



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

ESTUDIO DE LA SÍNTESIS DE METABOLITOS ANTIFÚNGICOS EN *Bacillus velezensis* 83 ASOCIADA A LA DINÁMICA POBLACIONAL Y TRANSCRIPCIONAL DURANTE SU INTERACCIÓN *in vitro* CON *Colletotrichum gloeosporioides*

TESIS

QUE PARA OPTAR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

M.C. AGUSTÍN LUNA BULBARELA

TUTOR PRINCIPAL

DR. LEOBARDO SERRANO CARREÓN
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL

DR. GERARDO CORZO BURGUETE
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA UNAM
DRA. MARÍA ESPERANZA MARTÍNEZ ROMERO
CENTRO DE CIENCIAS GENÓMICAS UNAM

CIUDAD DE MÉXICO. MAYO, 2024



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo fue realizado en el **Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (IBt-UNAM)** en el **Departamento de Ingeniería y Biocatálisis** bajo la dirección del Dr. Leobardo Serrano Carreón y la asesoría tanto de la Dra. María Esperanza Martínez Romero así como el Dr. Gerardo Corzo Burguete. La preparación y desarrollo del proyecto se realizó dentro del Grupo de Ingeniería de Bioprocesos a cargo del Dr. Enrique Galindo.

Durante la realización de este trabajo, se contó con una beca de doctorado otorgada por el Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT, 404462). Asimismo, se contó con el apoyo económico de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM) y el CONAHCyT a través de los proyectos IG200618/IN206715 y 247473, respectivamente.

DEDICATORIA

A mis padres, el I.C. Agustín Luna Serna† y la Sra. Irene Bulbarela García.

A mi tutora, la M.C. Edith Aidée Cárdenas Uribe.

A mis amigos, el Ing. Jalil Saab Hassanille† y el Ing. Emanuel Rafael Montesinos Fernández†.

AGRADECIMIENTOS

Al **Dr. Leobardo Serrano Carreón**, por su guía como un tutor que siempre brindo su apoyo y amistad, en forma de consejos y crítica constructiva.

Al **Dr. Enrique Galindo Fentanes**, por la oportunidad de permitirme formar parte de su equipo de investigación y por todos sus aportes para la realización de este proyecto.

Al comité tutorial, por sus enseñanzas y colaboración para el desarrollo del trabajo.

Dr. Gerardo Corzo Burguete

Dra. María Esperanza Martínez Romero

A los miembros del jurado, por su apoyo y enseñanzas.

Dr. Agustín López Munguía Canales

Dra. Rosa María Gutiérrez Ríos

Dr. Mario Alberto Serrano Ortega

Dr. José Utrilla Carreri

Dra. Sara Guillermina Centeno Leija

A los miembros de la Unidad de Escalamiento y Planta Piloto del IBt, por su apoyo técnico.

M.C. José Raunel Tinoco Valencia

Ing. Verónica Albiter Hernández

Biol. Mario Alberto Caro Bermúdez

A los integrantes del Grupo Galindo, por su apoyo técnico y amistad.

Dr. Carlos Felipe Peña Malacara

Dra. Celia Flores Ocampo

Dr. Sergio Andrés Cristiano Fajardo

M.C. Lorena Yamileth Balón Rosas

A mis compañeros, por su fraternidad.

Dra. Jimena Isaías Cid Uribe

Dr. Juan Carlos Fragoso Jiménez

Dra. María Teresa Romero-Gutiérrez

Dr. Sebastián González Villareal

A los investigadores del Instituto de Biotecnología, por su invaluable e incondicional apoyo.

Dr. Ernesto Ortiz Suri

Dra. Georgina Gurrola Briones

Dr. Fernando Zamudio Zúñiga

Dr. Lorenzo Patrick Segovia Forcella

A todas aquellas valiosas personas del Instituto de Biotecnología que se preocuparon por mí y me proporcionaron su ayuda incondicional.



PROTESTA UNIVERSITARIA DE INTEGRIDAD Y HONESTIDAD ACADÉMICA Y PROFESIONAL

(Graduación con trabajo escrito)

De conformidad con lo dispuesto en los artículos 87, fracción V, del Estatuto General, 68, primer párrafo, del Reglamento General de Estudios Universitarios y 26, fracción I, y 35 del Reglamento General de Exámenes, me comprometo en todo tiempo a honrar a la Institución y a cumplir con los principios establecidos en el Código de Ética de la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente con los de integridad y honestidad académica.

De acuerdo con lo anterior, manifiesto que el trabajo escrito titulado: **Estudio de la síntesis de metabolitos antifúngicos en *Bacillus velezensis* 83 asociada a la dinámica poblacional y transcripcional durante su interacción *in vitro* con *Colletotrichum gloeosporioides*** que presenté para obtener el grado de Doctor es original, de mi autoría y lo realicé con el rigor metodológico exigido por mi programa de posgrado, citando las fuentes de ideas, textos, imágenes, gráficos u otro tipo de obras empleadas para su desarrollo.

En consecuencia, acepto que la falta de cumplimiento de las disposiciones reglamentarias y normativas de la Universidad, en particular las ya referidas en el Código de Ética, llevará a la nulidad de los actos de carácter académico administrativo del proceso de graduación.

Atentamente

Agustín Luna Bulbarela
513026418

ÍNDICE GENERAL

Resumen	xi
I. Marco teórico y antecedentes	1
1.1 Introducción a la ecología microbiana de bacterias y hongos asociados a plantas	1
1.2 <i>Bacillus velezensis</i> y <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , un caso de estudio para entender las interacciones entre agentes de control biológico y hongos fitopatógenos.	2
1.3 Mecanismos de ataque y defensa en <i>Bacillus</i> spp.....	3
1.3.1 Mecanismos de ataque en <i>Bacillus</i> spp.	3
1.3.2 Mecanismos de defensa en <i>Bacillus</i> spp.	7
1.4 Casos de estudio de la interacción entre <i>Bacillus</i> spp. y hongos fitopatógenos. Estrategias y fenotipos	8
1.5 Antecedentes	14
II. Hipótesis y objetivos	17
III. Estrategia experimental	18
3.1 Estudio <i>in vitro</i> de la dinámica poblacional entre <i>B. velezensis</i> 83 y <i>C. gloeosporioides</i> mediante un sistema de interacción directa	18
3.2 Evaluación de la viabilidad celular y acumulación de lipopéptidos durante la interacción	19
3.3 Estudio de la respuesta transcriptómica de <i>B. velezensis</i> 83 debido a los efectos del tiempo e interacción microbiana bajo condiciones de no limitación nutricional	19
IV. Materiales y métodos	21
4.1 Microorganismos.....	21
4.2 Ensayos de interacción en cultivo lote.....	21
4.2.1 Inóculo fúngico.....	21
4.2.2 Inóculo de la bacteria.....	21
4.2.3 Cultivos axénicos y co-cultivo.....	21
4.2.4 Análisis estadístico de los ensayos de interacción.....	21
4.3 Métodos analíticos	22
4.3.1 Cuantificación del crecimiento celular	22
4.3.2 Cuantificación de glucosa	22
4.3.3 Cuantificación de lipopéptidos	22
4.3.4 Cuantificación de ácido poli- γ -glutámico (γ -PGA) y determinación de viscosidad	22

4.4 Ensayos de viabilidad celular.....	23
4.4.1 Tinciones.....	23
4.4.2 Microscopía de fluorescencia	23
4.4.3 Citometría de flujo.....	23
4.5 Análisis transcriptómicos	23
4.5.1 Aislamiento y secuenciación de ARN	23
4.5.2 Análisis de expresión diferencial (DEA)	24
V. Resultados y discusión.....	25
5.1 Dinámica de poblaciones durante escenario curativo y preventivo.....	25
5.2 Secuenciación masiva de ARN (<i>RNA-seq</i>) y resultados globales del análisis transcriptómico.....	29
5.3 Clasificación por grupos de ortología de los DEGs derivados del efecto de la interacción microbiana	30
5.4 Efecto de la interacción microbiana sobre los mecanismos de DEFENSA en <i>B. velezensis</i> 83	33
5.4.1 Regulación positiva de deshidrogenasas dependientes de SigB y enzimas con funciones antioxidantes	36
5.4.2 Regulación positiva de mecanismos de protección del ADN.....	37
5.4.3 Regulación positiva del transporte de metales y su papel protector durante el estrés oxidativo	37
5.4.4 Regulación positiva del control de calidad de la síntesis de proteínas y homeostasis del Zn	38
5.5 La reestructuración del metabolismo central en células co-cultivadas de <i>B. velezensis</i> 83 actúa de forma cooperativa con la respuesta general al estrés y REO.....	40
5.5.1 Regulación positiva de proteínas no dependientes de SigB relacionadas al control del estado redox y del metabolismo anaerobio	40
5.5.2 Regulación negativa de la ruta de las pentosas fosfato y biosíntesis de pirimidina	43
5.5.3 Regulación positiva para la asimilación y biosíntesis de aminoácidos antioxidantes	43
5.6 Regulación negativa del catabolismo de fuentes alternativas de carbono en células co-cultivadas de <i>B. velezensis</i> 83: un síntoma de versatilidad metabólica reducida.....	44
5.6.1 Catabolismo de fuentes alternativas de carbono de origen vegetal	45
5.6.2 Análisis de expresión de genes relacionados a la degradación de pared celular de hongos	46
5.7 Análisis transcriptómico de las vías de diferenciación celular en <i>B. velezensis</i> 83.....	47
5.7.1 Dinámica transcripcional de las vías de diferenciación celular en el cultivo axénico	48
5.7.2 Efecto de la interacción microbiana sobre las vías de diferenciación celular y la producción de γ -PGA.....	51

5.8 Efecto de la interacción sobre la transcripción de las vías de desintoxicación del metilglioxal	52
5.9 Efecto de la interacción sobre la expresión de genes correspondientes a PBPs y proteínas de resistencia a antibióticos ..	55
5.10 Análisis de los mecanismos de ATAQUE en <i>B. velezensis</i> 83 durante la interacción con <i>C. gloeosporioides</i> 09	58
5.10.1 Efecto de lipopéptidos producidos por <i>B. velezensis</i> 83 sobre la viabilidad de <i>C. gloeosporioides</i> bajo diferentes estados fisiológicos.....	58
5.10.2 Producción de lipopéptidos y efecto de la interacción sobre la viabilidad de <i>C. gloeosporioides</i>	60
5.10.3 Dinámica transcripcional de los genes relacionados a la antibiosis	61
5.10.4 Análisis de la carga transcripcional de los genes requeridos para la antibiosis en <i>B. velezensis</i> 83.....	63
5.11 Discusión final.....	66
VI. Conclusiones	68
VII. Reflexiones, alcances de la investigación y perspectivas.....	69
VIII. Referencias	71
IX. Producción científica, formación de recursos humanos y difusión	79
X. Anexos.....	80

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tablas

1. Genes principales relacionados a la biosíntesis de péptidos no ribosomales en <i>B. velezensis</i> 83	4
2. Genes relacionados a la biosíntesis, procesamiento postraduccional y autoinmunidad de la amilociclicina en <i>B. velezensis</i> 83.	5
3. Genes principales y/o accesorios relacionados a la biosíntesis de policétidos en <i>B. velezensis</i> 83	6
4. Aspectos moleculares y fenotipos desarrollados durante interacciones interespecíficas benéficas entre <i>Bacillus</i> spp. y hongos filamentosos. Comensalismo y mutualismo	10
5. Aspectos moleculares y fenotipos desarrollados durante interacciones interespecíficas no beneficiosas entre <i>Bacillus</i> spp. y hongos filamentosos. Competencia	10
6. Aspectos moleculares y fenotipos desarrollados durante interacciones interespecíficas no beneficiosas entre <i>Bacillus</i> spp. y hongos filamentosos. Amensalismo	11
7. Diseño de toma de muestras para análisis de expresión diferencial y planteamiento de hipótesis	20

Figuras

1. Metabolitos antimicrobianos producidos por <i>Colletotrichum</i> spp.....	2
2. Potencial biotecnológico de <i>B. velezensis</i> 83.....	15
3. Modelo de interacción <i>in vitro</i> entre <i>B. velezensis</i> 83 y <i>C. gloeosporioides</i>	18
4. Distribución de biomasa y acumulación de lipopéptidos durante el escenario de interacción curativo	26
5. Análisis de viabilidad de suspensiones celulares de <i>B. velezensis</i> 83.....	27
6. Distribución de biomasa durante el escenario de interacción preventivo.....	28
7. Resultados globales del análisis de expresión diferencial (DEA).....	29
8. Clasificación ortológica de los DEGs por efecto de la interacción microbiana	31
9. Análisis de expresión diferencial de factores sigma (σ) en <i>B. velezensis</i> 83	32
10. DEA de la ruta de activación de la respuesta a estrés en células co-cultivadas de <i>B. velezensis</i> 83	33
11. Regulación positiva de los mecanismos de defensa en células co-cultivadas de <i>B. velezensis</i> 83.....	35
12. Efectos de la interacción sobre la expresión de genes del metabolismo anaerobio y la síntesis de ARN	41
13. Efectos de la interacción sobre la expresión de genes para la biosíntesis de Cys/Met	44
14. Efecto de la interacción sobre la expresión de genes del metabolismo de carbohidratos	45
15. Dinámica transcripcional de las rutas de diferenciación celular y <i>quorum sensing</i>	49
16. Cambios transcripcionales en el sistema de regulación DegU/S y los genes biosintéticos de γ -PGA por efecto de la interacción.....	51
17. Efecto de la interacción sobre la expresión de genes implicados en la respuesta a antibióticos y las rutas de detoxificación de metilglixal.....	53
18. Efecto dosis-respuesta de la bacilomicina D sobre la integridad de membrana de <i>C. gloeosporioides</i> 09	59
19. Efecto del co-cultivo sobre la integridad de membrana en <i>C. gloeosporioides</i> 09	61
20. Dinámica transcripcional de los genes para la biosíntesis de antibióticos en <i>B. velezensis</i> 83	62
21. Carga transcripcional de los genes de biosíntesis de antibióticos en <i>B. velezensis</i> 83	65

22. Tesis del paralelismo entre la estrategia simultánea de ataque y defensa en células co-cultivadas de <i>B. velezensis</i> 83 y la estrategia de falange griega.....	68
23. Retos para la producción de metabolitos, enzimas y esporas de <i>Bacillus</i> derivados de la heterogeneidad y la desincronización celular	70

ANEXOS

Tablas suplementarias

1S. Análisis de homología y clasificación funcional de los genes diferencialmente expresados en células co-cultivadas de <i>Bacillus velezensis</i> 83.....	80
2S. Genes relacionados a la respuesta general al estrés. Regulón del factor sigma alternativo sensible al estrés general SigB (σ^B) en <i>B. velezensis</i> 83	82

Figuras suplementarias

1S. Controles para analizar viabilidad de suspensiones celulares miceliares y de bacteria	83
2S. Validación de la integridad de muestras de ARN, calidad y profundidad de la secuenciación masiva	84
3S. Reproducibilidad de librerías y resultados globales del análisis de expresión diferencial	84
4S. Clasificación ortológica de los genes pertenecientes al regulón del factor sigma alternativo SigB (σ_B) derivados del efecto de la interacción microbiana	85
5S. Dinámica transcripcional de las rutas centrales del metabolismo encargadas de la biosíntesis de precursores de metabolitos antimicrobianos en <i>B. velezensis</i> 83 durante cultivos axénicos	85

RESUMEN

El uso de fertilizantes químicos y pesticidas se ha incrementado significativamente con el objetivo de solventar las necesidades de alimento de una población en constante crecimiento. Sin embargo, estos productos ocasionan la contaminación de los campos agrícolas y el desarrollo de resistencia por parte de los patógenos. La tendencia a nivel mundial es el de sustituir estas prácticas agrícolas convencionales hacia modelos más sustentables, como el uso de agentes de control biológico.

El control biológico describe al empleo de organismos que son enemigos naturales de los fitopatógenos, con el fin de controlar su incidencia y disminuir sus efectos dañinos en las plantas. Bacterias empleadas como agentes de control biológico, tales como *Bacillus* spp., son microorganismos capaces de establecer asociaciones benéficas con las plantas que poseen la capacidad inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos a través de la síntesis de una amplia variedad de metabolitos antimicrobianos. En el contexto de las aplicaciones agrícolas, una mejor comprensión de las interacciones entre los hongos fitopatógenos y agentes de control biológico, incluyendo los fenotipos que se desarrollan durante las mismas, proporciona elementos clave para establecer estrategias de control biológico racionales, evaluar su comportamiento y posible impacto en el ecosistema.

El presente trabajo es un estudio de una interacción *in vitro* entre dos microorganismos modelo de relevancia socioeconómica, utilizando un enfoque de dinámica de poblaciones y estudios transcripcionales con el objetivo de contribuir en el entendimiento de las estrategias de ataque y defensa empleadas por *Bacillus velezensis* durante su interacción con hongos fitopatógenos. A partir de co-cultivos *in vitro* en biorreactor agitado entre *Bacillus velezensis* 83, el principio activo del biofungicida Fungifree AB, y el hongo fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides*, el agente causante de la antracnosis del mango, se evaluó la dinámica de poblaciones de ambos microorganismos así como la respuesta metabólica (síntesis de compuestos antimicrobianos) y transcriptómica de la bacteria en condiciones de no limitación.

Bajo las condiciones de interacción estudiadas, la presencia de *Colletotrichum gloeosporioides* modifica el perfil de crecimiento y expresión génica en *Bacillus velezensis*. Esta respuesta involucra cambios en el nivel de expresión de alrededor del 10 % de sus secuencias codificantes y consiste en el desarrollo de un fenotipo especializado en la defensa contra múltiples factores de estrés. Sin embargo, tal como sugieren los transcriptomas de células co-cultivadas de *Bacillus velezensis* 83, la activación de la respuesta al estrés es energéticamente demandante, lo que hace necesario una redistribución de recursos y energía, en favor de la activación de mecanismos de defensa. Aquí, el regulón de SigB, permite a la bacteria atenuar los efectos negativos de diversos factores de estrés y representa un factor determinante para preservar la viabilidad de su población a largo plazo. Además, los transcriptomas estudiados revelaron que independientemente de la interacción microbiana, la bacteria sobre-expresa simultáneamente múltiples genes biosintéticos asociados a su crecimiento, sugiriendo la producción de una mezcla compleja de antibióticos, incluyendo péptidos no ribosomales y policétidos. Esta habilidad de *B. velezensis* para producir múltiples compuestos antimicrobianos aún en ausencia de competidores, es una de las bases de su capacidad para ejercer control biológico hacia hongos fitopatógenos.

De acuerdo con nuestros resultados, la respuesta a la interacción de *B. velezensis* 83 se asemeja a la estrategia utilizada por una formación de falange griega clásica: al sacrificar su tasa de crecimiento y la versatilidad metabólica, los recursos se pueden redistribuir hacia la defensa (fenotipo resistente al estrés) mientras se mantiene el ataque (capacidad de antibiosis).

I. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES

1.1 Introducción a la ecología microbiana de bacterias y hongos asociados a plantas.

En la naturaleza, los hongos y bacterias asociados con plantas entablan interacciones ecológicas interespecíficas impactando directamente sobre la salud de su huésped (Frey-Klett *et al.*, 2011; Ghoul y Mitri, 2016; Nanjundappa *et al.*, 2019). Durante estas interacciones, estos microorganismos despliegan fenotipos específicos tales como el metabolismo cooperativo (*metabolite cross-feeding*) acontecido durante el comensalismo (Worrich *et al.*, 2016) y el mutualismo (Abeyasinghe *et al.*, 2020), o la producción selectiva de metabolitos antimicrobianos y proteínas de resistencia como ocurre en la competencia (Vallet *et al.*, 2017) y el amensalismo (Ola *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2014; Albarracín-Orio *et al.*, 2020). El resultado de estas interacciones es relevante para el desarrollo y fisiología de sus poblaciones (Albarracín-Orio *et al.*, 2020) e influye directamente sobre su supervivencia (Worrich *et al.*, 2016), patogenicidad (de ser este el caso, Han *et al.*, 2021), la simbiosis con otros microorganismos y la colonización de nichos (Artursson y Jansson, 2003; Abeyasinghe *et al.*, 2020), cerrándose así una compleja red de relaciones con el huésped. No obstante, para que esto pueda ocurrir es necesario que se establezca una comunicación y reconocimiento químico entre ambas partes.

El contacto directo entre hongos y bacterias puede ser determinante para entablar sus distintas relaciones benéficas (Worrich *et al.*, 2016) o antagónicas (Zhang *et al.*, 2014). El mutualismo entre *Bacillus* spp. y hongos micorrízicos arbusculares, ambos microorganismos asociados directamente a las raíces de las plantas, es un ejemplo de esto (Artursson y Jansson, 2003). No obstante, bacterias como *Bacillus subtilis* pueden colonizar el micelio tanto de hongos benéficos de las plantas (*Glomus dussii*) como de fitopatógenos (e.g. *Pythium ultimum* y *Fusarium oxysporum*), una estrategia que les da acceso a nutrientes y agua (Artursson y Jansson, 2003; Worrich *et al.*, 2016; Abeyasinghe *et al.*, 2020). Inclusive, otras bacterias pueden presentar micofagia, un tipo de depredación en la que obtienen nutrientes a expensas de las hifas de los hongos (de Boer y col. 2005). Si bien aún no se entiende del todo, la comunicación entre hongos y bacterias puede ocurrir gracias al reconocimiento de componentes de la pared o membrana celular (Peng *et al.* 2001; Frey-Klett *et al.*, 2011). Proteínas como las lectinas fungen como receptores de azúcares, incluyendo residuos de manosa y galactosa presentes en la superficie de hongos (Peng y col. 2001), tal como ocurre en la co-floculación de levaduras (*Schizosaccharomyces pombe*) y bacterias ácido lácticas (*Pediococcus damnosus*).

La comunicación entre bacterias y hongos también puede llevarse a cabo indirectamente a través del intercambio y/o conversión de metabolitos (Schouten *et al.*, 2008) o los cambios fisicoquímicos generados en su ambiente como efecto secundario de su metabolismo (como el agotamiento de los nutrientes disponibles). Aquí, las moléculas difusibles como antibióticos (Vallet *et al.*, 2017), compuestos orgánicos volátiles (Yuan *et al.*, 2012) y nutrientes (Abeyasinghe *et al.*, 2020) juegan un importante rol en las interacciones porque gracias a la quimiotaxis, el fenómeno descrito como el movimiento dirigido por un gradiente de concentración (de Weert *et al.*, 2004), facilita la migración de estos microorganismos hacia ambientes ricos en sustratos o su distanciamiento de sustancias tóxicas. Por ejemplo, diversas especies de *Pseudomonas* son capaces de reconocer exudados miceliares como el ácido fusárico (de Weert y col. 2004), desplegando quimiotaxis. Dentro del intercambio y conversión de metabolitos, la dualidad entre antibiosis y proteínas de resistencia es uno de los fenómenos más conocidos de ataque y defensa. La antibiosis consiste en la síntesis y difusión de metabolitos tóxicos por parte de bacterias u hongos, los cuales pueden inhibir las funciones celulares de los microorganismos no productores. Por su parte, el microorganismo sujeto a esta situación de estrés debe responder mediante la síntesis de proteínas de resistencia para evitar los efectos dañinos producidos por estas moléculas (Schoonbeek *et al.*, 2002; Schouten *et al.*, 2008). Enzimas para su degradación o la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) que propician su detoxificación, como ocurre con las lacasas producidas por

hongos, son algunos ejemplos (Schouten *et al.*, 2008). Tanto hongos como bacterias también pueden modular las condiciones fisicoquímicas del ambiente a través de su metabolismo. Algunos hongos son capaces de producir ácidos orgánicos para acidificar el medio, alterando el ambiente hacia uno poco favorable para la producción de antibióticos (Riedlinger y col. 2006). Inclusive pueden interrumpir el *quorum sensing* y la producción de antibióticos en bacterias (Schouten *et al.*, 2004; Rasmussen *et al.*, 2005; van Rij *et al.*, 2005, Singh *et al.*, 2022) evitando la colonización de su nicho. Por tal motivo, resulta esencial para las bacterias benéficas asociadas a plantas, la previa colonización del tejido vegetal a través de la formación de biopelículas (Vlamakis *et al.*, 2013).

1.2 *Bacillus velezensis* y *Colletotrichum gloeosporioides*, un caso de estudio para entender las interacciones entre agentes de control biológico y hongos fitopatógenos.

En el contexto de las aplicaciones agrícolas, una mejor comprensión de las interacciones entre los hongos fitopatógenos (PFs) y rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPRs), así como de los fenotipos que se desarrollan durante las mismas proporciona elementos clave para mejorar las estrategias de control biológico, evaluar su comportamiento y posible impacto en el ecosistema.

Entre los primeros, *Colletotrichum* spp. son PFs de gran importancia socio-económica porque son los agentes causantes de la antracnosis o tizón en una amplia gama de cultivos y plantas ornamentales de alto valor agregado (cítricos, mango, vid, aguacate, fresa; Weir *et al.* 2012) y se consideran el género modelo predilecto para estudiar la diferenciación de estructuras de infección en hongos hemibiotróficos (Perfect *et al.*, 1999). Estos hongos fitopatógenos desarrollan estructuras infecciosas especializadas, como apresorios e hifas necrotróficas, que les permiten penetrar el tejido vegetal y alimentarse del mismo (Perfect y col. 1999). Así mismo, también se conoce su capacidad para sintetizar múltiples compuestos bioactivos con actividad antimicrobiana, incluyendo contra bacterias Gram-positivas como *Bacillus* spp., lo cual también resalta su potencial biotecnológico (Fig. 1).

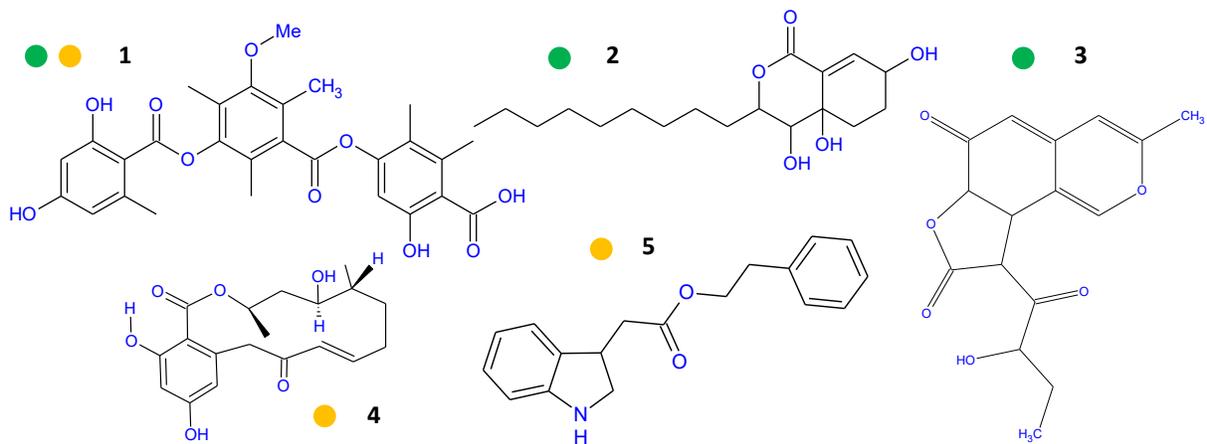


Figura 1. Metabolitos antimicrobianos producidos por *Colletotrichum* spp. Ácido colletotrico (1), collectindolida (2), colletotrichinona (3), monocilina (4) y fenil-etil-indol-acetato (5). (Lu *et al.*, 2000; Zou *et al.*, 2000; Wicklow *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2016; Williams *et al.*, 2021; Riga *et al.*, 2023). Los círculos amarillos y verdes indican compuestos con actividad antifúngica y antibacterial, respectivamente.

Por otro lado, entre las especies de PGPR más comercializadas como agentes de control biológico (BCA), *Bacillus velezensis*, representa un modelo interesante para estudios de interacción PGPR-PF, ya que pertenece a un grupo bacteriano abundante en la rizosfera (Mendes *et al.*, 2013; Balderas- Ruíz *et al.*, 2021). A diferencia de *Bacillus subtilis* 168, el modelo clásico de diferenciación celular en bacterias Gram-positivas (López *et al.*, 2009), *Bacillus velezensis* (antes *B. amyloliquefaciens*, Dunlap *et al.*, 2016), es una especie genéticamente divergente con un estilo de vida

asociado a las plantas, capaz de estimular su crecimiento y suprimir fitopatógenos (Balderas-Ruíz *et al.* 2020). Del mismo modo que *Colletotrichum* spp., estas bacterias son capaces de sintetizar múltiples metabolitos bioactivos como parte fundamental de sus estrategias de ataque, las cuales se abordan a continuación.

1.3 Mecanismos de ataque y defensa en *Bacillus* spp.

1.3.1 Mecanismos de ataque en *Bacillus* spp. Numerosos estudios indican que la inoculación de plantas con diversas especies de *Bacillus* es una forma eficiente para disminuir la incidencia de enfermedades ocasionadas por fitopatógenos (Jetiyanon, 2007; Thasana *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2011; Mochizuki *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2022). Para lograr dichos efectos, estas bacterias emplean diversos mecanismos como la competencia por espacio y nutrientes, la antibiosis y la inducción de la resistencia sistémica en las plantas huésped (IRS) (Ongena y Jacques 2007; Correa y Soria, 2010; Liu *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2014; Torres *et al.*, 2016).

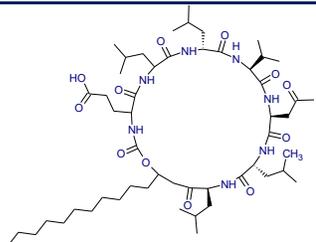
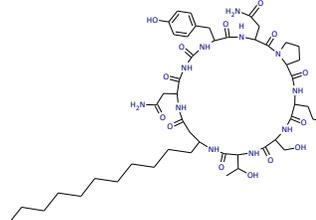
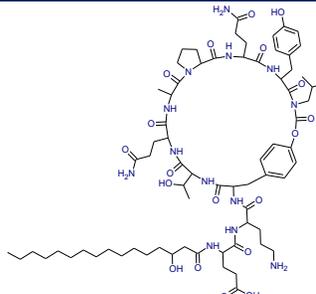
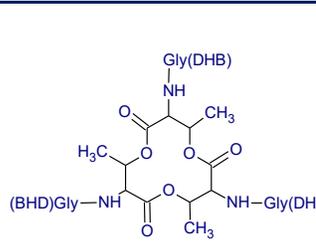
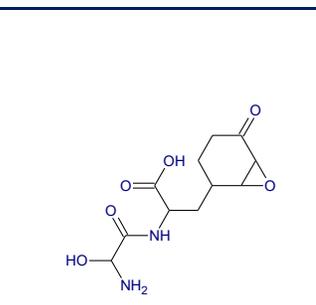
Este género es altamente eficiente para competir y secuestrar nutrientes derivados de los exudados de la raíz, debido tanto a su más alta velocidad de crecimiento en comparación a hongos filamentosos como a su capacidad de establecerse mediante la formación de *biofilm* (Vlamakis *et al.*, 2013). Así mismo, estas bacterias son capaces de sintetizar una amplia variedad de metabolitos con actividad antimicrobiana, incluyendo antibióticos, enzimas y compuestos orgánicos volátiles (Tran *et al.*, 2022; Chen *et al.*, 2009a), los cuales perturban el desarrollo y fisiología de los hongos filamentosos, ocasionando anomalías morfológicas en el micelio (Zhang *et al.*, 2014), dañando sus estructuras reproductivas (Torres *et al.*, 2016), inhibiendo la germinación de sus estructuras de resistencia (esporas, Liu *et al.*, 2011), e incluso ocasionando la sub-expresión de genes relacionados a su patogenicidad (Han *et al.*, 2021). De acuerdo con sus blancos y mecanismos de acción estos metabolitos se clasifican como:

A) Permeabilización de la membrana plasmática. Dentro de esta categoría resaltan lipopéptidos cíclicos como la bacilomicina D, fengicina y la surfactina, los cuales provocan cambios morfológicos en la membrana plasmática de los hongos (Tabla 1). La bacilomicina D es un lipopéptido con actividad antifúngica que provoca alteración de la membrana y pérdida de viabilidad celular (Zhao *et al.*, 2017, Luna-Bulbarela *et al.*, 2018). Así mismo, la fengicina es otro lipopéptido cíclico con actividad antifúngica que provoca la permeabilización de la membrana y muestra efectos dependientes de la concentración que van desde la inducción de la apoptosis hasta la necrosis en hongos (Zhao *et al.*, 2017).

Por su lado, la surfactina es un heptapéptido cíclico unido a un ácido graso β -hidroxilado, una estructura le que confiere fuertes propiedades tensoactivas y que puede provocar, dependiendo de la concentración, la permeabilización de membranas biológicas mediante la formación de canales, o la solubilización mediante un mecanismo similar a un detergente (Deleu *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2017). En el caso de la bacilomicina D, la presencia de un residuo de tirosina en su estructura le confiere afinidad hacia los esteroides, provocando su unión a membranas fúngicas con mayor afinidad, a diferencia de la surfactina quien no la presenta. Según estudios de dinámica molecular, se sugirió que la fengicina forma oligómeros más estables en las membranas fúngicas en comparación con las membranas bacterianas (Sur *et al.*, 2018).

Los lipopéptidos antifúngicos producidos por *Bacillus* spp. están involucrados en el biocontrol de numerosos hongos fitopatógenos, incluyendo *Paraconiothyrium variable* (Vallet *et al.*, 2017), *Macrophomina phaseolina* (Torres *et al.*, 2016), *Monilinia fructicola* (Liu *et al.*, 2011), *Verticillium dahliae*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani*, múltiples especies *Fusarium* (Li *et al.*, 2014), entre muchos otros. De hecho, mutantes no productoras de estos lipopéptidos (*B. amyloliquefaciens* C06 Δ *sfp*) pierden su capacidad de biocontrol, lo que resalta su importancia (Liu *et al.*, 2011).

Tabla 1. Genes principales relacionados a la biosíntesis de péptidos no ribosomales en *B. velezensis* 83.

Gen	Proteína	AA	Producto y mecanismo	Estructura
<i>srfAA</i>	Sintasa de péptido no ribosomal Ensamble de secuencia (Glu-Leu-Leu)	3584	Surfactina <i>Lipopéptido cíclico</i> Permeabilización de membrana ● Antibacterial ● Antifúngico	
<i>srfAB</i>	Sintasa de péptido no ribosomal Ensamble de secuencia (Val-Asp-Leu)	3586		
<i>srfAC</i>	Sintasa de péptido no ribosomal Ensamble de secuencia (Leu)	1278		
<i>srfAD</i>	Sintasa de surfactina Subunidad tioesterasa/aciltransferasa	243		
<i>bmyC</i>	Sintasa de péptido no ribosomal Ensamble (Ser-Thr) y tioesterasa	2619	Bacilomicina D <i>Lipopéptido cíclico</i> Permeabilización de membrana ● Antifúngico	
<i>bmyB</i>	Sintasa de péptido no ribosomal Ensamble de secuencia (Tyr-Asn-Pro-Glu)	5363		
<i>bmyA</i>	Sintasa híbrida PKS/NRPS* Ensamble de secuencia (ácido graso, Asn)	3982		
<i>bmyD</i>	Malonil-CoA transferasa	400		
<i>fenE</i>	Sintasa de péptido no ribosomal Ensamble de secuencia (Ile) y tioesterasa	1267	Fengicina/Plipastatina <i>Lipopéptido cíclico</i> Permeabilización de membrana ● Antifúngico	
<i>fenD</i>	Sintasa de péptido no ribosomal Ensamble de secuencia (Pro-Gln-Tyr)	3591		
<i>fenC</i>	Sintasa de péptido no ribosomal Ensamble de secuencia (Glu-Ala/Val)	2549		
<i>fenB</i>	Sintasa de péptido no ribosomal Ensamble de secuencia (Tyr-Thr)	2565		
<i>fenA</i>	Sintasa de péptido no ribosomal Ensamble de secuencia (Glu-Orn)	2552		
<i>dhbF</i>	Sintasa de péptido no ribosomal	2375	Bacilibactina <i>Sideróforo catecólico</i> Secuestro de Fe ● Antibacterial	
<i>dhbB</i>	Iso-corismatasa / liasa	308		
<i>dhbE</i>	(2,3-DHB)* adenilato sintasa	541		
<i>dhbC</i>	Iso-corismato sintasa	398		
<i>dhbA</i>	2,3-DH*-2,3-DHB* deshidrogenasa	261		
<i>bacG</i>	Reductasa dependiente de NADH Síntesis de epoxi-4S-H ₂ HPP	259	Bacilisina <i>Dipéptido</i> Inhibición de la glucosamina 6-fosfato sintasa ● Antibacterial ● Antifúngico	
<i>bacF</i>	Aminotransferasa Síntesis de Di-hidro-anticapsina	399		
<i>bacE</i>	Transportador tipo MFS* de bacilisina	393		
<i>bacD</i>	Alanina-Anticapsina ligasa Ensamble final	472		
<i>bacC</i>	Di-hidro-anticapsina 7-deshidrogenasa Síntesis de anticapsina	253		
<i>bacB</i>	7R-en-H ₂ HPP* Oxidasa y 3E-ex-H ₂ HPP Isomerasa	236		
<i>bacA</i>	Prefenato deshidratasa/decarboxilasa	204		

*AA (Número de residuos de acuerdo con el tamaño de secuencia reportado en el genoma de *B. velezensis* 83), DH (Di-hidro), DHB (Di-hidroxi-benzoato), MFS (superfamilia principal de transportadores facilitadores), H₂HPP (Di-hidrofenilpiruvato), PKS/NRPS (sintasa híbrida de policétidos y péptidos no ribosomales). Anotación y/o estructuras mostradas corresponden a lo reportado por Stein (2005), Jacques (2011), Balderas-Ruiz *et al.*, (2020), Zhang *et al.*, (2020) e Islam *et al.*, (2022).

Además de los lipopéptidos, la amilociclicina, un péptido ribosomal de alrededor de 64 residuos (6,381 Da) está relacionada a la permeabilización de membranas (Tabla 2). Este metabolito corresponde a una bacteriocina circular con actividad antibacteriana, caracterizada por primera vez en *B. amyloliquefaciens* FZB42 (Scholz *et al.*, 2014). Esta presenta una fuerte actividad contra otros microorganismos Gram-positivos, incluyendo *B. subtilis*, y aunque se desconoce su mecanismo de acción, es probable que sea similar al de otras bacteriocinas por su grado de similitud. Por ejemplo, tiene un punto isoeléctrico elevado (PI= 9.8) (Scholz *et al.*, 2014), lo que a pH fisiológico le conferirá carga positiva, facilitando su inserción a la membrana y la formación de poros, causando permeabilización.

Tabla 2. Genes relacionados a la biosíntesis, procesamiento postraduccional y autoinmunidad de la amilociclicina en *B. velezensis* 83.

Gen	Proteína	AA*	Producto y mecanismo	Estructura
<i>acnF</i>	Proteína transmembranal Autoinmunidad. No esencial para síntesis.	73	Amilociclicina <i>Bacteriocina circular</i> <i>Formación de poros</i> <ul style="list-style-type: none"> ● Antibacterial 	Carboxilo terminal -W ₆₄ AAAYKKGYKKIMTKATAVI AYSIAGAGTVIGILSISAITSAADI IDIAKKAATSIGLTSAL ₁ - Amino terminal
<i>acnE</i>	Proteína de transportador ABC Autoinmunidad	175		
<i>acnD</i>	ATP-PB* de transportador ABC Autoinmunidad	234		
<i>acnC</i>	Proteína de maduración Autoinmunidad y esencial para la síntesis	551		
<i>acnA</i>	Bacteriocina circular Pre-péptido	111		
<i>acnB</i>	Proteína transmembranal Esencial para la síntesis	190		

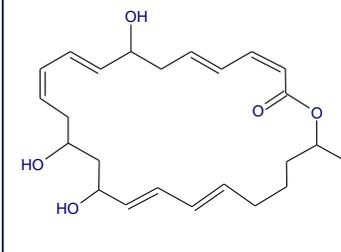
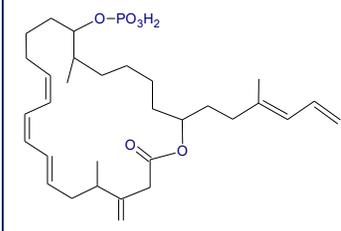
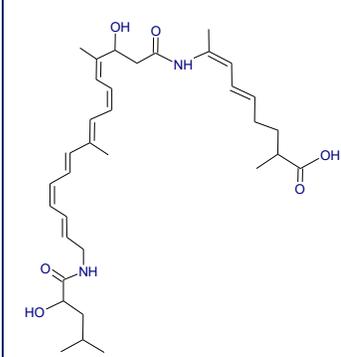
*AA (Número de residuos de acuerdo con el tamaño de secuencia reportado en el genoma de *B. velezensis* 83),*ATP-PB (Proteína de unión a ATP). Las funciones de las proteínas involucradas y la estructura indicada en la tabla corresponden a lo reportado por Scholz *et al.*, 2014, Chowdhury *et al.*, 2015 y Balderas-Ruiz *et al.*, (2020).

B) Interferencia en la asimilación de nutrientes. La bacilibactina es un sideróforo implicado en la quelación del Fe³⁺ del medio extracelular para su posterior transferencia al citoplasma mediante transportadores ABC (Tabla 1). Este es producido por *Bacillus* spp. durante la limitación de hierro y puede tener efectos inhibidores contra otras bacterias como *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* (Pi y Helmann, 2017; Chakraborty *et al.*, 2022; Liu *et al.*, 2023).

C) Inhibición de la síntesis de pared celular. Aquí pertenece la bacilisina, un dipéptido antimicrobiano constituido por un residuo L-Ala unido al aminoácido no proteínogénico L-anticapsina. Este actúa sobre bacterias u hongos interfiriendo con la formación de la pared celular mediante la inhibición de la glucosamina 6-fosfato sintasa (Özcengiz y Ögülür, 2015; Tabla 1).

D) Inhibición de la síntesis de proteínas. Tres policétidos entran en esta categoría: la macrolactina, la difidina y el bacilaeno, los cuales inhiben la síntesis de proteínas (Aleti *et al.*, 2015; Tabla 3). La macrolactina conforma un grupo de antibióticos antibacterianos producidos por distintas especies de *Bacillus*, caracterizados por ser policétidos cíclicos adicionados de grupos acetato, malato o azúcares (Schneider *et al.*, 2007). La difidina es un policétido fosfatado altamente insaturado con actividad bactericida de amplio espectro (Gram-positivas y negativas), que inhibe la síntesis de proteínas (Zweerink y Edison, 1987; Tran *et al.*, 2022). Adicionalmente, este metabolito provoca la sub-expresión de genes relacionados con la división celular, la síntesis de proteínas y paredes celulares (Wu *et al.*, 2015). Como referencia, la inhibición de la síntesis de proteínas es compartida entre los policétidos como la eritromicina. Por su parte, el bacilaeno son un grupo de policétidos que comprenden enaminas poli-insaturadas (Chen *et al.*, 2009b,c; Aleti *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2021). Además de inhibir la síntesis de proteínas, este antibiótico tiene efectos sobre la formación de biopelículas, ya sea como potenciador en el caso de *Bacillus* (Li *et al.*, 2021) o como inhibidor en otras bacterias (Erega *et al.*, 2021). Mutantes de *Bacillus amyloliquefaciens* WH1 no productoras de difidina, pierden su capacidad de control biológico *in vitro* contra *Ralstonia solanacearum* (Liu *et al.*, 2023), lo cual resalta su importancia.

Tabla 3. Genes principales y/o accesorios relacionados a la biosíntesis de policétidos en *B. velezensis* 83.

Gen	Proteína	AA*	Producto y mecanismo	Estructura
<i>mInA</i>	Aciltransferasa/ Enoilreductasa	768	<p>Macrolactina <i>Trans-AT policétido tipo I</i></p> <p>Inhibición de la péptido deformilasa</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Antibacterial ● Antifúngico 	
<i>mInB</i>	Policétido sintasa tipo I	4088		
<i>mInC</i>	Policétido sintasa tipo I	1590		
<i>mInD</i>	Policétido sintasa tipo I	2903		
<i>mInE</i>	Policétido sintasa tipo I	2334		
<i>mInF</i>	Policétido sintasa tipo I	1904		
<i>mInG</i>	Policétido sintasa tipo I	2460		
<i>mInH</i>	Proteína multifuncional Deshidratasa/cetosintasa/Tioesterasa	1283		
<i>mInI</i>	Similar a β-lactamasa/transpeptidasa	353		
<i>dfnM</i>	Enoil-CoA hidratasa	248	<p>Dificidina <i>Trans-AT policétido tipo I</i></p> <p>Inhibición de síntesis de proteínas</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Antibacterial 	
<i>dfnL</i>	Hidroxi-metil-glutaril-CoA sintasa	415		
<i>dfnK</i>	Citocromo P450	384		
<i>dfnJ</i>	Policétido sintasa	2071		
<i>dfnI</i>	Policétido sintasa	2050		
<i>dfnH</i>	Policétido sintasa	2572		
<i>dfnG</i>	Policétido sintasa	5203		
<i>dfnF</i>	Policétido sintasa	1908		
<i>dfnE</i>	Proteína con dominio tipo KR*	2098		
<i>dfnD</i>	Policétido sintasa	4197		
<i>dfnC</i>	Oxidorreductasa de la familia SDR*	245		
<i>dfnB</i>	CoA ligasa de ácidos grasos	454		
<i>dfnX</i>	Proteína transportadora de acilo	90		
<i>dfnY</i>	D-fructosa-6-F-amidotransferasa	326		
<i>dfnA</i>	[ACP]* S-malonil transferasa	752		
<i>baeB</i>	Metalohidrolasa tipo MBL*	225	<p>Bacilaeno <i>Polieno</i></p> <p>Inhibición de la síntesis de proteínas</p> <p>Antibacterial</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Antibacterial ● Antifúngico 	
<i>baeC</i>	[ACP]* S-malonil transferasa	289		
<i>baeD</i>	Acil transferasa	324		
<i>baeE</i>	[ACP]* S-malonil transferasa	746		
<i>acpK</i>	Proteína transportadora de acilo	82		
<i>baeG*</i>	Hidroxi-metil-glutaril-CoA sintasa	420		
<i>baeH</i>	Enoil-CoA hidratasa/isomerasa	257		
<i>baeI</i>	Enoil-CoA hidratasa	249		
<i>baeJ</i>	Sintasa híbrida PKS/NRPS*	4983		
<i>baeL</i>	Policétido sintasa	4475		
<i>baeM</i>	Policétido sintasa	3511		
<i>baeN</i>	Sintasa híbrida PKS/NRPS*	5434		
<i>baeR</i>	Policétido sintasa	2485		
<i>baeS</i>	Citocromo P450	403		

*AA (Número de residuos de acuerdo con el tamaño de secuencia reportado en el genoma de *B. velezensis* 83), *ACP (Proteína portadora de acilos), *KR (Dominio tipo Kringle), *SDR (Deshidrogenasa/reductasa de cadena corta), *MBL (metalo-β-lactamasa). *baeGHJLMNRS en ciertas ocasiones se nombran bacGHJLMNRS (Balderas-Ruiz *et al.*, 2020). *PKS/NRPS (sintasa híbrida de policétidos y péptidos no ribosomales). Anotación y/o estructuras mostradas corresponden a lo reportado por Stein (2005), Chen *et al.*, (2006), Schneider *et al.*, (2007), Balderas-Ruiz *et al.*, (2020) y Zhang *et al.*, (2020).

E) Degradación de componentes de pared. *Bacillus* spp., incluyendo *B. velezensis* presentan en su genoma genes que codifican enzimas para la degradación y adquisición de múltiples fuentes de carbono encontradas en plantas y/o hongos, por ejemplo polisacáridos como glucanos, pectina, quitina y almidón, entre muchos más (Lindner *et al.*, 1994; Inácio *et al.*, 2008; Ouattara *et al.*, 2010; Niazi *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2018). Estas enzimas son importantes herramientas que le permiten a estas bacterias entablar asociaciones directas con su huésped al facilitar su nutrición, y se han sugerido como elementos para ejercer control biológico al degradar la pared celular de los hongos fitopatógenos, como sucede con las quitinasas.

F) Compuestos volátiles antimicrobianos relacionados a la inducción de resistencia sistémica. Por otro lado, se sabe que compuestos volátiles sintetizados por especies de *Bacillus* también pueden contribuir en la reducción de los niveles de enfermedades causadas por fitopatógenos, directamente través de sus efectos antimicrobianos (interviniendo con la estructura y función de membranas biológicas) e indirectamente a través de inducir la resistencia sistémica (IRS) en plantas y la disminución de la expresión de sus factores de patogenicidad (Chen y col. 2007; Yuan *et al.*, 2012; Mu *et al.*, 2017; Ling *et al.*, 2022; Grahovac *et al.*, 2023). *Bacillus* spp. comparten la producción de múltiples compuestos volátiles, incluyendo alcoholes (2-etil-hexanol, 2,3-butanodiol, 1,3-propanodiol, 3-pentanol y , 2,4-bis [2-metilpropil] fenol), aldehídos (nonanal, 2,4-decadienal, benzaldehído y 4-hidroxi-benzaldehído), cetonas (2-nonanona, 2-undecanona, acetoina, acetofenona) y benzotiazoles (benzotiazol, 1,2-benzisotiazol-3[2H]-ona).

1.3.2 Mecanismos de defensa en *Bacillus* spp. Compuestos tóxicos que perturban el estado redox como las ROS, enzimas líticas como la lisozima, péptidos antimicrobianos que alteran la membrana como la polimixina B, y otros muchos antibióticos bactericidas provenientes de competidores (Zuber, 2009; Kim *et al.*, 2019), son ejemplos de factores de estrés biótico que impactan directamente sobre el desarrollo de las poblaciones bacterianas. Para contrarrestar sus efectos dañinos, las especies de *Bacillus* emplean diversas respuestas y mecanismos de defensa donde múltiples proteínas están involucradas. Si bien la carga génica correspondiente varía entre especies y cepas, como referencia podemos mencionar que el genoma de *B. subtilis* destina alrededor de 110 genes para la resistencia a antibióticos, 102 para la respuesta al estrés oxidativo y 178 para la respuesta general al estrés (Zhu y Stülke, 2018), representando en conjunto alrededor del 5 al 10% de sus genes, dependiendo de la especie.

En *B. subtilis*, la respuesta celular a antibióticos y enzimas líticas es mediada por distintos factores sigma de la ARN polimerasa, tales como SigM (σ^M), requerido para la adaptación a inhibidores de la síntesis de péptido glucano a través de la homeostasis y reestructuración del péptido glucano, SigW (σ^W) necesario para la adaptación de la membrana en respuesta a compuestos como la polimixina B y la vancomicina, y SigV (σ^V) implicado en la resistencia a enzimas líticas como la lisozima a través de la O-acetiltransferasa OatA. Este último además, facilita la alaninación de los ácidos teicoicos de la pared celular mediante las proteínas con actividad transferasas y ligasas DltXABCDE, confiriendo resistencia a péptidos antimicrobianos con carga positiva (Zhu y Stülke, 2018). Lo anterior se relaciona a otros mecanismos reportados en otras bacterias, como la generación de mutaciones en proteínas blanco como las proteínas de unión a la penicilina (PBP) o recambio de estas (Chambers, 1999, Mitchell *et al.*, 2023) y la modificación de la relación estequiométrica entre la proteína blanco y el antibiótico mediante la sobre- o sub-expresión génica (Giles y Reynolds, 1979, Thulin y Andersson, 2019). Así mismo, existen otros mecanismos de defensa y proteínas concernientes a la resistencia a antibióticos reportados en *Bacillus* spp. (Fernandes *et al.*, 2013, Ealand *et al.*, 2018; Zhu y Stülke, 2018) entre los que se encuentran: la expulsión de antibióticos mediante distintos tipos de transportadores (ABC, MFS y SMR) como los transportadores ABC de bacitracina y lantibióticos, BceAB y PsdAB, o el exportador de tetraciclina TetB (Masaoka *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2007; Zhu y Stülke, 2018) y distintas proteínas de degradación como la β -lactamasa PenP o la penicilina acilasa Yxel (Rathinaswamy *et al.*, 2012).

El manejo del estrés oxidativo y/o nitrosativo también es relevante durante las interacciones entre bacterias y hongos fitopatógenos. Este se induce cuando la concentración de electrófilos tóxicos, como las especies reactivas de oxígeno (ROS) o nitrógeno (RNS), excede la capacidad celular para desintoxicarlos, prevaleciendo un ambiente oxidante (Alhasawi *et al.*, 2019; Kim *et al.*, 2019). Usualmente las ROS son subproductos de la respiración y el metabolismo, sin embargo también son generados como un efecto secundario de agentes oxidantes (quinonas) y antibióticos producidos por otros microorganismos (Dwyer *et al.*, 2009; Zuber, 2009; Quinlan *et al.*, 2012; Kim *et al.* 2019), lo cual obliga a la célula a destinar recursos hacia mecanismos de defensa específicos contra estrés oxidativo. Durante este escenario, las ROS causan daño celular sistémico que involucra desequilibrio del estado redox, efectos negativos sobre la actividad de las enzimas, propician mutaciones en el ADN, la peroxidación de lípidos de membrana, y la agregación o mal plegamiento de las proteínas (Boylan y Gherardini, 2008; Mullarky y Cantley, 2015; Zuber, 2019). Asimismo, provocan modificaciones postraduccionales indeseables como la oxidación de residuos de metionina y cisteína, o la carbonilación de residuos de arginina y lisina (Shcherbik y Pestov, 2019). Inclusive, las aminoacil-ARNt-sintetasas y los ribosomas sufren modificaciones químicas que afectan la síntesis de proteínas (Shcherbik y Pestov, 2019). Para contender estos efectos negativos, *Bacillus* spp. utiliza antioxidantes no enzimáticos como el bacilitiol, un tiol de bajo peso molecular (Chandrangsu *et al.*, 2018) y proteínas antioxidantes como la superóxido dismutasa, peroxidasas, catalasas, y diversas tiorredoxinas (He *et al.*, 2017; Zhu y Stülke, 2018) en conjunto con deshidrogenasas generadoras de poder reductor (NADPH) y otras proteínas para la regeneración de los antioxidantes (reducción de tioles) (Corpas y Barrocho, 2014).

En adición a estas enzimas, en *Bacillus* también resaltan las respuestas mediadas por el regulador transcripcional para la homeostasis del estado redox Spx (Zuber, 2009) y el del factor sigma alternativo de la ARN polimerasa SigB (σ^B) (Hecker y Völker, 1998, 2001; Höper *et al.*, 2005; Hecker *et al.*, 2007; Marles-Wright y Lewis, 2008; Marles-Wright *et al.*, 2008; Zuber, 2009; Zhu y Stülke, 2018). La respuesta mediada por SigB comprende un conjunto de proteínas de estrés general (GSP) con múltiples mecanismos no-específicos que permiten atenuar y prevenir los efectos dañinos ocasionados por el estrés osmótico, antibióticos (estrés sobre la pared celular), bajas temperaturas, especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS y RNS) (Hecker y Völker, 1998; Moore *et al.*, 2004; Hecker *et al.*, 2007). Históricamente, esta respuesta fue estudiada a través del uso de factores de estrés abióticos (como calor o herbicidas), y aún no se comprende su función biológica en el contexto de las interacciones con otros microorganismos. Sin embargo, dada la gran cantidad de proteínas mediadas por SigB relacionadas tanto a la resistencia a antibióticos como a las especies reactivas de oxígeno, puede intuirse que son relevantes en las interacciones entre *Bacillus* spp. y hongos fitopatógenos, como lo han sugerido recientemente otros grupos de trabajo (Bartolini *et al.*, 2019). En las tablas 4 a 6, se hace una recopilación de los diversos modelos de ACB y PF estudiados previamente bajo diferentes escenarios *in vitro* con objetivo de entender las respuestas y fenotipos moleculares implicados durante sus distintas interacciones. A continuación, se hace una breve explicación de estas y se discuten sus estrategias.

1.4 Casos de estudio de la interacción entre *Bacillus* spp. y hongos fitopatógenos. Estrategias y fenotipos.

Las respuestas de interacción entre *Bacillus* spp. y hongos fitopatógenos pueden estudiarse mediante estrategias de co-cultivo *in vitro* directo (Ola *et al.*, 2013, Zhang *et al.*, 2014) o indirecto (Lee *et al.* 2005, Li *et al.*, 2014, Vallet *et al.*, 2017, Tian *et al.*, 2021) ya sea en sistemas de fase líquida o sólida (Tablas 4-6). Estas estrategias pretenden establecer condiciones controladas que permitan excluir de la respuesta estudiada del efecto de otros factores abióticos y bióticos como sucedería bajo condiciones naturales. Las interacciones directas implican un contacto físico sumado al intercambio de metabolitos a través del medio como ocurre en co-cultivos líquidos, mientras que en las indirectas no existe dicho contacto y la comunicación puede ocurrir únicamente mediante señales químicas, como sucede en cultivos sólidos con espaciado entre colonias y cultivos sumergidos separados a través de membranas. Las

interacciones indirectas pueden por ejemplo utilizarse para evaluar el efecto de compuestos volátiles (Yuan *et al.*, 2012; Mu *et al.*, 2017, Tabla 6 Parte 2). Dependiendo el caso, las respuestas observadas pueden (Benoit *et al.*, 2015; Abeysinghe *et al.*, 2020) o no depender del contacto (Mu *et al.*, 2017; Tian *et al.*, 2021). Por ejemplo, en la relación mutualista entre *B. subtilis* y *Aspergillus nidulans*, la bacteria despliega motilidad y colonización sobre las hifas, lo cual le permite explorar nuevos espacios al proporcionar tiamina al hongo y promover su crecimiento (Abeysinghe *et al.*, 2020, Tabla 4), resaltando la importancia del contacto directo entre ambos microorganismos. En interacciones indirectas artificiales, los metabolitos producidos por el hongo o la bacteria pueden reconfigurar severamente el metaboloma de su contraparte tras ser adicionados exógenamente en cultivos axénicos. Tal es el caso de la relación de amensalismo entre *Bacillus amyloliquefaciens* y *Aspergillus oryzae*, donde metabolitos producidos por el hongo, como los oleatos de oxilipina, promueven el crecimiento, la formación de *biofilm* y la producción de surfactina en *Bacillus*, mientras que metabolitos de la bacteria reprimen el crecimiento micelial, la conidiación y la producción de oxilipinas en *A. oryzae* (Singh *et al.*, 2022, Tabla 6 Parte 1).

