



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRICOLAS

CAMPUS CAMPECHE

POSTGRADO EN BIOPROSPECCIÓN Y SUSTENTABILIDAD
AGRÍCOLA EN EL TRÓPICO

**IDENTIFICACIÓN DE CLUSTERS DE GENES
POTENCIALMENTE INVOLUCRADOS EN LA BIOSÍNTESIS
DE METABOLITOS SECUNDARIOS EN BACTERIAS DE
AGUADAS DE CALAKMUL ANTAGÓNICAS A
FITOPATÓGENOS**

JEAN YVENS ALBERUS

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

SIHOCHAC, CHAMPOTÓN, CAMPECHE

2022

CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALIAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el(la) que suscribe Jean Yvens Alberus, Alumno de esta institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección del Profesor Dr. Joel Lara Reyna, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis **IDENTIFICACIÓN DE CLUSTERS DE GENES PONTENCIALMENTE INVOLUCRADOS EN LA BIOSÍNTESIS DE METABOLITOS SECUNDARIOS EN BACTERIAS DE AGUADAS DE CALAKMUL ANTAGÓNICAS A FITOPATÓGENOS** y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos que se pueden derivar serán registrados a nombre del Colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, El consejero y El que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta institución.

Sihochac, Champotón, Campeche a de 25 de febrero de 2022.

Jean Yvens Alberus
Alumno

Dr. Joel Lara Reyna
Consejero

La presente tesis, titulada: **Identificación de clústeres de genes potencialmente involucrados en la biosíntesis de metabolitos secundarios en bacterias de aguadas de Calakmul antagónicas a fitopatógenos**, realizada por: **Jean Yvens Alberus**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS
BIOPROSPECCIÓN Y SUSTENTABILIDAD AGRICOLA EN EL TRÓPICO
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO: _____

DR. JOEL LARA REYNA

CODIRECTORA: _____

DRA. KARINA VERDEL ARANDA

ASESORA: _____

DRA. AÍDA MARTÍNEZ HERNÁNDEZ

ASESORA: _____

DRA. MARÍA DE JESÚS YAÑEZ MORALES

Sihochac, Champotón, Campeche a de 25 de febrero de 2022.

Resumen

La bioprospección de nuevos productos naturales bacterianos útiles para la salud humana, el bienestar animal y la seguridad alimentaria entre otros usos biotecnológicos potenciales, requiere ahora de la exploración de ecosistemas inexplorados como lo es la Biosfera de Calakmul, donde se puede hipotetizar que las bacterias producen metabolitos con importantes funciones ecológicas especialmente de defensa y sobrevivencia. Las herramientas genómicas y bioinformáticas que hoy existen nos proveen con una gran cantidad de datos y capacidad de procesamiento, que permiten abordar los estudios combinando distintos acercamientos, para hacer más eficiente el proceso de descubrimiento de nuevos productos naturales, y orientarlo a objetivos más precisos. Bajo la hipótesis de que la microbiota nativa edáfica de Calakmul, contiene taxas de bacterias no exploradas, con *clústeres* de genes biosintéticos que codifican productos naturales novedosos útiles, para combatir fitopatógenos de cultivos tropicales; en el presente trabajo se planteó como objetivo, identificar *clústeres* de genes potencialmente relacionados con el fenómeno de antagonismo de las bacterias aisladas de las aguadas en la reserva de la biosfera de Calakmul. Se utilizó un acercamiento guiado por función, donde 225 bacterias aisladas fueron confrontadas con tres fitopatógenos *in vitro* (*Colletotricum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum* y *Alternaria alternata*). Cien cepas de las 225 evaluadas fueron identificadas como antagonista contra al menos uno de los fitopatógenos mencionados, de las cuales 12 mostraron actividad contra los tres hongos. Estas 12 cepas fueron identificadas molecularmente secuenciando el gen 16S rRNA, más del 50% de ella pertenecen al género *Pseudomonas*. Para la búsqueda de nuevos *clústeres* biosintéticos, se secuenció el genoma de las dos cepas bacterianas con mayor capacidad de inhibición a los hongos evaluados. El procesamiento, anotación y la minería de los genomas se llevó a cabo utilizando herramientas como: FastQC, Galaxy, Patric, RAST, AntiSMASH, BiGSCAPE y ANVI'o. A estas cepas se les identificó como *Bacillus subtilis* CKM138 y *Pseudomonas sp.* CKM127. Análisis adicionales filogenéticos y de porcentaje de identidad nucleotídico, permitieron identificar que la cepa CKM127 es una especie nueva al que se le asignó el nombre de *Pseudomonas calakmulensis*. De los dos genomas secuenciados, se logró predecir distintos *clústeres* biosintéticos. En el aislamiento de *B. subtilis* CKM138 se predijeron seis *clústeres* de metabolitos secundarios con menos del 60% de identidad con algún clúster conocido, de los cuales 4 son singletons (no encontrados en ninguno grupo de *clústeres* reportado en especies cercanas) de acuerdo a BiGSCAPE. Y de la especie nueva identificada, *Pseudomonas calakmulensis* CKM127, los *clústeres* de genes biosintéticos predichos no superan 62% de similitud con *clústeres* conocidos. Seis de ellos tienen menos de 20% de similitud con BGC reportados. Las perspectivas son altamente alentadoras para la realización de estudios de biología molecular y analíticos adicionales para confirmar y elucidar los productos naturales producidos por estas bacterias, y seguir explorando la riqueza microbiológica de la biosfera de Calakmul.

Palabras claves: Bioprospección, bacterias, Calakmul, minería de genomas, *clústeres* de genes biosintéticos, metabolitos secundarios, antagonismo.

