

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



ANÁLISIS GENÓMICO E IDENTIFICACIÓN DE FACTORES DE
VIRULENCIA DE UN CONSORCIO DE *Bacillus spp.*
PATÓGENOS POTENCIALES DEL CHILE
HABANERO (*Capsicum chinense* Jacq.)

POR

Q.B.P. OSCAR NOÉ FLORES CASTILLO

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN
EN MICROBIOLOGÍA

Julio, 2021

ANÁLISIS GENÓMICO E IDENTIFICACIÓN DE FACTORES
DE VIRULENCIA DE UN CONSORCIO DE *Bacillus spp.*
PATÓGENOS POTENCIALES DEL CHILE
HABANERO (*Capsicum chinense* Jacq.)

Comité de Tesis



Dra. María Julissa Ek Ramos
Presidente



Dra. Patricia Tamez Guerra
Secretario



Dr. Ricardo Alberto Gómez Flores
Vocal



Dr. Hamlet Avilés Arnaut
Vocal



Dr. César Iván Romo Sáenz
Vocal



Dra. Katiushka Arévalo Niño
Subdirector de posgrado



SUBDIRECCIÓN
DE POSGRADO

ANÁLISIS GENÓMICO E IDENTIFICACIÓN DE FACTORES
DE VIRULENCIA DE UN CONSORCIO DE *Bacillus spp.*
PATÓGENOS POTENCIALES DEL CHILE
HABANERO (*Capsicum chinense* Jacq.)

Dirección de Tesis



Dra. María Julissa Ek Ramos
Director



Dra. Claudia Martínez Anaya
Director externo

AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento:

Al CONACyT por brindarme la beca de maestría para así poder tener el sustento durante este proceso.

A la Dra. María Julissa Ek Ramos, por su apoyo y preocupación constante en asesorarme de la mejor manera en la realización de esta tesis, por aceptarme en su equipo de trabajo, por sus sugerencias, enseñanzas y consejos.

A la Dra. Patricia Tamez Guerra por su valiosa ayuda, por el espacio brindado en su equipo, por contribuir en mi formación académica, disponibilidad para atenderme y por la certeza de sus comentarios para la realización de este trabajo.

A la Dra. Claudia Martínez Anaya, por su apoyo como directora de tesis, por la certeza de sus comentarios para la realización de este proyecto. Además por su gran ayuda en la secuenciación de las cepas financiada por el proyecto DGAPA-PAPIIT IN211019.

Al Dr. Ricardo Alberto Gómez Flores, Dr. Hamlet Avilés Arnaut y al Dr. César Iván Romo Sáenz, por su disponibilidad de tiempo para asesorarme en el desarrollo de este trabajo.

A mis amigos de la facultad, César, Mario, Cecy, Esteban, del laboratorio Unidad de Formulación de Biológicos-FCB (Servando, Ricardo, Feli, Angello, Mario, Lalo, Jesi, Rosa, Oziel) por compartir sus conocimientos, por hacer más amenas las horas en el trabajo experimental, pero, sobre todo por su amistad.

A Yuliana Edith Valdez Ortiz, por su confianza, motivación, cariño y amor. Aunque no sabemos que nos deparará el futuro, has sido y eres una persona muy especial para mí.

DEDICATORIA

A mis padres Lorena y Noé que siempre me han apoyado en las decisiones que he tomado, por enseñarme que todo se puede lograr con dedicación, esfuerzo y paciencia.

A mis hermanos Alvis Joel, Adrián, Isabel Alejandra y al resto de mi familia, por sus consejos y compañía.

ÍNDICE

SECCIÓN	PÁGINA
LISTA DE TABLAS	VII
LISTA DE FIGURAS	VIII
LISTA DE SÍMBOLOS Y FIGURAS	IX
RESUMEN	XI
ABSTRACT	XII
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Sistema de Defensa de las Plantas Contra Microorganismos	3
2.2 Enzimas Degradadoras de Pared Celular de Plantas	4
2.3 Efectos Benéficos de Consorcios de <i>Bacillus spp.</i> en Plantas	5
2.4 Microorganismos Patógenos de <i>C. chinense</i>	6
2.5 Modelo de Estudio y Ventajas del Cultivo in vitro de Células o Tejidos Vegetales	7
2.6 Microscopia de Fluorescencia de Tejidos Vegetales	8
2.7 Herramientas Bioinformáticas	8
3. JUSTIFICACIÓN	10
4. HIPÓTESIS	11
5. OBJETIVOS	12
5.1 Objetivo General	12
5.2 Objetivos Particulares	12
6. MATERIALES Y MÉTODOS	13
6.1 Germinación y Condiciones de Crecimiento de Plantas de Chile Habanero	13
6.2 Cultivo del Consorcio Patogénico de <i>Bacillus spp.</i>	13
6.3 Bioensayos	14
6.4 Análisis Morfológico	14
6.5 Extracción de ADN de las Especies del Consorcio de <i>Bacillus spp.</i> y Análisis Filogenético	15
6.6 Análisis Bioinformático	16
6.7 Análisis Estadístico	17
7. RESULTADOS	18
7.1 Morfología Colonial y Microscópica del Consorcio de <i>Bacillus spp.</i>	18
7.2 Efectos del Consorcio Patogénico de <i>Bacillus spp.</i> en Hojas de Plantas de Chile Habanero	19
7.3 Estadísticos Básicos y Evaluación de la Calidad de Secuenciación	22
7.4 Anotación y Clasificación Funcional de Proteínas	27
7.5 Genomas Circulares de las Especies del Consorcio	29

7.6 Análisis Genómico Comparativo	32
7.7 Análisis Filogenético	33
7.8 Enzimas que Degradan Pared Celular de Plantas	34
7.9 Proteínas Candidatas que Contribuyen a Fitopatogenicidad	40
8. DISCUSIÓN	41
8.1 Análisis Genómico de las Especies del Consorcio de <i>Bacillus</i> <i>spp.</i>	41
8.2 Enzimas que Degradan Pared Celular de Plantas	44
8.3 Proteínas Candidatas de Fitopatógenos	47
9. CONCLUSIÓN	50
10. PERSPECTIVAS	50
11. BIBLIOGRAFÍA	51
12. RESUMEN BIOGRÁFICO	68

LISTA DE TABLAS

TABLA	DESCRIPCIÓN	PÁGINA
1	Estadísticos básicos de secuenciación de los genomas	23
2	Resumen de las características generales de los genomas de las especies	26
3	Fragmento de plásmido identificado en el conjunto de datos	32
4	Comparación de características genómicas generales de cepas de <i>Bacillus</i>	33
5	Familias de glicósido hidrolasas predecidas en las especies del consorcio	37
6	Familias de carbohidrato esterasas, polisacárido liasas, módulos unión a carbohidratos y actividades auxiliares predecidas en las especies del consorcio	39
7	Proteínas candidatas a fitopatogenicidad en las especies del consorcio de <i>Bacillus spp.</i>	40

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	DESCRIPCIÓN	PÁGINA
1	Morfología de <i>Bacillus spp.</i> cultivado en agar YDC a 25 ± 2 °C	18
2	Morfología microscópica del consorcio <i>Bacillus spp.</i> cultivado en agar YDC incubado a 25 ± 2 °C por 2 y 4 días, respectivamente	19
3	Imágenes representativas del daño observado en hojas infectadas por el consorcio de <i>Bacillus spp.</i>	20
4	Prueba K-W comparación múltiple de medias con corrección de Bonferroni alfa= 0.005	21
5	Imágenes representativas de las reacciones de las hojas a las 72 h p.i.	22
6	Análisis de la distribución en la longitud de las lecturas y porcentaje de GC	24
7	Estimación del error de secuenciación por el método DRISSE	25
8	Total de las proteínas anotadas de los tres genomas basada en KEGG	27
9	Clasificación funcional de las proteínas codificadas por los genomas de las especies	29
10	Mapas de los genomas de las especies del consorcio	31
11	Árbol filogenético construido con secuencias del gen 16S del ARNr	34
12	Enzimas activas en carbohidratos (CAZy) predecidas en los genomas de las especies	35
13	Comparación múltiple contra genomas de especies fitopatógenas de enzimas activas en carbohidratos (CAZy) predecidas	36

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

Actividad Auxiliar	AA
Algoritmo Modelo de Markov para alineamiento de secuencias	HMMER
Alineamiento con Doble Índice para Datos NGS (por sus siglas en inglés)	DIAMOND
Análisis Genético Evolucionario Molecular (por sus siglas en inglés)	MEGA
Anotación Rápida de Metagenomas mediante Tecnología de Subsistemas (por sus siglas en inglés)	MG-RAST
Anotación de Enzimas Activas en Carbohidratos (por sus siglas en inglés)	dbCAN2
Anotación Rápida usando Tecnología de Subsistemas (por sus siglas en inglés)	RAST
Base de datos de proteínas no-redundante (por sus siglas en inglés)	M5nr
Carbohidrato Esterasa	CE
Carbonato de calcio, dextrosa, extracto de levadura (por sus siglas en inglés)	YDC
Centro de Integración de Recursos de Patógenos (por sus siglas en inglés)	PATRIC
Densidad óptica	DO
Enciclopedia de Genes y Genomas de Kioto (por sus siglas en inglés)	KEGG
Enzimas Activas en Carbohidratos (por sus siglas en inglés)	CAZy
Enzima Degradadora de Pared Celular de Plantas (por sus siglas en inglés)	PCWDE
Estimación del Error de Secuenciación Inferido por Lecturas Duplicadas (por sus siglas en inglés)	DRISEE
Genoma Ensamblado de Metagenoma (por sus siglas en inglés)	MAG
Glicosil Hidrolasa	GH
Glicosil Transferasa	GT
Herramienta de Alineamiento Básico Local (por sus siglas en inglés)	BLASTN
Homología de patrones en péptidos (por sus siglas en inglés)	Hotpep

Inmunidad Desencadenada por Efector (por sus siglas en inglés)	ETI
Inmunidad Desencadenada por Patrón (por sus siglas en inglés)	PTI
Kilo bases	kb
Kilo pares de bases	kpb
Mega pares de bases	Mbp
Módulo Unión a Carbohidrato (por sus siglas en inglés)	CBM
Murashige y Skoog	MS
Pares de bases	pb
Patrón Molecular Asociado a Daño (por sus siglas en inglés)	DAMP
Patrón Molecular Asociado a Microorganismo (por sus siglas en inglés)	MAMP
Polisacárido Liasa	PL
Proteína de Resistencia a Enfermedad	R
Reconocimiento de Patrones (por sus siglas en inglés)	PRR
Respuesta de Hipersensibilidad (por sus siglas en inglés)	HR
Rizobacteria Promotora del Crecimiento Vegetal (por sus siglas en inglés)	PGPR
Secuencia Codificante (por sus siglas en inglés)	CDS
Secuenciación de Siguiete Generación (por sus siglas en inglés)	NGS
Servicio de Asignación RAST (por sus siglas en inglés)	RBS
Servidor de Anotación Automática KEGG (por sus siglas en inglés)	KAAS
Sistema para análisis comparativo y anotación de genomas	SEED
Visor de Genomas Circulares (por sus siglas en inglés)	CGView

RESUMEN

En los últimos años se ha reportado la capacidad que tienen especies del género *Bacillus* para promover el crecimiento de plantas, sin embargo, otras especies son fitopatógenas. Los análisis genómicos de especies fitopatógenas nos pueden ayudar a entender la patogénesis y desarrollar estrategias de control contra cepas emergentes. Actualmente existe una variedad de bases de datos y herramientas bioinformáticas que facilitan el análisis para entender procesos que, hasta hace no mucho, solo podían estudiarse experimentalmente. En otro contexto, los chiles representan una tradición culinaria y símbolo cultural en México; el chile habanero de Yucatán cuenta con denominación de origen desde el 2010 y ha logrado posicionarse tanto en el mercado nacional como internacional. En este trabajo nos propusimos analizar los genomas de un consorcio patogénico de *Bacillus spp.* en búsqueda de posibles factores involucrados en ese proceso empleando plantas de chile habanero. En base a los resultados obtenidos, concluimos que: el aislado de *Bacillus spp.* es capaz de causar síntomas de enfermedad a plantas de chile habanero. El análisis morfológico al microscopio de fluorescencia de las hojas a las 72 h post-infección, demostró que el tratamiento mezcla y con *B. paralicheniformis* hubo una modificación en la estructura de la pared celular comparada contra el tratamiento sin infectar donde se observó que se conservó la arquitectura del tejido. Mediante secuenciación de los genomas y del gen 16S del ARNr se identificaron las especies: *B. paralicheniformis*, *B. pumilus* y *B. safensis*. Se destaca que el análisis de predicción de enzimas activas en carbohidratos (CAZy) reveló que los tres genomas contienen numerosas PCWDEs comparables a otras especies de *Bacillus* reportadas como fitopatógenas, asimismo, el análisis *in silico* demostró que los genomas contienen genes relacionados al ensamble de flagelos, así como de sistemas de secreción de proteínas que podrían contribuir a su patogenicidad.

ABSTRACT

In recent years, the ability of species of the *Bacillus* genus to promote plant growth has been reported, however, other species are phytopathogens. Genomic analyzes of phytopathogens can help to understand their mechanisms of virulence in order to develop control strategies against emerging diseases. Currently, a variety of databases and bioinformatics tools facilitate analyzing processes that, until not long ago, could only be studied experimentally. In another context, chili peppers are a culinary tradition and represent a Mexican cultural symbol; the habanero pepper from Yucatán has had an origin designation since 2010, with an important position in both, national and international markets. In this work we set out to analyze the genomes of a pathogenic consortium of *Bacillus spp.* in search of possible virulence factors involved in infection using habanero pepper as a plant model. Based on the results obtained, we conclude that: the *Bacillus spp.* consortium is capable of causing disease symptoms to habanero pepper plants. In morphological analysis under the fluorescence microscope of the leaves at 72 h post-infection, we determined that treatment with the consortium and with *B. paralicheniformis*, provoked a modification of the host cell wall structure compared to the uninfected plant, which showed a preserved tissue architecture. By whole genome sequencing and 16S rRNA gene sequences, the species were identified as: *B. paralicheniformis*, *B. pumilus* and *B. safensis*. Our predictive analysis of carbohydrate active enzymes (CAZy) revealed that the three genomes contain numerous PCWDEs comparable to other *Bacillus* species reported as phytopathogens. The *in silico* analysis also showed that the genomes contain genes related to the assembly of flagella, as well as protein secretion systems that could contribute to their pathogenicity.

1. INTRODUCCIÓN

La secuenciación de genomas ha sido revolucionada por las tecnologías de secuenciación de siguiente generación (NGS), la cual puede producir grandes cantidades de datos a un costo relativamente bajo (Lee et al. 2011). Estas tecnologías NGS proveen un nuevo enfoque en el estudio de especies patógenas permitiendo la comparación de múltiples familias génicas a nivel genómico y transcriptómico (Brunner et al. 2013). El rápido progreso en secuenciación genómica bacteriana ha llevado al descubrimiento y caracterización de muchos factores de virulencia de diversas especies (Chen et al. 2005, 2016).

Varios factores le confieren al microorganismo potencial de virulencia: su habilidad de entrar al hospedero, evadir sus defensas, crecer en el ambiente del hospedero y la capacidad de contrarrestar la respuesta inmune. Estudiar los factores de virulencia facilita el entendimiento de la patogenicidad y los mecanismos de infección, y ayuda a los investigadores a intentar desarrollar nuevos métodos para prevenir o controlar enfermedades (Casadevall y Pirofski 2009).

Diversos estudios han reportado que especies del género *Bacillus* son promotoras del crecimiento vegetal (PGPR, por sus siglas en inglés) (Borriss 2015; Hashem et al. 2019). Otros PGPR incluyen a los géneros *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Rhizobium* y *Frankia* (Glick 1995). Sin embargo, hay reportes de especies de *Bacillus* fitopatógenas; *B. pumilus* causando enfermedad en robles (Ahmadi et al. 2019), *B. pumilus* GR8 que infecta jengibre (Peng et al. 2013; Yuan y Gao 2015), *B. pumilus* TE07 causando pudrición de frutos del árbol *Ficus lacor* (Hakim et al. 2015), *B. pumilus* infectando pinos Scots (Kovaleva et al. 2015), *B. pumilus* OD23 que infecta papa (Bathily et al. 2010), *B. pumilus* (dos aislados; 50/08-C1 y 71/08-C2) que infectan hojas de frijol (Font et al. 2010), *Bacillus* sp. infectando árboles de pera (Li et al. 2009), *B. pumilus* infectando árboles de mango (Galal et al. 2006), *B. pumilus* que infecta frutos y hojas del árbol duraznero (Saleh et al. 1997) y *B. megaterium* pv. *cerealis* que infecta hojas del trigo (Hosford 1982).

En un estudio realizado por (Yuan y Gao 2015) reportaron a *B. pumilus* GR8 como patógeno que causa podredumbre del rizoma del jengibre mediante la invasión del tejido

parenquimatoso, creciendo en el espacio extracelular y produciendo enzimas degradadoras de pared celular de plantas (PCWDEs, por sus siglas en inglés) que destruyen la pared celular vegetal. Los autores secuenciaron y caracterizaron el genoma de dicha cepa encontrando en el análisis bioinformático numerosas enzimas PCWDEs y otras proteínas asociadas con procesos de invasión y adaptación al ambiente extracelular del rizoma.

En otro contexto, el cultivo de células o tejidos del chile ha sido utilizado como modelo para estudiar diversos procesos bioquímicos, fisiológicos y moleculares así como sistemas para el aislamiento de variantes celulares que exhiben características bioquímicas o agronómicas (Ochoa-Alejo y Ramirez-Malagon 2001). Dado lo anteriormente expuesto, y a las ventajas del cultivo *in vitro*, en este proyecto de tesis nos propusimos identificar genes involucrados en el proceso de patogénesis por parte del consorcio de *Bacillus spp.* sobre plantas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.).

2. ANTECEDENTES

2.1 Sistemas de Defensa de las Plantas Contra Microorganismos

Las plantas están continuamente expuestas a patógenos, por lo que han desarrollado defensas versátiles y efectivas que consisten en barreras físicas, químicas y respuestas inducibles activadas después de la interacción del patógeno con la planta (Choudhary y Johri 2009). Las bacterias fitopatógenas proliferan en los espacios intercelulares después de entrar por los poros de gas o agua (estomas e hidátodos) o a través de heridas (Jones y Dangl 2006). Las plantas dependen principalmente de dos niveles interconectados del sistema inmunológico innato para percibir y responder a las infecciones por patógenos (Jones y Dangl 2006; Spoel y Dong 2012; Han 2019). Uno utiliza receptores de reconocimiento de patrones (PRR) para reconocer patrones moleculares asociadas a microorganismos (MAMPs) como lipopolisacáridos, peptidoglicanos y flagelina de bacterias, y patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) (Nürnberger et al. 2004; Spoel y Dong 2012). Los otros usan las proteínas de resistencia a enfermedad (R) que responden a las moléculas efectoras que son secretadas por los patógenos que ayudan a establecer una infección exitosa y suprimir la inmunidad de la planta (Han 2019).

La percepción de MAMPs o DAMPs por los PRR activa la defensa contra los patógenos, conocida como inmunidad desencadenada por patrones (PTI) (Nürnberger et al. 2004; Jones y Dangl 2006). Los mecanismos de defensa de las plantas incluyen procesos que resultan en la activación transcripcional de genes de respuesta a la patogénesis, como la producción de enzimas líticas (quitinasas, glucanasas y proteasas), proteínas antimicrobianas (defensinas) o metabolitos secundarios como fitoalexinas. Otras respuestas son la activación de enzimas para el reforzamiento de la pared celular mediante el entrecruzamiento de enlaces, la producción de intermediarios reactivos del oxígeno y óxido nítrico que resultan tóxicos para el microorganismo (Lebeda et al. 2001; Nürnberger et al. 2004; Bellincampi et al. 2014; Balint-Kurti 2019).

Los patógenos han desarrollado un repertorio de efectores que son liberados a las células de las plantas para interferir con la PTI (Jones y Dangl 2006; Spoel y Dong 2012). Para contrarrestar esta infección, las plantas usan las proteínas R para responder contra

los efectores a través de unión directa o sensando perturbaciones de las moléculas del huésped por los efectores del patógeno (Han 2019). El reconocimiento de estos efectores resulta en la inmunidad desencadenada por efector (ETI) (Jones y Dangl 2006; Spoel y Dong 2012). La ETI usualmente induce a una muerte celular programada en el sitio de infección, conocido como respuesta de hipersensibilidad (HR) y así limita localmente la dispersión del patógeno (Jones y Dangl 2006).

En la rizosfera las interacciones planta-microorganismo pueden ser benéficas, neutrales o perjudiciales. Muchos microorganismos tienen la capacidad de promover el crecimiento de la planta. Este tipo de bacterias están catalogadas como rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (Hashem et al. 2019). Las actividades metabólicas de esas bacterias en la rizosfera potencian el transporte y obtención de nutrientes hacia las raíces (Glick 1995).

2.2 Enzimas Degradadoras de Pared Celular de Plantas

Además de su función estructural, la pared celular de las plantas provee la primera línea de defensa contra patógenos que secretan enzimas que degradan pared celular (Juge 2006; Brunner et al. 2013). Los factores de virulencia le permiten al patógeno colonizar el nicho del hospedero donde el microorganismo prolifera y le causa daño al tejido. Estos factores incluyen: proteínas de secreción como toxinas y enzimas, estructuras en la superficie celular como polisacáridos de cápsula, lipopolisacáridos y proteínas de membrana que contribuyen directamente al proceso de enfermedad (Chen et al. 2005).

Los componentes principales de las paredes celulares de plantas son miembros de dos redes de polisacáridos, uno consiste en celulosa, hemicelulosa y el otro en polisacáridos pécticos. Adicionalmente contienen proteínas estructurales como glicoproteínas ricas en hidroxiprolina. Para penetrar las paredes celulares, los patógenos secretan una variedad de enzimas degradadoras de polisacáridos como: endo y poligalacturonasas, endo y exopectato liasas, endo y exopectina liasas, pectin metil esterases, endo y exoglucanasas, acetil esterases y β -glucosidasas que degradan celulosa (Lebeda et al. 2001; Bellincampi et al. 2014). Por ejemplo, la degradación de pectina requiere la acción combinada de varias pectinasas como las poligalacturonasas (PGs; EC 3.2.1.15), que rompen los enlaces entre los residuos de ácido D-galacturónico en el

homogalacturonano (Juge 2006) y pectin liasas (PLs; EC 4.2.2.10) que rompen los enlaces metil éster del ácido poligalacturónico de la pectina. El xiloglucano es el polisacárido predominante en la hemicelulosa de las paredes de mono y dicotiledóneas e interactúa con las microfibrillas de celulosa mediante puentes de hidrógeno, contribuyendo a la integridad estructural. Las endoglucanasas hidrolizan xiloglucano, celulosa o carboxi metil celulosa (Jahr et al. 2000).

2.3 Efectos Benéficos de Consorcios de *Bacillus spp.* en Plantas

En un estudio realizado por (Hashmi et al. 2019), se encontró que un consorcio de *Bacillus* aislado de suelo, mostró efectos positivos en el crecimiento de avena (*Avena sativa*), respecto a la germinación de semillas e incremento de biomasa total en ensayos *in vitro* e invernadero mediante la inoculación de endosporas o células vegetativas. El consorcio estaba formado por dos cepas de *B. thuringiensis* y una de *B. licheniformis*.

(Wang et al. 2012) encontraron que un consorcio de tres cepas PGPR (*B. cereus* AR156, *B. subtilis* SM21 y *Serratia sp.* XY21) le confería tolerancia a estrés por sequía a plantas de pepino manteniendo la eficiencia fotosintética e incrementando actividades anti oxidativas en sus raíces. Asimismo, (Zhang et al. 2019) con ese mismo consorcio evaluaron el efecto para el control de la podredumbre por *Phytophthora sp.* en *C. annuum* L. var. *grossum*, evaluando también el mejoramiento en la calidad de sus frutos. Concluyeron que el consorcio era capaz de alterar la microbiota del suelo y que ese cambio estaba relacionado positivamente con el contenido de fósforo disponible, potasio total, nitrógeno total, amonio y carbono orgánico total.