Dentro de estos estudios (Tablas 4-6), las ciencias -ómicas, como la transcriptómica (Benoit *et al.*, 2015), la proteómica (Zhang *et al.*, 2014), la metabolómica (Ola *et al.*, 2013; Torres *et al.*, 2016; Vallet *et al.*, 2017) y el uso de la generación de mutantes por biología molecular (Liu *et al.*, 2011; Bartolini *et al.*, 2019; Abeysinghe *et al.*, 2020; Albarracín-Orio *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2021bc) resaltan como herramientas fundamentales que permiten caracterizar los fenotipos moleculares desarrollados durante estas interacciones. Los estudios de asociaciones benéficas o antagónicas entre *Bacillus* spp. y hongos fitopatógenos, demostraron que como resultado de la interacción se generan: cambios en los patrones de crecimiento y morfología de sus colonias (Liu *et al.*, 2018, Bartolini *et al.*, 2019, Rodríguez-Ayala *et al.*, 2020, Villa-Rodríguez *et al.*, 2021), transferencia cruzada de nutrientes (*metabolic cross-feeding*, Artursson y Jansson, 2003; Abeysinghe *et al.*, 2020), redistribución de recursos hacia mecanismos de defensa (Bartolini *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2021d), la producción alterada o selectiva de metabolitos antimicrobianos (Ola *et al.* 2013; Li *et al.*, 2014, Tian *et al.* 2021), modulación y perturbación del *quorum sensing* o la formación de *biofilm* (Khezri *et al.*, 2016; Albarracín-Orio *et al.*, 2020; MacAlpine *et al.*, 2022) y reestructuración de su metabolismo (Lee *et al.* 2005, Benoit *et al.*, 2015; Wang *et al.* 2021a; Singh *et al.*, 2022).

Por ejemplo, co-cultivos indirectos en medio sólido entre *Bacillus cabrialesii* y *Bipolaris sorokiniana*, o *B. subtilis* y *Fusarium verticillioides* demuestran antagonismo dual y cambios morfológicos en sus colonias. Aquí, las colonias bacterianas muestran un menor crecimiento radial hacia el lado adyacente al hongo en comparación con el lado opuesto, indicando quimiotaxis y/o antibiosis (Bartolini *et al.*, 2019; Villa-Rodríguez *et al.*, 2021). Este peculiar comportamiento puede inducirse por la presencia de antibióticos a concentraciones sub-inhedoras. En otros casos, la interacción entre *Streptomyces venezuelae* y *B. subtilis*, reveló que el cloranfenicol excretado por el actinomiceto induce movilidad no dependiente de flagelos en *Bacillus* (*sliding motility*) (Liu *et al.*, 2018). Con respecto a la producción selectiva de metabolitos, en otro co-cultivo indirecto, *B. amyloliquefaciens* SQR9, una cepa productora de lipopéptidos y bacililactina, modifica su perfil de antibióticos excretados dependiendo del competidor (*Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora parasitica*) (Li *et al.*, 2014, Tabla 6 Parte 1). De forma similar, durante la interacción entre otra cepa de *B. amyloliquefaciens* y *Fusarium oxysporum*, la bacteria sobre-expresa los genes biosintéticos encargados de la síntesis de difidicina, bacililactina y bacilisina, incluyendo genes relacionados a la síntesis de sus precursores (e.g. fenilalanina, tirosina y triptófano, Tian *et al.*, 2021). El mecanismo de inducción aún se desconoce, pero mutantes de la bacteria no productoras de estos antibióticos presentan menor actividad de biocontrol, resaltando la importancia de estos compuestos (Li *et al.*, 2014). Cepas no productoras estos péptidos no ribosomales y policétidos también pueden presentar actividad antifúngica a través de otro tipo de metabolitos como enzimas (Wang *et al.*, 2020c, Tabla 5), compuestos volátiles (Yuan *et al.*, 2012) o como en el caso *B. subtilis* 168 hacia *Ceratocystis fimbriata*, mediante ácido dipicolínico (Wang *et al.*, 2021b, Tabla 6, Parte 1), resaltando la versatilidad de los mecanismos de control biológico en este género de bacterias.

Tabla 4. Aspectos moleculares y fenotipos desarrollados durante interacciones interespecíficas benéficas entre especies de *Bacillus* y hongos filamentosos. Comensalismo y mutualismo.

N	Microorganismos	Interacción	Modelos <i>in vitro</i> estudiados	Fenómenos y mecanismos	Aspectos moleculares y fenotipos	Referencia
1	<i>Bacillus subtilis</i> (+) <i>Pythium ultimum</i> (=) <i>Fusarium oxysporum</i> (=) <i>Lyophyllum</i> sp. (=)	Comensalismo	Directa – Sólido	Protección contra el estrés	El micelio de <i>P. ultimum</i> , <i>F. oxysporum</i> o <i>Lyophyllum</i> sp. reduce el estrés hídrico y nutricional en <i>Bacillus</i> proporcionando nutrientes (C, N) y agua. Asimismo, facilita la germinación y subsecuente adhesión y crecimiento de células de <i>Bacillus</i> .	Worrich et al., (2016)
2	<i>Bacillus cereus</i> (+) <i>Glomus dussii</i> (=)	Comensalismo	Directa – Sólida*	Adhesión	Colonización de hifas micorrízicas por <i>B. cereus</i> presentes en raíces, más frecuentemente cerca de grietas o áreas degradadas, sugiriendo un comportamiento saprófito o bien aprovechamiento del carbono exudado por la planta a través de las hifas (comensal).	Artursson y Jansson (2003)
3	<i>Bacillus subtilis</i> (+) <i>Aspergillus niger</i> (+) <i>Agaricus bisporus</i> (+)	Mutualismo	Directa – Sólida Directa – Líquida**	Co-disminución de los mecanismos de defensa	Adhesión y crecimiento de células bacterianas sobre las hifas del hongo, dependiente de los genes para la producción de <i>biofilm</i> (exo-polisacáridos vía operón <i>epsA-O</i> y fibras amiloides por <i>tasA</i>). Sub-expresión de genes relacionados a mecanismos de defensa tanto en hongo como en bacteria. Sub-expresión de genes para la biosíntesis de surfactina y la respiración aeróbica, y sobre-expresión de genes para la esporulación y metabolismo anaeróbico en la bacteria.	Benoit et al., (2015) Kjeldgaard et al., (2019)
4	<i>Bacillus subtilis</i> (+) <i>Aspergillus nidulans</i> (+)	Mutualismo	Directa – Sólida	Metabolismo cooperativo	<i>B. subtilis</i> despliega motilidad y colonización sobre las hifas de <i>Aspergillus nidulans</i> , permitiéndole explorar nuevos espacios al proporcionar tiamina al hongo y promover su crecimiento. Aquí, <i>B. subtilis</i> incrementa la expresión del operón para la biosíntesis de tiamina y coherentemente el hongo lo reprime. Una mutante de <i>A. nidulans</i> auxotrofa a tiamina (Δ <i>thiA</i>) es capaz de crecer durante el co-cultivo con <i>B. subtilis</i> , pero no así con <i>B. subtilis</i> Δ <i>thiA</i> .	Abeyasinghe et al., (2020)
5	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (+) <i>Yarrowia lipolytica</i> (+)	Mutualismo	Directa – Líquida	Sobreproducción de compuestos antimicrobianos	En un ambiente enriquecido con lípidos, hay un aumento significativo en los títulos de lipopéptidos cíclicos producidos por células de <i>B. amyloliquefaciens</i> co-cultivadas (7x de fengicina, 12x de surfactina e 3x de iturina con respecto al control axénico). Esta interacción es artificial dado que <i>Yarrowia lipolytica</i> YL21 es una cepa modificada genéticamente para aumentar la síntesis de ácidos grasos mediante el bloqueo de la ruta de β -oxidación de lípidos, y resalta como caso potencial de biotransformación.	Bai et al., (2023)

Efectos de la interacción sobre el crecimiento del microorganismo en cuestión: Beneficioso (+), Inhibitorio (-) y nulo (=). *Raíz, **Cultivo estático.

Tabla 5. Aspectos moleculares y fenotipos desarrollados durante interacciones interespecíficas no benéficas entre especies de *Bacillus* y hongos filamentosos. Competencia.

	Microorganismos	Interacción	Modelos <i>in vitro</i> estudiados	Fenómenos y mecanismos	Aspectos moleculares y fenotipos	Referencia
1	<i>Bacillus subtilis</i> (-) <i>Fusarium verticillioides</i> (-)	Competencia	Directa – Líquida Indirecta – Sólida	Activación de la respuesta a estrés	Bacteria y hongo despliegan crecimiento radial diferenciado. <i>F. verticillioides</i> enciende la respuesta a estrés dependiente del factor sigma alternativo SigB en <i>B. subtilis</i> , a través de la cascada de regulación mediada por RsbP relacionada al déficit energético. <i>B. subtilis</i> Δ <i>srfA</i> y Δ <i>sigB</i> presentan menor capacidad <i>in vitro</i> de control biológico y produce menos surfactina.	Bartolini et al., (2019)
2	<i>Bacillus velezensis</i> (-) <i>Fusarium verticillioides</i> (-)	Competencia	Directa – Líquida	Degradación vía enzimas líticas	Menor y mayor concentración de células viables y esporas de <i>Bacillus</i> durante el co-cultivo, respectivamente. En correspondencia, genes relacionados a la esporulación y a la formación del flagelo presentan mayor y menor nivel de expresión, respectivamente. El hongo sufre pérdida de integridad de membrana y degradación celular (β -glucanasas).	Wang, et al., (2020)
3	<i>Bacillus subtilis</i> (-) <i>Paraconiothyrium variabile</i> (-)	Competencia	Indirecta – Sólida	Producción y degradación de antibióticos	Antagonismo simultáneo entre la bacteria y el hongo vía metabolitos antimicrobianos. El hongo es capaz de hidrolizar enzimáticamente los lipopéptidos (surfactina) sintetizados por la bacteria, y además produce ácidos tetrónicos antibacterianos (nivefuranona A).	Vallet et al., (2017)
4	<i>Bacillus tentimorbus</i> (-) <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (-)	Competencia	Indirecta – Líquida	Reestructuración del metabolismo	<i>B. tentimorbus</i> sobre-expresa en más de 10 veces genes involucrados en la glucólisis y el ciclo de Krebs, indicando competencia por sustrato.	Lee et al., (2005)

Efectos de la interacción sobre el crecimiento del microorganismo en cuestión: Beneficioso (+), Inhibitorio (-) y nulo (=).

Tabla 6 (Parte 1). Aspectos moleculares y fenotipos desarrollados durante interacciones interespecíficas no benéficas entre especies de *Bacillus* y hongos filamentosos. Amensalismo.

	Microorganismos	Interacción	Modelos <i>in vitro</i> estudiados	Fenómenos y mecanismos	Descripción	Referencia
1	<i>Bacillus subtilis</i> (=) <i>Magnaporthe grisea</i> (-)	Amensalismo	Directa - Líquida	Síntesis de enzimas líticas	La bacteria inhibe el crecimiento del hongo y provoca anomalías en la morfología del micelio. En co-cultivo, la bacteria incrementa la producción de enzimas hidrolíticas (endo-1,4-β-glucanasas y proteasas).	Zhang <i>et al.</i> , (2014)
2	<i>Bacillus subtilis</i> (=) <i>Fusarium tricinctum</i> (-)	Amensalismo	Directa - Sólida	Producción y elicitación de antibióticos	Incremento en la biosíntesis de compuestos antibacterianos (lateropirona, enniatinas y fusaristatina) por parte del hongo durante la interacción, y elicitación de nuevos metabolitos.	Ola <i>et al.</i> , (2013)
3	<i>Bacillus subtilis</i> (=) <i>Ceratocystis fimbriata</i> (-)	Amensalismo	Directa - Sólida	Colonización y destrucción de estructuras fúngicas	La bacteria es capaz de colonizar los conidios del hongo, distorsionar su pared celular y finalmente causar su lisis. La cepa de estudio (<i>B. subtilis</i> 168) no es capaz de producir lipopéptidos antimicrobianos pero sí ácido dipicolínico (DPA), otro metabolito antifúngico. Una mutante <i>B. subtilis</i> con expresión incrementada de la dipicolinato sintasa <i>spoVF</i> , generada a partir del reemplazo de su promotor nativo con el de <i>spoVG</i> , produce mayor cantidad de DPA con respecto a su cepa silvestre, mostrando una mayor capacidad de biocontrol <i>in vitro</i> e <i>in planta</i> , resaltando la importancia del DPA.	Wang <i>et al.</i> , (2021b)
4	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (+) <i>Aspergillus oryzae</i> (-)	Amensalismo	Indirecta - Líquida	Reconfiguración de metaboloma	Metabolitos del hongo agregados exógenamente a cultivos axénicos de <i>Bacillus</i> promueven su crecimiento y síntesis de <i>biofilm</i> en <i>Bacillus</i> pero reducen la secreción de lipopéptidos, mientras que metabolitos de la bacteria reprimen el crecimiento micelial, la conidiación y la producción de oxilipinas en <i>Aspergillus</i> . La surfactina producida por la bacteria modula el fenómeno, sin embargo esta sufre linealización a través del tiempo posiblemente por hidrólisis enzimática derivada del hongo. Oleatos de oxilipina producidos por el hongo promueven la producción de surfactina en <i>Bacillus</i> .	Singh <i>et al.</i> , (2022).
5	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (=) <i>Macrophomina phaseolina</i> (-)	Amensalismo	Indirecta - Sólida	Producción de antibióticos	<i>Bacillus</i> inhibe el crecimiento micelial mediante la co-producción de lipopéptidos (surfactina, iturina y fengicina), produce daño en estructuras reproductivas e induce la formación de esclerocios dañados en el hongo.	Torres <i>et al.</i> , (2016)
6	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (=) <i>Monilinia fructicola</i> (-)	Amensalismo	Indirecta - Sólida	Producción de antibióticos	<i>B. amyloliquefaciens</i> C06 produce lipopéptidos antifúngicos (bacilomicina D y fengicina) capaces de inhibir la germinación y el crecimiento micelial. Mutante no productora de lipopéptidos (<i>Δsfp</i>) pierde su capacidad de biocontrol, resaltando su importancia.	Liu <i>et al.</i> , (2011)
7	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (=) <i>Fusarium oxysporum</i> (-)	Amensalismo	Indirecta - Sólida	Producción y elicitación de antibióticos	Sobre-expresión de los genes biosintéticos encargados de la síntesis de difidina, bacilibactina y bacilicina en <i>B. amyloliquefaciens</i> durante la inhibición de <i>Fusarium oxysporum</i> . Asimismo, numerosos genes relacionados a la biosíntesis de aminoácidos, metabolismo del corimato, propanoato, entre otros son sobre-expresados en la bacteria durante la interacción, incluyendo genes relacionados a la síntesis de precursores de la bacilibactina (fenilalanina, tirosina y triptófano).	Tian <i>et al.</i> , (2021)
8	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (=) <i>Verticillium dahliae</i> (-) <i>Fusarium solani</i> (-) <i>Phytophthora parasitica</i> (-) <i>Fusarium oxysporum</i> (-) <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (-) <i>Rhizoctonia solani</i> (-)	Amensalismo	Indirecta - Sólida	Producción selectiva de metabolitos antimicrobianos Competencia por el hierro a través de sideróforos	El patrón de metabolitos antimicrobianos excretados por <i>B. amyloliquefaciens</i> (bacilomicina D, fengicina, surfactina y bacilibactina) es alterado en función de la especie de hongo con el cual interacciona. Durante la interacción entre <i>B. amyloliquefaciens</i> y <i>F. solani</i> , la cantidad de bacilomicina D detectada disminuye con respecto al cultivo axénico (13 veces). Contrariamente, la síntesis de este lipopéptido es inducido de 1.1 a 2.1 veces durante la interacción entre <i>B. amyloliquefaciens</i> con otros hongos (<i>V. dahliae</i> , <i>S. sclerotiorum</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>P. parasitica</i>). La bacteria consistentemente sobre-expresa <i>fenA</i> y excreta mayor cantidad de fengicina durante su interacción con <i>V. dahliae</i> . Asimismo, células de <i>B. subtilis</i> co-cultivadas contra cada uno de los patógenos, excretan una mayor cantidad de bacilibactina, y sobre-expresan consistentemente <i>dhbA</i> (excepto con <i>F. solani</i>).	Li <i>et al.</i> , 2014

Efectos de la interacción sobre el crecimiento del microorganismo en cuestión: Beneficioso (+), Inhibitorio (-) y nulo (=).

Tabla 6 (Parte 2). Aspectos moleculares y fenotipos desarrollados durante interacciones interespecíficas no benéficas entre especies de *Bacillus* y hongos filamentosos. Amensalismo.

	Microorganismos	Interacción	Modelos <i>in vitro</i> estudiados	Fenómenos y mecanismos	Descripción	Referencia
9	<i>Bacillus altitudinis</i> (=) <i>Fusarium graminearum</i> (-)	Amensalismo	Indirecta – Sólida	Redistribución de recursos mediante autofagia	La homeostasis de la autofagia en <i>F. graminearum</i> es esencial como mecanismo de defensa durante su interacción con especies bacterianas con actividad antifúngica, y además es importante para su virulencia en espigas de <i>Triticum aestivum</i> . Durante su interacción con <i>B. altitudinis</i> , entabla una interacción limitada a la competencia por nutrientes y resiste la actividad antifúngica de la bacteria. Sin embargo, mutantes de <i>F. graminearum</i> a quienes se les ha bloqueado proteínas de autofagia ($\Delta atg8$) son inhibidas fuertemente durante la misma interacción, revelando la importancia de la redistribución de recursos para contener contra factores de estrés bióticos.	Wang et al., (2021c)
10	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (=) <i>Fusarium oxysporum</i> (-)	Amensalismo	Indirecta – Sólida	Producción de compuestos volátiles antifúngicos	<i>B. amyloliquefaciens</i> produce al menos 11 diferentes compuestos volátiles, entre estos el benzotiazol fenol y el 2,3,6-trimetil fenol, capaces de inhibir el crecimiento de <i>F. oxysporum</i> . Se sugiere que estos metabolitos son de importancia ecológica en las relaciones a distancia entre ambos microorganismos.	Yuan et al., (2012)
11	<i>Bacillus subtilis</i> (=) <i>Botrytis cinerea</i> (-)	Amensalismo	Indirecta – Sólida	Producción de compuestos volátiles antifúngicos	<i>B. subtilis</i> produce una mezcla de cetonas (e.g., benzofenona), alcoholes (e.g., 1-butanol, 1-heptileno-4-alcohol, 3-metil-3-hexanol), alcanos alifáticos, ácidos orgánicos (ácido hexadecanoico), y ésteres (e.g., éster butílico del ácido acético) capaz de inhibir el crecimiento del hongo, ocasionando contracción del protoplasma y/o apoptosis.	Mu et al., (2017)
12	<i>Bacillus subtilis</i> (=) <i>Fusarium oxysporum</i> (-)	Amensalismo	Indirecta – Sólida Directa – Sólida (Plantas)	Reducción de factores de patogenicidad	Plantas de <i>Glycine max</i> co-inoculadas demuestran la efectividad biológica de <i>Bacillus subtilis</i> para disminuir la severidad de la pudrición de la raíz. <i>B. subtilis</i> ocasiona aparición anormalidades en hifas y esporas de <i>F. oxysporum</i> . En co-cultivo, genes para la invasión y colonización del huésped correspondientes a enzimas líticas (celulasa, β -glucosidasas, α -amilasa, pectin-metil-galacturonasa), biosíntesis de pared celular y ergosterol, y enzimas antioxidantes fueron sub-expresados en el hongo, coherentemente con la actividad de los productos.	Han et al., (2021)
13	<i>Bacillus velezensis</i> (=) <i>Alternaria iridialustralis</i> (-)	Amensalismo	Indirecta – Sólida (Agar y plantas)	Producción de compuestos volátiles antifúngicos	<i>B. velezensis</i> inhibe el crecimiento <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de <i>A. iridialustralis</i> , causante de la pudrición de las bayas de Goji, a partir de una mezcla de compuestos volátiles. De estos, la 2,3-butanodiona presenta la mayor actividad antifúngica. A 60 μ L/L inhibe totalmente el crecimiento del <i>A. iridialustralis</i> en ensayos con bayas de Goji.	Ling et al., (2022)
14	<i>Bacillus subtilis</i> (+) <i>Setophoma terrestres</i> (-)	Amensalismo	Indirecta – Sólida (Agar y plantas)	Modulación del metaboloma vía <i>quorum sensing</i>	Sobrenadantes de <i>B. subtilis</i> inhiben el crecimiento del hongo. Por su parte, el hongo induce numerosos cambios fenotípicos y morfológicos en <i>Bacillus</i> , como colonias de apariencia mucho más rugosa asociada a una mayor producción de <i>biofilm</i> . Sobrenadantes de <i>Bacillus</i> obtenidos tras la interacción con el hongo son carentes de lipopéptidos cíclicos (como la surfactina), pero conservan actividad antifúngica, asociada probablemente a dos cetonas volátiles (2-heptanona y 2-octanona). Adición exógena de surfactina inhibe parcialmente la actividad antifúngica de sobrenadantes y cetonas de <i>B. subtilis</i> . Mutantes de la bacteria afectadas en ComQPXA la importancia del <i>quorum sensing</i> para conservar la producción de las cetonas y aumentar la <i>biofilm</i> en decremento de la surfactina.	Albarracín-Orio et al., (2020)
15	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (=) <i>Fusarium oxysporum</i> (-)	Amensalismo	Metabolito – Patógeno	Inducción de daño en membrana	<i>B. amyloliquefaciens</i> ocasiona la contracción de conidios, induce la formación de vacuolas atípicamente grandes, daño en membrana y la muerte de conidios vía miriocina y otras esfingofunginas. La miriocina disminuye la fluidez de la membrana y destruye la membrana de <i>F. oxysporum</i> , además de alterar la expresión de genes relacionados al metabolismo de los esfingolípidos y glicerofosfolípidos y biosíntesis de esteroides.	Xu et al., (2019) Wang et al. (2021a)

Efectos de la interacción sobre el crecimiento del microorganismo en cuestión: Beneficioso (+), Inhibitorio (-) y nulo (=).

Un fenómeno similar pero a la inversa de producción selectiva de metabolitos, ocurrió durante el co-cultivo directo en medio sólido entre *Fusarium tricinctum* con *B. subtilis* 168trpC2, donde hay una mayor biosíntesis de antimicrobianos (lateropirona, enniatinas y fusaristatina) por parte del hongo, así como la elicitación de nuevos metabolitos (Ola *et al.* 2013, Tabla 6 Parte 1).

La transcriptómica permite por ejemplo, estudiar de forma simultánea los perfiles de expresión de la gran cantidad de genes relacionados a la antibiosis (Tablas 1-3). Por ejemplo, a través de un co-cultivo indirecto en fase sólida entre *B. amyloliquefaciens* GKT04 y *F. oxysporum* se reveló que la bacteria sobre-expresa la transcripción de genes relacionados a la producción de compuestos antimicrobianos tales como la difidina, bacilibactina y bacilisina, incluyendo sus precursores (Tian *et al.* 2021). Es de resaltar, que este fenómeno de producción selectiva y sobreproducción de metabolitos en *Bacillus* observado durante las interacciones con PFs se ha observado únicamente en sistemas de fase sólida con distanciamiento entre colonias no así en sistemas líquidos de interacción directa (Li *et al.*, 2014; Tian *et al.*, 2021). Si bien los cultivos sólidos son la modalidad más frecuentemente utilizada para el estudio de interacciones ACB-PFs (Tablas 4-6) por que mimetizan de forma más cercana a lo acontecido en la naturaleza, estos generalmente presentan mayores restricciones difusionales y gradientes nutricionales en comparación a sistemas sumergidos, mismo que facilita la formación de *biofilm*. Un *biofilm* de *Bacillus* spp. puede describirse como colonias organizadas de bacterias embebidas en matriz extracelular caracterizadas por la presencia de múltiples subpoblaciones, incluyendo esporas y diversos tipos de células vegetativas especializadas en la producción de diversos metabolitos (Vlamakis *et al.*, 2013). Dado que en cultivos sólidos ambos microorganismos consumen simultáneamente nutrientes y la producción de antibióticos en *Bacillus* es asociada a la formación de subpoblaciones especializadas (López *et al.*, 2009), se podría sugerir que el fenómeno de sobreproducción observado en previos reportes es más bien un efecto secundario de la limitación nutricional prematura que conlleva a la inducción de los metabolito, y no así de un efecto *per se* del hongo. Lo anterior, es un aspecto importante que considerar al momento de diseñar y abordar estudios transcripcionales en los microorganismos que compiten por nutrientes.

Con respecto a la metabolómica, también se debe recalcar que la concentración de metabolitos detectables observado durante las interacciones puede no representar con exactitud el total sintetizado por el microorganismo productor, ya que pueden existir fenómenos de degradación enzimática y/o absorción a la biomasa del blanco (Albarracín-Orio *et al.*, 2020; Singh *et al.*, 2022). Para ilustrarlo, durante el co-cultivo indirecto entre *B. subtilis* y *Paraconiothyrium variabile*, ocurre una antibiosis dual donde el hongo además de producir un compuesto antibacteriano responde con la síntesis de una enzima capaz de hidrolizar la surfactina producida por la bacteria como un mecanismo de defensa (Vallet *et al.*, 2017). Es por esta razón que las ciencias -ómicas, como la transcriptómica (Benoit *et al.*, 2015; Khezri *et al.*, 2016), la proteómica (Zhang *et al.*, 2014) y la metabolómica (Ola *et al.*, 2013; Torres *et al.*, 2016; Vallet *et al.*, 2017), son herramientas atractivas pero también complementarias para caracterizar los fenotipos moleculares desarrollados durante las interacciones.

Como se comentó anteriormente, las interacciones entre BCA y PF también pueden ocasionar cambios en el metabolismo de los competidores. Por ejemplo, células vegetativas de *B. subtilis* cultivadas juntamente con conidios de *Colletotrichum*, mostraron sufrir cambios significativos en su transcriptoma. Aquí, Lee *et al.* 2005 emplearon un sistema de co-cultivo sumergido de interacción indirecta a través de tubos cilíndricos permeables. Durante la interacción, la bacteria experimentó sobre-expresión en más de 10 veces en genes involucrados en la glucólisis y el ciclo de Krebs, llevando a la conclusión de que es la competencia por nutrientes uno de los principales mecanismos de biocontrol de esta cepa. El estudio demostró que la comunicación química y un tiempo de interacción corto (1h) son suficientes para inducir cambios en el transcriptoma, sin embargo, no se proporciona información sobre la persistencia de dichos cambios, ni la evolución de las poblaciones en términos de biomasa, viabilidad o expresión génica. Lo anterior es importante a considerar para estudiar las interacciones entre ACB y PF, porque la expresión de

genes y la producción de ciertos metabolitos antimicrobianos en *Bacillus* es controlada por fenómenos de *quorum sensing*, es decir, están asociados al crecimiento poblacional (López *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2023).

Contrario a lo esperado, respuestas mutualistas también pueden acontecer durante co-cultivos entre BCA y PF. Así lo demuestran análisis de expresión diferencial de transcriptomas de *B. subtilis* y *Aspergillus niger* obtenidos de co-cultivos líquidos estáticos de interacción directa. Interesantemente, ambos microorganismos disminuyen la transcripción de genes relacionados con la antibiosis y despliegan la formación de *biofilm* conjuntamente (Benoit *et al.*, 2015). La expresión de genes en la bacteria, relacionados con la biosíntesis de surfactina, la respuesta al estrés y la respiración aeróbica fueron sub-expresados significativamente, mientras que los genes para encargados de la esporulación y el metabolismo anaeróbico fueron sobre-expresados (Benoit *et al.*, 2015). Los autores sugirieron un nivel limitante de oxígeno en las células bacterianas adheridas al hongo, por lo que su estrategia no pudo separar el efecto de la limitación nutricional (un efecto abiótico) de los efectos debidos al hongo.

1.5 Antecedentes.

Dentro del Instituto de Biotecnología de la UNAM y en colaboración con el CIAD-Culiacán, se desarrolló una tecnología para la producción y formulación de un biofungicida para el control de la antracnosis (Serrano-Carreón *et al.* 2010). Actualmente, este producto es comercializado bajo el nombre *Fungifree AB*[®], y posee como principio activo esporas termorresistentes de *Bacillus velezensis* 83 (previamente identificado como *Bacillus amyloliquefaciens*, Fig. 2). El agente de control biológico (BCA) *B. velezensis* 83 es una cepa eficaz para reducir la incidencia de enfermedades causadas por diferentes géneros de hongos fitopatógenos (*Colletotrichum*, *Erysiphe*, *Botrytis*, *Sphaerotheca*, *Leveillula*) y cuenta con registros para su uso en cultivos de importancia socioeconómica en México como el mango, aguacate, papaya, cítricos, jitomate, arándano azul, fresa, plátano, entre otros (Galindo *et al.*, 2013, Balderas-Ruíz *et al.*, 2020).

Análisis del genoma de esta cepa, reveló su potencial para colonizar y estimular el crecimiento de plantas. Entre los genes relacionados con la colonización e interacción con las plantas se encuentran los necesarios para la formación de *biofilm* (ácido poli- γ -glutámico y otros biopolímeros), síntesis de compuestos volátiles como la acetoína, y enzimas para la asimilación de múltiples fuentes de carbono de origen vegetal (Balderas- Ruíz *et al.*, 2020). Asimismo, *B. velezensis* 83 presenta genes reportados para promover el crecimiento y sanidad de las plantas mediante fitoestimulación (producción de indoles), mejorar su acceso al fósforo y hierro (fitasas y sideróforos), inducción de la resistencia sistémica (surfactina y acetoína) e inhibición de enfermedades causadas por fitopatógenos mediante antibiosis (Mongkolthanaruk, 2012, Chowdhury *et al.*, 2015, Chen *et al.*, 2018, Balderas-Ruíz *et al.*, 2020, Fig. 2).

La producción de ácido poli- γ -glutámico (PGA), lipopéptidos cíclicos y acetoína ha sido confirmada experimentalmente en esta cepa (Cristiano-Fajardo *et al.*, 2019, Flores *et al.* 2020). En PGPRs como *Bacillus* spp., el PGA participa en la formación de la biopelícula y ofrece una ventaja competitiva en la colonización de plantas (Vlamakis *et al.*, 2013), mientras que a la acetoína y los lipopéptidos cíclicos son capaces de inducir la resistencia sistémica en *Arabidopsis thaliana* (Ongena y Jacques, 2007; Rudrappa *et al.*, 2010; Chowdhury *et al.*, 2015). La surfactina es un componente importante del *biofilm* ya que gracias a sus propiedades tensoactivas facilita la expansión de colonia y además interviene en el *quorum sensing* y las vías de diferenciación celular de la bacteria (López *et al.*, 2009; van Gestel *et al.*, 2015). Estudios a nivel de invernadero con plantas de *Solanum lycopersicum* inoculadas con *B. velezensis* 83 demostraron mejoras en la producción de frutos (Balderas-Ruíz *et al.*, 2021). Más recientemente, se ha demostrado que *B. velezensis* 83 es capaz de promover el crecimiento vegetal y el desarrollo del sistema radicular en *Arabidopsis thaliana* mediante una ruta dependiente de citoquininas (Barrera-Ortíz *et al.*, 2023).

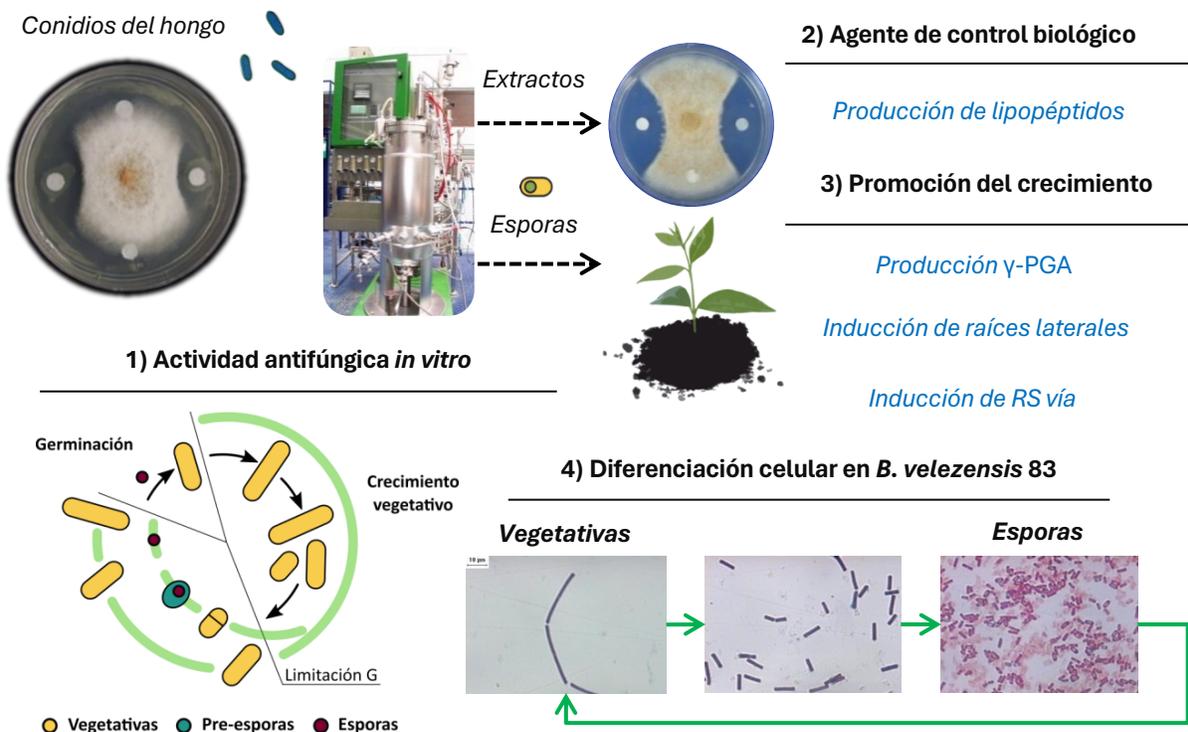


Figura 2. Potencial biotecnológico de *B. velezensis* 83. 1) Actividad antifúngica *in vitro* desplegada por *B. velezensis* 83 durante su interacción con *C. gloeosporioides*. 2) Actividad antifúngica asociadas a la producción de lipopéptidos de extractos de sobrenadante de medio de cultivo obtenidos por fermentación axénica de la bacteria. 3) Mecanismos de promoción de crecimiento de las plantas corroborados en *B. velezensis* 83. 4) Diferenciación celular y esporulación en *B. velezensis* 83 asociada a la limitación nutricional (glucosa).

Con respecto al mecanismo de antibiosis, el 8.2% (≈ 327 Kb) de su genoma está destinado a la producción de compuestos antimicrobianos mediante sintasas de péptidos no ribosomales, sintasas de policétidos y péptidos antimicrobianos de origen ribosomal (Balderas-Ruíz *et al.*, 2020). Los genes biosintéticos identificados corresponden a los necesarios para la producción de: lipopéptidos cíclicos (bacilomicina D, surfactina y fengicina), un dipéptido antimicrobiano (bacilisina), sideróforos (bacilibactina), policétidos (difícidina, bacilaeno y macrolactina) y una bacteriocina (amilociclicina), mismos que pueden visualizarse a detalle en las tablas 1 a 3. Aunque si bien incompletos, el genoma de *B. velezensis* 83 cuenta con otros clústeres biosintéticos, incluyendo los relacionados a la subtilina (un lantibiótico) y mersacidina (péptido antimicrobiano) (Balderas-Ruíz *et al.*, 2020).

En un estudio previo, se encontró que *B. velezensis* 83 sintetiza en cultivo axénico diversos lipopéptidos con actividad antifúngica capaces de inhibir *in vitro* la germinación de esporas y el crecimiento del micelio de *C. gloeosporioides* (Luna-Bulbarela *et al.*, 2018). Estos compuestos fueron aislados e identificados como seis homólogos de bacilomicina D, clasificados en tres distintos grupos de isómeros (1044, 1058 y 1072 Da). La secuencia peptídica de estos correspondió a un pequeño péptido (Asn₁-Tyr₂-Asn₃-Pro₄-Glu₅-Ser₆-Thr₇) con una metilación en Glu₅, el cual forma un anillo con una cadena de ácido graso β -NH₂ de longitud variable (C₁₄, C₁₅ y C₁₆).

Los isómeros de bacilomicina D presentan distinta actividad antifúngica en esporas sugiriendo que las metilaciones en posición *iso* o *anteiso* del ácido graso ocasionan las diferencias. Asimismo, las concentraciones mínimas inhibitorias específicas 100 (MIC₁₀₀) de bacilomicina D (en sus diferentes homólogos) para micelio son entre tres y doce veces menores que las necesarias para inhibir la germinación de esporas. Sin embargo, tal como indica el

genoma de *B. velezensis* 83, más allá de estos lipopéptidos cíclicos, esta cepa tiene el potencial para producir una amplia variedad de moléculas con propiedades antimicrobianas, los cuales podrían funcionar como mecanismos (aditivos o sinérgicos) de antibiosis contra *C. gloeosporioides*.

El presente trabajo es un estudio de una interacción *in vitro* entre dos microorganismos modelo de relevancia socioeconómica, utilizando un enfoque de dinámica de poblaciones y estudios transcripcionales. A partir de co-cultivos sumergidos *in vitro* entre *Bacillus velezensis* 83 y el hongo fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides* 09 se evaluó la respuesta transcripcional de la bacteria en condiciones de no limitación nutricional (C y O₂). Lo anterior permitió evaluar las estrategias de ataque (antibiosis) y defensa (resistencia al estrés) de *B. velezensis* 83 durante su interacción con el patógeno. Para esclarecer cuales metabolitos antimicrobianos pudieran ser preferencialmente sintetizados durante la interacción con *C. gloeosporioides*, este estudio abordó un análisis transcripcional de los genes biosintéticos involucrados y analizó la producción de algunos metabolitos involucrados en el antagonismo ejercido por *B. velezensis* 83.

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Hipótesis

En un hábitat sin limitación nutricional, una población de *B. velezensis* 83 en exposición con biomasa activa de *C. gloeosporioides*, sobre-expresa la maquinaria genómica relacionada con su actividad antagonista (metabolitos antimicrobianos y enzimas líticas) y con su resistencia al estrés con respecto a una población en cultivo axénico.

2.2 Objetivo general

Contribuir en el entendimiento de la ecología microbiana entre agentes de control biológico y hongos fitopatógenos, a través de estudiar la interacción modelo “*Bacillus velezensis* - *C. gloeosporioides*” con un enfoque transcriptómico de los mecanismos de ataque (funciones antimicrobianas) y defensa (factores de resistencia al estrés) bajo condiciones de no-limitación de nutrientes.

2.3 Objetivos particulares

Estudiar la dinámica de poblaciones entre *Bacillus velezensis* 83 y *C. gloeosporioides* 09, empleando escenarios *in vitro* de interacción directa (en modo curativo y preventivo), bajo condiciones de no-limitación de nutrientes (C y O₂).

Evaluar la viabilidad celular de ambas poblaciones (bacteria y hongo) y su relación con la acumulación de lipopéptidos antimicrobianos (surfactina y bacilomicina D) a través del tiempo durante la interacción microbiana.

Estudiar los cambios en la respuesta transcriptómica de elementos relacionados con el ataque (expresión de funciones antimicrobianas) y defensa (expresión de la respuesta a estrés) de *B. velezensis* 83 derivados del efecto de la interacción microbiana (exposición al fitopatógeno *C. gloeosporioides*) o el tiempo de incubación, bajo condiciones de no-limitación de nutrientes.

III. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para contribuir en el entendimiento de las estrategias de ataque y defensa de *Bacillus velezensis* durante su interacción con hongos fitopatógenos se planteó la siguiente estrategia:

3.1 Estudio *in vitro* de la dinámica poblacional entre *B. velezensis* 83 y *C. gloeosporioides* mediante un sistema de interacción directa. Tomando en consideración los reportes mencionados, el presente estudio analizó la dinámica poblacional *in vitro* entre *B. velezensis* 83 y *C. gloeosporioides* mediante co-cultivos directos empleando biorreactores tipo tanque agitado en modo lote. Se consideraron tres tipos de cultivos: 1) cultivo axénico de la bacteria, 2) cultivo axénico del hongo y 3) co-cultivo. Estos mismos se realizaron bajo dos distintos escenarios determinados por el estado fisiológico inicial de ambos microorganismos: a) curativo (esporas de *B. velezensis* 83 y micelio de *C. gloeosporioides*) y b) preventivo (esporas de la bacteria y conidios del hongo). El escenario curativo permitió mimetizar el escenario de antracnosis quiescente, que es naturalmente habitual en enfermedades postcosecha. Esto es una aproximación más cercana con respecto a como ocurre en la naturaleza, considerando que la antracnosis es una enfermedad quiescente en las plantas, y la aplicación de formulaciones de *B. velezensis* 83 son basadas en esporas.

En comparación con cultivos en fase sólida, los cultivos sumergidos en biorreactores con agitación ofrecen un escenario de estudio menos heterogéneo facilitando el intercambio y conversión de metabolitos. Al mismo tiempo disminuyen los posibles efectos secundarios derivados de gradientes nutricionales, como zonas con limitación nutricional y formación prematura de esporas. A diferencia de matraces convencionales, los biorreactores con agitación garantizan condiciones no limitantes de oxígeno mediante la manipulación del flujo de aireación y el control a pH constante a lo largo de la interacción. Así mismo, permiten dar seguimiento fácilmente a la concentración de la fuente de carbono sin alterar el sistema, un aspecto importante para la selección de muestras para transcriptómica. De este modo se aseguró un periodo de interacción bajo condiciones no limitantes de oxígeno y glucosa.

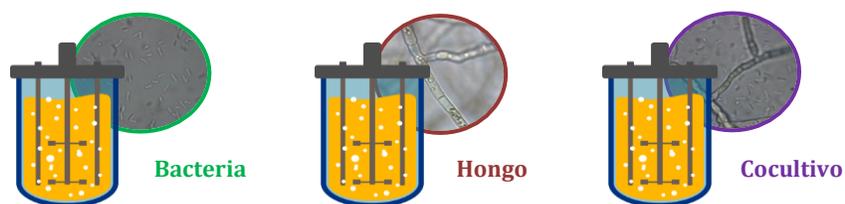


Figura 3. Modelo de interacción *in vitro* entre *B. velezensis* 83 y *C. gloeosporioides*. En escenario preventivo las concentraciones celulares iniciales de bacteria y hongo fueron $X_b = 1 \times 10^6$ esporas/mL y $X_c = 2 \times 10^5$ conidios/mL, respectivamente. En escenario curativo las concentraciones celulares iniciales de bacteria y hongo fueron $X_b = 1 \times 10^6$ esporas/mL y $X_H = 0.9 \text{ g}_{\text{Micelio}}/\text{L}$, respectivamente. Condiciones de cultivo: 2L Medio mineral, pH 6.8, agitación a 100 rpm y aireación a 4 L/min (2 vvm).

Para evitar someter a *C. gloeosporioides* (un hongo filamentoso) al estrés mecánico ejercido a través de las turbinas, se emplearon barras difusoras de acero inoxidable microporoso para propiciar la transferencia de oxígeno aún a baja agitación. La tensión de oxígeno disuelto (TOD) fue mantenida a valores superiores de 30 % de saturación enriqueciendo con oxígeno puro cuando fue necesario, pero manteniendo constante la velocidad de aireación (4.0 L/min). Un medio de cultivo libre de extracto de levadura fue empleado para evitar imitar los efectos de la interacción bacteria-hongo a través del medio de cultivo, un aspecto no considerado en estudios anteriores. Esto se debe a que la adición de componentes de pared celular de hongos a los medios de cultivo, como los oligosacáridos de manosa, pueden propiciar la síntesis de metabolitos secundarios en *Bacillus* spp. (Reffatti *et al.*, 2014). El medio utilizado de sales minerales y glucosa-extracto de papa, ofreció rendimientos aparentes biomasa-sustrato equiparables para ambos microorganismos, asegurando un medio de cultivo igual de favorable para su crecimiento.

Con todas estas consideraciones se evaluó el desarrollo de los microorganismos en términos del tamaño de su población y viabilidad, tanto para cultivos axénicos (controles) como co-cultivo (interacción microbiana).

3.2 Evaluación de la viabilidad celular y acumulación de lipopéptidos durante la interacción. De acuerdo con los trabajos previos, la bacilomicina D es el principal lipopéptido antifúngico producido por *B. velezensis* durante cultivos axénicos (Luna-Bulbarela *et al.*, 2018). Para corroborar la lisis celular por permeabilización de membrana, se evaluaron los efectos de la bacilomicina D sobre la viabilidad de *C. gloeosporioides* bajo diferentes estadios de crecimiento (conidios y micelio). Esto se realizó mediante ensayos microbiológicos de dosis-respuesta y tinciones de fluorescencia con yoduro de propidio (IP). Se eligió la bacilomicina D C₁₄ para realizar estos ensayos ya que es el homólogo más abundante dentro de la mezcla (≈45 %) producida por esta bacteria. La bacilomicina D C₁₄ fue purificada de sobrenadantes de *B. velezensis* 83 (>95 % pureza) mediante el procedimiento descrito anteriormente por Luna-Bulbarela *et al.*, 2018. Posteriormente, dichos tratamientos funcionaron como punto de referencia al evaluar los efectos de *B. velezensis* 83 sobre la viabilidad de *C. gloeosporioides* durante los co-cultivos en biorreactor agitado.

Una vez que se corroboró el mecanismo de acción de la bacilomicina D, suspensiones celulares de *B. velezensis* 83 y/o *C. gloeosporioides* fueron recolectadas de los cultivos axénicos o co-cultivos, antes y después del agotamiento de la glucosa para realizar los ensayos de viabilidad celular. Imágenes de fluorescencia de células de *B. velezensis* 83 teñidas con IP (un marcador de viabilidad) y Syto9, fueron obtenidas mediante un citómetro de flujo acoplado a análisis de imágenes, mientras que imágenes de contraste de fase (CF) y fluorescencia (F) fueron obtenidas de células de *C. gloeosporioides* teñidas con IP por microscopía de fluorescencia. Suspensiones celulares del hongo (conidios o micelio) o la bacteria sometidas a tratamiento térmico (80 °C, 15 minutos) fueron utilizadas también como un control positivo, mientras que células no teñidas fungieron como control negativo. Finalmente, se analizó la concentración residual de los lipopéptidos, bacilomicina D y surfactina mediante HPLC, y con ello se discutió sobre los efectos observados a través de las tinciones.

3.3. Estudio de la respuesta transcriptómica en *B. velezensis* 83 debido a los efectos del tiempo e interacción microbiana bajo condiciones de no limitación nutricional. A partir del sistema de interacción *in vitro* montado en biorreactor agitado, se generaron suspensiones celulares de bacteria libre de biomasa fúngica para su análisis transcripcional. RNA-seq y análisis bioinformático permitieron dilucidar los cambios de expresión en transcriptomas de *B. velezensis* 83 debidos al tiempo de incubación y a la interacción con el hongo bajo condiciones de no limitación nutricional (C y O₂).

Un cultivo en lote como el planteado para este trabajo, es por definición un ambiente cambiante a través del tiempo. Por esta razón, resultó importante considerar el efecto del tiempo dentro de los análisis transcripcionales para separarlos de aquellos causados por el hongo fitopatógeno. En un microorganismo como *Bacillus velezensis*, el cual despliega diferenciación celular, los efectos del tiempo incluyen aquellos derivados del aumento en la concentración celular, las moléculas de *quorum sensing* y las respuestas transcripcionales asociadas.

Se aisló ARN bacteriano de cultivos axénicos y co-cultivos para comparar sus transcriptomas. Mediante análisis de expresión diferencial (DEA) se evaluaron los efectos individuales de dos factores: el tiempo de incubación (concentración celular) y la interacción microbiana sobre los niveles de expresión (CPM, cuentas por millón). Para el efecto del tiempo, se compararon las muestras provenientes del tiempo de 13h con respecto 8h, indistintamente si correspondían a cultivo axénico o co-cultivo (Tabla 7). Por su parte, para el efecto de la interacción microbiana, se compararon las muestras del co-cultivo con respecto a las provenientes del cultivo axénico, indistintamente de su tiempo de incubación (Tabla 7).

Particularmente, se estudió el efecto de la interacción microbiana sobre la expresión de los genes relacionados a la resistencia al estrés (estrategia de defensa) y la biosíntesis de compuestos antimicrobianos (estrategia de ataque) en condiciones de interacción microbiana. Para ello se realizó una búsqueda bioinformática de los genes y rutas de interés dentro del genoma de *B. velezensis* 83, incluyendo: a) la respuesta general al estrés, b) respuesta a estrés oxidativo, c) proteínas de unión a penicilina y respuesta a estrés por antibióticos, d) ruta de detoxificación de metilgloxal y e) genes biosintéticos de metabolitos antimicrobianos y enzimas líticas.

Finalmente, para ponderar la carga transcripcional de los genes necesarios para la biosíntesis de compuestos antimicrobianos se analizó su nivel de expresión en número de bases nitrogenadas/millón de secuencias (pb/M= TPM x pb/transcrito) y se comparó contra los genes más expresados bajo las condiciones experimentales y las proteínas más abundantes según lo reportado (Zhu y Stülke, 2018). Para calcular los valores en pb/M se consideró el tamaño de secuencia reportado (Balderas-Ruiz *et al.* 2020) y la expresión en transcritos por millón (TPM) obtenida de transcriptomas de cultivo axénico a 13 h.

Tabla 7. Diseño de toma de muestras para análisis de expresión diferencial y planteamiento de hipótesis.

Muestras	Tiempo (h)		Análisis de expresión diferencial ($n=6$, $p<0.05$, $FDR<0.05$)	
	8	13	Factor	Hipótesis nula
Axénico	A8	A13	Tiempo	$H_0 : \frac{\sum cpm_{A13} + \sum cpm_{C13}}{n} = \frac{\sum cpm_{A8} + \sum cpm_{C8}}{n}$
Cocultivo	C8	C13	Interacción microbiana	$H_0 : \frac{\sum cpm_{C13} + \sum cpm_{C8}}{n} = \frac{\sum cpm_{A13} + \sum cpm_{A8}}{n}$

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Microorganismos.

El agente de control biológico, *B. velezensis* 83 fue proporcionado por Agro&Biotecnía S. de R.L. de C.V., Cuernavaca, Morelos, México y está depositado en las Colecciones Coordinadas Belgas de Microorganismos (BCCM-LMG S-30921). El hongo fitopatológico, *C. gloeosporioides* 09, fue proporcionado por el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), Culiacán, Sinaloa, México (Galindo *et al.*, 2013).

4.2 Ensayos de interacción en cultivo lote.

4.2.1 Inóculo fúngico. Una suspensión de esporas (conidios) de *C. gloeosporioides* fue obtenida a partir de cultivo sólido, propagado el hongo durante 10 días en medio PDA (DB, Difco, MD, USA) a 29 °C y bajo oscuridad. La composición de este medio fue la siguiente (g/L): glucosa (20), almidón de papa (4) y agar (15). Los conidios fueron recuperados en 10 mL de solución isotónica (NaCl, 0.9 % p/v) y el micelio se descartó a través de filtración (membrana Whatman No. 1), para una concentración final de 2×10^8 conidios/mL. Posteriormente, esta suspensión fue utilizada para inocular 1 L de medio líquido de papa y glucosa (pH 5.5, BD Difco, MD, USA) contenido en un matraz Erlenmeyer de 2 L de capacidad a una concentración inicial de 2×10^5 conidios/mL. El cultivo fue incubado a 29 °C y 80 rpm durante 21 horas. Finalmente, el micelio (1.8 g de biomasa seca libre de conidios) fue recuperado asépticamente mediante filtración (membrana Whatman 1) y suspendido en 150 mL de solución isotónica.

4.2.2 Inóculo de la bacteria. Esporas de *Bacillus velezensis* 83 almacenadas en tubos de criopreservación y suspendidas en una solución de glicerol al 40% v/v, fueron reactivadas en cajas de Petri con agar YPG durante 24 horas. La composición del medio YPG fue la siguiente (g/L): extracto de levadura (10), peptona de caseína (10), glucosa (10) y agar bacteriológico (15). Posteriormente, las células generadas de *B. velezensis* 83 fueron inoculadas en un matraz Erlenmeyer de 250 mL de capacidad, el cual contenía 50 mL de medio mineral para esporulación a un pH inicial de 6.8. La composición del medio fue la siguiente (g/L): 4 (NH₄)₂SO₄, 5.3 K₂HPO₄, 6.4 KH₂PO₄, 0.4 MgSO₄·7H₂O, 10 glucosa, 0.005 MnCl₂, 0.04 CaCl₂ y 0.03 FeSO₄·7H₂O. Las células fueron incubadas a una concentración inicial de 1×10^7 células/mL a 29 °C y 200 rpm durante 50 h. Tras lo anterior, se verificó un porcentaje de esporulación mayor al 85 % (esporas/célula) mediante una tinción con verde de malaquita (Schaeffer y Fulton, 1933). Finalmente, las esporas fueron recuperadas por centrifugación y suspendidas en solución isotónica (NaCl, 0.9 % p/v).

4.2.3 Cultivos axénicos y co-cultivo. Los ensayos se realizaron en un biorreactor tipo tanque agitado con geometría estándar de 2.5 L de volumen nominal (Dusher®, Cd. México, México) empleando 2 L de medio mineral con papa y glucosa. El medio contenía (g/L): (NH₄)₂SO₄ (4), K₂HPO₄ (5.3), KH₂PO₄ (6.4), MgSO₄·7H₂O (0.4), MnCl₂ (0.005), CaCl₂ (0.04), FeSO₄·7H₂O (0.03), dextrosa (20) y almidón soluble de papa (4). El biorreactor fue operado durante 18 h en modo lote a 29 °C y 100 rpm. El pH se mantuvo constante a 6.8 ± 0.1 mediante la adición de solución ácida (HCl, 5 % v/v) o alcalina (NaOH, 5 % p/v), según fuese requerido. La tensión de oxígeno disuelto (TOD) fue mantenida a valores superiores de 30 % de saturación enriqueciendo con oxígeno puro cuando fue necesario, pero manteniendo constante la velocidad de aireación (4.0 L/min, 2 vvm). Además, se empleó una barra difusora de acero inoxidable microporoso para propiciar la transferencia de oxígeno. Se realizaron tres tipos de cultivos: dos cultivos axénicos (bacteria u hongo) y un co-cultivo. Para el escenario preventivo y curativo, los cultivos con *C. gloeosporioides* fueron inoculados a una concentración inicial de 2×10^5 conidios/mL y 0.9 g/L de biomasa seca libre de conidios, respectivamente. Para los cultivos con *B. velezensis* 83, estos fueron inoculados a una concentración inicial de 1×10^6 esporas/mL para ambos escenarios. En el caso de los co-cultivos, los dos microorganismos fueron inoculados al mismo tiempo (0 h).

4.2.4 Análisis estadístico de ensayos de interacción. Se realizó estadística descriptiva básica de las variables estudiadas en cultivos axénicos y co-cultivos, además de un análisis de comparación de medias mediante una prueba de Tukey ($p < 0.05$).

4.3 Métodos analíticos.

4.3.1 Cuantificación del crecimiento celular. La concentración de células de *B. velezensis* 83 fue calculada usando una cámara de Neubauer (8100104, Hirschmann, Eberstadt, Alemania) y microscopía de campo claro (Optiphot-2 Nikon, Japón) empleando un objetivo 40x/0.65 160/0.17 (Nikon, Japón). La biomasa seca total en cultivos axénicos y co-cultivo fue determinada mediante análisis gravimétrico. Para dicho propósito, las muestras fueron filtradas a través de una membrana de acetato de celulosa de 0.45 μm de tamaño de poro (Sartorius Stedim Biotech, Göttingen, Alemania) y deshidratadas hasta masa constante con calor seco a 80 °C. El crecimiento bacteriano (g/L) fue obtenido mediante una correlación entre la biomasa seca y la concentración de células. En el caso de los co-cultivos, la fracción correspondiente al hongo fue obtenido por diferencia.

4.3.2 Cuantificación de glucosa. Muestras de sobrenadante de cultivo fueron utilizadas para la cuantificación de glucosa residual mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) haciendo uso de una columna Aminex HPX-87H de 300 × 2.9 mm (BIO-RAD, CA, USA) en modo isocrático. Se utilizó un sensor de índice de refracción (2414 Model, WATERS, Milford, MA, USA) para la cuantificación y la fase móvil consistió en una solución de H_2SO_4 a 5 mM. El flujo de fase móvil fue de 0.8 mL/min y la temperatura de 50 °C. Se elaboró una curva de calibración con soluciones estándar de glucosa (J.T. Baker, Madrid, ES).

4.3.3 Cuantificación de lipopéptidos. Muestras de sobrenadante de medio cultivo fueron utilizadas para la cuantificación de bacilomicina D y surfactina mediante HPLC. Para dicho propósito, se utilizó una columna analítica Zorbax RX (C_8 , 5 μm) de 4.6 × 150 mm (Agilent, CA, USA) y la detección se realizó a 200 nm mediante un detector dual UV/VIS (2487, WATERS, Milford, MA, USA). La fase móvil consistió en una mezcla de agua (solución A) y acetonitrilo (solución B), ambas al 0.1 % v/v de ácido trifluoroacético (TFA). La temperatura y el flujo se mantuvieron a 30 °C y 1 mL/min, respectivamente. Los lipopéptidos fueron separados mediante un gradiente, donde el porcentaje de la solución B se modificó con respecto al tiempo de la siguiente manera: constante a 37 % (0 al 10° min), ascenso de 37 a 80% (10 al 11° min), constante a 80% (11 al 21° min), descenso de 80 a 37% (21 al 22° min) y finalmente constante a 37 % (22 al 30° min). Para elaborar curvas estándar, se utilizaron soluciones de concentración conocida de iturina A y surfactina de *Bacillus subtilis* de >95 % de pureza (Sigma-Aldrich Merck KGaA, Darmstadt, DE).

4.3.4 Cuantificación de ácido poli- γ -glutámico (γ -PGA) y determinación de viscosidad. Se determinó la concentración de γ -PGA acuerdo a lo reportado por Cristiano-Fajardo, *et al.*, 2024 utilizando sobrenadantes libres de células de cultivos axénicos y co-cultivo. Para dicho propósito se utilizó un equipo de HPLC (2694, Waters corporation, USA) equipado con una columna para cromatografía de permeación en gel (GPC, Ultrahydrogel de 7.8 × 300 mm, UG500). Las muestras (0.1 mL) fueron eluidas a 38 °C utilizando una solución de NaNO_3 (0.1 M) como fase móvil, a un flujo constante de 0.8 mL/min. Por su parte, la viscosidad de estos sobrenadantes fue determinada empleando un reómetro de cono y plato (Advanced Rheometer AR100, TA Instruments, Waters Corporation, USA) equipado con un cono 511604.901 (TA Instruments, Waters Corporation, USA). Las mediciones se realizaron a 30 °C y una velocidad de cizallamiento entre 1 y 10000 (s^{-1}). La viscosidad aparente fue reportada a 100 (s^{-1}).