Abstract

The bioprospection of new bacterial natural products useful for human health, animal welfare and food safety, among other potential biotechnological uses, now requires the exploration of unexplored ecosystems such as the Calakmul Biosphere, where it can be hypothesized that bacteria produce metabolites with important ecological functions, especially defense and survival. The genomic and bioinformatic tools that exist nowadays provide us with a large amount of data and processing capacity, which allow studies to be carried out by combining different approaches, to make the process of discovering new natural products more efficient, and to guide it towards more precise objectives. Under the hypothesis that the native edaphic microbiota of Calakmul contains unexplored bacterial taxa, with biosynthetic genes clusters that encode novel natural products effective to combat phytopathogens of tropical crops; In the present work, the objective was to identify clusters of genes potentially related to the phenomenon of antagonism of bacteria isolated from the water holes (aguadas) in the Calakmul biosphere reserve. A function-guided approach was used, where 225 isolated bacteria were confronted with three phytopathogens in vitro (*Colletotricum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum* and *Alternaria alternata*). One hundred strains of the 225 evaluated were identified as antagonistic against at least one of the phytopathogens mentioned, of which 12 showed activity against the three fungi. These 12 strains were molecularly identified by sequencing the 16S rRNA gene, more than 50% of them belong to the *Pseudomonas* genus. To search for new biosynthetic clusters, the genome of the two bacterial strains with the highest capacity to inhibit the fungi evaluated was sequenced. The processing, annotation and mining of the genomes was carried out using tools such as: FastQC, Galaxy, Patric, RAST, AntiSMASH, BiGSCAPE and ANVI'o. These strains were identified as *Bacillus subtilis* CKM138 and *Pseudomonas* sp. CKM127. Additional phylogenetic and nucleotide identity percentage analyzes made it possible to identify strain CKM127 as a new species to which the name *Pseudomonas calakmulensis* was assigned. From the two sequenced genomes, it was possible to predict different biosynthetic clusters. In the isolation of *B. Subtilis* CKM138, six clusters of secondary metabolites with less than 60% identity with any known cluster were predicted, of which 4 are singletons (not found in any group of clusters reported in close species) according to BiGSCAPE. And of the newly identified species, *Pseudomonas calakmulensis* CKM127, predicted biosynthetic gene clusters do not exceed 62% similarity to known clusters. Six of them have less than 20% similarity with reported BGC. The prospects are highly encouraging for additional molecular biology and analytical studies to confirm and elucidate the natural products produced by these bacteria, and to further explore the microbiological richness of the Calakmul biosphere.

Keywords: Bioprospecting, bacteria, Calakmul, genome mining, biosynthetic gene clusters, secondary metabolites, antagonism.

AGRADECIMIENTOS

Al Colegio de Postgraduados Campus Campeche por el apoyo recibido para realizar los estudios correspondientes al bioprospección y sustentabilidad agrícola en el trópico (BioSAT).

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología a través del Programa Nacional de Posgrados de Calidad por la beca recibida para realizar mis estudios de postgrado.

A los miembros del consejo particular por su paciencia, dedicación, apoyo y conocimientos compartidos durante mi proceso de formación académica.

Finalmente, a mi familia, y a todos mis amigos que durante estos años me han brindado su apoyo incondicional.

MUCHAS GRACIAS

INDICE DE CONTENIDO

1	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1	La Biosfera de Calakmul y su potencial para la bioprospección microbiológica	1
1.2	Bacterias como agentes de control biológicos contra fitopatógenos	3
1.3	Mecanismos de acción de las bacterias agentes de control biológico	4
1.4	Plasticidad genómica-metabólica de las bacterias.....	11
1.5	La necesidad urgente de obtener nuevos productos naturales	14
1.6	Estrategias para la búsqueda de productos naturales en microorganismos	14
1.7	Acercamiento Clásico o tradicional	15
1.8	Minería de genomas (Genome mining).....	16
1.9	Integración del <i>genome mining</i> , la metabolómica, la ecología y la búsqueda dirigida por función.....	19
1.10	Tipos de los <i>clústeres</i> de genes biosintéticos	19
1.11	Fitopatógenos utilizados en este estudio	29
1.12	Hipótesis	32
1.13	Objetivo general	32
1.14	Objetivos específicos.....	32
2	MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
2.1	Material biológico.....	35
2.2	Hongos fitopatógenos (HF) utilizados	35
2.3	Ensayos de antagonismo y selección de bacterias.....	36
2.4	Caracterización morfológica de los aislamientos bacterianos seleccionados.....	39
2.5	Identificación Molecular	39
2.6	Ensamblaje de genomas	41
2.7	Métricas de ensamblaje.....	41
2.8	Anotación y predicción de <i>clústeres</i> biosintéticos	42
2.9	Identificación de BGC de CKM138 y CKM127 en la plataforma BiGSCAPE /CORASON con sus parientes cercanos según genes constitutivos.....	43

2.10	Porcentaje de identidad promedio de nucleótidos de CKM127 con sus parientes más cercanos según genes constitutivos en la plataforma ANVI'O y análisis filogenético en base al gen <i>rpoD</i>	45
3	RESULTADOS.....	47
3.1	Selección las bacterias con actividad antagonica a los fitopatógenos <i>Colletotricum gloeosporioides</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> y <i>Alternaria alternata</i>	47
3.2	Evaluación cuantitativa.....	49
3.3	Caracterización microbiológica de las bacterias seleccionadas.....	53
3.4	Extracción y purificación de DNA.....	55
3.5	Imágenes de la electroforesis en gel de la amplificación del gen 16S de los aislamientos.....	56
3.6	Identificación molecular.....	57
3.7	Métricas de ensamblaje de los genomas secuenciados.....	62
3.8	Anotación general en RAST De los genomas ensamblados.....	64
3.9	<i>Clusters</i> de genes biosintéticos del aislamiento CKM138 identificados con AntiSMASH.....	66
3.10	<i>Clusters</i> de genes biosintéticos del aislamiento CKM127 identificados con AntiSMASH.....	67
3.11	Comparación de <i>clústeres</i> biosintéticos en BiGSCAPE.....	68
4	DISCUSIÓN.....	72
4.1	La minería de genomas guiado por función como estrategia para la búsqueda de nuevos productos naturales en Calakmul.....	72
4.2	Identificación de los 12 aislamientos bacterianos seleccionados.....	73
4.3	Anotación funcional de los genomas.....	76
5	CONCLUSIONES.....	84
6	PERSPECTIVAS.....	86
7	BIBLIOGRAFÍA.....	87
8	ANEXOS.....	105