(Jaizme-Vega et al. 2004) reportaron que la aplicación con un consorcio de *Bacillus spp.*, al inicio de la aclimatación de dos cultivares de banano (*Musa sp.*), inducen un efecto positivo en el contenido de minerales foliares y desarrollo de frutos.

(Kaushal et al. 2019) en cultivos de *C. annuum*, evaluaron la actividad y formularon un consorcio compuesto por *B. subtilis* y *B. pumilus*. Encontraron que la incidencia de pudrición de las semillas y podredumbre de plántulas fue significativamente menor que los tratamientos sin el inóculo del consorcio. También observaron un incremento significativo en el rendimiento de frutos.

Por su parte, (Verma et al. 2018) aislaron y caracterizaron especies bacterianas para desarrollar un consorcio que promoviera el crecimiento de plantas, potenciar y hacer sustentables cultivos de soya verde (*Vigna radiata*). El consorcio que emplearon estaba conformado por *B. subtilis* BHUJP-H1, *Bacillus sp.* BHUJP-H2 y *B. licheniformis* BHUJP-H3.

El género *Bacillus spp.* puede existir en varios consorcios, el efecto puede ser benéfico o patogénico. Por lo tanto, es importante identificar los efectos cuando diferentes especies de *Bacillus* co-existen en determinadas circunstancias.

2.4 Microorganismos Patógenos de *C. chinense*

La mancha bacteriana es una enfermedad causada por la bacteria *Xanthomonas vesicatoria* y puede presentarse en todas las partes de la planta (hojas, frutos y tallos) (Robles-Hernández et al. 2017). Los primeros síntomas se presentan en las hojas, con manchas acuosas circulares, las cuales se necrosan con centros de color café y bordes cloróticos delgados. Generalmente las lesiones mecánicas, como las que se producen por uso de herramientas, insectos, viento y pulverización a alta presión, son las que causan la infección (Villa-Castorena et al. 2014)

Phytophthora capsici es un oomiceto que causa la marchitez del chile habanero. Como su nombre lo indica, el síntoma más común es un marchitamiento general o parcial, el daño se puede presentar en cualquier parte de la planta y en cualquier estado de desarrollo (Villa-Castorena et al. 2014). Los síntomas son la destrucción del xilema y floema, lo que impide el paso de agua y nutrientes a la parte aérea de la planta. Los frutos quedan adheridos a la planta y frecuentemente se observa el micelio de color blanco que cubre las semillas podridas en el interior del fruto, además en las hojas y ramas se desarrollan tizones,

Rhizoctonia solani es un hongo que provoca el “damping off”, o caída de plántulas como consecuencia del estrangulamiento y necrosis del tallo a nivel de cuello. En plantas adultas los síntomas se caracterizan por presentar lesiones cóncavas de color pardo rojizo que aparecen en el tallo y en la raíz principal (Villa-Castorena et al. 2014).

La marchitez vascular es causada por el hongo *Fusarium oxysporum* que invade el sistema vascular causando marchitez, clorosis y necrosis foliar (Villa-Castorena et al. 2014). En las hojas basales infectadas, las primeras indicaciones de enfermedad se observan como un amarillamiento unilateral, posteriormente las hojas se secan, pero permanecen adheridas a la planta. Su diseminación se realiza mediante semillas, viento, labores del suelo, plantas enfermas o herramientas contaminadas.

2.5 Modelo de Estudio y Ventajas del Cultivo *in vitro* de Células o Tejidos Vegetales

En México, los chiles representan una tradición culinaria y símbolo cultural, son económicamente importantes debido a su alto consumo de las diferentes variedades (Pino et al. 2007). El chile tipo habanero es de particular importancia por tener la más alta concentración de capsaicinoides que son responsables del picante (Barrales-López et al. 2015).

Por otro lado, el cultivo de tejidos vegetales ha sido ampliamente utilizado para estudios básicos relacionados con la fisiología de plantas (fotosíntesis, nutrición celular, embriones) bioquímica, metabolismo celular, morfogénesis (organogénesis, embriogénesis) fitopatología (interacción planta-microorganismo), histología (diferenciación celular) y citología (ciclo celular) (Thorpe 2007; Loyola-Vargas et al. 2008; Bhojwani y Dantu 2013).

Entre las ventajas de estos cultivos se encuentran: las plantas están libres de enfermedades, el proceso es independiente de las estaciones del año, se requiere un espacio relativamente pequeño, para la obtención de plantas no se requieren suplementos adicionales, producción masiva de plantas, rescate de ejemplares en peligro de extinción (Loyola-Vargas et al. 2008; Rosslee 2020).

Las células, tejidos u órganos se mantienen creciendo *in vitro* en medios artificiales bajo condiciones asépticas y ambientes controlados. Los medios de cultivo contienen todos los nutrientes requeridos para el crecimiento y desarrollo de las plantas. Están compuestos principalmente de macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, otros compuestos orgánicos y agentes gelificantes en caso de que sean sólidos (Murashige y Skoog 1962). El medio Murashige y Skoog (medio MS) es ampliamente utilizado para el

cultivo *in vitro* de muchas especies de plantas (Loyola-Vargas et al. 2008; Hussain et al. 2012).

Los reguladores del crecimiento vegetal tienen un rol importante para el desarrollo de la planta en el medio de cultivo. Las auxinas, citoquininas y giberelinas son los reguladores más comunes (Hussain et al. 2012). El tipo y la concentración de las hormonas depende de la especie de la planta a cultivar, tejido, órgano y objetivos del experimento (Rafiq et al. 2007).

2.6 Microscopía de Fluorescencia de Tejidos Vegetales

La microscopía de fluorescencia es una herramienta invaluable para estudiar procesos biológicos. La localización de los componentes de la pared celular utilizando moléculas fluorescentes con afinidad de unión específica por los polisacáridos ha llevado a un amplio conocimiento acerca del desarrollo (crecimiento) de células vegetales (Bidhendi et al. 2019).

La pared celular es como una armadura de polisacáridos que encapsula las células vegetales. Esa mezcla de polisacáridos define la forma de la célula y permite el establecimiento de turgencia al resistir la expansión debido a la absorción de agua impulsada osmóticamente (Bidhendi et al. 2019). El colorante fluorescente blanco de calcoflúor se une a los β -glucanos incluyendo celulosa, xiloglucanos y quitina (Herth y Schnepf 1980; Flores-Félix et al. 2015). Este compuesto fluorescente aún sigue ampliamente utilizado para la visualización de paredes celulares en general y para el estudio de la orientación de estructuras de celulosa particularmente (Flores-Félix et al. 2015; Bidhendi et al. 2019).

2.7 Herramientas Bioinformáticas

Muchos recursos bioinformáticos han sido desarrollados en los últimos años para analizar la cantidad masiva de datos generados por las plataformas NGS. Esta tecnología ha permitido a los investigadores realizar secuenciación a niveles que habrían sido inimaginables en el pasado (Tatusova et al. 2014). El gran incremento de datos de secuencias de ADN representa nuevos retos para el ensamble, anotación, análisis y visualización de estos. Por esta razón, el objetivo de tales herramientas computacionales

es acelerar el procesamiento de datos y asistir en su interpretación. Nuevos software y algoritmos están siendo desarrollados para mejorar la velocidad, eficiencia y la habilidad para manejar las características específicas de los datos producidos por NGS (Lee et al. 2011; Wong et al. 2019).

En el 2009, como iniciativa de la Universidad de Virginia en EUA y en colaboración con el Instituto de Alergias y Enfermedades Infecciosas y el Centro de Recursos Bioinformáticos de Microorganismos Patógenos, produjeron una de las fuentes más importantes de análisis de datos de bacterias, conocida como Centro de Integración de Recursos de Patógenos (PATRIC) proveyendo a los investigadores una base de datos de genomas bacterianos anotados, integración de datos ómicos y una herramienta de análisis que apoya la investigación de enfermedades infecciosas (Snyder et al. 2006; Wattam et al. 2014; Antonopoulos et al. 2019).

La integración de datos de las distintas entidades como el Centro Nacional de Información de Biotecnología (NCBI), Departamento de Agricultura de Estados Unidos, Centro de Control de Enfermedades y datos proporcionados por grupos de investigadores privados hace que la información que se conoce hasta el momento esté disponible para encontrar y comparar genomas de interés (Snyder et al. 2006; Wattam et al. 2014; Antonopoulos et al. 2019).

3. JUSTIFICACIÓN

En los últimos años se ha reportado la capacidad que tienen especies del género *Bacillus* para promover el crecimiento de plantas mediante el aumento en la obtención de nutrientes, fijación de nitrógeno, interacción con microorganismos simbióticos, así como en la reducción de metales tóxicos. Sin embargo, recientemente se han reportado especies de *Bacillus* como causantes de enfermedades en plantas. Por ello, la información genómica de cepas patógenas será de gran utilidad para conocer los factores involucrados en la enfermedad e identificar posibles estrategias de control para cepas patógenas emergentes.

4. HIPÓTESIS

Los genomas de un consorcio patogénico de *Bacillus spp.* aislado del tallo de una planta de girasol (*Helianthus annuus* L.) enferma contienen regiones responsables de su patogenicidad y es capaz de infectar plantas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.).

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Caracterización bioinformática y experimental de un consorcio de *Bacillus spp.* con actividad patogénica sobre plantas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.).

5.2 Objetivos Particulares

1. Caracterizar los efectos del consorcio patogénico de *Bacillus spp.* sobre hojas de plantas de *Capsicum chinense* bajo microscopía de fluorescencia mediante preparación en fresco y con el colorante fluorescente específico para la pared celular (blanco de calcoflúor).
2. Separar los miembros del consorcio de *Bacillus spp.* con base en sus características morfológicas.
3. Caracterizar los efectos de cada una de las especies del consorcio sobre hojas de plantas de *C. chinense* bajo microscopía de fluorescencia mediante preparación en fresco y con el colorante fluorescente específico para la pared celular (blanco de calcoflúor).
4. Identificar la presencia de genes responsables de la patogenicidad asociadas al género *Bacillus spp.* en el consorcio aislado y análisis completos de los genomas.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Germinación y Condiciones de Crecimiento de Plantas de Chile Habanero

Se usaron semillas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) de la marca comercial HortaFlor Cat. H 948 como modelo de estudio. Se esterilizó la superficie de las semillas y germinaron de acuerdo con (Santana-Buzzy et al. 2005) en condiciones asépticas, con soluciones y materiales estériles. Se sumergieron en etanol al 70% y se enjuagaron cuatro veces con agua destilada. Posteriormente, se sumergieron en hipoclorito de sodio comercial al 30% (v/v) por 15 minutos y se lavaron 5 veces con agua destilada. Luego se secaron con papel secante y se transfirieron a tubos de vidrio 18x150 mm tapados con torundas de algodón conteniendo 5 mL de medio MS (Murashige y Skoog 1962) (1/2 MS medio basal, 30 g/L sacarosa, 8 g/L agar agar, pH 5.8). Las semillas se incubaron a $24 \pm 2^\circ\text{C}$ en un fotoperíodo de 16 h luz (intensidad de luz aprox. 3678 lúmenes ó 342 pie-candela) por 2-3 semanas hasta la formación de plantas.

Las plantas destinadas para los análisis con el microscopio de fluorescencia se obtuvieron a partir de semillas sin desinfectar y sembradas en bandejas de germinación de 72 cavidades con suelo de la marca comercial Happy Flower^{MR} (tierra preparada para maceta) esterilizado en autoclave. Las bandejas se incubaron a $24 \pm 2^\circ\text{C}$ en un fotoperíodo de 16 h luz (intensidad de luz aprox. 3678 lúmenes ó 342 pie-candela) por 5-6 semanas hasta la formación de plantas.

6.2 Cultivo del Consorcio Patogénico de *Bacillus spp.*

Se utilizó un consorcio patogénico de *Bacillus spp.* aislado de una planta girasol (*Helianthus annuus* L.) enferma en el estadio de desarrollo de cuatro hojas verdaderas en el municipio de Marín, Nuevo León, México. El consorcio de *Bacillus spp.* y especies aisladas se cultivaron en caldo YDC (dextrosa 20 g/L, extracto de levadura 10 g/L, carbonato de calcio 20 g/L). Para la preparación de lotes grandes de bacterias y su criopreservación, la mezcla y especies por separado se cultivaron en matraces Erlenmeyer de 250 mL y se incubaron en agitador orbital a $24 \pm 2^\circ\text{C}$ por 48 h. Al final del tiempo de incubación se distribuyeron en alícuotas de 1 mL (500 μL de cultivo y 500 μL de glicerol

al 40%) en tubos para microcentrífuga estériles de 1.5 mL y se almacenaron a -70°C para mantener las cepas sin cambios.

6.3 Bioensayos

Para los bioensayos, se tomaron las alícuotas (de bacterias) del ultracongelador y se atemperaron por 30 minutos. Luego se agitaron en vortex por 1 minuto y se sembraron por estría en placas con agar YDC (dextrosa 20 g/L, extracto de levadura 10 g/L, carbonato de calcio 20 g/L, agar agar 20 g/L) y se incubaron a $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 48 h para la preparación de los inóculos bacterianos para infectar las hojas de las plantas. Se preparó una solución de gelatina al 1% estéril y se transfirieron 200 μL a tubos para microcentrífuga de 1.5 mL correspondientes a cada una de las especies del consorcio (“especies lisa, naranja y rugosa”), la mezcla y un control negativo. Posteriormente, con pistilos pequeños estériles se maceraron las colonias hasta obtener mezclas homogéneas. Después, se agregaron 800 μL de la gelatina al 1% y se agitaron en vortex por 1 min. Los inóculos se ajustaron a una densidad óptica (DO) de 0.244 a 625 nm mediante espectrofotómetro (SmartSpec™ Plus BIO RAD). Después, con pinceles #2 se tomaron inóculos de cada una de las tres especies de *Bacillus spp.* y se depositaron en el envés de las hojas de las plantas de *C. chinense*. Por último, se incubaron y se analizaron las respuestas de la hoja y tallo mediante análisis visual del tejido que presentó daño. El procedimiento para la infección se realizó de acuerdo con (Betsuyaku et al. 2019) con las plantas obtenidas de las bandejas de 72 cavidades.

6.4 Análisis Morfológico

Para los análisis morfológicos macroscópicos del tejido, las hojas de cada tiempo de incubación y de cada grupo experimental se procesaron para analizar el área de daño bajo microscopía de fluorescencia mediante preparación en fresco y con el colorante fluorescente específico para la pared celular, blanco de calcoflúor.

Antes de someter los tratamientos a la tinción, las hojas fueron despigmentadas con solución de Carnoy (Ek-Ramos et al. 2010) toda la noche en cajas Petri de vidrio conteniendo 5 mL de esa solución en agitador orbital a 120 rpm selladas con parafilm. Pasado el tiempo se retiró la solución, se enjuagó con agua destilada y se repitió el proceso.

Para la tinción con blanco de calcoflúor se prepararon secciones de hojas de los tratamientos y se montaron en portaobjetos. Se añadieron aproximadamente 200 μ L de la solución de blanco de calcoflúor M2R (Sigma-Aldrich, Cat. 18909) y se dejó incubar por 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se retiró el colorante y se realizaron 2 lavados con agua destilada. Por último, se observó al microscopio de fluorescencia VELAB® Modelo VE146-YT con filtro banda G: 510-560 nm.

6.5 Extracción de ADN de las Especies del Consorcio de *Bacillus spp.* y Análisis Filogenético

Mediante secuenciación del gen 16S ribosomal se confirmó la identidad de las especies que conforman el consorcio de *Bacillus spp.* La extracción de ADN de las especies aisladas se realizó de acuerdo con el método fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (Pérez-González et al. 2015). El gen 16S rRNA fue amplificado mediante PCR utilizando los oligonucleótidos 16S rRNA For y 16S rRNA Rev ReadyMade™ Primers (IDT Cat. 51-01-19-06 y 51-01-19-07, respectivamente) empleando el mix GoTaq® Green Master (Promega, Cat. M7123) siguiendo protocolos del fabricante. La PCR consistió en un precalentamiento (94°C, 5 min) y 35 ciclos de lo siguiente: desnaturalización (94°C, 3 s), alineamiento (65°C, 30 s) y extensión (72°C, 1.3 min). La extensión final fue por 7 min y el tamaño de los productos de las reacciones fueron confirmados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Los productos de PCR se purificaron con el kit SureClean Plus (BIOLINE, Cat. BIO-37047) siguiendo el protocolo del fabricante. Los fragmentos purificados se enviaron a secuenciar al Laboratorio de Servicios Genómicos CINVESTAV (Irapuato, Gto. México) usando la tecnología Sanger.

Las secuencias obtenidas fueron curadas manualmente en el programa GeneiousPrime versión 2021.1.1 (Kearse et al. 2012) y analizadas con la herramienta BLASTN en la página web del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). El árbol filogenético fue construido por el método Máxima Verosimilitud con 1000 replicaciones (Bootstrap) en el programa MEGA v. 10.1.10 (Kumar et al. 2018).

6.6 Análisis Bioinformático

Los genomas del consorcio patogénico de *Bacillus spp.* se secuenciaron en la Unidad Universitaria de Secuenciación Masiva de ADN del Instituto de Biotecnología de la Universidad Autónoma de México en Cuernavaca, Morelos, México.

Las secuencias crudas totales fueron subidas al servidor MG-RAST (Anotación Rápida de Metagenomas mediante la Tecnología de Subsistemas) (Meyer et al. 2008; Keegan et al. 2016) y se procesaron mediante su flujo de trabajo estándar manteniendo los parámetros sin modificar. Para la identificación y anotación de proteínas y otras secuencias, se realizaron contra las diferentes bases de datos asociadas a MG-RAST. Las bases de datos GenBank (Benson et al. 2015), M5NR (Wilke et al. 2012), SEED (Overbeek et al. 2014; Brettin et al. 2015) y KEEG (Moriya et al. 2007; Kanehisa et al. 2016) fueron usadas para la anotación de los genomas a varios niveles.

Mediante la herramienta Servicio de Binning RAST (RBS) (Parks et al. 2017) se reconstruyeron y recuperaron los tres genomas del consorcio puro secuenciado a través de PATRIC (Snyder et al. 2006; Wattam et al. 2014; Antonopoulos et al. 2019) siguiendo los parámetros: ensamble de genomas: SPAdes v. 3.12.0 (Bankevich et al. 2012), “modo metagenómico”, tipo de librería: “paired-end”. Posteriormente, el conjunto de datos que se obtuvo se analizó con QUASt (Gurevich et al. 2013) para evaluar la calidad del ensamble. Por último, los datos se procesaron con los programas y bases de datos que se describen enseguida.

Las enzimas activas en carbohidratos (CAZy) (Garron y Henrissat 2019) fueron predecidas a través de la herramienta dbCAN2 (Yin et al. 2012; Zhang et al. 2018) con su flujo de trabajo estándar que anota las enzimas que contiene el conjunto de datos por medio de los algoritmos: HMMER (Finn et al. 2011) con un valor-E de $<1e^{-15}$, DIAMOND (Buchfink et al. 2015) que emplea BLAST contra la base de datos CAZy con un valor-E de $<1e^{-102}$ y Hotpep (Busk y Lange 2013; Busk et al. 2017) que identifica motivos conservados de las enzimas. Las proteínas que se predijeron dentro del módulo de GT fueron identificadas, sin embargo, no se incluyeron en análisis posteriores. Las que se identificaron como GH, PL, CE, CBM y AA fueron las que se incluyeron debido a que han sido asociadas con la degradación de carbohidratos de la pared celular vegetal

(Blackman et al. 2014). Los resultados obtenidos se graficaron usando el lenguaje de programación R mediante el software RStudio v. 4.0.1 (R Core Team 2020). Asimismo, mediante el NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) se descargaron los genomas de cepas reportadas como fitopatógenas, se procesaron con dbCAN2 y se elaboraron los gráficos para demostrar las comparaciones múltiples.

Las funciones de las proteínas fueron predecidas y clasificadas contra KEGG (Kanehisa et al. 2016) a través de KAAS (servidor de anotación automática KEGG) (Moriya et al. 2007). Los resultados obtenidos se procesaron usando el lenguaje de programación R mediante el software RStudio v. 4.0.1 (R Core Team 2020). Los mapas circulares de los genomas se construyeron usando CGView (Stothard et al. 2019) (<http://cgview.ca/>).

6.7 Análisis Estadístico

Para determinar diferencias significativas en la proporción de plantas que presentaron daño entre los tratamientos, se utilizó una prueba no paramétrica Kruskal-Wallis usando el paquete estadístico XLSTAT v. 2020.5.1.

7. RESULTADOS

7.1 Morfología Colonial y Microscópica del Consorcio de *Bacillus spp.*

En agar YDC se aislaron e identificaron las morfologías coloniales correspondientes a las especies del consorcio de *Bacillus spp.* En la **Figura 1** se muestra el consorcio total así como las especies separadas. Las especies fueron identificadas como: “especie lisa” (*Bacillus pumilus*, BL): colonias beige, forma circular, elevadas y márgenes enteros (**Figura 1B**); “especie naranja” (*Bacillus safensis*, BN): colonias con pigmento naranja, márgenes enteros, convexas, forma circular y superficie lisa (**Figura 1C**); “especie rugosa” (*Bacillus paralicheniformis*, BR): colonias blanquecinas, forma irregular, elevadas, margen ondulado y superficie áspera (**Figura 1D**).

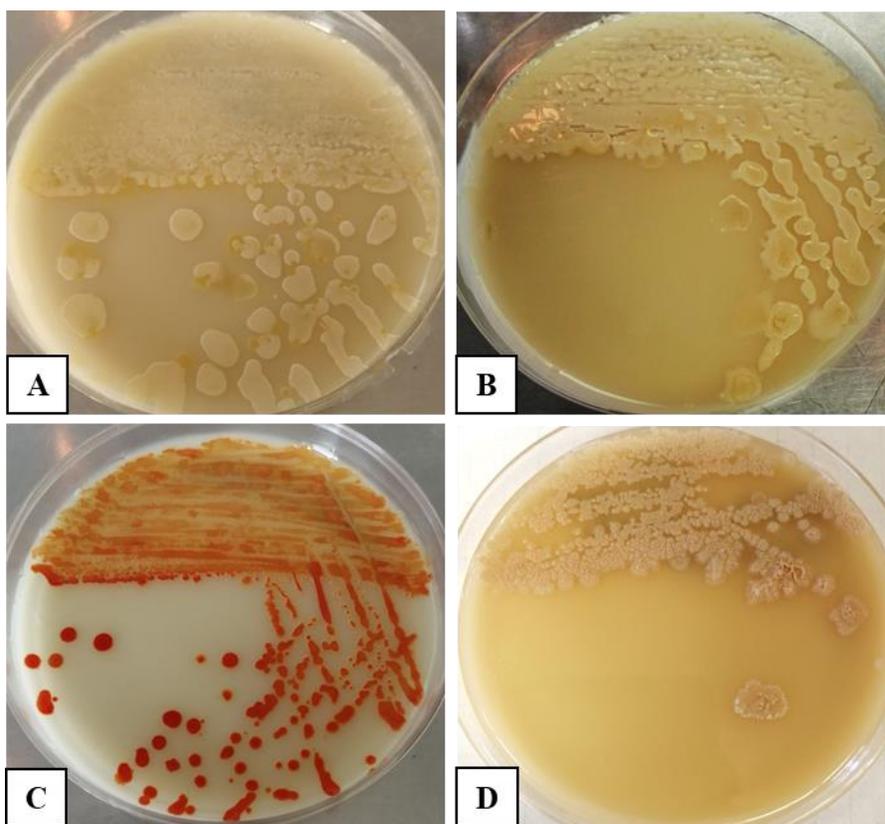


Figura 1. Morfología de *Bacillus spp.* cultivado en agar YDC incubado a 25 ± 2 °C por 48 h. **A)** mezcla del aislado, **B)** ‘especie lisa’ (*Bacillus pumilus*, BL), **C)** ‘naranja’ (*Bacillus safensis*, BN), **D)** ‘rugosa’ (*Bacillus paralicheniformis*, BR).