4.4 Ensayos de viabilidad celular.

4.4.1 Tinciones. Suspensiones celulares de *Bacillus* y/o *Colletotrichum gloeosporioides* fueron recolectadas de los cultivos axénicos o co-cultivos antes y después del agotamiento de la glucosa para realizar ensayos de viabilidad celular. Se utilizaron dos cromóforos fluorescentes, el yoduro de propidio (IP) y/o SYTO 9 (S9), obtenidos de pruebas comerciales para viabilidad celular (LIVE/DEAD®, Molecular Probes, ahora parte de Thermo Fisher Scientific, USA). En el caso de la bacteria, se adicionó 1 µL de solución de IP y S9 (1.67 and 20 mM, respectivamente) a 1 mL de suspensión de células (1.2×10^8 células/mL) y se incubó en oscuridad durante 15 minutos. Para el caso del hongo, se adicionó 1 µL de solución de IP (20 mM) a un 1 mL de suspensión de células y se incubó en oscuridad durante 15 minutos.

4.4.2 Microscopía de fluorescencia. Imágenes de contraste de fase (CF) y fluorescencia (F) fueron obtenidas de células de *Colletotrichum gloeosporioides* teñidas con IP. El microscopio utilizado fue un Zeiss Axioskop (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Germany) equipado con dos objetivos, 20×/0.5 y 40×/0.75, y un cubo de filtro de fluorescencia (BP 546 FT 580 LP 590). Las imágenes fueron recolectadas usando una cámara monocromática (CCD Photometrics CoolSnapcf). Células del hongo (conidios o micelio) sometidas a tratamiento térmico (80 °C, 15 minutos) o concentraciones conocidas de bacilomicina D C₁₄ fueron utilizadas como un control positivo, mientras que células no teñidas fungieron como control absoluto (Anexos, Fig. 1S). La bacilomicina D C₁₄ fue obtenida de sobrenadantes de *B. velezensis* 83 (>95 % pureza) mediante el procedimiento descrito por Luna-Bulbarela *et al.*, (2018).

4.4.3 Citometría de flujo. Imágenes de fluorescencia de células de *Bacillus velezensis* 83 teñidas con IP y S9, fueron obtenidas mediante un citómetro de flujo acoplado a análisis de imágenes (ImageStream^x, AMNIS, EMD Millipore, WA, USA) equipado con un objetivo 60x/0.9. Los datos obtenidos fueron procesados mediante IDEAS Application v6.1 utilizando un archivo de compensación. Los canales e intensidades de los láseres de excitación fueron (mW): 5 (488 nm) y 10 (785 nm). Por su parte, los espectros de emisión utilizados para S9 y IP fueron 480-560 y 595-660 nm, respectivamente. Células vegetativas de la bacteria sometidas a tratamiento térmico (80 °C, 15 minutos) fueron utilizadas como un control positivo y células no teñidas fungieron como control absoluto (Anexos, Fig. 1S).

4.5 Análisis transcripcionales.

4.5.1 Aislamiento y secuenciación de ARN. Muestras de ARN total de la bacteria fueron obtenidas a partir de los cultivos en biorreactor para su posterior análisis transcripcional. Las muestras fueron recolectadas después de 8 y 13 h de cultivo, lo cual correspondió a tiempos de interacción donde no existe limitación por glucosa y oxígeno. 30 mL de suspensión de células provenientes del reactor fueron recolectados en tubos de 50 mL de capacidad (libres de ARNasas) que contenían 8 mL de solución de estabilización de ARN (RNAlater, AMBION, TX, USA) y colocadas en hielo. En el caso de los co-cultivos, el micelio de *Colletotrichum gloeosporioides* fue descartado asépticamente mediante filtración. Tras lo anterior, las muestras se centrifugaron a 4000 rpm, 4°C por 30 min. Se descartó el sobrenadante y suspendió la muestra en 500 µL de solución de estabilización. La muestra obtenida fue almacenada a -80 °C hasta el momento de su extracción. Para realizar la extracción de ARN, se realizó una digestión enzimática del material. La solución de lisis consistió en Tris-Cl (30 mM) + EDTA (1.26 mM) suplementado con lisozima a 15 mg/mL (Sigma-Aldrich, 12650-88-3, ≥90 % de pureza, ≥40,000 U/mg), y proteinasa K a 0.06 U/mL (QIAGEN, 19131, >600 mUA/mL). La digestión se realizó en 0.22 mL a una concentración de 4×10^8 células/mL, a 25 °C durante 15 min. Posteriormente, el ARN total fue aislado empleando RNeasy Mini Kit (74104, QIAGEN). La concentración del ARN se cuantificó en un NanoDrop (ND-1000, Thermo Scientific) mientras que la calidad del ARN fue corroborada mediante electroforesis capilar (2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies, Waldbronn, DE). Todos los tratamientos se realizaron

por triplicado asegurando que el número de integridad del ARN fuese mayor a 8.0 (Anexos, Fig. 2S). Se realizó un enriquecimiento del ARN mensajero mediante la remoción del ARN ribosomal (Ribominus™, Invitrogen, Life Technologies). De estas muestras, se realizó una cuantificación de ARN mensajero mediante secuenciación del transcriptoma (RNA-seq, Hi Seq4000 Sequencing Systems, Illumina Inc., CA, USA) a través del servicio de secuenciación masiva de A&M AgriLife Research Genomics and Bioinformatics Service (Texas, USA). A partir de lo anterior se generaron 12 librerías pareadas correspondientes a cuatro condiciones diferentes: cultivo axénico y co-cultivo a dos distintos tiempos (8 y 13 h, Anexos, Fig. 2S). Estas secuencias fueron depositadas en Gene Expression Omnibus (GEO, GSE202842).

4.5.2 Análisis de expresión diferencial (DEA). Previo al análisis de expresión diferencial, se realizó un control de calidad de las secuencias sin procesar mediante el programa FastQC (versión 0.11.7, Anexos, Fig. 2S). Corroborada la viabilidad de las librerías, los transcritos obtenidos por RNA-Seq fueron cuantificados mediante el *software* Salmon (v0.14.1, Patro *et al.*, 2017), usando el genoma de *B. velezensis* 83 como referencia (3846 secuencias codificantes, NCBI CP034203). Con estos datos, se comprobó la reproducibilidad de las muestras mediante un análisis de componentes principales (PCA) y se realizó un análisis de expresión diferencial mediante Edge R (Bioconductor package, Robinson *et al.*, 2010) (Anexos, Fig. 3S). Aquellas secuencias codificantes con al menos una cuenta por millón (*cpm*) fueron consideradas para el análisis. Los puntos de corte para las pruebas estadísticas fueron una probabilidad y una tasa de descubrimientos falsos menor al 5 %. ($p < 0.05$ y $FDR < 0.05$, respectivamente). Se evaluaron los efectos individuales de dos factores: a) tiempo de incubación, y b) la interacción microbiana. Posterior al DEA, se realizó una asignación de grupos de ortología mediante eggNOG-Mapper (Versión 4.5, Huerta-Cepas *et al.*, 2017) y BlastKOALA (Versión 2.2, Kanehisa *et al.*, 2016b) usando el genoma de *B. velezensis* 83 como templatado. Esta información se utilizó para evaluar las rutas metabólicas afectadas por los factores estudiados (tiempo de incubación e interacción) a través de KEGG Mapper donde el genoma de la cepa modelo, *B. amyloliquefaciens* FZB42 fue utilizado como referencia (Kanehisa y Goto, 2000; Kanehisa *et al.*, 2016a; Kanehisa y Sato, 2019). Ambas anotaciones fueron enriquecidas con la información disponible para *B. subtilis* reportada en Subtiwiki (Zhu y Stülke, 2018; Pedreira *et al.*, 2022). Para ello, se realizaron análisis de secuencias mediante BLAST-P en búsqueda de genes ortólogos, considerando el contexto genómico como un criterio extra de validación y finalmente se unificó la nomenclatura de los genes entre ambas especies.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Dinámica de poblaciones durante escenario curativo y preventivo. Las cinéticas de crecimiento de *B. velezensis* 83 y *C. gloeosporioides* 09 para cultivos axénicos y co-cultivo desarrolladas durante el escenario curativo se muestran en la Figura 4A-D. En el caso de la bacteria, se detectó una velocidad de crecimiento específica menor durante el co-cultivo a partir de las 11h con respecto al cultivo axénico (0.19 vs 0.45 h^{-1}), incluso cuando el oxígeno (30 % de TOD) y la concentración de glucosa (5 g/L, Fig. 4E) no eran limitantes. En tales condiciones, el peso seco máximo fue de 7.7 y 2.2 g/L para el cultivo axénico y co-cultivo, respectivamente (Fig. 4A y 4F). Dado que durante el co-cultivo el hongo mantuvo condiciones que permitieron una velocidad de crecimiento máxima hasta el agotamiento de la fuente de carbono (16 h), una limitación por nutrientes no pudo ser la causa de esta diferencia (Fig. 4D).

Para analizar si esto se debió a diferencias en viabilidad celular, suspensiones de células co-cultivadas de *B. velezensis* obtenidas a diferentes tiempos de incubación se sometieron a una doble tinción con IP/S9 y se analizaron mediante citometría de flujo (Fig. 5). Los ensayos no revelaron daños por permeabilización de membrana en células co-cultivadas de *B. velezensis* 83 antes o durante la limitación por glucosa. Por lo tanto, la disminución en la velocidad de crecimiento observada no puede asociarse a una pérdida de viabilidad celular. En el caso del hongo no se encontraron diferencias significativas en el crecimiento entre cultivo axénico y co-cultivo (Fig. 4D y 4F).

Al comparar los cultivos axénicos, el rendimiento de biomasa-sustrato ($Y_{x/s}$) fue similar para ambos microorganismos, siendo 0.45 ± 0.02 y 0.58 ± 0.17 (g_x/g_s) para la bacteria y el hongo, respectivamente (Fig. 4F). Esto significa que el medio de cultivo seleccionado ofreció igualdad en términos nutricionales. Contrario a lo esperado, la biomasa total del co-cultivo al agotarse la glucosa, se distribuyó en 26 y 74 % para bacteria y hongo, respectivamente. Durante el escenario curativo, esta distribución se explica parcialmente tanto por una mayor biomasa fúngica inicial como por el tiempo requerido para la germinación de las esporas de *B. velezensis* 83 (aproximadamente 2-3 horas).

Aunque el crecimiento fúngico no se vio afectado, la viabilidad micelial sí disminuyó gradualmente durante el co-cultivo. Esto se hace palpable cuando a tiempos finales del co-cultivo, se presenta la formación de conidios irregulares, característicos de la presencia de lipopéptidos (Luna-Bulbarela *et al.*, 2018). La pérdida de viabilidad por daño en membrana se puede asociar directamente a la presencia de metabolitos fúngicos tales como la bacilomicina D y la fengicina. Ensayos *in vitro* con micelio y conidios utilizando bacilomicina D, así lo respaldan. Estos resultados se abordarán más detalladamente en los apartados 5.10.1 y 5.10.2, de resultados y discusión.

Es importante señalar que en el escenario de biocontrol preventivo, el co-cultivo donde ambos microorganismos fueron inoculados como esporas y conidios (bacteria y hongo, respectivamente), sólo se detectó inhibición en el hongo (60%, Fig. 6). En esta condición, la ventaja fue para la bacteria debido a que su tiempo de germinación (t_g) y duplicación ($t_{1/2}$) es menor (2-3 y 1.5 h, respectivamente) en comparación con el hongo (6-9 h y 4.9 h, respectivamente). En este escenario, cuando la germinación del hongo finaliza, la glucosa residual está cerca de agotarse. Una competencia agresiva por los nutrientes por parte de *B. velezensis* 83 puede explicar la distribución de la biomasa durante la interacción, mientras que deformaciones detectadas en el micelio indicaron antibiosis. En este sentido, se ha corroborado experimentalmente la eficacia del biocontrol por parte de *B. velezensis* 83 sobre *Botrytis cinerea* en frutos de tomate cuando se inoculan preventivamente (Balderas-Ruiz *et al.*, 2021). Posteriormente, se eligió el escenario de biocontrol curativo para evaluar la respuesta de la bacteria a nivel transcripcional ya que proporcionó un contexto en el que ambos microorganismos pueden interactuar durante un período de tiempo relativamente largo sin limitaciones nutricionales.

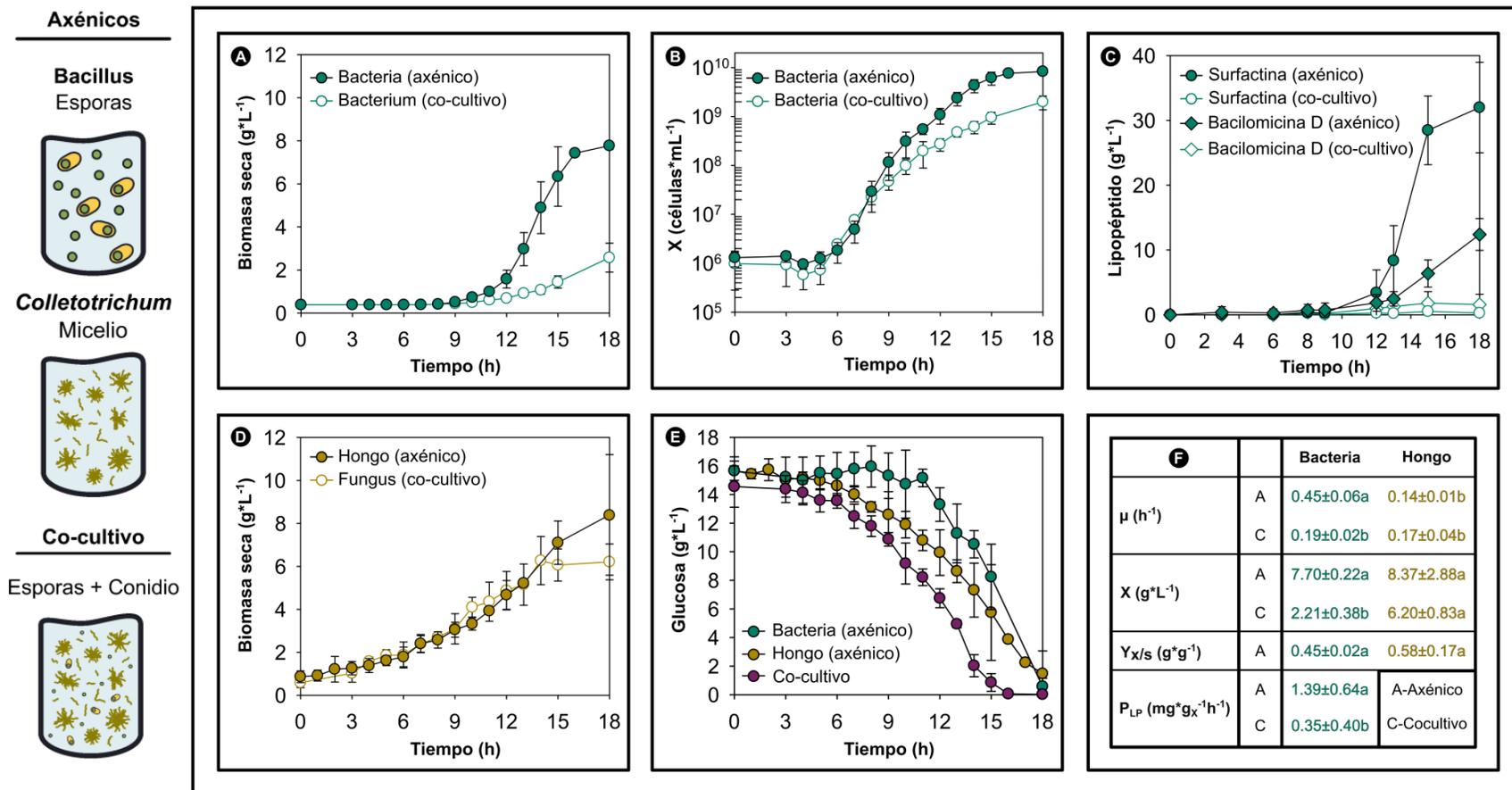


Figura 4. Distribución de biomasa y acumulación de lipopéptidos durante el escenario de interacción curativo. En este escenario, los microorganismos inician los cultivos en forma de esporas (bacteria) y micelio (hongo). Los círculos rellenos y vacíos corresponden a los cultivos axénicos y el co-cultivo, respectivamente. Los colores verde, amarillo y morado denotan a *B. velezensis*, *C. gloeosporioides* y al perfil de glucosa residual durante el co-cultivo, respectivamente. μ [h⁻¹] es la velocidad específica de crecimiento, X [g*L⁻¹] es la concentración máxima de biomasa seca a las 18 h, $Y_{X/S}$ [g*g⁻¹] es el rendimiento aparente biomasa-sustrato and P_{LP} [mg*g⁻¹*h⁻¹] es la productividad específica de lipopéptidos (surfactina + bacilomicina D). Tratamientos con letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$).

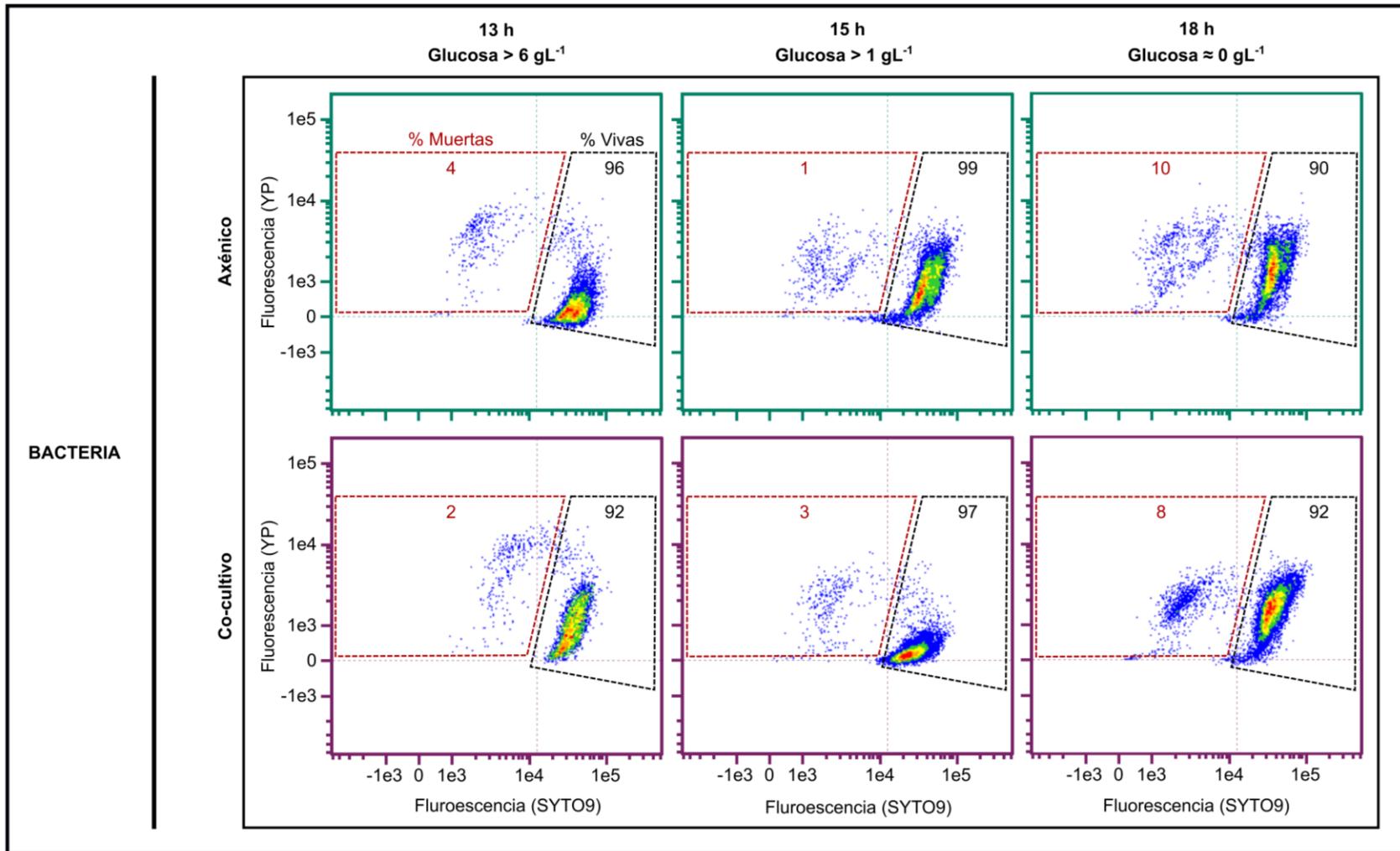


Figura 5. Análisis de viabilidad de suspensiones celulares de *B. velezensis* 83. Los citogramas indicados en verde y morado corresponden al cultivo axénico y co-cultivo. Los cuadriláteros denotados por líneas rojas y negras discontinuas y sus números asociados indican las zonas de células muertas y vivas (y su porcentaje de abundancia) según los controles positivo y negativo, respectivamente. Los cuadrantes en los citogramas delimitan la autofluorescencia de células del cultivo axénico sin adición de fluorocromos (control absoluto). Las concentraciones de glucosa indicadas corresponden a las determinadas en sobrenadantes en los tiempos de muestreo analizados.

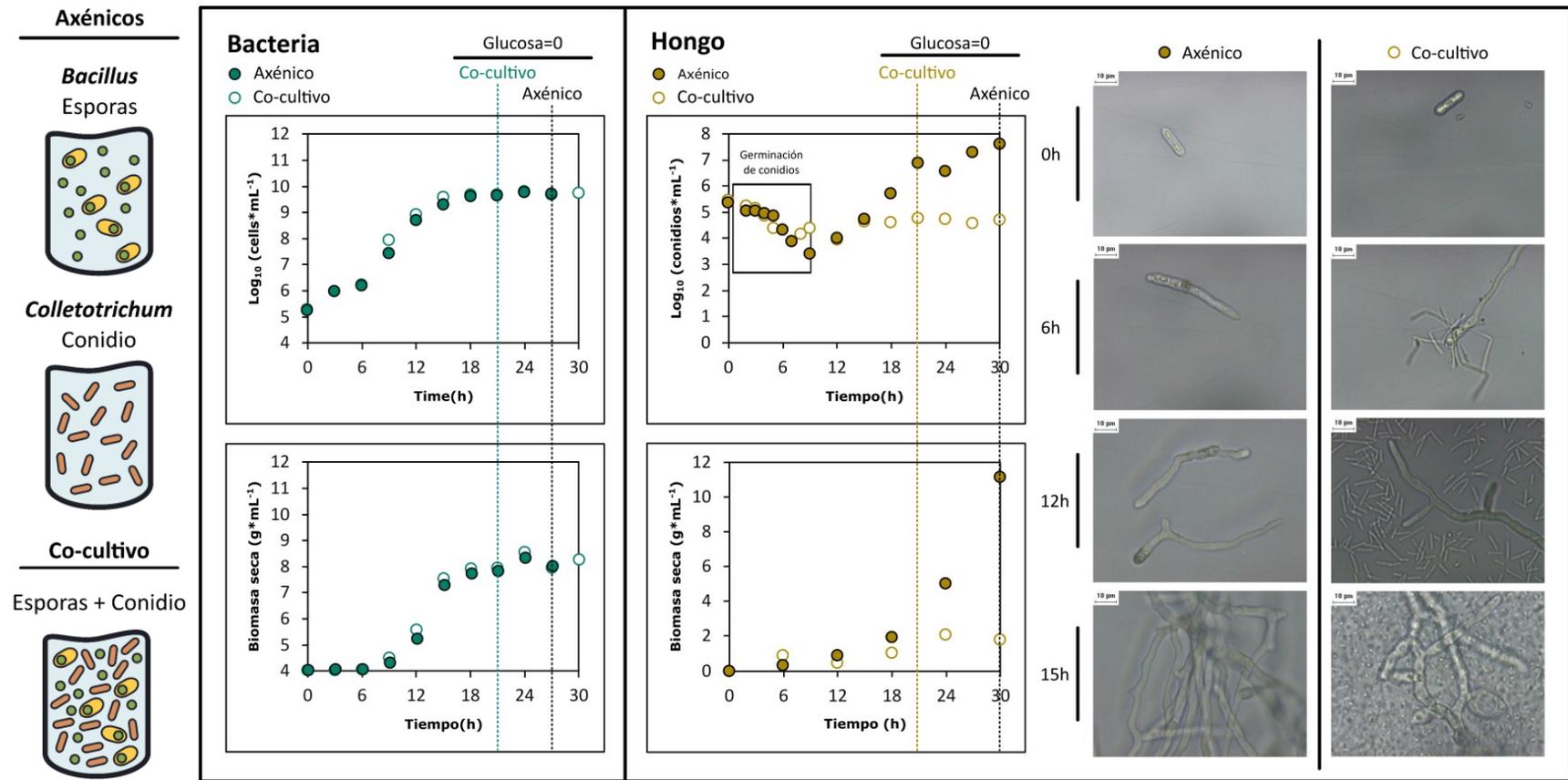


Figura 6. Distribución de biomasa durante el escenario de interacción preventivo. En este escenario, ambos microorganismos inician los cultivos en forma de esporas (bacteria y hongo). Los círculos rellenos y vacíos corresponden a cultivos axénicos y co-cultivo, respectivamente. Los colores verde y amarillo denotan a *B. velezensis* y *C. gloeosporioides*, respectivamente. Las líneas punteadas indican el momento de agotamiento de la glucosa. El gráfico correspondiente al perfil de acumulación de biomasa seca de *C. gloeosporioides* involucra la suma de biomasa de conidios y micelio. Fotografías a la derecha de los gráficos muestran la interacción entre ambos microorganismos, resaltando el periodo de germinación de los conidios (3-9 h). Morfologías atípicas en el micelio durante el co-cultivo pueden observarse a partir de las 15 h.

5.2 Secuenciación masiva de ARN (RNA-seq) y resultados globales del análisis transcripcional. El ARN total fue aislado de suspensiones celulares de la bacteria bajo diferentes condiciones de cultivo (axénico y co-cultivo) y dos tiempos de incubación (8 y 13 h). El objetivo fue determinar los efectos independientes de dos factores: a) la interacción microbiana (factor biótico) y b) el tiempo (concentración celular), sobre el nivel de expresión de las 3,846 secuencias codificantes (CDS, por sus siglas en inglés) en *B. velezensis* 83. A partir del análisis de RNA-seq, se obtuvieron 12 librerías pareadas (2x150 pb) con un tamaño entre los 11 y 14 millones de secuencias para cada una (Anexos, Fig. 2S). El número total de secuencias que se alinearon al genoma mediante el uso de Salmon (v0.14.1) fueron de 1,002,210 a 1,855,912 y de 1,214,048 a 2,147,153 para el cultivo axénico (8-15 %) y el co-cultivo (9-17 %), respectivamente (Anexos, Fig. 2S). Un alto porcentaje de las secuencias remanentes se alinearon a las secuencias del ARN ribosomal, donde del 35 al 46 % fueron correspondientes a las subunidades 5-16-23s del ribosoma bacteriano. Las secuencias que alinearon al genoma representan una cobertura de 75 a 139x y 91 a 148x para el cultivo axénico y co-cultivo, respectivamente (Anexos, Fig. 2S). Alrededor del 92 % del total de las CDS fueron expresadas (3542/3846) bajo las condiciones de cultivo.

Antes de proceder al análisis de expresión diferencial (DEA, por sus siglas en inglés), se corroboró la reproducibilidad de las muestras mediante un análisis de componentes principales (PCA, Anexos, Fig. 3S). Posteriormente, el DEA reveló que un total de 1,225 (31.8 % de las CDS) y 461 (11.9 %) fueron genes diferencialmente expresados (DEGs, por sus siglas en inglés) debido al efecto del tiempo de incubación (t) y la interacción microbiana (i), respectivamente (Figura 7). De ellos, 88 DEGs (2.2% del total) fueron sujetos al efecto combinado de ambos factores. Dentro del subconjunto de genes regulados positivamente, 623 se debieron al tiempo, 253 debido a la interacción microbiana y 1 fue regulado positivamente por ambos factores (Fig. 7). Para los genes regulados negativamente, 514 y 120 se debieron al tiempo y a la interacción microbiana, respectivamente, mientras que 8 fueron regulados negativamente por ambos factores. Un subconjunto de 79 DEG tuvo alteraciones opuestas en sus niveles de expresión debido al tiempo y la interacción microbiana. Resultados del análisis de expresión diferencial e información adicional de los genes con mayor cambio de expresión pueden consultarse en los Anexos, Tabla 1S. Posterior a este primer análisis, se realizó una clasificación de los DEGs por grupos de ortología, el cual es descrito a continuación.

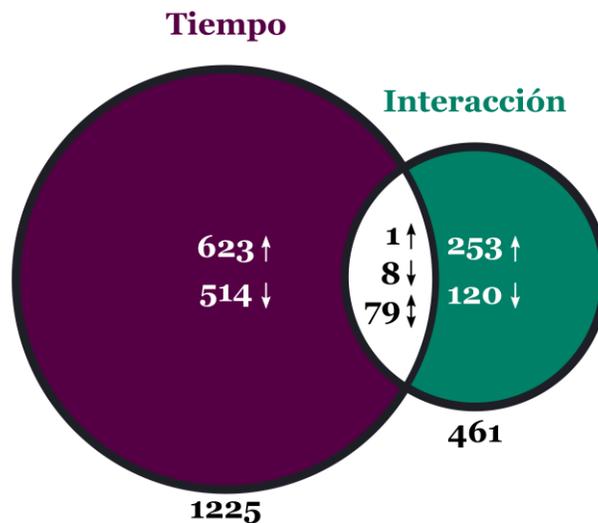


Figura 7. Resultados globales del análisis de expresión diferencial. Diagrama de Venn para describir la segregación de genes expresados diferencialmente (DEGs) debido a dos factores: tiempo de incubación (t) e interacción (i). Flechas indicando hacia arriba y abajo indican genes sobre- y sub-expresados, respectivamente. Flechas en ambas direcciones indican DEGs con efectos combinados.

5.3 Clasificación por grupos de ortología de los DEGs derivados del efecto de la interacción microbiana. La Figura 8 muestra 311 de los 461 (67.5%) DEGs afectados por la interacción microbiana después de ser clasificados por grupos de ortólogos (COGs, 17 en total). Los 150 DEGs restantes (32.5%) corresponden a proteínas hipotéticas cuya función es aún desconocida. El análisis de los COGs afectados se basó en dos características: 1) la contribución relativa a la respuesta global y 2) por patrón de distribución, es decir, porcentaje de genes sobre- o sub-expresados dentro de estos. Con respecto a la primera característica, aproximadamente el 50% de los genes afectados por la interacción se asignaron dentro de 4 COGs distintos cuya contribución individual relativa fue de, al menos, el 9%. Estos 4 COGs, el número de DEGs involucrados y su correspondiente porcentaje de contribución relativa fueron: transporte y metabolismo de iones inorgánicos (P, 51, 16%), transporte y metabolismo de carbohidratos (G, 50, 16%), producción de energía y conversión (C, 29, 9%) y transcripción (K, 27, 9%).

A nivel genómico, estas métricas representan cambios en el nivel de expresión para el 26, 21, 16 y 10% de los genes clasificados dentro de los COGs P-G-C-K. Por otro lado, 7 de los 17 COGs afectados por la interacción microbiana tenían más del 70% de sus genes sobre- o sub-expresados. De estos 7 COGs, el transporte y el metabolismo de iones inorgánicos (P, 76%), la transducción de señales (T, 87%), la replicación y reparación (L, 72%) y la traducción (J, 77%) fueron mayoritariamente regulados de forma positiva mientras que el metabolismo y el transporte de carbohidratos (G, 84%), el metabolismo y el transporte de nucleótidos (F, 90%) y el tráfico y la secreción intracelular (U, 75%) fueron en su mayoría regulados negativamente (Fig. 8).

A partir de la clasificación ortológica, se procedió a analizar la respuesta transcripcional de los regulones correspondientes a los factores sigma, proteínas de transducción de señales, y reguladores afectados. Lo anterior permitió entender las interacciones funcionales entre los genes diferencialmente expresados. Las figuras 9A-B muestran gráficos tipo volcán (\log_2 FC contra $-\log_2$ FDR) resultantes del análisis de expresión diferencial para 16 factores sigma de la polimerasa de ARN presentes en *B. velezensis* 83. Como se puede observar, los dos factores evaluados (tiempo e interacción) ocasionan cambios en sus niveles de expresión. En el caso del tiempo, 5 distintos factores sigma presentaron cambios.

En orden ascendente de su significancia y su función descrita, estos fueron: 1) **sigF**, específico de las etapas tempranas de la pre-espora y que permite la transcripción de genes para la esporulación, 2) **sigL**, necesario para el uso de la acetoina, 3) **sigH**, para la transcripción de genes de fase estacionaria temprana (incluyendo esporulación y competencia), 4) **sigM**, que facilita la adaptación a inhibidores de la síntesis de mureína y 5) **sigO**, un cofactor sigma, conocido por inducirse bajo condiciones ácidas y finalmente. De estos, solo **sigM** fue sub-expresado mientras que los cuatro restantes fueron sobre-expresados.

La activación de múltiples factores sigma en simultáneo al aumento de la concentración celular puede ser una evidencia indirecta de heterogeneidad fenotípica, la cual caracteriza al género *Bacillus* (López *et al.*, 2009; Kuchina *et al.*, 2021), explicando así la abundante cantidad de DEGs modificados a través del tiempo (1,225). Este tema en específico se abordará más a detalle en la sección 5.7.1 de resultados y discusión. Interesantemente, solo **sigB** y **ylaC** fueron los únicos genes que codifican para factores sigma afectados por la interacción, y ambos están relacionados a la respuesta al estrés y sobre-expresados. Se conoce poco acerca de las funciones de **YlaC**, pero la evidencia sugiere su relación con la regulación del estado redox y su contribución a la resistencia contra el estrés oxidativo/metálico (Kwak *et al.*, 2018). Por su parte, **SigB** es el responsable de la activación de la respuesta general al estrés y es una importante proteína para el control biológico de *B. velezensis* 83 tanto para sus mecanismos de defensa como ataque.

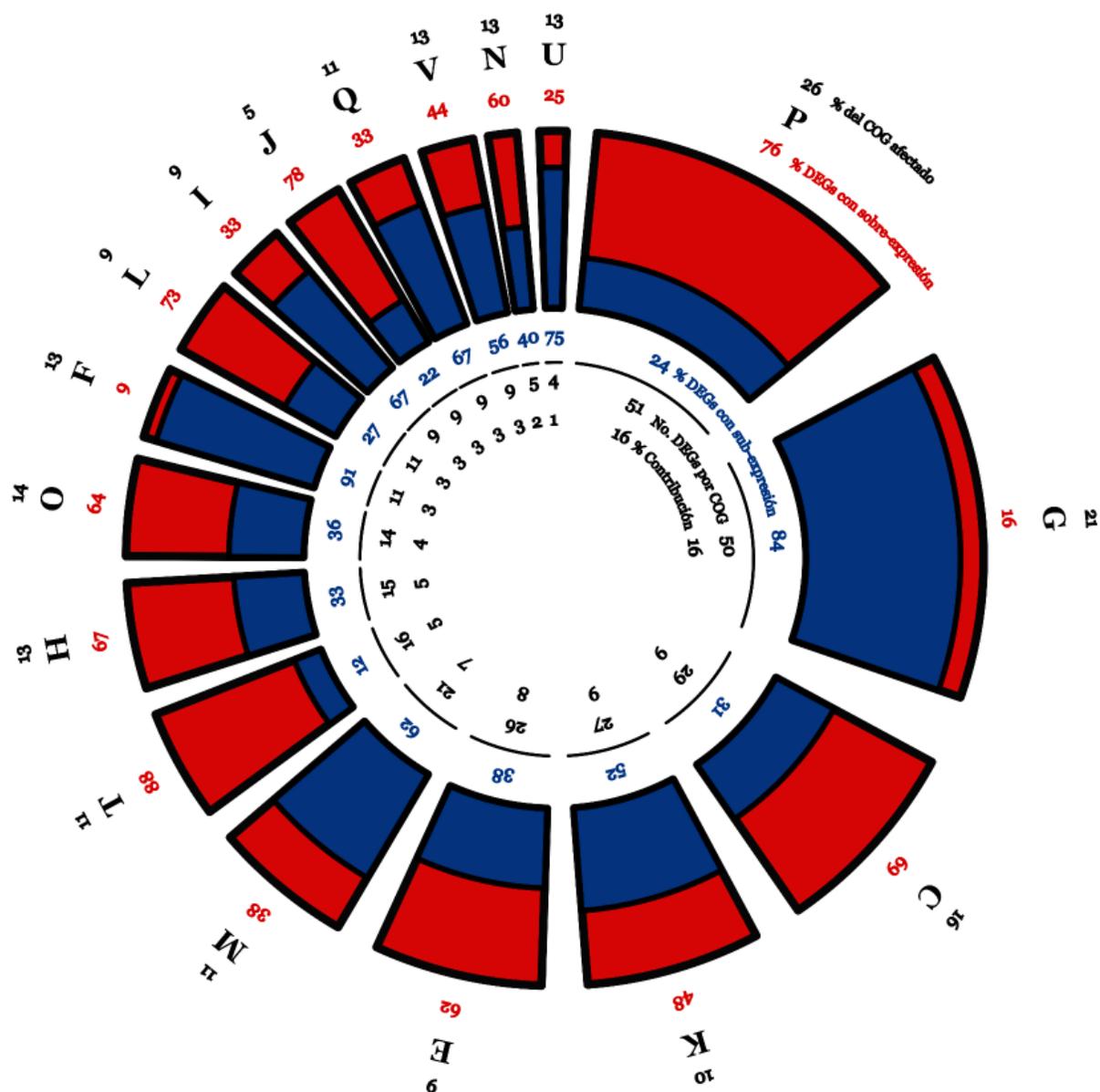


Figura 8. Clasificación ortológica de los genes diferencialmente expresados (DEGs) por efecto de la interacción. Las secciones circulares indican la proporción de cada categoría con respecto al total de DEGS, no considerando aquellos con función desconocida. Las subsecciones rojas y azules así como los correspondientes números con esos mismos colores indican la proporción de genes sobre- y sub-expresados de cada COG, respectivamente. Los números negros más al interior del gráfico que describen una trayectoria circular indican el número de DEGs de cada categoría (COG) y su contribución individual como porcentaje. Los números negros exteriores indican el porcentaje de DEGs por COGs con respecto al número total de genes en el genoma pertenecientes a la misma. La nomenclatura de los de los conjuntos de genes ortólogos es: **C** (producción y conversión de energía), **E** (transporte y metabolismo de aminoácidos), **F** (transporte y metabolismo de nucleótidos), **G** (transporte y metabolismo de carbohidratos), **H** (transporte y metabolismo de coenzimas), **I** (transporte y metabolismo de lípidos), **J** (traducción, estructura ribosómica y biogénesis), **K** (transcripción), **L** (replicación, recombinación y reparación), **M** (biogénesis de pared celular/membrana/envoltura), **N** (motilidad celular), **O** (modificación postraduccional), **P** (transporte y metabolismo de iones inorgánicos), **Q** (biosíntesis, transporte y catabolismo de metabolitos secundarios), **S** (poco conocido), **T** (mecanismos de transducción de señales), **U** (tráfico intracelular, secreción y transporte vesicular) y **V** (mecanismo de defensa).

FACTORES σ

MECANISMOS DE DEFENSA

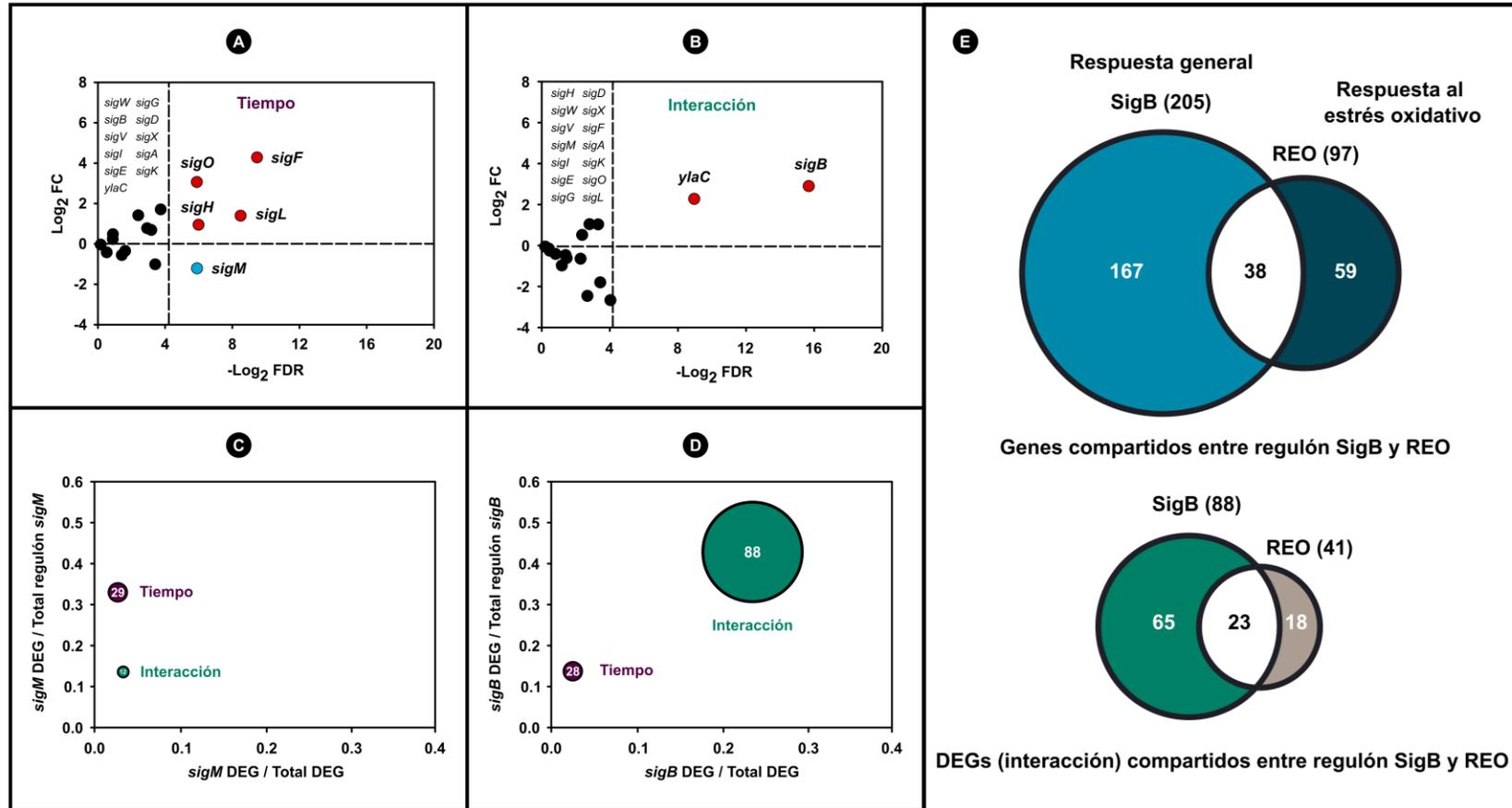


Figura 9. Análisis de expresión diferencial de los factores sigma (σ) en *B. velezensis* 83. A y B, diagramas tipo volcán de los 16 factores sigma presentes en *B. velezensis* 83 analizados por factores (A: Tiempo y B: Interacción). $\text{Log}_2 \text{FC}$: Indica el logaritmo base dos de la relación entre el nivel promedio de expresión de un gen (en CPM) con respecto al control. $-\text{Log}_2 \text{FDR}$: Indica el logaritmo negativo base dos de la tasa de descubrimientos falsos (aquí, datos más hacia la derecha presentan diferencias estadísticas con mayor significancia). Los rellenos rojo, azul y negro de los círculos en los gráficos A y B indican sobre-expresión, sub-expresión y cambios no significativos en su expresión, respectivamente. C y D, indican la distribución de los DEGs pertenecientes a los regulones de SigM (C) y SigB (D) por factor (tiempo e interacción) de acuerdo con dos variables: 1) la fracción de contribución que representan con respecto a tamaño global del regulón al que pertenecen y 2) la fracción que representan con respecto a la respuesta global. E. Arriba: diagrama de Venn para dos conjuntos de genes: los pertenecientes a la respuesta general al estrés (205, regulados por el factor sigma alternativo *sigB*) y aquellos relacionados a la respuesta al estrés oxidativo (97, REO). Abajo: DEGs compartidos entre el regulón de SigB y REO.

5.4 Efecto de la interacción microbiana sobre los mecanismos de DEFENSA en *B. velezensis* 83. Los DEGs sobre-expresados pertenecientes a la categorías COG de transducción de señales y transcripción indicaron que los mecanismos de defensa fueron activados en células co-cultivadas de *B. velezensis* 83. Tal es el caso del operón *rsbV-rsbW-sigB-rsbX*, el cual fue consistentemente sobre-expresado. De hecho, entre todos los DEGs asociados con la interacción microbiana, el gen *sigB* que codifica para el factor sigma alternativo de la polimerasa de ARN, SigB (σ^B), se encuentra en el top 4 de mayor significancia ($\text{Log}_2 \text{FC} = 2.89$, $p\text{-value} = 2.14 \times 10^{-8}$, $\text{FDR} = 1.9 \times 10^{-5}$, Fig. 9B y 10). Estos genes codifican las proteínas de señalización del estresosoma, el complejo multiproteico supramolecular responsable de la detección del estrés y la activación de **SigB**, que a su vez controla la respuesta general al estrés (GSR, por sus siglas en inglés).

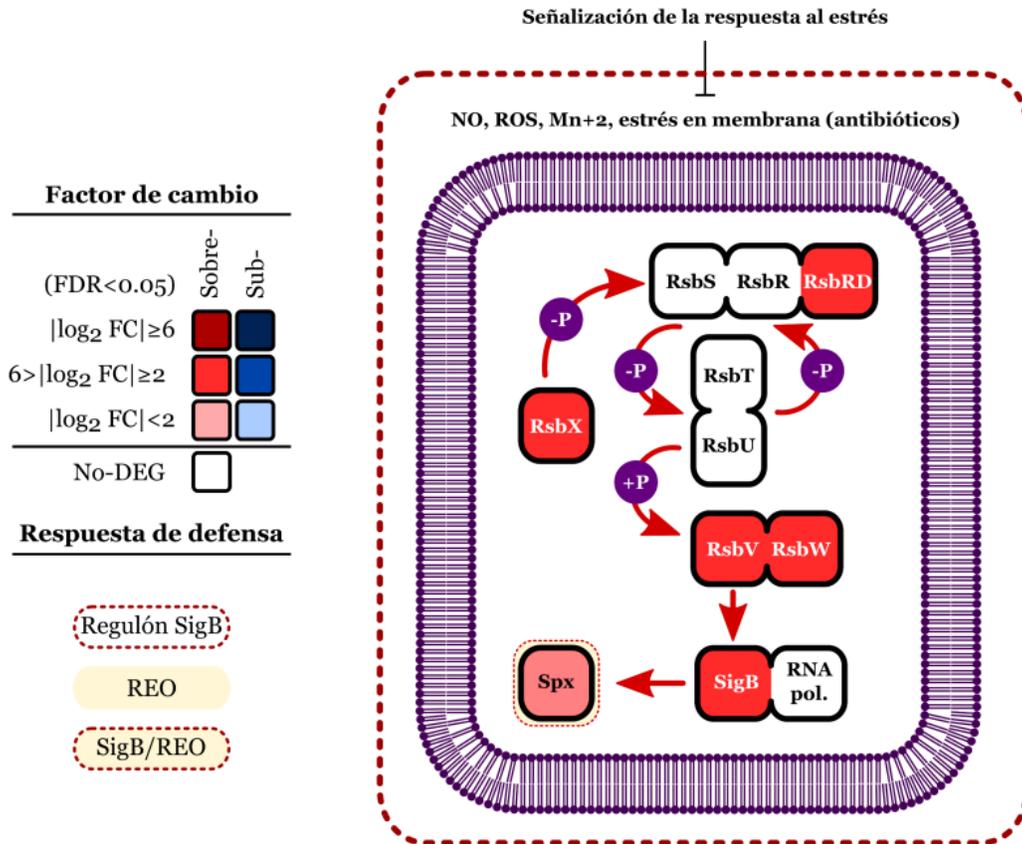


Figura 10. DEA de la ruta de activación de la respuesta a estrés en células co-cultivadas de *B. velezensis* 83. Los resultados del análisis transcripcional se muestran a través de un diagrama de funciones e interacción de proteínas. Aquí, los cuadros dentro del diagrama representan cada una de las proteínas involucradas. El color rojo o azul indica una sobre- y sub-expresión (estadísticamente significativa) de los genes correspondientes de acuerdo con una escala de factores de cambio indicada a la izquierda. En el caso de cuadros blancos, estos denotan cambios no significativos en los niveles de expresión. Los colores y líneas fuera de los cuadros indican información adicional: la línea roja punteada y el patrón de color marfil indican que los genes correspondientes a estas proteínas pertenecen al regulón de SigB o a REO. Patrones simultáneos (líneas rojas punteadas sumadas a patrones marfil) indican que una proteína es regulada por ambos sistemas.

SigB es relevante porque es el regulador maestro de la adaptación al estrés en *B. subtilis* (Bartolini *et al.*, 2019). Por su parte, **RsbX** desfosforila a **RsbS** y **RsbR**, dos de los componentes principales del estresosoma. **RsbW** es el factor anti-sigma B, mientras que **RsbV** es el antagonista del factor anti-sigma B. **rsbRD**, un parálogo de **rsbR**, que codifica un componente putativo del estresosoma, también fue regulado positivamente por la interacción microbiana. El factor sigma alternativo **SigB** induce la transcripción de más de 200 genes, incluidos los que codifican proteínas de estrés general (GSP). Estas proteínas de estrés dependientes de **SigB** están involucradas en la protección no específica

contra el estrés oxidativo y protegen a las células contra factores de estrés (antibióticos, calor, ácido y sal) con múltiples y preventivos mecanismos de resistencia al estrés (Mols y Abee, 2011). De acuerdo con nuestro análisis, 205 genes de *B. velezensis* 83 mostraron homología de secuencia con genes pertenecientes al regulón **sigB** descrito para *B. subtilis* (Zhu y Stülke, 2018). La distribución de estos genes por *e-value* fue: 115 (con $e-value < 1 \times 10^{-99}$), 82 ($1 \times 10^{-99} \leq e-value < 2 \times 10^{-20}$) y 8 ($2 \times 10^{-20} \leq e-value < 5 \times 10^{-4}$). Para información más detallada se invita a acudir a la sección de Anexo, Tabla 2S).

Un total de 116 genes del regulón de **sigB** se expresaron diferencialmente, de los cuales 28 y 88 se vieron afectados por el tiempo y la interacción microbiana, respectivamente. Estas cifras corresponden al 13.6% y al 42.9% del número total de genes pertenecientes al regulón **sigB** (Fig. 9D). Para los *DEGs* afectados por el tiempo, 18 y 10 *DEGs* presentaron sobre- y sub-expresión, respectivamente, mientras que todos los genes dependientes de **SigB** afectados por la interacción microbiana (88) fueron sobre-expresados. Los *DEGs* dependientes de **SigB** representan el 25% de los *DEG* afectados exclusivamente por la interacción microbiana. Además, considerando proteínas de función desconocida o hipotética, estos 88 genes se encuentran dentro de múltiples grupos COG en los que se clasifican los genes correspondiente al regulón de **sigB** (Anexos, Fig. 4S). Esto significa la activación de una respuesta sistemática dependientes de **SigB**. En términos del número de operones pertenecientes al regulón de **sigB**, 91 fueron afectados, de los cuales: 21, 65 y 5 fueron afectados por el tiempo, la interacción microbiana y por doble efecto, respectivamente. Abriendo un paréntesis, es interesante hacer notar que los perfiles de expresión de **sigM** y **sigB** y sus efectos son consistentemente opuestos. Por su parte **sigB** es un gen exclusivamente sobre-expresado por la interacción, mientras que **sigM** es un gen sub-expresado por efecto tiempo, donde los genes de sus respectivos regulones persiguen fielmente este mismo patrón. El regulón de **sigM** consta de 87 genes, de los cuales 29 fueron modificados por efecto del tiempo, mientras que únicamente 12 por efecto de la interacción, un patrón opuesto al de **sigB** (Fig. 9C-D).

Los resultados muestran claramente la sobre-expresión de múltiples mecanismos para atenuar y prevenir el estrés oxidativo debido a la interacción microbiana. Como se comentó anteriormente, además del regulón de **sigB** *Bacillus* posee otros mecanismos de defensa relacionados con el alivio de los efectos de las especies reactivas de oxígeno (ROS) (Zuber, 2009). Estos conjuntos de genes codifican proteínas responsables de la respuesta al estrés oxidativo (REO) que implica una regulación transcripcional específica y mecanismos para hacer frente a los factores de estrés, tales como la expresión de proteínas antioxidantes (Hecker y Völker, 2001; Mols y Abee, 2011). Después de un análisis de homología, 97 de los 102 genes reportados en *B. subtilis* relacionados con REO se encontraron en el genoma de *B. velezensis* 83 (Zhu y Stülke, 2018). De este conjunto de genes, 41, 17 y 2 se vieron afectados por el tiempo, la interacción microbiana y ambos factores, respectivamente. De forma similar al regulón de **sigB**, los *DEGs* debido a la interacción microbiana y relacionados a REO, fueron mayoritariamente sobre-expresados (40 de 41, 97%). La GSR y REO están relacionados porque **SigB** puede también regular la expresión de genes involucrados en mecanismos antioxidantes dentro de las bacterias Gram positivas (Tran y Bonilla, 2021). Su estrecha relación quedó clara cuando se compararon ambos conjuntos de genes. 38 de los 97 genes dentro de la REO (39%) se clasifican como parte del regulón **sigB** (Fig. 9E). Asimismo, 23 de los 41 *DEGs* debido a la interacción microbiana que intervienen en la REO también forman parte del regulón de **sigB** (Fig. 9E).

La Figura 11 muestra el efecto de la interacción microbiana sobre el nivel de expresión de los genes que codifican para las proteínas involucradas en la señalización y mecanismos de defensa de GSR y REO. Como puede observarse, los mecanismos de defensa en la célula engloban una respuesta sistémica en la célula, incluyendo la generación de poder reductor, degradación de pro-oxidantes, degradación de proteínas mal plegadas, protección del ribosoma, redistribución de metales como el Fe y el Zn, y reparación de biomoléculas, entre otros. Las correspondientes proteínas se describen a continuación de acuerdo con sus mecanismos de protección y la categoría COG a la cual pertenecen (secciones 5.4.1 a 5.4.4).

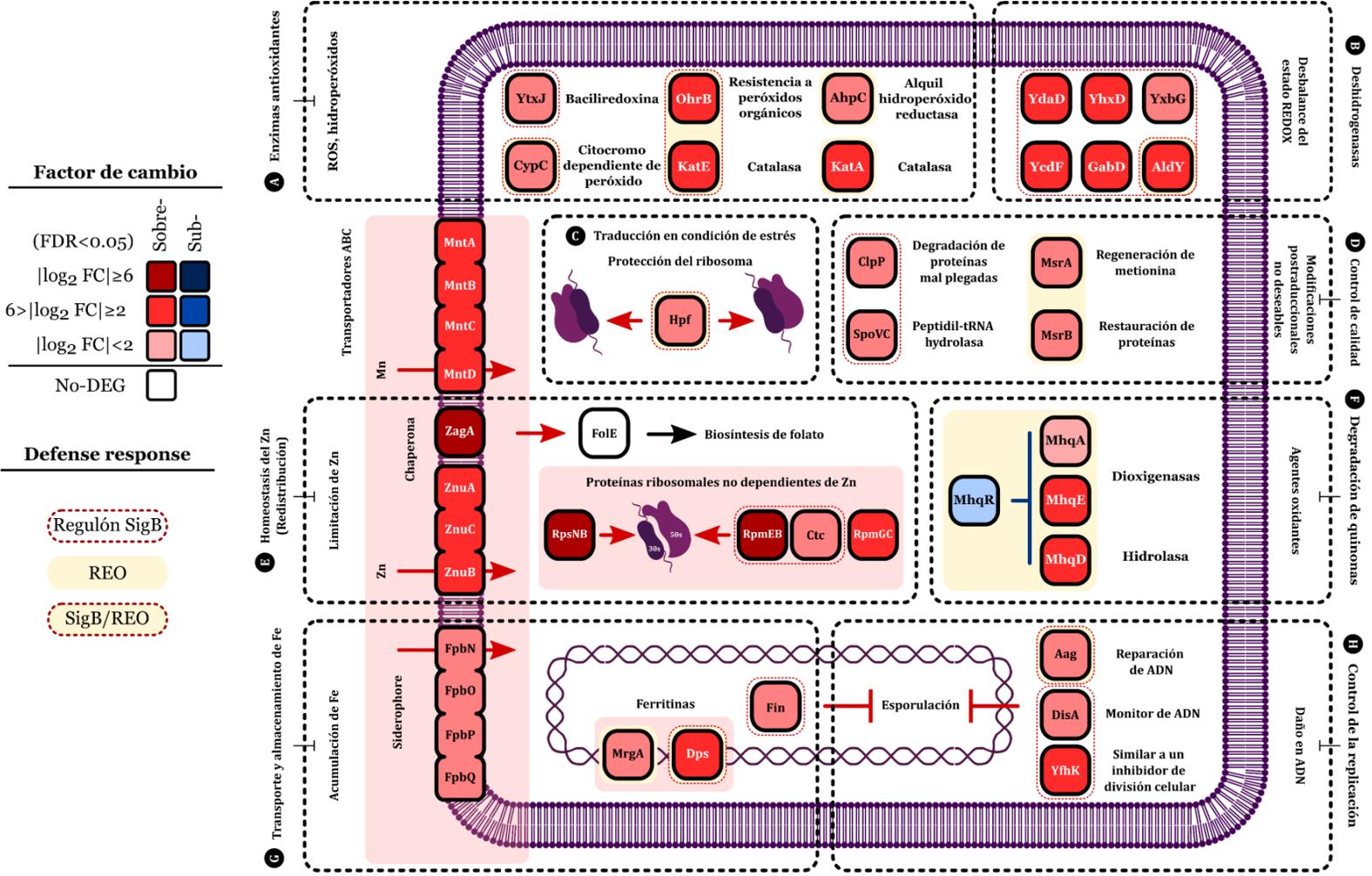


Figura 11. Regulación positiva de los mecanismos de defensa en células co-cultivadas en *B. velezensis* 83. La interacción microbiana causó la sobre-expresión de múltiples genes relacionados a mecanismos de defensa (A-H) y procesos celulares, incluyendo la respuesta al estrés general (GSR, mecanismos de defensa dependientes del factor sigma alternativo SigB) y la respuesta a estrés oxidativo (REO). Los resultados del análisis transcripcional se muestran a través de un diagrama de funciones e interacción de proteínas. Aquí, los cuadros dentro del diagrama representan cada una de las proteínas involucradas. El color rojo o azul indica una sobre- y sub-expresión (estadísticamente significativa) de los genes correspondientes de acuerdo con una escala de factores de cambio indicada a la izquierda. En el caso de cuadros blancos, estos denotan cambios no significativos en los niveles de expresión ($p > 0.05$, $FDR > 0.05$). Los colores y líneas fuera de los cuadros indican información adicional: la línea roja punteada y el patrón de color marfil indican que los genes correspondientes a estas proteínas pertenecen al regulón de SigB o a REO. Patrones simultáneos (líneas rojas punteadas sumadas a patrones marfil) indican que la proteína es regulada por ambos sistemas. Las proteínas involucradas fueron a su vez clasificadas por mecanismos de defensa, demarcados en líneas punteadas de color negro.