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Ejemplo de <i>cluster</i> de genes biosintéticos	16
Figura 2	Acercamiento tradicional para la búsqueda de nuevos productos naturales	16
Figura 3	Identificación de islas o <i>clústeres</i> de genes potencialmente implicados en la producción de metabolitos secundarios mediante la minería de genomas	18
Figura 4	Organización modular de una sintetasa de péptidos no ribosomales (NRPS)	21
Figura 5	Los tres tipos de policétidos sintasas	23
Figura 6	Mecanismo general de las enzimas radicales SAM	24
Figura 7	Biosíntesis de terpenoides	26
Figura 8	. Esquema del flujo de trabajo para la identificación de <i>clústeres</i> biosintéticos de metabolitos bioactivos en los genomas de bacterias nativas de suelos de la biosfera de Calakmul	34
Figura 9	Especies de hongos fitopatógenos evaluadas en este trabajo como indicadores de la capacidad antagonista de los aislamientos bacterianos.	36
Figura 10	Ensayo de confrontación bacteria <i>versus</i> HF en caja Petri	37
Figura 11	Esquema de la evaluación cuantitativa de los aislamientos contra los hongos fitopatógenos	39
Figura 12	Número de aislamientos con actividad inhibitoria contra cada fitopatógeno	47
Figura 13	Imagen del efecto inhibitorio de los aislamientos bacterianos sobre el crecimiento de los hongos fitopatógenos al final de la evaluación (15 días), comparando con su crecimiento de forma aislada)	49
Figura 14	Imagen del efecto inhibitorio de los aislamientos bacterianos sobre el crecimiento de los hongos fitopatógenos al final de la evaluación (15 días), comparando con su crecimiento de forma aislada	50
Figura 15	Imagen del efecto inhibitorio de los aislamientos bacterianos sobre el crecimiento de los hongos fitopatógenos al final de la evaluación (15 días), comparando con su crecimiento de forma aislada	50
Figura 16	Imagen del efecto inhibitorio de los aislamientos bacterianos sobre el crecimiento de los hongos fitopatógenos al final de la evaluación (15 días), comparando con su crecimiento de forma aislada	51

Figura 17	Inhibición de los aislamientos bacterianos en contra de las tres especies de fitopatógeno	52
Figura 18	Actividad inhibitoria de los aislamientos contra los tres fitopatógenos	53
Figura 19	DNAs genómicos extraídos de los 12 aislamientos seleccionados	55
Figura 20	DNAs genómicos de los aislamientos 1: CKM127 Y 2: CKM138	55
Figura 21	Electroforesis en gel de la amplificación del gen 16S	57
Figura 22A	Genograma basado en el porcentaje de identidad nucleotídica realizado con ANVI'o	61
Figura 22B	Relación filogenética entre las secuencias directas del gen <i>rpoD</i> de CKM127 y sus parientes cercanos obtenidos de la base de datos del NCBI	62
Figura 23	Calidad obtenida por secuencia de bases del genoma del aislamiento CKM138 después del filtrado de las lecturas R1 y R2	63
Figura 24	Calidad obtenida por secuencia de bases del genoma del aislamiento CKM127 después del filtrado de las lecturas R1 y R2	63
Figura 25	distribución y funciones de los subsistemas identificados en el aislamiento CKM127	65
Figura 26	distribución y funciones de los subsistemas identificados en el aislamiento CKM138	65
Figura 27	Ubicación de los <i>clústeres</i> de genes biosintéticos del aislamiento CKM138 (<i>Bacillus subtilis</i>)	66
Figura 28	Ubicación de los <i>clústeres</i> de genes biosintéticos del aislamiento CKM127 (<i>Pseudomonas spp.</i>)	67
Figura 29	Mapa de calor de presencia y ausencia de <i>clústeres</i> en las familias de tipo NPRS donde se identificó el singleton del aislamiento CKM127	69
Figura 30	Contexto genómico del singleton de la familia FAM166 identificada en CKM127 (<i>Pseudomonas spp</i> CKM127)	69
Figura 31	Mapa de calor de presencia y ausencia de <i>clústeres</i> en las familias donde se identificó uno de los cuatro singletons del aislamiento CKM138	70
Figura 32	Mapa de calor de presencia y ausencia de BCG en las familias de tipo NPRS donde se identificaron 3 de los 4 singletons del aislamiento CKM138	70
Figura 33	Contexto genómico del singleton de la familia FAM191 identificado en CKM138 (<i>B. subtilis</i>).	71

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1	Otros ejemplos de rizobacterias que inducen resistencia sistémica	6
Cuadro 2	Ejemplos de antibióticos producidos por bacterias antagónicas a hongos	8
Cuadro 3	Ejemplos de genes involucrados en los mecanismos de acción de las bacterias agentes de control biológico	11
Cuadro 4	Mecanismos que contribuyen en la plasticidad genómica en bacterias	12
Cuadro 5	Ejemplos de metabolitos secundarios bioactivos encontrados mediante minería genómica	13
Cuadro 6	Ejemplos de compuestos novedosos identificados mediante minería de <i>clústeres</i> biosintéticos	27
Cuadro 7	Sitios de colecta de los aislamientos bacterianos dentro de la RBC	35
Cuadro 8	Genomas comparados con el CKM138	44
Cuadro 9	Genomas comparados con el CKM127	45
Cuadro 10	100 aislamientos con por lo menos actividad inhibitoria contra uno de los fitopatógenos	48
Cuadro 11	Caracterización microbiológica de los 12 aislamientos con mayor actividad antagónica contra tres hongos fitopatógenos	54
Cuadro 12	Resultados de la cuantificación de las muestras de DNA en el nanodrop	56
Cuadro 13	Aislamientos identificables a nivel especie con 16S rRNA	58
Cuadro 14	Aislamientos donde el 16S es insuficiente para identificarlos a nivel especie	58
Cuadro 15	Clasificación taxonómica de ambos genomas según en el análisis de MiGA basado en ANI y AAI	60
Cuadro 16	Porcentaje promedio de identidad de nucleótidos del aislamiento CKM127 con sus parientes más cercanos basado en rpoB y 16S rRNA	61
Cuadro 17	Resultados de la secuenciación NexSeq formato 2x150 de las dos bibliotecas generadas, se realizó la secuenciación en cuatro líneas para cada caso	63
Cuadro 18	Características y métricas de calidad de los genomas CKM127 Y CKM138 secuenciados y ensamblados	64
Cuadro 19	Clusters de genes biosintéticos del aislamiento CKM138 (<i>Bacillus subtilis</i>)	66
Cuadro 20	Clusters de genes biosintéticos del aislamiento CKM127 (<i>Pseudomonas spp</i>)	67
Cuadro 21	Familias de BGCs presentes en los aislamientos CKM127 y CKM138	71
Cuadro 22	Regiones de los genomas secuenciados con altas probabilidades de ser <i>clústeres</i> biosintéticos nuevos	83