A partir de los cultivos aislados y la mezcla se realizaron tinción Gram y tinción de esporas con verde malaquita. La **Figura 2** muestra los resultados obtenidos; todos corresponden a bacilos grampositivos (**Figura 2A**) formadores de esporas (**Figura 2B**).

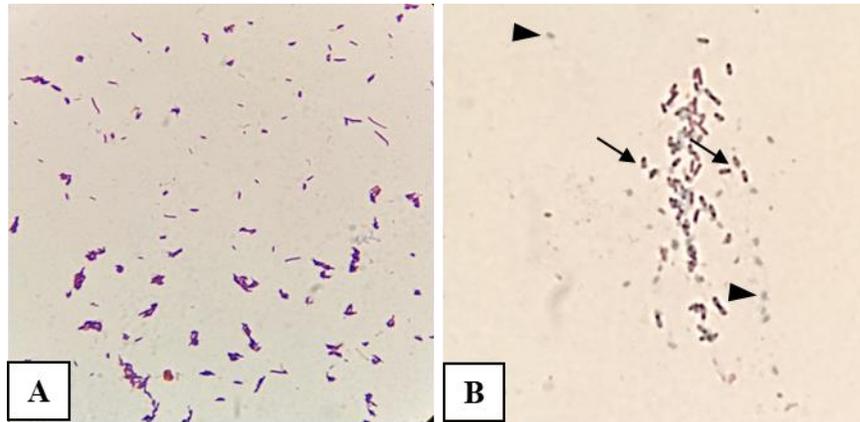


Figura 2. Morfología microscópica del consorcio *Bacillus spp.* cultivado en agar YDC incubado a 25 ± 2 °C por 2 y 4 días, respectivamente. **A)** Bacilos grampositivos teñidos con tinción Gram (100x), **B)** bacilos con endospora (flechas) y esporas libres (punta de flecha) teñidos con verde malaquita (100x).

7.2 Efectos del Consorcio Patogénico de *Bacillus spp.* en Hojas de Plantas de Chile Habanero

Los daños observados en las hojas de las plantas inoculadas con el consorcio de *Bacillus spp.* y especies por separado fueron puntos negros en el envés de hojas, aspecto rizado (**Fig. 3B**) y clorosis (**Fig. 3C**) comparadas con el tratamiento control a las 24 h post-infección (p.i.). A las 48 y 72 h p.i. se observaron los síntomas más pronunciados y los tallos se tornaron color ligero café (**Fig. 3D**) con un anillo oscuro cerca de los peciolo de las hojas. Los efectos ocasionados por las especies inoculadas por separado fueron los mismos que la mezcla a diferencia de que una menor cantidad de plantas presentaron síntomas. Por lo que se puede inferir que la mezcla tiene un mayor efecto patogénico que las especies individuales.

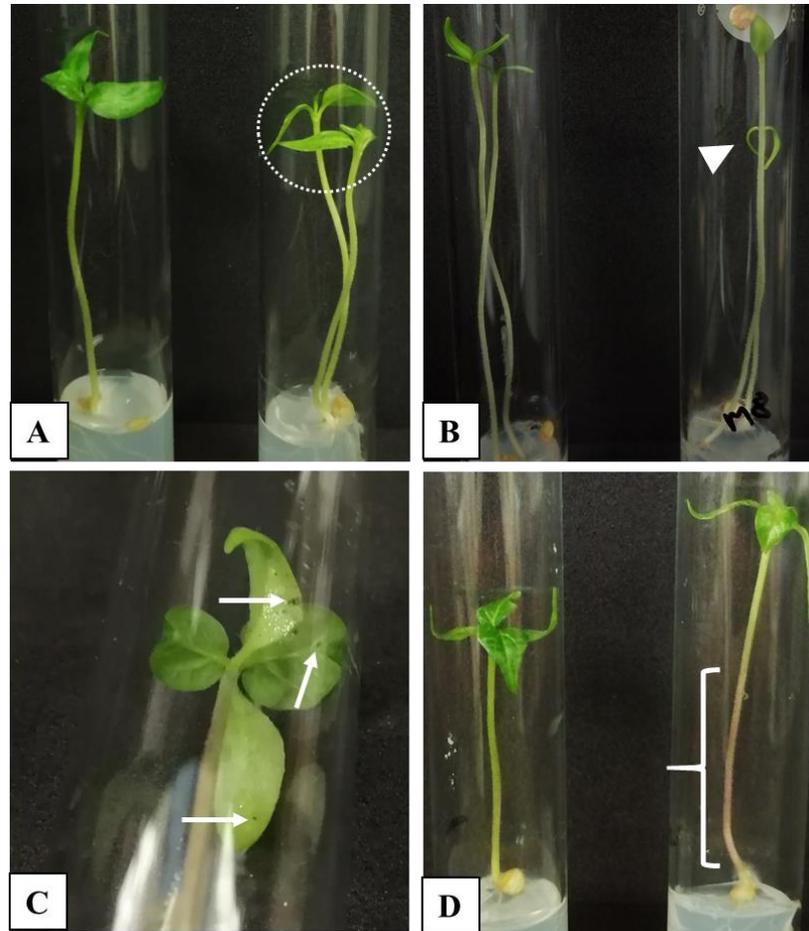


Figura 3. Imágenes representativas del daño observado en hojas infectadas por el consorcio de *Bacillus spp.* **A)** Clorosis (círculo punteado) y **B)** apariencia rizada (punta de flecha) comparado con el tratamiento control (plantas izq.) a las 24 h post-infección (p.i.). A las 72 h p.i. se observaron manchas negras pequeñas en envés **C)** (flechas) y los tallos se tornaron ligero café **D)** (llaves).

Para determinar la proporción de plantas que presentaron síntomas de enfermedad contra las plantas control, realizamos una prueba de Kruskal-Wallis. A las 48 h encontramos diferencia en la proporción de las plantas que sufrieron daño correspondiente a los tratamientos con la mezcla vs el control (**Figura 4A**). Y hasta las 72 h p.i. hubo diferencias significativas entre los tratamientos BR y mezcla contra control (**Figura 4B**).

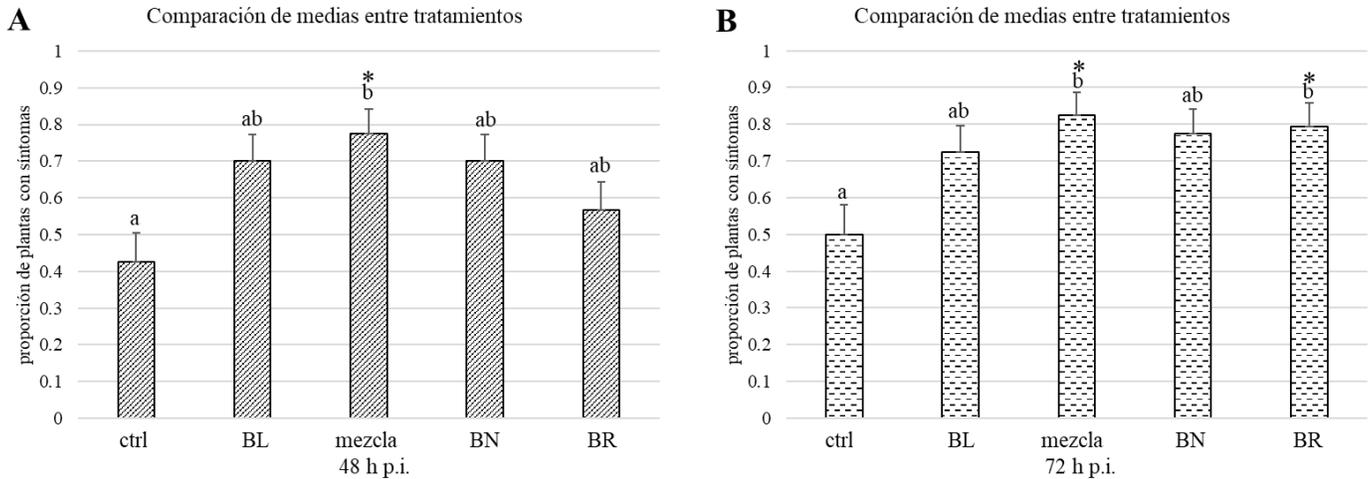


Figura 4. Prueba K-W comparación múltiple de medias con corrección de Bonferroni alfa= 0.005. **A)** A las 48 h p.i. hubo diferencia significativa entre tratamiento ctrl vs. mezcla; **B)** a las 72 h p.i. diferencias significativas entre ctrl vs. mezcla y BR.

El análisis morfológico al microscopio de fluorescencia de las hojas a las 72 h post-infección, demostró que el tratamiento mezcla y con BR hubo una modificación en la estructura de la pared celular comparada contra el tratamiento sin infectar donde se observó que se conservó la arquitectura del tejido (**Figura 5**). En el tratamiento control sin infectar (**Figura 5A**) la señal fluorescente, correspondiente al blanco de calcoflúor, es más fuerte respecto a los demás tratamientos. Lo que podemos inferir que en el control no hubo cambios o modificaciones en la estructura de las paredes celulares y por consiguiente en las células vegetales. El blanco de calcoflúor es capaz de unirse a la celulosa en las paredes celulares y es usado ampliamente para observar estructuras vegetales (Flores-Félix et al. 2015; Bidhendi et al. 2019).

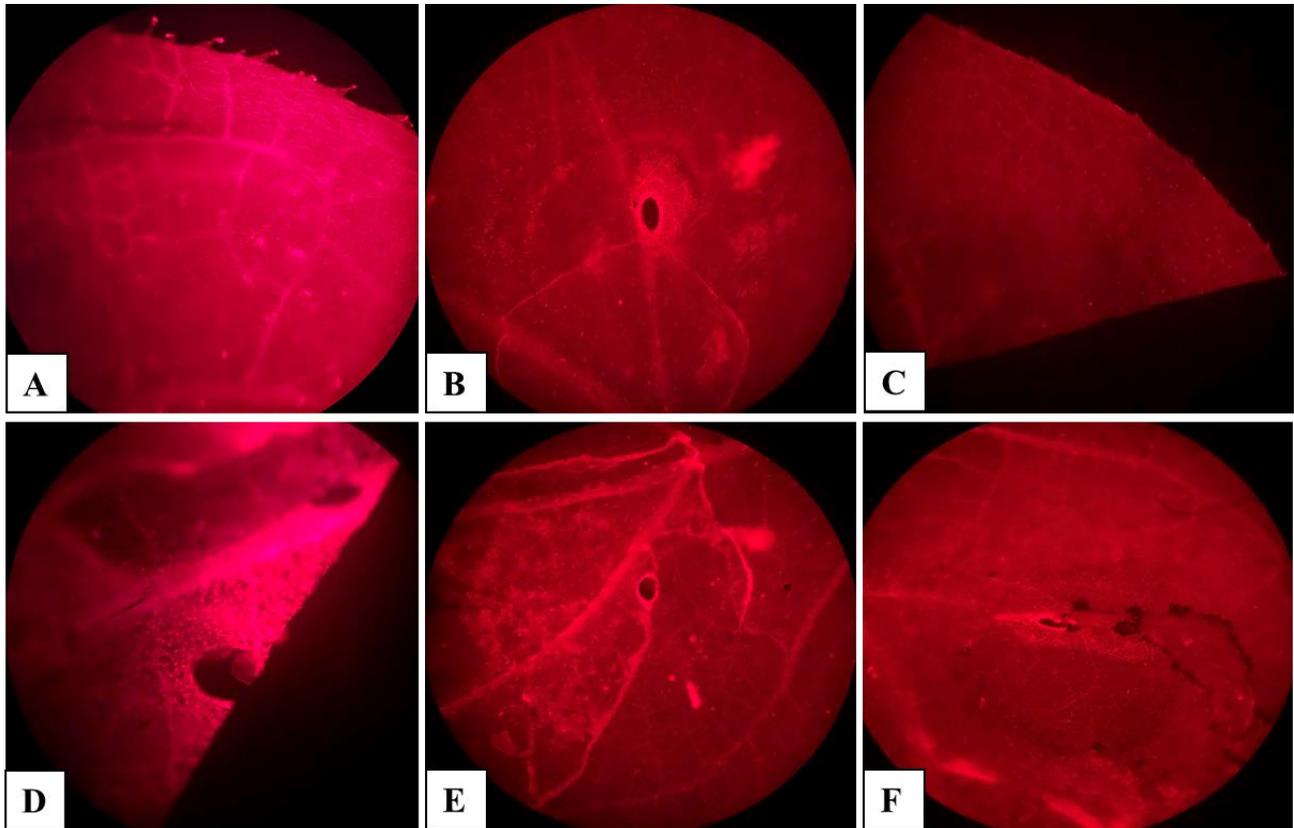


Figura 5. Imágenes representativas de las reacciones de las hojas a las 72 h p.i. En **A)** se muestra el control; **B)** mezcla; **C)** BL; **D)** BN; **E)** BR; **F)** *Phytophthora capsici*. Microscopía de fluorescencia. Tinción con blanco de calcoflúor. Magnificación 4x, 10x **D)**.

7.3 Estadísticos Básicos y Evaluación de la Calidad de Secuenciación

Una manera de revisar a primer instancia los datos que se obtienen de las tecnologías como NGS, es analizar estadísticos básicos que incluyen el número de secuencias totales, la longitud promedio de lecturas y el contenido de Guanina-Citosina. La **Tabla 1** resume los estadísticos básicos del análisis de datos a través del servidor MG-RAST (Meyer et al. 2008) de los genomas del consorcio puro. Se obtuvo un total de 22.3 millones de secuencias, un total de 1,831 millones de pares de bases (pb) con una longitud promedio de lecturas de 76 pb y un contenido de Guanina-Citosina (GC) del 40.1%.

Tabla 1. Estadísticos básicos de secuenciación de los genomas. Obtenidos del servidor MG-RAST.

Medición	Valor
Total de secuencias (datos crudos)	22,389,215
Total de pares de bases (datos crudos)	1,831,264,356
Longitud promedio de lecturas (pb)	76
GC (%)	40.1
Plataforma	Illumina

Para evaluar a detalle la longitud promedio de las lecturas y contenido de GC, se graficaron los datos después del preprocesamiento mediante SolexaQA (Cox et al. 2010) para remover secuencias de baja calidad y secuencias que se encontraban dos desviaciones estándar de la longitud promedio (Huse et al. 2007). La **Figura 6A** muestra la longitud de las lecturas que se encuentra entre 74 – 77 pb y la distribución del porcentaje de GC del análisis completo de secuencias en la **Figura 6B**. El contenido de GC está entre 35 y 45%.

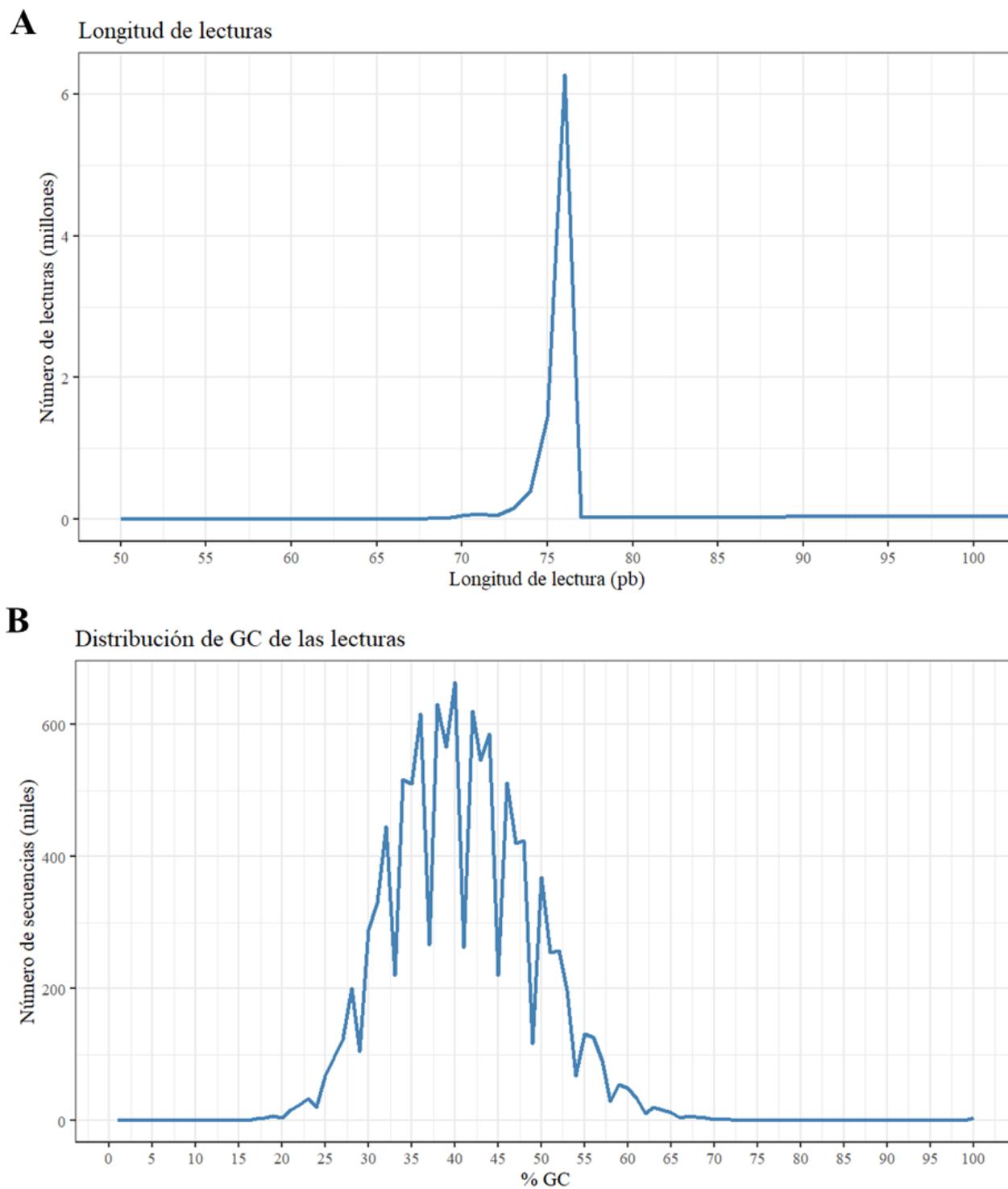


Figura 6. Análisis de la distribución en la longitud de las lecturas y porcentaje de GC. **A)** La longitud promedio de las secuencias se encuentra entre 74 y 77 pares de bases (pb) y en **B)** se muestra el porcentaje de GC (35 – 45%) de los genomas analizados.

Asimismo, se evaluó la calidad de secuenciación mediante el método DRISSEE (Estimación del Error de Secuenciación Inferido por Lecturas Duplicadas) descrito por (Keegan et al. 2012) que analiza lecturas duplicadas artificialmente y determina el grado de variación entre secuencias idénticas en su prefijo; el error total de los datos fue de 4.3%

Figura 7.

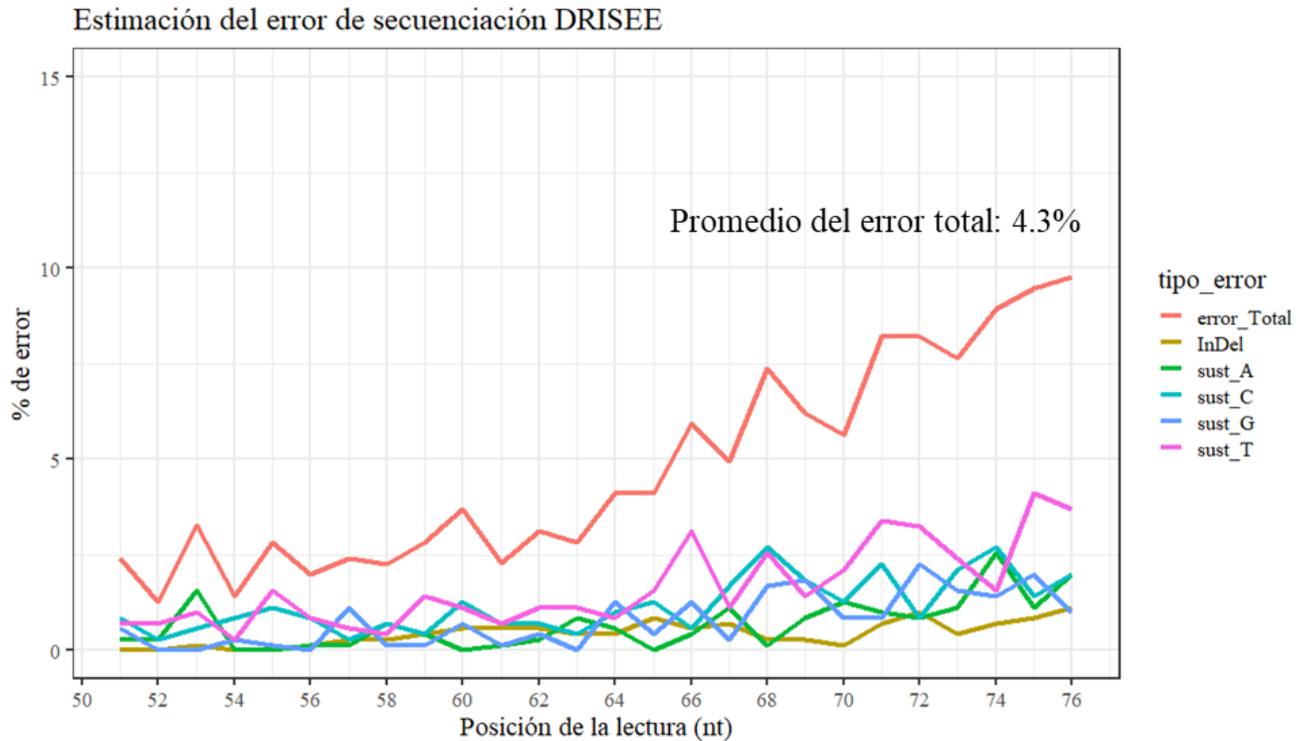


Figura 7. Estimación del error de secuenciación por el método DRISSEE. El porcentaje de error (eje Y) está graficado con respecto a la posición de la lectura (eje X). Se muestra el error total (error_Total), sustituciones de A (sust_A), sustituciones de C (sust_C), sustituciones de G (sust_G), sustituciones de T (sust_T) e InDel indica inserciones y deleciones.

Después del preprocesamiento y evaluación de las secuencias, se procesó el conjunto de datos con la herramienta RBS (Wattam et al. 2014; Parks et al. 2017) que provee PATRIC con el objetivo de recuperar genomas completos del conjunto total. Se obtuvieron los siguientes datos que muestra la **Tabla 2**. Se logró un mejor ensamble de genomas de las especies BR y BL de acuerdo con el número de contigs, sin embargo, los

tres genomas mostraron características aceptables de acuerdo con el flujo de trabajo y valores de corte de PATRIC (Wattam et al. 2014).

Tabla 2. Resumen de las características generales de los genomas de las especies

Característica	Especie		
	BR	BL	BN
Tamaño del ADN (pb)	4,308,667	3,735,864	5,123,145
Contenido de GC (%)	45.79	41.58	34.6
Número de CDSs	4,597	3,909	5,320
Número de contigs	40	28	109
Tamaño del contig N50 (kpb)	277.251	517.230	100.441
Consistencia (%)	99.8	98.4	88.4
Contaminación (%)	0.2	0.1	0

Cabe destacar que las características respecto al número de contigs (BR, BL y BN; 40, 28 y 109, respectivamente), tamaño del contig N50 (BR, BL y BN; 277, 517 y 100 kpb, respect.) que es un estadístico para evaluar la contigüidad de un ensamblaje del genoma (Nagarajan y Pop 2013), la consistencia (BR, BL y BN; 99.8, 98.4 y 88.4, respect.) y contaminación (BR, BL y BN; 0.2, 0.1 y 0, respect.) se encuentran dentro de los rangos permitidos para concluir que son genomas completos (**Tabla 2**). Los contigs en un ensamblaje son ordenados por tamaño iniciando por el más largo, entonces, el N50 es el tamaño del contig que se encuentra a la mitad (50%) de todo el genoma.