5.4.1 Regulación positiva de deshidrogenasas dependientes de SigB y enzimas con funciones antioxidantes. La interacción microbiana aumentó la transcripción de 29 genes relacionados con la producción y conversión de energía, donde el 70% de estos fueron sobre-expresados (Fig. 8). Entre ellos, los genes correspondientes a siete deshidrogenasas dependientes de SigB fueron sobre-expresados debido a la interacción microbiana: la succinato-semialdehído deshidrogenasa **gabD**, aldehído deshidrogenasa **aldY**, formiato deshidrogenasa **yjgC**, proteínas de estrés generales similares a la alcohol deshidrogenasa **ydaD/yhxD** y la proteínas de estrés similares a la glucosa 1-deshidrogenasa **ycdF/yxbG** (Fig. 11B). Esta clase de proteínas son relevantes para la homeostasis del estado redox y la regeneración antioxidante (reducción de tioles) durante el estrés oxidativo (Singh *et al.*, 2007; Ho *et al.*, 2007; Corpas y Barrocho, 2014; Thomas *et al.*, 2016).

Por su parte, la succinato-semialdehído deshidrogenasa **GabD** junto con la 4-aminobutirato transaminasa **GabT**, otra proteína no perteneciente al regulón de **SigB** cuyo gen fue sobre-expresado fuertemente por la interacción ($\text{Log}_2 \text{FC} = 5.9$), generan poder reductor de forma acoplada al ciclo de Krebs (TCA, por sus siglas en inglés) (Fig. 11-12). **GabT** utiliza el glutamato y el 2-oxoglutarato para producir succinato-semialdehído, y luego la **GabD** generará succinato y un equivalente reductor en forma de NADH. En el contexto de estrés oxidativo, cuando el glioxilato, un cetoácido, reacciona con ROS, libera formiato. Este formiato se utiliza posteriormente para producir poder reductor en forma de NADH y CO_2 a través de la formiato deshidrogenasa, lo que ha sugerido su papel en la respuesta al estrés oxidativo (Thomas *et al.*, 2016). Como se discutirá más adelante, estas proteínas trabajan cooperativamente para mantener la homeostasis del estado redox junto con otras deshidrogenasas no dependientes de **SigB** (Fig. 12).

Con respecto a los genes que codifican para las enzimas **YcdF/YxbG** (similares a la glucosa 1-deshidrogenasa) y la gluconolactonasa **Yvre** (una hidrolasa dependiente de SigB consistentemente sobre-expresada por la interacción), ambas están relacionadas con la vía de las pentosas fosfato (PPP). De manera similar a la reconocida enzima antioxidante, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de la PPP (Ho *et al.*, 2007; Singh *et al.*, 2007; Corpas y Barrocho, 2014), la glucosa 1-deshidrogenasa **YcdF** podría generar poder reductor en forma de NADPH mediante oxidación de beta-D-glucosa a D-glucono-1,5-lactona. Posteriormente, la D-glucono-1,5-lactona podría ser hidrolizada a D-gluconato por la gluconolactonasa **Yvre**. El D-gluconato posteriormente podría generar mayor poder reductor (NADPH) mediante una reacción de descarboxilación oxidativa, como ocurre durante la PPP con la 6-fosfogluconato deshidrogenasa.

Los resultados también mostraron una regulación positiva sobre la expresión de genes dependientes de **SigB** (GSR) y REO que codifican enzimas antioxidantes en células de *B. velezensis* 83 co-cultivadas. Estos correspondían a genes que codifican enzimas para consumo o degradación de agentes pro-oxidantes, como la proteína de resistencia al peróxido orgánico **OhrB**, la catalasa **KatE**, la bacilirredoxina **YtxJ**, la peroxigenasa de ácidos grasos **CypC**, y las dioxigenasas específicas de hidroquinona **MhqA** y **MhqE** (esta última posiblemente **MhqO**, dependiente de **SigB**), entre otras (Fuangthong *et al.*, 2001; Gaballa *et al.*, 2014, Fig. 11A). En *Bacillus*, las proteínas **OhrB** y **OhrA** son peroxirredoxinas, en las que una cisteína de la enzima se oxida a ácido sulfénico, consumiendo peróxido, y luego se restaura con el poder reductor conferido por algún tiol-antioxidante. En *Bacillus*, este antioxidante corresponde al bacilitiol, un tiol utilizado como mecanismo de defensa para la desintoxicación de ROS (Chandrangsu *et al.*, 2018). De manera similar al mecanismo de las tiorredoxinas, las bacilirredoxina actúa como antioxidante, restaurando el bacilitiol después de su oxidación (Linzner *et al.*, 2019). En sintonía, la bacilirredoxina **brxB** y el transportador de malato **yflS** también fueron sobre-expresados por la interacción microbiana, pero estos no son dependientes de **SigB**. **BrxB** es una importante proteína que participa en la homeostasis del estado redox y tiene la función de reactivar proteínas con modificaciones en sus grupos tiol (S-bacilitiolación), como la metionina sintasa MetE, lo que significa una protección contra la auxotrofia de la metionina durante el estrés oxidativo (Gaballa *et al.*, 2014). Por su parte, la relevancia **yflS** está en el hecho de que él malato es requerido para la síntesis de bacilitiol, vía la glicosil-transferasa

del ácido L-málico BshA durante el primer paso de su biosíntesis (Gaballa *et al.*, 2010). En coherencia con lo anterior, la gamma-glutamyl-transferasa **ggt**, necesaria para la degradación de tioles, fue sub-expresada fuertemente en células de *B. velezensis* 83 co-cultivadas ($\text{Log}_2 \text{FC} = -6.8$). El conjunto de dioxigenasas específicas de hidroquinona mencionadas con anterioridad participan en la respuesta al estrés oxidativo y confieren resistencia a las hidroquinonas (como catecol y 2-metilhidroquinona) por escisión de su característico anillo (Töwe *et al.*, 2007). La dioxigenasa/glioxalasa **mhqE** (posiblemente **mhqO**, dependiente de **SigB**), junto con la fosfolipasa/carboxilesterasa **mhqD**, forman un operón, consistentemente sobre-expresado por efecto de la interacción (Fig. 11F). Por su parte, **mhqA** no forma parte de una unidad policistrónica. Con respecto a la regulación de estos genes, su represor transcripcional **mhqR**, coherentemente sub-expresado por la interacción microbiana (Fig. 5). Otro gen dependiente de **SigB** sobre-expresado en las células co-cultivadas fue la peroxigenasa de ácidos grasos **cypC**. Interesantemente, la enzima correspondiente utiliza el poder oxidante de las ROS para catalizar la hidroxilación de un ácido graso, de modo que está relacionada directamente a la biosíntesis de lipopéptidos como la surfactina (Youssef *et al.*, 2011).

Con respecto a la categoría COG I (transporte y metabolismo de lípidos), también se encontraron genes relacionados a la resistencia al estrés con mecanismos antioxidantes. Aquí, solo tres genes fueron sobre-expresados positivamente debido a la interacción microbiana, dos de los cuales son dependientes de **SigB**: la cardiolipina sintasa **ywiE** y la diacilglicerol quinasa putativa **bmrU**. La cardiolipina juega un papel fundamental en la fosforilación oxidativa y es necesaria para la actividad óptima de los complejos respiratorios (Mileykovskaya y Dowhan, 2009; Arias-Cartin *et al.*, 2012). La cardiolipina sintetasa **YwiE** cumple con un rol de protección contra el estrés por *paraquat* (Zhu y Stülke, 2018), escenario donde los superóxidos generados por este pesticida oxidante desencadenan la peroxidación lipídica. Con respecto a la diacilglicerol quinasa putativa **BmrU**, esta proteína se describe como una proteína de resistencia a múltiples fármacos en *B. subtilis* relacionada a la protección contra estrés oxidativo (Song *et al.*, 2008; Zhu y Stülke, 2018).

5.4.2 Regulación positiva de mecanismos de protección del ADN. Los resultados indican que el COG de replicación y reparación fue uno de los que fueron mayormente sobre-expresados (72% de sus DEGs) debido al efecto de la interacción (Fig. 10). Dentro de estos DEG regulados positivamente, dos correspondieron a genes dependientes de **SigB**: la hipoxantina-ADN glicosilasa **aag** y la diadenilato ciclase **disA** (Fig. 11E y 11G). La hipoxantina es producto de la desaminación de la adenina, lo que provoca errores en la transcripción o replicación del ADN porque imita a la guanina. Para evitarlo, **Aag** elimina la hipoxantina durante la reparación del ADN (Lee *et al.*, 2011). Por su parte, **DisA** es una proteína que escanea la integridad del ADN, la cual condensa 2 ATP en di-AMP cíclico (una molécula de señalización), y su función consiste en retrasar el proceso de diferenciación a esporas cuando el ADN presenta daños (Boye, 2006; Zhu y Stülke, 2018). Además de los mencionados, otros genes no dependientes de **SigB** relacionados a la reparación del ADN fueron sobre-expresados en las células co-cultivadas: las tres subunidades de la excinucleasa ABC (codificados en los operones **uvrAB** y **uvrC**), el inhibidor de división celular dependiente de ADN dañado **yneA** (el cual inhibe la división celular, clasificado dentro del COG de biogénesis de membrana) junto con otros dos genes de su operón (una recombinasa similar a la resolvasa **yneB**, y la proteína **ynzC** de función desconocida) y su represor transcripcional **lexA** (Lenhart *et al.*, 2012; Zhu y Stülke, 2018). Al igual que **yneA**, **yfhK** es otro gen sobre-expresado dependiente de **SigB**, similar a un inhibidor de la división celular. Este tipo de elementos podrían contribuir al fenotipo observado en la interacción, una tasa de crecimiento más lenta sin menoscabo de la viabilidad celular.

5.4.3 Regulación positiva del transporte de metales y su papel protector durante el estrés oxidativo. La categoría COG con el mayor número de DEGs (51) en células co-cultivadas de *B. velezensis* 83, fue el metabolismo de iones inorgánicos (categoría COG P). De estos, 39 (76.5%) y 12 (23.5%) DEGs fueron sobre- y sub-expresados, respectivamente (Fig. 8). En el contexto de la activación de los mecanismos de defensa, esto es de esperarse debido a la relación directa entre la homeostasis de los metales y el estrés oxidativo. Las ROS provocan la liberación de hierro

de las metaloproteínas, lo que aumenta la concentración intracelular de hierro. Posteriormente, los peróxidos oxidarán este metal generando radicales hidroxilo altamente reactivos, que dañarán las biomoléculas (Boylan y Gherardini, 2008). Las ROS también causan la inactivación de proteínas de la homeostasis del hierro, como el represor transcripcional Fur, provocando un aumento de la concentración de hierro intracelular, induciendo estrés (Varghese *et al.*, 2007; Zuber, 2009). Según nuestros resultados, las proteínas relacionadas con los sistemas de transporte y almacenamiento de hierro aumentaron su expresión en células co-cultivadas de *B. velezensis* 83 (Fig. 11G). Genes correspondientes a dos proteínas tipo ferritina **Dps** dependientes de **SigB** fueron sobre-expresados. Las **Dps** desempeñan un papel durante la desintoxicación del hierro al atenuar la generación de ROS (Chiancone *et al.*, 2004). Estas proteínas forman complejos con el ADN que protegen a las bacterias contra la muerte oxidativa (Zhu y Stülke, 2018).

Además, siete genes no dependientes de **SigB** correspondientes a tres diferentes sistemas de transporte de hierro del tipo ABC fueron sobre-expresados en células co-cultivadas. Uno de ellos correspondió al transportador ABC **fbpNOPQ** para petrobactina (un sideróforo), el cual se sobre-expresó consistentemente por completo (Fig. 11G). Los sideróforos participan en la adquisición de hierro durante condiciones limitantes, al mismo tiempo que desempeñan un papel como antioxidantes. Estos mejoran la resistencia a ROS en especies como *Cupriavidus necator*, *E. coli*, *Salmonella enterica* (Achard *et al.*, 2013; Adler *et al.*, 2014; Peralta *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2018). En *Salmonella typhimurium*, la presencia intracelular de sideróforos es importante para conferir protección total contra ROS (Achard *et al.*, 2013). Por tanto, el transporte de estas moléculas como mecanismos de defensa es relevante en la respuesta frente al estrés oxidativo. Esta redistribución del hierro probablemente sea un elemento compartido con la respuesta a la limitación nutricional por hierro. Durante esta limitación, la célula utiliza sistemas de transporte de hierro elemental y sideróforos y, además limita la traducción de proteínas dependientes de este metal para mantener una reserva mínima de hierro (Pi y Helmann, 2017). En coherencia con lo anterior, el gen **fbpA** que codifica para una chaperona de ARN la cual participa en esta inhibición de la traducción, también fue sobre-expresado por el efecto de interacción.

Finalmente, dentro de la categoría COG P, el transportador ABC de zinc de alta afinidad **znuABC** (Patzner y Hantke, 1998), el transportador tipo ABC de manganeso **mntABCD** (Guedon *et al.*, 2003) y otros transportadores de cationes metálicos fueron consistentemente sobre-expresados en células co-cultivadas de *B. velezensis* 83 (Figura 11E). El zinc contribuye a mantener la homeostasis del estado redox a través de diferentes mecanismos, incluida la protección antioxidante, la detección redox y la señalización regulada por redox (Oteiza, 2012). El Zn^{+2} puede reemplazar al Fe^{+2} de los centros activos de diversas enzimas susceptibles al daño oxidativo (Chandrangsu *et al.*, 2019). Como se describe a continuación, este y otros mecanismos para mantener la homeostasis del Zn^{+2} intracelular son relevantes durante la respuesta al estrés, activada durante la interacción.

5.4.4 Regulación positiva del control de calidad de la síntesis de proteínas y homeostasis del Zn. Los DEGs debidos a la interacción microbiana pertenecientes a la categoría COG J (Traducción, estructura del ribosoma y biogénesis) corresponden mayoritariamente a genes sobre-expresados, donde siete fueron sobre-expresados y dos sub-expresados (Fig. 8). De los siete genes sobre-expresados, se encontró que al menos cinco pertenecen al regulón de **sigB**, mientras que los otros dos participan en la respuesta al estrés de Zn (una consecuencia del estrés oxidativo). Los dependientes de **SigB** (sobre-expresados y pertenecientes al COG J) tienen funciones relacionadas con la reparación y degradación de proteínas mal plegadas, el reciclaje de ARNt y la protección de ribosomas durante un escenario de estrés (Menez *et al.*, 2002; Schmalisch *et al.*, 2002; Frees *et al.*, 2007; Feaga *et al.*, 2020). Ejemplos de estos genes son el operón **ctc-spoVC-fin**, la proteína de estrés general **hpf** y la proteasa dependiente de ATP **clpP** (Fig. 11C-E). Durante el estrés oxidativo, estas proteínas protegen contra modificaciones indeseables causadas por ROS (oxidación de Met/Cys o carbonilación de Arg/Lys) de las proteínas ribosómicas (Shcherbik y Pestov, 2019).

Hpf es una proteína con cuya función es la dimerización de ribosomas (por lo tanto, un inhibidor de la traducción) que protege las proteínas ribosómicas S2 y S3 (Fig. 11C) (Zhu y Stülke, 2018; Feaga *et al.*, 2020) durante un escenario de estrés. Por otro lado, **ClpP** es la subunidad proteolítica de una proteasa implicada en el control de calidad de las proteínas ya que degrada proteínas mal plegadas. En general, las proteasas como **ClpP** tienen un papel importante en la regulación de los procesos biológicos, incluida la respuesta al estrés oxidativo y los procesos de diferenciación (Frees *et al.*, 2007). En coherencia con **ClpP**, la proteína adaptadora putativa **ypbH**, probablemente necesaria para la unión entre **ClpP** y ClpC (la otra subunidad), también fue sobre-expresada por la interacción microbiana. La proteína de estrés general **Ctc**, es una proteína ribosómica similar a L25, que se une a la subunidad 5s del ARN ribosómico bajo condiciones de estrés (Schmalisch *et al.*, 2002), mientras que el papel de la peptidil-ARNt hidrolasa **SpoVC** está relacionado al reciclaje del ARNt que se ha unido a ribosomas disociados cuando la traducción falla. Además, se informó que esta proteína es esencial tanto para el crecimiento vegetativo como para la esporulación (Menez *et al.*, 2002). Los dos genes correspondientes (**spoVC** y **ctc**) forman un operón junto con la antes mencionada proteína de unión a la ARN polimerasa **fin**, un factor anti-SigF. **Fin** es una proteína que se une al factor sigma SigF, un factor sigma específico de la pre-espora en etapas tempranas, impidiendo su unión a la ARN polimerasa, retrasando la transcripción de alrededor de 118 genes. Mutantes nulas de **Fin** de *B. subtilis* muestran una mayor transcripción de genes dependientes de SigF y defectos en la esporulación (menos esporas viables, Wang-Erickson *et al.*, 2017).

Los otros DEGs sobre-expresados que pertenecen a la categoría COG J fueron relacionados a la homeostasis del Zn. Durante un escenario de estrés oxidativo, el zinc puede sustituir la función del hierro, haciendo requerida su redistribución celular. En parte, esto ocurre mediante el reemplazo de proteínas ribosómicas dependientes de Zn por sus parálogos no dependientes (Chandrangsu *et al.*, 2019). De hecho, los genes que codifican los parálogos de proteínas ribosómicas independientes de Zn se encuentran entre los más fuertemente sobre-expresados por efecto de la interacción microbiana, incluyendo la proteína ribosómica accesoria **rpmEB** (Log₂ FC= 6.1), la proteína ribosómica alternativa **rpmGC** (Log₂ FC= 2.7) y la proteína ribosómica alternativa **rpsNB** (Log₂ FC= 7.7, Fig. 11E). Aunque **rpmEB** también está regulado por **SigB**, los tres parálogos de proteínas ribosómicas independientes de Zn, **rpmEB**, **rpmGC** y **rpsNB**, junto con otros genes sobre-expresados por la interacción microbiana, incluido el transportador de zinc ABC de alta afinidad **znuACB** y la metalochaperona de zinc **zagA**, están sujetos a la represión por parte del regulador Zur en presencia de Zn. La sobre-expresión de estos genes es una indicación indirecta del agotamiento y redistribución del zinc para reemplazar el hierro como resultado del estrés oxidativo.

La metalochaperona **zagA** de zinc fue el segundo gen más sobre-expresado en células co-cultivadas de *B. velezensis* 83 (Log₂ FC= 8.9, Fig. 11E). **ZagA** moviliza zinc de RpmE para proporcionarlo a la ciclohidrolasa I de GTP FolE (necesaria para la biosíntesis de folato y la biosíntesis de ADN) durante la deficiencia de zinc, asegurando así la actividad enzimática de esta último (Chandrangsu *et al.*, 2019). Curiosamente, en el genoma de *B. velezensis* 83, **ZagA** se localiza junto a otros tres DEGs dentro del top de los 6 DEGs más sobre-expresados por efecto de la interacción: la formaldehído deshidrogenasa putativa **yycR** (Top 1, Log₂ FC= 9.1), y las proteínas de función desconocida **yckC** (Top 4, Log₂ FC= 6.8) y **yckD** (Top 6, Log₂ FC= 6.2). Probablemente, los pares de genes **ZagA-yycR** y **yckC-yckD** forman sus propios operones en *B. velezensis* 83 y/o comparten los mismos reguladores transcripcionales. La configuración de genes adyacentes a **zagA** parece ser típica de *B. velezensis* 83, ya que no corresponden a lo reportado en *B. subtilis* (**folEB-yciB-yczL-zagA-yckA-yckB**, Zhu y Stülke, 2018).

Hasta ahora, se ha descrito algunas de las funciones de los DEGs involucrados en la GSR (88) y REO (41), sin embargo, la respuesta de las células co-cultivadas resultó aún mucho más compleja, dado que numerosos genes relacionados al metabolismo central también sufrieron cambios en sus niveles de expresión.

5.5 La reestructuración del metabolismo central en células co-cultivadas de *B. velezensis* 83 actúa de forma cooperativa con la respuesta general al estrés y REO. Con respecto al metabolismo central, transcriptomas de las células co-cultivadas de *B. velezensis* 83 sugieren que estas sufren una redistribución de energía y recursos a favor de la activación de la respuesta al estrés, sacrificando la versatilidad catabólica y la biosíntesis de ARN tal como indica la sub-expresión de los genes encargados del catabolismo de fuentes alternativas de carbono, y la biosíntesis de pirimidina, respectivamente (Fig. 12-14). Además, la redistribución de energía y recursos incluyó la sobre-expresión de vías del metabolismo central que actúan en cooperación con las funciones de la GSR y REO. Ejemplos de esto son las oxidorreductas no dependientes de **SigB** (vinculadas al ciclo de Krebs y proteínas del metabolismo anaeróbico) relacionadas a la homeostasis del estado redox (Fig. 12) y las rutas de absorción de azufre y biosíntesis de aminoácidos antioxidantes (Fig. 13). A continuación se describe la remodelación del metabolismo central a favor de las respuestas de defensa en las células co-cultivadas.

5.5.1 Regulación positiva de proteínas no dependientes de SigB relacionadas al control del estado redox y del metabolismo anaerobio. Genes que codifican para oxidorreductas no dependientes de **SigB** relacionadas con el estado redox fueron sobre-expresadas como resultado de la interacción con el hongo. Estos genes corresponden a oxidorreductas dependientes de NAD(P)⁺, como la formaldehído deshidrogenasa putativa **yycR** (similar a *adhB* de *B. subtilis* y *frmA* de *E. coli*), una glicerol deshidrogenasa putativa (similar a **gldA** de *E. coli*), el complejo de la L-lactato deshidrogenasa **lutABC** y L-lactato deshidrogenasa **ldh** (Fig. 12). Estas oxidorreductas ligadas al ciclo de Krebs y a la glucólisis pueden contribuir a la regulación del poder reductor intracelular y alivian el estrés oxidativo/electrófilo.

El gen de la formaldehído deshidrogenasa putativa **yycR** fue el DEGs más sobre-expresado en *B. velezensis* 83 durante la interacción ($\text{Log}_2\text{FC}=9.1$, $p=5.1 \times 10^{-8}$, $\text{FDR}=3.6 \times 10^{-5}$). La función de la enzima es desconocida y su actividad enzimática es controversial. Inicialmente, fue descrita por homología como una formaldehído deshidrogenasa dependiente de glutatión, sin embargo, actualmente existe evidencia de que es una alcohol deshidrogenasa capaz de oxidar multitud de alcoholes y reducir algunos aldehídos (Ashraf *et al.*, 2017). En todo caso, si su actividad corresponde a la inicialmente reportada, esta formaría un lazo cerrado para la producción de poder reductor a través del TCA y las ya antes mencionadas **GabD** y **GabT** (Fig. 12). Con respecto a la glicerol deshidrogenasa **gldA**, es una alcohol deshidrogenasa dependiente de metales (probablemente de Zn^{+2}), que permite la generación de NADH mediante la oxidación de glicerol a dihidroxiacetona.

Por su parte, el complejo de la L-lactato deshidrogenasa oxidasa **LutABC** y la lactato deshidrogenasa **Ldh** son proteínas de hierro-azufradas que catalizan interconversiones entre lactato y piruvato (Chai *et al.*, 2009). Ciertos metabolitos, como el lactato, contribuyen al equilibrio redox intracelular (Carrière *et al.*, 2020). De hecho, la actividad antioxidante del lactato en modelos *in vitro* de membrana se describió previamente (Groussard *et al.*, 2000). Además, se reconoce la capacidad del lactato para disipar el estrés oxidativo en los tejidos adiposos humanos (Carrière *et al.*, 2020). La lactato deshidrogenasa **Ldh** cataliza la conversión de lactato en piruvato, generando un poder reductor equivalente en forma de NADH. En otros modelos biológicos, como *C. elegans*, se ha sugerido que el lactato desempeña un papel importante en la inducción de mecanismos de defensa (antioxidantes y procesamiento de proteínas mal plegadas) mediante la elicitación moderada de ROS, ya que ocasiona curva dosis-respuesta bifásicas (hormesis) (Tauffenberger *et al.*, 2019). Así mismo, este tipo de enzima en plantas es esencial para activar la cascada de señalización de ROS asociada al desarrollo de resistencia contra fitopatógenos (Rojas *et al.*, 2012). En el contexto de respuesta contra el estrés oxidativo, se ha verificado una reacción no canónica de la enzima (**Ldh**), como la conversión de α -cetobutirato en α -hidroxibutirato, este último con propiedades antioxidantes (Liu *et al.*, 2018).

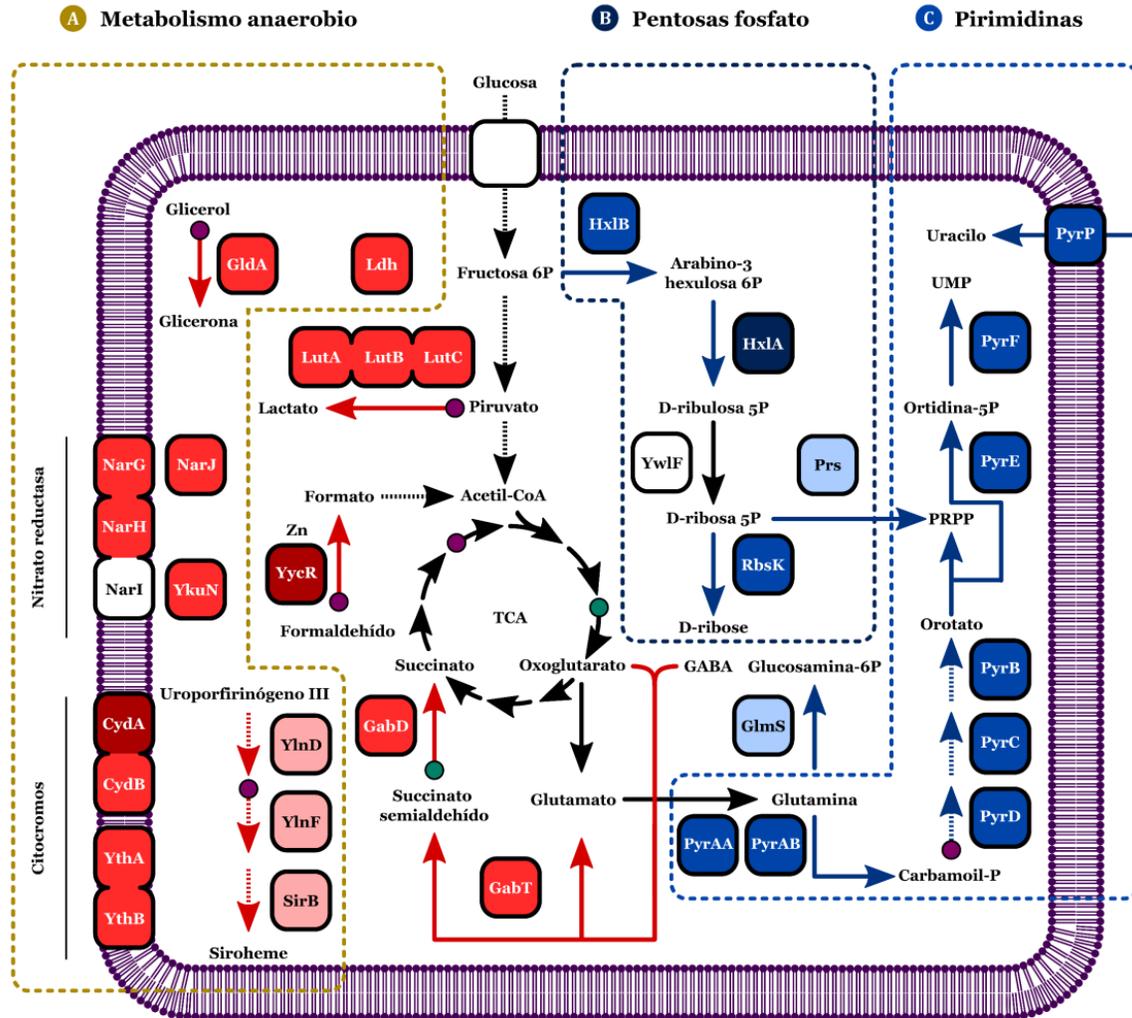


Figura 12. Efectos de la interacción sobre la expresión de genes del metabolismo anaerobio y la síntesis de ARN. La figura muestra los resultados del análisis transcripcional mediante un diagrama de rutas metabólicas. Aquí, los cuadros dentro del diagrama representan a las proteínas involucradas. El color rojo o azul indica una sobre- o sub-expresión (estadísticamente significativa) de los genes correspondientes de acuerdo con una escala de factores de cambio indicada abajo a la derecha. En el caso de cuadros blancos, estos denotan cambios no significativos en los niveles de expresión ($p > 0.05$, $FDR > 0.05$). Pasos únicos y múltiples de reacciones enzimáticas para la transición entre metabolitos se indican con flechas continuas y discontinuas, respectivamente. Reacciones enzimáticas que involucran la oxido-reducción entre $NAD^+/NADPH$, $NAD^+/NADH$, $FMN/FMNH_2$ se indican mediante círculos verdes, morados y amarillos, respectivamente.

Factor de cambio	
($FDR < 0.05$)	Sobre-Sub-
$ \log_2 FC \geq 6$	■ ■
$6 > \log_2 FC \geq 2$	■ ■
$ \log_2 FC < 2$	■ ■
No-DEG	□

Los productos de los genes *ldh* y *gldA*, junto con otros genes sobre-expresados debido a la interacción incluyendo, a las subunidades I y II del citocromo bd ubiquinol oxidasa *cydAB*, y la nitrato reductasa *narGHJ* (pero no *narI*) participan en el metabolismo anaeróbico (Fig. 12). El operón *cydABCD* fue consistentemente sobre-expresado en las células co-cultivadas de *B. velezensis* 83. Estos genes corresponden a las subunidades I y II del del citocromo bd ubiquinol oxidasa **CydAB**, mientras que **CydCD** son subunidades del exportador ABC de glutatión. En *E. coli* tienen un papel en la homeostasis redox celular, ya que transporta el tiol reductor glutatión hacia el periplasma (Pittman *et al.*, 2005). Por otro lado, *Bacillus* es uno de los pocos géneros de bacterias aeróbicas que contiene en su genoma dos secuencias del complejo citocromo bd ubiquinol oxidasa, *cydAB* e *ythAB*. Ambos complejos homólogos fueron sobre-expresados durante la interacción (Fig. 12). Estas proteínas son quinol-oxidasa con dos subunidades cada una, y en *E. coli* se

expresan bajo limitación de oxígeno (Winstedt *et al.*, 1998; Borisov *et al.*, 2011). En el presente caso, la causa de su sobre-expresión durante el co-cultivo no puede ser una limitación de oxígeno (TOD>30 %). La causa podría estar relacionada a las otras funciones atribuidas a estas proteínas. El citocromo bd ubiquinol oxidasa está relacionado con la tolerancia bacteriana frente al estrés oxidativo y nitrosativo (óxido nítrico y peroxinitrito) (Giuffrè *et al.*, 2014), contribuye a la desintoxicación del peróxido de hidrógeno en *E. coli*, participa en la degradación de compuestos aromáticos (Borisov *et al.*, 2011), y también tiene funciones protectoras durante la respuesta al estrés de ROS/antibióticos en *Mycobacterium* (Lu *et al.*, 2015).

Por otro lado, en *Bacillus* spp. hay dos operones de nitrato reductasa: 1) ***nasBCDEF*** y 2) ***narGHJI***, cada uno con su propia regulación genética (Nakano *et al.*, 1998; Moreno-Vivian *et al.*, 1999). ***nasBC*** y ***narGHJ*** fueron sub- y sobre-expresados por efecto de la interacción, respectivamente. Las proteínas correspondientes tienen varias funciones, como la utilización del nitrato como fuente de nitrógeno (asimilación de nitrato), permiten la supervivencia en condiciones de hipoxia mediante el uso de nitrato y nitrito como aceptores finales de electrones (respiración de nitrato) y como elemento regulador del estado redox disipando el poder reductor (Moreno-Vivian *et al.*, 1999). Asimismo, estos genes están involucrados en las interacciones bacteria-planta (Chen *et al.*, 2018).

El operón de la nitrato reductasa ***narGHJI*** (sobre-expresado por interacción microbiana) cuyo producto participa en la respiración/asimilación de nitratos, es inducido por la limitación de oxígeno (Nakano *et al.*, 1998). Sin embargo, como fue mencionado anteriormente, esta no parece ser la señal de activación. Inclusive, el nivel de expresión del regulador transcripcional de los genes anaeróbicos Fnr quien induce la transcripción de ***narGHJI*** no fue modificado por la interacción, por lo que deben existir otros elementos de regulación aún desconocidos. Por otro lado, se sabe que el operón de la nitrato reductasa ***nasBC*** (regulado negativamente por efecto de la interacción) se induce bajo limitación de nitrógeno (glutamina o amonio) y se reprimen en el caso opuesto (Nakano *et al.*, 1998). Estos genes son regulados positivamente a través del regulador pleiotrópico transcripcional ***tnrA***, el cual se sobre-expresa durante limitación de N, de acuerdo con reportes anteriores. Sin embargo, este fue consistentemente sub-expresado en células co-cultivadas. Otros siete genes regulados positivamente por ***TnrA*** y relacionados con la adquisición y el metabolismo de fuentes de nitrógeno también fueron sub-expresados por la interacción microbiana (***nasA***, ***pucR***, ***nrgAB***, ***pxpB***, ***kipR***, ***lipC*** e ***ywrD***). De los anteriores, dos son transportadores: el transportador de nitrato ***nasA*** y el transportador de amonio ***nrgA***. La regulación negativa de estos genes sugiere que no hay limitación de nitrógeno durante la interacción hongo-bacteria.

La sobre-expresión de ***narGHJ*** debido a la interacción microbiana fue consistente con la sobre-expresión de genes para la producción de cofactores necesarios para la función de las enzimas correspondientes. Estos fueron: ***moeB-moeA-mob-moaE***, necesarios para la síntesis del cofactor de molidopterina y la biosíntesis de *siroheme*. Otra función asociada a la nitrato reductasa es la producción de óxido nítrico (NO), un volátil que regula las respuestas al estrés de las plantas (Yamasaki y Sakihama, 2000; Rockel *et al.*, 2002; Pan *et al.*, 2019; Tejada-Jimenez *et al.*, 2019). El NO es una especie reactiva de nitrógeno relacionada con el estrés oxidativo y se ha informado su participación en la acción de control biológico de fitopatógenos (Wang *et al.* 2005).

En relación con lo anterior, el gen codificante de la flavodoxina ***ykuN*** fue regulado positivamente por la interacción fúngica. En *B. subtilis*, funge como donante de electrones durante la desaturación de ácidos grasos (Chazarreta-Cifre *et al.*, 2011) y participa en la respuesta a limitación de hierro (Pi y Helmann, 2017), reemplazando a las ferredoxinas. Se propuso que probablemente también participa en la producción de óxido nítrico (una especie NOS) por las óxido nítrico sintasas (Wang *et al.*, 2007).

5.5.2 Regulación negativa de la ruta de las pentosas fosfato y biosíntesis de pirimidina. Los DEGs debidos a la interacción microbiana pertenecientes a la categoría COG F (metabolismo y transporte de nucleótidos) fueron mayoritariamente sub-expresados (90%) (Fig. 8). Aquí, 11 genes fueron sub-expresados, mientras que sólo 1 fue sobre-expresado. Ejemplo de estos son los genes del operón *pyrR-PBC-AA-AB-KDFE* necesario para la biosíntesis de pirimidina, el cual fue casi completamente sub-expresado por la interacción microbiana ($-4 \leq \text{Log}_2 \text{FC} \leq -3$), con la única excepción del antiterminador transcripcional *pyrR*. Esto es posible gracias a un codón de paro intermedio al final de este gen. Los productos de este operón son: la uracilo permeasa **PyrP**, la aspartato carbamoil-transferasa **PyrB**, la di-hidro-orotasa **PyrC**, la carbamoil-fosfato sintetasa **PyrAA** (subunidad de glutaminasa), la carbamoil-fosfato sintetasa **PyrAB** (subunidad catalítica), la ácido di-hidro-orótico deshidrogenasa **PyrK** (subunidad de transferencia de electrones), la ácido di-hidro-orótico deshidrogenasa **PyrD** (subunidad catalítica), la orotidina 5-fosfato descarboxilasa **PyrF**, y la orotato fosfo-ribosil-transferasa **PyrE**. Estas proteínas participan en el transporte de uracilo y en la síntesis *de novo* de nucleótidos derivados de la pirimidina como el monofosfato de uridina (UMP), constituyente fundamental del ARN (Fig. 12). La transcripción de este operón es reprimida por la acción de *pyrR*. Durante condiciones no limitantes de nucleótidos (UMP y UTP), *pyrR* se une a la secuencia líder (5' UTR) del ARN, y detiene la transcripción del operón (Babitzke *et al.*, 2019). Es de esperar que la demanda de nucleótidos para la síntesis de ARN/ADN disminuyera con tasas de crecimiento más bajas y/o condiciones UMP/UTP no limitantes, de ahí la regulación negativa de estos genes durante el co-cultivo. En íntima relación con lo anterior, el gen *prs* que codifica la fosfo-ribosil-pirofosfato sintetasa también fue sub-expresado por efecto de la interacción. Esta enzima conecta directamente la vía de las pentosas fosfato con la síntesis de UMP a través del intermediario fosfo-ribosil-difosfato (PRPP), hecho que también contribuye negativamente a la síntesis de ARN y por lo tanto a una menor velocidad de crecimiento característica de las células co-cultivadas. De hecho, mutantes nulas de *pyrF* presentan un fenotipo de lento crecimiento (Koo *et al.*, 2017) (Fig. 12).

Con respecto a la vía de las pentosas fosfato, la expresión de genes del metabolismo de azúcares relacionados a la síntesis de ácidos nucleicos resultó afectada negativamente por el efecto de la interacción. El operón de captación de ribosa fue completamente sub-expresado por efecto de la interacción ($\text{Log}_2 \text{FC} \leq -3.0$). Estos genes fueron: represor transcripcional *rbsR*, riboquinasa *rbsK* y sistema transportador ABC de ribosa *rbsDACB*. Otros genes fuertemente sub-expresados fuertemente ($\text{FC} \leq -5.0$) fueron la 3-hexulosa-6-fosfato sintasa *hxlA* y la 6-fosfo-3-hexuloisomerasa *hxlB*. Estas enzimas participan en la vía de la ribulosa monofosfato y permiten la fijación del formaldehído para la formación de fructosa 1,6-bifosfato, que posteriormente se formará piruvato para la biosíntesis de biomasa, resultando congruente con el fenotipo observado en las células co-cultivadas de la bacteria. Estas proteínas también están conectadas estrechamente con la síntesis de UMP y ARN (Fig. 12). Por extensión, la sub-expresión de estos genes contribuye a disminuir la velocidad de crecimiento de la bacteria.

5.5.3 Regulación positiva para la asimilación y biosíntesis de aminoácidos antioxidantes. Genes relacionados con el metabolismo del azufre fueron regulados positivamente por la interacción (Fig. 13). Algunos de estos genes y su función correspondiente fueron: *cysP-sat-cysC* (asimilación, reducción y activación de sulfatos), operón *ssuBACD* (captación y asimilación de sulfonatos alifáticos), *cysK* (biosíntesis de cisteína), *metQ* (transporte de metionina del operón *metNPQ*) y el operón completo *mtnWXBD* (vía de recuperación de metionina). Estos genes están directamente relacionados con el estrés oxidativo y los mecanismos de defensa, por lo que la metionina y la cisteína son aminoácidos esenciales para la homeostasis del estado redox. En el contexto de la activación de la respuesta general al estrés debido a la interacción, esto cobra sentido. Durante un escenario de estrés oxidativo, las ROS modifican e inactivan residuos de cisteína expuestos (Zuber, 2009), así como también ocasionan la oxidación de los sitios activos de proteínas basados en cisteína, como es el caso de las peroxidasas (Hochgräfe *et al.*, 2005; Zuber, 2009). Además, proteína con residuos de metionina desempeñan un papel importante como antioxidante, mientras que la cisteína suministra grupos tiol para la biosíntesis de antioxidantes (Levine *et al.*, 2000; Chandrangsu *et al.*, 2018).

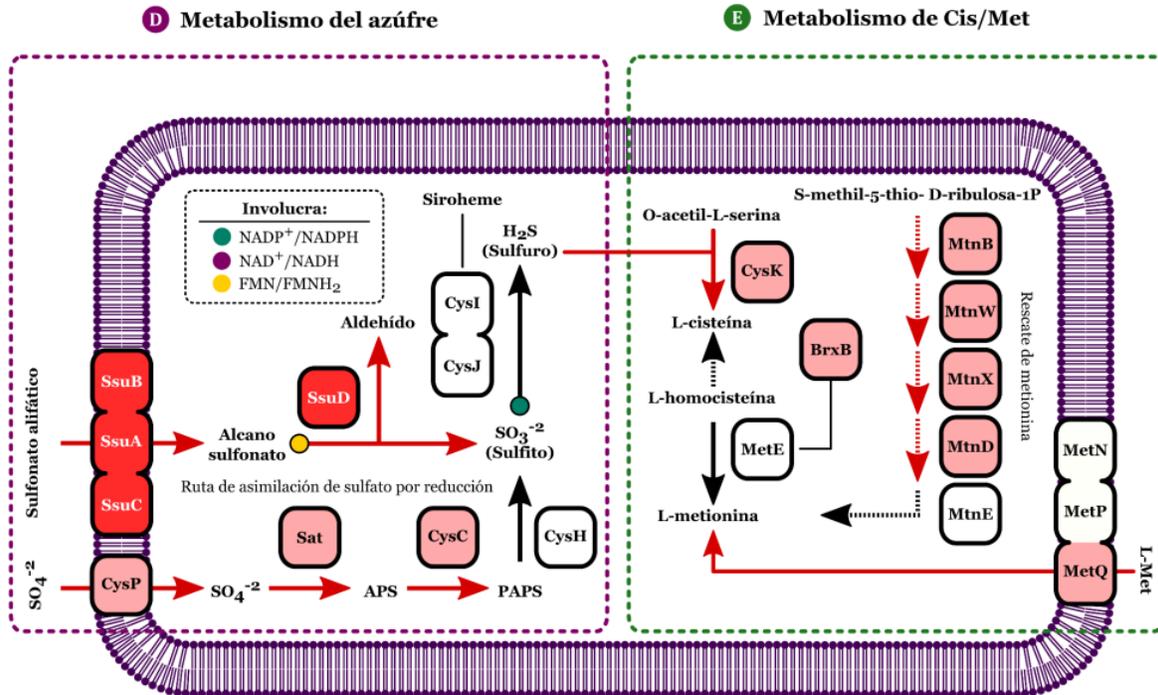


Figura 13. Efectos de la interacción sobre la expresión de genes para la biosíntesis de Cys y Met. Rutas metabólicas relacionadas a la adquisición y reducción de azufre, biosíntesis de cisteína y recuperación de metionina fueron sobre-expresadas en células co-cultivadas de la bacteria. La figura muestra los resultados del análisis transcripcional mediante un diagrama de rutas metabólicas. El código de colores sigue las mismas reglas de interpretación que la figura 11. Pasos únicos y múltiples de reacciones enzimáticas para la transición entre metabolitos se indican con flechas continuas y discontinuas, respectivamente. Reacciones enzimáticas que involucran la oxido-reducción entre NADP⁺/NADPH, NAD⁺/NADH, FMN/FMNH₂ se indican mediante círculos verdes, morados y amarillos, respectivamente.

Factor de cambio	
(FDR < 0.05)	Sobre-Sub-
log ₂ FC ≥ 6	■ ■
6 > log ₂ FC ≥ 2	■ ■
log ₂ FC < 2	■ ■
No-DEG	□

5.6 Regulación negativa del catabolismo de fuentes alternativas de carbono en células co-cultivadas de *B. velezensis* 83: un síntoma de versatilidad metabólica reducida. El segundo grupo de genes ortólogos con el mayor número de DEGs (50) en células co-cultivadas de *B. velezensis* 83 fue G (Metabolismo y transporte de carbohidratos) con 42 (76,5 %) y 8 (23,5 %) DEGs sub-expresados y sobre-expresados, respectivamente. Del número total de genes clasificados dentro de esta categoría COG en el genoma, el 21% fueron modificados por el efecto de la interacción microbiana (Fig. 8). La Figura 14 muestra parte de este conjunto de DEGs sub-expresados relacionados a la asimilación de fuentes alternativas de carbono, clasificados de acuerdo con el origen de la fuente: plantas, hongos y de ambas.

Inicialmente, se hipotetizó que durante la interacción se produciría una estimulación del metabolismo en *B. velezensis* 83 para degradar la biomasa del *C. gloeosporioides*. Sin embargo, tras realizar el análisis transcripcional, los resultados indicaron que este no fue el caso. Los datos mostraron que la interacción microbiana provocó una disminución en la expresión de genes relacionados con el catabolismo de polisacáridos, el transporte y utilización de fuentes específicas de carbono, así como elementos de regulación. Esto sugiere que durante la interacción y bajo las condiciones experimentales, la población de *B. velezensis* 83 es metabólicamente menos versátil y muestra una mayor preferencia por la glucosa. En el cultivo axénico cuando la concentración celular es alta ($X \geq 10^9$ células/mL), el microorganismo es capaz de expresar niveles significativos de genes para la degradación y asimilación de múltiples biopolímeros aun cuando las fuentes de carbono son glucosa y almidón, e incluso cuando la concentración del sustrato está por encima de una limitación nutricional ($S > 5$ g/L), lo que hace contrasentido con la represión catabólica.

Lo anterior probablemente se debe a fenómenos de heterogeneidad fenotípica o sobreflujo de carbono e invita a reflexionar cómo las bacterias distribuyen sus recursos durante condiciones de exceso de carbono. De manera general, los DEGs de la clasificación G que presentaron sub-expresión debido al efecto de la interacción están relacionados con el metabolismo de los siguientes biopolímeros: almidón, maltodextrinas, arabinano, xilano y pectina de origen vegetal, quitina de origen fúngico, y β-glucanos, galactano, glucomanano y galactomanano los cuales pueden provenir de ambos tipos de fuentes. En adición a lo anterior, genes correspondientes al metabolismo de disacáridos (sacarosa, melobiosa, trehalosa, y maltosa) y otros relacionados con el metabolismo del citrato, ácido fítico, ribosa, ribulosa, rafinosa y hexuronato (D-glucuronato y D-galacturonato) también fueron sub-expresados. A continuación se describen los genes afectados de acuerdo con la fuente natural de donde proviene el sustrato al que están relacionados.

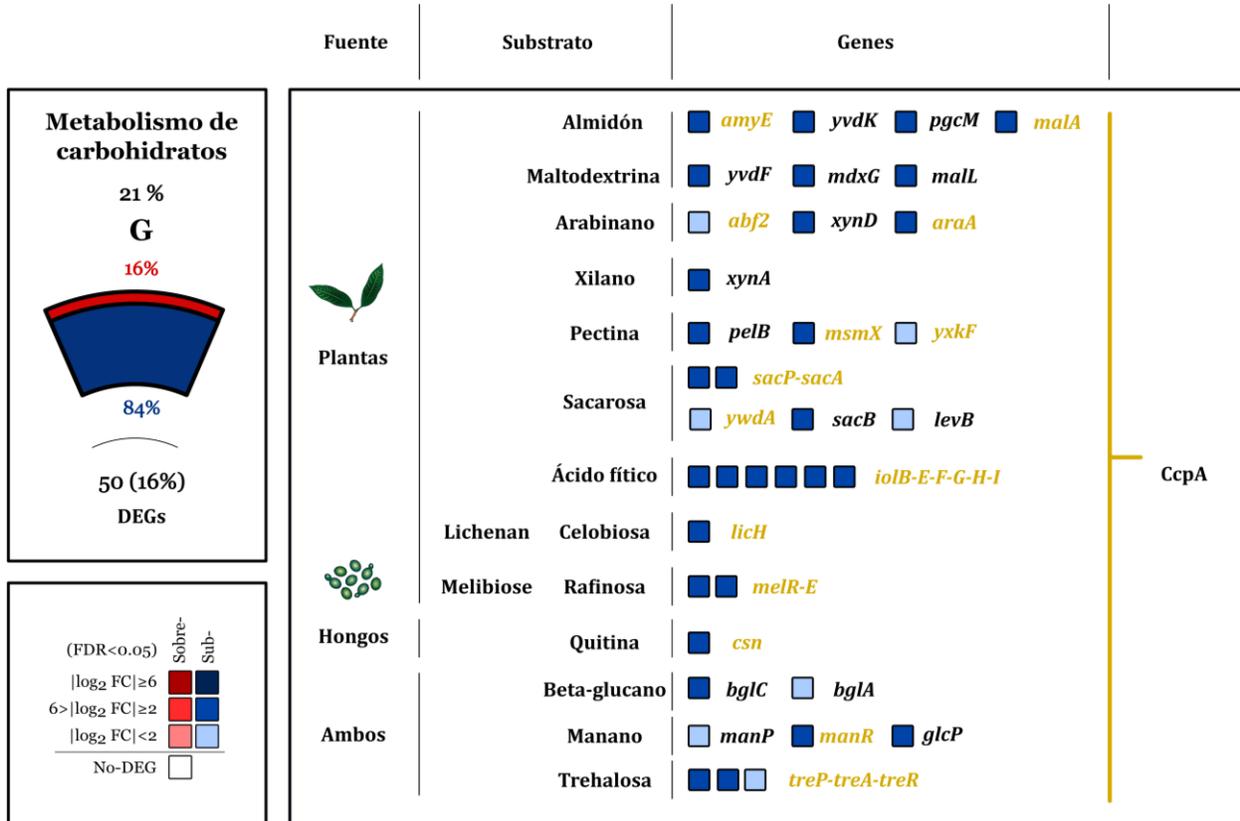


Figura 14. Efecto de la interacción sobre la expresión de genes del metabolismo de carbohidratos. Análisis de transcriptomas de células co-cultivadas de *B. velezensis* 83 indican que la bacteria disminuye fuertemente la expresión de numerosos genes relacionados a la adquisición de múltiples de carbono (de origen vegetal y/o fúngico) en comparación al cultivo axénico. Los resultados del DEA se muestran a través de un diagrama tipo *heat map*. Los colores rojo y azul indican una sobre- y sub-expresión (estadísticamente significativa) de los genes correspondientes de acuerdo con una escala de tasas de cambio.

5.6.1 Catabolismo de fuentes alternativas de carbono de origen vegetal. Respecto a las fuentes de carbono de origen vegetal, genes correspondientes a enzimas para la degradación y asimilación de almidón, maltodextrinas y maltosa fueron sub-expresados (Fig. 14). El primero de ellos, fue la α-amilasa *amyE*. *Bacillus* también utiliza dos operones, de 3 (*malA-glvR-malP*) y 9 (*yvdE-yvdF-mdxE-mdxF-mdxG-yvdJ-yvdK-malL-pgcM*) genes para la utilización de maltosa y maltodextrinas (Schönert *et al.*, 2006). 6 de estos 12 genes fueron sub-expresados, cuatro de ellos hidrolasas. Estos fueron: amilasa maltogénica *yvdF* (glucano 1,4-α-maltohidrolasa), maltosa fosforilasa *yvdK* (glucósido hidrolasa), α-glucosidasa *malL* (almidón hidrolasa), glucosa-1-fosfato fosfodismutasa *pgcM*, 6-fosfo-α-glucosidasa *malA* y el transportador ABC de maltodextrina *mdxG* (permeasa).

Para el metabolismo del arabinano, tres genes fueron sub-expresados (Fig. 14). El genoma de *B. velezensis* 83, al igual que *B. subtilis* contiene dos α -N-arabinofuranosidasas. Estas enzimas son responsables de la degradación del arabinano (polisacárido de la pared celular vegetal) para producir oligómeros de arabinosilo y L-arabinosa (Sá-Nogueira *et al.*, 1997; Inácio *et al.*, 2008). El gen correspondiente a la α -L-arabinofuranosidasa **abf2**, fue sub-expresado. Los otros dos genes sub-expresados fueron la arabinoxilano/arabinofuranohidrolasa **xynD** y la L-arabinosa isomerasa **araA**. La primera enzima participa en la degradación del arabinoxilano, liberando α -L-arabinosa (Bourgeois *et al.*, 2007). Otros polisacáridos vegetales son los xilanos, constituidos a partir de residuos de xilosa unidos por enlaces β -1,4. Con respecto a la degradación de polímero, solo la endo-1,4- β -xilanasas **xynA** fue sub-expresada.

Siguiendo con los sustratos de origen vegetal, el genoma de *B. velezensis* 83 contiene tres pectato liasas, de las cuales una de ellas (**pelB**) sufrió sub-expresión debido a la interacción microbiana (Fig. 14). La pectina es un componente abundante de la pared celular de las plantas. Este hetero-polímero es degradado por enzimas con actividad liasa para producir oligogalacturonidos, que luego pueden degradarse a D-galacturonato (Mekjian *et al.*, 1999; Ouattara, *et al.*, 2010). Además, otros dos genes para la utilización de D-glucuronato y D-galacturonato (hexuronatos) fueron sub-expresados: un homólogo de la glucuronato isomerasa **uxaC** y el transportador simultáneo de glucósido/pentósido/hexurónido por cationes **yjmB** (ambas secuencias adyacentes en el genoma). En complemento con lo anterior, un pequeño operón esencial para el crecimiento en pectina o galactano fue regulado negativamente (Ferreira *et al.*, 2017). Este operón consta del transportador ABC de múltiples azúcares (proteína de unión a ATP) **msmX** y la proteína hipotética **yxkF**. En cuanto a otros carbohidratos vegetales, el operón completo para el uso de la sacarosa fue regulado negativamente por la interacción. Los genes corresponden a: la permeasa del sistema fosfotransferasa (PTS) **sacP**, fosfosacarasa **sacA** y la proteína hipotética **ywdA**. El operón **sacB-levB**, también relacionado con el metabolismo de la sacarosa, fue regulado negativamente por la interacción microbiana. Estos genes consisten en la levansacarasa **sacB** para la producción de levana y la endolevanasa **levB** (sacarosa-6-fosfato hidrolasa) para la degradación de levana (Marvasi *et al.*, 2010; Zhu y Stülke, 2018).

El ácido fítico es una fuente de carbono y fósforo que suele estar presente en las semillas. Las especies de *Bacillus* poseen una fitasa extracelular y la maquinaria para su metabolismo, lo que tiene efectos positivos sobre el crecimiento de las plantas (Ildriss *et al.*, 2002; Borgi *et al.*, 2015). Inicialmente, la fitasa libera fosfatos de inositol, *myo*-inositol y fosfato inorgánico (Borgi *et al.*, 2015). Posteriormente, el *myo*-inositol es catabolizado por un operón extenso y complejo, **iolABCDEFGHIJ** (Yoshida *et al.*, 2008). Los productos finales del catabolismo del inositol son una mezcla de di-hidroxi-acetona fosfato, acetil-CoA y CO₂. En nuestro estudio, seis de estos diez genes (**iolBEFGHI**) fueron sub-expresados (Fig. 14). Mientras que por otro lado, el gen correspondiente a la fitasa *phy* en *B. velezensis* 83 no resultó afectada.

5.6.2 Análisis de expresión de genes relacionados a la degradación de pared celular de hongos. Por otro lado, para las fuentes de carbono derivadas de hongos, otras cepas de *Bacillus velezensis* han demostrado actividad quitinasa (Niazi *et al.*, 2014). Existe evidencia de secuencias de este tipo de enzimas en el genoma de *B. velezensis* 83. Los posibles candidatos podrían ser: a) enzima lítica de la corteza de la espora *yaaH* (una proteína de germinación), que tiene actividad N-acetil-glucosaminidasa, b) una proteína de unión a quitina (similar a *cpbD* de *Pseudomonas aeruginosa*) y c) quitosanasa **csn**. El homólogo de *cpbD* en *B. velezensis* 83, según un análisis de secuencias corresponde a una mono-oxigenasa lítica de polisacáridos. Estas enzimas pueden degradar la quitina o la celulosa (Zhang *et al.*, 2015). En cualquier caso, *yaaH* y el homólogo de *cpbD* no se vieron afectados por la interacción microbiana. Sólo la quitinasa **csn** (clasificada en la categoría COG de la biogénesis de la pared celular) fue regulada negativamente por la interacción (Log₂ FC= -3.0) (Fig. 14). Esta quitinasa extracelular cataliza la hidrólisis de los enlaces glicosídicos del quitosano (Rivas *et al.*, 2000). La quitina es un componente de la pared celular de los hongos, por lo que esperaba una sobre-expresión durante la interacción, más no fue el caso si no todo lo contrario.

Con respecto al metabolismo de β -glucanos y mananos (glucomanano y galactomanano), polímeros presentes en la pared celular de las plantas y diversos hongos, *B. subtilis* contiene enzimas para su degradación. Nuestros resultados mostraron que la endo-1,4- β -glucanasa **bglC** y la 6-fosfo- β -glucosidasas **bglA** de *B. velezensis* 83 fue sub-expresada en las células co-cultivadas. Con respecto al metabolismo de mananos, la permeasa del PTS específica de manosa **manP** y su activador, el antiterminador de transcripción **manR**, fueron sub-expresados por la interacción microbiana. Además, un homólogo de *glcP* en *B. velezensis* 83, un transportador simultáneo de glucosa/manosa:H⁺ putativo (Log₂ FC= -2.9), fue sub-expresado. Este gen en *B. velezensis* 83 está ubicado antes de otros dos genes consistentemente sub-expresados por la interacción microbiana: una aspartato aminotransferasa putativa (Log₂ FC= -4.0) y un gen similar a la inositol monofosfatasa (Log₂ FC= -2.9).