1 INTRODUCCIÓN

1.1 La Biosfera de Calakmul y su potencial para la bioprospección microbiológica

Declarada en 2014 como patrimonio mixto de la humanidad por la UNESCO, la reserva de la Biosfera de Calakmul (**RBC**) es la segunda mayor extensión de bosque tropical en América y de los más conservados del mundo con una zona núcleo con actividad humana considerada casi nula. La Antigua Ciudad Maya y Bosques Tropicales protegidos de la **RBC** en Campeche, es el primer bien mixto mexicano inscrito en la lista de la UNESCO. Calakmul (que significa en maya “dos montículos adyacentes”) con 723 mil hectáreas, es el segundo pulmón natural más grande del continente. La **RBC** forma parte del corredor biológico Mesoamericano y colinda en la parte sur con la reserva de la Biosfera Maya de Guatemala; conformando en conjunto el área de selva tropical protegida y continua más grande de Latino América. Esta área protegida pertenece al grupo de bosques tropicales pluviales, que son reconocidos como los ecosistemas más biodiversos en el mundo (Vázquez y Orozco, 1992; Burley, 2002). En estos tipos de bosques, la diversidad de especies se conoce y se han identificado casi en su totalidad pues se han realizado varios estudios sobre flora, fauna, suelo y clima (INECOL, 2000; CONANP, 2010; Martínez y Galindo, 2017). Esta área de conservación contiene entre su biodiversidad animal y vegetal: 86 especies de mamíferos (jaguar, puma, ocelote, tigrillo y leoncillo, oso hormiguero, mono araña, mono aullador, tapir, entre otros), 282 especies de aves, 50 especies de reptiles, 400 de mariposas; 1,500 diferentes especies de plantas, 73 diferentes especies de orquídeas, y una alta diversidad de Leguminosas, representada por 42 géneros y más de 220 especies (INECOL, 2000). La reserva es la zona de albergue de 150 especies protegidas. Su importancia biológica es internacionalmente reconocida, al ser el único lugar en México donde se conservan 5 de los 6 grandes felinos mexicanos, lo cual es un indicador biológico de baja perturbación.

De este modo, las especies vegetales y animales están bien caracterizadas; sin embargo, estudios sobre la riqueza biológica microbiana y su importancia para la bioprospección no se han realizado (Burley, 2002). Con el advenimiento de las nuevas tecnologías de secuenciación, se realizan actualmente trabajos de investigación por parte de centros de investigaciones y la industria privada en otros sistemas naturales (Caneschi *et al.*, 2018; Andryukov, Mikhailov y Besednova, 2019; Oh *et al.*, 2019) enfocados hacia la bioprospección, pues la variedad de ecosistemas permite buscar alternativas de solución a diferentes problemáticas en áreas como: agentes biológicos de protección de cultivos agrícolas, bioprocesos, biorremediación, farmacéutico, biofertilizantes, industria de alimentos, microbiología agrícola, y otros relacionados con nutrición y salud animal (Vázquez y Orozco, 1992; Burley, 2002). Las investigaciones en esas ramas más recientemente se han dirigido hacia la prospección química, biomédica, biónica y de genes (Melgarejo *et al.*, 2002; Pushpangadan *et al.*, 2018).

Un componente de interés adicional en la RCB es su origen geológico, como gran parte de la península de Yucatán, presenta suelos altamente permeables de origen calcáreo sobre los cuales las aguas de lluvia se filtran rápidamente (CONANP, 2010), por lo que existen muy pocos cuerpos de agua superficiales permanentes; sin embargo, hay depresiones asociadas a fallas y fracturas que permiten que en época de lluvias se acumule el agua formando las denominadas “aguadas”. El líquido ahí normalmente se tiñe de café por una especie de árboles que crecen en sus márgenes, el pucté (*Bucida buceras*), que ayudan a que las lagunas superficiales no se evaporen tan fácilmente. Son cuerpos de agua con características de humedales y algunas (por el tipo de terreno menos poroso) llegan a permanecer en temporada de sequía por lo que algunos son de vital importancia para abastecer y sostener parte de la fauna nativa (Reyna, 2019); además, la permutación entre un ambiente aireado en sequía e hipóxico cuando tiene agua es un ambiente propicio para microorganismos interesantes capaces de permanecer en ambas condiciones. El microbiota del lecho y orillas de las zonas bajas inundables o “aguadas”, pudieran tener características relevantes, como tolerancia

a condiciones extremas de inundación y desecación, así como metabolismos facultativos para tolerar condiciones anóxicas.

Es de resaltar que en la reserva de la biosfera de Calakmul el pH de los suelos va de ligeramente alcalino a alcalino (INE, 1999); a diferencia de lo que ocurre en la mayoría de las selvas tropicales que por lo general poseen suelos ácidos (FAO, 1986), lo cual genera una condición adicional a la que deben adaptarse los microorganismos del suelo.