7.4 Anotación y Clasificación Funcional de Proteínas

Se analizó la clasificación funcional de las proteínas codificadas por los genomas de las especies del consorcio utilizando KAAS contra la base de datos KEGG. En total, se anotaron 2082, 1949 y 1853 proteínas putativas asociadas a las categorías: metabolismo, procesamiento de información ambiental, procesamiento de información genética, procesos celulares y sistemas del organismo para las especies BR, BL y BN, respectivamente (**Figura 8**).

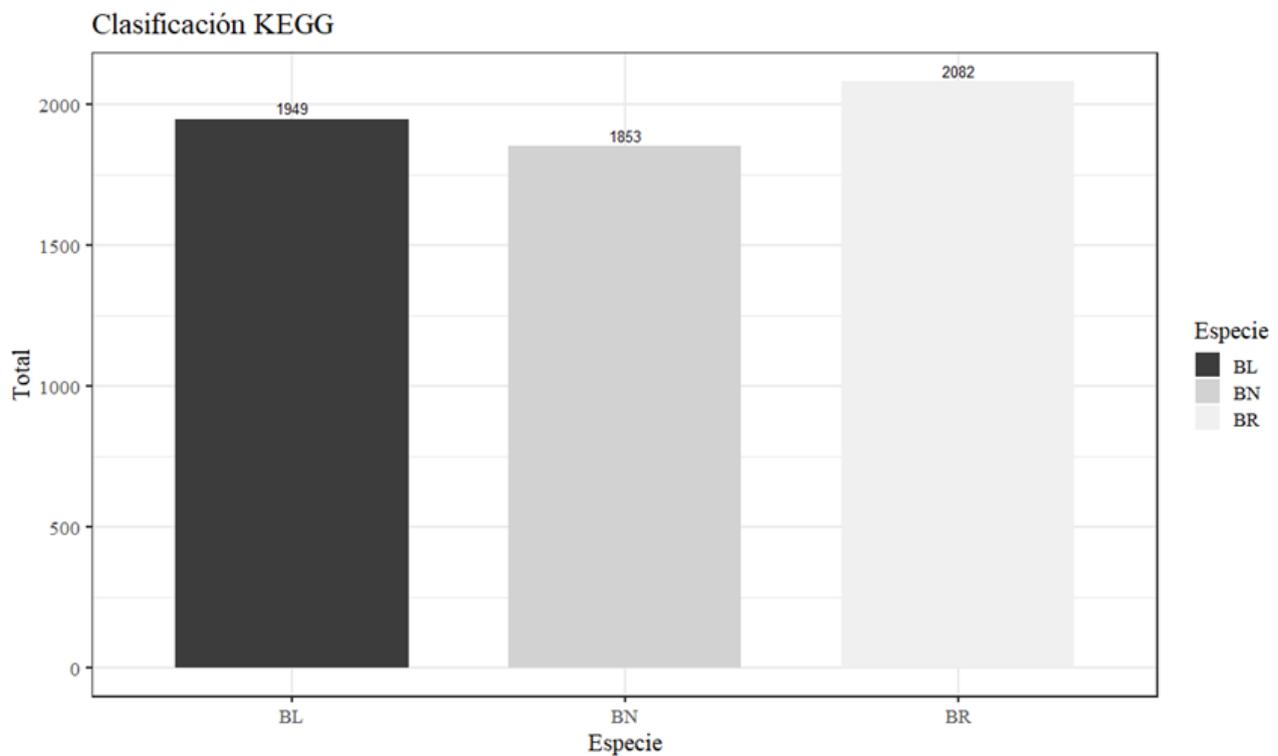
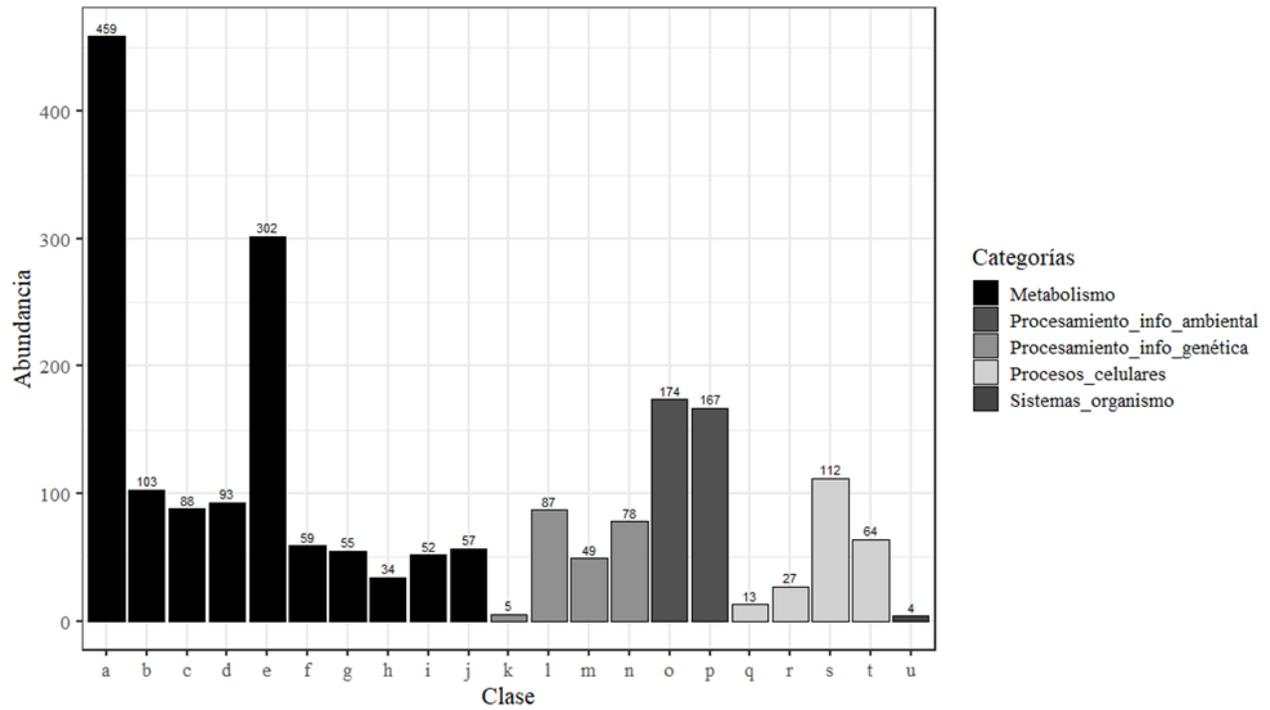


Figura 8. Se muestra el total de las proteínas anotadas de los tres genomas basada en KEGG. El total se indica arriba de las barras.

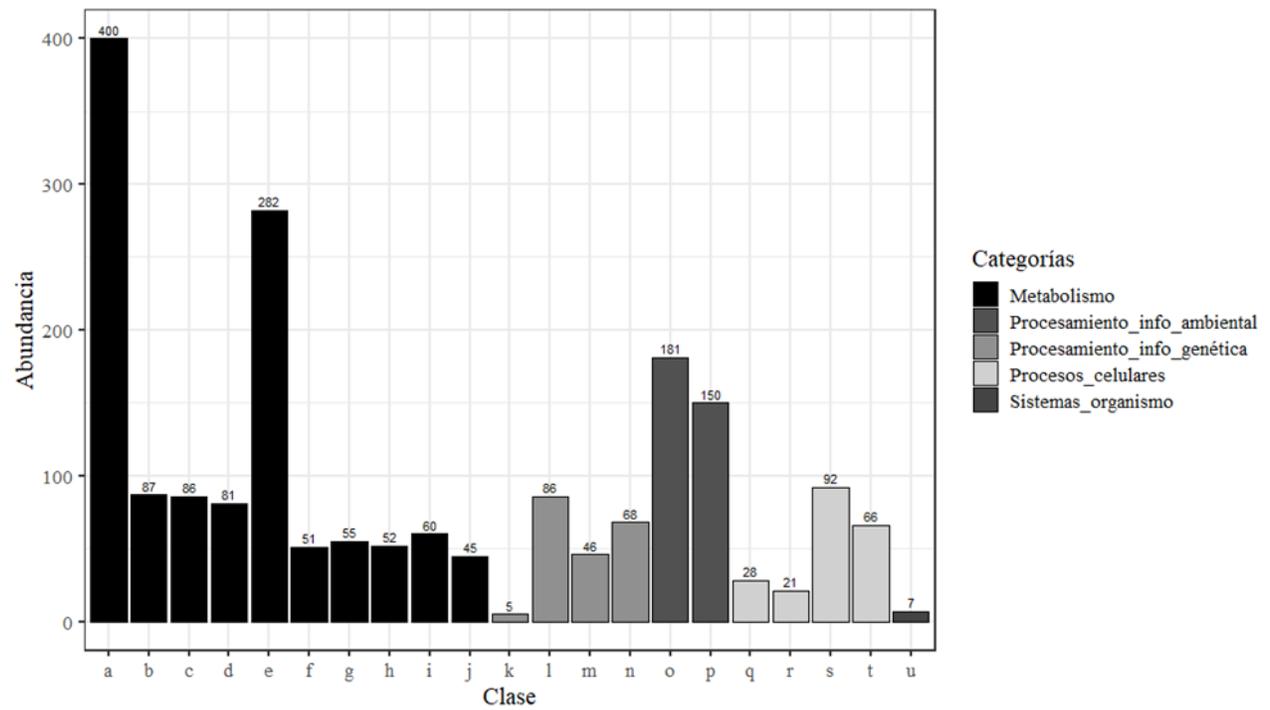
La **Figura 9** muestra la clasificación funcional KEGG de todas las clases que compone la base de datos para las tres especies. Metabolismo de carbohidratos y metabolismo de aminoácidos fueron las clases con más proteínas anotadas (**Figura 9**, clases a y e).

A

Clasificación KEGG de BR

**B**

Clasificación KEGG de BL



C

Clasificación KEGG de BN

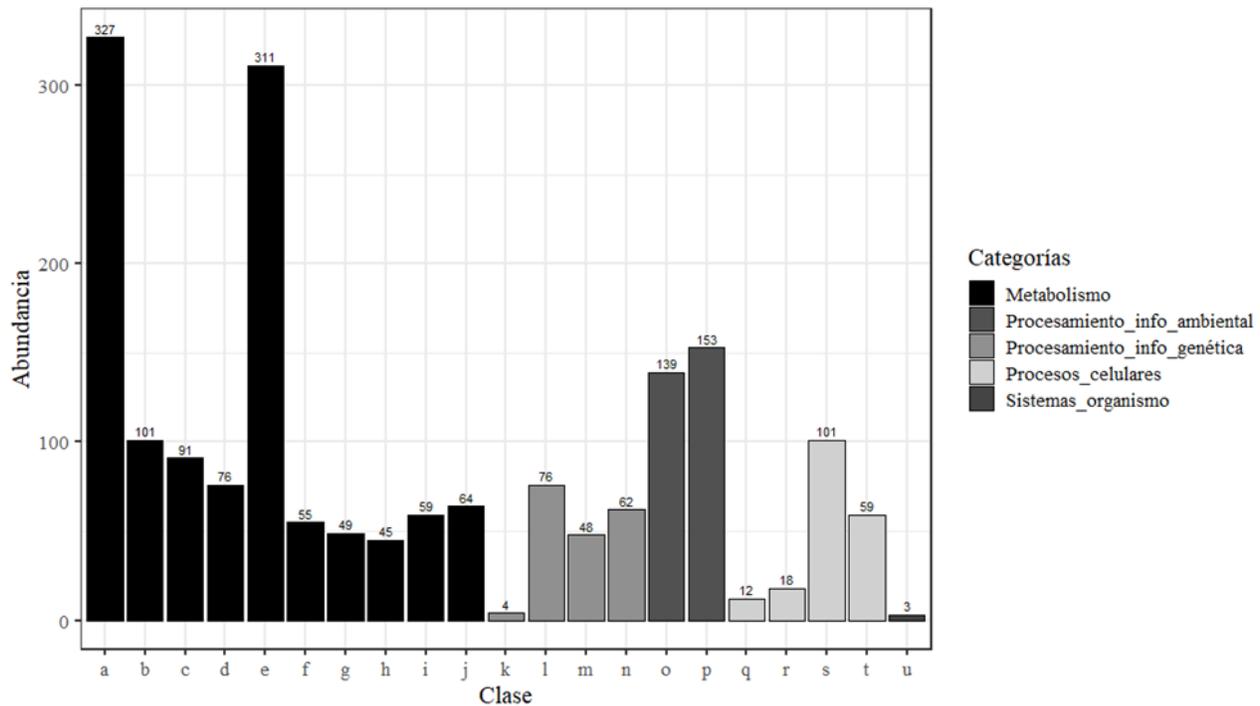
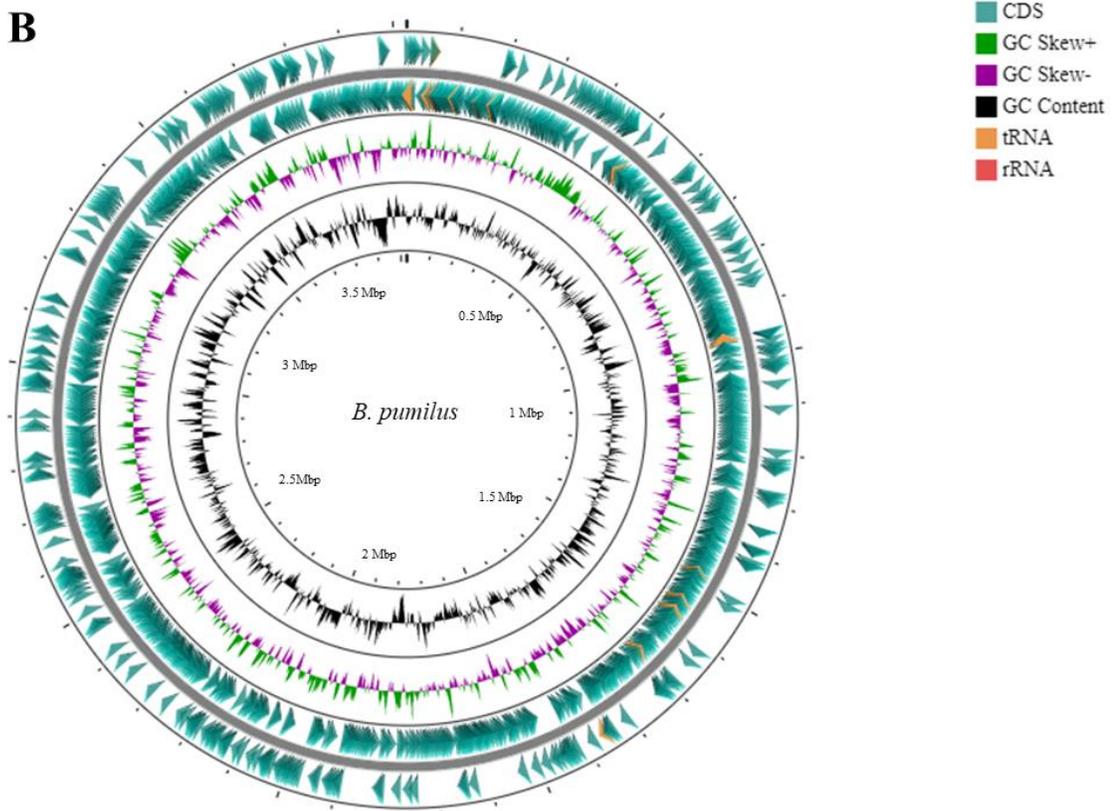
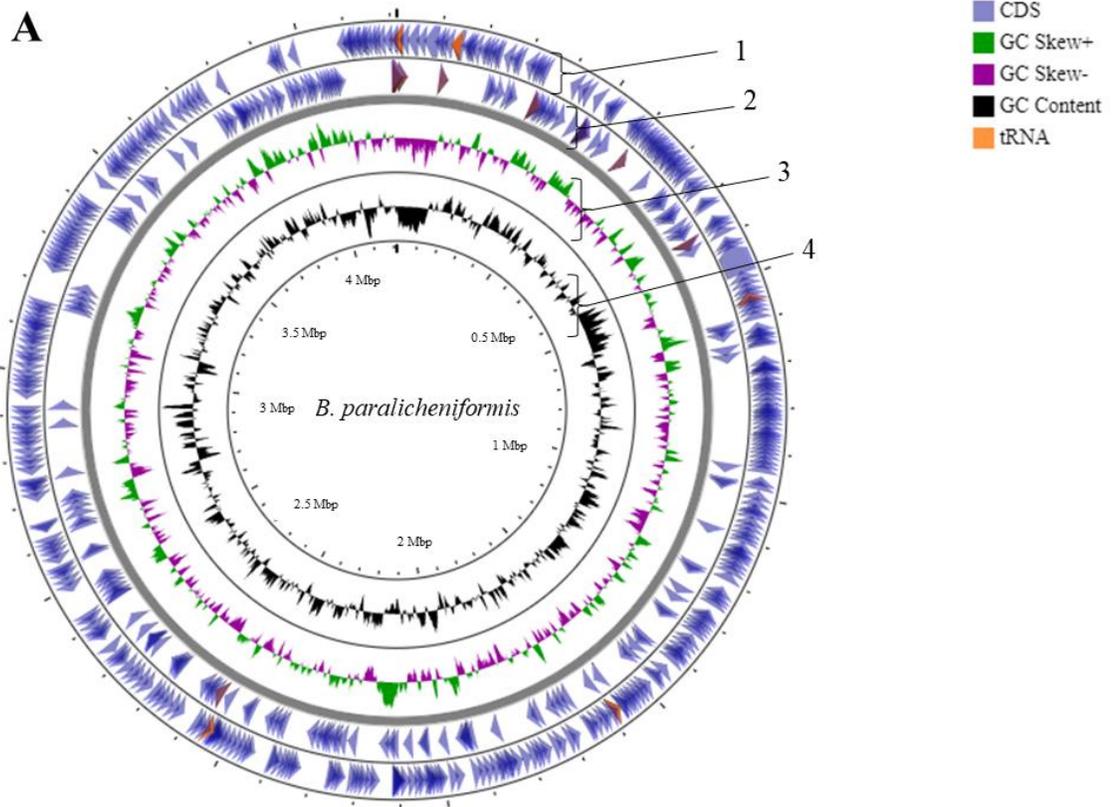


Figura 9. Clasificación funcional de las proteínas codificadas por los genomas de **A)** *B. paralicheniformis* (BR), **B)** *B. pumilus* (BL) y **C)** *B. safensis* (BN) basado en KEGG (Enciclopedia de Genes y Genomas de Kyoto). La abundancia de cada clase se indica arriba de las barras. **a:** metabolismo de carbohidratos, **b:** metabolismo energía, **c:** metabolismo de lípidos, **d:** metabolismo de nucleótidos, **e:** metabolismo de aminoácidos, **f:** metabolismo de otros aminoácidos, **g:** metabolismo y biosíntesis de glicanos, **h:** metabolismo de terpenoides y poliquétidos, **i:** biosíntesis de otros metabolitos secundarios, **j:** metabolismo y degradación de xenobióticos, **k:** transcripción, **l:** traducción, **m:** plegamiento y degradación, **n:** replicación y reparación, **o:** transporte membranal, **p:** transducción de señales, **q:** transporte y catabolismo, **r:** crecimiento celular y muerte, **s:** comunidad celular, **t:** motilidad celular, **u:** adaptación al ambiente.

7.5 Genomas Circulares de las Especies del Consorcio

Mediante la herramienta CGView (Stothard et al. 2019) se construyeron los mapas circulares de los genomas del consorcio de *Bacillus spp.* Las secuencias codificantes (CDS), el contenido de GC, ARN ribosomal, ARN de transferencia y el sesgo GC (GC skew) donde GC están en mayor proporción en la cadena líder (Snyder et al. 2012) **Figura 10** son los elementos que contienen los mapas. La **Figura 10** muestra los genomas circulares correspondientes a las tres especies que componen el consorcio de *Bacillus spp.*



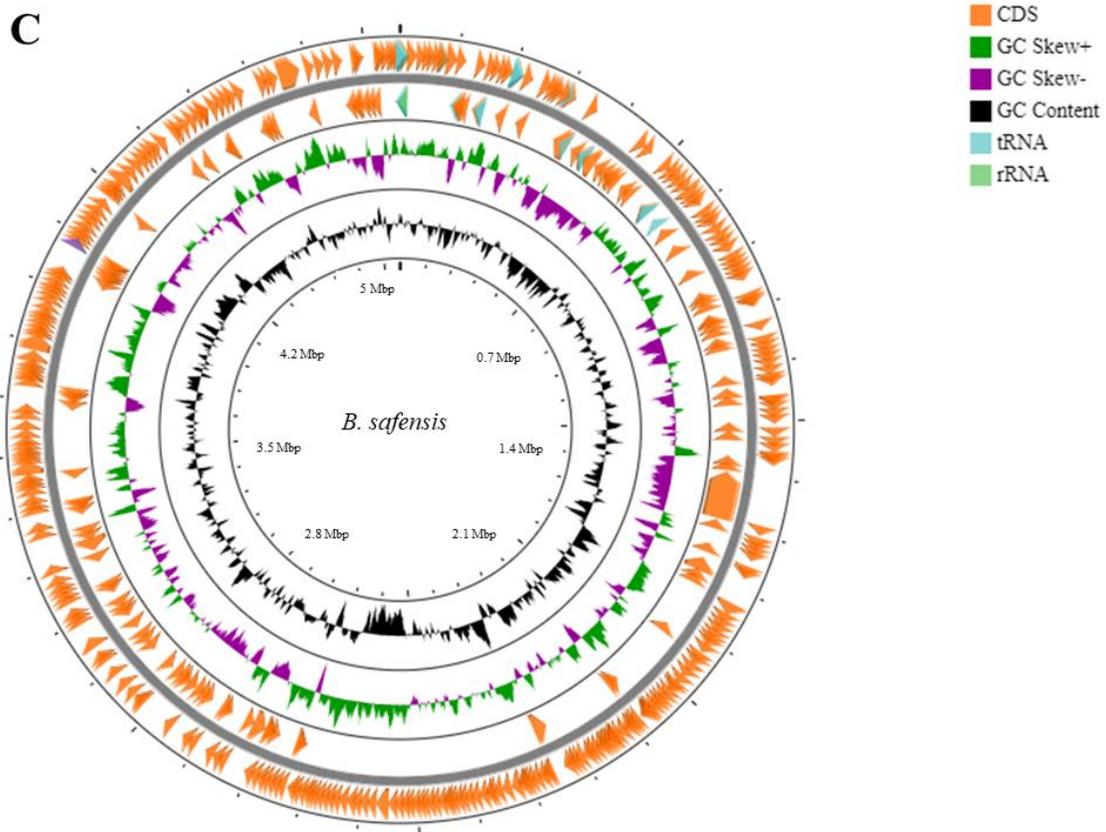


Figura 10. Mapas de los genomas de las especies del consorcio: **A)** *B. paralicheniformis* (BR), **B)** *B. pumilus* (BL) y **C)** *B. safensis* (BN). La escala del interior representa el tamaño de los genomas en Mega pares de bases (Mbp); el genoma de cada especie se muestra por anillos del 1 (exterior) al 4 (interior). Anillos 1 y 2 (cadena adelantada y cadena retrasada), secuencias codificantes (CDS), ARNt y ARNt anotados mediante RAST. Anillo 3, sesgo de GC (GC skew). Anillo 4, contenido de GC.

A través de la herramienta PlasmidFinder (Carattoli et al. 2014) se procesó el conjunto de datos con el objetivo de identificar plásmidos por homología de secuencias. En nuestros datos se logró identificar un fragmento de >1.5 kb (**Tabla 3**) que ha sido caracterizado en un aislado de *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* (Huang et al. 2006): es un plásmido grande con un tamaño aproximado de 82 kb llamado pBMB165. El fragmento predicho codifica a una proteína relacionada a la replicación (del plásmido) con un 95.7% de similitud; el número de acceso del GenBank es AHC73160.1.