La dinámica transcripcional observada en los genes del metabolismo de carbohidratos invita a pensar que el control biológico derivado de enzimas líticas (quitinasas y β -glucanasas) reportado en otros trabajos, podría ser más bien un efecto secundario de la versatilidad metabólica de estas bacterias para sobrevivir en ambientes con fuentes de carbono complejas y limitadas, como son las raíces de las plantas, ya que durante la suficiencia de glucosa y en presencia directa del hongo (como ocurre en este trabajo), la transcripción de los genes involucrados es fuertemente reprimida. Es de resaltar que en el cultivo axénico hay una expresión significativa de este conjunto de genes aun cuando no está presente la fuente de carbono correspondiente y la glucosa no es limitante. Este fenómeno es similar a lo reportado en cultivos de *E. coli*, donde la expresión de los genes del catabolismo de fuentes alternativas de carbono implica a una alta inversión de recursos, de tal modo que las proteínas correspondientes representan una fracción mayoritaria de su proteoma (You *et al.*, 2013). De ser extrapolable a *B. velezensis* 83, esto significa que las células co-cultivadas redistribuyen una proporción significativa de recursos en favor de los mecanismos de defensa al disminuir la transcripción de los genes correspondientes al COG G.

Es importante resaltar, que sólo 7 genes de la categoría COG G (Metabolismo y transporte de carbohidratos) fueron sobre-expresados por el efecto de la interacción microbiana. En coherencia con la activación de la respuesta al estrés explicada anteriormente, 4 de estos genes mostraron homología con genes dependientes de SigB. Estos incluyen dos genes de proteínas de estrés general fuertemente sobre-expresados, el transportador simultaneo de azúcar:H⁺ putativo **csbC** (Log₂ FC= 4.4) y el transportador de glucosa putativo **ywtG** (Log₂ FC= 4.2).

Muchos de los DEGs relacionados con la adquisición de fuentes alternativas de carbono hasta ahora descritos, son controlados transcripcionalmente por el represor tipo *Lacl*, la proteína control catabólico *CcpA*, el regulador maestro del metabolismo del carbono en bacterias Gram-positivas (Swint-Kruse y Matthews, 2009; Zhu y Stülke, 2018). Los reguladores tipo *Lacl* además de mediar la regulación del metabolismo de los carbohidratos, se han propuesto como mecanismos de heterogeneidad fenotípica dentro de poblaciones bacterianas isogénicas (López *et al.*, 2009, Ackermann, 2015; Evans y Zhang, 2020). Tomando en consideración lo anterior, el análisis de expresión diferencial sugiere que la población de células co-cultivadas de *B. velezensis* 83 presenta una menor heterogeneidad fenotípica, en términos de metabolismo de fuentes alternativas de carbono.

5.7 Análisis transcripcional de las vías de diferenciación celular en *B. velezensis* 83. Durante el crecimiento de *Bacillus* spp. ocurren fenómenos de heterogeneidad metabólica (Pisithkul *et al.*, 2019) y generación de diferentes subpoblaciones isogénicas con diferentes roles específicos, tales como células en esporulación, competentes, móviles, productoras de matriz extracelular (López *et al.*, 2009, Qin *et al.*, 2022). Por ejemplo, estos cambios ocurren durante la transición de células planctónicas a productoras de *biofilm* (producción de biopolímeros y exoenzimas, Fessia *et al.*, 2022). La heterogeneidad fenotípica tiene diversas funciones dentro de una población bacteriana, ya que permite la supervivencia en ambientes cuyos nutrientes son fluctuantes y también facilita la cooperación entre grupos clonales metabólicamente especializados (Ackermann, 2015; Takhaveev y Heinemann, 2018; Evans *et al.*, 2020;

Evans y Zhang, 2020). Se ha sugerido que esta segregación o división de funciones ahorra recursos e impulsa una tasa de crecimiento más alta en comparación con una población uniforme (Ackermann, 2015; Takhaveev y Heinemann, 2018). Además, fenómenos como la formación de *biofilm* pueden ser relevantes para la acción de control biológico de estas bacterias. Por tales motivos y con interés de conocer más acerca de la fisiología del microorganismo, se realizó un DEA de la dinámica de las rutas de diferenciación acontecida durante el cultivo axénico (efecto del tiempo, sección 5.7.1) y los efectos de la interacción sobre las mismas (sección 5.7.2).

5.7.1 Dinámica transcripcional de las vías de diferenciación celular en el cultivo axénico. En el caso específico del cultivo axénico, el tiempo afectó la expresión de múltiples genes relacionados con las vías de diferenciación de *Bacillus* (*life-style*). En la figura 15 se muestra un diagrama general de las correspondientes rutas de señalización y activación, así como también la compleja red de interacción entre las mismas. El diagrama incluye tres de las vías más importantes: a) *quorum sensing* y competencia, b) la síntesis de enzimas degradativas y c) producción de matriz extracelular (*biofilm*) y esporulación.

Respecto al *quorum-sensing* y competencia, la feromona **comX** y la cinasa sensora **comP** sufrió sub-expresión por efecto del tiempo durante el cultivo axénico ($-1.5 \leq \text{Log}_2 \text{FC} \leq -1.0$). Esto es opuesto a lo esperado, dado que se conoce que la expresión de estas proteínas atiende al incremento de la concentración celular. El nivel de expresión del operón para la síntesis de surfactina *srfAABCD*, el cual depende directamente del sistema ComQXPA no sufrió cambios. Sin embargo, aunque su nivel de expresión parece ser constitutiva, fue suficiente para una productividad significativa del metabolito (1.3 mg_{L⁻¹}/g_xh, Fig. 4). Esto significa que a pesar de la ligera sub-expresión en **comX**, la concentración crítica de moléculas de *quorum sensing* si fue alcanzada, siendo coherente con la activación de rutas posteriores (producción de enzimas degradativas, formación de *biofilm* y esporulación). Por su parte, el factor de transcripción de la competencia **comK** presentó sobre-expresión a través del tiempo ($\text{Log}_2 \text{FC} = 2.1$) (Fig. 15). El nivel de expresión de este gen está sujeto a múltiples factores, por lo que resulta difícil definir la causa directa de este comportamiento. De primer instancia su transcripción debería ser constitutiva dado que depende del principal factor sigma de la ARN polimerasa, SigA (*housekeeping*). Sin embargo, su transcripción o actividad también es regulada positiva (ComK, **DegU**, Spo0A) y negativamente (MecA, **CodY**, Rok, **AbrB**) por múltiples reguladores (Zhu y Stülke, 2018), muchos de los cuales también sufrieron cambios transcripcionales (incluyendo **DegU**, Fig. 15). La sobre-expresión de **ComK**, podría ser la primera evidencia indirecta de heterogeneidad fenotípica en el cultivo, ya que de acuerdo con estudios previos de cepas reporteras con fusiones transcripcionales *comK-gfp*, el gen es expresado solo en una fracción de la población (Dubnau y Losick, 2006, López *et al.*, 2009).

Además de facilitar la competencia, el *quorum sensing* también facilita la síntesis de enzimas degradativas y bacilomicina D a través de la activación del sistema de dos componentes DegS-DegU. DegS es una cinasa citoplásmica que fosforila al regulador de respuesta DegU, y facilita la síntesis y transporte de enzimas extracelulares. De acuerdo con nuestros resultados, el regulador de respuesta **degU** fue altamente expresado bajo las condiciones de cultivo axénico (TPM) y además sobre-expresado por efecto del tiempo (Fig. 15). En sintonía con esto, los operones regulados por este sistema correspondientes a la síntesis de bacilomicina D *bmyDABC* ($10.8 \geq \text{Log}_2 \text{FC} \geq 4.7$), síntesis y transporte de ácido poli- γ -glutámico *capBCAE* ($3.9 \geq \text{Log}_2 \text{FC} \geq 3.6$, también conocido como *pgsBCAE*), y las exo-proteasas: bacilopeptidasa F *bpr* ($\text{Log}_2 \text{FC} = 5.5$) y subtilisina E *aprE* ($\text{Log}_2 \text{FC} = 6.3$) fueron fuertemente sobre-expresados por efecto del tiempo. La expresión de estos genes fue coherente con la acumulación de ácido poli- γ -glutámico y bacilomicina D en sobrenadantes del cultivo axénico (Fig. 4 y Fig. 16). La sobre-expresión de estos genes es indicativo de un posible aumento de la heterogeneidad fenotípica a lo largo del cultivo axénico. Estas exo-proteasas son expresadas sólo en una fracción minoritaria de la población en cepas reporteras con fusiones transcripcionales *aprE-gfp* y *degU-gfp* (Veening *et al.*, 2008). Los sistema ComQXPA y DegS-DegU, también son importantes en la activación de la formación de matriz extracelular y *biofilm* (Qin *et al.*, 2022), descritas a continuación.

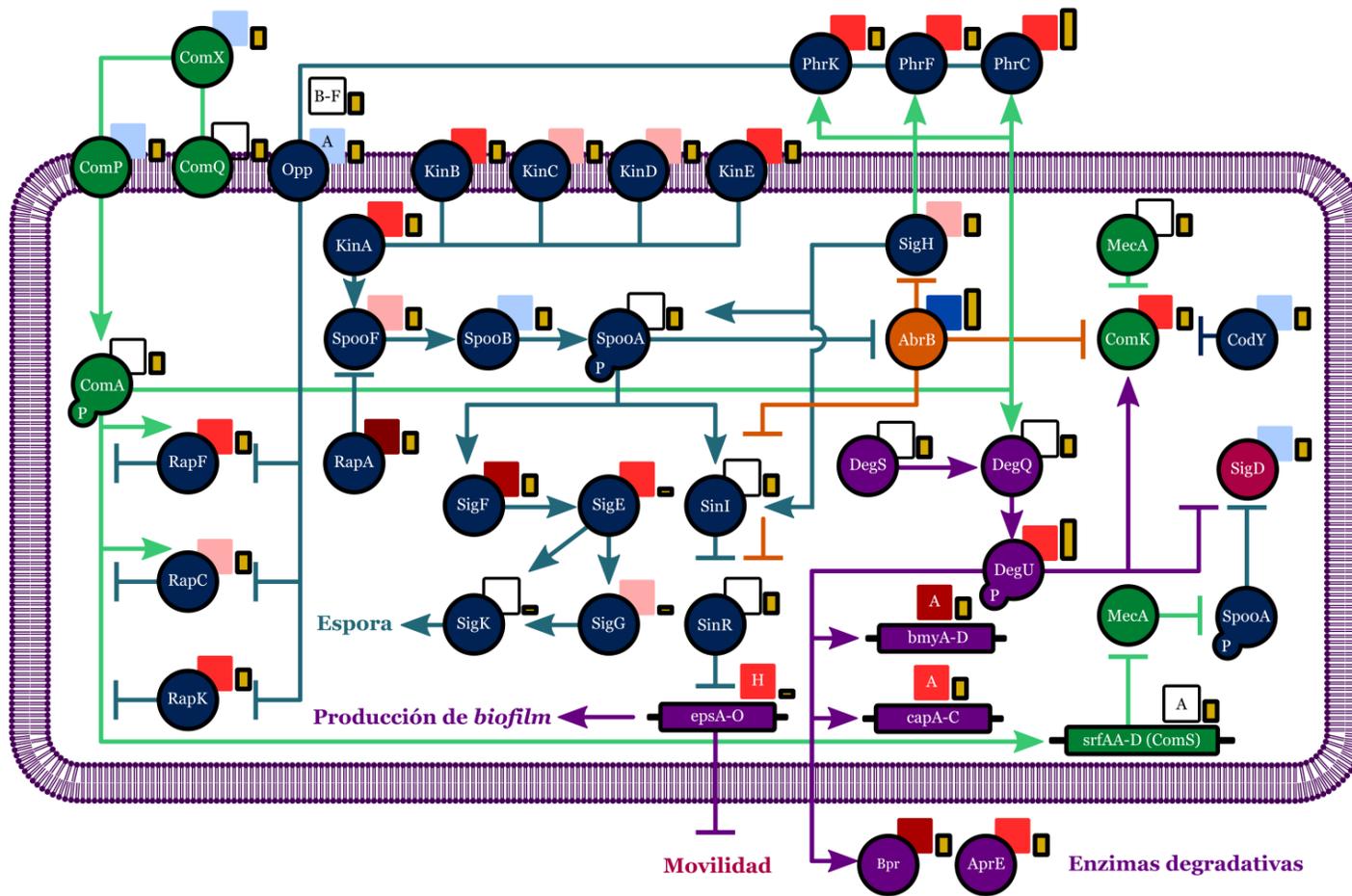


Figura 15. Dinámica transcripcional de las rutas de diferenciación celular y *quorum sensing*. Arriba. El efecto del tiempo (13 h vs 8 h) se muestran a través de un diagrama de funciones e interacción de proteínas. Aquí, cada proteína es representada con círculos y clasificada de acuerdo con la ruta de diferenciación en la cual participa: *quorum sensing* y competencia (verde), producción de exoenzimas y biopolímeros (morado) y esporulación (azul). Las líneas conectoras entre estas indican interacciones de regulación positiva (terminación con puntas de flecha) o represión (terminación cuadrada). El resultado del DEA de los genes correspondientes a cada proteína se muestra en los cuadros superiores asociados a cada círculo, donde el color rojo y azul indican una sobre- o sub-expresión de acuerdo con una escala de factores de cambio (indicada abajo a la derecha). El valor de expresión promedio en transcritos por millón (TPM) es codificado mediante un rectángulo amarillo, cuya altura es proporcional al nivel de expresión.

Factor de cambio (FDR < 0.05)	Sobre-Sub-		TPM
	Expresión	Expresión	
$ \log_2 FC \geq 6$	[Red]	[Blue]	[Yellow] (0,10)
$6 > \log_2 FC \geq 2$	[Red]	[Blue]	[Yellow] [10,500]
$ \log_2 FC < 2$	[Light Red]	[Light Blue]	[Yellow] [500,+∞]
No-DEG	[White]	[White]	[White]

Respecto a la esporulación y producción de matriz extracelular, los tiempos de muestreo para el análisis transcripcional (8 y 13 h) correspondieron a condiciones de no limitación nutricional por glucosa, por lo tanto no se esperaba la formación de esporas en este periodo. La presencia de estas durante el cultivo axénico es detectada (vía tinción de verde de malaquita) hasta después de 3-6 h tras el agotamiento de la glucosa (21-24 h de incubación total). No obstante, los transcriptomas sugieren que para las 13 h, donde la concentración celular es elevada ($X \geq 10^9$ células/mL), la población de *Bacillus* ya se está preparando para la esporulación, lo cual concuerda con la sobre-expresión de las proteínas de señalización de la esporulación y los primeros factores sigma implicados (Fig. 15).

Con respecto a la ruta de señalización y activación de la esporulación, los genes correspondientes a las cinco cinasas sensoras **KinA**, **KinB**, **KinC**, **KinD** y **KinE** fueron consistentemente sobre-expresadas a las 13 h con respecto a 8h ($4.3 \geq \text{Log}_2 \text{FC} \geq 0.7$). Estas proteínas inician la cascada de señalización regulando post-traduccionalmente la primera proteína del fosforelevo **Spo0F** (López *et al.*, 2009, Qin *et al.*, 2022), cuyo gen fue consistentemente sobre-expresado ($\text{Log}_2 \text{FC} = 1.8$). Siguiendo con la ruta de activación, la expresión del regulador maestro de la esporulación Spo0A no fue afectado por el tiempo. Puede intuirse que su nivel de fosforilación era elevado en ese momento dado que los tres primeros los factores sigma de la ARN polimerasa específicos de la esporulación (**sigF**, **sigE** y **sigG**) fueron sobre-expresados con una magnitud coherente a su orden de activación ($\text{Log}_2 \text{FC} = 6.0, 2.2$ y 1.2 , respectivamente) (Fig. 15). Los factores sigma alternativos **SigF** (σ^F) y **SigG** (σ^G), son específicos de la pre-espora para las etapas temprana y tardía, respectivamente. Por su parte **SigE** (σ^E) es específico de la célula madre en etapas tempranas (Qin *et al.*, 2022). Estas proteínas, se encargan de facilitar la expresión de numerosos genes durante la morfogénesis (114, 150, y 242, respectivamente), de allí su relevancia. Lo anterior, también fue lógico con su nivel de expresión (si bien bajo), que va de mayor a menor en número de transcritos por millón desde **SigF** a **SigG** (TPM, Fig. 15).

El incremento de la fracción de regulador maestro fosforilado Spo0A-P cumple además otros importantes roles en la célula, a niveles bajo-intermedios y previo a la esporulación, este regulador promueve la transcripción del operón **epsABCDEFGHIJKLMNO** para la producción de *biofilm*, a través de una doble represión, mediada por SinI y SinR (Chai *et al.* 2008, López *et al.*, 2009) (Fig. 15). En coherencia, la activación casi completa del operón *eps* se confirmó en el cultivo axénico ($5.8 \geq \text{Log}_2 \text{FC} \geq 2.0$), donde solo hubo dos excepciones (*epsL* y *epsO*). Entre otras de sus funciones, la síntesis de metabolitos antimicrobianos como la difidicina, también es controlada transcripcionalmente por Spo0A (Liu *et al.*, 2023). El bajo nivel de expresión promedio de los factores sigma de la esporulación nos sugiere que probablemente solo fracción minoritaria de la población presenta esta expresión. Podría descartarse que estos niveles observados describan a una población homogénea con niveles bajo de expresión porque durante la diferenciación celular no todas las células entran a esporulación de forma sincronizada, debido a que Spo0A-P es activo solo en una subpoblación (Chai *et al.* 2008), aunque esto solo es una hipótesis.

Existen otros factores epigenéticos causantes de heterogeneidad fenotípica, como los reguladores negativos tipo Rap (Mutlu *et al.*, 2018), que pueden explicar por qué están sobre-expresados los genes de activación de la esporulación, aun cuando esta no es detectable. Las proteínas Rap son aspartato fosfatasas encargadas de retrasar la esporulación a través de impedir el fosforelevo hacia Spo0A en las células vegetativas (Qin *et al.*, 2022). Su expresión es dependiente del *quorum sensing* a través del sistema ComQXPA. Los reguladores de respuesta tipo aspartato fosfatasa **rapA**, **rapF**, **rapC** y **rapK** fueron sobre-expresados por efecto del tiempo ($\text{Log}_2 \text{FC} = 8.2, 4.5, 1.3$, y 4.5 , respectivamente). Consistentemente, también sus respectivos inhibidores, los péptidos tipo **phrF**, **phrC** y **phrK** ($5.5 \geq \text{Log}_2 \text{FC} \geq 2.5$), con excepción de *phrA*, dado que el genoma de *B. velezensis* 83 no cuenta con la misma (Fig. 15). Según lo reportado, la excreción de proteasas extracelulares durante la fase estacionaria permite la maduración de los pre-péptidos Phr. Los péptidos maduros reingresan a la célula a través del transportador ABC OppABCDF, y una vez dentro, ocasionan cambios conformacionales en su respectivas fosfatasas Rap, inhibiendo su actividad y permitiendo la esporulación (Fig. 15). Probablemente **RapA** presenta una sobre-expresión de un orden de magnitud superior con

respecto al resto de fosfatasa, debido a la carencia de PhrA y es la causante de dicho fenómeno. Esto explicaría, porque a diferencia de *B. velezensis* 83, la cepa modelo *B. velezensis* FZB42 en cultivos en matraz agitado con medio mineral, genera esporas aún bajo condiciones de suficiencia de glucosa ($\approx 10\%$ Espora/célula al momento de [Glucosa]= 0 g/L). Finalmente, el patrón de expresión mostrado en el cultivo axénico es consistente con lo anteriormente descrito para las rutas de diferenciación de *Bacillus*. De ser extrapolable a la cepa de estudio, podemos concluir que los cultivos axénicos se caracterizan por poblaciones altamente heterogéneas y diferenciadas. Un estudio profundo acerca de la diferenciación celular de este microorganismo estuvo fuera de los objetivos iniciales y alcances del presente trabajo de investigación. Por ello, se invita cordialmente al lector a acudir a la sección de reflexiones finales y perspectivas, donde se aborda al respecto.

5.7.2 Efecto de la interacción microbiana sobre las vías de diferenciación celular y la producción de γ -PGA.

Después analizar el perfil de expresión de las rutas de diferenciación en el cultivo axénico, se procedió a analizar el efecto de la interacción sobre las mismas. Para el *quorum sensing* y competencia, únicamente dos genes relacionados con la captación de ADN exógeno fueron ligeramente sub-expresado por efecto de la interacción microbiana: la nucleasa asociada a la membrana *nucA* ($\text{Log}_2 \text{FC} = -1.7$) y su inhibidor *nin* (también conocido como *comJ*, $\text{Log}_2 \text{FC} = -1.9$). Estos genes constituyen un operón y son relevantes para la competencia genética (Provedi *et al.*, 2001). Con respecto a los genes de biosíntesis enzimas degradativas y bacilomicina D dependientes de DegU, múltiples genes fueron severamente sub-expresados por la interacción microbiana (Fig. 16). Estos genes incluyeron al regulador de la síntesis de exo-enzimas *degQ* ($\text{Log}_2 \text{FC} = -2.1$), cuyo producto estimula la fosforilación y activación de DegU a través de DegS, la bacilopeptidasa *F bpr* ($\text{Log}_2 \text{FC} = -3.8$), el operón completo para la biosíntesis de bacilomicina D *bmyCBAD* ($-6.7 \leq \text{Log}_2 \text{FC} \leq -3.2$) y el operón completo para la biosíntesis de ácido poli- γ -glutámico *capBCAE* ($-7.2 \leq \text{Log}_2 \text{FC} \leq -6.3$).

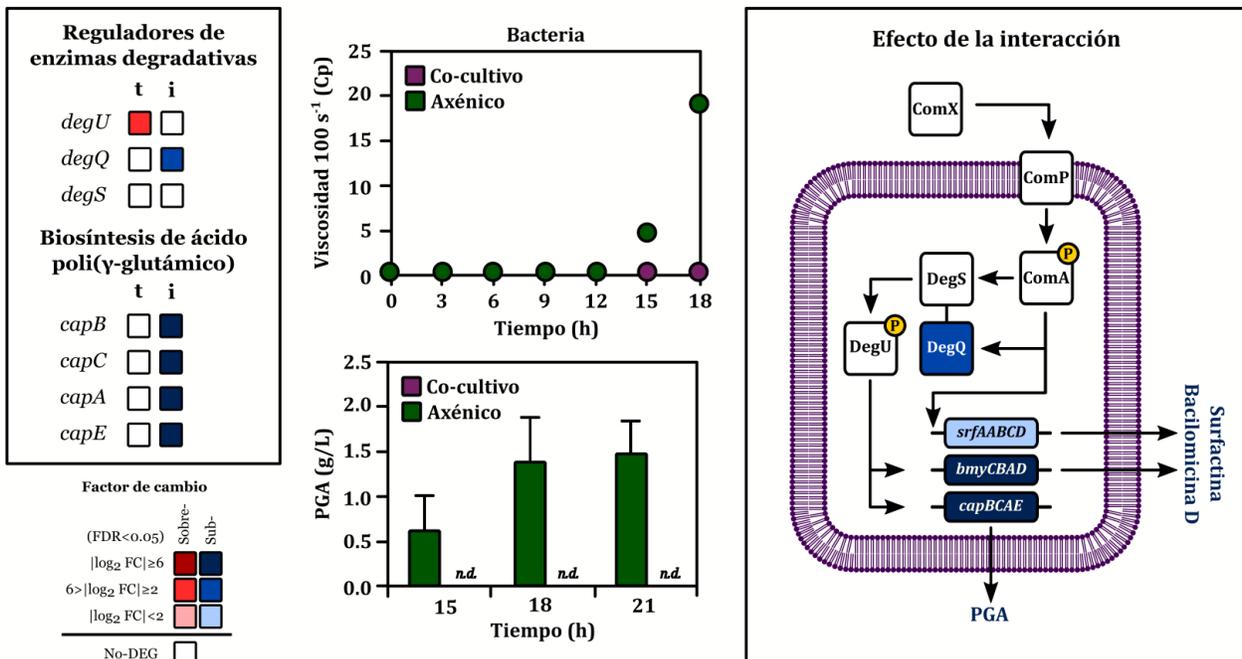


Figura 16. Cambios transcripcionales en el sistema de regulación DegU/S y los genes biosintéticos de γ -PGA derivados del efecto de la interacción. El análisis de expresión diferencial del sistema DegU/S (control de enzimas degradativas y PGA) se indica a la izquierda empleando el código de colores de anteriores figuras. Al centro, se muestra la viscosidad aparente y la concentración de PGA en sobrenadantes de: cultivo axénico de *B. velezensis* 83 (verde) y co-cultivo (morado). La viscosidad aparente de los sobrenadantes del cultivo axénico de *C. gloeosporioides* es igual al agua. A la derecha, el análisis transcripcional de los elementos de regulación transcripcional del sistema DegU/S por *quorum sensing*.

Este fenotipo queda confirmado tras detectarse menor concentración de los productos de las correspondientes (lipopéptidos y biopolímero) en los sobrenadantes del co-cultivo en comparación al control, así como también una menor viscosidad aparente en los mismos (Fig. 16). Se conoce que la bacilomicina D participa en los procesos de diferenciación celular porque incrementa significativamente la expresión de la cinasa sensora KinC en *B. amyloliquefaciens* (Xu *et al.*, 2013). Reportes previos muestran que cepas mutantes de *B. amyloliquefaciens* no productoras de bacilomicina D presentan nula actividad de biocontrol contra *Fusarium* y menor producción de *biofilm* y capacidad de colonización de raíces *Cucumis sativus*, resaltando la importancia de este lipopéptido (Xu *et al.*, 2013). Además, se conoce que cepas mutantes de *Bacillus* no productoras de *biofilm*, que por definición presentan menor diferenciación celular, tienen menor capacidad de colonización de plantas y actividad de control biológico sobre hongos fitopatógenos. Por esta razón, es importante considerar que si estos cambios se reproducen bajo condiciones naturales en las plantas huésped, el desempeño de estos bioinoculantes podría estar comprometido.

Según el DEA de la ruta de señalización y activación de la esporulación, solo el regulador de respuesta **RapC**, la proteasa **spolIGA** y la tioesterasa para la biosíntesis de surfactina **srfAD** fueron sub-expresados por efecto de la interacción microbiana, y solo ligeramente ($\text{Log}_2\text{FC} \approx -1.85$). **RapC** es una aspartato fosfatasa que funge como inhibidor negativo de la esporulación a través de secuestrar el grupo fosfato del regulador de la competencia y *quorum sensing* ComA-P. La proteasa **SpolIGA** es encargada de la maduración del factor sigma de la ARN polimerasa SigE, el cual es específico de la célula madre durante etapas tempranas de la esporulación, y la tioesterasa **SrfAD** se encarga de cerrar el anillo peptídico con el ácido graso β -hidroxilado para finalizar la síntesis de surfactina. Estos elementos podrían contribuir al retraso de la diferenciación hacia esporas durante el co-cultivo en períodos más avanzados del cultivo, pero en todo caso, la respuesta a estrés ocasionada por el fitopatógeno no implicó una esporulación prematura en la bacteria.

Recapitulando los resultados descritos hasta ahora, las células co-cultivadas de *B. velezensis* 83 se caracterizan transcripcionalmente por incrementar los recursos relacionados con la respuesta al estrés, son metabólicamente menos versátiles y muestran una mayor preferencia por la glucosa. Sin embargo, aún se desconocen las moléculas causantes de dichos efectos y los mecanismos regulatorios específicos involucrados. Compuestos antimicrobianos producidos por el hongo podrían ser el agente causante. Además, el hongo también pudo haber provocado de manera indirecta, la generación de compuestos tóxicos dentro de la bacteria. Por ejemplo, se podrían considerar las especies electrófilas reactivas (RES, Lee y Park, 2017) y productos de la oxidación degradativa de la glucosa (Quijano *et al.*, 2016). Otra respuesta de los patógenos es la producción de especies reactivas de oxígeno que ayudan a detoxificar los metabolitos tóxicos. Esto mediante la expresión de lacasas, como sucede en *Botrytis cinerea* (Schouten *et al.* 2008). Los dos siguientes apartados describen el efecto de la interacción sobre la transcripción de dos conjuntos de genes específicos: la ruta de desintoxicación de glioxales (Sección 5.8) y la respuesta a antibióticos (Sección 5.9). La primera porque un mayor consumo de glucosa puede acarrear efectos secundarios nocivos para la célula mientras que la respuesta a antibióticos es un aspecto importante para considerar durante las interacciones microbianas.

5.8 Efecto de la interacción sobre la transcripción de las vías de desintoxicación del metilglioxal. En sincronía con la activación de la respuesta al estrés, genes de rutas de la desintoxicación del metilglioxal fueron sobre-expresados consistentemente en células co-cultivadas (Fig. 17). Lo anterior podría estar relacionado debido a que los subproductos de la oxidación degradativa de la glucosa, como el metilglioxal (MGO, un compuesto citotóxico), pueden modular la expresión de genes relacionados con la respuesta al estrés (Farmer y Davoine, 2007). Como puede observarse en la figura 17, durante la glucólisis, la fructosa-1,6 bifosfato aldolasa produce gliceraldehído 3-P junto con di-hidroacetona fosfato (también conocida como glicerona-P). Este último se convierte posteriormente en MGO a través de una sintasa.

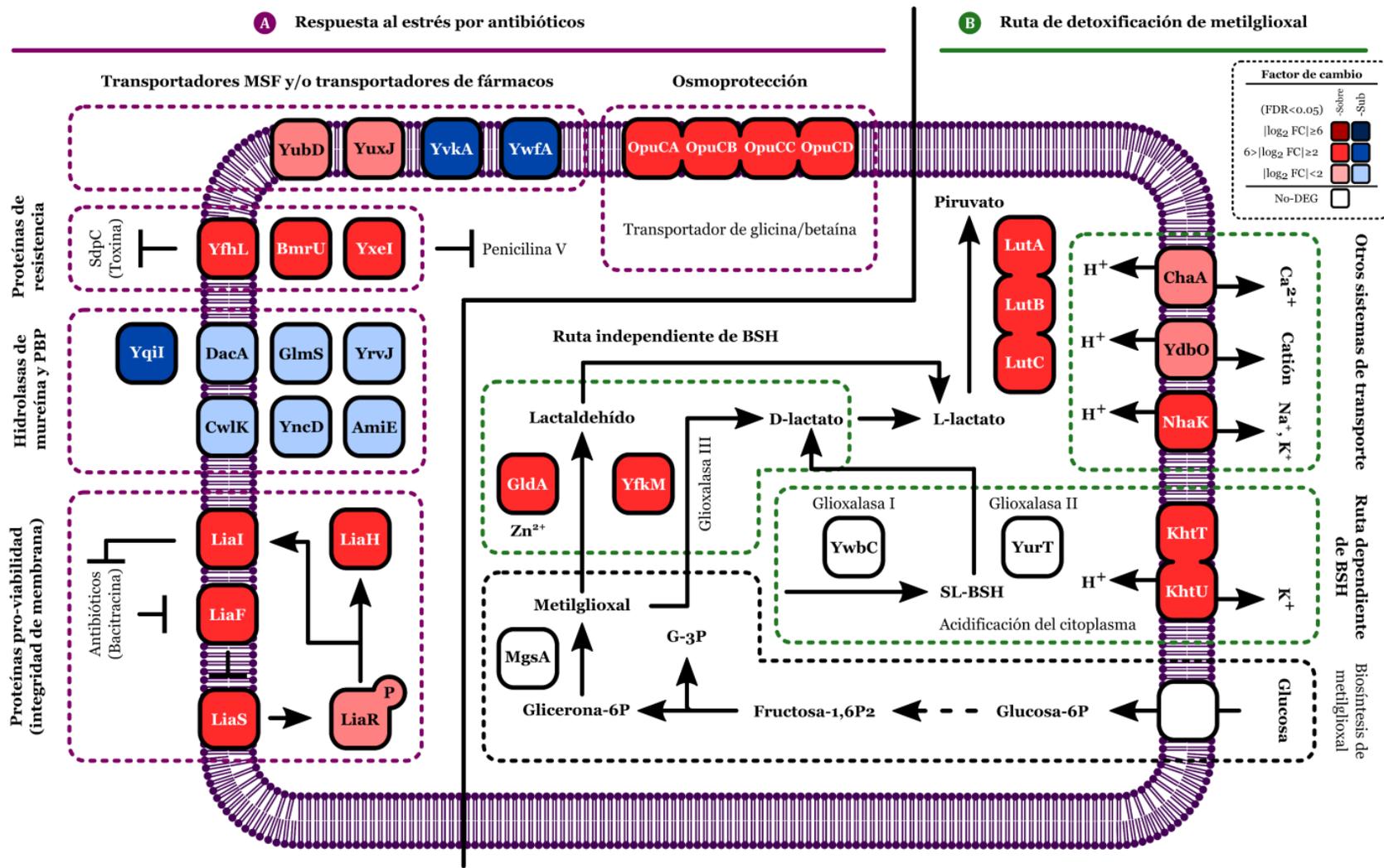


Figura 17. Efecto de la interacción sobre la expresión de genes implicados en la respuesta a antibióticos y las rutas de detoxificación de metilgloxiol. Los resultados del análisis transcripcional se muestran a través de un diagrama de funciones e interacción de proteínas. Aquí, los cuadros dentro del diagrama representan cada una de las proteínas involucradas. El color rojo o azul indica una sobre- y sub-expresión (estadísticamente significativa) de los genes correspondientes de acuerdo con una escala de factores de cambio indicada a la izquierda. En el caso de cuadros blancos, estos denotan cambios en los niveles de expresión no significativos ($p > 0.05$, $FDR > 0.05$).

El MGO también puede originarse a partir de la degradación de proteínas glicosiladas, la oxidación del ADN y la peroxidación lipídica, fenómenos también presentes durante el estrés oxidativo (Lee y Park, 2017). Así, la vía de desintoxicación de los glioxales y la respuesta contra el estrés tienen mecanismos de respuesta en común. Existe evidencia que sugiere que la generación de RES va acompañada de un mayor consumo de glucosa (Lee y Park, 2017). Uno de los mecanismos de represión catabólica en bacterias consiste en controlar la adquisición de glucosa en función de la concentración interna de AMPc. En *E. coli* la transcripción de la glioxalasa I (una enzima responsable de la desintoxicación) está indirectamente relacionada con la concentración de AMPc, sugiriendo que la activación de la vía de desintoxicación de los glioxales está relacionada con la adquisición y oxidación de la glucosa (Lee y Park, 2017). En otras palabras, si la concentración de glucosa es alta, la glioxalasa *gloA* es liberada de su control negativo.

Según nuestros datos, la cantidad de glucosa consumida durante el co-cultivo corresponde a la suma aritmética de aquella consumida individualmente durante cada cultivo axénico (hasta el agotamiento del sustrato a las 15 h). Esto significa que la tasa de consumo de glucosa ($g_s/L \cdot h$) en la bacteria no cambió, pero dado que su velocidad de crecimiento específica es menor durante el co-cultivo en comparación al cultivo axénico, su velocidad de consumo específico forzosamente debió haber aumentado ($g_s/g_x \cdot h$). Por supuesto esto solo se cumpliría si no hay cambios similares en el hongo. Desde un punto de vista de bioingeniería clásica, la velocidad de consumo específico de glucosa se puede definir como $q_s = -\mu/Y_{x/s}^* - m [g_s/g_x \cdot h]$, donde μ es la velocidad de crecimiento específica [h^{-1}], $Y_{x/s}^* [g_x/g_s]$ es el rendimiento real, y m el coeficiente de mantenimiento [$g_s/g_x \cdot h$]. Con base en estas consideraciones, solo un aumento significativo en la energía de mantenimiento explicaría un aumento en la velocidad de consumo específica de glucosa en la bacteria. La inducción de la respuesta al estrés y los múltiples mecanismos de defensa en las células co-cultivadas de *B. velezensis* 83 detectada a través del análisis de expresión diferencial (Fig. 11) es coherente con esta deducción. Se sabe que durante el estrés oxidativo, aumenta la energía de mantenimiento para la reparación y protección de la membrana y las macromoléculas, disminuyendo el rendimiento biomasa-sustrato aparente. El mecanismo para aumentar la velocidad de consumo específico de glucosa (pero con crecimiento restringido) podría estar relacionado también con la respuesta al estrés. Según nuestro análisis, no hay cambios en la transcripción de los genes relacionados con la glucólisis, sin embargo, los transportadores putativos de glucosa: **csbC** ($\text{Log}_2 \text{FC} = 4.5$) y **ywtG** ($\text{Log}_2 \text{FC} = 4.3$) si fueron sobre-expresados en células co-cultivadas. Como se mencionó anteriormente, estos genes están regulados por SigB, el principal regulador del estrés, e hipotéticamente podrían aumentar la absorción de glucosa durante la interacción.

En correspondencia con lo anterior, el DEA también indicó una regulación positiva de las vías de desintoxicación de RES. Brevemente, la desintoxicación de glioxales consta de varias vías que convergen en el D-lactato como productos final, mediante la participación de enzimas dependientes de NADPH (aldo-ceto reductasas) y glioxalosas (tipo I, II y III; Lee y Park, 2017). En *B. subtilis* existen tres rutas para la desintoxicación del metilglioxal: a) una dependiente del bacilitiol (BSH) y b) dos independientes. La vía dependiente utiliza glioxalosas de tipo I y II (YwbC y YurT, respectivamente) y finaliza con la producción de D-lactato y la activación del intercambiador de K^+/H^+ KhtSTU. Por lo tanto, existe una estrecha relación entre la desintoxicación del metilglioxal, la producción de lactato y la acidificación del citoplasma (Chandrangsu *et al.*, 2014). Por su parte, las vías independientes de BSH utilizan glioxalosas de tipo III para convertir MG en lactato, o aldo-ceto reductasas para convertir MG en acetol (Chandrangsu *et al.*, 2014).

La interacción microbiana causa la sobre-expresión de genes que involucran dos tipos de vías de desintoxicación de MGO, dependientes de BSH (bacilitiol) e independientes de BSH (Fig. 17). En el caso de la vía dependiente de BSH, la interacción microbiana provoca la sobre-expresión de los genes que codifican para el intercambiador de K^+/H^+ , **khtU** ($\text{Log}_2 \text{FC} = 1.9$) y **khtT** ($\text{Log}_2 \text{FC} = 3.4$), los cuales confieren protección contra el metilglioxal en *B. subtilis* y provocan la acidificación del citoplasma. Se desconoce el mecanismo de protección de estos intercambiadores, pero existe una

estrecha relación entre la desintoxicación de metilglioxal, la producción de lactato y la salida del potasio (Changdrangsu *et al.*, 2014). Esto es consistente con la sobre-expresión de las lactato deshidrogenasas antes mencionadas, las cuales podrían reincorporar el lactato generado al metabolismo de la glucosa, en forma de piruvato. Recapitulando, el complejo L-lactato deshidrogenasa **lutABC** y la L-lactato deshidrogenasa **ldh** fueron sobre-expresadas ($\text{Log}_2 \text{FC} > 4.27$). En adición, los intercambiadores catión/ H^+ **nhaK** y **chaA** (este último para calcio), y el exportador putativo de cationes **ydbO**, fueron ligeramente sobre-expresados en las células co-cultivadas ($2.1 \geq \text{Log}_2 \text{FC} \geq 1.4$), los cuales también podrían contribuir a la acidificación del citoplasma. En cuanto a la vía independiente de BSH, **yfkM** fue sobre-expresado ($\text{Log}_2 \text{FC} = 3.1$), un gen dependiente de SigB que codifica una enzima similar a la glioxalasa III. Además, un gen que codifica una glicerol deshidrogenasa putativa similar a **gldA** de *E. coli* también fue sobre-expresada ($\text{Log}_2 \text{FC} = 4.1$) (Fig. 17). En *E. coli*, se ha propuesto el papel protector de la glicerol deshidrogenasa dependiente de NADH a través de la desintoxicación y degradación de compuestos tóxicos, e interesantemente es dependiente de Zn^+ . Esta enzima puede mediar en la detoxificación de dihidroxiacetona (un posible precursor de MGO) a glicerol, de metilglioxal a D-lactaldehído, entre otros (Subedi *et al.*, 2008; Lee y Park, 2017). Para corroborar estos cambios transcripcionales, requiere evaluar si la velocidad de consumo específico de la bacteria durante el co-cultivo es efectivamente mayor en comparación al control y si está correlacionado con el nivel de transcripción de la vía descrita.

5.9 Efecto de la interacción sobre la expresión de genes correspondientes a PBPs y proteínas de resistencia a antibióticos. Una de las formas de comunicación celular durante las interacciones entre microorganismos es a través de la antibiosis (Frey-Klett *et al.*, 2011). Es por ello, que existe una dinámica conexión y lazos co-evolutivos entre los genes para la biogénesis de la pared/membrana celular y la resistencia a los antibióticos. Muchos compuestos antimicrobianos, por ejemplo, tienen afinidad hacia los componentes de la pared o membrana bacteriana, como es el caso de los antibióticos β -lactámicos y las proteínas de unión a la penicilina (PBP) (Fernandes *et al.*, 2013). En esta sección se abordará conjuntamente el efecto de la interacción sobre la expresión de los genes involucrados para estos dos aspectos y su relación con la activación de la respuesta al estrés observada. Para dicho objetivo, se requirieron análisis de homología adicionales usando el genoma de *B. velezensis* 83 en búsqueda de los genes involucrados.

Según los resultados del DEA, 21 genes correspondientes a la categoría COG M (biogénesis de la pared y membrana celular) fueron modificados durante la interacción microbiana, de los cuales 8 y 13 fueron sobre- y sub-expresados, respectivamente (Fig. 8). Dentro de los genes sobre-expresados, resaltan tres genes correspondientes a glicosiltransferasas (GTasa) de la familia 2 (WP_1259, WP_3311 y **cgeD**) y el transportador de piruvato **pftAB** ($\text{Log}_2 \text{FC} = 3.2$ y 2.7 , respectivamente) (Charbonnier *et al.*, 2017), mientras que dentro de los sub-expresados se encuentran numerosas PBP.

Las dos GTasas con los dos factores de cambio más altos, **WP_1259** y **WP_3311** ($\text{Log}_2 \text{FC} = 3.7$ y $\text{Log}_2 \text{FC} = 2.8$, respectivamente) muestran homología con bajo porcentaje de identidad (%) solo hacia GTasas de otras especies bacterianas. **WP_1259** es similar a la GTasa *yoU* de *B. subtilis* (*e-value* = 1×10^{-22} , 28%) y a la GTasa para biosíntesis lipopolisacáridos *kdtX* de *S. marcescens* (*e-value* = 1×10^{-10} , 39 %). Por su parte, **WP_3311** muestra similitud hacia GTasa *wcaE* de *E. coli* (*e-value* = 8×10^{-7} , 36 %). En *B. velezensis* 83 están presentes las 14 GTasas reportadas para *B. subtilis*, sin embargo WP_3311 no presenta homología con ninguna de estas. Las GTasas de la familia 2 en *B. subtilis*, participan en funciones como la glicosilación del ácido lipoteicoico, incluso como en el caso de CsbB, están relacionadas con la respuesta al estrés oxidativo. En *S. aureus*, la GTasa TarS responsable de las decoraciones de β -O-GlcNAc de los ácidos teicoicos, componente principal de la pared celular en bacterias Gram-positivas, participa en la resistencia contra los antibióticos β -lactámicos (Sobhanifar *et al.*, 2016). Las GTasas se utilizan en biotecnología para modificar antibióticos con azúcares como estrategia para obtener estructuras con propiedades antimicrobianas más deseables en comparación a las originales, por lo que sería interesante estudiar estas dos enzimas aún no

caracterizadas. De hecho, se propuso que deben existir GTasas aún sin descubrir en *B. amyloliquefaciens* (ahora, *B. velezensis*) que actúen como elementos *trans* para la modificación de antibióticos, como es el caso de la macrolactina decorada con piranosidos de glucosa, una de las diferentes formas en las que este compuesto antimicrobiano puede ser aislado de sobrenadantes de este microorganismo (Schneider *et al.*, 2007).

Por el contrario, cinco genes que codifican para hidrolasas de peptidoglicano, reportados como proteínas de unión a penicilina (Vollmer *et al.*, 2007) fueron ligeramente sub-expresados ($-1.4 \leq \text{Log}_2\text{FC} \leq -2.2$) por la interacción microbiana. Entre estas se encontraron: la D-alanil-D-alanina carboxipeptidasa **dacA**, la peptidoglicano L, D-endopeptidasa hidrolítica **cwlK** y tres N-acetilmuramil-L-alanina amidasas, incluidas **amiE**, **yrvJ** e **yqil**. Otros genes relacionados con la síntesis de la pared celular, como la alanina racemasa **yncD**, la sortasa de clase D **yhcS** (implicada en la biogénesis de la espora, Spirig *et al.*, 2011) y la glutamina-fructosa-6-fosfato transaminasa **glmS** también fueron sub-expresadas ($-1.5 \leq \text{Log}_2\text{FC} \leq -1.2$) (Fig. 17).

El número reportado de proteínas de unión a penicilina en el genoma de *B. subtilis* es 16 (Wei *et al.*, 2004), y de acuerdo con nuestro análisis, al menos 15 de estas están presentes en *B. velezensis* 83. De estas, las previamente mencionadas **dacA** y **amiE** fueron sub-expresadas. **DacA** es relevante porque fue reportada como la principal D-alanil-D-alanina carboxipeptidasa en *B. subtilis* (PBP-5), y está involucrada en el crecimiento de la pared celular catalizando los pasos finales de la síntesis del peptidoglicano con entrecruzamiento (Sauvage *et al.*, 2008; Zhu y Stülke, 2018; The UniProt Consortium, 2019). Su sub-expresión se podría relacionar con la menor velocidad de crecimiento observada en la bacteria durante el co-cultivo. La N-acetilmuramil-L-alanina amidasa **AmiE** (o **YbbE**) descrita como PBP-4B, participa en el reciclaje de componentes de la pared celular, como los muropéptidos de peptidoglucano (Litzinger *et al.*, 2010), y tiene actividad β -lactamasa aunque baja con respecto a otras β -lactamasas (Cha *et al.*, 2013).

Aunque las PBP son relevantes para el desarrollo de la pared celular y algunas pueden mejorar la resistencia a antibióticos β -lactámicos, es difícil discernir si un aumento o disminución en su nivel de expresión puede significar una mejora o una disminución en la resistencia hasta no comprobarlo experimentalmente, ya que los efectos reportados son divergentes y suelen ser específicos. Por ejemplo, una estrategia para aumentar la resistencia a los β -lactámicos puede ser la sobreproducción de PBP, como en el caso de la PBP-1B y la *mecillinam* Thulin y Andersson, 2019). De la misma manera, la inactivación de genes para PBP también puede provocar un aumento de en la resistencia, como sucedió en el caso de la GTasa/transpeptidasa PBP-4 y la moenomycinina (Zawadzka-Skomial *et al.*, 2006). Sumado a lo anterior, es difícil discutir a qué tipo de β -lactámicos tienen afinidad los productos de los genes afectados por la interacción, ya que como se observó previamente, el espectro de selectividad de este tipo de proteínas es amplio y variable (Kocaoglu y Carlson, 2015).

Hasta ahora, no se cuenta con evidencia experimental de la clase de metabolitos antimicrobianos que *C. gloeosporioides* 09 puede producir. Sin embargo, de acuerdo con el análisis del genoma de *C. gloeosporioides* 23, se reveló la presencia de múltiples genes biosintéticos correspondientes a policétidos sintasas (PK, 31), sintasas de péptidos no ribosomales (NRPK, 13) e híbridos PK-NRPK (4) (Nordberg *et al.*, 2014). Además, los metabolitos sintetizados por esta especie de hongo muestran actividad antimicrobiana contra bacterias Gram-positivas. Entre ellos se encuentran el ácido colletotrico (Zou *et al.*, 2000; García-Pajón y Collado, 2003), derivados del ergosterol (3-oxo-ergosta-4,6,8(14),22-tetraeno, Lu *et al.*, 2000), azafilonas (colletotricona A, Wang *et al.*, 2016; Williams *et al.*, 2021) y otras químicamente aún no identificadas (extractos activos, Arivudainambi *et al.*, 2011). Probablemente este tipo de metabolitos sean los causantes de la activación de la respuesta al estrés en *B. velezensis* 83. Para profundizar más acerca de este tema, se realizó una búsqueda de los genes en *B. velezensis* 83 relacionados a la resistencia a antibióticos, basándonos en 63 genes reportados para *B. subtilis* (Zhu y Stülke, 2018). Los resultados mostraron que 9 (14 %) de estos homólogos en *B. velezensis* 83 mostraron sobre-expresión por efecto de la interacción microbiana,

los cuales corresponden a proteínas de resistencia contra antibióticos y un sistema de dos componentes que fomenta la integridad de membrana y la viabilidad. Asimismo, los resultados del DEA arrojaron adicionalmente cambios de expresión en genes para: un transportador tipo ABC para solutos compatibles, transportadores de la principal superfamilia de facilitadores (MFS) y transportadores de resistencia a múltiples fármacos (MDR) (Fig. 17).

Con respecto a las proteínas de resistencia, tres genes fueron involucrados. Dos de ellos genes inducibles por **SigB**, la proteína de resistencia a múltiples fármacos **bmrU**, una diacilglicerol quinasa putativa ($\text{Log}_2 \text{FC} = 4.0$), y la proteína de estrés general **yfhL** ($\text{Log}_2 \text{FC} = 2.3$) (Butcher y Helmann, 2006). El tercero fue el gen correspondiente a la penicilina acilasa **yxel** ($\text{Log}_2 \text{FC} = 3.1$). **Yxel** purificada de *B. subtilis* tiene actividad contra la penicilina V, pero es inhibida por las cefalosporinas (Rathinaswamy *et al.*, 2012). Los genes para la proteína de resistencia **yfhL** junto con el inhibidor putativo de división celular **yfhK** y la epóxido hidrolasa **yfhM** forman un operón, consistentemente sobre-expresado en las células co-cultivadas ($2.7 \geq \text{Log}_2 \text{FC} \geq 2.3$). En el caso particular de **yfhL**, se reportó como un parálogo de **sdpl**, cuyo producto confiere resistencia contra el péptido tóxico SdpC, producido por otras cepas de *Bacillus* (Butcher y Helmann, 2006).

Los otros genes sobre-expresados relacionados con la respuesta a los antibióticos corresponden al operón completo de **liaHGFSR** ($3.8 \geq \text{Log}_2 \text{FC} \geq 1.9$) (Fig. 17). El sistema de dos componentes **LiaR/S** participa en la respuesta al estrés causado por antibióticos, controlando la integridad y viabilidad de la membrana celular (Toimentseva y Sharipova, 2013). Su expresión es inducible por antibióticos activos contra bacterias Gram-positivas que inhiben la síntesis de la pared celular, como la bacitracina, nisina, y vancomicina, o por algunos disruptores de membrana (surfactantes químicos). Sin embargo, no es inducible por antibióticos β -lactámicos como la ampicilina, penicilina G y cefalosporina (Mascher *et al.*, 2004). Su transcripción también es inducida al inicio de la fase estacionaria, indirectamente por el regulador maestro de la esporulación Spo0A, que interactúa y reprime los efectos del regulador transcripcional AbrB, la proteína que controla negativamente el sistema LiaR/S (Jordan *et al.*, 2007). En cuanto a sus funciones, **LiaF** es el represor del sistema de dos componentes **LiaR/S** durante la fase exponencial o ausencia de antibióticos. Cuando la fuente de estrés está presente, la histidina cinasa **LiaS** detecta una señal (aún desconocida) y **LiaF** libera a **LiaS** de su restricción. Posteriormente, **LiaS** fosforila el regulador de respuesta de dos componentes **LiaR**, permitiendo así la sobre-expresión del operón **liaHGFSR** (Toimentseva y Sharipova, 2013). La función **LiaG** aún se desconoce. Por su parte, **LiaH** es similar a la *phage shock protein* PspA. Mutantes no productoras de PspA son más sensibles a la nisina, un antimicrobiano que provoca la permeabilización de membrana (Kingston *et al.*, 2013). La función específica de **LiaH** aún no se comprende completamente, pero se propuso su importancia en la translocación de proteínas, como una posible unidad accesoria a la translocasa argininas gemela TatAY-TatCY en *B. subtilis* (Bernal-Cabas *et al.*, 2020), implicada en la secreción de proteínas plegadas (Goosens *et al.*, 2014).

Como se comentó, genes que codifican para transportadores ABC de solutos compatibles, transportadores de la superfamilia de facilitadores principales (MFS), y transportadores de resistencia a múltiples fármacos (MDR) también fueron afectados por la interacción microbiana (Fig. 17). Con respecto a los primeros, el operón completo del transportador ABC para solutos compatibles **opuC(ABCD)** fue sobre-expresado por causa de la interacción ($3.3 \geq \text{Log}_2 \text{FC} \geq 2.5$) (Fig. 17). Los transportadores de solutos compatibles desempeñan un papel fundamental en la respuesta al estrés osmótico y también están relacionados con la respuesta a múltiples antibióticos (Cohen, 2014). Los antibióticos β -lactámicos inhiben las enzimas para la síntesis de peptidoglucano, afectando la homeostasis de la pared celular y eventualmente promoviendo la lisis celular por choque osmótico. La función de **opuC(ABCD)** es el transporte de solutos compatibles, como glicina-betaína, carnitina y colina, entre otros. En *B. subtilis* este transportador es relevante durante la respuesta al estrés osmótico (Hoffmann y Bremer, 2017). En otros modelos como *C. oleophila*, osmoprotectores como la trehalosa aumentan la resistencia al estrés oxidativo y su eficacia de biocontrol (Nie *et al.*, 2019).

Entre los DEGs correspondientes a transportadores tipo MFS sobre-expresados por la interacción, se encontraron los ya antes mencionados **csbC** y **ywtG** (ambos genes dependientes de **SigB**), el transportador de MFS **yubD** ($\text{Log}_2 \text{FC} = 1.3$), y el transportador tipo MFS putativo para el intercambio de múltiples fármacos **yuxJ** ($\text{Log}_2 \text{FC} = 1.7$). Los transportadores de MFS participan en el proceso de transporte de una amplia gama de metabolitos, incluido el co-transporte de azúcares/ H^+ y el intercambio antibiótico/ H^+ (Pao *et al.*, 1998). Según el análisis con eggNOG-Mapper, el gen del transportador MFS **yubD** es similar a un transportador de resistencia a antibióticos. Un análisis de secuencia posterior también indicó su similitud con el transportador MFS (subunidad de permeasa) presente en *Neisseria*, que participa en el transporte de múltiples antibióticos bacterianos (Du *et al.*, 2015). Se desconoce la función de **yuxJ** en *B. subtilis*, pero su secuencia de aminoácidos comparte similitud con la proteína de resistencia a múltiples fármacos MdtG (o YceE) de *E. coli*, la cual confiere resistencia al inhibidor de la pared celular fosfomicina (Nishino y Yamaguchi, 2001). Curiosamente, este gen se encuentra localizado junto a una PBP4 (glucosiltransferasa). Sólo dos genes asociados con la resistencia a los medicamentos fueron sub-expresados por la interacción. Estos fueron el transportador de expulsión de múltiples fármacos putativo **yvkA**, y la proteína de resistencia a cloranfenicol putativa **ywfA** (Fig. 17).

5.10 Análisis de los mecanismos de ATAQUE en *B. velezensis* 83 durante la interacción con *C. gloeosporioides*.

Se procedió a estudiar el mecanismo de antibiosis en *B. velezensis* 83 utilizando ensayos *in vitro* de dosis-respuesta de metabolitos antifúngicos purificados, y además estudiando la viabilidad del hongo y el nivel de expresión de los genes involucrados durante el co-cultivo. Además, se analizó el nivel de expresión de los genes involucrados en comparación a las proteínas más abundantes reportadas, para ponderar la carga transcripcional que involucra la antibiosis. A continuación, se describen los resultados mostrados en el orden mencionado.

5.10.1 Efecto de lipopéptidos producidos por *B. velezensis* 83 sobre la viabilidad de *C. gloeosporioides* bajo diferentes estados fisiológicos. En el trabajo previo, se determinó que *B. velezensis* 83 es capaz de sintetizar una mezcla de homólogos de bacilomicina D de cadenas de ácido graso variable (C_{14} - C_{16}), los cuales son capaces de inhibir tanto la germinación de conidios y el crecimiento del micelio de *C. gloeosporioides*. En el presente trabajo se dio seguimiento a dicho trabajo y se evaluó el efecto de la bacilomicina sobre la viabilidad de *C. gloeosporioides* bajo diferentes estadios del patógeno (conidios y micelio). Posteriormente, dichos tratamientos también funcionaron como control positivo al evaluar la respuesta del patógeno durante los ensayos de co-cultivo.

La figura 18 muestra los resultados de los ensayos *in vitro* en matraces agitados. En el caso de los conidios, las tinciones con IP mostraron que cuando estas son expuestas a bacilomicina D C_{14} previo a su germinación, ocurre un efecto dosis-respuesta, donde el porcentaje de germinación se relaciona con el número de esporas que presentan daño en la membrana celular. Los resultados mostraron que a concentraciones sub-inhedorias ($0 \leq [\text{Bacilomicina}] \leq 8 \mu\text{M}$), el porcentaje de germinación no se ve afectado y una vez que se alcanza una concentración crítica, se produce una respuesta dependiente a la concentración. Esta pérdida de viabilidad celular causada por la bacilomicina D, ha sido estudiada previamente mediante microscopía electrónica y de transmisión, y se relaciona con la alteración de la membrana plasmática, y la subsecuente la fuga del citoplasma y plasmólisis, además del daño causado a la pared celular (Gu *et al.*, 2017). Otros autores también mencionan que estos lipopéptidos provocan la acumulación de ROS y la inducción de apoptosis (Hajare *et al.*, 2013; Gu *et al.*, 2017).