Todo lo anterior, en suma, con el hecho de que la zona núcleo de Calakmul se encuentran en baja perturbación por actividades antropogénicas, sus suelos representan una oportunidad única para el estudio de las comunidades microbianas en un ecosistema natural muy particular en busca de actividades microbianas con características de interés para su aplicación biotecnológica. El desarrollo de más y más variados estudios científicos dentro de esta reserva son ampliamente requeridos para coadyuvar en la protección y cuidado de la riqueza ahí albergada y coadyuvar en el desarrollo de alternativas de uso sustentable de sus recursos naturales. En este sentido, en el laboratorio de Agrogenómica del Colegio de Postgraduados campus Campeche, se han hecho colectas de microorganismos del lecho y orillas de las zonas bajas inundables de tres “aguadas” en época de lluvias y secas; de esta colección se realizó una selección de aquellos microorganismos con actividad antifúngica para realizar, mediante minería genómica, la búsqueda e Identificación de posibles *clústeres* de genes de biosíntesis de metabolitos secundarios relacionadas con la actividad.

1.2 Bacterias como agentes de control biológicos contra fitopatógenos

El termino control biológico se usó por primera vez aplicado a fitopatógenos por Von Tubeuf en 1914, y el primer intento para controlar una enfermedad de raíz con microorganismos introducidos en el suelo fue hecha por Hartley en 1921 (Sharma y Gupta, 2014). Así, mientras se fue reportando capacidad supresora de enfermedades en varios microorganismos, y se fueron comprendiendo diversos

modos de acción, se fue ganando interés e importancia en la posible aplicación de microorganismos para el control de enfermedades en plantas. Hoy en día se conocen como parte del grupo de las bacterias promotores de crecimiento en plantas (PGPB) (Plant Growth Promoting Bacteria), ya las bacterias supresoras de enfermedades. Una bacteria PGPB, presenta como característica una alta persistencia en la rizosfera después de la inoculación ya que tiene una alta capacidad para colonizar efectivamente la superficie de la raíz, de tal modo que pueda ejercer un efecto fisiológico directo o indirecto sobre el crecimiento de la planta (Scher *et al.*, 1988). Entre los microorganismos beneficiosos se pueden seleccionar aislados que sean muy eficaces contra patógenos y se puedan multiplicar en medios artificiales. La aplicación de tales antagonistas seleccionados y producidos en masa en altas densidades una o varias veces se denomina "control biológico aumentativo" (Eilenberg *et al.*, 2001; Heimpel y Mills, 2017; Van Lenteren *et al.*, 2018). Para el control biológico aumentativo comercial de enfermedades, se utilizan productos que contienen microorganismos vivos, en algunos casos, el producto incluye metabolitos antimicrobianos producidos por los organismos microbianos seleccionados, y algunos productos incluso contienen solo metabolitos antimicrobianos sin células vivas del antagonista (Glare *et al.*, 2012).

1.3 Mecanismos de acción de las bacterias agentes de control biológico

Existen múltiples mecanismos de acción conocidos, tales como la competencia para la colonización de los nichos de las raíces, la inducción de resistencia sistémica, compuestos volátiles, sideróforos, antibióticos, producción de enzimas líticas entre otros. comprender el modo de acción de los agentes de control biológico es esencial para lograr un control óptimo de la enfermedad. De igual manera es importante para poder caracterizar los posibles riesgos para los humanos o el medio ambiente y los posibles riesgos de desarrollo de resistencia. Los modos de acción de las bacterias agentes de control biológico, así como los genes que involucrados en sus procesos han sido ampliamente estudiados (Dutta *et al.*, 2020; Hofmann *et al.*, 2020; D. Liu *et al.*, 2019; Zamioudis *et al.*, 2021). En el cuadro 3 se

muestran algunos ejemplos de genes involucrados en los mecanismos de acción descritos a continuación:

1.3.1 Competencia para la colonización de las raíces

Las raíces de las plantas excretan del 10 al 44% del carbono fijado fotosintéticamente, que sirve como fuente de energía, moléculas de señalización o antimicrobianos para los microorganismos del suelo (Guttman, McHardy y Schulze, 2014), por lo que la secreción de fotosintatos genera una alta competencia por nutrientes entre los microorganismos del suelos para colonizar la raíz, en esta competencia diferentes tipos de microorganismos, pueden estar presentes tanto fitopatógenos como microorganismos benéficos.

La capacidad de colonizar los nichos es un mecanismo fundamental para la acción de los PGPBs, la reacción a los quimioatrayentes de los exudados de las raíces, así como la tenencia de una maquinaria enzimática adecuada para desintoxicarse de la actividad antimicrobiana que algunos exudados radicales puedan tener, son mecanismos que dan ventajas competitivas a las bacterias con actividad antagónica en la rizosfera (Pal y Gardener, 2006; O'Brien, 2017; Colla *et al.*, 2018); por ejemplo, *Bacillus subtilis* es atraída por L-ácido málico producido por *Arabidopsis thaliana* (Beauregard *et al.*, 2013). Otros mecanismos involucran a lipopolisacáridos (Pal y Gardener, 2006), flavonoides (Long, 2001), terpenos, compuestos fenólicos, así como moléculas de señalización como los ácidos jasmónicos y salicílicos entre otros, pueden jugar papeles importantes en la interacción entre PGPB y patógenos por la colonización de la raíz (Doornbos *et al.*, 2011).

1.3.2 Colonización de raíces y recombinasas de sitio específico

Las características bacterianas importantes para una colonización efectiva de las raíces muchas veces están sujeta a la variación de fases, un proceso regulatorio orquestado por recombinasas de sitio específico. La capacidad de colonización de algunas PGPBs depende de la secreción dichas recombinasas (Dekkers *et al.*, 1998). A menudo se han observado mutaciones espontáneas en el

sistema GacS/GacA y son responsables de la variación fenotípica en *Pseudomonas spp* (Bull *et al.*, 2001). Se ha demostrado que estas mutaciones son desencadenadas por las recombinasas específicas del sitio codificadas por *sss* y *xerD*. La sobreexpresión de estos genes puede conducir a una mejor colonización competitiva de la rizosfera. De hecho, contribuyen a la aparición de variantes fenotípicas que pueden colonizar distintas partes de la raíz (Martínez-Granero *et al.*, 2005).

1.3.3 Promoción indirecta de crecimiento por inducción de resistencia sistémica

La inducción de resistencia sistémica (ISR) es similar a la resistencia sistémica adquirida (SAR) donde las plantas logran activar con éxito el mecanismo de defensa en respuesta a la infección primaria por un patógeno, la diferencia es que la ISR no provoca la reacción de hipersensibilidad que resulta en la necrosis limitada como ocurre en caso de la SAR (van Loon y Pieterse, 1998).