Tabla 3. Fragmento de plásmido identificado en el conjunto de datos

Fragmento del plásmido	Producto	Identidad	Longitud de secuencia	Longitud de secuencia diana	Acceso GenBank
pBMB165	Primasa carboxilo terminal-1	95.8	1556	1557	AHC73160.1

7.6 Análisis Genómico Comparativo

El análisis comparativo contra cinco genomas de referencia obtenidas del NCBI de cada una de las especies de *Bacillus* demostró que poseen características similares entre ellas (**Tabla 4**). Los genomas de las cepas de *B. paralicheniformis* Bac84, MDJK30 y BR (reportado en este estudio) muestran alta similitud respecto al tamaño del ADN y contenido de GC. Asimismo, los genomas de las cepas de *B. pumilus* ATCC 7061 y BL (de este estudio) exhiben un alto grado de homología respecto al tamaño del ADN, contenido de GC y número de CDSs predecidos (**Tabla 4**). Distinto fue el caso de la comparación genómica de las seis cepas de *Bacillus safensis*, donde incluso hubo diferencias entre los genomas de referencia respecto al tamaño del ADN y número de CDSs (**Tabla 4** fondo).

Tabla 4. Comparación de características genómicas generales de cepas de *Bacillus*

Característica	Cepas de <i>B. paralicheniformis</i>					
	BR	F47	Bac84	MDJK30	ATCC 12759	KJ-16
Tamaño del ADN (pb)	4,308,667	4,028,325	4,376,831	4,352,468	4,389,210	4,455,635
Contenido GC (%)	45.79	46.2	45.8	45.9	45.8	45.9
Número de CDSs	4,597	4,026	4,292	4,216	4,348	4,153
Método de ensamble	SPAdes	CLC Cell	Celera	Newbler	Newbler, Velvet	CLC Cell
Acceso GenBank	-	GCA_002026335.1	GCA_002993925.1	GCA_002068155.1	GCA_000746885.1	GCA_001042485.1
Origen de la cepa	México	Argelia	Arabia Saudita	China	EUA	Corea del Sur
Característica	Cepas de <i>B. pumilus</i>					
	BL	GR-8 ⁺	LLTC96	SAFR-032	7P	ATCC 7061
Tamaño del ADN (pb)	3,735,864	3,674,849	3,697,756	3,704,641	3,582,806	3,833,998
Contenido GC (%)	41.58	41.4	41.6	41.3	42	41.7
Número de CDSs	3,909	3,592	3,727	3,679	3,460	3,900
Método de ensamble	SPAdes	Velvet	A5	-	Newbler	-
Acceso GenBank	-	GCA_001191605.1	GCA_002998365.1	GCA_000017885.4	GCA_000691485.1	GCA_000172815.1
Origen de la cepa	México	China	China	USA	Rusia	EUA
+ : Cepa originalmente identificada como <i>B. pumilus</i> GR-8 (Yuan y Gao 2015), ahora <i>B. altitudinis</i> GR-8, NCBI BioSample (SAMN02905161)						
Característica	Cepas de <i>B. safensis</i>					
	BN	PgKB20	CFA06	U14-5	DE0105	B4107
Tamaño del ADN (pb)	5,123,145	3,786,744	3,771,318	4,151,325	4,120,250	3,650,234
Contenido GC (%)	34.6	41.7	41.47	41.4	40.98	41.61
Número de CDSs	5,320	3,717	3,660	4,212	4,576	3,803
Método de ensamble	SPAdes	HGAP	CLC	HGAP3, Quiver	SPAdes	Velvet
Acceso GenBank	-	GCA_008244765.1	GCA_000715185.1	GCA_001938665.1	GCA_008764375.1	GCA_000828395.1
Origen de la cepa	México	Corea del Sur	Brasil	Antártida	EUA	Países Bajos

7.7 Análisis Filogenético

La secuenciación del gen 16S del ARN ribosomal fue empleado para la identificación de las especies del consorcio de *Bacillus spp.* Los resultados mostraron que las especies BL y BN son altamente similares entre ellas incluso contra las cepas de referencia obtenidas del NCBI (**Figura 11**). Estas dos especies formaron un clúster con >50% por lo que podemos inferir que los resultados obtenidos son confiables. El caso fue distinto con las cepas de *B. paralicheniformis* que se establecieron en clústeres diferentes con porcentajes favorables.

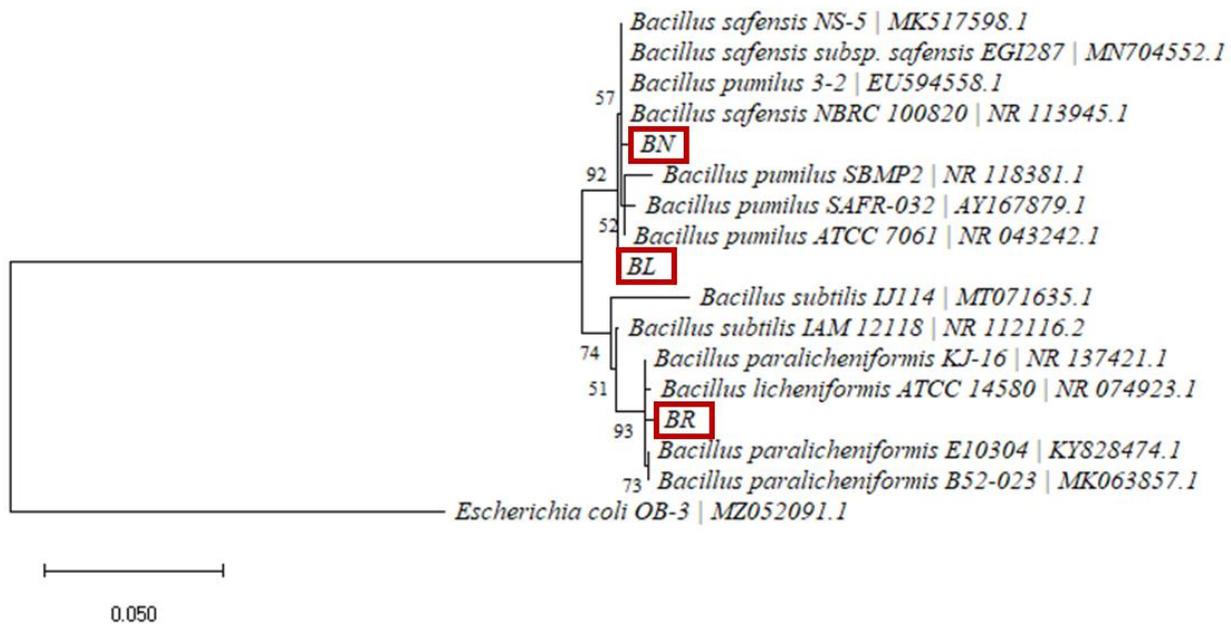


Figura 11. Árbol filogenético construido con secuencias del gen 16S del ARNr con 14 secuencias obtenidas del NCBI y las 3 correspondientes al consorcio (recuadros rojos) mediante el método máxima verosimilitud. Se muestran los porcentajes del Bootstrap en cada nodo. La escala representa el número de sustituciones/100 nucleótidos.

7.8 Enzimas que Degradan Pared Celular de Plantas

La virulencia de algunas bacterias fitopatógenas dependen de un conjunto de enzimas que secretan que degradan pared celular causando maceración del tejido como: pectinasas, celulasas y proteasas (Barnard et al. 2007; Blackman et al. 2014) por mencionar algunas. Se predijeron un total de 385 proteínas contra la base de datos CAZy a través de dbCAN2. De esas se eliminaron 122 de los siguientes análisis debido a que pertenecían a la clase de GT y no han sido asociadas con la degradación de carbohidratos de la pared celular (Blackman et al. 2014). El total de proteínas predecidas fueron identificadas entre las clases y sus familias como: 135 GH, 67 CBM, 42 CE, 14 PL y 4 AA. Del total, corresponden 130, 76 y 56 de proteínas predecidas a las especies del consorcio BR, BL y BN, respectivamente como lo muestra la **Figura 12**.

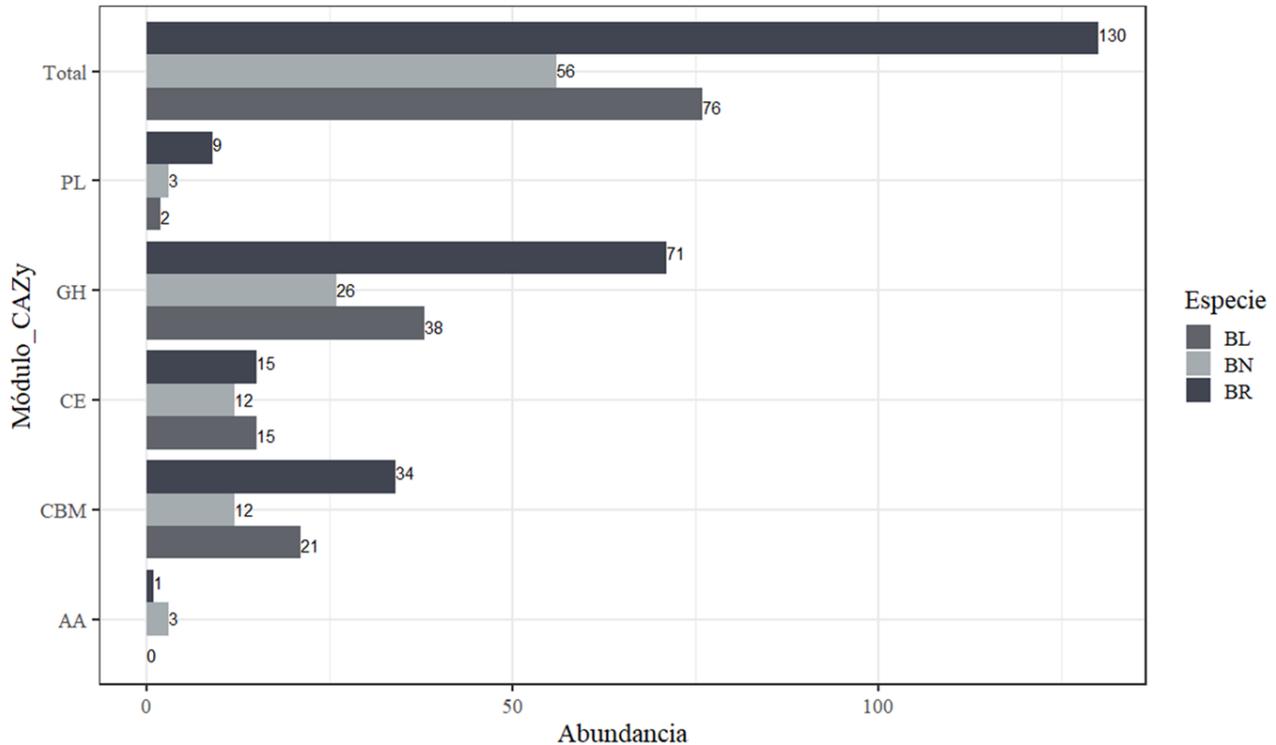


Figura 12. Enzimas activas en carbohidratos (CAZy) predecidas en los genomas de las especies de *Bacillus*. AA: actividad auxiliar, CBM: módulo de unión a carbohidrato, CE: carbohidrato esterasa, GH: glicosil hidrolasa, PL: polisacárido liasa.

Además del análisis de los genomas de *Bacillus*, se compararon contra especies que tienen reportes de ser fitopatógenas: *B. pumilus* GR-8, ahora *B. altitudinis* GR-8 (Yuan y Gao 2015), *B. circulans* (Leary et al. 1986), BR, BL y BN (este estudio), *B. pumilus* SAFR-032 (genoma de referencia, acceso GenBank GCA_000017885.4), y otras especies fitopatógenas grampositivas como *Clavibacter michiganensis* CASJ001 y *C. michiganensis* CASJ008 (Thapa et al. 2017), para saber si existen diferencias en el número de enzimas degradadoras. La **Figura 13** muestra que BR contiene en su genoma mayor abundancia de enzimas.

Comparación de CAZymes

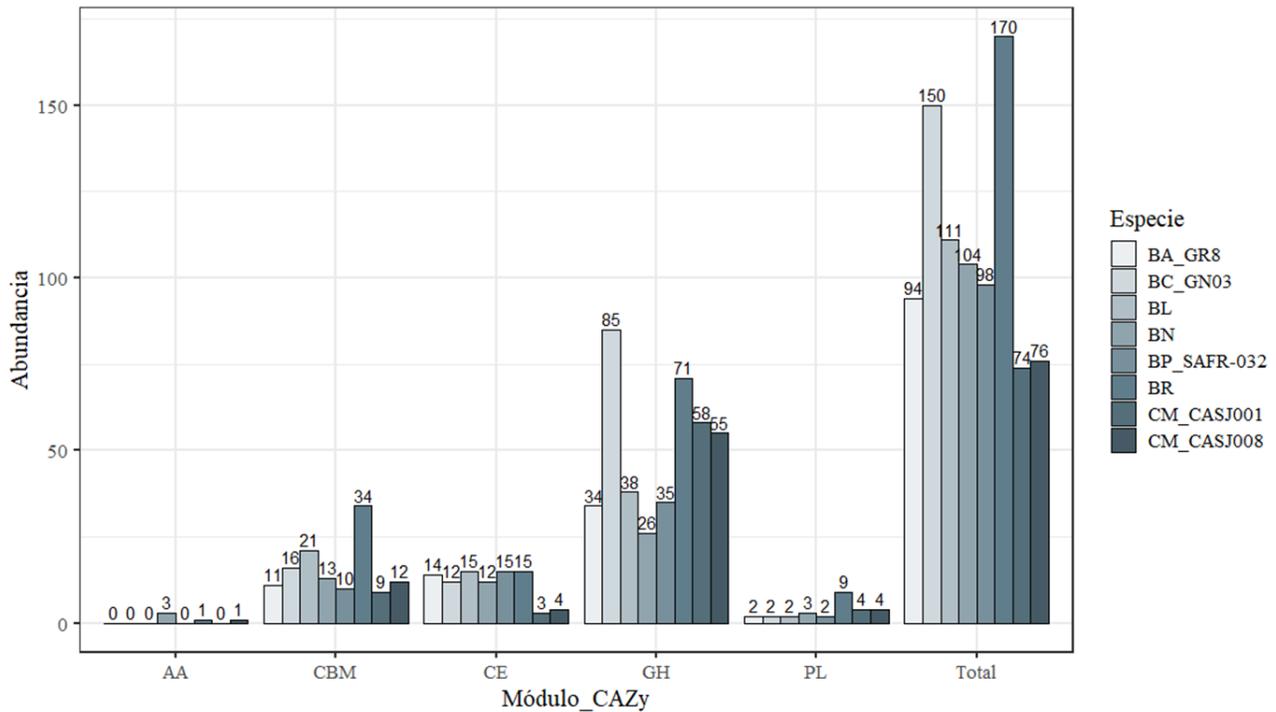


Figura 13. Comparación múltiple contra genomas de especies fitopatógenas de enzimas activas en carbohidratos (CAZy) predecidas. AA: actividad auxiliar, CBM: módulo de unión a carbohidrato, CE: carbohidrato esterasa, GH: glicosil hidrolasa, PL: polisacárido liasa. Especies: BA_GR8 (*B. altitudinis* GR8), BC_GN03 (*B. circulans* GN03), BP_SAFR-032 (*B. pumilus* SAFR-032), CM_CASJ001 (*Clavibacter michiganensis* CAS001), CM_CASJ008 (*C. michiganensis* CASJ008).

Las familias de GH más abundantes que se identificaron en los genomas de las especies del consorcio fueron GH1, GH13, GH23, GH4 y GH43. La **Tabla 5** muestra información detallada de las familias predecidas, así como los sustratos y actividades enzimáticas putativas que podrían desarrollar. Por ejemplo, las GH1 tienen actividad sobre los residuos de glucosa unidos por enlace β -1,4 que forman la celulosa (Mimic 2008). La celulosa no es el único sustrato para estas familias de enzimas, también tienen como blanco hemicelulosas y pectinas como se describe en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Familias de glicosido hidrolasas (GH) predecidas en las especies del consorcio

Especie	Familia CAZy	Sustrato	Actividad enzimática	Número E.C.	Abundancia	Referencia
BR, BL	GH1	celulosa, hemicelulosa, pectina	β -glucosidasa, β -galactosidasa, β -manosidasa	3.2.1.21, 3.2.1.23, 3.2.1.25	23	Minic 2008, Kubicek et al. 2014
BR, BN	GH13	celulosa, hemicelulosa (xiloglucanos)	β -glucosidasa, 1,4- β -xilosidasa	3.2.1.21, 3.2.1.37	14	Collins et al. 2005, Minic 2008
BR, BL, BN	GH23	quitina, quitooligosacáridos	quitinasa	3.2.1.14	12	Romeis et al. 1993
BR, BL, BN	GH4	oligosacáridos con configuración anomérica	α -glucosidasa, α -galactosidasa, 6-P- β -glucosidasa	3.2.1.20, 3.2.1.22, 3.2.1.86	10	Nicotra et al. 2007
BR, BL	GH43	hemicelulosa (xiloglucanos), pectina	β -xilosidasa, endo-1,4- β -xilanasas	3.2.1.37, 3.2.1.8	9	Collins et al. 2005, Suzuki et al. 2010
BR, BN, BL	GH18	oligosacáridos enlace-N	endo- β -N-acetilglucosaminidasa	3.2.1.96	9	Minic 2008
BR, BL, BN	GH5	celulosa, hemicelulosa (xilanos y galactomananos), β -1,3-glucanos	endo- β -1,4-glucanasa/celulasa, endo- β -1,4-xilanasas, β -glucosidasa	3.2.1.4, 3.2.1.8, 3.2.1.21	6	Minic 2008, Aspeborg et al. 2012, Kubicek et al. 2014
BR, BL	GH32	sucrosa	invertasa	3.2.1.26	5	Lammens et al. 2009
BR, BL	GH42	hemicelulosa (galactomananos), pectina	β -galactosidasa, α -L-arabinopiranosidasa	3.2.1.23, 3.2.1.-	4	Collins et al. 2005, Minic 2008
BR, BL	GH3	celulosa, pectina, hemicelulosa (xiloglucanos)	β -glucosidasa, xilano 1,4- β -xilosidasa, exo-xiloglucanasa	3.2.1.21, 3.2.1.37, 3.2.1.155	3	Collins et al. 2005, Minic 2008
BR, BL	GH105	pectina (rhamnogalacturonano)	hidrolasa de rhamnogalacturonilo no saturado	3.2.1.172	3	Itoh et al. 2006
BR, BN	GH8	celulosa, hemicelulosa (xiloglucanos) quitosano	celulasa, endo-1,4- β -xilanasas quitosanas	3.2.1.4, 3.2.1.8, 3.2.1.132	3	Fierobe et al. 1993, Adachi et al. 2004, Minic 2008
BR, BL, BN	GH126	almidón	α -amilasa	3.2.1.-	3	Ficko-Blean et al. 2011
BR	GH31	almidón, hemicelulosa (xiloglucanos)	α -glucosidasa, α -galactosidasa	3.2.1.20, 3.2.1.22	2	Moreira y Filho 2008, Van Den Brink y de Vries 2011
BR, BL	GH28	pectina (homogalacturonano)	poligalacturonasa	3.2.1.15	2	Wu et al. 2008, Kubicek et al. 2014
BR, BL	GH9	celulosa (β -1,4-glucanos), hemicelulosa (β -1,4-glucanos)	endo- β -1,3(4)-glucanasa	3.2.1.6	2	Foley et al. 2019
BR, BL	GH48	celulosa (β -1,4-glucanos), hemicelulosa (β -1,4-glucanos)	endo- β -1,4-glucanasa	3.2.1.4	2	Reverbel-Leroy et al. 1997
BR, BL	GH53	pectina (rhamnogalacturonano)	endo- β -1,4-galactanasas	3.2.1.89	2	Vanholme et al. 2009
BR, BL	GH30	hemicelulosa (xiloglucanos)	xilano β -1,4-xilosidasa	3.2.1.37	2	Boraston et al. 2004
BR, BL	GH11	hemicelulosa (xiloglucanos)	endo- β -1,4-xilanasas	3.2.1.8	2	Gilkes et al. 1991
BR, BL	GH16	hemicelulosa (xiloglucanos), β -1,3-glucanos	xiloglucano endo- β -1,4-glucanasa, β -1,3-glucosidasa	3.2.1.151, 3.2.1.39	2	Viborg et al. 2019
BR, BL	GH51	hemicelulosa (galactomananos)	endo- β -1,4-xilanasas	3.2.1.8	2	Eckert y Schneider 2003
BR	GH12	celulosa, hemicelulosa (xiloglucanos)	endo- β -1,4-glucanasa	3.2.1.4	1	Ketudat Cairns y Esen 2010, Van Den Brink y de Vries 2011, Kubicek et al. 2014
BL	GH38	oligosacáridos enlace-N	α -manosidasa	3.2.1.24	1	Gregg et al. 2011
BR	GH26	hemicelulosa (xiloglucanos)	β -1,3-xilanasas	3.2.1.32	1	Araki et al. 2000

Los sustratos potenciales y las actividades enzimáticas probables están basadas en la información proporcionada por las referencias citadas

Asimismo, en la **Tabla 6** se describen las CE, PL, la clase no-catalítica CBM y las enzimas con actividad auxiliar (AA) identificadas en las especies de *Bacillus spp.* La familia más abundante de carbohidrato esterasas fue la número 4, que de acuerdo con la base de datos CAZy, corresponde a las enzimas acetil xilano esterasas que tienen como sustrato la hemicelulosa (Biely 2012). Respecto a la categoría PL, la familia 1 fue la más abundante; estas enzimas agrupan a las pectato y exopectato liasas y tienen al rhamnogalacturonano, componente de la pectina, como potencial sustrato (Garron y Cygler 2010). Por otro lado, las familias CBM50 y CBM2 fueron las que se encontraron en mayor número (**Tabla 6**).

Los módulos de unión a carbohidratos son dominios que ocurren dentro de las proteínas de las otras clases de CAZymes y su función es acercar y prolongar la cercanía del sitio activo (de la enzima) con el sustrato potencial, permitiendo la hidrólisis del polisacárido (Guillén et al. 2009). En los genomas del consorcio, se identificó a la enzima con actividad auxiliar (AA) de la familia 10 (**Tabla 6** al fondo) que podría aumentar la accesibilidad al sustrato para las enzimas hidrolíticas actuando en sinergia con las celulasas (Levasseur et al. 2013).