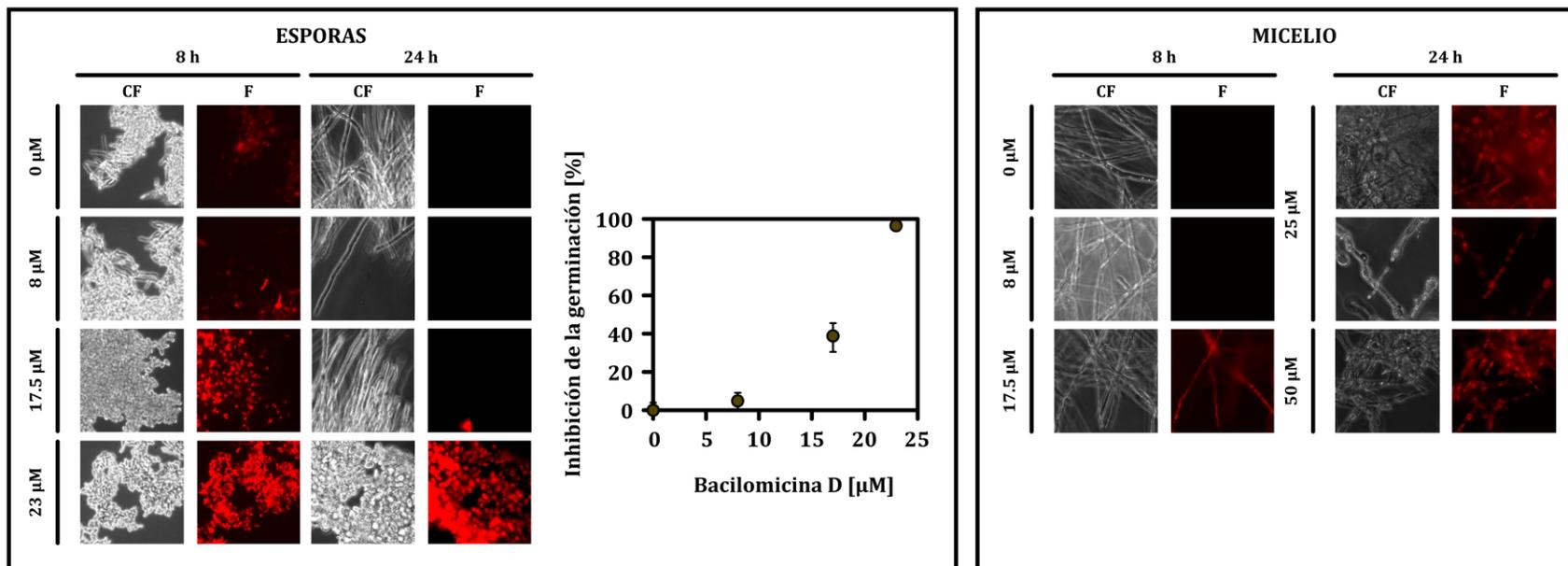


Figura 18. Efecto dosis-respuesta de la bacilomicina D sobre la integridad de membrana de *C. gloeosporioides*. CF y F corresponden a micrografías en campo claro y fluorescente, respectivamente. A la izquierda, ensayos de inhibición una concentración inicial de 1×10^5 conidios/mL expuestos a distintas concentraciones del lipopéptido. La concentración mínima inhibitoria 100 (MIC_{100}) es igual a 23 μM . 8 y 24 h corresponden a los tiempos de muestreo. A la derecha, ensayo realizado con micelio. Para ello, la adición del lipopéptido ocurrió una vez finalizado el tiempo de germinación del conidio (12 h).

En el caso de los conidios, es importante mencionar que a concentraciones inferiores a la concentración mínima inhibitoria 100 ($MIC_{100}=23 \mu M$), el micelio obtenido luego de 24 h de exposición al lipopéptido no presentó daño de membrana (Fig. 18). Esto sugiere que una cantidad significativa del antibiótico fue absorbida por las esporas y que sólo las esporas viables restantes germinaron, aunque también existe la posibilidad de la degradación del lipopéptido, como se ha sugerido en otros estudios de interacción (Vallet *et al.*, 2017). El caso opuesto ocurrió cuando el lipopéptido se agregó directamente al micelio, pues aunque la respuesta también fue dosis-dependiente, el daño de la membrana persiste con un tiempo de exposición similar (24 h) (Fig. 18). Estos resultados pueden explicar las diferencias en la sensibilidad a la bacilomicina D entre las esporas y el micelio, ya que el micelio generado a partir de las esporas germinadas es completamente funcional después del tratamiento, no siendo el caso del micelio tratado directamente. Asimismo, se detectaron dilataciones anormales en las hifas de *C. gloeosporioides* después de la adición de una concentración inhibitoria de bacilomicina D al micelio (Fig. 18) similares a las presentes en *C. gloeosporioides* durante el co-cultivo con *B. velezensis* 83.

5.10.2 Producción de lipopéptidos y efecto de la interacción sobre la viabilidad de *C. gloeosporioides*. Una vez que se corroboró que la bacilomicina D ocasiona daños en membrana de conidios y micelio de *C. gloeosporioides*, se procedió a analizar la relación entre la concentración de lipopéptidos detectada en sobrenadantes de medio del co-cultivo y la viabilidad del micelio de *C. gloeosporioides* observada durante la interacción. En cultivo axénico, la surfactina y la bacilomicina D alcanzaron al momento del agotamiento de la glucosa, 34 y 12 mg/L, respectivamente. Sin embargo, en co-cultivo, su concentración disminuye significativamente (0.3 y 1.5 mg/L, respectivamente). Esto representa una reducción del hasta en un 99% y 87 %, respectivamente (Fig. 4F). Posibles factores para esta reducción podrían ser los siguientes:

A) Absorción a la biomasa fúngica y/o degradación enzimática. La inserción y subsecuente permeabilización de membranas es el mecanismo de acción característico de estos lipopéptidos cíclicos (Jacques, 2011; Luna-Bulbarela *et al.*, 2018). Debido a su alta afinidad hacia membranas biológicas, sería de esperarse que durante la interacción ocurra una absorción continua del metabolito, impidiendo su acumulación. Asimismo, se han identificado enzimas en otros hongos capaces de hidrolizar la surfactina como un mecanismo de defensa (Hoeffler *et al.*, 2012; Vallet *et al.*, 2017). El fenómeno de disminución en la producción de lipopéptidos ha sido reportado tanto en interacciones directas (cultivo sumergido) como indirectas (cultivo sólido), como sucede en la confrontación *in vitro* entre *B. subtilis* y *Macrophomina phaseolina* (Benoit *et al.*, 2015; Torres *et al.*, 2016).

B) Sub-expresión de las sintasas y menor productividad específica. Dado que el hongo también consume nutrientes durante la interacción, no se podría esperar la misma concentración de lipopéptidos a menos que aumente la productividad específica del lipopéptido por parte de la bacteria. Durante la interacción, se observó tanto una regulación negativa de las sintasas correspondientes (***srfaAD*** y ***bymCBAD***) como una menor productividad específica de lipopéptidos en *B. velezensis* 83 (Fig. 4F y 19). Sin embargo, los ensayos con yoduro de propidio, indicaron que la viabilidad del hongo se afectó progresivamente durante la interacción incluso antes de la limitación por glucosa, sugiriendo que si se produjeron metabolitos antimicrobianos capaces de causar daños a nivel de membrana.

Con respecto a la surfactina, pruebas *in vitro* demostraron que concentraciones de hasta 50 μM (~50 mg/L) de una mezcla de homólogos C₁₃-C₁₅ no causan ningún efecto negativo sobre la germinación y/o el crecimiento de *C. gloeosporioides* 09 y tampoco causan efecto de permeabilización de membrana (datos no mostrados), por lo que queda descartada como la posible causa. La permeabilización de la membrana observada en el hongo (Fig. 19) podría deberse al efecto conjunto de la bacilomicina D y otros metabolitos antifúngicos como la fengicina, cuyo mecanismo de acción es similar.

C) Disponibilidad reducida de precursores. La inducción de la producción de metabolitos puede no estar relacionada directamente con la sobre-expresión de las enzimas responsables, sino más bien con él la remodelación del metabolismo que facilite la disponibilidad de precursores y energía necesaria (Reffatti *et al.*, 2014). En este contexto, un gen accesorio implicado en la síntesis de surfactina, la acil-CoA sintetasa ***lcfA***, fue sub-expresada durante la interacción microbiana (Log₂ FC= -3.6). Esta enzima participa en la síntesis de los ácidos grasos β -hidroxilados, precursores necesarios para la síntesis de lipopéptidos. *B. subtilis* OKB105 Δ *lcfA* muestra una disminución significativa (de al menos 50% menos) en la cantidad de surfactina producida (Kraas *et al.*, 2010), lo cual resalta su importancia de este gen.

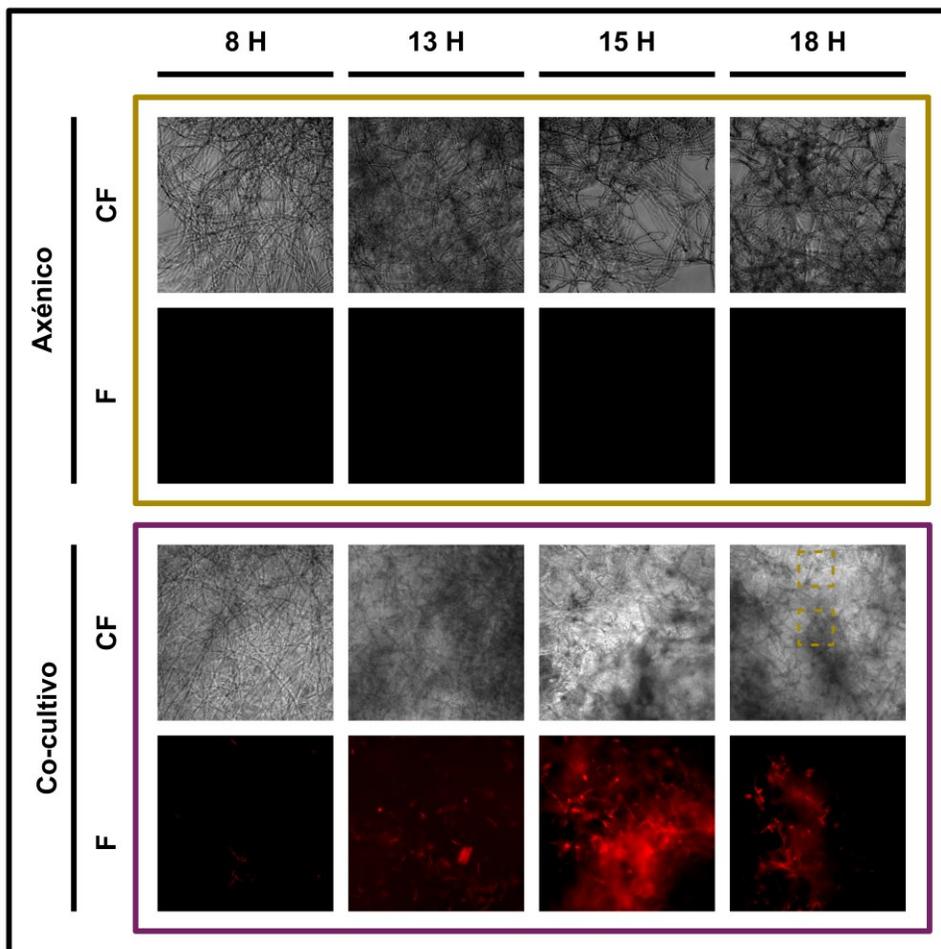


Figura 19. Efecto del co-cultivo sobre la integridad de membrana en *C. gloeosporioides*. CF y F corresponden a micrografías en contraste de fases y fluorescencia, respectivamente. Los ensayos muestran daño en membrana únicamente en células del co-cultivo aún antes de la limitación por glucosa (≈ 18 h).

5.10.3 Dinámica transcripcional de los genes relacionados a la antibiosis. Como se discutió anteriormente, la concentración de lipopéptidos detectada en el sobrenadante del co-cultivo puede estar influenciada por diversos factores, incluido el nivel de expresión de los genes correspondientes y la absorción constante del metabolito hacia la biomasa del hongo. La concentración final observada de los metabolitos resulta difícil de interpretar dadas las razones expuestas. Según el genoma de *B. velezensis* 83, más allá de estos lipopéptidos cíclicos, esta cepa es capaz de producir una amplia variedad de moléculas con propiedades antimicrobianas, los cuales podrían funcionar como mecanismos de antibiosis contra *C. gloeosporioides*. Para esclarecer cuáles de estos pudieran ser preferencialmente sintetizados durante la interacción con *C. gloeosporioides*, se estudió su dinámica transcripcional. Los resultados del análisis de expresión diferencial para los genes biosintéticos se muestran en la figura 20. Aquí, se indican simultáneamente los efectos del tiempo y la interacción. A través del tiempo, e independientemente de la interacción microbiana, la bacteria sobre-expresa la mayoría de los genes biosintéticos, sugiriendo la producción de una mezcla compleja de antibióticos. Los operones *bmyCBAD*, *fenABCDE* y *bacABCDE* que codifican para las sintasas de péptidos no ribosomales correspondientes para la producción de bacilomicina D, fengicina y bacilisina fueron consistentemente sobre-expresados debido al efecto del tiempo de incubación. Asimismo, los operones *dfnMLKJIHGFEDCBXYA* y *baeBCDE-acpK-bacGHIJLMNR* que codifican las sintasas de policétidos para la producción de difcidina y bacilaeno, respectivamente, y el operón *acnFEDCAB* para la biosíntesis de amiloliclina,

también se sobre-expresaron por el efecto del tiempo. Solo tres de los cinco genes necesarios para la síntesis de bacililactina (*dhbFBCEA*), fueron sobre-expresados. La sobre-expresión simultánea de la mayoría de los genes para antibiosis durante el crecimiento exponencial, tanto en axénico como en co-cultivo, significa que la expresión de estos genes está mayoritariamente asociada con el crecimiento (Fig. 20).

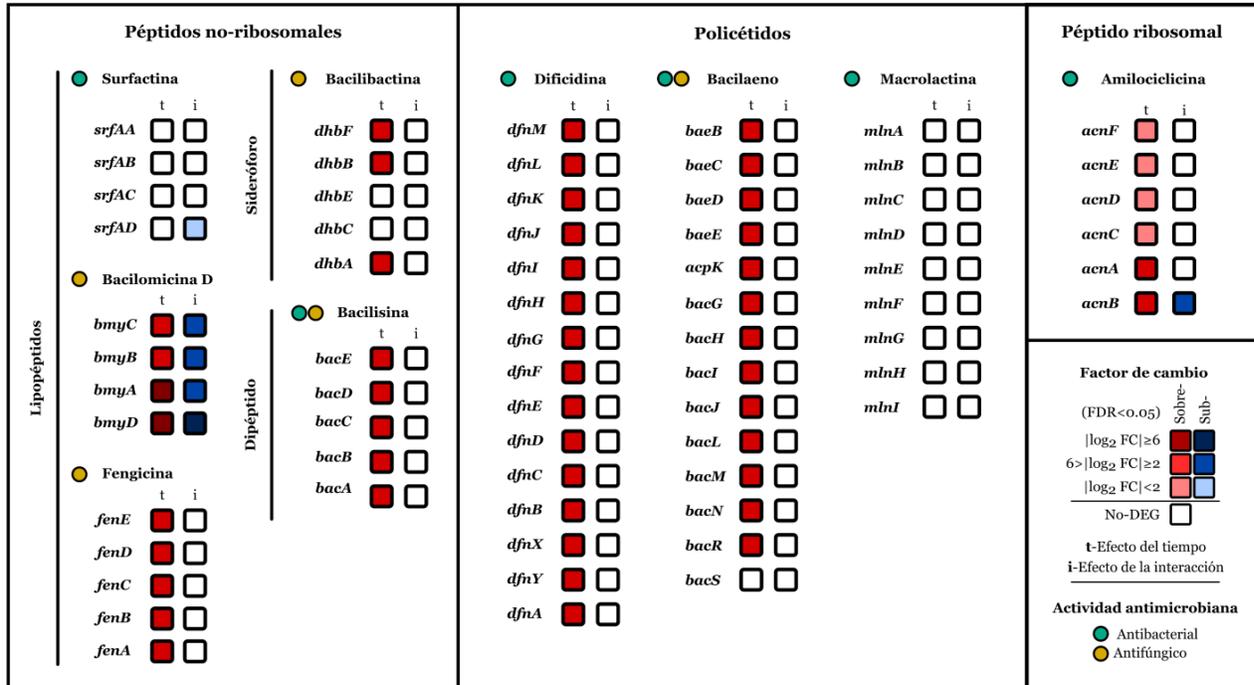


Figura 20. Dinámica transcripcional de los genes para la biosíntesis de antibióticos en *B. velezensis* 83. Los resultados del análisis de expresión diferencial en función de los factores analizados, tiempo (t) e interacción (i) se indican en los cuadros adjuntos a cada gen. La escala de colores de los cuadros indica el \log_2 del factor de cambio, sean rojos, azules y blancos para genes sobre-, sub-expresados y sin cambio significativo de expresión en relación con el control, respectivamente. La actividad antimicrobiana reportada de los productos correspondientes se indica en círculos.

Por otro lado, la interacción microbiana no tuvo efecto sobre el nivel de transcripción de la mayoría de estos genes. La sub-expresión de *srfAD*, todo el operón *bymCBAD* y *acnB* fueron las únicas excepciones. La disminución simultánea en la producción de ambos lipopéptidos podría esperarse ya que los operones correspondientes presentan elementos de regulación transcripcional compartidos. El operón para la síntesis de surfactina *srfAABCD* (surfactina) está regulado directamente a través de los reguladores de *quorum-sensing* ComA-K (Jacques, 2011), mientras que el operón *bmyABCD* (bacilomicina D) está co-regulado positiva, directa e indirectamente por el sistema DegU/S y ComA, respectivamente. (Cairns *et al.*, 2014, Ohsawa *et al.*, 2014). La señalización del fenómeno observado durante el co-cultivo aún no está clara, pero no es un caso aislado. En un reporte anterior, se observó que durante la interacción entre *B. subtilis* y *A. niger*, ambos microorganismos disminuyen la transcripción de genes relacionados con la síntesis de metabolitos antimicrobianos (incluida la surfactina, Benoit *et al.*, 2015). Además se ha informado que, para otras interacciones entre bacterias y hongos, la interacción puede alterar el *quorum sensing* y la formación de biopelículas en bacterias (MacAlpine *et al.*, 2022). Por ejemplo, *Candida albicans* puede afectar negativamente la producción de fenazina en *P. aeruginosa* mediante la obstrucción del *quorum sensing* (MacAlpine *et al.*, 2022).

Es importante resaltar la posible relación entre la síntesis de compuestos antimicrobianos, el balance energético y la heterogeneidad fenotípica en *Bacillus*. Como se mencionó anteriormente, el operón *bmyCBAD* fue el único operón

consistentemente sub-expresado en las células co-cultivadas de *B. velezensis* 83 y dado que su regulación transcripcional depende de señales de *quorum sensing* y del regulador DegU, se podría intuir que la heterogeneidad fenotípica en el co-cultivo está afectada. Enlazando con lo anterior y de acuerdo con la literatura, la sub-expresión de la tioesterasa *srfAD* para la síntesis de surfactina en células co-cultivadas también estaría relacionada directamente con la respuesta general al estrés y el equilibrio energético. Esto es porque la transcripción del operón *srfAABCD* es regulada negativamente a través del regulador transcripcional Spx (Zhu y Stülke, 2018). Este regulador (tanto positivo como negativo) juega un papel importante durante la activación de la respuesta al estrés oxidativo específico y su transcripción depende parcialmente de SigB (Huerta-Cepas *et al.*, 2017, Zhu y Stülke, 2018; Rojas-Tapias y Helmann, 2019). Es a través de esta regulación negativa de la síntesis de surfactina que Spx podría participar negativamente en la regulación de la diferenciación celular. Además, la sub-expresión simultánea de *bmyCBAD* y *srfAD* observada en las células co-cultivadas de *B. velezensis* 83, podría también ser un efecto secundario de la activación de los sistemas de defensa y la inherente disminución de la velocidad de crecimiento, lo cual en sí mismo afecta el *quorum sensing*.

Aun considerando las excepciones antes mencionadas, la variedad de estructuras de compuestos antimicrobianos (lipopéptidos antifúngicos y policétidos antibacterianos) y mecanismos de acción se mantuvo durante la interacción. Prueba de ello es que se detectó daño significativo en la membrana del hongo durante el co-cultivo (Fig. 19), dando a entender que la mezcla de antibióticos resultante fue efectiva. A diferencia del operón ***bymCBAD***, la transcripción de los genes responsables de la síntesis de fengicina y bacilicina, otros metabolitos antifúngicos, no se vio afectada por el efecto de la interacción microbiana. Como sugiere otro trabajo, la presencia de fengicina durante el co-cultivo probablemente explica el efecto observado sobre la membrana del hongo (Villa-Rodríguez *et al.*, 2021). Hasta ahora, las pruebas *in vitro* con bacilomicina D purificada demostraron que este lipopéptido es efectivo para inhibir al patógeno vía permeabilización de membrana. De hecho, mutantes no productores de lipopéptidos reportadas en otros trabajos tienen una capacidad de biocontrol *in vitro* menor e incluso nula, lo que resalta su importancia (Liu *et al.*, 2011; Gu *et al.*, 2017). Por ello, resultó interesante observar que el microorganismo prescindiera casi exclusivamente de este lipopéptido durante la interacción. Otra posible explicación se aborda a continuación.

5.10.4 Análisis de la carga transcripcional de los genes requeridos para la antibiosis en *B. velezensis* 83. En *B. velezensis* 83, los genes dedicados a la producción de compuestos antimicrobianos ocupan alrededor del 8.2% de su genoma. Por esta razón es que resulta sorpresivo la sobre-expresión simultánea de la mayoría de los genes biosintéticos independientemente de la presencia del patógeno, considerando la carga transcripcional y energética que conlleva la producción de antibióticos. Las policétidos sintetas (PKS) y las sintetas de péptidos no ribosomales (NRPS) son las proteínas más grandes conocidas en bacterias (Reva y Tümmeler, 2008). El tamaño promedio de las proteínas en bacterias es de 311 residuos (Kozłowski, 2017) mientras que las sintetas de péptidos no ribosomales encargadas de la producción de bacilomicina D (***BymCBAD***) constituyen un complejo multienzimático que en conjunto son más de 12,000 aminoácidos (1,300 kDa) (Moyné *et al.*, 2004), las cuales están codificadas en una larga secuencia de aproximadamente 36.9 kb (Tabla 1). Adicionalmente, ATPs y precursores (aminoácidos y ácidos grasos) son necesarios para la biosíntesis del metabolito. Por su parte, las secuencias codificantes para las PKS encargadas de la síntesis de difidicina y el bacilaeno cuentan con secuencias aún más largas, de 69.1 y 71.7 kb. De hecho, los dos genes más largos en bacterias se conocen en *Chlorobium chlorochromatii* que codifican para proteínas de 36 806 and 20 647 amino ácidos y solo son sobrepasadas por la proteína de músculo humano titina (Reva y Tümmeler, 2008, Krüger y Linke, 2011). Estas métricas nos advierten de la importancia de la antibiosis como parte fundamental de la estrategia de esta bacteria para mantener su población, aun cuando estas impliquen una inversión de recursos significativa. Esto hizo cuestionarnos, bajo las condiciones experimentales utilizadas ¿cómo se compara el nivel de expresión de estos genes con respecto a otros genes del metabolismo?

En la figura 21 se muestra el nivel de expresión promedio observado a las 13 h del cultivo axénico. Aquí, para cada metabolito antimicrobiano, los datos representan el promedio en TPM (transcritos por millón) de la expresión de todos los genes que comprenden su biosíntesis. Cuando analizamos la expresión de los genes involucrados, observamos que no todos están en el mismo orden de magnitud. Los genes responsables de la síntesis de bacilisina (***bacABCDE***), bacilomicina D (***bmyCBAD***), bacilaeno (***baeBCDE-acpK-bacGHIJLMNR***), dificidadina (***dfnMLKJIHGFEDCBXYA***), surfactina (***srfAABCD***) y fengicina (***fenABCDE***) resaltan como los más expresados ($55 < \text{TPM} < 329$) (Fig. 21 A-B). Al elaborar un histograma del nivel de expresión de todas las secuencias codificantes, podemos categorizar el transcriptoma obtenido en tres niveles: bajo ($0 \leq \text{TPM} \leq 10$, 24%), intermedio ($10 < \text{TPM} \leq 500$, 67%) y alto ($500 < \text{TPM} < \infty$, 8%) (Fig. 21C). Tomando esto en consideración, el nivel de expresión de estos genes biosintéticos se encuentra en un nivel intermedio, aunque por debajo del promedio (260 TPM) de todo el transcriptoma, siendo ***bacABCDE*** y ***acnA*** las únicas excepciones (330 TPM). También se observa que no existe una preferencia en *B. velezensis* 83 hacia la expresión de las policétidos sintetasas o las sintetasas de péptidos no ribosomales. Esto probablemente se debe a que algunos de los genes biosintéticos presentan elementos de regulación en común. Por ejemplo, el regulador maestro de la esporulación Spo0A es esencial para la biosíntesis de metabolitos secundarios en *B. amyloliquefaciens* (*B. velezensis*), incluyendo lipopéptidos y dificidadina (Liu *et al.*, 2023). La transcripción de ***dfnMLKJIHGFEDCBXYA*** concuerda con otros fenotipos observados durante el cultivo axénico que son dependientes de Spo0A-P, como la producción de PGA.

Los genes correspondientes a la síntesis de macrolactina (***mlnABCDEFGHI***) y la bacilibactina (***dhbFBECA***) presentaron un nivel de expresión basal que es hasta dos órdenes de magnitud inferior con respecto a los anteriores ($5.5 < \text{TPM} < 8.5$). En *B. amyloliquefaciens* (hoy *B. velezensis*) la síntesis de bacilibactina es inhibida a través del regulador de la homeostasis del hierro Fur, y solo se favorece bajo condiciones de limitación del metal (Liu *et al.*, 2023). Dado que el medio de cultivo está suplementado con $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, una baja expresión de ***dhbFBECA*** era de esperarse. En el caso de la macrolactina, se desconoce su regulación transcripcional. Como un caso particular, se indica por separado la expresión del *cluster* biosintético de la amilociclicina, porque a diferencia de los otros, el producto final es un péptido antimicrobiano de origen ribosomal, donde el gen codificante del pre-péptido es fuertemente expresado (***acnA***, 5166 TPM). Aunque, si solo se consideran los genes accesorios (***acnFEDC-B***), su nivel de expresión es comparable a las PKS y NRPS más expresadas. Asimismo, puede observarse que no existe una correlación entre el tamaño del *cluster* biosintético (pb) y su nivel de expresión (TPM) (Fig. 21D). Estos más bien se diferencian en la cantidad de ARN necesario para la transcripción, derivado del gran tamaño de las secuencias que comprenden. Esta inversión en ARN puede ser inclusive mayor que la requerida para la transcripción de los genes más expresados o los correspondientes a las proteínas más abundantes en *Bacillus* (Fig. 21E-F).

Como era de esperarse, el top 3 de los genes más expresados durante el cultivo axénico incluye proteínas ribosomales. El top 3 de los genes más expresados y el tamaño de sus productos es: la proteína ribosomal 30S-S21 *rpsU* (57 residuos, 97,452 TPM), la proteína ribosomal 50S-L36 *rpmJ* (37 residuos, 22,214 TPM), y la chaperona de ARN/HSP *CspD* (66 residuos, 21,660 TPM). Solo el 2 % de todas las secuencias codificantes en los transcriptomas analizados presentaron este alto nivel de expresión ($\text{TPM} > 2000$) (Fig. 21C). Con esos niveles de expresión y considerando el tamaño de sus secuencias, las pares de bases por millón de secuencias necesarias ($\text{pb}/\text{M} = \text{TPM} \times \text{pb}/\text{transcrito}$) son: 16.6×10^6 (*rpsU*), 2.4×10^6 (*rpmJ*) y 4.2×10^6 (*CspD*). En comparación, la cantidad de ARN invertido por la célula para la sintasa de bacilomicina (5.0×10^6 pb/M) es aproximadamente 0.3x del gen más expresado (***bmyCBAD*** vs *rpsU*), y es igual tanto al segundo y tercer gen más expresado (*rpmJ* y *CspD*). Inclusive, el ARN invertido en ***bmyCBAD*** se compara con el necesario para la transcripción del factor de elongación *tufA*, cuya proteína resultante es la reportada como más la abundante en *Bacillus*, y supera lo requerido para genes importantes del metabolismo central como la glucosa 6P isomerasa *pgi* y la citrato sintasa *citZ* (Fig. 21E-F). Los resultados de esta comparación también se aplican para otros *clusters* biosintéticos como en el caso de ***dfnMLKJIHGFEDCBXYA***.

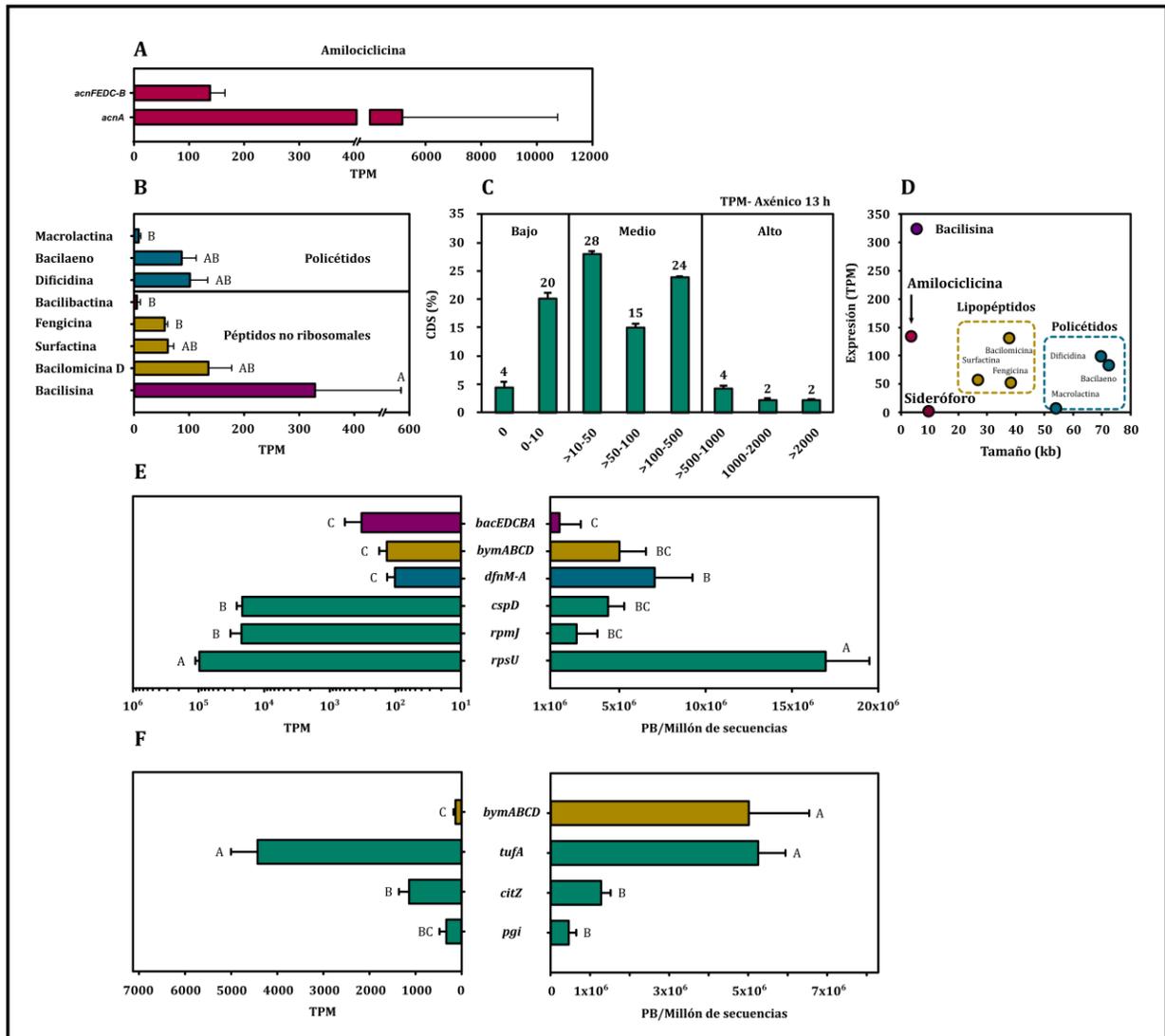


Figura 21. Carga transcripcional de los genes de biosíntesis de antibióticos en *B. velezensis* 83. **A** y **B**. Niveles de expresión por *cluster* biosintético obtenidos a partir de las réplicas de transcriptomas de células cultivadas en modo axénico y clasificados por tipo de metabolito (bacteriocina, policétidos y péptidos no ribosomales). Los valores muestran el promedio del nivel de expresión en transcritos por millón (TPM) considerando todos los genes del *cluster* biosintético, con la excepción del precursor de la amilicicicina (*acnA*). **C**. Pseudo-histograma del nivel de expresión en TPM involucrando todas las secuencias codificantes. Las barras de error indican la desviación estándar entre réplicas del cultivo axénico. **D**. Gráfico de dispersión para describir en nivel de expresión de los *cluster* biosintéticos (TPM) en función del tamaño total de la secuencia codificante (pb). **E**. Comparación del nivel de expresión de los *cluster* biosintéticos en términos de TPM y PB/millón de secuencias con respecto a los tres genes más expresados en el cultivo axénico: proteína ribosomal 30S-S21 *rpsU* (Top 1), la proteína ribosomal 50S-L36 *rpmJ* (Top 2) y la chaperona de ARN/HSP *CspD* (Top 3). **F**. Comparación del nivel de expresión del *cluster* de biosíntesis de bacilomicina D en términos de TPM y PB/millón de secuencias en comparación a tres genes correspondientes proteínas del metabolismo central y dentro del top 100 de las más abundantes en *B. subtilis*: factor de elongación *tufA*, la glucosa 6P isomerasa *pgi* y la citrato sintasa *citZ*. Niveles de expresión descritos con letras distintas presentan diferencias estadísticas ($p < 0.05$).

5.11 Discusión final. Este trabajo constituye hasta donde alcanza nuestro conocimiento, la primera caracterización del fenotipo molecular a nivel de transcriptoma de un agente de control biológico (ACB) (*B. velezensis* 83) bajo estrés biótico causado por un fitopatógeno (HF) (*C. gloeosporioides*). En comparación a trabajos previos donde se emplean sistemas de interacción indirecta en cultivo sólido, el uso de un sistema de co-cultivos en biorreactor agitado permitió establecer un escenario de interacción directa controlado (temperatura, pH y oxigenación) que propicia la comunicación celular entre ambos microorganismos durante un periodo de no limitación nutricional sin interferencia de otros factores (bióticos y abióticos). Esta estrategia permitió evaluar de forma independiente los cambios transcripcionales debido al efecto del tiempo y la interacción. Asimismo, los resultados obtenidos por herramientas bioinformáticas y los diagramas de rutas metabólicas fueron consistentes con el fenotipo observado en las células co-cultivadas de *B. velezensis* 83. Los datos recolectados suministraron información para una mayor comprensión de la fisiología del microorganismo en términos de estrategias de defensa y ataque.

En cuanto a los mecanismos de defensa, los datos sugieren que *B. velezensis* 83 hace una inversión constante y significativa de recursos para activar la respuesta general al estrés regulada por *sigB* durante su interacción con el hongo. Actualmente, el estudio del regulón de *sigB* cobra relevancia debido a su importante papel en las interacciones ACB-HF, tanto para mecanismos de defensa como ataque. SigB permite la rápida adaptación de las bacterias a múltiples fuentes de estrés (biótico o abiótico) y representa una ruta de defensa alternativa a la esporulación en *Bacillus* (Rodríguez-Ayala *et al.*, 2020). Según la literatura, la transcripción de *sigB* depende de dos tipos de señales de activación del estresosoma: 1) estrés energético como ocurre en la fase estacionaria (vía RsbP) o 2) estrés ambiental (vías RsbU y RsbV (Hecker *et al.*, 2007; Marles-Wright *et al.*, 2008; Marles-Wright y Lewis, 2008; Zuber, 2009). Desafortunadamente, las funciones de las vías RsbU/RsbV en ambientes naturales o interacciones microbianas todavía están poco exploradas. Hasta donde se conoce, sólo existe un informe previo en el que se reportó la activación de SigB en *Bacillus* causada por un hongo fitopatógeno. La interacción de *Bacillus subtilis* NCIB3610 con micelio activo/desactivado o sobrenadantes de cultivos de *Fusarium verticillioides* desencadena la inducción de SigB por activación dependiente de RsbP a través de una vía de activación de estrés energético (Bartolini *et al.*, 2019). Bajo las condiciones experimentales analizadas (periodo sin limitación nutricional), los factores de estrés deberían ser de naturaleza biótica (por ejemplo, antibióticos producidos por *C. gloeosporioides*). En cualquier caso, la respuesta general al estrés debe ser muy importante para las interacciones ACB-HF, ya que la mutantes de *Bacillus* no productoras de SigB presentan menor producción de surfactina y actividad antifúngica *in vitro* (Bartolini *et al.*, 2019).

Sin embargo, mantener activa la respuesta general al estrés tiene un impacto en la economía celular. Para prevenir los efectos negativos de los factores de estrés, la célula debe incrementar sus recursos de mantenimiento, por lo que la menor velocidad de crecimiento observada en células co-cultivadas de *B. velezensis* 83 podría ser resultado de una redistribución de la energía y el carbono a favor de la activación de los mecanismos de defensa y la viabilidad celular. Como se indicó, la bacteria durante la interacción acciona mecanismos de defensa para prevenir y aliviar los efectos negativos causados por las especies reactivas de oxígeno (ROS), como el desequilibrio del estado redox, el daño del ADN, la peroxidación lipídica, las modificaciones postraduccionales desfavorables, la agregación y/o el mal plegamiento de proteínas (Mullarky y Cantley, 2015; Zuber, 2019). La activación de estos mecanismos de defensa en las células co-cultivadas de *B. velezensis* 83 podría atender a la presencia de factores de estrés. Estos podrían ser subproductos de la respiración y el metabolismo (metilglicoxal) o de naturaleza exógena, como compuestos tóxicos que perturban la homeostasis del estado redox (p. ej., quinonas), péptidos antimicrobianos que alteran la membrana (polimixina) y otros antibióticos bactericidas provenientes de competidores (ampicilina, kanamicina) (Zuber, 2009; Kim *et al.*, 2019). La sobre-expresión simultánea de genes relacionados con la resistencia a los antibióticos y la activación de la respuesta general al estrés y la respuesta al estrés oxidativo y electrófilo (GSR/OESR) observada en *B. velezensis* 83 durante la interacción microbiana sugiere que ambos sistemas comparten elementos de señalización. Reforzando esta idea, en otras bacterias Gram positivas como *Enterococcus faecalis*, la activación de la resistencia

contra el estrés oxidativo mediante el uso de concentraciones subletales de peróxido de hidrógeno mejora la resistencia contra antibióticos como las cefalosporinas (Djorić y Kristich, 2015).

Con respecto a los mecanismos de ataque, se reportó previamente que durante la interacción entre *B. subtilis* y *Magnaporthe grisea*, el fitopatógeno desencadena la producción de enzimas hidrolíticas en la bacteria, como la endo-1,4- β -glucanasa (Zhang *et al.*, 2014). Sin embargo, en contraposición nuestros resultados indican que el metabolismo de la quitina y los β -glucanos (componentes de la pared celular de los hongos) y otros polisacáridos son sub-expresados en células co-cultivadas de *B. velezensis* 83 durante un escenario de no limitación por glucosa. Esto puede estar relacionado al hecho de que la mayoría de los DEGs relacionados con la adquisición de fuentes alternativas de carbono que fueron sub-expresados son controlados por el represor catabólico de carbono CcpA (Swint-Kruse y Matthews, 2009). Todo esto nos lleva a pensar que la producción de enzimas líticas en *Bacillus* spp. como mecanismo de control biológico, es más bien un ejemplo de antibiosis accidental, presente sólo bajo condiciones nutricionales limitantes (como el reportado por Zhang *et al.*, 2014), ya que bajo condiciones de no-limitación nutricional la bacteria no sobre-expresa las enzimas aún en contacto directo con el hongo. Sin embargo, bajo condiciones naturales donde las fuentes de carbono son limitantes y complejas (como en la filósfera), los genes que codifican para las enzimas hidrolíticas podrían ser relevantes para la competencia de la bacteria y su acción de control biológico. La evidencia sugiere que el principal mecanismo de biocontrol de *B. velezensis* 83 es la producción de antibióticos. Con respecto a los lipopéptidos antifúngicos y policétidos antibacterianos, la dinámica de expresión de los genes implicados en su síntesis se correlaciona casi exclusivamente con el crecimiento bacteriano, y a excepción de la bacilomicina D es independiente de la interacción microbiana. Contextualizando exclusivamente al escenario de interacción evaluado, la estrategia utilizada por la bacteria consistiría en remodelar su metabolismo, prescindiendo de un metabolito con un mecanismo de acción redundante (bacilomicina D), cuya producción es energéticamente demandante, de modo que se mantenga un equilibrio energético que permita simultáneamente ejercer antibiosis y contar con protección contra factores de estrés (aumentando la energía dedicada al mantenimiento). La transcripción de los genes responsables de la síntesis de fengicina y bacilisina, otros metabolitos antifúngicos se mantuvieron durante la interacción microbiana, sugiriendo que estos compuestos podrían ser los causantes del daño observado en el hongo durante la interacción. De hecho, numerosas cepas de *B. velezensis* (anteriormente denominadas *B. amyloliquefaciens*, Dunlap, 2019), incluida la cepa modelo *B. velezensis* FZB42, exhiben actividad de control biológico contra un amplio espectro de hongos fitopatógenos, como *Monilinia fructicola* (Liu *et al.*, 2011), *Fusarium graminearum* (Gu *et al.*, 2017), *Pythium ultimum* (Kim *et al.*, 2022) a través de lipopéptidos antifúngicos que pertenecen a las familias de la iturina (bacilomicina D) y/o fengicina.

Antes de proseguir a la sección de conclusiones, es importante resaltar la importancia que tiene comprender las interacciones entre agentes de control biológico y hongos fitopatógenos en el contexto actual de la creciente demanda de alimentos. El uso de agentes de control biológico representa actualmente una herramienta útil para el control de plagas, y además tiene el potencial para solventar los efectos adversos que conlleva el uso de pesticidas químicos. Estudiar la ecología de estos microorganismos y conocer sus respuestas a estímulos bióticos, abre la posibilidad de plantear estrategias más racionales de biocontrol para así disminuir la probabilidad del desarrollo de resistencias a corto plazo. Tal como sugieren las hipótesis de co-evolución, como el de la Reina Roja (Nair *et al.* 2019), los microorganismos que entablan relaciones interespecíficas de amensalismo experimentan una constante carrera armamentista donde cambios constantes en su genoma son necesarios para contrarrestar los mecanismos de defensa y/o ataque de sus competidores, evadiendo así la extinción. El amplio regulón de SigB, que comprende a más de 200 genes, muchos de estos desconocidos y los numerosos *cluster* biosintéticos para la síntesis de antibióticos en *Bacillus*, son probablemente el resultado de esta constante evolución de las especies de *Bacillus* para mantenerse en el ecosistema.

VI. CONCLUSIONES

Bajo las condiciones de interacción estudiadas, la presencia de *Colletotrichum gloeosporioides* modifica el perfil de crecimiento y expresión en *Bacillus velezensis*. Esta respuesta involucra cambios en el nivel de expresión de alrededor del 10 % de sus secuencias codificantes y consiste en el desarrollo de un fenotipo especializado en la defensa contra múltiples factores de estrés, aún sin existir una limitación nutricional. Tal como sugieren los transcriptomas de células co-cultivadas de *Bacillus velezensis* 83, la activación de la respuesta al estrés es energéticamente demandante, lo que hace necesario una redistribución de recursos y energía, en favor de la activación de mecanismos de defensa. Lo anterior resalta la importancia del regulón de SigB en *Bacillus* para atenuar los efectos negativos de factores bióticos causantes de estrés, siendo un factor determinante para preservar la viabilidad de su población a largo plazo. Con respecto a los mecanismos de ataque, la sobre-expresión de los genes para antibiosis está únicamente asociada al crecimiento bacteriano, independientemente de la presencia o ausencia del hongo. La interacción microbiana no afecta el perfil de expresión de la mayoría de los genes involucrados en la biosíntesis de compuestos antimicrobianos. De hecho, la diversidad de compuestos antimicrobianos en términos de estructura química y actividad se mantiene. Esta habilidad de *B. velezensis* para producir múltiples compuestos antimicrobianos aún en ausencia de competidores, es una de las bases para su control biológico. Dado que las formulaciones para control biológico a base de *Bacillus* son usualmente elaboradas en base a esporas, se deben considerar algunas advertencias estratégicas. Las inoculaciones preventivas de las esporas de *B. velezensis* en las plantas es un factor importante para el éxito de las estrategias de control biológico debido al tiempo necesario para la germinación y el crecimiento de la bacteria. Considerando que la infección por *Colletotrichum* es quiescente, un establecimiento preventivo de la bacteria es esencial por que la dinámica de expresión de los genes relacionados a la antibiosis en *B. velezensis* está asociada al crecimiento bacteriano. Dibujando un paralelismo (Fig. 22) con la información generada, el comportamiento de *B. velezensis* 83 durante su interacción con hongos fitopatógenos se asemeja a la estrategia utilizada por una formación de falange griega: al sacrificar su velocidad de crecimiento y su versatilidad metabólica, los recursos pueden redistribuirse hacia la defensa (fenotipo resistente al estrés) mientras se mantiene el ataque (antibiosis).

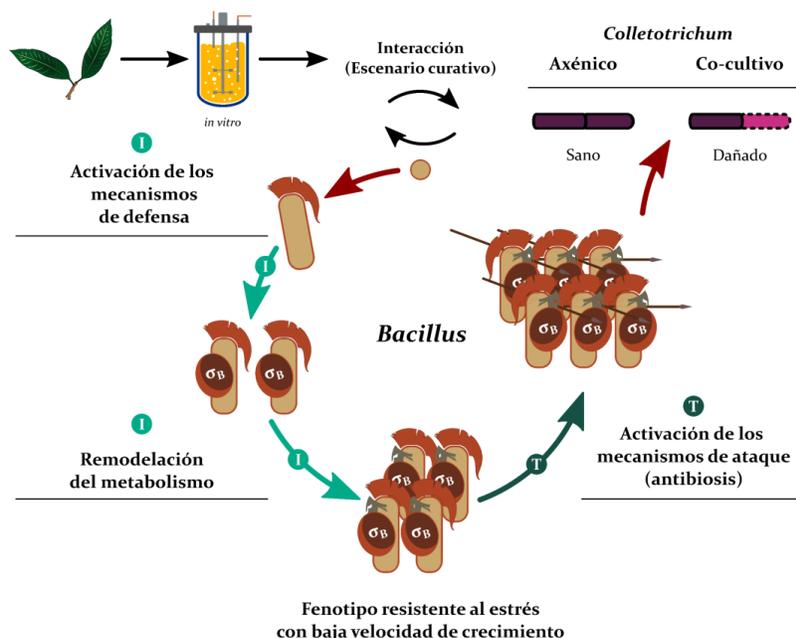


Figura 22. Tesis del paralelismo entre la estrategia simultánea de ataque y defensa en células co-cultivadas de *B. velezensis* 83 y la estrategia de falange griega.

VII. REFLEXIONES FINALES, ALCANCES DE LA INVESTIGACIÓN Y PERSPECTIVAS.

A continuación se exponen las reflexiones finales del trabajo mientras se proponen hipótesis para trabajos futuros.

Mecanismos de defensa y señalización del estrés en *Bacillus* spp. Como se mencionó en este trabajo, se desconocen los factores y mensajeros implicados en la ruta de señalización de la respuesta general al estrés, mediada por el estresosoma y el factor sigma alternativo SigB en *Bacillus* spp. Resultaría importante estudiar la interacción *in vitro* entre *B. velezensis* y otros hongos fitopatógenos para discriminar si la activación de la respuesta general al estrés (como se observó en este trabajo) es un fenómeno generalizado y además dilucidar cuales metabolitos producidos por *C. gloeosporioides* son la causa de la activación del operón de *sigB* en *B. velezensis* 83. Además, las características y funciones de muchas proteínas del regulón de SigB aún se desconocen, por lo que son necesarios más estudios para comprender su papel específico en las comunidades microbianas.

Control biológico. Los cultivos en lote *in vitro* permitieron estudiar el efecto de un estímulo biótico (*C. gloeosporioides*) sobre el crecimiento y perfil transcripcional de *B. velezensis* 83 bajo una condición particular. Sin embargo, es necesario puntualizar que la diversidad fenotípica dentro del género *Bacillus* podría ser relevante al momento de extrapolar nuestros resultados a otras interacciones bacteria-hongo. Las cepas de *B. velezensis* con alta identidad genómica (>98%) difieren significativamente en términos de producción de metabolitos (lipopéptidos y biopolímeros), así como en la colonización de raíces de *Arabidopsis thaliana*. Por lo anterior, resultaría interesante realizar estudios de interacción *in planta* para entender los mecanismos de ataque y defensa de cepas de *B. velezensis* contra varios hongos fitopatógenos, utilizando como estrategia cultivos hidropónicos, un escenario de interacción sumergida similar al utilizado en este trabajo. En el contexto socio-económico actual, esta modalidad de producción agrícola es una opción más sustentable con el ambiente, ya que disminuye el consumo de agua y pesticidas, por lo que evaluar y entender cómo funcionan los agentes de control biológico en sistemas hidropónicos resulta esencial.

Heterogeneidad fenotípica. Análisis de los transcriptomas obtenidos del cultivo axénico de *B. velezensis* 83 revelaron que alrededor del 32 % de sus secuencias codificantes sufren cambios transcripcionales por efecto del tiempo, incluyendo las relacionadas a la producción de metabolitos y múltiples rutas de diferenciación. Sin embargo, la tecnología de secuenciación utilizada en este trabajo (RNA-seq) implica obtener transcriptomas promedio de las células recolectadas. Los cambios observados pueden ser generalizados en toda la población o bien representan mezclas de células fenotípicamente diferenciadas con altos o bajos niveles de expresión. Para fines biotecnológicos, lo anterior es relevante porque la heterogeneidad intrínseca y baja sincronización de las poblaciones en *Bacillus* es una de las mayores limitantes para la producción de agentes de control biológico basados en esporas de este microorganismo (Fig. 23).

A futuro, observar, entender y manipular *ad hoc* la heterogeneidad fenotípica abrirá la posibilidad de incrementar la producción de esporas o dirigir los cultivos hacia la producción de un metabolito deseable que naturalmente sólo sería sintetizado por una fracción minoritaria de la población. Referente únicamente a la observación del fenómeno, la citometría de flujo acoplado a análisis *single-cell RNA-Seq* de líneas reporteras fluorescentes y/o células tratadas con anticuerpos fluorescentes capaces de reconocer proteínas marcadoras podrían resultar útiles para hacer un balance de subpoblaciones. En este contexto, actualmente son escasos los estudios de heterogeneidad fenotípica mediante *single-cell RNA-Seq* en bacterias (e.g. Kuchina *et al.*, 2021).

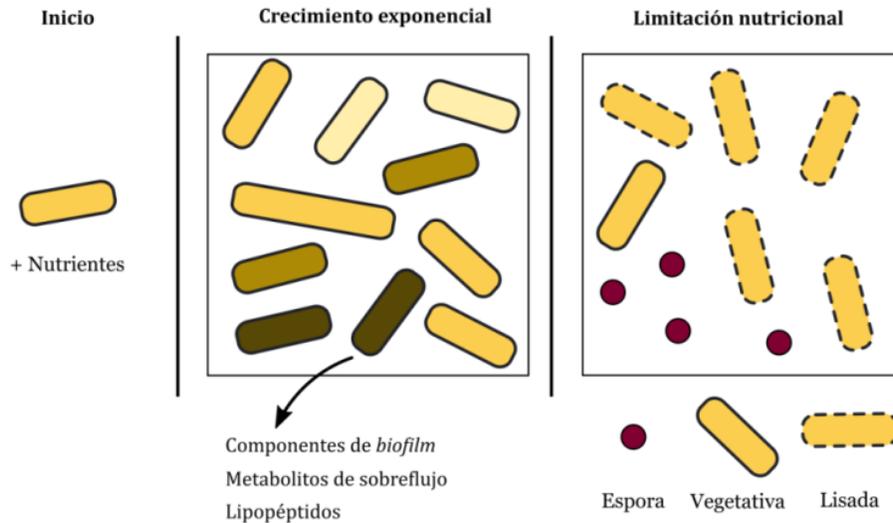


Figura 23. Retos para la producción de metabolitos, enzimas y esporas de *Bacillus* derivados de la heterogeneidad y la desincronización celular. Las poblaciones de *Bacillus* se caracterizan por desarrollar múltiples subpoblaciones isogénicas, las cuales tienen fenotipos distintos y roles específicos en su población. Entre ellas, se encuentran: células vegetativas (motiles, mineras, competentes, caníbales y productoras de matriz) y esporas. De hecho, la eficiencia de esporulación ronda usualmente el 40 % (Espora/Célula). Lo anterior limita la rentabilidad y productividad de procesos industriales que envuelven cultivos de *Bacillus* porque el sustrato proporcionado se deriva a múltiples fines no deseados.

Carga metabólica de la síntesis de metabolitos antimicrobianos. Como se discutió anteriormente, la carga transcripcional que implica la expresión de las sintasas para la producción de lipopéptidos, significa costos energéticos significativos para la célula, que teóricamente son equiparables o incluso mayor a la expresión de las proteínas más abundantes. Con esto en mente, resultaría interesante realizar un análisis a mayor profundidad de las rutas metabólicas que alimentan los precursores para la síntesis de metabolitos y realizar un balance energético y transcripcional global. Se sabe que el ARN comprende menos del 5% del peso seco de una célula, y sólo el 3 % del total corresponde a ARN mensajero, por lo que sería necesario evaluar cuánta carga energética global real representa para la célula la síntesis de antibióticos, en términos de ARN, aminoácidos para la síntesis de las proteínas y los precursores. Como una alternativa para iniciar su exploración, resultaría interesante la caracterización del proteoma o los metabolitos secundarios producidos por *Bacillus* (en cultivo axénico y co-cultivo) a través de técnicas como la espectrometría de masas. Esto además permitiría dilucidar posibles correlaciones entre la productividad de los metabolitos y la carga transcripcional asociada. En la sección de anexos figura 5S, se plantea superficialmente la hipótesis de que el metabolismo celular en *Bacillus* se adapta de forma sincronizada a la expresión y producción de metabolitos antimicrobianos.

VIII. REFERENCIAS

- Abeyasinghe G., Kuchira M., Kudo G., Masuo S., Ninomiya A., Takahashi K., Utada A.S., Hagiwara D., Nomura N., Takaya N., Obana N., & Takeshita N. (2020). Fungal mycelia and bacterial thiamine establish a mutualistic growth mechanism. *Life Sci Alliance*. 3(12):e202000878.
- Achard M.E., Chen K.W., Sweet M.J., Watts R.E., Schroder K., Schembri M.A., & McEwan A.G. (2013). An antioxidant role for catecholate siderophores in *Salmonella*. *Biochem J*. 454(3): 543–549.
- Ackermann M. (2015). A functional perspective on phenotypic heterogeneity in microorganisms. *Nat Rev Microbiol*. 13(8):497–508.
- Adler C., Corbalan N.S., Peralta D.R., Pomares M.F., de Cristóbal R.E., & Vincent P.A. (2014). The alternative role of enterobactin as an oxidative stress protector allows *Escherichia coli* colony development. *PLoS One*. 9(1):e84734.
- Albarracín-Orio A.G., Petras D., Tobares R.A., Aksenov A.A., Wang M., Juncosa F., Sayago P., Moyano A.J., Dorrestein P.C., & Smania A.M. (2020). Fungal-bacterial interaction selects for quorum sensing mutants with increased production of natural antifungal compounds. *Commun Biol*. 3(1):670.
- Aleti G., Sessitsch A., & Brader G. (2015). Genome mining: prediction of lipopeptides and polyketides from *Bacillus* and related Firmicutes. *Comput Struct Biotechnol J*. 13: 192–203.
- Alhasawi A., Legendre F., Jagadeesan S., Appanna V., & Appanna V. (2019). Biochemical strategies to counter nitrosative stress: nanofactories for value-added products. In: *Microbial Diversity in the Genomic Era*. Das S., Dash H. Academic Press. 153–169.
- Arias-Cartin R., Grimaldi S., Arnoux P., Guigliarelli B., & Magalon A. (2012). Cardiolipin binding in bacterial respiratory complexes: structural and functional implications. *BBA-Bioenergetics*. 1817: 1937–1949.
- Arivudainambi U.S., Anand T.D., Shanmugaiah V., Karunakaran C., & Rajendran A. (2011). Novel bioactive metabolites producing endophytic fungus *Colletotrichum gloeosporioides* against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 61(3):340–345.
- Artursson V., & Jansson J.K. (2003). Use of bromodeoxyuridine immunocapture to identify active bacteria associated with arbuscular mycorrhizal hyphae. *Appl Environ Microbiol*. 69(10):6208–6215.
- Ashraf, R., Rashid, N., Basheer, S., Aziz, I., & Akhtar, M. (2017). Glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase homolog from *Bacillus subtilis* strain R5 is a propanol-preferring alcohol Dehydrogenase. *Biochem (Mosc)*. 82(1), 13–23.
- Babitzke P., Lai Y.J., Renda A.J., & Romeo T. (2019). Posttranscription initiation control of gene expression mediated by Bacterial RNA-Binding Proteins. *Annu Rev Microbiol*. 73:43–67.
- Bai S., Qiao B., Hou Z.J., Gao G.R., Cao C.Y., Cheng J.S., & Yuan Y.J. (2023). Mutualistic microbial community of *Bacillus amyloliquefaciens* and recombinant *Yarrowia lipolytica* co-produced lipopeptides and fatty acids from food waste. *Chemosphere*. 310:136864.
- Balderas-Ruiz K.A., Bustos P., Santamaria R.I., González V., Cristiano-Fajardo S.A., Barrera-Ortiz S., Mezo-Villalobos M., Aranda-Ocampo S., Guevara-García A.A., Galindo E., & Serrano-Carreón L. (2020). *Bacillus velezensis* 83 a bacterial strain from mango phyllosphere, useful for biological control and plant growth promotion. *AMB Express*. 10(163).
- Balderas-Ruiz, K.A., Gómez-Guerrero C.I., Trujillo-Roldán M.A., Valdez-Cruz N.A., Aranda-Ocampo S., Juárez A.M., Leyva E., Galindo E., & Serrano-Carreón L. (2021). *Bacillus velezensis* 83 increases productivity and quality of tomato (*Solanum lycopersicum* L.): Pre and postharvest assessment. *Curr Res Microb Sci*. 2: 100076.
- Barrera-Ortiz S., Balderas-Ruiz K.A., Lopez-Bucio J.S., Lopez-Bucio J., Flores C., Galindo E., Serrano-Carreón L., & Guevara-García A.A. (2023). A *Bacillus velezensis* strain improves growth and root system development in *Arabidopsis thaliana* through cytokinin signaling. *Rhizosphere*. 28: 100815.
- Bartolini M., Cogliati S., Vileta D., Bauman C., Ramírez W., & Grau R. (2019). Stress-responsive alternative sigma factor SigB plays a positive role in the antifungal proficiency of *Bacillus subtilis*. *Appl Environ Microbiol*. 85(9): e00178–19.
- Benoit I., van den Esker M.H., Patyshakuliyeva A., Mattern D.J., Blei F., Zhou M., Dijksterhuis J., Brakhage A.A., Kuipers O.P., de Vries A.T., & Kovács R.P. (2015). *Bacillus subtilis* attachment to *Aspergillus niger* hyphae results in mutually altered metabolism. *Environ Microbiol*. 17: 2099–2113.
- Bernal-Cabas M., Miethke M., Antelo-Varela M., Aguilar-Suárez R., Neef J., Schön L., Gabarrini G., Otto A., Becher D., Wolf D., & van Dijk J.M. (2020). Functional association of the stress-responsive LiaH protein and the minimal TatAyCy protein translocase in *Bacillus subtilis*. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 1867(8):118719.
- Borgi M.A., Boudebouze S., Mkaouer H., Maguin E., & Rhimi M. (2015). *Bacillus* phytases: Current status and future prospects. *Bioeng*. 6(4):233–236.
- Borisov V.B., Gennis R.B., Hemp J., & Verkhovsky M.I. (2011). The cytochrome *bd* respiratory oxygen reductases. *Biochim Biophys Acta*. 1807(11): 1398–1413.
- Bourgeois T.M., Van Craeyveld V., Van Campenhout S., Courtin C.M., Delcour J.A., Robben J., & Volckaert G. (2007). Recombinant expression and characterization of XynD from *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* ATCC 6051: a GH 43 arabinoxylan arabinofuranohydrolase. *Appl Microbiol Biotechnol*. 75(6):1309–1317.
- Boye E. (2006). DisA, a busy bee that monitors chromosome integrity. *Cell*. 125(4):641–643.
- Boylan J.A., & Gherardini F.C. (2008). Determining the cellular targets of reactive oxygen species in *Borrelia burgdorferi*. *Methods Mol. Biol.*. 431: 213–221.
- Butcher B.G., & Helmann J.D. (2006). Identification of *Bacillus subtilis* sigma-dependent genes that provide intrinsic resistance to antimicrobial compounds produced by *Bacilli*. *Mol Microbiol*. 60(3): 765–782.
- Cairns L.S., Hogley L., & Stanley-Wall N.R. (2014). Biofilm formation by *Bacillus subtilis*: new insights into regulatory strategies and assembly mechanisms. *Mol Microbiol*. 93: 587–598.
- Carrière A., Lagarde D., Jeanson Y., Portais J.C., Galinier A., Ader I., & Casteilla L. (2020) The emerging roles of lactate as a redox substrate and signaling molecule in adipose tissues. *J Physiol. Biochem*. 76(2):241–250.
- Cha S.S., An Y.J., Jeong C.S., Kim M.K., Jeon J.H., Lee C.M., Lee H.S., Kang S.G., & Lee J.H. (2013). Structural basis for the β -lactamase activity of EstU1, a family VIII carboxylesterase. *Proteins*. 81(11):2045–2051.
- Chai Y., Chu F., Kotter R., & Losick R. (2008). Bistability and biofilm formation in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*. 67(2):254–263.
- Chai Y., Kotter R., & Losick R. (2009). A widely conserved gene cluster required for lactate utilization in *Bacillus subtilis* and its involvement in biofilm formation. *J. Bacteriol*. 191(8): 2423–2430.
- Chakraborty K., Kizhakkekalam V.K., Joy M., & Chakraborty R.D. (2022). Bacilibactin class of siderophore antibiotics from a marine symbiotic *Bacillus* as promising antibacterial agents. *Appl Microbiol Biotechnol*. 106(1): 329–340.
- Chambers HF. (1999). Penicillin-binding protein-mediated resistance in pneumococci and staphylococci. *J Infect Dis*. 179(Suppl 2):S353–9.