Entre los microbios benéficos de la rizosfera que pueden activar el ISR se encuentran las rizobacterias, como *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis*, *Paenibacillus polymyxa* y *Azospirillum brasilense* (cuadro 1); como algunas especies de *Trichoderma*; hongos micorrízicos como *Rhizophagus irregularis* (syn. *Glomus intraradices*) y *Pseudomonas indica*; y cepas no patogénicas de *Fusarium oxysporum* (Romera *et al.*, 2019).

Cuadro 1. Otros ejemplos de rizobacterias que inducen resistencia sistémica

Rizobacterias	Plantas	Patógeno	Referencia
<i>Novosphingobium pentaromativorans</i>	Pimiento	<i>Xanthomonas axonopodis</i>	Hahm <i>et al.</i> , (2012)
<i>Azospirillum brasilense</i>	Fresa	<i>Colletotrichum acutatum</i>	Tortora <i>et al.</i> , (2012)
<i>Bacillus subtilis</i>	Fresa	<i>Sphaerotheca macularis</i>	Lowe <i>et al.</i> , (2012)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Arabidopsis	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	Weller <i>et al.</i> , (2012)

Fuente: (Walters, Ratsep & Havis, 2013)

1.3.4 Control biológico mediante aleloquímicos

Colonización ofensiva de PGPB y retención defensiva de los nichos de la rizosfera que están habilitados por la producción de aleloquímicos bacterianos, incluyendo sideróforos quelantes de hierro, antibióticos, biocidas volátiles, enzimas líticas y enzimas de degradación (Compant *et al.*, 2005; Pal y Gardener, 2006; Colla *et al.*, 2018; Vurukonda, Giovanardi y Stefani, 2018; Köhl, Kolnaar y Ravensberg, 2019).

1.3.5 Sideróforos

Los sideróforos son los compuestos claves producidos por diversos grupos de antagonistas-PGPB como *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Azotobacter*, *Enterobacter* y *Serratia*. Los cuales inhiben la proliferación de fitopatógenos secuestrando Fe^{3+} en la rizosfera (Tailor *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2011). Kloepper y colaboradores (1980), demostraron la importancia de la producción de sideróforos como mecanismo de control biológico de *Erwinia carotovora* y *Fusarium oxysporum* mediante varias cepas de *Pseudomonas fluorescens* que promueven el crecimiento de las plantas.

1.3.6 Antibiosis

Es el efecto antagónico por la producción de toxinas microbianas que pueden eliminar a otros microorganismos como hongos hasta en concentraciones bajas (Pal y Gardener, 2006). Múltiples antibióticos producidos por bacteria se han reportado en la supresión de enfermedades fungosas en plantas (Shanahan *et al.*, 1992; Moyne *et al.*, 2001, Karimi *et al.*, 2012) (cuadro 2). Los metabolitos antimicrobianos a menudo se consideran como el modo de acción más potente de los microorganismos contra los competidores, lo que permite a los productores de antibióticos ventajas competitivas en entornos con recursos limitados (Raaijmakers y Mazzola, 2012). Aproximadamente un tercio de las divisiones bacterianas no tienen representantes cultivados y se conocen solo a través de secuencias de ARNr (Clardy *et al.*, 2006). Por tanto, se puede suponer que la mayoría de los antibióticos producidos *in situ* en el medio ambiente aún se desconocen. Los análisis de

genomas microbianos han revelado que un gran número de *clústeres* de genes crípticos codificantes de enzimas que producen antibióticos, aún no están identificados (Raaijmakers y Mazzola, 2012).

Cuadro 2. Ejemplos de antibióticos producidos por bacterias antagónicas a hongos

Antibiótico	Fuente	Patógeno blanco	Enfermedad	Referencia
2,4-diacetil-floroglucinol	<i>Pseudomonas fluorescens</i> F113	<i>Pythium</i> spp.	Damping off	Shanahan <i>et al.</i> , (1992)
Agrocina 84	<i>Agrobacterium radiobacter</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Agalla de la corona	Kerr (1980)
Bacilomicina D	<i>Bacillus subtilis</i> AU195	<i>Aspergillus flavus</i>	Contaminación de aflatoxina	Moyne <i>et al.</i> , (2001)
Fengicina	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42	<i>Fusarium oxysporum</i>	Pudrición	Koumoutsis <i>et al.</i> , (2004)
Xanthobaccina A	<i>Lysobacter</i> sp. strain SB-K88	<i>Aphanomyces cochlioides</i>	Damping off	Islam <i>et al.</i> , (2010)
Gliotoxina	<i>Trichoderma virens</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	Pudrición de la raíz	Wilhite <i>et al.</i> , (2001)
Herbicolina	<i>Pantoea agglomerans</i> C9-1	<i>Erwinia amylovora</i>	Tizón de fuego	Sandra <i>et al.</i> , (2001)
Iturina A	<i>B. subtilis</i> QST713	<i>Botrytis cinérea</i> y <i>R. solani</i>	Damping off	Paulitz y Belanger (2001)
Micosubtilina	<i>B. subtilis</i> BBG100	<i>Pythium Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>Tritici</i>	Damping off	Leclere <i>et al.</i> , (2005)
Fenazina	<i>P. fluorescens</i> 2-79 and 30-84	<i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>tritici</i>	Mal del pie	Thomashow <i>et al.</i> , (1990)
Pioluteorina,	<i>P. fluorescens</i> Pf-5	<i>Pythium ultimum</i> y <i>R. solani</i>	Damping off	Howell y Stipanovic (1980)
Zwittermicina A	<i>Bacillus cereus</i> UW85	<i>Phytophthora medicaginis</i> y <i>P. aphanidermatum</i>	Damping off	Smith <i>et al.</i> , (1993)

1.3.7 Producción de enzimas líticas

Muchos microorganismos producen y liberan enzimas líticas que puede hidrolizar una amplia variedad de compuestos poliméricos, incluyendo quitina, proteínas, celulosa, hemicelulosa y ADN (Pal y Gardener, 2006). Las enzimas hidrolíticas ayudan a las bacterias a colonizar la planta; también producen proteasas, celulasas, amilasas y lipasas que inhiben el crecimiento de hongos fitopatógenos (Govin *et al.*, 2019). La capacidad de producir quitinasas extracelulares se considera crucial para que *Streptomyces sp. cepa 385* suprima

Fusarium oxysporum f. sp. Cucumerinum (Singh *et al.*, 1999). También se ha demostrado que la quitinasa y laminarinasa extracelulares sintetizadas por *Pseudomonas stutzeri* digieren y lisan el micelio de *Fusarium solani* (Fridlender, Inbar y Chet, 1993).