Tabla 6. Familias de carbohidrato esterasas (CE), polisacárido liasas (PL), módulos union a carbohidratos (CBM) y actividades auxiliares (AA) predecidas en las especies del consorcio

Especie	Familia CAZy	Sustrato	Actividad enzimática	Número E.C.	Abundancia	Referencia
BR, BL, BN	CE4	hemicelulosa	acetil xilano esterasa	3.1.1.72	27	Biely 2012
BR, BL	CE12	pectina (homogalacturonano y rhamnogalacturonano)	pectin esterasa, acetil xilano esterasa	3.1.1.-, 3.1.1.72	5	Navarro-Fernández et al. 2008, Van Den Brink y de Vries 2011
BR, BL	CE7	hemicelulosa	acetil xilano esterasa, cephalosporina-C desacetilasa	3.1.1.72, 3.1.1.41	2	Vincent et al. 2003, Biely 2012
BR, BL	CE9	quitosano	N-acetilglucosamina-6-P desacetilasa	3.5.1.25	2	Hall et al. 2007
BR, BL	CE8	pectina (homogalacturonano)	pectin metil esterasa	3.1.1.11	2	de Vries y Visser 2001, Van Den Brink y de Vries 2011
BL	CE6	hemicelulosa	acetil xilano esterasa	3.1.1.72	1	Biely 2012
Especie	Familia CAZy	Sustrato	Actividad enzimática	Número E.C.	Abundancia	Referencia
BR, BL	PL1	pectina (rhamnogalacturonano)	pectato liasa, exopectato liasa	4.2.2.2, 4.2.2.9	4	Garron y Cygler 2010, Wang et al. 2011, Kubicek et al. 2014
BR, BL, BN	PL9	pectina (rhamnogalacturonano)	pectato liasa, exopoligalacturonato liasa	4.2.2.2, 4.2.2.9	3	Brooks et al. 1990
BR	PL11	pectina (rhamnogalacturonano)	rhamnogalacturonano endoliasa	4.2.2.23	2	Ochiai et al. 2006
BR	PL3	pectina (rhamnogalacturonano)	pectato liasa	4.2.2.2	1	Garron y Cygler 2010, Kubicek et al. 2014
BR	PL26	pectina (rhamnogalacturonano)	rhamnogalacturonano exo-liasa	4.2.2.24	1	Ochiai et al. 2007
Especie	Familia CAZy	Sustrato	Actividad enzimática	Número E.C.	Abundancia	Referencia
BR, BL, BN	CBM50	quitina/glicoproteínas			22	Tzepelis et al. 2012
BR, BL, BN	CBM2	quitina/hemicelulosa (xilanos)			8	Black et al. 1996
BR, BL	CBM6	hemicelulosa (xilanos), celulosa			5	Fernandes et al. 1999
BR, BN	CBM48	unión a α -glucanos (almidón)			5	Sim et al. 2014
BR, BL	CBM3	celulosa			5	Morag et al. 1995
BR, BN	CBM68	almidón, amilopectina			4	Hii et al. 2012
BR	CBM35	pectina (rhamnogalacturonano)			2	Montanier et al. 2009
BR, BL	CBM27	hemicelulosa (galactomananos)			2	Boraston et al. 2003
BR	CBM49	celulosa			1	Urbanowicz et al. 2007
BR	CBM46	celulosa			1	Venditto et al. 2015
BN	CBM41	unión a α -glucanos (amilosa, amilopectina)			1	Lammerts van Bueren et al. 2004
BL	CBM61	pectina (rhamnogalacturonano)			1	Cid et al. 2010
BL	CBM25	almidón			1	Boraston et al. 2006
BL	CBM36	hemicelulosa (xilanos)			1	Jamal-Talabani et al. 2004
BR	CBM1	celulosa			1	Larroque et al. 2012
BR	CBM72	hemicelulosa (galactomananos), celulosa			1	Duan et al. 2016
BR	CBM63	celulosa			1	Georgelis et al. 2011
BR	CBM66	pectina (rhamnogalacturonano)			1	Hamouda et al. 2020
Especie	Familia CAZy	Sustrato	Actividad enzimática	Número E.C.	Abundancia	Referencia
BR, BN	AA10	celulosa	monooxigenasa cobre-dependiente	1.14.99.54	4	Levasseur et al. 2013

Los sustratos potenciales y las actividades enzimáticas probables están basadas en la información proporcionada por las referencias citadas

7.9 Proteínas Candidatas que Contribuyen a Fitopatogenicidad

La secreción de un conjunto de PCWDEs como pectinasas y celulasas, la producción de sideróforos y la secreción de moléculas efectoras contribuyen para una infección exitosa (Coulthurst et al. 2006). Se ha demostrado que la producción de esas moléculas (efectoras) son dependientes del quorum sensing (Barnard et al. 2007), como el autoinductor-2 (AI-2) que su producción es dependiente del gen *luxS* (Surette et al. 1999). En los genomas BR, BL y BN se identificaron genes candidatos que podrían contribuir para lograr la infección en el hospedero. La **Tabla 7** muestra las proteínas identificadas en cada uno de los genomas.

Tabla 7. Proteínas candidatas a fitopatogenicidad en las especies del consorcio de *Bacillus spp.*

Especie	Fuente acceso GenBank*	Identidad (%)	Proteína	Función
BR	OMI11715.1	100	Liasa S-ribosilhomocisteína (LuxS)	Involucrada en la síntesis del autoinductor-2 empleado en quorum sensing (Surette et al. 1999). Implicada en la formación de biopelícula (Trappetti et al. 2011)
BL	WP_099728596.1	99.4		
BN	WP_001141371.1	100		
BN	WP_046945725.1	100	N-acil homoserin lactonasa	Participa en la síntesis del n-acil homoserin lactona (AHL) (Barnard et al. 2007)
BN	EEK50083.1	94.4	Proteína regulatoria de exoenzima aepA	Activador transcripcional que regula los niveles de proteasas y celulasas en la célula (Liu et al. 1993)
BR	WP_144497846.1	99.7	Regulador transcripcional Kdgr	Regulador de los genes involucrados en la degradación de pectina (Bell et al. 2004)
BL	WP_099726431.1	95.7		
Todas las especies	-	Anotación KEGG ⁺	Biogénesis de flagelos	Motilidad, flagelina facilita la adherencia del patógeno al tejido vegetal (Rossez et al. 2014)
BR	WP_075752550.1	97.2	Factor de elongación EF-Tu	Actúa como PAMP e induce respuesta inmune al huésped (Furukawa et al. 2014)
BL	WP_117728266.1	99.5		
BN	WP_048374300.1	98.7		
BR	WP_145625064.1	99.7	Permeasa transportadora de Fe	Captación de iones Fe (Coulthurst et al. 2006)
Todas las especies	-	Anotación KEGG ⁺	Biosíntesis de sideróforos	Quelantes de iones Fe (Andrews et al. 2003)
Todas las especies	-	Anotación KEGG ⁺	Serin-proteasas	Incrementa la capacidad de entrada y multiplicación en la célula huésped (Upadhye et al. 2009).

Las funciones de las proteínas están basadas en la información proporcionada por las referencias citadas.

*: los números de acceso corresponden a la secuencia proteica publicada en la base de datos.

+: ver sección de Materiales y Métodos: Análisis Bioinformático para parámetros de predicción y anotación.

8. DISCUSIÓN

8.1 Análisis Genómico de las Especies del Consorcio de *Bacillus spp.*

Los métodos de secuenciación masiva en paralelo como la NGS ha abierto el camino a una nueva era en genómica y biología molecular, comparado con el método Sanger que se considera como primera generación, la NGS provee mayor rendimiento en los datos con un costo más bajo y permite realizar estudios genómicos a escala poblacional (Park y Kim 2016). Entre las ventajas de la NGS: no se requiere clonación en modelos bacterianos del ADN diana (a secuenciar), se procesan millones de reacciones en paralelo y al mismo tiempo y por último, la detección de las bases incorporadas se realiza por ciclos y en paralelo (Bentley et al. 2008; Park y Kim 2016). Todas estas características permiten a los investigadores analizar genomas completos a bajo costo y en un corto período de tiempo. Además de las ventajas mencionadas, esta tecnología minimiza los errores en la incorporación de bases durante el proceso de síntesis de lecturas y el enfoque de lecturas en pares “paired end” es eficiente al momento de alinear secuencias mejorando la precisión y cobertura de secuencias consenso (Bentley et al. 2008; Nagarajan y Pop 2013). Dicho esto, podemos inferir que las secuencias generadas por el sistema utilizado para nuestro trabajo son de alto rendimiento y precisión.

La evaluación de la calidad de secuencias es imprescindible para conocer si los datos con los que se trabajan son óptimos para análisis posteriores y con esto evitar horas de trabajo y esfuerzos. Por esta razón, se procesaron los datos mediante MG-RAST (Meyer et al. 2008) ya que nos ayuda a determinar si la calidad de lecturas es óptima y así tomar la decisión si nuestro conjunto de datos son de buena calidad para análisis posteriores. MG-RAST ha sufrido modificaciones en su flujo de trabajo y ha estado en constante mejoramiento para proveer un análisis confiable (Keegan et al. 2016). Nuestros resultados mostraron una longitud promedio de lecturas de 76 pb, un contenido de GC 40.1% y un promedio total del error de secuenciación de 4.3% (**Figuras 6 y 7**).

Hasta hace más de una década, la recuperación de genomas a partir de datos metagenómicos estaba restringida a muestras con baja diversidad (Tyson et al. 2004), sin embargo, la mejora en las tecnologías de secuenciación y los avances en los recursos

bioinformáticos han permitido recuperar genomas ensamblados de metagenomas (MAG's, por sus siglas en inglés) de entornos de alta diversidad (Yeoh et al. 2015; Parks et al. 2017). Los MAG se obtienen agrupando contigs ensamblados con una composición de secuencia similar, profundidad de cobertura en una o más muestras relacionadas (Parks et al. 2017). Nuestro conjunto de datos inicialmente contenía tres genomas de especies de *Bacillus* estrechamente relacionadas. Los MAG son típicamente incompletos y pueden contener contigs de múltiples cepas o especies debido a los desafíos para distinguir entre miembros de la comunidad relacionados tanto en los procesos de montaje (ensamble) como en el agrupamiento (Imelfort et al. 2014). No obstante, este tema en especial ha estimulado el desarrollo de herramientas para evaluar la calidad de los MAG recuperados, y como lo muestra la **Tabla 2**, obtuvimos genomas considerados como completos de acuerdo con lo sugerido por (Snyder et al. 2007; y Parks et al. 2017), que para clasificar un genoma como completo (reconstruido de muestras que contienen más de dos genomas) deben contar con los siguientes estadísticos: contig N50 ≥ 10 kpb, consistencia $\geq 87\%$, que es el número de genes que corresponden a un genoma funcional (Wattam et al. 2014), y contaminación $< 10\%$.

Los plásmidos son moléculas de ADN circulares o lineales capaces de replicarse por sí mismos y transferirse entre diferentes especies bacterianas. La mayoría de los plásmidos descritos se han identificado por conferir ciertas características fenotípicas que son objeto de selección positiva en la bacteria huésped, como la presencia de genes de resistencia a antimicrobianos o de virulencia (Snyder et al. 2012; Carattoli et al. 2014). Sin embargo, los genes relacionados a virulencia predecidos se encontraron que forman parte del cromosoma de las especies como lo muestra la **Tabla 5**. Además, el fragmento de plásmido putativo codifica a una proteína relacionada con la replicación (del plásmido) (**Tabla 3**). Similar al ADN genómico o cromosómico, los plásmidos codifican proteínas, ARN y se replican conforme la célula crece, posteriormente cuando la célula se divide se distribuyen a las células hijas. Aislados de bacterias extraídos del ambiente a menudo perderán algunos o todos los plásmidos con el tiempo cuando se cultivan en el laboratorio (Snyder et al. 2012). Aunque el consorcio de *Bacillus spp.* se almacenó en ultracongelación hasta su uso, cabe la posibilidad de que no se hayan logrado identificar en el conjunto de datos por la razón antes mencionada. Mediante el análisis genómico

comparativo realizado contra cepas de referencia (**Tabla 4**), podemos inferir que los genomas reportados en este estudio no contienen material extracromosómico, al menos con las especies BR y BL, debido a que los tamaños de ADN y número de CDS son similares entre sí. Distinto a los genomas de *B. safensis*, ya que hubo diferencias incluso entre los genomas de referencia (**Tabla 4**). La presencia de cepas con cierta homología en una comunidad puede ser un desafío para la recuperación de genomas a partir de muestras que contienen >2 genomas (especies), ya que puede reducir la calidad del ensamblaje y la capacidad de reconocer contigs de la misma población (Imelfort et al. 2014; Luo et al. 2015) (el consorcio de *Bacillus spp.* en nuestro caso). En particular, existe la posibilidad de que solo se ensamblen regiones genómicas compartidas entre cepas con-específicas (altamente homólogas). Este sesgo en el tamaño de los cromosomas puede atribuirse a varios factores que incluyen: inexactitudes en las estimaciones de integridad y contaminación (Parks et al. 2015), errores en el ensamblaje de regiones repetitivas (Jørgensen et al. 2015), dificultades para asignar pequeños contigs a genomas derivados de una mezcla (Kang et al. 2015) o a variaciones naturales en el tamaño del ADN entre especies (Tatusova et al. 2014). Dado lo anteriormente expuesto, podemos inferir que obtuvimos una recuperación casi completa del ADN cromosómico de las tres especies (**Tabla 4**). Esto sugiere que para los MAG casi completos, no hay pérdida sistemática de contenido genómico (Parks et al. 2017), con la excepción de elementos extracromosómicos como plásmidos.

Para adaptarse al rápido crecimiento de datos genómicos, se requieren métodos computacionales más eficientes y precisos para la anotación funcional de genomas. La base para la anotación es la aplicación de la similitud de secuencias contra secuencias curadas o anotadas manualmente. Esto se logra mediante métodos de alineación de secuencias como el algoritmo Smith-Waterman (Smith y Waterman 1981) y BLAST (Altschul et al. 1990). Los genes ortólogos son genes funcionalmente conservados en diferentes especies, ramificados de un ancestro común por especiación. En la práctica, se deducen computacionalmente de la relación bidireccional de mejor resultado (BBH) en la comparación del genoma por pares (Tatusov et al. 1997; Kanehisa et al. 2016). Por lo tanto, la identificación de genes ortólogos entre especies es la mejor forma de predecir (*in silico*) funciones de genomas secuenciados. La anotación de genomas en KEGG se realiza

en diferentes fases; 1) las funciones moleculares son almacenadas en la base KO (Ortología KEGG) y se asocian a grupos ortólogos con el fin de integrarlas con evidencia experimental en organismos específicos a otros organismos; 2) los grupos ortólogos son definidos en el contexto de rutas KEGG y otras conexiones moleculares para deducir a cuáles vías metabólicas participarían los genes anotados y en consecuencia las proteínas. Por lo tanto, el procedimiento de anotación del genoma conduce a la reconstrucción automática de rutas metabólicas permitiendo la interpretación de funciones a alto nivel (Kanehisa et al. 2016).

8.2 Enzimas que Degradan Pared Celular de Plantas

Bacillus subtilis y especies relacionadas son usadas en la producción industrial de enzimas, proteínas con actividad insecticida y farmacéutica, antibióticos y nucleótidos purínicos para aumentar el sabor de productos comestibles (Olempska-Beer et al. 2006; Ochiai et al. 2007). Varias enzimas importantes para el procesamiento de alimentos han sido derivadas de cepas y especies de *Bacillus* durante años (Olempska-Beer et al. 2006; Gu et al. 2018). Comparado con otros microorganismos, es bien conocido que especies de *Bacillus* tienen una capacidad superior de secreción de proteínas, además de buen crecimiento en fuentes de carbono económicas y su adaptación en la producción industrial de los productos ya mencionados (Gu et al. 2018). Por otro lado, se cree que muchos patógenos vegetales evolucionaron a partir de los saprobios (Gibson et al. 2011). Dado que la lignocelulosa es el material más perdurable en los residuos vegetales, los saprobios exitosos han desarrollado arsenales PCWDE para adquirir azúcares para su propia nutrición y supervivencia.

Las CAZymes están catalogadas en distintas familias que ensamblan o rompen oligosacáridos y polisacáridos. Tales familias se agrupan de acuerdo con su distinta especificidad pero que comparten el plegamiento tridimensional, la maquinaria catalítica y mecanismo de reacción (Garron y Henrissat 2019). Este sistema de clasificación ha sido integrado y actualizado meticulosamente en la base de datos CAZy desde 1998 (Levasseur et al. 2013) por lo que provee información manualmente curada para cada una de las categorías haciendo posible cubrir todas las familias involucradas en procesos de descomposición de celulosa, hemicelulosa y pectina (Levasseur et al. 2013).

Refiriéndonos a datos de secuencias, la clasificación está basada en la estructura primaria de aminoácidos, pero dado que la estructura terciaria y la unión del sustrato dependen de la estructura primaria, el sustrato de muchas PCWDEs se puede deducir a partir de ella (secuencia de aminoácidos). Por lo que en este estudio, se utilizó la homología de secuencias con CAZymes caracterizados para agrupar las PCWDEs predecidas según el sustrato o sustratos que degradan (**Tablas 5 y 6**). La diversidad de monosacáridos, la gran variedad de posibles enlaces, la modificación de carbohidratos como sulfataciones o acetilaciones, la longitud y la forma que adoptan los polisacáridos (linear, circular, ramificaciones) provee a estos glucanos como las más diversas de todas las biomoléculas (Garron y Henrissat 2019). Esta diversidad de sustratos está correlacionada con el gran número de funciones cubiertas por las familias CAZyme. Incluso si algunas enzimas son más abundantes que otras, las familias muestran una importante diversidad estructural (Davies et al. 2005; Garron y Henrissat 2019).

La complejidad estructural, insolubilidad y el alto peso molecular de la lignina que es una red de distintos polisacáridos y compuestos aromáticos, es un reto para los microorganismos degradarla o modificarla (Ruiz-Dueñas y Martínez 2009). Evidencia reciente ha resaltado que existen enzimas alternativas involucradas en la oxidación de ciertos componentes de la pared celular vegetal. Originalmente descritas como celulasas, se ha demostrado que tales enzimas son monooxigenasas polisacárido líticas dependientes de cobre que favorecen la degradación de celulosa, en conjunto con celulasas clásicas (Ruiz-Dueñas y Martínez 2009; Levasseur et al. 2013). Por lo tanto, estas enzimas oxidativas son esenciales porque estimulan la conversión enzimática de polisacáridos recalcitrantes. En consecuencia, se creó una nueva clase en la base de datos CAZy llamada “Actividades Auxiliares (AA)” que abarca enzimas redox y enzimas monooxigenasas polisacárido líticas involucradas en degradación de celulosa y lignina (Levasseur et al. 2013). La clase AA abarca varias familias que no se limitan a un único mecanismo de reacción para un sustrato específico. La familia AA10 (**Tabla 6**) predecida en nuestros datos, posee el rol de cortar oxidativamente los enlaces en la celulosa por lo que podría incrementar la accesibilidad a enzimas hidrolíticas actuando en sinergia con esas enzimas (Levasseur et al. 2013). Cabe destacar la cantidad de CAZymes identificadas involucradas en la degradación de pectina (rhamnogalacturonano y homogalacturonano), ya que se cree

que la descomposición de este polisacárido es el primer paso en la cascada de las actividades PCWDE (Brunner et al. 2013), que en consecuencia podría incrementar la porosidad de la pared celular y exponer a los demás polisacáridos con el fin de facilitar la acción de las demás enzimas hidrolíticas (Blackman et al. 2014). Los residuos β -1,4-glucosa que forman la celulosa puede ser degradado por las enzimas que caen dentro de cuatro categorías: endo y exo- β -1,4-glucanasas, celobiohidrolasas y β -glucosidasas (Minic 2008); también hay proteínas AA que asisten en el rompimiento de la celulosa a través de actividad enzimática directa o indirectamente (Levasseur et al. 2013) y CMBs que se unen a celulasas y aumentan la actividad enzimática (**Tabla 6**).

Se han descrito distintos reguladores de la producción de PCWDE, entre ellos el represor KdgR que se ha demostrado que actúa como regulador de los genes involucrados en la degradación de pectina (Bell et al. 2004). KdgR es un represor de la transcripción que se une a las regiones promotoras (cajas KdgR) de sus genes blanco. De acuerdo con la búsqueda BLASTP, se pudo identificar que los genomas de BR y BL contienen esta proteína reguladora (**Tabla 7**). Otro regulador es AepA (activador de proteínas extracelulares) que actúa como activador transcripcional regulando los niveles en la producción de proteasas y celulasas en la célula (Liu et al. 1993).

Para funcionar en la degradación de la pared celular de la planta, las enzimas deben secretarse y moverse a través de la pared celular del patógeno para acceder a la pared celular de la planta (Blackman et al. 2014). La anotación de los genomas contra KEGG arrojó que nuestro conjunto de datos contiene una variedad de proteínas relacionadas al transporte, motilidad celular y adaptación al ambiente (**Figura 9**) lo que sugiere que podrían intervenir en procesos de infección como la secreción (transporte) de enzimas degradadoras. Distintas proteínas relacionada al ensamble de flagelos fueron anotadas (**Tabla 7**). Estas proteínas participan en la interacción entre el patógeno y la planta; pueden inducir inmunidad al hospedero y la flagelina facilita la adherencia del patógeno al tejido vegetal (Rossez et al. 2014). Un inconveniente que se tuvo cuando realizamos alineamientos usando BLAST contra la base de datos CAZy, es que solo se pudo decir si la proteína de consulta tenía hits (similitudes entre secuencias) de dominios entre las clases CAZymes con actividad hidrolítica (GH, PL, CE y AA), sin embargo, suponiendo que la

proteína de consulta tiene un dominio de GH y un CBM, la alineación con BLAST sólo nos mostrará como resultado la presencia de un dominio GH perdiendo así datos importantes para la predicción. Por el contrario, la anotación usando la herramienta dbCAN2 (Zhang et al. 2018) proporciona información mucho más precisa y sensible; como cuál y cuántos dominios CAZyme (incluidos, por ejemplo, dominios CBM repetitivos) tiene la proteína de consulta y dónde están los límites de estos dominios en la secuencia completa. Por lo tanto, dbCAN2 en general ofrece una anotación CAZyme mucho mejor y más completa que la simple búsqueda BLAST.

8.3 Proteínas Candidatas de Fitopatógenos

Las plantas contienen grandes fuentes de nutrientes potenciales para la diversidad de especies bacterianas patógenas en el ambiente, la mayoría de estos microorganismos son lo suficientemente pequeños para pasar a través de los estomas y otras aberturas naturales hacia el tejido vegetal (Alfano y Collmer 1996). Si la bacteria puede sobrevivir y atravesar las barreras, el siguiente paso es secuestrar los nutrientes que necesita (de la planta) y comenzar a crecer en la superficie de la planta o intercelularmente ingresando a través de heridas o estomas. Las bacterias patógenas o no patógenas poseen una serie de estructuras y moléculas expuestas que la planta puede reconocer como "no propias". Ejemplos de estructuras características que son reconocidas por las plantas incluyen β -glucano, lipopolisacáridos (LPS), el factor de elongación EF-Tu y la flagelina (Rossez et al. 2014; Feechan et al. 2015). La definición original de PAMP describe estas moléculas como altamente conservadas dentro de una clase de microorganismos que tienen una función esencial en la adaptación o supervivencia; algunos PAMP también son necesarios para la virulencia (Feechan et al. 2015). Además de los PAMP bacterianos conservados, estudios han demostrado que algunos PAMP están aún más conservados, como el fragmento de 13 aminoácidos expuesto en la superficie de una transglutaminasa de la pared celular, llamada Pep13, en especies de *Phytophthora* (Feechan et al. 2015).