- Chandrangsu P., Dusi R., Hamilton C.J., & Helmann J.D.** (2014). Methylglyoxal resistance in *Bacillus subtilis*: contributions of bacillithiol-dependent and independent pathways. *Mol Microbiol*. 91(4): 706–715.
- Chandrangsu P., Loi V.V., Antelmann H., & Helmann J.D.** (2018). The role of bacillithiol in Gram-Positive *Firmicutes*. *Antioxid Redox Signal*. 28(6): 445–462.
- Chandrangsu P., Huang X., Gaballa A., & Helmann J.D.** (2019). *Bacillus subtilis* FoE is sustained by the ZagA zinc metallochaperone and the alarmone ZTP under conditions of zinc deficiency. *Mol Microbiol*. 112(3): 751–765.
- Charbonnier T., Le Coq D., McGovern S., Calabre M., Delumeau O., Aymerich S., & Jules M.** (2017). Molecular and physiological logics of the pyruvate-induced response of a novel transporter in *Bacillus subtilis*. *mBio*. 8(5):e00976-17.
- Chazarreta-Cifre L., Martiarena L., de Mendoza D., & Altabe S.G.** (2011). Role of ferredoxin and flavodoxins in *Bacillus subtilis* fatty acid desaturation. *J Bacteriol*. 193(16): 4043–4048.
- Chen L., Heng J., Qin S., & Bian K.** (2018). A comprehensive understanding of the biocontrol potential of *Bacillus velezensis* LM2303 against *Fusarium* head blight. *PLoS ONE*. 13(6): e0198560.
- Chen X.H., Koumoutsis A., Scholz R., & Borriss R.** (2009b). More than anticipated - production of antibiotics and other secondary metabolites by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *J Mol Microbiol Biotechnol*. 16: 14–24.
- Chen X.H., Koumoutsis A., Scholz R., Eisenreich A., Schneider K., Heinemeyer I., Morgenstern B., Voss B., Hess W.R., Reva O., Junge H., Voigt B., Jungblut P.R., Vater J., Süßmuth R., Liesegang H., Strittmatter A., Gottschalk G., & Borriss R.** (2007). Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Nat Biotechnol*. 25(9):1007–1014.
- Chen X.H., Koumoutsis A., Scholz R., Schneider K., Vater J., Süßmuth R., Piel J., & Borriss R.** (2009a). Genome analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 reveals its potential for biocontrol of plant pathogens. *J Biotech*. 140(1-2): 27–37.
- Chen X.H., Scholz R., Borriss M., Junge H., Mögel G., Kunz S. & Borriss R.** (2009c). Difficidin and bacilysin produced by plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* are efficient in controlling fire blight disease. *J Biotech*. 140(2): 38–44.
- Chen X.H., Vater J., Piel J., Franke P., Scholz R., Schneider K., Koumoutsis A., Hitzeroth G., Grammel N., Strittmatter A.W., Gottschalk G., Süßmuth R.D., & Borriss R.** (2006). Structural and functional characterization of three polyketide synthase gene clusters in *Bacillus amyloliquefaciens* FZB 42. *J Bacteriol*. 188(11):4024–4036.
- Chiancone E., Ceci P., Ilari A., Ribacchi F., & Stefanini S.** (2004). Iron and proteins for iron storage and detoxification. *BioMetals*. 17:197–202.
- Chowdhury S.P., Hartmann A., Gao X., & Borriss R.** (2015). Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 - a review. *Front Microbiol*. 6: 780.
- Cohen, B.E.** (2014). Functional linkage between genes that regulate osmotic stress responses and multidrug resistance transporters: challenges and opportunities for antibiotic discovery. *Antimicrob Agents Chemother*. 58(2): 640–646.
- Corpas F.J., & Barroso J.B.** (2014). NADPH-generating dehydrogenases: their role in the mechanism of protection against nitro-oxidative stress induced by adverse environmental conditions. *Front Environ Sci*. 2(55): 1–5.
- Correa O.S., & Soria M.A.** (2010). Potential of Bacilli for biocontrol and its exploitation in sustainable agriculture. *Microbiol Monographs*. 18: 197–209.
- Cristiano-Fajardo S.A., Flores C., Flores N., Tinoco-Valencia R., Serrano-Carreón L., & Galindo E.** (2019). Glucose limitation and glucose uptake rate determines metabolite production and sporulation in high cell density continuous cultures of *Bacillus amyloliquefaciens* 83. *J Biotech*. 299: 57–65.
- Cristiano-Fajardo S.A., Barron-Reyes D., Flores C., Luna-Bulbarena A., Soriano-Pena E., Tinoco-Valencia R., Galindo E., & Serrano-Carreón L.** (2024). Production of poly-gamma-glutamic acid and spore formation in *Bacillus velezensis* 83 are affected by acidic growing conditions and glucose uptake rate. *J. Chem. Technol. Biotechnol*. 99(3): 609–617.
- de Boer W., Leveau J.H., Kowalchuk G.A., Klein-Gunnewiek P.J., Abeln E.C., Figue M.J., Sjollem K., Janse J.D., & van Veen J.A.** (2004). *Collimonas fungivorans* gen. nov., sp. nov., a chitinolytic soil bacterium with the ability to grow on living fungal hyphae. *Int J Syst Evol Microbiol*. 54: 857–864.
- de Weert S., Kuiper I., Lagendijk E.L., Lamers G.E., & Lugtenberg B.J.** (2004). Role of chemotaxis toward fusaric acid in colonization of hyphae of *Fusarium oxysporum* f. sp. radicles-persici by *Pseudomonas fluorescens* WCS365. *Mol Plant Microbe In*. 17:1185–1191.
- Deleu M., Lorent J., Lins L., Brasseur R., Braun N., El Kirat K., Nylander T., Dufrene Y.F., & Mingeot-Leclercq M.P.** (2013). Effects of surfactin on membrane models displaying lipid phase separation. *Biochim Biophys Acta*. 1823(2): 801–815.
- Djoric D., & Kristich C.J.** (2015). Oxidative stress enhances cephalosporin resistance of *Enterococcus faecalis* through activation of a two-component signaling system. *Antimicrob Agents Chemother*. 59(1): 159–169.
- Du D., van Veen H.W., Murakami S., Pos K.M., & Luisi B.F.** (2015). Structure, mechanism and cooperation of bacterial multidrug transporters. *Curr Opin Struct Biol*. 33:76–91.
- Dubnau D., & Losick R.** (2006). Bistability in bacteria. *Mol Microbiol*. 61(3):564–572.
- Dunlap C.A., Kim S.J., Kwon S.W., & Rooney A.P.** (2016). *Bacillus velezensis* is not a later heterotypic synonym of *Bacillus amyloliquefaciens*; *Bacillus methylophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* and '*Bacillus oryzicola*' are later heterotypic synonyms of *Bacillus velezensis* based on phylogenomics. *Int J Syst Evol Microbiol*. 66:1212–1217.
- Dunlap C.A.** (2019). Taxonomy of registered *Bacillus* spp. strains used as plant pathogen antagonists. *Biol Control*. 134: 82–86.
- Dwyer D.J., Kohanski M.A., & Collins J.J.** (2009). Role of reactive oxygen species in antibiotic action and resistance. *Curr Opin Microbiol*. 12(5):482–489.
- Ealand C.S., Machowski E.E., & Kana B.D.** (2018). β -lactam resistance: The role of low molecular weight penicillin binding proteins, β -lactamases and Id -transpeptidases in bacteria associated with respiratory tract infections. *IUBMB Life*. 70(9):855–868.
- Erega A., Stefanic P., Dogsa I., Danevčić T., Simunovic K., Klančnik A., Smole-Možina S., & Mandić-Mulec I.** (2021). Bacillaene mediates the inhibitory effect of *Bacillus subtilis* on *Campylobacter jejuni* biofilms. *Appl Environ Microbiol*. 87(12):e0295520.
- Evans C.R., Kempes C.P., Price-Whelan A., & Dietrich L.E.P.** (2020). Metabolic heterogeneity and cross-feeding in bacterial multicellular systems. *Trends Microbiol*. 28(9):732–743.
- Evans T.D., & Zhang F.** (2020). Bacterial metabolic heterogeneity: origins and applications in engineering and infectious disease. *Curr Opin Biotechnol*. 64: 183–189.
- Farmer E. E., & Davoine C.** (2007). Reactive electrophile species. *Curr Opin Plant Biol*. 10: 380–386.
- Feaga H. A., Kopylov M., Kim J.K., Jovanovic M., & Dworkin J.** (2020). Ribosome dimerization protects the small subunit. *J Bacteriol*. 202: e00009–20.
- Fernandes R., Amador P., & Prudêncio C.** (2013). β -Lactams: chemical structure, mode of action and mechanisms of resistance. *Rev Med Microbiol*. 24: 7–17.
- Ferreira M.J., Mendes A.L., & de Sá-Nogueira I.** (2017). The MsmX ATPase plays a crucial role in pectin mobilization by *Bacillus subtilis*. *PLoS One*. 12(12):e0189483.

- Fessia A., Barra P., Barros G., & Nesci A.** (2022). Could *Bacillus* biofilms enhance the effectivity of biocontrol strategies in the phyllosphere?. *J Appl Microbiol.* 133(4): 2148–2166.
- Flores C., Medina-Valdez A., Pena C., Serrano-Carreón L., & Galindo E.** (2020). Oxygen transfer rate determines molecular weight and production of poly(γ -glutamic acid) as well as carbon utilization by *Bacillus velezensis* 83. *J Chem Technol Biotechnol.* 95 (9): 2383–2392.
- Frees D., Savijoki K., Varmanen P., & Ingmer H.** (2007). Clp ATPases and ClpP proteolytic complexes regulate vital biological processes in low GC, Gram-positive bacteria. *Mol Microbiol.* 63:1285–1295.
- Frey-Klett P., Burlinson P., Deveau A., Barret M., Tarkka M. & Sarniguet A.** (2011). Bacterial-fungal interactions: hyphens between agricultural, clinical, environmental, and food microbiologists. *Microbiol Mol Biol Rev.* 75: 583–609.
- Fuangthong M., Atichartpongkul S., Mongkolsuk S., & Helmann J.D.** (2001). OhrR is a repressor of ohrA, a key organic hydroperoxide resistance determinant in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.* 183(14): 4134–4141.
- Gaballa A., Newton G.L., Antelmann H., Parsonage D., Upton H., Rawat M., Claiborne A., Fahey R.C., & Helmann J.D.** (2010). Biosynthesis and functions of bacillithiol, a major low-molecular-weight thiol in Bacilli. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107(14):6482–6486.
- Gaballa A., Chi B.K., Roberts A.A., Becher D., Hamilton C.J., Antelmann H., & Helmann J.D.** (2014). Redox regulation in *Bacillus subtilis*: The bacilliredoxins BrxA(YphP) and BrxB(YqiW) function in de-bacillithiolation of S-bacillithiolated OhrR and MetE. *Antioxid Redox Signal.* 21(3): 357–367.
- Galindo E., Serrano-Carreón L., Gutiérrez C.R., Allende R., Balderas K., Patiño M., Trejo M., Wong M.A., Rayo E., Isauro D., & Jurado C.** (2013). The challenges of introducing a new biofungicide to the market: a case study. *Electron J Biotechnol.* 16.
- García-Pajón C.M., & Collado I.G.** (2003). Secondary metabolites isolated from *Colletotrichum* species. *Nat Prod Rep.* 20(4):426–431.
- van Gestel J., Vlamakis H., & Kolter R.** (2015). From cell differentiation to cell collectives: *Bacillus subtilis* uses division of labor to migrate. *PLoS Biol.* 13: e1002141.
- Ghoul M. & Mitri S.** (2016). The ecology and evolution of microbial competition. *Trends Microbiol.* 24: 833–845.
- Giles A.F. & Reynolds R.E.** (1979). *Bacillus megaterium* resistance to cloxacillin accompanied by a compensatory change in penicillin binding proteins. *Nature.* 280(5718): 167–168.
- Giuffrè A., Borisov V.B., Arese M., Sarti P., & Forte E.** (2014) Cytochrome bd oxidase and bacterial tolerance to oxidative and nitrosative stress. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1837(7): 1178–1187.
- Goosens V.J., Monteferrante C.G., & van Dijk J.M.** (2014). The Tat system of Gram-positive bacteria. *Biochim Biophys Acta.* 1843(8):1698–1706.
- Grahovac J., Pajčin I., & Vlajkov V.** (2023). *Bacillus* VOCs in the context of biological control. *Antibiotics (Basel).* 12(3): 581.
- Groussard C., Morel I., Chevanne M., Monnier M., Cillard J., & Delamarque A.** (2000). Free radical scavenging and antioxidant effects of lactate ion: an in vitro study. *J Appl Physiol.* 89(1): 169–175.
- Gu Q., Yang Y., Yuan Q., Shi G., Wu L., Lou Z., Huo R., Wu H., Borriss R., & Gao X.** (2017). Bacillomycin D produced by *Bacillus amyloliquefaciens* is involved in the antagonistic interaction with the plant-pathogenic fungus *Fusarium graminearum*. *Appl Environ Microbiol.* 83(19):e01075–17.
- Guedon E., Moore C.M., Que Q., Wang T., Ye R.W., & Helmann J.D.** (2003). The global transcriptional response of *Bacillus subtilis* to manganese involves the MntR, Fur, TnrA and o⁸ regulons. *Mol Microbiol.* 49(6): 1477–1491.
- Hajare S.N., Subramanian M., Gautam S., & Sharma A.** (2013). Induction of apoptosis in human cancer cells by a *Bacillus* lipopeptide bacillomycin D. *Biochimie.* 95(9):1722–1731.
- Han S., Chen J., Zhao Y., Cai H., & Guo C.** (2021). *Bacillus subtilis* HSY21 can reduce soybean root rot and inhibit the expression of genes related to the pathogenicity of *Fusarium oxysporum*. *Pestic Biochem Physiol.* 178:104916.
- He L., He T., Farrar S., Ji L., Liu T., & Ma X.** (2017). Antioxidants maintain cellular redox homeostasis by elimination of reactive oxygen species. *Cell Physiol Biochem.* 44(2): 532–553.
- Hecker M., Pané-Farré J., & Völker U.** (2007). SigB-Dependent general stress response in *Bacillus subtilis* and related Gram-Positive bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 61: 215–236.
- Hecker M., & Völker U.** (1998). Non-specific, general and multiple stress resistance of growth-restricted *Bacillus subtilis* cells by the expression of the o⁸B regulon. *Mol Microbiol.* 29(5): 1129–1136.
- Hecker M., & Völker U.** (2001). General stress response of *Bacillus subtilis* and other bacteria. *Adv Microb Physiol.* 44: 35–91.
- Ho H.Y., Cheng M.L., & Chiu D.T.** (2007). Glucose-6-phosphate dehydrogenase--from oxidative stress to cellular functions and degenerative diseases. *Redox Rep.* 12(3): 109–118.
- Hochgräfe F., Mostertz J., Albrecht D., & Hecker M.** (2005). Fluorescence thiol modification assay: oxidatively modified proteins in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol.* 58(2): 409–425.
- Hoefler B.C., Gorzelnik K.V., Yang J.Y., Hendricks N., Dorrestein P.C., & Straight P.D.** (2012). Enzymatic resistance to the lipopeptide surfactin as identified through imaging mass spectrometry of bacterial competition. *PNAS.* 109: 13082–13087.
- Hoffmann T., & Bremer E.** (2017). Guardians in a stressful world: the Opu family of compatible solute transporters from *Bacillus subtilis*. *Biol Chem.* 398(2):193–214.
- Höper D., Völker U., & Hecker M.** (2005). Comprehensive characterization of the contribution of individual SigB-dependent general stress genes to stress resistance of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.* 187(8): 2810–2826.
- Huerta-Cepas J., Forslund K., Coelho L.P., Szklarczyk D., Juhl-Jensen L., von Mering C., & Bork P.** (2017). Fast genome-wide functional annotation through orthology assignment by eggNOG-Mapper. *Mol Biol Evol.* 34(8): 2115–2122.
- Idriss E.E., Makarewicz O., Farouk A., Rosner K., Greiner R., Bochow H., Richter T., & Borriss R.** (2002). Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 contributes to its plant-growth-promoting effect. *Microbiol (Reading).* 148:2097–2109.
- Inácio J.M., Correia I.L., & de Sá-Nogueira I.** (2008). Two distinct arabinofuranosidases contribute to arabino-oligosaccharide degradation in *Bacillus subtilis*. *Microbiol.* 154: 2719–2729.
- Islam T., Rabbee M.F., Choi J., & Baek K.H.** (2022). Biosynthesis, molecular regulation, and application of bacitracin produced by *Bacillus* species. *Metabolites.* 12(5): 397.
- Jacques, P.** (2011). Surfactin and other lipopeptides from *Bacillus* spp. 57–91. *In: Soberón-Chavéz G. (ed). Biosurfactants.* Springer-Verlag Press, Berlin, Heidelberg.
- Jetiyanon, K.** (2007). Defensive-related enzyme response in plants treated with a mixture of *Bacillus* strains (IN937a and IN937b) against different pathogens. *Biol Control.* 42(2): 178–185.
- Jordan S., Rietkötter E., Strauch M.A., Kalamorz F., Butcher B.G., Helmann J.D., & Mascher T.** (2007). LiaRS-dependent gene expression is embedded in transition state regulation in *Bacillus subtilis*. *Microbiol.* 153: 2530–2540.
- Kanehisa M., & Goto S.** (2000). KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res.* 28(1): 27–30.

- Kanehisa M., & Sato, Y.** (2019). KEGG Mapper for inferring cellular functions from protein sequences. *Protein Sci.*, 29, 28–35.
- Kanehisa M., Sato Y., Kawashima M., Furumichi M., & Tanabe M.** (2016a). KEGG as a reference resource for gene and protein annotation. *Nucleic Acids Res.*, 44, 457–462.
- Kanehisa M, Sato Y, & Morishima K.** (2016b). BlastKOALA and GhostKOALA: KEGG Tools for Functional Characterization of Genome and Metagenome Sequences. *J Mol Biol.* 428(4): 726–731.
- Khezri M., Jouzani G.S., & Ahmadzadeh M.** (2016). *Fusarium culmorum* affects expression of biofilm formation key genes in *Bacillus subtilis*. *Braz J Microbiol.* 47(1): 47–54.
- Kim S.Y., Park C., Jang H.J., Kim B.O., Bae H.W., Chung I.Y., Kim E.S., & Cho Y.E.** (2019). Antibacterial strategies inspired by the oxidative stress and response networks. *J Microbiol.* 57: 203–212.
- Kim J.A., Song J.S., Kim P.I., Kim D.H., & Kim Y.** (2022). *Bacillus velezensis* TSA32-1 as a promising agent for biocontrol of plant pathogenic fungi. *J Fungi (Basel)*. 8(10): 1053.
- Kingston A.W., Liao X., & Helmann J.D.** (2013). Contributions of the $\sigma(W)$, $\sigma(M)$ and $\sigma(X)$ regulons to the lantibiotic resistome of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol.* 90(3):502–518.
- Kjeldgaard B., Listian S.A., Ramaswami V., Richter A., Kiese-walter H.T., & Kovács Á.T.** (2019). Fungal hyphae colonization by *Bacillus subtilis* relies on biofilm matrix components. *Biofilm*. 1:100007.
- Kocaoglu O., & Carlson E.E.** (2015). Profiling of β -lactam selectivity for penicillin-binding proteins in *Escherichia coli* strain DC2. *Antimicrob Agents Chemother.* 59(5): 2785–2790.
- Koo B.M., Kritikos G., Farelli J.D., Todor H., Tong K., Kimsey H., Wapinski I., Galardini M., Cabal A., Peters J.M., Hachmann A.B., Rudner D.Z., Allen K.N., Typas A., & Gross C.A.** (2017). Construction and analysis of two genome-scale deletion libraries for *Bacillus subtilis*. *Cell Syst.* 4(3): 291–305e7.
- Kozłowski, LP.** (2017). Proteome-pl: proteome isoelectric point database. *Nucleic Acids Res.* 45(D1): D1112–D1116.
- Kraas F.I., Helmetag V., Wittmann M., Strieker M., & Marahiel, M.A.** (2010). Functional dissection of surfactin synthetase initiation module reveals insights into the mechanism of lipoinitiation. *Chem Biol.* 17(8): 872–880.
- Krüger M., & Linke W.A.** (2011). The giant protein titin: a regulatory node that integrates myocyte signaling pathways. *J Biol Chem.* 286(12): 9905–9912.
- Kuchina A., Brettner L.M., Paleologu L., Roco C.M., Rosenberg A.B., Carignano A., Kibler R., Hirano M., De Paolo R.W., & Seelig G.** (2020). Microbial single-cell RNA sequencing by split-pool barcoding. *Science*. 371(6531):eaba5257.
- Kwak M.K., Ryu H.B., Song S.H., Lee J.W., & Kang S.O.** (2018). Anti- σ factor YlaD regulates transcriptional activity of σ factor YlaC and sporulation via manganese-dependent redox-sensing molecular switch in *Bacillus subtilis*. *Biochem J.* 475(13):2127–2151.
- Lee, Y.K., Jang, Y.S., Chang, H.H., Hyung, S.W., & Chung, H.Y.** (2005). A putative early response of antifungal *Bacillus lentimorbus* WJ5 against the plant pathogenic fungus, *Colletotrichum gloeosporioides*, analyzed by a DNA microarray. *J Microbiol.* 43: 308–312.
- Lee H.W., Dominy B.N., & Cao W.** (2011). New family of deamination repair enzymes in uracil-DNA glycosylase superfamily. *J Biol Chem.* 286(36): 31282–31287.
- Lee C., & Park C.** (2017). Bacterial responses to glyoxal and methylglyoxal: reactive electrophilic species. *Int J Mol Sci.* 18(1): 169.
- Lenhart J.S., Schroeder J.W., Walsh B.W., & Simmons L.A.** (2012). DNA repair and genome maintenance in *Bacillus subtilis*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 76(3):530–564.
- Levine R.L., Moskovitz J., & Stadtman E.R.** (2000). Oxidation of methionine in proteins: roles in antioxidant defense and cellular regulation. *IUBMB Life.* 50(4-5): 301–307.
- Li B., Li Q., Xu Z., Zhang N., Shen Q., & Zhang R.** (2014). Responses of beneficial *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 to different soil borne fungal pathogens through the alteration of antifungal compounds production. *Front Microbiol.* 5: 1–10.
- Li C., Zhu L., Pan D., Li S., Xiao H., Zhang Z., Shen X., Wang Y., & Long, M.** (2018). Siderophore-mediated iron acquisition enhances resistance to oxidative and aromatic compound stress in *Cupriavidus necator* JMP134. *Appl Environ Microbiol.* 85(1):e01938-18.
- Li H., Han X., Dong Y., Xu S., Chen C., Feng Y., Cui Q., & Li W.** (2021). Bacillae: Decomposition trigger point and biofilm enhancement in *Bacillus*. *ACS Omega.* 6(2): 1093–1098.
- Lindner C., Stülke J., & Hecker M.** (1994). Regulation of xylanolytic enzymes in *Bacillus subtilis*. *Microbiol.* 140:753–757.
- Ling L., Luo H., Yang C., Wang Y., Cheng W., Pang M., & Jiang K.** (2022). Volatile organic compounds produced by *Bacillus velezensis* L1 as a potential biocontrol agent against postharvest diseases of wolfberry. *Front Microbiol.* 13: 987844.
- Linzner N., Loi V.V., Fritsch V.N., Tung Q.N., Stenzel S., Wirtz M., Hell R., Hamilton C.J., Tedin K., Fulde M., & Antelmann H.** (2019). *Staphylococcus aureus* uses the bacilliredoxin (BrxAB)/bacillithiol disulfide reductase (YpdA) redox pathway to defend against oxidative stress under infections. *Front Microbiol.* 10(1355).
- Litzinger S., Duckworth A., Nitzsche K., Risinger C., Wittmann V., & Mayer C.** (2010). Muropeptide rescue in *Bacillus subtilis* involves sequential hydrolysis by beta-N-acetylglucosaminidase and N-acetylmuramyl-L-alanine amidase. *J Bacteriol.* 192(12): 3132–3143.
- Liu J., Zhou T., He D., Li X., Wu H., & Liu W.** (2011). Functions of lipopeptides bacillomycin D and fengycin in antagonism of *Bacillus amyloliquefaciens* C06 towards *Monilinia fructicola*. *J Microbiol Biotechnol.* 20: 43–52.
- Liu Y., Kyle S., & Straight P.D.** (2018). Antibiotic stimulation of a *Bacillus subtilis* migratory response. *mSphere.* 3(1):e00586-17.
- Liu N., Sun H., Tang Z., Zheng Y., Qi G., & Zhao X.** (2023). Transcription factor Spo0A regulates the biosynthesis of diffidin in *Bacillus amyloliquefaciens*. *Microbiol Spectr.* 11(4):e0104423.
- López D., Vlamakis H., & Kotter R.** (2009). Generation of multiple cell types in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Rev.* 33(1): 152–163.
- Lu H., Zou W.X., Meng J.C., Hu J., & Tan R.X.** (2000). New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum* sp., an endophytic fungus in *Artemisia annua*. *Plant Sci.* 151: 67–73.
- Lu P., Heineke M.H., Koul A., Andries K., Cook G.M., Lill H., van Spanning R., & Bald D.** (2015). The cytochrome *bd*-type quinol oxidase is important for survival of *Mycobacterium smegmatis* under peroxide and antibiotic-induced stress. *Sci Rep.* 27(5): 10333.
- Luna-Bulbarela A., Tinoco-Valencia R., Corzo G., Kazuma K., Konno K., Galindo E., & Serrano-Carreón L.** (2018). Effects of bacillomycin D homologues produced by *Bacillus amyloliquefaciens* 83 on growth and viability of *Colletotrichum gloeosporioides* at different physiological stages. *Biol Control.* 127: 145–154.
- MacAlpine J., Robbins N., & Cowen L.E.** (2022). Bacterial-fungal interactions and their impact on microbial pathogenesis. *Mol Ecol.* 32(10): 2565–2581.
- Marles-Wright J., Grant T., Delumeau O., van Duinen G., Firbank S.J., Lewis P.J., Murray J.W., Newman J.A., Quin M.B., Race P.R., Rohou A., Tichelaar W., van Heel M., & Lewis R.J.** (2008). Molecular architecture of the

“stressosome,” a signal integration and transduction hub. *Science*. 322 (5898): 92–96.

Martes-Wright J., & Lewis R.J. (2008). The *Bacillus subtilis* stressosome: A signal integration and transduction hub. *Commun Integr Biol*. 1(2): 182–184.

Marvasi M., Visscher P.T., & Casillas-Martinez L. (2010). Exopolymeric substances (EPS) from *Bacillus subtilis*: polymers and genes encoding their synthesis. *FEMS Microbiol Lett*. 313(1):1–9.

Masaoka Y., Ueno Y., Morita Y., Kuroda T., Mizushima T., & Tsuchiya T. (2000). A two-component multidrug efflux pump, EbrAB, in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*. 182(8): 2307–2310.

Mascher T., Zimmer S.L., Smith T.A., & Helmann J.D. (2004). Antibiotic-inducible promoter regulated by the cell envelope stress-sensing two-component system LiaRS of *Bacillus subtilis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 48(8):2888–2896.

Mekjian K.R., Bryan E.M., Beall B.W., & Moran C.P. Jr. (1999). Regulation of hexuronate utilization in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*. 181(2):426–433.

Mendes R., Garbeva P., & Raaijmakers J.M. (2013). The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. *FEMS Microbiol Rev*. 37: 634–663.

Menez J., Buckingham R.H., de Zamaroczy M., & Campelli C.K. (2002). Peptidyl-tRNA hydrolase in *Bacillus subtilis*, encoded by *spoVC*, is essential to vegetative growth, whereas the homologous enzyme in *Saccharomyces cerevisiae* is dispensable. *Mol Microbiol*. 45(1): 123–129.

Mileykovskaya E., & Dowhan W. (2009). Cardiolipin membrane domains in prokaryotes and eukaryotes. *Biochim Biophys Acta - Biomembr*. 1788: 2084–2091.

Mitchell S.L., Kearns D.B., & Carlson E.E. (2023). Penicillin-binding protein redundancy in *Bacillus subtilis* enables growth during alkaline shock. *bioRxiv* [Preprint]. doi: 10.1101/2023.03.20.533529.

Mochizuki M., Yamamoto S., Aoki Y., & Suzuki S. (2012). Isolation and characterization of *Bacillus amyloliquefaciens* S13-3 as a biological control agent for anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. *Biocontrol Sci Technol*. 22(6): 697–709.

Mols M., & Abee T. (2011). Primary and secondary oxidative stress in *Bacillus*. *Environ Microbiol*. 13(6): 1387–1394.

Mongkothanaruk W. (2012). Classification of *Bacillus* beneficial substances related to plants, humans and animals. *J Microbiol Biotechnol*. 22(12):1597–1604.

Moore C.M., Nakano M.M., Wang T., Ye R.W., & Helmann J.D. (2004). Response of *Bacillus subtilis* to nitric oxide and the nitrosating agent sodium nitroprusside. *J Bacteriol*. 186(14): 4655–4664.

Moreno-Vivián C., Cabello P., Martínez-Luque M., Blasco R., & Castillo F. (1999). Prokaryotic nitrate reduction: molecular properties and functional distinction among bacterial nitrate reductases. *J Bacteriol*. 181(21):6573–84.

Moynes A.L., Cleveland T.E., & Tuzun S. (2004). Molecular characterization and analysis of the operon encoding the antifungal lipopeptide bacillomycin D. *FEMS Microbiol Lett*. 234(1): 43–49.

Mu J., Li X., Jiao J., Ji G., Wu J., Hu F., & Li H. (2017). Biocontrol potential of vermicompost through antifungal volatiles produced by indigenous bacteria. *Biol Control*. 112: 49–54.

Mullarky E., & Cantley L.C. (2015). Diverting glycolysis to combat oxidative stress. In: Nakao K., Minato N., Uemoto S. *Innovative Medicine: Basic Research and Development*. Tokyo: Springer. 3–23.

Mutlu A., Trauth S., Ziesack M., Nagler K., Bergeest J.P., Rohr K., Becker N., Höfer T., & Bischofs I.B. (2018). Phenotypic memory in *Bacillus subtilis* links dormancy entry and exit by a spore quantity-quality tradeoff. *Nat Commun*. 9(1): 69.

Nair R.R., Vasse M., Wielgoss S., Sun L., Yu Y.N. & Velicer G.J. (2019). Bacterial predator-prey coevolution accelerates genome evolution and selects on virulence-associated prey defences. *Nat Commun*. 10(1): 4301.

Nakano M.M., Hoffmann T., Zhu Y., & Jahn D. (1998). Nitrogen and oxygen regulation of *Bacillus subtilis* nasDEF encoding NADH-dependent nitrite reductase by TnrA and ResDE. *J Bacteriol*. 180(20): 5344–5350.

Nanjundappa A., Bagyaraj D.J., Kumar-Saxena A., Kumar M., & Chakdar H. (2019). Interaction between arbuscular mycorrhizal fungi and *Bacillus* spp. in soil enhancing growth of crop plants. *Fungal Biol Biotechnol*. 6(23).

Niazi A., Manzoor S., Asari S., Bejai S., Meijer J., & Bongcam-Rudloff E. (2014). Genome analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* Subsp. plantarum UCMB5113: a rhizobacterium that improves plant growth and stress management. *PLoS One*. 9(8):e104651.

Nie X., Zhang C., Jiang C., Zhang R., Guo F., & Fan X. (2019). Trehalose increases the oxidative stress tolerance and biocontrol efficacy of *Candida oleophila* in the microenvironment of pear wounds. *Biol Control*. 132: 23–28.

Nishino K., & Yamaguchi A. (2001). Analysis of a complete library of putative drug transporter genes in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 183(20):5803–5812.

Nordberg H., Cantor M., Dusheyko S., Hua S., Poliakov A., Shabalov I., Smirnova T., Grigoriev I.V., & Dubchak I. (2014). The genome portal of the Department of Energy Joint Genome Institute: 2014 updates. *Nucleic Acids Res*. 42:D26–31.

Ohsawa T., Tsukahara K., & Ogura M. (2014). *Bacillus subtilis* response regulator DegU is a direct activator of *pgsB* transcription involved in γ -polyglutamic acid synthesis. *Biosci Biotechnol Biochem*. 73: 2096–2102.

Ola A.R.B., Thomy D., Lai D., Brötz-Oesterhelt H., & Proksch P. (2013). Inducing secondary metabolite production by the endophytic fungus *Fusarium tricinctum* through coculture with *Bacillus subtilis*. *J Nat Prod*. 76: 2094–2099.

Ongena M., & Jacques P. 2007. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiol*. 16:3–5.

Oteiza, P.I. (2012). Zinc and the modulation of redox homeostasis. *Free Radic Biol Med*. 53(9): 1748–1759.

Ouattara H.G., Reverchon S., Niamke S.L., & Nasser W. (2010). Biochemical properties of pectate lyases produced by three different *Bacillus* strains isolated from fermenting cocoa beans and characterization of their cloned genes. *Appl Environ Microbiol*. 76(15): 5214–5220.

Özcengiz G., & Ögüür İ. (2015). Biochemistry, genetics and regulation of bacilysin biosynthesis and its significance more than an antibiotic. *New Biotechnol*. 32 (6): 612–619.

Pao S.S., Paulsen I.T., & Saier M.H. Jr. (1998). Major facilitator superfamily. *Microbiol Mol Biol Rev*. 62(1): 1–34.

Patro R., Duggal G., Love M.I., Irizarry R.A., & Kingsford C. (2017). Salmon: fast and bias-aware quantification of transcript expression using dual-phase inference. *Nat Methods*. 14(4): 417–419.

Patzer S.I., & Hantke, K. (1998). The ZnuABC high-affinity zinc uptake system and its regulator Zur in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*. 28(6): 1199–1210.

Pedreira T., Efmann C., & Stülke, J. (2022). The current state of SubtiWiki, the database for the model organism *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res*. 50: D875–D882.

Peng X., Sun J., Michiels C., Iserentant D., & Verachtert H. (2001). Decrease in cell surface galactose residues of *Schizosaccharomyces pombe* enhances its coaggregation with *Pediococcus damnosus*. *Appl Environ Microbiol*. 67: 3413–3417.

Peralta D.R., Adler C., Corbalán N.S., Paz García E.C., Pomares M.F., & Vincent P.A. (2016). Enterobactin as part of the oxidative stress response repertoire. *PLoS One*. 11(6): e0157799.

- Perfect S.E., Hughes H.B., O'Connell R.J., & Green J.R.** (1999). *Colletotrichum*: A model genus for studies on pathology and fungal-plant interactions. *Fungal Genet. Biol.* 27(2–3): 186–198.
- Pi H., Helmann J.D.** (2017). Sequential induction of Fur-regulated genes in response to iron limitation in *Bacillus subtilis*. *PNAS.* 114(48): 12785–12790.
- Pisithkul T., Schroeder J.W., Trujillo E.A., Yeasin P., Stevenson D.M., Chaiamarit T., Coon J.J., Wang J.D., & Amador-Noguez D.** (2019). Metabolic Remodeling during biofilm development of *Bacillus subtilis*. *mBio.* 10(3): e00623–19.
- Pittman M.S., Robinson H.C., & Poole R.K.** (2005). A bacterial glutathione transporter (*Escherichia coli* CydDC) exports reductant to the periplasm. *J Biol Chem.* 280(37): 32254–32261.
- Provvedi R., Chen I., & Dubnau D.** (2001). NucA is required for DNA cleavage during transformation of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol.* 40(3):634–44.
- Qin Y., Angelini L.L., & Chai Y.** (2022). *Bacillus subtilis* cell differentiation, biofilm formation and environmental prevalence. *Microorganisms.* 10(6): 1108.
- Quijano C., Trujillo M., Castro L., & Trostchansky A.** (2016). Interplay between oxidant species and energy metabolism. *Redox Biol.* 8:28–42.
- Quinlan C.L., Orr A.L., Perevoshchikova I.V., Treberg J.R., Ackrell B.A., & Brand M.D.** (2012). Mitochondrial complex II can generate reactive oxygen species at high rates in both the forward and reverse reactions. *J Biol Chem.* 287(32): 27255–27264.
- Rasmussen T.B., Skindersoe M.E., Bjarnsholt T., Phipps R.K., Christensen K.B., Jensen P.O., Andersen J.B., Koch B., Larsen T.O., Hentzer M., Eberl L., Hoiby N., & Givskov M.** (2005). Identity and effects of quorum-sensing inhibitors produced by *Penicillium* species. *Microbiol.* 151: 1325–1340.
- Rathinaswamy P., Gaikwad S.M., Suresh C.G., Prabhune A.A., Brannigan J.A., Dodson G.G., & Pundle A.V.** (2012). Purification and characterization of Yxel, a penicillin acylase from *Bacillus subtilis*. *Int J Biol Macromol.* 50(1): 25–30.
- Reffatti P.F., Roy I., Odell M., & Keshavarz T.** (2014). Proteomics analysis of *Bacillus licheniformis* in response to oligosaccharides elicitors. *Enzyme Microb Technol.* 61–62: 61–66.
- Reva O., Tümmler B.** (2008). Think big—giant genes in bacteria. *Environ Microbiol.* 10(3): 768–77.
- Riedlinger J., Schrey S.D., Tarkka M.T., Hampp R., Kapur M., & Fiedler H.P.** (2006). Auxofuran, a novel metabolite that stimulates the growth of fly agaric, is produced by the mycorrhiza helper bacterium *Streptomyces* strain Ach505. *Appl Environ Microbiol.* 72: 3550–3557.
- Riga R., Happyana N., & Hakim E.H.** (2023). Secondary metabolites from *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from *Artocarpus heterophyllus* and evaluation of their cytotoxic and antibacterial activities. *Nat Prod Res.* 14:1–7.
- Rivas L.A., Parro V.C., Moreno-Paz M., & Mellado R.P.** (2000). The *Bacillus subtilis* 168 *csn* gene encodes a chitosanase with similar properties to a *Streptomyces* enzyme. *Microbiol.* 146:2929–2936.
- Robinson M.D., McCarthy D.J., & Smyth G.K.** (2010). *edgeR*: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics.* 26: 139–140.
- Rockel P., Strube F., Rockel A., Wildt J., & Kaiser W.M.** (2002). Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase *in vivo* and *in vitro*. *J Exp Bot.* 53(366): 103–110. PMID: 11741046.
- Rodríguez-Ayala F., Bartolini M., & Grau R.** (2020). The stress-responsive alternative sigma factor SigB of *Bacillus subtilis* and its relatives: an old friend with new functions. *Front Microbiol.* 11: 1761.
- Rojas C.M., Senthil-Kumar M., Wang K., Ryu C.M., Kaundal A., & Mysore K.S.** (2012). Glycolate oxidase modulates reactive oxygen species-mediated signal transduction during nonhost resistance in *Nicotiana benthamiana* and *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 24(1): 336–352.
- Rojas-Tapias D.F., & Helmann J.D.** (2019). Roles and regulation of Spx family transcription factors in *Bacillus subtilis* and related species. *Adv Microb Physiol.* 75: 279–323.
- Rudrappa T., Biedrzycki M.L., Kunjeti S.G., Donofrio N.M., Czymbek K.J., Paré P.W., & Bais H.P.** (2010). The rhizobacterial elicitor acetoin induces systemic resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Commun Integr Biol.* 3(2):130–138.
- S-Nogueira I., Nogueira T.V., Soares S., & de Lencastre H.** (1997). The *Bacillus subtilis* L-arabinose (*ara*) operon: nucleotide sequence, genetic organization and expression. *Microbiol.* 143:957–969.
- Sauvage E., Kerff F., Terrak M., Ayala J.A., & Chartier P.** (2008). The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev.* 32(2): 234–258.
- Schaeffer A.B., & Fulton M.D.** (1933). A simplified method of staining endospores. *Science* 77: 194.
- Schmalisch M., Langbein I., & Stülke J.** (2002). The general stress protein Ctc of *Bacillus subtilis* is a ribosomal protein. *J Mol Microb Biotech.* 4: 495–501.
- Schneider K., Chen X.H., Vater J., Franke P., Nicholson G., Borriss R., & Süßmuth R.D.** (2007). Macrolactin is the polyketide biosynthesis product of the *pkS2* cluster of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *J Nat Prod.* 70(9): 1417–1423.
- Scholz R., Vater J., Budiharjo A., Wang Z., He Y., Dietel K., Schwewe T., Herfort S., Lasch P., & Borriss R.** (2014). Amylocyclin, a novel circular bacteriocin produced by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *J Bacteriol.* 196(10): 1842–1852.
- Schönert S., Seitz S., Krafft H., Feuerbaum E.A., Andernach I., Witz G., & Dahl M.K.** (2006). Maltose and maltodextrin utilization by *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.* 188(11): 3911–3922.
- Schoonbeek H.J., Raaijmakers J.M., & de Waard M.A.** (2002). Fungal ABC transporters and microbial interactions in natural environments. *MPMI.* 15: 1165–1172.
- Schouten A., Maksimova O., Cuesta-Arenas Y., van den Berg G., & Raaijmakers J.M.** (2008). Involvement of the ABC transporter BcAtrB and the laccase BcLCC2 in defence of *Botrytis cinerea* against the broad-spectrum antibiotic 2,4-diacetylphloroglucinol. *Environ Microbiol.* 10: 145–157.
- Schouten A., van den Berg G., Edel-Hermann V., Steinberg C., Gautheron N., Alabouvette C., de Vos C.H., Lemanceau P., & Raaijmakers J.M.** (2004). Defense responses of *Fusarium oxysporum* to 2,4-diacetylphloroglucinol, a broad-spectrum antibiotic produced by *Pseudomonas fluorescens*. *MPMI.* 17: 1201–1211.
- Serrano-Carreón L., Balderas-Ruiz K.A., Wong-Urrea M.A., & Galindo-Fentanes E.** (2010). Biofungicidas para el control de la antracnosis del mango: logrando frutos de alta calidad internacional para mercados exigentes. *Claridades Agropecuarias.* 208: 28–37.
- Shcherbik N., & Pestov D.G.** (2019). The impact of oxidative stress on ribosomes: from injury to regulation. *Cells.* 8(11): 1379.
- Singh R., Mailloux R.J., Puiseux-Dao S., & Appanna V.D.** (2007). Oxidative stress evokes a metabolic adaptation that favors increased NADPH synthesis and decreased NADH production in *Pseudomonas fluorescens*. *J Bacteriol.* 189(18): 6665–6675.
- Singh D., Lee S.H., & Lee C.H.** (2022). Non-obligate pairwise metabolite cross-feeding suggests ammensalic interactions between *Bacillus amyloliquefaciens* and *Aspergillus oryzae*. *Commun Biol.* 5(1): 232.
- Sobhanifar S., Worrall L.J., King D.T., Wasney G.A., Baumann L., Gate R.T., Nosella M., Brown E.D., Withers S.G., & Strynadka N.C.** (2016). Structure and mechanism of *Staphylococcus aureus* TarS, the wall teichoic acid β-

glycosyltransferase involved in methicillin resistance. PLoS Pathog. 12(12):e1006067.

Song J., Li J., Mourot J.M., Evers B.M., & Chung D.H. (2008). Diacylglycerol kinase regulation of protein kinase D during oxidative stress-induced intestinal cell injury. Biochem Biophys Res Commun. 375(2): 200–204.

Spirig T., Weiner E.M., & Clubb R.T. (2011). Sortase enzymes in Gram-positive bacteria. Mol Microbiol. 82(5): 1044–1059.

Stein T. (2005). *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. Mol Microbiol. 56(4): 845–857.

Subedi K.P., Kim I., Kim J., Min B. & Park C. (2008). Role of GldA in dihydroxyacetone and methylglyoxal metabolism of *Escherichia coli* K12. FEMS Microbiol Lett. 279(2): 180–187.

Sur S., Romo T.D., & Grossfield A. (2018). Selectivity and mechanism of fengycin, an antimicrobial lipopeptide, from molecular Dynamics. J Phys Chem B. 122(8): 2219–2226.

Swint-Kruse L., & Matthews K.S. (2009). Allosteric in the LacI/GalR family: variations on a theme. Curr Opin Microbiol. 12(2): 129–137.

Takhaveev V., & Heinemann M. (2018). Metabolic heterogeneity in clonal microbial populations. Curr Opin Microbiol. 45: 30–38.

Tauffmanberger A., Fiumelli H., Almufasta S., & Magistretti P.J. (2019). Lactate and pyruvate promote oxidative stress resistance through hormetic ROS signaling. Cell Death Dis. 10(9): 653.

Tejada-Jimenez M., Llamas A., Galván A., & Fernández E. (2019). Role of Nitrate Reductase in NO production in photosynthetic Eukaryotes. Plants (Basel). 8(3): 56.

Thasana N., Prapagdee B., Rangkadilok N., Sallabhan R., Aye S.L., Ruchirawat S., & Loprasert S. (2010). *Bacillus subtilis* SSE4 produces subtilene A, a new lipopeptide antibiotic possessing an unusual C15 unsaturated beta-amino acid. FEBS Lett. 584(14): 3209–3214.

UniProt Consortium. (2019). UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. Nucleic Acids Res. 47(D1): D506–D515.

Thomas S.C., Alhasawi A., Auger C., Omri A., & Appanna V.D. (2016). The role of formate in combatting oxidative stress. Antonie Van Leeuwenhoek. 109(2): 263–271.

Thulin E., & Andersson D.I. (2019). Upregulation of PBP1B and LpoB in *cysB* mutants confers mecillinam (Amdinocillin) resistance in *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother. 63(10): e00612–19.

Tian D., Song X., Li C., Zhou W., Qin L., Wei L., Di W., Huang S., Li B., Huang Q., Long S., He Z., & Wei S. (2021). Antifungal mechanism of *Bacillus amyloliquefaciens* strain GKT04 against *Fusarium* wilt revealed using genomic and transcriptomic analyses. Microbiologopen. 10(3): e1192.

Toimentseva A.A., & Sharipova M.R. (2013). Genetic mechanisms of the *Bacillus* adaptation. Mikrobiologiya. 82(3): 259–273.

Torres M.J., Brandan C.P., Petroselli G., Erra-Balsells R., & Audisio M.C. (2016). Antagonistic effects of *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* and *B. amyloliquefaciens* against *Macrophomina phaseolina*: SEM study of fungal changes and UV-MALDI-TOF MS analysis of their bioactive compounds. Microbiol Res. 182: 31–39.

Töwe S., Leetakriangsak M., Kobayashi K., Van Duy N., Hecker M., Zuber P., & Antelmann H. (2007). The MarR-type repressor MhqR (YkvE) regulates multiple dioxygenases/glyoxalases and an azoreductase which confer resistance to 2-methylhydroquinone and catechol in *Bacillus subtilis*. Mol Microbiol. 66(1): 40–54.

Tran C., Cock I.E., Chen X., & Feng Y. (2022). Antimicrobial *Bacillus*: metabolites and their mode of action. Antibiotics. 11(1): 88.

Tran H.T., & Bonilla C.Y. (2021). SigB-regulated antioxidant functions in gram-positive bacteria. World J Microbiol Biotechnol. 37(3): 38.

Vallet, M., Vanbellingen, Q.P., Fu, T., Le Caer. J.P., Della-Negra, S., Touboul, D., Duncan, K.R., Nay, B., Brunelle, A., & Prado, S. (2017). An integrative approach to decipher the chemical antagonism between the competing endophytes *Paraconiothyrium variabile* and *Bacillus subtilis*. J Nat Prod. 80: 2863–2873.

van Rij E.T., Girard G., Lugtenberg B.J., & Bloemberg G.V. (2005). Influence of fusaric acid on phenazine-1-carboxamide synthesis and gene expression of *Pseudomonas chlororaphis* strain PCL1391. Microbiol. 151: 2805–2814.

Varghese S., Wu A., Park S., Imlay K.R., & Imlay J.A. (2007). Submicromolar hydrogen peroxide disrupts the ability of Fur protein to control free-iron levels in *Escherichia coli*. Mol Microbiol. 64: 822–830.

Veening J.W., Igoshin O.A., Eijlander R.T., Nijland R., Hamoen L.W., & Kuipers O.P. (2008). Transient heterogeneity in extracellular protease production by *Bacillus subtilis*. Mol Syst Biol. 4:184.

Villa-Rodríguez E., Moreno-Ulloa A., Castro-Longoria E., Parra-Cota F.I., & de Los Santos-Villalobos S. (2021). Integrated omics approaches for deciphering antifungal metabolites produced by a novel *Bacillus* species, *B. cabrialesii* TE3T, against the spot blotch disease of wheat (*Triticum turgidum* L. subsp. *durum*). Microbiol Res. 251: 126826.

Vlamakis H., Chai Y., Beauregard P., Losick R., & Kolter R. (2013). Sticking together: building a biofilm the *Bacillus subtilis* way. Nat Rev Microbiol. 11(3): 157–168.

Vollmer W., Joris B., Chartier P., & Foster S. (2007). Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. FEMS Microbiol Rev. 32(2): 259–286.

Wang Y., Yang Q., Tosa Y., Nakayashiki H., & Mayama S. (2005). Nitric oxide-overproducing transformants of *Pseudomonas fluorescens* with enhanced biocontrol of tomato bacterial wilt. J Gen Plant Pathol. 71: 33–38.

Wang H., Wang Z., Liu Z., Wang K., & Xu W. (2021a). Membrane disruption of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* induced by myriocin from *Bacillus amyloliquefaciens* LZN01. Microb Biotechnol. 14(2): 517–534.

Wang T., Wang X., Han M., Song X., Yang D., Wang S., Laborda P., & Shi X. (2021b). Enhanced *spoVF* operon increases host attachment and biocontrol ability of *Bacillus subtilis* for the management of *Ceratocystis fimbriata* in sweet potato. Biol Control. 161: 104651.

Wang J., Xu C., Sun Q., Xu J., Chai Y., Berg G., Cernava T., Ma Z., & Chen Y. (2021c). Post-translational regulation of autophagy is involved in intramicrobiome suppression of fungal pathogens. Microbiome. 9(1): 131.

Wang Z.Q., Lawson R.J., Buddha M.R., Wei C.C., Crane B.R., Munro A.W., & Stuehr D.J. (2007). Bacterial flavodoxins support nitric oxide production by *Bacillus subtilis* nitric-oxide synthase. J Biol Chem. 282(4): 2196–202.

Wang W.X., Kusari S., Laatsch H., Goltz C., Kusari P., Strohmann C., Kayser O., & Spiteller M. (2016). Antibacterial azaphilones from an endophytic fungus, *Colletotrichum* sp. BS4. J Nat Prod. 79(4): 704–710.

Wang C., Zhao D., Qi G., Mao Z., Hu X., Du B., Liu K., & Ding Y. (2020). Effects of *Bacillus velezensis* FKM10 for promoting the growth of *Malus hupehensis* Rehd. and inhibiting *Fusarium verticillioides*. Front Microbiol. 10: 2889.

Wang-Erickson A.F., Deighan P., Chen S., Barrasso K., Garcia C.P., Martínez-Lumbreras S., Alfano C., Krysztofinska E.M., Thapaliya A., Camp A.H., Isaacson R.L., Hochschild A., & Losick R. (2017). A novel RNA polymerase-binding protein that interacts with a sigma-factor docking site. Mol Microbiol. 105(4): 652–662.

Wei Y.H., Wang L.F., & Chang J.S. (2004). Optimizing iron supplement strategies for enhanced surfactin production with *Bacillus subtilis*. Biotechnology Progress. 20: 979–983. In: Jacques, P. 2011. Surfactin and Other Lipopeptides from *Bacillus* spp. In: Soberón-Chávez G. 2011. Biosurfactants. Ed. Springer. Microbiology Monographs 20: 57–93.

Weir B.S., Johnston P.R., & Damm U. (2012). The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. Stud Mycol. 73: 115–180.

- Wicklow D.T., Jordan A.M., & Gloer J.B.** (2009). Antifungal metabolites (monorden, monocillins I, II, III) from *Colletotrichum graminicola*, a systemic vascular pathogen of maize. *Mycol Res.* 113:1433–1442.
- Williams K., Greco C., Bailey A.M., & Willis C.L.** (2021). Core steps to the azaphilone family of fungal natural products. *ChemBiochem.* 22(21): 3027–3036.
- Winstedt L., Yoshida K., Fujita Y., & von Wachenfeldt C.** (1998). Cytochrome *bd* biosynthesis in *Bacillus subtilis*: characterization of the *cydABCD* operon. *J Bacteriol.* 180(24): 6571–6580.
- Worrich A., Stryhanyuk H., Musat N., König S., Banitz T., Centler F., Frank K., Thullner M., Harms H., Richnow H.H., Miltner A., Kästner M., & Wick L.Y.** (2016). Mycelium-mediated transfer of water and nutrients stimulates bacterial activity in dry and oligotrophic environments. *Nat Commun.* 8: 15472.
- Wu L., Wu H., Chen L., Yu X., Borriss R., & Gao X.** (2015). Difficidin and bacilysin from *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 have antibacterial activity against *Xanthomonas oryzae* rice pathogens. *Sci Rep.* 5: 12975.
- Xu W., Wang H., Lv Z., Shi Y., & Wang Z.** (2019). Antifungal activity and functional components of cell-free supernatant from *Bacillus amyloliquefaciens* LZN01 inhibit *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* growth. *Biotechnol. Equip.* 33(1): 1042–1052.
- Xu Z., Shao J., Li B., Yan X., Shen Q., & Zhang R.** (2013). Contribution of bacillomycin D in *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 to antifungal activity and biofilm formation. *Appl Environ Microbiol.* 79(3): 808–815.
- Yamasaki H., & Sakihama Y.** (2000). Simultaneous production of nitric oxide and peroxy nitrite by plant nitrate reductase: *in vitro* evidence for the NR-dependent formation of active nitrogen species. *FEBS Lett.* 468(1): 89–92.
- Yoshida K., Yamaguchi M., Morinaga T., Kinehara M., Ikeuchi M., Ashida H., & Fujita Y.** (2008). *myo*-Inositol catabolism in *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem.* 283(16): 10415–10424.
- You C., Okano H., Hui S., Zhang Z., Kim M., Gunderson C.W., Wang Y.P., Lenz P., Yan D., & Hwa T.** (2013). Coordination of bacterial proteome with metabolism by cyclic AMP signalling. *Nature.* 500: 301–306.
- Youssef N.H., Wofford N., & McInerney M.J.** (2011). Importance of the long-chain fatty acid beta-hydroxylating cytochrome P450 enzyme YbdT for lipopeptide biosynthesis in *Bacillus subtilis* strain OKB105. *Int J Mol Sci.* 12(3): 1767–1786.
- Yu X., Ai C., Xin L., & Zhou G.** (2011). The siderophore-producing bacterium, *Bacillus subtilis* CAS15, has a biocontrol effect on *Fusarium* wilt and promotes the growth of pepper. *Eur J Soil Biol.* 47(2): 138–145.
- Yuan J., Raza W., Shen Q., & Huang Q.** (2012). Antifungal activity of *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 volatile compounds against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Appl Environ Microbiol.* 78(16): 5942–5944.
- Zawadzka-Skomial J., Markiewicz Z., Nguyen-Distèche M., Devreese B., Frère J.M., & Terrak M.** (2006). Characterization of the bifunctional glycosyltransferase/acyltransferase penicillin-binding protein 4 of *Listeria monocytogenes*. *J Bacteriol.* 188(5): 1875–1881.
- Zhang Z., Ma C., Pornillos O., Xiu X., Chang G., & Saier M.H. Jr.** (2007). Functional characterization of the heterooligomeric EbrAB multidrug efflux transporter of *Bacillus subtilis*. *Biochemistry.* 46(17): 5218–5225.
- Zhang C., Zhang X., & Shen S.** (2014). Proteome analysis for antifungal effects of *Bacillus subtilis* KB-1122 on *Magnaporthe grisea* P131. *World J Microbiol Biotechnol.* 30: 1763–1774.
- Zhang H., Zhao Y., Cao H., Mou G., & Yin H.** (2015). Expression and characterization of a lytic polysaccharide monoxygenase from *Bacillus thuringiensis*. *Int J Biol Macromol.* 79:72–75.
- Zhao H., Shao D., Jiang C., Shi J., Li Q., Huang Q., Rajoka M.S.R., Yang H., & Jin M.** (2017). Biological activity of lipopeptides from *Bacillus*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 101(15): 5951–5960.
- Zhang Y., Wang Y., Qin Y., & Li P.** (2020). Complete genome sequence of *Bacillus velezensis* LPL-K103, an antifungal cyclic lipopeptide bacillomycin L producer from the surface of lemon. *Biotech.* 10(1): 8.
- Zhu B., & Stülke J.** (2018). SubtiWiki in 2018: from genes and proteins to functional network annotation of the model organism *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Research.* 46: 743–748.
- Zou W.X., Meng J.C., Lu H., Chen G.X., Shi G.X., Zhang T.Y., & Tan R.X.** (2000). Metabolites of *Colletotrichum gloeosporioides*, an endophytic fungus in *Artemisia mongolica*. *J Nat Prod.* 63: 1529–1530.
- Zuber P.** (2009). Management of oxidative stress in *Bacillus*. *Annu Rev Microbiol.* 63: 575–597.
- Zweerink M.M., & Edison A.** (1987). Difficidin and oxydifficidin: novel broad spectrum antibacterials produced by *Bacillus subtilis*. III. Mode of action of difficidin. *J Antibiot (Tokyo).* 40(12): 1692–1697.