1.3.8 Compuestos volátiles orgánicos (VOCs)

Los metabolitos gaseosos de las bacterias a nivel químico son compuestos lipofílicos (normalmente alcoholes, alcanos, ácidos o cetonas) que llamaron la atención relativamente recientemente debido a su potencial antibiótico (Gotor *et al.*, 2017). Estos pueden actuar directamente contra el patógeno (antibiosis directa) destruyendo la pared celular o indirectamente, por inducción de resistencia sistémica en las plantas (Calvo *et al.*, 2020). Numerosos agentes bacterianos dentro de los géneros *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Paenibacillus* son productores de compuestos volátiles (Xie *et al.*, 2020). Los VOCs producidos por *Streptomyces fimicarius* BWL-H1 inhibieron el crecimiento y desarrollo de *Peronophythora litchii* al destruir la integridad de la pared celular (Zhang *et al.*, 2019). Varios estudios han demostrado las actividades antifúngicas de los VOCs producidos por bacterias endófitas. *B. velezensis* ZSY-1 exhibió una fuerte actividad antifúngica contra *Alternaria solani* y *Botrytis cinérea* al producir 2,5-dimetilpirazina y benzotiazol volátiles (Gao *et al.*, 2017; Sinuco León *et al.*, 2020). El compuesto volátil 2-etil-3-metilpirazina producido por *Bacillus megaterium* también mostró actividad antimicrobiana de amplio espectro (Munjal *et al.*, 2016).

1.3.9 Degradación de factores de virulencia

Otro modo de acción es la degradación de proteínas tóxicas secretadas por los patógenos. Por ejemplo, algunos aislamientos de *Pantoea dispersa*, *Klebsiella oxyto*, *Alcaligenes denitrificans*, pueden degradar la toxina albicidina un inhibidor potente de la girasa que bloquea la replicación del ADN producida por *Xanthomonas albilineans*. Los mecanismos de desintoxicación incluyen la producción de una proteína que se une a la toxina tanto en *Klebsiella oxyto* como en *Alcaligenes denitrificans*, y es mediada por una esterasa en *Pantoea dispersa* (Zang y Birch

1996; Zang y Birch,1997; Comptant *et al.*, 2005). En ocasiones las toxinas del patógeno son de amplio espectro y pueden impedir el crecimiento o degradar los antibióticos producidos por los agentes de control biológicos (Rigobelo *et al.*, 2016). Frente a esa problemática se ha descubierto que ciertos PGPB apagan la capacidad de detección de quórum-sensing de los patógenos mediante la degradación del auto inductor de señales, bloqueando así la expresión de numerosos genes de virulencias. Este enfoque tiene un enorme potencial para aliviar enfermedades, incluso después del inicio de la infección, de manera curativa ya que generalmente los patógenos vegetales dependen del quórum-sensing mediado por auto inductores para activar las cascadas de genes para sus factores de virulencia (Zao, Yu y Ding, 2020).

1.3.10 Combinación de modos de acción

La actividad antagónica de una bacteria contra un patógeno puede implicar más de un modo de acción. Por ejemplo, en el caso de algunas especies de *Trichoderma*. Producen enzimas hidrolíticas que permeabilizan y degradan la pared celular del hongo así que la permeabilidad aumentada de la pared celular facilita la entrada posterior de metabolitos antimicrobianos (Karlsson *et al.*, 2017). También es conocido por actuar vía hiperparasitismo y la inducción de resistencia sistémica (Harman *et al.*, 2004). *Pseudozyma flocculosa* controla efectivamente a la enfermedad conocida como mildiu polvoriento causada por hongos de la orden *Erysiphales* a través de la producción antibióticos y a la privación de micronutrientes como Zn y Mn (Bélanger *et al.*, 2012). De este modo, se pueden encontrar en los antagonistas más de un mecanismo para el control de otro, por lo que se abre el panorama y no depender del uso de una molécula como ocurre en el caso de fungicidas sintéticos.

Cuadro 3. Ejemplos de genes involucrados en los mecanismos de acción de las bacterias agentes de control biológico

Genes	Bacteria	Función	Mecanismo de acción	Referencias
<i>attB, attD, attR</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Producción de celulosa	Colonización de las raíces	Matthysse y McMahan, 1998
Tn5 <i>lacZ</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Síntesis de aminoácidos	Colonización de las raíces	Simmons <i>et al.</i> , 2007
<i>flgB, flgC, flgE, flgK, flgM</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	Formación de los flagelos	Colonización de las raíces	Samaras <i>et al.</i> , 2021
<i>srfA, srfB, srfC</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	Síntesis de surfactina	Antibiosis	Samaras <i>et al.</i> , 2022
<i>LEN_1308</i>	<i>Lysobacter enzymogenes</i>	Síntesis de Lisil endopeptidasa	Enzimas líticas	Takami <i>et al.</i> , 2017
<i>lucA, lucC</i>	<i>Pseudomonas entomophila</i>	Deferoxamina	Sideróforos	Hofmann <i>et al.</i> , 2019
<i>pchC</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Síntesis de Piochelina	Sideróforos	Hofmann <i>et al.</i> , 2020
<i>pvdI, pvdD</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Producción de pyoverdina	Antibiosis	Dutta <i>et al.</i> , 2020
<i>gbpA</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Producción de quitinasa	Enzimas líticas	Dutta <i>et al.</i> , 2021
<i>ribF</i>	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	Síntesis de riboflavina	Inducción de residencia sistémica	Nelker <i>et al.</i> , 2019
<i>DKG71_41330</i>	<i>Streptomyces sp. NEAU-S7GS2</i>	Producción de quitinasa	Enzimas líticas	Liu <i>et al.</i> , 2019