Las paredes celulares de plantas son estructuras complejas heterogéneas compuestas de polisacáridos, proteínas y polímeros aromáticos; la composición y estructura difiere entre los linajes de las plantas, sin embargo, comparten que todas contienen microfibrillas de celulosa embebidas en una matriz de pectina, hemicelulosa,

lignina y otras proteínas estructurales (Levasseur et al. 2013; Kubicek et al. 2014). La producción de proteínas de secreción es clave en la virulencia de muchos patógenos bacterianos (Barnard et al. 2007). Pasan su vida parasitaria contra la pared de las células vegetales, en los espacios intercelulares de varios órganos vegetales o en el xilema, y algunos son necrógenos capaces de causar la muerte a las células vegetales. Su capacidad para multiplicarse y luego para matar las células depende de las enzimas secretadas que degradan la pared o de las moléculas que la atraviesan (Alfano y Collmer 1996; Barnard et al. 2007). La secreción de un conjunto de PCWDEs como pectinasas y celulasas, la producción de sideróforos y la secreción de moléculas efectoras contribuyen para una infección exitosa (Coulthurst et al. 2006). Se ha demostrado que la producción de esas moléculas (efectoras) son dependientes del quorum sensing (Barnard et al. 2007), como el autoinductor-2 (AI-2) que su producción es dependiente del gen *luxS* (Surette et al. 1999; Trappetti et al. 2011). Muchas especies bacterianas grampositivas o gramnegativas, poseen actividad similar al AI-2 o contienen un homólogo al gen *luxS* lo que sugiere que AI-2 es universal (no específico de especie) y que es una molécula de señalización interespecie; mutaciones en el gen *luxS* da lugar a distintos fenotipos, desde poco impacto hasta una alteración completa en la capacidad patogénica (Vendeville et al. 2005). En nuestros genomas de las tres especies se identificó la proteína putativa liasa-S-ribosilhomocisteína, que está involucrada en la síntesis del autoinductor-2 (**Tabla 7**), además de una variedad de proteínas que se asignaron como “comunidad celular” dentro de la categoría “procesos celulares” en KEGG involucradas en quorum sensing (**Figura 9**). Otro factor que podría estar involucrado en la patogénesis del consorcio de *Bacillus spp.* sobre plantas de chile habanero es el factor de elongación EF-Tu; se ha demostrado que tiene función como PAMP en arroz (*Oryza sativa*) y *Arabidopsis* ocasionándoles que monten una respuesta PTI (Furukawa et al. 2014). Aunque el EF-Tu es intracelular, su liberación por lisis de células bacterianas durante la invasión al tejido vegetal es suficiente para cumplir su función (Zipfel et al. 2006; Feechan et al. 2015). Por otro lado, en un estudio realizado por (Rossez et al. 2014) probaron la hipótesis de que el flagelo de *E. coli* interviene en los pasos iniciales de adherencia a la membrana celular vegetal vía patrones moleculares de reconocimiento facilitando interacciones en un modelo con plantas de *Arabidopsis*. En la **Tabla 7** se muestra que las tres especies de *Bacillus* contienen genes

relacionados a la biogénesis de flagelos precedidos usando KEGG. Una serin-proteasa putativa se encontró en cada uno de los genomas del consorcio y fueron asignadas en la clase procesamiento de información ambiental (**Tabla 7; Figura 9**). Se ha observado que esta proteína incrementa la capacidad de entrada y multiplicación intracelular de la bacteria (Upadhye et al. 2009).

La formación de biopelícula es un proceso complejo que involucra varios pasos. El primero es la adherencia de las células bacterianas a la superficie del hospedero, luego esas células forman biopelículas compuestas por una matriz extracelular. Esta matriz protege a la bacteria de antibióticos o del ataque del sistema inmune del hospedero (Trappetti et al. 2011). Posteriormente, las células se “despegan” a células individuales que pueden diseminarse e infectar otros sitios. El quorum sensing juega un papel importante en este proceso, donde el autoinductor-2 que es sintetizado por la enzima LuxS, es una molécula de señalización que regula su formación (Surette et al. 1999; Auger et al. 2006). Como muestra la **Tabla 7**, se identificó a la enzima LuxS con un alto porcentaje de identidad en nuestro conjunto de datos. Otro factor importante en el desarrollo de biopelículas por el patógeno es la disponibilidad del hierro (Fe) (Trappetti et al. 2011); es un elemento esencial para la mayoría de las células debido a su papel como cofactor de enzimas, particularmente de las que participan en el metabolismo central y respiración. La escasez de Fe (disponible) en el ambiente es una de las primeras líneas de defensa del hospedero para evitar una infección bacteriana (Hammer y Skaar 2011). Los microorganismos han desarrollado estrategias como sistemas de transporte de Fe de alta afinidad para sobrellevar la escasez de este elemento en el ambiente. En condiciones de bajos niveles de Fe, los sideróforos son liberados al medio para tomar o remover el Fe del hospedero (de Lorenzo y Martínez 1988; Andrews et al. 2003), posteriormente el Fe quelado es internalizado a la célula del microorganismo a través de un receptor embebido en su pared celular. Aunque no se predijeron proteínas putativas relacionadas al transporte de iones Fe en dos genomas de las especies de *Bacillus*, en la especie BR se identificó un transportador (permeasa) de Fe (**Tabla 7**) que de acuerdo con (Andrews et al. 2003), las bacterias grampositivas emplean una permeasa del tipo ABC para que el ion Fe se transporte hacia el citoplasma de la célula bacteriana.

9. CONCLUSIONES

De acuerdo con los análisis genómicos de las especies del consorcio y los resultados arrojados de los bioensayos infectando plantas de chile habanero podemos concluir que el consorcio de *Bacillus spp.* es capaz de causar síntomas de enfermedad a plantas de chile habanero. Se identificaron tres especies con morfología colonial distintiva en agar YDC. Mediante secuenciación de los genomas y del gen 16S del ARNr se identificaron las especies: *B. paralicheniformis*, *B. pumilus* y *B. safensis*. El análisis de predicción de enzimas activas en carbohidratos reveló que los tres genomas contienen numerosas enzimas degradadoras de pared celular vegetal, comparables a otras especies de *Bacillus* reportadas como fitopatógenas. Asimismo, el análisis *in silico* demostró que los genomas contienen genes que codifican a flagelos, proteasas, sideróforos, reguladores de secreción de celulasas, que podrían contribuir a su fitopatogenicidad.

10. PERSPECTIVAS

- Resequenciar por separado las especies del consorcio bajo la misma tecnología para buscar elementos extracromosómicos que pudieran poseer, como plásmidos.
- Realizar cortes histológicos del tejido vegetal infectado para observar a nivel celular los cambios provocados por la infección de las especies del consorcio de *Bacillus spp.*
- Cuantificar parámetros empleados para determinar cómo las células sufren el daño y elucidar un posible mecanismo de patogénesis que ocasiona el consorcio de *Bacillus spp.*

11. BIBLIOGRAFÍA

- Adachi W, Sakihama Y, Shimizu S, Sunami T, Fukazawa T, Suzuki M, Yatsunami R, Nakamura S, Takénaka A. 2004. Crystal structure of family GH-8 chitosanase with subclass II specificity from *Bacillus* sp. K17. *Journal of Molecular Biology*. 343(3): 785-795.
- Ahmadi E, Kowsari M, Azadfaar D, Jouzani GS. 2019. *Bacillus pumilus* and *Stenotrophomonas maltophilia* as two potentially causative agents involved in Persian oak decline in Zagros forests (Iran). *For. Path.* e12541.
- Alfano JR, Collmer A. 1996. Bacterial pathogens in plants: life up against the wall. *The Plant Cell*. 8: 1683-1698.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*. 215(3): 403-410.
- Andrews SC, Robinson AK, Rodríguez-Quiñones F. 2003. Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiology Reviews*. 27(2): 215-237.
- Antonopoulos DA, Assaf R, Aziz RK, Brettin T, Bun C, Conrad N, Davis JJ, Dietrich EM, Disz T, Gerdes S, Kenyon RW, Machi D, Mao C, Murphy-Olson DE, Nordberg EK, Olsen GJ, Olson R, Overbeek R, Parrello B, Pusch GD, Santerre J, Shukla M, Stevens RL, VanOeffelen M, Vonstein V, Warren AS, Wattam AR, Xia F, Yoo H. 2019. PATRIC as a unique resource for studying antimicrobial resistance. *Briefings in Bioinformatics*. 20(4): 1094-1102.
- Araki T, Hashikawa S, Morishita T. 2000. Cloning, sequencing, and expression in *Escherichia coli* of the new gene encoding β -1,3-xylanase from a marine bacterium *Vibrio* sp. strain XY-214. *Applied and Environmental Microbiology*. 66(4): 1741-1743.
- Aspeborg H, Coutinho PM, Wang Y, Brumer I, Henrissat B. 2012. Evolution, substrate specificity and subfamily classification of glucoside hydrolase family 5 (GH5). *BMC Evolutionary Biology*. 12: 186.
- Auger S, Krin E, Aymerich S, Gohar M. 2006. Autoinducer 2 affects biofilm formation by *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 72(1): 937-941.
- Balint-Kurti P. 2019. The plant hypersensitive response: concepts, control and consequences. *Molecular Plant Pathology*. 20: 1163-1178.
- Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, Lesin VM, Nikolenko SI, Pham S, Prjibelski AD, Pyshkin AV, Sirotkin AV, Vyahhi N, Tesler G,

- Alekseyev MA, Pevzner PA. 2012. SPAdes: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of Computational Biology*. 19(5): 455-477.
- Barnard AML, Bowden SD, Burr T, Coulthurst SJ, Monson RE, Salmond GPC. 2007. Quorum sensing, virulence, and secondary metabolite production in plant soft-rotting bacteria. *Phil. Trans. R. Soc.* 362: 1165-1183.
- Barrales-López A, Robledo-Paz A, Trejo C, Espitia-Rangel E, Rodríguez-De La O JL. 2015. Improved *in vitro* rooting and acclimatization of *Capsicum chinense* Jacq. plantlets. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 51: 247-283.
- Bathily H, Babana AH, Samaké F. 2010. *Bacillus pumilus*, a new pathogen on potato tubers in storage in Mali. *African J. Microbiology Research*. 4(20): 2067-2071.
- Bell KS, Sebaihia M, Pritchard L, Holden MTG, Hyman LJ, Holeva MC, Thomson NR, Bentley SD, Churcher LJC, Mungall K, Atkin R, Bason N, Brooks K, Chillingworth T, Clark K, Doggett J, Fraser A, Hance Z, Hauser H, Jagels K, Moule S, Norbertczak H, Ormond D, Price C, Quail MA, Sanders M, Walker D, Whitehead S, Salmond GPC, Birch PRJ, Parkhill J, Toth IK. 2004. Genome sequence of the enterobacterial phytopathogen *Erwinia carotovora* subsp. *Atroseptica* and characterization of virulence factors. *PNAS*. 101(30): 11105-11110.
- Bellincampi D, Cervone F, Lionetti V. 2014. Plant cell wall dynamics and wall-related susceptibility in plant-pathogen interactions. *Frontiers in Plant Science*. 228: 1-8.
- Benson DA, Clark K, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Sayers EW. 2015. GenBank. *Nucleic Acid Research*. 43: D30-D35.
- Bentley DR, Balasubramanian S, Swerdloy HP, Smith GP, Milton J, et al. 2008. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature*. 456(6): 53-59.
- Betsuyaku S, Nomura N, Fukuda H. 2019. A versatile method for mounting *Arabidopsis* leaves for intravital time-lapse imaging. *Journal of Visualized Experiments*. 144: e59147.
- Bhojwani SS, Dantu PK. 2013. *Plant tissue culture: an introductory text*. Springer India, pp. 39-50.
- Bidhendi AJ, Chebli Y, Geitmann A. 2019. Fluorescence visualization of cellulose and pectin in the primary plant cell wall. *Journal of Microscopy*. 278(3): 164-181.
- Biely P. 2012. Microbial carbohydrate esterases deacetylating plant polysaccharides. *Biotechnology Advances*. 30: 1575-1588.

Black GW, Hazlewood GP, Millward-Sadler SJ, Laurie JJ, Gilbert HJ. 1996. A modular xylanase containing a novel non-catalytic xylan-specific binding domain. *Journal of Biochemistry*. 307: 191-195.

Blackman LM, Cullerne DP, Hardham AR. 2014. Bioinformatic characterization of genes encoding cell wall degrading enzymes in the *Phytophthora parasitica* genome. *BMC Genomics*. 15: 785.

Boraston AB, Bolam DN, Gilbert HJ, Davies GJ. 2004. Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition. *Biochemistry Journal*. 382: 769-781.

Boraston AB, Healey M, Klassen J, Ficko-Blean E, Lammerts van Bueren A, Law V. 2006. A structural and functional analysis of α -glucan recognition by family 25 and 26 carbohydrate-binding modules reveals a conserved mode of starch recognition. *The Journal of Biological Chemistry*. 281(1): 587-598.

Boraston AB, Revett TJ, Boraston CM, Nurizzo D, Davies GJ. 2003. Structural and thermodynamic dissection of specific mannan recognition by a carbohydrate binding module, *TmCBM27*. *Structure*. 11: 665-675.

Borriss R. 2015. *Bacillus*, a plant-beneficial bacterium. In: *Principles of Plant-Microbe Interactions*, Lugtenberg B (ed). Springer, Cham. pp. 379-392.

Brettin T, Davis JJ, Disz T, Edwards RA, Gerdes S, Olsen GJ, Olson R, Overbeek R, Parrello B, Pusch GD, Shukla M, Thomason JA, Stevens R, Vonstein V, Wattam AR, Xia F. 2015. RASTtk: a modular and extensible implementation of the RAST algorithm for building custom annotation pipelines and annotating batches of genomes. *Scientific Reports*. 5: 8365.

Brooks AD, He SY, Gold S, Keen NT, Collmer A, Hutcheson SW. 1990. Molecular cloning of the structural gene for exopolysaccharide lyase from *Erwinia chrysanthemi* EC16 and characterization of the enzyme product. *Journal of Bacteriology*. 172(12): 6950-6958.

Brunner PC, Torriani SFF, Croll D, Stukenbrock EH, McDonald BA. 2013. Coevolution and life cycle specialization of plant cell wall degrading enzymes in a hemibiotrophic pathogen. *Molecular Biology and Evolution*. 30: 1337-1347.

Buchfink B, Xie C, Huson DH. 2015. Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. *Nature Methods*. 12: 59-64.

Busk PK, Lange L. 2013. Function-based classification of Carbohydrate-Active Enzymes by Recognition of Short, Conserved Peptide Motifs. *Applied and Environmental Microbiology*. 79(11): 3380-3391.

Busk PK, Pilgaard B, Lezyk MJ, Meyer AS, Lange L. 2017. Homology to peptide pattern for annotation of carbohydrate-active enzymes and prediction of function. *BMC Bioinformatics*. 18: 214.

Carattoli A, Zankari E, García-Fernández A, Larsen MV, Lund O, Villa L, Aarestrup FM, Hasman H. 2014. *In silico* detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 58(7): 3895-3903.

Casadevall A, Pirofski LA. 2009. Virulence factors and their mechanism of action: the view from a damage-response framework. *J. Water Health*. 7 (S1): S2-S18.

Chen L, Yang J, Yu J, Yao Z, Sun L, Shen Y, Jin Q. 2015. VFDB: a reference database for bacterial virulence. *Nucleic Acids Research*. 33: D325-D328.

Chen L, Zheng D, Liu B, Yang J, Jin Q. 2016. VFDB 2016: hierarchical and refined dataset for big data analysis-10 years on. *Nucleic Acid Research*. 44: D694-D697.

Choudhary DK, Johri BN. 2009. Interactions of *Bacillus* spp. and plants – With special reference to induced systemic resistance (ISR). *Microbiological Research*. 164: 493-513.

Cid M, Pedersen HP, Kaneko S, Coutinho PM, Henrissat B, Willats WGT, Boraston AB. 2010. Recognition of the helical structure of β -1,4-galactan by a new family of carbohydrate-binding modules. *The Journal of Biological Chemistry*. 285(46): 35999-36009.

Collins T, Gerday C, Feller G. 2005. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*. 29: 3-23.

Coulthurst SJ, Lilley KS, Salmond GPC. 2006. Genetic and proteomic analysis of the role of *luxS* in the enteric phytopathogen, *Erwinia carotovora*. *Molecular Plant Pathology*. 7(1): 31-45.

Cox MP, Peterson DA, Biggs PJ. (2010). SolexaQA: at-a-glance quality assessment of Illumina second-generation sequencing data. *BMC Bioinformatics*. 11: 485.

Davies GJ, Gloster TM, Henrissat B. 2005. Recent structural insights into the expanding world of carbohydrate-active enzymes. *Current Opinion in Structural Biology*. 15: 637-645.

de Lorenzo V, Martínez JL. 1988. Aerobactin production as a virulence factor: a reevaluation. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 7(5): 621-629.

de Vries RP, Visser J. 2001. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 65(4): 497-522.

Duan CJ, Feng YL, Cao QL, Huang MY, Feng JX. 2016. Identification of a novel family of carbohydrate-binding modules with broad ligand specificity. *Scientific Reports.* 6:19392.

Eckert K, Schneider E. 2003. A thermoacidophilic endoglucanase (CelB) from *Alicyclobacillus acidocaldarius* displays high sequence similarity to arabinofuranosidases belonging to family 51 of glycoside hydrolases. *European Journal of Biochemistry.* 270: 3593-3602.

Ek-Ramos MJ, Avila J, Cheng C, Martin GB, Devarenne TP. 2010. The T-loop extension of the tomato protein kinase AvrPto-dependent Pto-interacting protein 3 (Adi3) directs nuclear localization for suppression of plant cell death. *Journal of Biological Chemistry.* 285(23): 17584-17594.

Feechan A, Turnbull D, Stevens LJ, Engelhardt S, Birch PRJ, Hein I, Gilroy EM. 2015. The hypersensitive response in PAMP- and effector-triggered immune responses. In: *Plant Programmed Cell Death*, Gunawardena AN, McCabe PF (eds), Springer: Switzerland, pp: 235-368.

Fernandes AC, Fontes CMGA, Gilbert HJ, Hazlewood GP, Fernandes TH, Ferreira LMA. 1999. Homologous xylanases from *Clostridium thermocellum*: evidence for bi-functional activity, synergism between xylanase catalytic modules and the presence of xylan-binding domains in enzyme complexes. *Biochemical Journal.* 342: 105-110.

Ficko-Blean E, Stuart CP, Boraston AB. 2011. Structural analysis of CPF_2247, a novel α -amylase from *Clostridium perfringens*. *Proteins.* 79: 2771-2777.

Fierobe HP, Bagnara-Tardif C, Gaudin C, Guerlesquin F, Sauve P, Belaich A, Belaich JP. 1993. Purification and characterization of endoglucanase C from *Clostridium cellulolyticum*. *European Journal of Biochemistry.* 217: 557-565.

Finn RD, Clements J, Eddy SR. 2011. HMMER web server: interactive sequence similarity searching. *Nucleic Acid Research.* 39: W29-W37.

Flores-Félix JD, Menéndez E, Marcos-García M, Celador-Lera L, Rivas R. 2015. Calcofluor white, an alternative to propidium iodide for plant tissue staining in studies of

root colonization by fluorescent-tagged rhizobia. *Journal of Advances in Biology and Biotechnology*. 21(1): 65-70.

Foley MH, Déjean G, Hemsworth GR, Davies GJ, Brumer H, Koropatkin NM. 2019. A cell surface GH9 endo-glucanase coordinates with surface glycan-binding proteins to mediate xyloglucan uptake in the gut symbiont *Bacteroides ovatus*. *Journal of Molecular Biology*. 431: 981-995.

Font MI, Bassimba DDM, Cebrián MC, Molina LM, Jordá C. 2010. First report of *Bacillus pumilus* on *Phaseolus vulgaris* in Spain. *Plant Pathology*. 59: 400.

Furukawa T, Inagaki H, Takai R, Hirai H, Che FS. 2014. Two distinct EF-Tu epitopes induce immune responses in rice and *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 27(2): 113-124.

Galal AA, El-Bana AA, Janse J. 2006. *Bacillus pumilus*: a new pathogen on mango plants. *Egypt J. Phytopathol*. 34(1): 17-29.

Garron ML, Cygler M. 2010. Structural and mechanistic classification of uronic acid-containing polysaccharide lyases. *Glycobiology*. 20(12): 1547-1573.

Garron ML, Henrissat B. 2019. The continuing expansion of CAZymes and their families. *Current Opinion in Chemical Biology*. 53: 82-87.

Georgelis N, Tabuchi A, Nikolaidis N, Cosgrove DJ. 2011. Structure-function analysis of the bacterial expansin EXLX1. *The Journal of Biological Chemistry*. 286(19): 16814-26823.

Gibson DM, King BC, Hayes ML, Bergstrom GC. 2011. Plant pathogens as a source of diverse enzymes for lignocellulose digestion. *Current Opinion in Microbiology*. 14: 264-270.

Gilkes NR, Henrissat B, Kilburn DG, Miller RC, Warren RAJ. 1991. Domains in microbial β -1,4-glycanases: sequence, conservation, function, and enzyme families. *Microbiological Reviews*. 55(2): 303-315.

Glick BR. 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*. 41: 109-117.

Gregg KJ, Zandberg WF, Hehemann JH, Whitworth GE, Deng L, Vocadlo DJ, Boraston AB. 2011. Analysis of a new family of widely distributed metal-independent α -mannosidases provides unique insight into the processing of N-linked glycans. *The Journal of Biological Chemistry*. 286(17): 15586-15596.

- Gu Y, Xu X, Wu Y, Niu T, Liu Y, Li J, Du G, Liu L. 2018. Advances and prospects of *Bacillus subtilis* cellular factories: from rational design to industrial applications. *Metabolic Engineering*. 50: 109-121.
- Guillén D, Sánchez S, Rodríguez-Sanoja R. 2009. Carbohydrate-binding domains: multiplicity of biological roles. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85: 1241-1249.
- Gurevich A, Saveliev V, Vyahhi N, Tesler G. 2013. QUASt: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*. 29(8): 1072-1075.
- Hakim S, Naz S, Liaquat F, Gul S, Chaudhary HJ, Munis MFH. 2015. Presence of *Bacillus pumilus* causing fruit rot of *Ficus lacor* in Pakistan. *Journal of Plant Pathology*. 97(3): 543-543.
- Hall RS, Xiang DF, Xu C, Raushel FM. 2007. N-acetyl-D-glucosamine-6-phosphate deacetylase: substrate activation via a single divalent metal ion. *Biochemistry*. 46: 7942-7952.
- Hammer ND, Skaar EP. 2011. Molecular mechanisms of *Staphylococcus aureus* iron acquisition. *Annual Reviews of Microbiology*. 65: 129-147.
- Hamouda HI, Ali N, Su H, Feng J, Lu M, Li FL. 2020. Exploration of two pectate lyases from *Caldicellulosiruptor bescii* reveals that the CBM66 module has a crucial role in pectic biomass degradation. *Enzymology and Protein Engineering*. 86(16): e00787-20.
- Han GZ. 2019. Origin and evolution of the plant immune system. *New Phytologist*. 222: 70-83.
- Hashem A, Tabassum B, Abd_Allah EF. 2019. *Bacillus subtilis*: a plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 26: 1291-1297.
- Hashmi I, Paul C, Al-Dourobi A, Sandoz F, Deschamps P, Junier T, Junier P, Bindschedler S. 2019. Comparison of the plant growth-promotion performance of a consortium of Bacilli inoculated as endospores or as vegetative cells. *Microbiology Ecology*. 95: 1-14.
- Herth W, Schnepf E. 1980. The fluorochrome, calcofluor white, binds oriented to structural polysaccharide fibrils. *Protoplasma*. 105: 129-133.
- Hii SL, Tan JS, Ling TC, Ariff AB. 2012. Pullulanase: role in starch hydrolysis and potential industrial applications. *Enzyme Research*. Article ID 921362.

- Hosford RM. 1982. White blotch incited in wheat by *Bacillus megaterium* pv. *cerealis*. *Phytopathology*. 72: 1453-1459.
- Huang J, Guo S, Mahillon J, Van der Auwera G, Wang L, Han D, Yu Z, Sun M. 2006. Molecular characterization of a DNA fragment harboring the replicon of pMBM165 from *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis*. *BMC Genomics*. 7: 270.
- Huse MS, Huber JA, Morrison HG, Sogin ML, Welch DM. 2007. Accuracy and quality of massively parallel DNA pyrosequencing. *Genome Biology*. 8: R143.
- Hussain A, Qarshi IA, Nazir H, Ullah I. 2012. Plant tissue culture: current status and opportunities. In: Recent advances in plant *in vitro* culture. Leva A, Rinaldi LMR, Intech Open, pp. 1-28.
- Imelfort M, Parks D, Woodcroft BJ, Dennis P, Hugenholtz P, Tyson GW. 2014. GroopM: an automated tool for the recovery of population genomes from related metagenomes. *PeerJ*. 2e:603.
- Itoh T, Ochiai A, Mikami B, Hashimoto W, Murata K. 2006. A novel glycoside hydrolase family 105: the structure of family 105 unsaturated rhamnogalacturonyl hydrolase complexed with disaccharide in comparison with family 88 enzyme complexed with the disaccharide. *Journal of Molecular Biology*. 360(3): 573-585.
- Jahr H, Dreier J, Meletzus D, Bahro R, Eichenlaub R. 2000. The endo- β -1,4-glucanase CelA of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* is a pathogenicity determinant required for induction of bacterial wilt of tomato. *The American Phytopathological Society*. 13: 703-714.
- Jaizme-Vega MC, Rodríguez-Romero AS, Piñero-Guerra MS. 2004. Potential use of rhizobacteria from the *Bacillus* genus to stimulate the plant growth of micropropagated banana. *Fruits*. 59: 83-90.
- Jamal-Talabani S, Boraston AB, Turkenburg JP, Tarbouriech N, Ducros VMA, Davies GJ. 2004. Ab initio structure determination and functional characterization of CBM36: a new family of calcium-dependent carbohydrate binding modules. *Structure*. 12: 1177-1187.
- Jones JDG, Dangl JL. 2006. The plant immune system. *Nature*. 444: 323-329.
- Jørgensen TS, Kiil AS, Hansen MA, Sørensen SJ, Hansen LH. 2015. Current strategies for mobilome research. *Frontiers in Microbiology*. 750(5).