IX. Producción científica, formación de recursos humanos y difusión

Artículos científicos

Luna-Bulbarela A, Romero-Gutiérrez MT, Tinoco-Valencia R, Ortiz E, Martínez-Romero ME, Galindo E, Serrano-Carreón L. (2024). Response of *Bacillus velezensis* 83 to interaction with *Colletotrichum gloeosporioides* resembles a Greek phalanx-style formation: A stress resistant phenotype with antibiosis capacity. *Microbiological Research*. 280, 127592. DOI: 10.1016/j.micres.2023.127592.

Luna-Bulbarela A, Tinoco-Valencia R, Corzo G, Kazuma K, Konno K, Galindo E, Serrano-Carreón L. (2018). Effects of bacillomycin D homologues produced by *Bacillus amyloliquefaciens* 83 on growth and viability of *Colletotrichum gloeosporioides* at different physiological stages. *Biological Control*. 127, 145–154. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2018.08.004.

Cristiano-Fajardo S A, Barrón-Reyes D, Flores C, **Luna-Bulbarela A**, Soriano-Pena E, Tinoco-Valencia R, Galindo E, Serrano-Carreón L (2024). Production of poly-gamma-glutamic acid and spore formation in *Bacillus velezensis* 83 are affected by acidic growing conditions and glucose uptake rate. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. DOI: 10.1002/jctb.7563.

Tutoría

Tutor principal de la alumna Arizmendi Sánchez Montserrat Alejandra (2024). Estudio de la distribución de RapA durante el crecimiento y la esporulación de *Bacillus velezensis* FBZ42-P_{RapA}-mcherry. Tesis de licenciatura. Ingeniería Química, Tecnológico Nacional de México. Zacatepec, Morelos. No. Control: 16090004. Examen de grado celebrado el día 31 de enero del 2024.

Congresos

Luna-Bulbarela A, Sánchez-Arizmendi MA, Ilka B B, Galindo E, Serrano-Carreón L. (2023). Rumbo a la comprensión y manipulación de la esporulación en *Bacillus velezensis*. XX Congreso Nacional de biotecnología y bioingeniería, Ixtapa Zihuatanejo, Guerrero.

Balón-Rosas LY, **Luna-Bulbarela A**, Serrano-Carreón L, Galindo E. (2023). Estudio transcripcional de la red de *quorum sensing* que determina la esporulación de *Bacillus velezensis* 83, en función del pH del cultivo. Congreso Nacional de biotecnología y bioingeniería, Ixtapa Zihuatanejo, Guerrero.

Luna-Bulbarela A, Tinoco-Valencia R, Romero-Gutiérrez M T, Martínez-Romero M E, Galindo E, Serrano-Carreón L. (2021). *Bacillus velezensis* 83 vs *Colletotrichum gloeosporioides*: Estrategias de Defensa y de Ataque. XIX Congreso Nacional de biotecnología y bioingeniería. Modalidad virtual.

Luna-Bulbarela A, de los Santos-Ventura C, Galindo E, Serrano-Carreón L. (2019). Estudio de la toxicidad de mezclas de bacilomicina D y surfactina biosintetizadas por *Bacillus velezensis* 83 en el crecimiento y viabilidad de *Colletotrichum gloeosporioides* 09 cultivado en medio líquido. XVIII Congreso Nacional de biotecnología y bioingeniería, León, Guanajuato.

Luna-Bulbarela A, Corzo-Burguete G, Galindo-Fentanes E, Serrano-Carreón L (2015). Inhibición del crecimiento de *Colletotrichum gloeosporioides* 09 mediante antibióticos lipopeptídicos producidos por *Bacillus* sp. 83. XVI Congreso Nacional de biotecnología y bioingeniería, Guadalajara, Jalisco.

X. ANEXOS

Tabla 1S. Análisis de homología y clasificación funcional de los genes diferencialmente expresados en células co-cultivadas de *Bacillus velezensis* 83. Gen: Nomenclatura canónica en *B. subtilis*. Genes en recuadros verdes forman parte del regulón factor sigma alternativo sensible al estrés general SigB (σ_B). **REO.** Genes afectados por la interacción relacionados a la respuesta al estrés oxidativo. **KEEG:** Código único de la enciclopedia Kyoto para genes y genomas. **E-value:** Estadístico del análisis de alineamiento local *BLASTP*. I: Porcentaje de identidad proteica. **WP:** Número de acceso de proteína único y no redundante. **COG:** Conjunto de genes ortólogos. **C** (producción y conversión de energía), **E** (transporte y metabolismo de aminoácidos), **F** (transporte y metabolismo de nucleótidos), **G** (transporte y metabolismo de carbohidratos), **H** (transporte y metabolismo de coenzimas), **I** (transporte y metabolismo de lípidos), **J** (traducción, estructura ribosómica y biogénesis), **K** (transcripción), **L** (replicación, recombinación y reparación), **M** (biogénesis de pared celular/membrana/envoltura), **N** (motilidad celular), **O** (modificación postraduccional), **P** (transporte y metabolismo de iones inorgánicos), **Q** (biosíntesis, transporte y catabolismo de metabolitos secundarios), **S** (poco conocido), **T** (mecanismos de transducción de señales), **U** (tráfico intracelular, secreción y transporte vesicular) y **V** (mecanismo de defensa). **Log₂ FC:** Factor de cambio. Indica el logaritmo base dos de la relación entre el nivel de expresión de un gen con respecto al control. Los cuadros en rojo y azul indican genes sobre- y sub-expresados, respectivamente. **Log₂ CPM:** Nivel de expresión un gen. Indica el logaritmo base dos de la media del número de cuentas por millón para seis réplicas conjuntas ($n=3$ del tratamiento y control) de un gen. **F:** Estadístico de Fisher. **p:** Probabilidad de que la hipótesis nula sea verdadera. **FDR:** Tasa de descubrimientos falsos.

Gen	REOE	KEEG	Descripción y función	E-value	I (%)	WP	COG	Log ₂ FC	Log ₂ CPM	F	p	FDR
<i>ycrR</i>		K00121	Formaldehído deshidrogenasa putativa.	6x10 ⁻⁵⁴	33	WP_007609290.1_302	C	9.2	12	126	5.2x10 ⁻⁰⁸	3.7x10 ⁻⁰⁵
<i>cydA</i>		K00425	Citocromo bd ubiquinol oxidasa (subunidad I).	0	89	WP_007614697.1_3625	C	6.7	8	45	1.6x10 ⁻⁰⁵	1.3x10 ⁻⁰³
<i>gbsB</i>		K11440	Coína deshidrogenasa (dependiente de FAD).	0	96	WP_014418719.1_2824	C	-5.3	7	14	2.4x10 ⁻⁰³	3.2x10 ⁻⁰²
<i>citM</i>		K03300	Transportador de Mg ²⁺ - citrato.	0	90	WP_060674522.1_718	C	-5.4	5	18	1.0x10 ⁻⁰³	2.0x10 ⁻⁰²
Gen	REOE	KEEG	Descripción	E-value	I (%)	WP	COG	Log ₂ FC	Log ₂ CPM	F	p	FDR
<i>gabT</i>		K07250	γ-aminobutirato transaminasa.	0	88	WP_128496446.1_357	E	5.9	9	18	9.8x10 ⁻⁰⁴	2.0x10 ⁻⁰²
<i>ydapP</i>		K00158	Piruvato:quinona oxidoreductasa.	0	89	WP_014416943.1_399	E	3.6	9	32	7.8x10 ⁻⁰⁵	4.1x10 ⁻⁰³
<i>ggt</i>		K00681	γ-glutamyltransferasa.	0	85	WP_014418078.1_1833	E	-6.9	8	19	8.3x10 ⁻⁰⁴	1.8x10 ⁻⁰²
<i>trpE</i>		K01657	Antranilato sintasa (subunidad I).	0	77	WP_021494241.1_2086	E,H	-4.4	8	13	3.2x10 ⁻⁰³	3.7x10 ⁻⁰²
Gen	REOE	KEEG	Descripción	E-value	I (%)	WP	COG	Log ₂ FC	Log ₂ CPM	F	p	FDR
<i>dra</i>		K01619	Desoxirribosa-fosfato aldolasa.	1x10 ⁻¹³⁵	86	WP_004393277.1_3684	F	1.3	8	16	1.4x10 ⁻⁰³	2.5x10 ⁻⁰²
<i>pyrB</i>		K00609	aspartato carbamoyl-transferasa.	0	79	WP_017417745.1_1500	F	-3.9	9	11	5.7x10 ⁻⁰³	4.7x10 ⁻⁰²
<i>pyrAA</i>		K01956	carbamoyl-fosfato sintetasa (subunidad de glutaminasa).	0	95	WP_109566930.1_1502	F	-3.9	11	14	2.3x10 ⁻⁰³	3.1x10 ⁻⁰²
Gen	REOE	KEEG	Descripción	E-value	I (%)	WP	COG	Log ₂ FC	Log ₂ CPM	F	p	FDR
<i>csbC</i>			Transportador simultáneo putativo de azúcares y protones.	0	88	WP_007407844.1_3715	G	4.5	10	55	5.5x10 ⁻⁰⁶	5.6x10 ⁻⁰⁴
<i>ywtG</i>			Transportador de glucosa putativo.	0	87	WP_007407509.1_3312	G	4.3	8	65	2.2x10 ⁻⁰⁶	3.2x10 ⁻⁰⁴
<i>rhsD</i>		K06726	Transportador ABC de ribosa (proteína de membrana).	5x10 ⁻⁷⁰	75	WP_128496942.1_3327	G	-6.0	5	16	1.5x10 ⁻⁰³	2.5x10 ⁻⁰²
<i>hxlA</i>		K08093	3-hexulosa-6-fosfato sintasa.	3x10 ⁻¹²⁵	87	WP_014416875.1_309	G	-6.8	9	19	8.1x10 ⁻⁰⁴	1.8x10 ⁻⁰²
Gen	REOE	KEEG	Descripción	E-value	I (%)	WP	COG	Log ₂ FC	Log ₂ CPM	F	p	FDR
<i>hemA</i>		K02492	Glutamyl-ARNt reductasa.	0	88	WP_003152628.1_2553	H	1.3	9	34	5.8x10 ⁻⁰⁵	3.3x10 ⁻⁰³
<i>moaE</i>		K03635	Molibdopterina sintasa (subunidad grande).	2x10 ⁻⁹⁸	87	WP_007611116.1_1370	H	1.3	7	21	5.7x10 ⁻⁰⁴	1.4x10 ⁻⁰²
<i>thiL</i>		K00946	Tiamina-monofosfato cinasa.	2x10 ⁻¹⁶⁴	68	WP_014417063.1_564	H	-1.0	7	12	4.5x10 ⁻⁰³	4.2x10 ⁻⁰²
<i>yhxA</i>			AM-8-amino-7-oxononanoato aminotransferasa putativa.	0	84	WP_100262123.1_877	H	-1.8	8	12	4.9x10 ⁻⁰³	4.4x10 ⁻⁰²
Gen	REOE	KEEG	Descripción	E-value	I (%)	WP	COG	Log ₂ FC	Log ₂ CPM	F	p	FDR
<i>bmrU</i>			Diacylglicerol cinasa putativa.	2x10 ⁻¹⁵³	69	WP_128496713.1_2235	I	4.0	9	63	2.6x10 ⁻⁰⁶	3.4x10 ⁻⁰⁴
<i>ywiE</i>		K06131	Cardiolipina sintetasa menor.	0	81	WP_094296212.1_3461	I	4.0	7	68	1.7x10 ⁻⁰⁶	3.2x10 ⁻⁰⁴
<i>bmyD</i>						WP_014418049.1_1798	I	-6.7	7	12	4.3x10 ⁻⁰³	4.1x10 ⁻⁰²
<i>lcfA</i>		K01897	Acil-CoA sintetasa de cadena larga.	0	80	WP_021494411.1_2591	I,Q	-3.7	6	12	4.1x10 ⁻⁰³	4.0x10 ⁻⁰²
Gen	REOE	KEEG	Descripción	E-value	I (%)	WP	COG	Log ₂ FC	Log ₂ CPM	F	p	FDR
<i>rpsNB</i>		K02954	La proteína ribosómica alternativa S14*.	3x10 ⁻⁵⁵	89	WP_007610245.1_838	J	7.8	6	157	1.4x10 ⁻⁰⁸	1.6x10 ⁻⁰⁵
<i>rpmEB</i>		K02909	Proteína ribosomal accesoria.	2x10 ⁻⁵¹	88	WP_003152229.1_2803	J	6.1	11	109	1.2x10 ⁻⁰⁷	6.0x10 ⁻⁰⁵
<i>yhcT</i>		K06180	Pseudouridilato sintasa putativa.	4x10 ⁻¹⁶⁴	71	WP_017417335.1_872	J	-0.6	6	11	5.9x10 ⁻⁰³	4.8x10 ⁻⁰²
<i>tyrS</i>		K01866	Tirosil-tRNA sintetasa.	0	94	WP_007613147.1_2715	J	-0.9	8	14	2.3x10 ⁻⁰³	3.1x10 ⁻⁰²
Gen	REOE	KEEG	Descripción	E-value	I (%)	WP	COG	Log ₂ FC	Log ₂ CPM	F	p	FDR
<i>sigB</i>		K03090	Factor sigma alternativo de la ARN polimerasa.	0	92	WP_029974100.1_450	K	2.9	11	146	2.1x10 ⁻⁰⁸	1.9x10 ⁻⁰⁵
<i>ylaC</i>			ARN polimerasa ECF factor sigma YlaC.	2x10 ⁻⁸²	65	WP_001741774.1_1425	K	2.2	3	40	2.6x10 ⁻⁰⁶	1.9x10 ⁻⁰³
<i>hutP</i>		K09683	Antiterminador transcripcional del operón <i>hut</i> .	2x10 ⁻¹⁰⁰	93	WP_004393292.1_3669	K	-4.1	4	11	5.4x10 ⁻⁰³	4.6x10 ⁻⁰²
<i>rhsR</i>		K02529	Represor transcripcional.	0	79	WP_128496938.1_3325	K	-4.7	6	20	6.0x10 ⁻⁰⁴	1.5x10 ⁻⁰²
Gen	REOE	KEEG	Descripción	E-value	I (%)	WP	COG	Log ₂ FC	Log ₂ CPM	F	p	FDR
<i>ywjD</i>			Endonucleasa de daño UV específica de esporulación.	0	78	WP_095060267.1_3458	L	2.2	3	20	6.8x10 ⁻⁰⁴	1.6x10 ⁻⁰²
<i>uvrB</i>		K03702	Excinucleasa ABC (subunidad B).	0	97	WP_003151439.1_3239	L	1.6	9	60	3.3x10 ⁻⁰⁶	3.8x10 ⁻⁰⁴
<i>ywqL</i>		K05982	Endonucleasa V.	9x10 ⁻¹⁵⁵	85	WP_061861605.1_3350	L	-1.8	3	16	1.6x10 ⁻⁰³	2.6x10 ⁻⁰²
<i>dprA</i>		K04096	Proteína mediadora de recombinación.	2x10 ⁻¹⁵⁴	71	WP_014417764.1_1563	L	-1.9	5	14	2.6x10 ⁻⁰³	3.3x10 ⁻⁰²
Gen	REOE	KEEG	Descripción	E-value	I (%)	WP	COG	Log ₂ FC	Log ₂ CPM	F	p	FDR
<i>yxeI</i>		K01442	Penicilina acilasa.	0	76	WP_094295707.1_1259	M	3.8	4	39	3.0x10 ⁻⁰⁵	2.0x10 ⁻⁰³
<i>hxlB</i>		K08094	6-fosfo-3-hexuloisomerasa.	7x10 ⁻¹⁰⁰	75	WP_021494205.1_308	M	-5.7	8	23	3.5x10 ⁻⁰⁴	1.0x10 ⁻⁰²

<i>capB</i>	K01932	Poli-γ-glutamato sintetasa.	0	93	WP_003151337.1_3320	M	-6.9	9	24	3.1x10 ⁻⁰⁴	9.4x10 ⁻⁰³	
<i>capA</i>	K07282	Transportador de γ-poli glutamato.	0	79	WP_007614174.1_3318	M	-7.2	9	24	3.3x10 ⁻⁰⁴	9.7x10 ⁻⁰³	
Gen	REOE	KEEG	Descripción	E-value	I (%)	WP	COG	Log ₂ FC	Log ₂ CPM	F	p	FDR
<i>motB</i>		K02557	Subunidad del estator flagelar.	2x10 ⁻¹⁴¹	81	WP_017417652.1_1305	N	1.6	5	12	4.7x10 ⁻⁰³	4.3x10 ⁻⁰²
<i>figK</i>		K02396	Proteína de unión.	0	63	WP_014419008.1_3272	N	1.5	8	16	1.5x10 ⁻⁰³	2.5x10 ⁻⁰²
<i>motP</i>		K02556	Estator flagelar.	2x10 ⁻¹⁷¹	84	WP_007408775.1_2722	N	-1.2	6	15	2.0x10 ⁻⁰³	2.9x10 ⁻⁰²
<i>motS</i>		K02557	Estator flagelar.	1x10 ⁻¹¹⁵	68	WP_003152387.1_2721	N	-1.6	5	13	3.6x10 ⁻⁰³	3.8x10 ⁻⁰²
Gen	REOE	KEEG	Descripción	E-value	I (%)	WP	COG	Log ₂ FC	Log ₂ CPM	F	p	FDR
<i>ohrB</i>		K04063	Proteína de estrés general.	1x10 ⁻⁸³	82	WP_022553455.1_1256	O	3.0	6	14	2.3x10 ⁻⁰³	3.1x10 ⁻⁰²
<i>epr</i>		K13277	Serina proteasa extracelular.	0	59	WP_128496991.1_3585	O	2.0	4	14	2.5x10 ⁻⁰³	3.3x10 ⁻⁰²
<i>minJ</i>			Determinante topológico de la división celular.	0	78	WP_095270806.1_3252	O	-1.3	8	13	2.9x10 ⁻⁰³	3.5x10 ⁻⁰²
<i>yacD</i>		K07533	Peptidil-prolil cis-trans-isomerasa putativa.	1x10 ⁻¹⁷⁸	81	WP_022552477.1_73	O	-1.4	7	20	6.1x10 ⁻⁰⁴	1.5x10 ⁻⁰²
Gen	REOE	KEEG	Descripción	E-value	I (%)	WP	COG	Log ₂ FC	Log ₂ CPM	F	p	FDR
<i>znuA</i>		K09815	Transportador ABC de alta afinidad al zinc (lipoproteína).	1x10 ⁻¹⁷⁸	83	WP_029973931.1_257	P	4.5	12	61	3.0x10 ⁻⁰⁶	3.5x10 ⁻⁰⁴
<i>mntC</i>		K11708	Transportador ABC de manganeso (proteína de membrana).	0	67	WP_022553655.1_2808	P	4.0	7	54	6.0x10 ⁻⁰⁶	5.9x10 ⁻⁰⁴
<i>mdxG</i>		K15772	Transportador ABC (permeasa).	0	92	WP_025649322.1_3190	P	-4.8	4	13	3.2x10 ⁻⁰³	2.9x10 ⁻⁰²
<i>rbsA</i>		K10441	Transportador ABC (proteína de unión a ATP).	0	84	WP_128496944.1_3328	P	-5.3	6	15	2.2x10 ⁻⁰³	3.1x10 ⁻⁰²
Gen	REOE	KEEG	Descripción	E-value	I (%)	WP	COG	Log ₂ FC	Log ₂ CPM	F	p	FDR
		K03897				WP_014417321.1_932	Q	4.0	9	92	3.1x10 ⁻⁰⁷	9.6x10 ⁻⁰⁵
		K01574				WP_065180469.1_3018	Q	2.9	4	11	6.0x10 ⁻⁰³	4.8x10 ⁻⁰²
<i>bmyB</i>			Bacilomicina D sintetasa.			WP_128496659.1_1796	Q	-4.7	10	15	2.0x10 ⁻⁰³	2.9x10 ⁻⁰²
<i>bmyA</i>			Bacilomicina D sintetasa.			WP_128496660.1_1797	Q	-5.1	10	13	3.6x10 ⁻⁰³	3.8x10 ⁻⁰²
Gen	REOE	KEEG	Descripción	E-value	I (%)	WP	COG	Log ₂ FC	Log ₂ CPM	F	p	FDR
<i>zagA</i>			Metalochaperona de zinc.	0	83	WP_014416870.1_301	S	8.9	12	95	2.6x10 ⁻⁰⁷	9.6x10 ⁻⁰⁵
<i>ycK</i>			Producto desconocido.	4x10 ⁻⁷⁰	63	WP_014416871.1_303	S	6.9	10	235	1.2x10 ⁻⁰⁹	2.1x10 ⁻⁰⁶
<i>capC</i>		K22116	Componente de la ligasa del ácido glutámico CapB-CapC.	8x10 ⁻⁸⁹	94	WP_003151340.1_3319	S	-6.9	7	30	1.1x10 ⁻⁰⁴	4.9x10 ⁻⁰³
<i>ywmC</i>		K07114	Producto desconocido.	2x10 ⁻¹⁰⁷	65	WP_109567270.1_3413	S	-7.4	11	19	8.4x10 ⁻⁰⁴	1.9x10 ⁻⁰²
Gen	REOE	KEEG	Descripción	E-value	I (%)	WP	COG	Log ₂ FC	Log ₂ CPM	F	p	FDR
<i>yocK</i>			Proteína de estrés general.	5x10 ⁻⁸⁷	71	WP_017417961.1_1873	T	3.6	9	21	5.6x10 ⁻⁰⁴	1.4x10 ⁻⁰²
<i>rsbV</i>		K04749	Factor anti-anti-SigB.	3x10 ⁻⁶³	81	WP_003156176.1_448	T	2.9	10	80	6.7x10 ⁻⁰⁷	1.8x10 ⁻⁰⁴
<i>ycbL</i>			Regulador de respuesta (Familia OmpR).	1x10 ⁻⁹⁶	58	WP_014419158.1_3523	T	-1.2	4	11	6.1x10 ⁻⁰³	4.8x10 ⁻⁰²
<i>glnK</i>		K07717	Quinasa sensora de un sistema de dos componentes.	0	70	WP_021495302.1_231	T	-1.2	5	11	6.0x10 ⁻⁰³	4.8x10 ⁻⁰²
Gen	REOE	KEEG	Descripción	E-value	I (%)	WP	COG	Log ₂ FC	Log ₂ CPM	F	p	FDR
<i>sipT</i>		K03100	Peptidasa señal I.	5x10 ⁻¹²⁷	86	WP_003154568.1_1379	U	0.8	8	11	5.1x10 ⁻⁰³	4.5x10 ⁻⁰²
<i>yobL/yokI</i>		K21487	Toxina.	0	56	WP_128496689.1_1975	U	-1.5	6	14	2.5x10 ⁻⁰³	3.3x10 ⁻⁰²
						WP_128496788.1_2696	U	-2.9	3	11	5.0x10 ⁻⁰³	4.4x10 ⁻⁰²
Gen	REOE	KEEG	Descripción	E-value	I (%)	WP	COG	Log ₂ FC	Log ₂ CPM	F	p	FDR
<i>cydC</i>		K16013	Transportador ABC (proteína de unión a ATP).	0	85	WP_128497001.1_3623	V	4.1	7	44	1.7x10 ⁻⁰⁵	1.3x10 ⁻⁰³
<i>cydD</i>		K16012	Transportador ABC (proteína de unión a ATP).	0	82	WP_014419231.1_3622	V	3.5	6	30	1.0x10 ⁻⁰⁴	4.8x10 ⁻⁰³
<i>ycbN</i>			Transportador ABC putativo (Proteína de unión a ATP).	1x10 ⁻¹⁴⁸	63	WP_025649399.1_3526	V	-2.0	3	18	9.0x10 ⁻⁰⁴	1.9x10 ⁻⁰²
		K01990				WP_115941358.1_185	V	-4.4	6	13	3.1x10 ⁻⁰³	3.6x10 ⁻⁰²
Gen	REOE	KEEG	Descripción	E-value	I (%)	WP	COG	Log ₂ FC	Log ₂ CPM	F	p	FDR
<i>ycK</i>			Producto desconocido.	1x10 ⁻³⁹	55	WP_007409357.1_304		6.2	6	236	1.2x10 ⁻⁰⁹	2.1x10 ⁻⁰⁶
<i>ykuO</i>			Producto desconocido.	2x10 ⁻¹⁵⁶	65	WP_128496605.1_1357		4.3	4	26	2.2x10 ⁻⁰⁴	8.2x10 ⁻⁰³
<i>capE</i>			Producto desconocido.	1x10 ⁻²²	75	WP_003151344.1_3317		-6.3	5	24	2.9x10 ⁻⁰⁴	9.2x10 ⁻⁰³
						WP_128496731.1_2421		-6.5	7	18	9.8x10 ⁻⁰⁴	2.0x10 ⁻⁰²

Tabla 2S. Genes relacionados a la respuesta general al estrés. Regulón del factor sigma alternativo sensible al estrés general SigB (σ_B) en *B. velezensis* 83.

Gen	COG	WP	e-value	I (%)
<i>aag</i>	L	WP_021494728.1	3x10 ⁻¹⁰⁴	81.6
<i>aldY</i>	C	WP_007408954.1	2x10 ⁻¹⁶⁰	46.8
<i>bmr</i>	G	WP_014417364.1	2x10 ⁻¹³⁸	53.7
<i>bmrR</i>	K	WP_021494613.1	4x10 ⁻⁰⁸	28.9
<i>bmrU</i>	I	WP_128496713.1	2x10 ⁻¹⁵³	68.6
<i>bofC</i>	S	WP_012118093.1	5x10 ⁻⁹⁰	73.5
<i>cdd</i>	F	WP_017418172.1	8x10 ⁻⁹⁴	91.2
<i>chaA</i>	P	WP_007408511.1	0	89.5
<i>clpC</i>	O	WP_007410388.1	0	98.3
<i>clpP</i>	O	WP_003151513.1	8x10 ⁻¹⁴⁰	96
<i>corA</i>	P	WP_014418379.1	6x10 ⁻¹⁶⁷	67.4
<i>csbA</i>	S	WP_003151438.1	5x10 ⁻⁴¹	98.5
<i>csbB</i>	M	WP_003155484.1	0	87.3
<i>csbC</i>	G	WP_007407844.1	0	87.9
<i>csbD</i>	S	WP_003151197.1	1x10 ⁻²⁰	69.1
<i>csbX</i>	G	WP_025650370.1	2x10 ⁻¹⁵⁵	52.5
<i>ctc</i>	J	WP_014416724.1	3x10 ⁻¹⁰³	71.4
<i>ctsR</i>	K	WP_003156396.1	9x10 ⁻¹⁰⁸	97.4
<i>cypC</i>	Q	WP_128496588.1	0	70.1
<i>daeC</i>	M	WP_022553249.1	0	60.7
<i>dctB</i>	P	WP_017419232.1	0	77.4
<i>disA</i>	L	WP_003156401.1	0	94.4
<i>dps</i>	P	WP_007408835.1	1x10 ⁻⁹⁹	92.4
<i>era</i>	M	WP_007408285.1	0	97
<i>fin</i>	S	WP_004264650.1	2x10 ⁻⁴⁷	86.8
<i>gabD</i>	C	WP_128496447.1	0	89.2
<i>galM</i>	G	WP_128496670.1	5x10 ⁻¹⁵⁰	61.7
<i>gsiB</i>	S	WP_012116853.1	5x10 ⁻⁷⁴	90.2
<i>gspA</i>	M	WP_007407730.1	1x10 ⁻¹⁷¹	75.9
<i>gtaB</i>	M	WP_003151367.1	0	90.4
<i>guaD</i>	F, J	WP_007615141.1	2x10 ⁻²⁰	39.2
<i>hpf</i>	J	WP_128496914.1	4x10 ⁻¹²³	89.4
<i>infB</i>	J	WP_014417788.1	0	95.7
<i>ioiW</i>	S	WP_021494129.1	0	70.4
<i>ipi</i>	S	WP_007409142.1	1x10 ⁻⁴⁷	58.3
<i>ispD</i>	I	WP_053285121.1	5x10 ⁻¹²⁸	73.7
<i>ispF</i>	I	WP_003156407.1	1x10 ⁻¹⁰⁹	94.9
<i>katE</i>	P	WP_128497007.1	0	83.8
<i>katX</i>	P	WP_014419227.1	0	95.7
<i>luxS</i>	T	WP_003152237.1	2x10 ⁻¹¹³	93.6
<i>mcsA</i>	S	WP_095061640.1	1x10 ⁻¹¹⁶	84.8
<i>mcsB</i>	E	WP_003156398.1	0	91.5
<i>menC</i>	H	WP_014418709.1	0	85.4
<i>menE</i>	H	WP_017418427.1	0	77.2
<i>mgsR</i>	P	WP_003153079.1	1x10 ⁻⁷⁷	85.5
<i>mhqO</i>	E	WP_128496682.1	1x10 ⁻⁹⁰	46.5
<i>mhqP</i>	S	WP_012117101.1	3x10 ⁻¹⁰	30.2
<i>nadE</i>	H	WP_014416856.1	0	88.2
<i>nhaX</i>	T	WP_110085657.1	4x10 ⁻⁹⁰	72.9
<i>nusA</i>	K	WP_003154195.1	0	95.2
<i>ohrB</i>	O	WP_022553455.1	1x10 ⁻⁸³	82.4
<i>opuD</i>	P	WP_014418673.1	0	87.7
<i>opuE</i>	E	WP_007408914.1	0	88.4
<i>phoP</i>	T	WP_061581277.1	2x10 ⁻¹⁵⁵	87.1
<i>phoR</i>	T	WP_021494433.1	0	71.3
<i>plsC</i>	I	WP_007409265.1	3x10 ⁻¹²⁹	86.9
<i>radA</i>	O	WP_014416742.1	0	93.5
<i>rbfA</i>	J	WP_003154185.1	9x10 ⁻⁷⁸	94.9
<i>recO</i>	L	WP_007408287.1	6x10 ⁻¹⁷⁶	89
<i>rnr</i>	K	WP_022553798.1	0	92.2
<i>rpiGA</i>	J	WP_003154192.1	1x10 ⁻⁶⁷	96
<i>rpmEB</i>	J	WP_003152229.1	2x10 ⁻⁵¹	87.8
<i>rsbR</i>	T	WP_003156182.1	3x10 ⁻¹⁶⁰	79.5
<i>rsbRD</i>	S	WP_128496721.1	3x10 ⁻¹¹⁶	64
<i>rsbS</i>	T	WP_007609584.1	9x10 ⁻⁸³	97.5
<i>rsbT</i>	T	WP_003156178.1	1x10 ⁻⁹⁰	94
<i>rsbU</i>	T	WP_007609589.1	0	89.6
<i>rsbV</i>	T	WP_003156176.1	3x10 ⁻⁶³	80.7
<i>rsbW</i>	T	WP_007609591.1	2x10 ⁻¹⁰⁷	88.1

Gen	COG	WP	e-value	I (%)
<i>rsbX</i>	T	WP_128496463.1	1x10 ⁻¹²⁵	81.8
<i>secG</i>	U	WP_003151681.1	4x10 ⁻⁴³	93.3
<i>sigB</i>	K	WP_029974100.1	0	92.4
<i>smgB</i>	O	WP_003152688.1	4x10 ⁻¹¹¹	96.8
<i>sodA</i>	P	WP_003153025.1	5x10 ⁻¹³⁷	92.1
<i>spo0E</i>	E	WP_003154690.1	3x10 ⁻⁴³	73.3
<i>spoVC</i>	J	WP_025650338.1	3x10 ⁻¹²⁵	87.8
<i>spx</i>	K	WP_003155034.1	1x10 ⁻⁹⁴	99.2
<i>trxA</i>	O	WP_003152560.1	2x10 ⁻⁷³	99
<i>yaaH</i>	G	WP_038461137.1	0	77.6
<i>yaaI</i>	Q	WP_014416712.1	3x10 ⁻¹⁰⁵	81.4
<i>yaaL</i>	S	WP_003156403.1	0	97.3
<i>ybyB</i>		WP_003156732.1	6x10 ⁻⁴⁵	74.4
<i>ycbP</i>	S	WP_003156684.1	1x10 ⁻⁵⁵	67.7
<i>ycdF</i>	S	WP_021495285.1	9x10 ⁻¹⁵⁸	81.8
<i>yceG</i>	G	WP_128496419.1	0	78.5
<i>yceC</i>	T	WP_015239102.1	6x10 ⁻¹¹²	81.3
<i>yceD</i>	T	WP_003156648.1	2x10 ⁻¹³⁴	93.3
<i>yceE</i>	T	WP_003156684.1	5x10 ⁻¹³⁸	95.3
<i>yceF</i>	P	WP_003156644.1	9x10 ⁻¹⁷⁴	92.2
<i>yceG</i>	S	WP_095273271.1	0	75.8
<i>yceH</i>	P	WP_007609246.1	0	90.6
<i>yczO</i>		WP_003156294.1	2x10 ⁻²⁷	85.2
<i>ydaC</i>	S	WP_021494370.1	5x10 ⁻⁰⁴	28.5
<i>ydaD</i>	S	WP_021495102.1	0	88.1
<i>ydaE</i>	S	WP_021495101.1	7x10 ⁻¹⁰⁵	82
<i>ydaF</i>	J	WP_022552606.1	4x10 ⁻⁷⁴	54.1
<i>ydaG</i>	S	WP_003156270.1	4x10 ⁻⁹²	86.4
<i>ydaJ</i>	T	WP_128496455.1	1x10 ⁻¹⁶²	62.1
<i>ydaK</i>	T	WP_014416937.1	2x10 ⁻¹⁵¹	72.1
<i>ydaL</i>	S	WP_128496456.1	0	69.2
<i>ydaM</i>	M	WP_061881165.1	0	95.2
<i>ydaN</i>	S	WP_128496457.1	0	59.6
<i>ydaP</i>	E	WP_014416943.1	0	88.7
<i>ydaS</i>	S	WP_003150926.1	5x10 ⁻²⁴	75.6
<i>ydaT</i>	S	WP_007609535.1	9x10 ⁻⁴⁰	80.6
<i>ydbD</i>	P	WP_014416954.1	0	88.6
<i>ydeC</i>	K	WP_014416996.1	9x10 ⁻¹⁴⁵	65.2
<i>ydhK</i>	S	WP_110124545.1	2x10 ⁻⁸¹	61
<i>yzdE</i>	E, G	WP_128496480.1	1x10 ⁻²⁸	80.6
<i>yebE</i>	S	WP_014469850.1	2x10 ⁻¹¹⁷	93.5
<i>yebG</i>		WP_007609843.1	2x10 ⁻³⁶	83.1
<i>yerD</i>	E	WP_128496491.1	0	79.8
<i>yfhD</i>		WP_003155508.1	5x10 ⁻³⁶	85.7
<i>yfhE</i>		WP_003155504.1	2x10 ⁻¹⁹	97.2
<i>yfhF</i>	S	WP_017419146.1	0	78.2
<i>yfhK</i>		WP_128496518.1	2x10 ⁻⁵⁹	52.8
<i>yfhL</i>	S	WP_053285204.1	6x10 ⁻²⁹	51.5
<i>yfhM</i>	S	WP_022552789.1	2x10 ⁻¹⁵⁴	70.6
<i>yfhO</i>	S	WP_128496519.1	0	65.7
<i>yfkD</i>		WP_088056277.1	2x10 ⁻¹⁷⁴	85.2
<i>yfkH</i>	S	WP_007408509.1	6x10 ⁻¹⁷²	82.2
<i>yfkl</i>		WP_095061139.1	1x10 ⁻³⁶	50.5
<i>yfkj</i>	T	WP_109566786.1	6x10 ⁻⁸¹	68.8
<i>yfkM</i>	S	WP_003155578.1	1x10 ⁻¹¹²	90
<i>yfkQ</i>	S	WP_128496439.1	3x10 ⁻¹⁵⁶	45.8
<i>yfkr</i>	S	WP_022552581.1	4x10 ⁻²⁸	24.9
<i>yfkt</i>	S	WP_012118599.1	3x10 ⁻¹⁵	23.5
<i>yflA</i>	O	WP_007410311.1	2x10 ⁻⁸⁴	35
<i>yflB</i>	S	WP_014417184.1	4x10 ⁻⁶⁶	75
<i>yflG</i>	J	WP_014417181.1	5x10 ⁻¹⁷⁷	93.2
<i>yflH</i>	S	WP_003155607.1	2x10 ⁻⁴⁴	71.1
<i>yflI</i>	S	WP_003155608.1	2x10 ⁻¹²	76.5
<i>yflT</i>	S	WP_003155650.1	1x10 ⁻⁷³	86.1
<i>yghB</i>	S	WP_128496534.1	0	75.9
<i>yhcM</i>		WP_128496529.1	1x10 ⁻³⁰	33.3
<i>yhdF</i>	S	WP_021494913.1	3x10 ⁻¹⁷²	80.6
<i>yhdN</i>	C	WP_128496417.1	2x10 ⁻⁷²	42
<i>yhdD</i>	S	WP_021495145.1	0	84.3

Gen	COG	WP	e-value	I (%)
<i>yisP</i>	I	WP_053285064.1	1x10 ⁻⁶⁰	48.6
<i>yitT</i>	S	WP_007610547.1	0	91.8
<i>yjbC</i>	S	WP_007409110.1	5x10 ⁻¹³¹	89.1
<i>yjgB</i>		WP_029973096.1	2x10 ⁻¹⁷⁹	59.9
<i>yjgC</i>	C	WP_128496585.1	0	86.4
<i>yjgD</i>	S	WP_012117344.1	2x10 ⁻⁹⁴	74.6
<i>yjgB</i>	Q	WP_088056523.1	0	65.1
<i>yjic</i>	C, G	WP_128496586.1	0	60.7
<i>yjzE</i>		WP_014417440.1	1x10 ⁻²⁷	58.3
<i>ykgA</i>	E	WP_053285023.1	2x10 ⁻¹³²	60.2
<i>ykgB</i>	G	WP_021493810.1	0	77.4
<i>ykcC</i>	G	WP_017417710.1	2x10 ⁻¹⁷⁶	85.7
<i>ykuT</i>	M	WP_022552756.1	2x10 ⁻²⁹	34.8
<i>ykzC</i>		WP_003154511.1	1x10 ⁻⁵⁸	63.5
<i>ykzI</i>		WP_003154513.1	2x10 ⁻³⁶	91.9
<i>ytxP</i>	S	WP_003154188.1	6x10 ⁻⁶¹	92.4
<i>ytxR</i>	K	WP_003154193.1	3x10 ⁻⁶⁰	94.5
<i>ytxS</i>	S	WP_007409801.1	3x10 ⁻¹⁰⁷	91.7
<i>ymzB</i>		WP_128496647.1	2x10 ⁻⁵⁵	71.1
<i>yobA</i>	J	WP_014418009.1	2x10 ⁻⁷⁹	61.3
<i>yocB</i>		WP_017417957.1	9x10 ⁻¹³⁶	71.7
<i>yocK</i>	T	WP_017417961.1	5x10 ⁻⁸⁷	71.2
<i>yoxB</i>		WP_021494175.1	1x10 ⁻⁸⁹	52.4
<i>yoxC</i>	S	WP_014418090.1	1x10 ⁻²⁰	43.8
<i>ypuD</i>		WP_003153366.1	2x10 ⁻⁵⁸	81.6
<i>yqhB</i>	P	WP_029973873.1	0	71.6
<i>yqhP</i>		WP_007408340.1	5x10 ⁻⁶⁶	80.9
<i>yqhQ</i>	S	WP_053284919.1	0	85.9
<i>yqjL</i>	S	WP_014418323.1	1x10 ⁻¹²⁷	66.2
<i>yqzL</i>		WP_007408286.1	9x10 ⁻²⁷	89.4
<i>yraA</i>	S	WP_065180600.1	5x10 ⁻¹¹¹	88.8
<i>yrdB</i>		WP_003152498.1	3x10 ⁻⁷⁶	80.8
<i>ytaB</i>	S	WP_014418714.1	2x10 ⁻⁷⁸	69.9
<i>ytfP</i>	S	WP_100261959.1	0	87.4
<i>ytiB</i>	P	WP_003152233.1	1x10 ⁻¹¹⁹	82.4
<i>ytkC</i>	S	WP_007408834.1	4x10 ⁻⁸⁰	82.8
<i>ytkK</i>	C	WP_128496774.1	1x10 ⁻¹⁶⁸	88.2
<i>ytkL</i>	S	WP_007613083.1	2x10 ⁻¹⁵⁷	92.1
<i>ytxG</i>	S	WP_007408777.1	4x10 ⁻⁸⁹	89.3
<i>ytxH</i>	S	WP_003152380.1	7x10 ⁻⁵⁹	72.2
<i>ytxJ</i>	S	WP_014418654.1	3x10 ⁻⁶³	78.7
<i>yugU</i>	S	WP_014418738.1	3x10 ⁻⁸⁵	81.8
<i>yuzA</i>	S	WP_003152104.1	4x10 ⁻⁵⁰	96.2
<i>yuzH</i>		WP_014418736.1	1x10 ⁻⁴²	76.8
<i>yvaK</i>	S	WP_007409986.1	0	95.5
<i>yvbG</i>	U	WP_007409973.1	3x10 ⁻¹³²	87.1
<i>yvgN</i>	S	WP_007410023.1	0	90.9
<i>yvgO</i>		WP_025649280.1	2x10 ⁻⁹⁹	80.1
<i>yvxE</i>	G	WP_017418936.1	5x10 ⁻¹⁷⁷	78.3
<i>ywiE</i>	I	WP_094296212.1	0	80.6
<i>ywjA</i>	V	WP_128496961.1	0	88
<i>ywjB</i>	H	WP_017418861.1	3x10 ⁻⁴⁹	46.2
<i>ywjC</i>		WP_003151087.1	3x10 ⁻⁴⁷	70.8
<i>ywiB</i>	E	WP_007614382.1	9x10 ⁻⁶³	61.2
<i>ywmF</i>	S	WP_021494817.1	1x10 ⁻⁸⁹	76.1
<i>ywsB</i>		WP_007407525.1	1x10 ⁻⁶⁴	67.6
<i>ywtG</i>	G	WP_007407509.1	0	87
<i>yxaA</i>	G	WP_128496392.1	3x10	

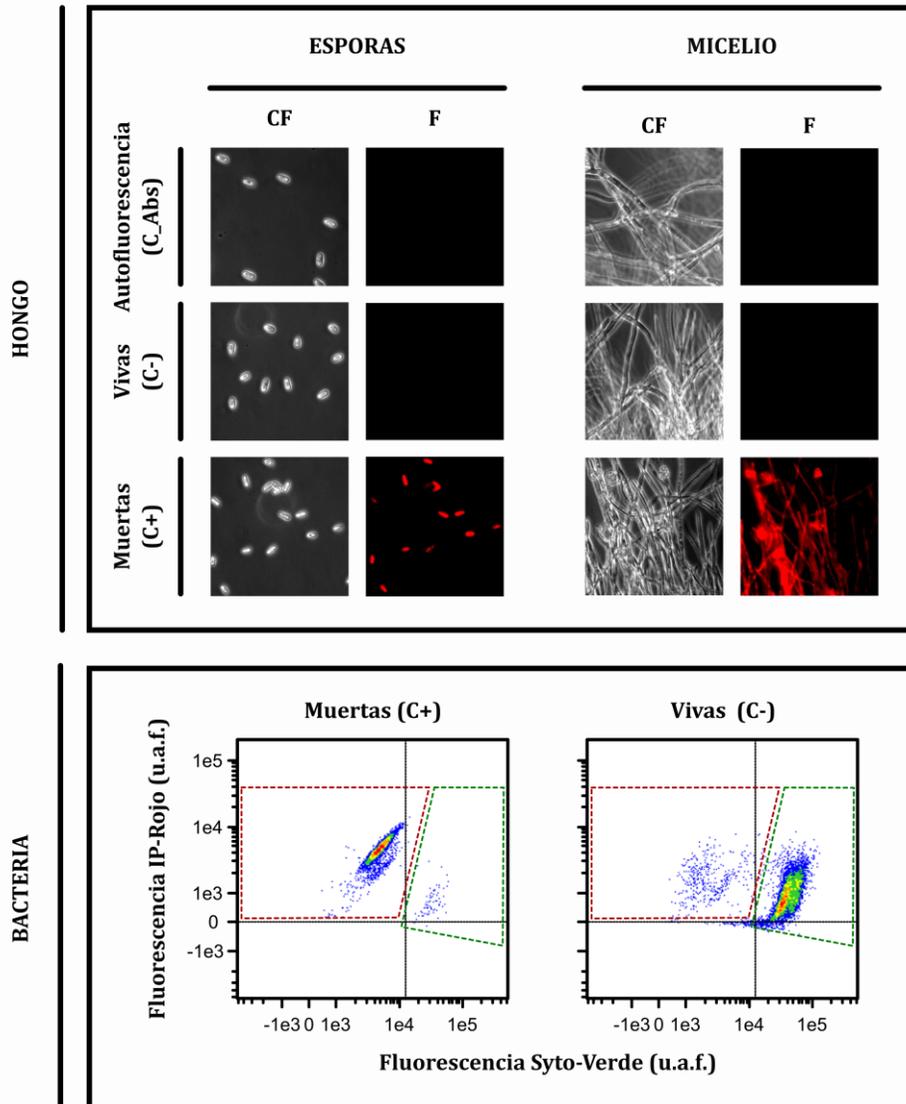


Figura 1S. Controles para analizar viabilidad de suspensiones celulares miceliales y de bacteria. Arriba. Ensayo de viabilidad por tinción con yoduro de propidio (YP) y microscopía de fluorescencia de suspensiones de células de *C. gloeosporioides*. Los controles absolutos corresponden a células no tratadas, el control negativo a células tratadas con YP y el control positivo a células tratadas con YP tras someterlas a choque térmico (80 °C, 15 min). Se muestran las micrografías en contraste de fases (CF) y fluorescente (F) tanto para una suspensión de esporas como de *pellets* (micelio). Abajo. Ensayo de viabilidad por doble tinción con yoduro de propidio (YP) y Syto 9 (S9) y citometría de flujo de células vegetativas de *B. velezensis* 83. De forma similar al caso anterior, el control negativo corresponde a células tratadas con doble tinción YP/S9 y el control positivo a células tratadas con YP/S9 tras someterlas a choque térmico (80 °C, 15 min). En el caso del control absoluto, corresponden a células no tratadas (citograma no mostrado).



Cultivo	Tiempo	Código	Lecturas	QS-Fhred	Coertura	N. Mapeos	% Mapeo
Axénico	8	A8_1	12,000,000	>33	75	1,002,210	8
		A8_2	12,000,000	>34	134	1,780,928	14
		A8_3	11,500,000	>33	76	1,013,274	8
	13	A13_1	11,500,000	>34	90	1,204,267	10
		A13_2	12,000,000	>34	122	1,626,413	13
		A13_3	12,000,000	>33	139	1,855,912	15
Co-cultivo	8	C8_1	13,000,000	>34	148	1,965,723	15
		C8_2	11,500,000	>33	101	1,346,189	11
		C8_3	14,000,000	>33	110	1,472,398	10
	13	C13_1	12,500,000	>34	161	2,147,153	17
		C13_2	12,000,000	>33	98	1,310,296	10
		C13_3	12,500,000	>33	91	1,214,048	9

Figura 2S. Validación de la integridad de muestras de ARN, calidad y profundidad de la secuenciación masiva. Arriba y a la izquierda, ejemplos de electroforesis capilares de algunas muestras obtenidas: 1) Axénico 8 h (RIN=9.4) , 2) Axénico de 13h (RIN=9.3), 3) Co-cultivo 8 h (RIN=9.0) y 4) Co-cultivo (RIN=9.6). Arriba y la derecha, diagrama de calidad Phred (QP ≥ 33) de una de las librerías (Co-cultivo 8 h). Abajo, procesamiento bioinformático inicial de las muestras de RNA-seq. Se obtuvieron librerías bi-pareadas cuya calidad promedio se indica en la columna QS-Fhred. El % de Mapeo corresponde al obtenido vía Software Salmón utilizando el genoma de *B. velezensis* 83 como templado. La cobertura se obtuvo mediante la siguiente aritmética: [(Número de lecturas)*(Factor de tipo de librería)*(Longitud del fragmento)]/Tamaño del genoma en pb. Para nuestro caso, =[(Número de lecturas)*(2)*(150)]/3997902.

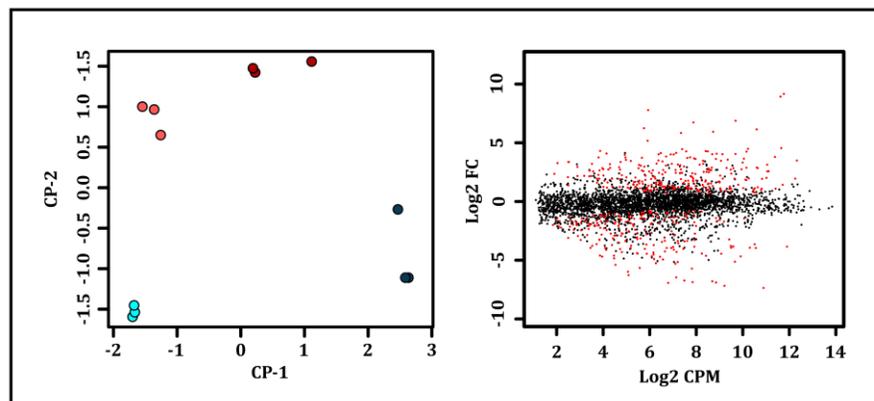


Figura 3S. Reproducibilidad de librerías y resultados globales del análisis de expresión diferencial. A la izquierda, diagrama de componentes principales (CP-1 y CP-2). Círculos azules y rojos indican describen los datos provenientes del cultivo axénico y co-cultivo, respectivamente. De la misma manera, círculos con colores tenues e intensos corresponden a 8 y 13 horas de incubación, respectivamente. A la derecha, diagrama del factor de cambio (FC) con respecto a la media de su nivel de expresión en cuentas por millón (CPM) . Puntos rojos y negros indican secuencias codificantes con y sin cambio de expresión.

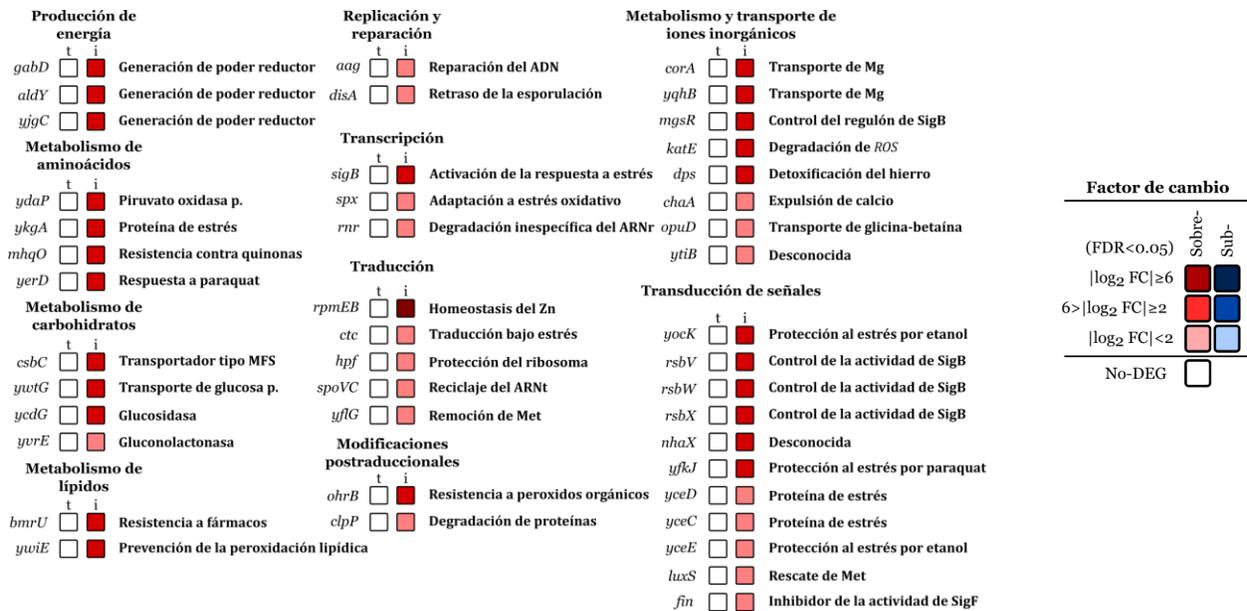


Figura 4S. Clasificación ortológica de los genes pertenecientes al regulón del factor sigma alternativo SigB (σ_B) afectados por la interacción microbiana. Los genes correspondientes a proteínas hipotéticas o de función desconocida no son mostrados.

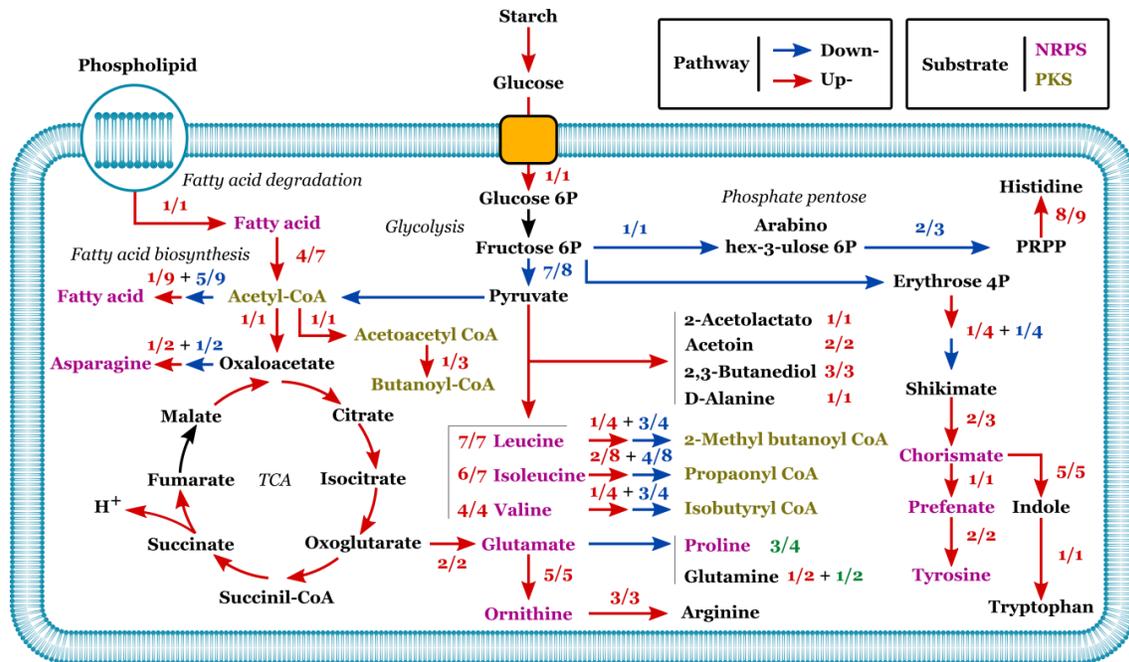


Figura 5S. Dinámica transcripcional de las rutas centrales del metabolismo encargadas de la biosíntesis de precursores de metabolitos antimicrobianos en *B. velezensis* 83 durante cultivos axénicos. La figura muestra los resultados del análisis de expresión diferencial al comparar los transcriptomas de células del monocultivo correspondientes a dos momentos (13 hr [$\times 10^9$ células/mL] vs 8 hr [$\times 10^6$ células/mL]). El color de las líneas que denotan las reacciones enzimáticas refleja los cambios transcripcionales observados, donde los colores rojo y azul indican sobre- y sub-expresión de los genes correspondientes. Además, en el diagrama se utilizan fracciones para denotar los casos donde es necesario más de una reacción enzimática para la conversión de los metabolitos. En estas fracciones, el numerador indica el número de genes con cambios transcripcionales significativos y el denominador, el número total de reacciones necesarias para lograr la conversión. Asimismo, se indica con suma de fracciones cuando existen simultáneamente casos de sobre-expresión y/o sub-expresión de los genes correspondientes en la misma vía metabólica. Los precursores para la síntesis de péptidos no ribosomales y policétidos son indicados con color morado y dorado, respectivamente. Por ejemplo, en el caso de la surfactina se requiere de siete precursores: ácidos grasos, ácido glutámico, leucina, isoleucina, valina, aspartato y ATP. Por simplificación se omiten las rutas de la respiración celular (y generación de ATP) y los nombres de las enzimas implicadas. Los resultados apoyan la hipótesis de que la síntesis de precursores y antibióticos está sincronizada.