- Juge N. 2006. Plant protein inhibitors of cell wall degrading enzymes. *Trends in Plant Science*. 11: 359-367.
- Kanehisa M, Sato Y, Kawashima M, Furumichi M, Tanabe M. 2016. KEGG as a reference resource for gene and protein annotation. *Nucleic Acid Research*. 44: D457-D462.
- Kanehisa M, Sato Y, Morishima K. 2016. BlastKOALA and GhostKOALA: KEGG tools for functional characterization of genome and metagenome sequences. *Journal of Molecular Biology*. 428: 726-731.
- Kang DD, Froula J, Egan R, Wang Z. 2015. MetaBAT, an efficient tool for accurately reconstructing single genomes from complex microbial communities. *PeerJ*. 3e:1165.
- Kaushal M, Mandyal P, Kaushal R. 2019. Field based assessment of *Capsicum annum* performance with inoculation of rhizobacterial consortia. *Microorganisms*. 7: 89.
- Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, Buxton S, Cooper A, Markowitz S, Duran C, Thierer T, Ashton B, Meintjes P, Drummond A. 2012. Geneious basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*. 28(12): 1647-1649.
- Keegan KP, Glass EM, Meyer F. 2016. MG-RAST, a metagenomics service for analysis of microbial community structure and function. In: *Microbial Environmental Genomics*, Martin F, Uroz S. (eds). Humana Press, New York, pp: 207-233.
- Keegan KP, Trimble WL, Wilkening J, Wilke A, Harrison T, D'Souza M, Meyer F. 2012. A platform-independent method for detecting error in metagenomic sequencing data: DRISEE. *PLoS Comput. Biol.* 8(6): e10002541.
- Ketudat Cairns JR, Esen A. 2010. β -glucosidases. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 67: 3389-3406.
- Kovaleva VA, Shalovylo YI, Gorovik YN, Lagonenko AL, Evtushenkov AN, Gout RT. 2015. *Bacillus pumilus* – a new phytopathogen of Scots pine – short communication. *J. Forest Science*. 61(3): 131-137.
- Kubicek CP, Starr TL, Glass NL. 2014. Plant cell wall-degrading enzymes and their secretion in plant-pathogenic fungi. *Annu. Rev. Phytopathol.* 52: 427-451.
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. 2018. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*. 35(6): 1547-1549.

- Lammens W, Le Roy K, Schroeven L, Van Laere A, Rabijns A, den Ende WV. 2009. Structural insights into glycoside hydrolase family 32 and 68 enzymes: functional implications. *Journal of Experimental Botany*. 60(3): 727-740.
- Lammerts van Bueren A, Finn R, Ausió J, Boraston AB. 2004. α -glucan recognition by a new family of carbohydrate-binding modules found in bacterial pathogens. *Biochemistry*. 43: 15633-15642.
- Larroque M, Barriot R, Bottin A, Barre A, Rougé P, Dumas B, Gaulin E. 2012. The unique architecture and function of cellulose-interacting proteins in oomycetes revealed by genomic and structural analyses. *BMC Genomics*. 13: 605.
- Leary JV, Nelson N, Tisserat B, Allingham EA. 1986. Isolation of pathogenic *Bacillus circulans* from callus cultures and healthy offshoots of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Applied and Environmental Microbiology*. 52(5): 1173-1176.
- Lebeda A, Luhová M, Sedlarová D, Jancová D. 2001. The role of enzymes in plant-fungal pathogens interactions. *Journal of Plant Diseases and Protection*. 108: 89-111.
- Lee HC, Lai K, Lorenc MT, Imelfort M, Duran C, Edwards D. 2011. Bioinformatics tools and databases for analysis of next-generation sequence data. *Briefings in Functional Genomics*. 1: 12-24.
- Levasseur A, Drula E, Lombard V, Coutinho PM, Henrissat B. 2013. Expansion of the enzymatic repertoire of the CAZy database to integrate auxiliary redox enzymes. *Biotechnology for Biofuels*. 6(41).
- Li B, Qui W, Tan QM, Su T, Fang Y, Xie GL. 2009. Association of a *Bacillus* sp. with leaf and twig dieback of Asian pear (*Pyrus pyrifolia*) in China. *J Plant Pathol*. 91(3): 705-708.
- Liu Y, Murata H, Chatterjee A, Chatterjee AK. 1993. Characterization of a novel regulatory gene *aepA* that controls extracellular enzyme production in the phytopathogenic bacterium *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Mol. Plant Microbe Interact*. 6(3): 299-308.
- Loyola-Vargas VM, De la Peña C, Galaz-Ávalos RM, Quiroz-Figueroa FR. 2008. Plant tissue culture. In: *Molecular Biomethods Handbook*, Walker JM, Rapley R (eds). Humana Press: New Jersey, pp. 875-904.
- Luo C, Knight R, Siljander H, Knip M, Xavier RJ, Gevers D. 2015. ConStrains identifies microbial strains in metagenomic datasets. *Nature Biotechnology*. 33(10): 1045-1055.

Meyer F, Paarmann D, D'Souza M, Olson R, Glass EM, Kubal M, Paczian T, Rodriguez A, Stevens R, Wilke A, Wilkening J, Edwards RA. 2008. The metagenomics RAST server - a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. *BMC Bioinformatics*. 9:386.

Minic Z. 2008. Physiological roles of plant glycoside hydrolases. *Planta*. 227: 723-740.

Montanier C, van Bueren AL, Dumon C, Flint JE, Correia MA, Prates JA, Firbank SJ, Lewis RJ, Grondin GG, Ghinet MG, Gloster TM, Herve C, Knox JP, Talbot BG, Turkenburg JP, Kerovuo J, Brzezinski R, Fontes CMGA, Davies GJ, Boraston AB, Gilbert HJ. 2009. Evidence that family 35 carbohydrate binding modules display conserved specificity but divergent function. *PNAS Biochemistry*. 106(9): 3065-3070.

Morag E, Lapidot A, Govorko D, Lamed R, Wilchek M, Bayer EA, Shoham Y. 1995. Expression, purification, and characterization of the cellulose binding domain of the scaffoldin subunit from the cellulosome of *Clostridium thermocellum*. *Applied and Environmental Microbiology*. 61(5): 1980-1986.

Moreira LRS, Filho EXF. 2008. An overview of mannan structure and mannan-degrading enzyme systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 79: 165-178.

Moriya Y, Itoh M, Okuda S, Yoshizawa AC, Kanehisa M. 2007. KAAS: an automatic genome annotation and pathway reconstruction server. *Nucleic Acid Research*. 35: W182-W185.

Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 15: 473-497.

Nagarajan N, Pop M. 2013. Sequence assembly demystified. *Nature Reviews*. 14: 157-168.

Navarro-Fernández J, Martínez-Martínez I, Montoro-García S, García-Carmona F, Takami H, Sánchez-Ferrer A. 2008. Characterization of a new rhamnogalacturonan acetyl esterase from *Bacillus halodurans* C-125 with a new putative carbohydrate binding domain. *Journal of Bacteriology*. 190(4): 1375-1382.

Nicotra F, Airoidi C, Cardona F. 2007. Synthesis of C- and S- glycosides. *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*. 1: 647-683.

Nürnberg T, Brunner F, Kemmerling B, Piater L. 2004. Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunological Reviews*. 198: 249-266.

- Ochiai A, Itoh T, Kawamata A, Hashimoto W, Murata K. 2007. Plant cell wall degradation by saprophytic *Bacillus subtilis* strains: gene clusters responsible for rhamnogalacturonan depolymerization. *Applied and Environmental Microbiology*. 73(12): 3803-3813.
- Ochiai A, Yamasaki M, Itoh T, Mikami B, Hashimoto W, Murata K. 2006. Crystallization and preliminary X-ray analysis of the rhamnogalacturonan lyase YesW from *Bacillus subtilis* strain 168, a member of polysaccharide lyase family 11. *Structural Biology and Crystallization Communications*. F62: 438-440.
- Ochoa-Alejo N, Ramirez-Malagon R. 2001. *In vitro* chili pepper biotechnology. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant*. 37: 701-729.
- Olempska-Bier ZS, Merker RI, Ditto MD, DiNovi MJ. 2006. Food-processing enzymes from recombinant microorganisms-a review. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 45: 144-158.
- Overbeek R, Olson R, Pusch GD, Olsen GJ, Davis JJ, Disz T, Edwards RA, Gerdes S, Parrello B, Shukla M, Vonstein V, Wattam A, Xia Fangfang, Stevens R. 2014. The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). *Nucleic Acid Research*. 42: D206-214.
- Park ST, Kim J. 2016. Trends in next-generation sequencing and a new era for whole genome sequencing. *International Neurobiology Journal*. 20: 76-83.
- Parks DH, Imelfort M, Skennerton CT, Hugenholtz P, Tyson GW. 2015. CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. *Genome Research*. 25: 1043-1055.
- Parks DH, Rinke C, Chuvochina M, Chaumeil PA, Woodcroft BJ, Evans PN, Hugenholtz P, Tyson GW. 2017. Recovery of nearly 8,000 metagenome-assembled genomes substantially expands the tree of life. *Nature Microbiology*. 2: 1533-1542.
- Peng Q, Yuan Y, Gao M. 2013. *Bacillus pumilus* a novel ginger rhizome rot pathogen in China. *Plant Disease*. 97: 1308-1315.
- Pérez-González O, Rodríguez-Villarreal RA, López-Arroyo JI, Maldonado-Blanco MG, Rodríguez-Guerra R. 2015. Mexican strains of *Hirsutella* isolated from *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae): morphologic and molecular characterization. *Florida Entomologist*. 98(1): 290-297.
- Pino J, González M, Ceballos L, Centurión-Yah AR, Trujillo-Aguirre J, Latournerie-Moreno L, Sauri-Duch E. 2007. Characterization of total capsaicinoids, colour and

volatile compounds of habanero chilli pepper (*Capsicum chinense* Jack.) cultivars grown in Yucatan. Food Chemistry. 104: 1682-1686.

R Core Team. 2020. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. [Online]. Disponible en: <https://www.R-project.org/>.

Rafiq M, Dahot MU, Mangrio SM, Naqvi HA, Qarshi IA. 2007. *In vitro* clonal propagation and biochemical analysis of field established *Stevia rebaudiana* Bertoni. Pak. J. Bot. 39 (7): 2467-2474.

Reverbel-Leroy C, Pages S, Belaich A, Belaich JP, Tardif C. 1997. The processive endocellulasa CelF, a major component of the *Clostridium cellulolyticum* cellulosome: purification and characterization of the recombinant form. Journal of Bacteriology. 179(1): 46-52.

Robles-Hernández L, Ojeda-Barrios DL, González-Franco AC, Hernández-Huerta J, Salas-Salazar NA, Hernández-Rodríguez OA. 2017. Susceptibilidad de aislados de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* a *Streptomyces* y extractos bioactivos de *Ganoderma*. Acta Universitaria. 27: 30-39.

Romeis T, Vollmer W, Höltje JV. 1993. Characterization of three different lytic transglycosylases in *Escherichia coli*. FEMS Microbiology Letters. 111: 141-146.

Rossez Y, Holmes A, Wolfson EB, Gally DL, Mahajan A, Pedersen HL, Willats WGT, Toth IK, Holden NJ. 2014. Flagella interact with ionic plant lipids to mediate adherence of pathogenic *Escherichia coli* to fresh produce plants. Environmental Microbiology. 16(7): 2181-2195.

Rosslee J. 2020. Advantages and disadvantages of plant tissue culture. Plant Cell Technology. [Online]. Disponible en: <https://www.plantcelltechnology.com/pct-blog/advantages-and-disadvantages-of-plant-tissue-culture/>

Ruiz-Dueñas FJ, Martínez AT. 2009. Microbial degradation of lignin: how a bulky recalcitrant polymer is efficiently recycled in nature and how we can take advantage of this. Microbial Biotechnology. 2(2): 164-177.

Saleh OI, Huang PY, Huang JS. 1997. *Bacillus pumilus*, the cause of bacterial blotch of immature balady peach in Egypt. J. Phytopathology. 145: 447-453.

Santana-Buzzy N, Canto-Flick A, Barahona-Pérez F, Montalvo-Peniche MC, Zapata-Castillo PY, Solís-Ruiz A, Zaldívar-Collí A, Gutiérrez-Alonso O, Miranda-Ham ML.

2005. Regeneration of habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) via organogenesis. Hort Science. 40(6): 1829-1831.

Sim L, Beeren SR, Findinier J, Dauvillée D, Ball SG, Henriksen A, Palcic MM. 2014. Crystal structure of the *Chlamydomonas* starch debranching enzyme isoamylase ISA1 reveals insights into the mechanism of branch trimming and complex assembly. The Journal of Biological Chemistry. 289(33): 22991-23003.

Smith TF, Waterman MS. 1981. Identification of common molecular subsequences. Journal of Molecular Biology. 147(1): 195-197.

Snyder EE, Kampanya N, Lu J, Nordberg EK, Karur HR, Shukla M, Soneja J, Tian Y, Xue T, Yoo H, Zhang F, Dharmanolla C, Dongre NV, Gillespie JJ, Hamelius J, Hance M, Huntington KI, Jukneliene D, Koziski D, Mackasmiel L, Mane SP, Nguyen V, Purkayastha A, Shallom J, Yu1 G, Guo Y, Gabbard J, Hix D, Azad AF, Baker SC, Boyle SM, Khudyakov Y, Meng XJ, Rupprecht C, Vinje J, Crasta OR, Czar MJ, Dickerman A, Eckart JD, Kenyon R, Will R, Setubal JC, Sobral BWS. 2006. PATRIC: The VBI pathosystems resource integration center. Nucleic Acid Research. 35: D401-D406.

Snyder L, Peters JE, Henkin TM, Champness W. 2012. Molecular genetics of bacteria. ASM Press: Washington, DC, pp: 13-65.

Spoel SG, Dong X. 2012. How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. Nature. 12: 89-100.

Stothard P, Grant JR, Van Domselaar G. 2019. Visualizing and comparing circular genomes using the CGView family of tools. Briefings in Bioinformatics. 20(4): 1576-4582.

Surette MG, Miller MB, Bassler BL. 1999. Quorum sensing in *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and *Vibrio harveyi*: a new family of genes responsible for autoinducer production. Proc. Nat. Acad. Sci. 96: 1639-1644.

Suzuki S, Fukuoka M, Ookuchi H, Sano M, Ozeki K, Nagayoshi E, Takii Y, Matsushita M, Tada S, Kusumoto KI, Kashiwagi Y. 2010. Characterization of *Aspergillus oryzae* glycoside hydrolase family 43 beta-xylosidase expressed in *Escherichia coli*. Journal of Bioscience and Bioengineering. 102(2): 115-117.

Tatusov RL, Koonin EV, Lipman DJ. 1997. A genomic perspective on protein families. Science. 278: 631-637.

Tatusova T, Ciufu S, Fedorov B, O'Neill K, Tolstoy I. 2014. RefSeq microbial genomes database: new representation and annotation strategy. *Nucleic Acid Research*. 42: D533-D559.

Thapa SP, Pattathil S, Hahn MG, Jacques MA, Gilbertson RL, Coaker G. 2017. Genomic analysis of *Clavibacter michiganensis* reveals insight into virulence strategies and genetic diversity of a grampositive bacterial pathogen. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 30(10): 786-802.

Thorpe TA. 2007. History of plant tissue culture. *Molecular Biotechnology*. 37: 169-180.

Trappetti C, Potter AJ, Paton AW, Oggioni MR, Paton JC. 2011. LuxS mediates iron-dependent biofilm formation, competence, and fratricide in *Streptococcus pneumoniae*. *Infection and Immunity*. 79(11): 4550-4558.

Tyson GW, Chapman J, Hugenholtz P, Allen EE, Ram RJ, Richardson PM, Solovyev VV, Rubin EM, Rokhsar DS, Banfield JF. 2004. Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. *Nature*. 428: 37-43.

Tzepelis GD, Melin P, Jensen DF, Stenlin J, Karlsson M. 2012. Functional analysis of glycoside hydrolase family 18 and 20 genes in *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology*. 49: 717-730.

Upadhye V, Majumdar A, Gomashe A, Joshi D, Gangane N, Thamke F, Mendiratta D, Harinath BC. 2009. Inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* secretory serine protease blocks bacterial multiplication both in axenic culture and in human macrophages. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. 41: 569-576.

Urbanowicz BR, Bennett AB, del Campillo E, Catalá C, Hayashi T, Henrissat B, Höfte H, McQueen-Mason SJ, Patterson SE, Shoseyov O, Teeri TT, Rose JKC. 2007. Structural organization and a standardized nomenclature for plant endo-1,4- β -glucanases (cellulases) of glycosyl hydrolase family 9. *Plant Physiology*. 144(4): 1693-1696.

Van Den Brink J, de Vries, RP. 2011. Fungal enzyme sets for plant polysaccharide degradation. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 91: 1477-1492.

Vanholme B, Haegeman A, Jacob J, Cannoot B, Gheysen G. 2009. Arabinogalactan endo-1,4- β -galactosidase: a putative plant cell wall-degrading enzyme of plant-parasitic nematodes. *Nematology*. 11(5): 739-747.

Vendeville A, Winzer K, Heurlier K, Tang CM, Hardie KR. 2005. Making sense of metabolism: autoinducer-2, LUXS and pathogenic bacteria. *Nature Reviews Microbiology*. 3: 383-396.

Venditto I, Najmudin S, Luis AS, Ferreira LMA, Sakka K, Knox JP, Gilbert HJ, Fontes CMGA. 2015. Family 46 carbohydrate-binding modules contribute to the enzymatic hydrolysis of xyloglucan and β -1,3-1,4-glucans through distinct mechanisms. *The Journal of Biological Chemistry*. 290(17): 10572-10586.

Verma JP, Jaiswal DK, Krishna R, Prakash S, Yadav J, Singh V. 2018. Characterization and screening of thermophilic *Bacillus* strains for developing plant growth promoting consortium from hot spring of Leh and Ladakh region of India. *Frontiers in Microbiology*. 9: 1293.

Viborg AH, Terrapon N, Lombard V, Michel G, Czjzek M, Henrissat B, Brumer H. 2019. A subfamily roadmap for functional glycogenomics of the evolutionry diverse glycoside hydrolase family 16 (GH16). *J. Biol. Chem*. 294(44): 15973–15986.

Villa-Castorena M, Catalán-Valencia EA, Inzuza-Ibarra MA, Román-López A, Macías-Rodríguez H, Cabrera-Rodarte D. 2014. Producción hidropónica de chile habanero en invernadero. INIFAP. ISBN: 978-607-37-0298-0.

Vincent F, Charnock SJ, Verschueren KHG, Turkenburg JP, Scott DJ, Offen WA, Roberts S, Pell G, Gilbert HJ, Davies GJ, Brannigan JA. 2003. Multifunctional xylooligosaccharide/cephalosporin C deacetylase revealed by the hexameric structure of the *Bacillus subtilis* enzyme at 1.9 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*. 330: 593-606.

Wang CJ, Yang W, Wang C, Gu C, Niu DD, Liu HX, Wang YP, Guo JH. 2012. Induction of drought tolerance in cucumber plants by a consortium of three plant growth-promoting rhizobacterium strains. *PLoS ONE*. 7: e52565.

Wang H, Fu L, Zhang X. 2011. Comparison of expression, purification, and characterization of a new pectate lyase from *Phytophthora capsica* using two different methods. *BMC Biotechnology*. 11:32.

Wattam AR, Abraham D, Dalay O, Disz TL, Driscoll T, Gabbard JL, Gillespie JJ, Gough R, Hix D, Kenyon R, Machi D, Mao C, Nordberg EK, Olson R, Overbeek R, Pusch GD, Shukla M, Schulman J, Stevens RL, Sullivan DE, Vonstein V, Warren A, Will R, Wilson MJC, Yoo HS, Zhang Y, Sobral BW. 2014. PATRIC, the bacterial bioinformatics database and analysis report. *Nucleic Acid Research*. 45: D581-D591.

Wilke A, Harrison T, Wilkening J, Field D, Glass EM, Kyripides N, Mavrommatis K, Meyer F. 2012. The M5nr: a novel non-redundant database containing protein sequences and annotation from multiple sources and associated tools. *BMC Bioinformatics*. 13: 141.

Wong KC, Zhang J, Yan S, Li X, Lin Q, Kwong S, Liang C. 2019. DNA sequencing technologies: sequencing data protocols and bioinformatics tools. *ACM Computing Surveys*. 52(5): 98.

Wu CH, Yan HZ, Liu LF, Liou RF. 2008. Functional characterization of a gene family encoding polygalacturonases in *Phytophthora parasitica*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 21(4): 480-489.

Yeoh YK, Sekiguchi Y, Parks DH, Hugenholtz P. 2015. Comparative genomics of candidate phylum TM6 suggests that parasitism is widespread and ancestral in this lineage. *Molecular Biology and Evolution*. 33(4): 915-927.

Yin Y, Mao X, Yang J, Chen X, Mao F, Xu Y. 2012. dbCAN: a web resource for automated carbohydrate-active enzyme annotation. *Nucleic Acid Research*. 40: W445-W451.

Yuan Y, Gao M. 2015. Genomic analysis of a ginger pathogen *Bacillus pumilus* providing the understanding to the pathogenesis and the novel control strategy. *Scientific Reports*. 5: 10259.

Zhang H, Yohe T, Huang L, Entwistle S, Wu P, Yang Z, Busk PK, Xu Y, Yin Y. 2018. dbCAN2: a meta server for automated carbohydrate-active enzyme annotation. *Nucleic Acid Research*. 46: W95-W101.

Zhang LN, Wang DC, Hu Q, Dai XQ, Xie YS, Li Q, Liu HM, Guo JH. 2019. Consortium of plant growth-promoting rhizobacteria strains suppresses sweet pepper disease by altering the rhizosphere microbiota. *Frontiers in Microbiology*. 10: 1668.

Zipfel C, Kunze G, Chinchilla D, Caniard A, Jones JDG. 2006. Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation. *Cell*. 125: 749-760.

12. RESUMEN BIOGRÁFICO

Oscar Noé Flores Castillo

Candidato para el grado de

Maestro en Ciencias con Orientación en Microbiología

Tesis: ANÁLISIS GENÓMICO E IDENTIFICACIÓN DE FACTORES DE VIRULENCIA DE UN CONSORCIO DE *Bacillus spp.* PATÓGENOS POTENCIALES DEL CHILE HABANERO (*Capsicum chinense* Jacq.)

Campo de Estudio: Microbiología

Datos Personales: Nacido en Monterrey, Nuevo León el 21 de febrero de 1995, hijo de Noé Flores Martínez y Lorena Castillo Olmos.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Químico Bacteriólogo Parasitólogo en 2018.

Experiencia Profesional: Químico encargado de área en el Laboratorio de Análisis Clínicos Delta durante 2 años. Auxiliar histotecnólogo en el Departamento de Patología de la Unidad de Alta Especialidad No. 34 Cardiología del IMSS durante 6 meses. Auxiliar del Laboratorio de Química Orgánica del Departamento de Química de la Facultad de Ciencias Biológicas-UANL durante 2 años.