1.4 Plasticidad genómica-metabólica de las bacterias

En los genomas bacterianos se encuentran universalmente presente un “genoma nuclear” o “*core genoma*” en inglés, que incluye los genes que proporcionan la información imprescindible que debe ser conservados en la mayoría de las bacterias para su función y metabolismo básico. Sin embargo, también se puede identificar una parte “flexible” o variable que contiene genes que son específicos a cada cepa, los cuales proporcionan características adicionales que permiten que esas especies se adapten a condiciones ambientales especiales. En esta parte flexible del genoma es donde se hace efectiva la plasticidad genómica-metabólica que se define como la capacidad de adquisición de genes u operones completos por varios mecanismos como la transferencia horizontal, o la conjugación

entre microorganismos, adquiriendo nuevas capacidades metabólicas (Sela, Itamar y Wolf, 2018). Estos mecanismos (cuadro 4) pueden alterar permanentemente los genotipos bacterianos y dar como resultado la adaptación a su entorno por una optimización del genoma. Morales et al, (2013), compararon los genomas de varias cepas de *Streptomyces* y encontraron que una cepa *S. lividans* 66 había adquirido varios genes y un plásmido que juegan un papel en la homeostasis de metales. Siupka et al, (2020) gracias a un enfoque de minería de genomas encontraron múltiples *clústeres* de genes biosintéticos en una cepa de *Streptomyces* aislada de cenizas de chimenea que tuvo actividad antagónica contra cepas patogénicas de *Fusarium avenaceum*, *Aspergillus niger*, *Nigrospora oryzae* sp. *roseF7*, y *Curvularia coatesiae* sp. *junF9*. En el cuadro 5 se muestran más ejemplos de metabolitos secundarios que fueron encontrados utilizando un enfoque de minería genómica.

Cuadro 4. Mecanismos que contribuyen en la plasticidad genómica en bacterias

Elemento genético o mecanismo	Consecuencias
Mutación puntual	Alteración de la expresión del gen
Recombinación homologa	Rearreglo del DNA, duplicación, adquisición horizontal de genes
Transformación	Adquisición de información genética adicional
Inserción	Inserción, inversión del DNA, alteración de la expresión de genes
Transposones	Rearreglo del DNA
Conjugación, plásmidos	Transferencia horizontal de genes
Bacteriófagos	Transferencia horizontal de genes
Islas genómicas, Islas de patogenicidad	Integración de regiones grandes de DNA

Fuente: (Dobrindt y Hacker, 2001)

La plasticidad genómica metabólica es considerada una de las claves de la evolución de las bacterias (Sela, Itamar y Wolf, 2018). Y las infinitas posibilidades metabólicas que resultan abre la puerta a que las bacterias sean fuente potencial de numerosos productos naturales que puedan ser de uso benéfico para distintas industrias, incluyendo la agrícola para el manejo de enfermedades en plantas.

Cuadro 5. Ejemplos de metabolitos secundarios bioactivos encontrados mediante minería genómica.

Cepas	Método	Compuesto	Referencia
<i>Streptomyces</i> spp. T676	AntiSMASH	Antracimicina	Alt y Wilkinson, 2015
<i>Streptomyces paulus</i> NRRL 8115	AntiSMASH	Paulomicina	Li et al., 2015
<i>Streptomyces olivaceus</i> cepa FXJ7.023	AntiSMASH	Lobophorin	Yue et al., 2016
<i>Streptomyces</i> sp. MSC090213JE08	AntiSMASH	Ishigamida	Du et al., 2016
<i>Streptomyces leeuwenhoekii</i> DSM 42122	AntiSMASH	Chaxamicina	Jordan y Moore, 2016
<i>Streptomyces</i> spp. CNR-698	BLASTP	Ammosamidas	Amagai et al., 2016
<i>Streptomyces lydicus</i> A02	BLASTP y AntiSMASH	Natamicina	Wu et al., 2017
<i>Streptomyces</i> spp. MP131-18	AntiSMASH	Lynamicinas y espiroindimicinas	Constanze et al., 2017
<i>Streptomyces</i> spp. SD85	AntiSMASH	Escelifrolactama	Low et al., 2018
<i>Streptomyces</i> spp. fd1-xmd	AntiSMASH	Estreptotricina y tunicamicina	Yu et al., 2018
<i>Streptomyces koyangensis</i> SCSIO 5802	antiSMASH	Neoabsomicina y abisomicina	Tu et al., 2018
<i>Streptomyces olivaceus</i> FXJ8.012	EXPLOSIÓN	Micomicina	Song et al., 2018
<i>Streptomyces</i> spp. ATCC 14903	antiSMASH y BLAST	Actinonina	Wolf et al., 2018
<i>Streptomyces aureofaciens</i> ATCC 31442	antiSMASH	Triacsinas	Twigg et al., 2018
<i>Streptomyces lunaelactis</i> MM109 T	antiSMASH	Ferroverdinas y bagremicinas	Martinet et al., 2019

Fuente: (Lee et al., 2020)

1.5 La necesidad urgente de obtener nuevos productos naturales

Alexander Fleming advirtió desde 1945 que el uso frecuente e irresponsable de antibióticos provocado por la demanda pública conduciría a una pérdida de eficacia (Schneider, 2021). Hoy en día la resistencia de los patógenos a los antibióticos ya es un problema real y urgente porque el acceso a antibióticos eficaces y costeables es fundamental para la salud humana, el bienestar animal y la seguridad alimentaria. Las posibles consecuencias de la resistencia a los antibióticos incluyen la reducción de la producción de alimentos, la reducción de la seguridad alimentaria, mayores preocupaciones sobre la inocuidad de los alimentos, mayores pérdidas económicas para los productores agrícolas y la contaminación del medio ambiente (Dadgostar, 2019).

Investigaciones del Banco Mundial en el 2017 indicaron que la resistencia a los antimicrobianos elevaría la tasa de pobreza y afectaría, aunque de manera diferente a todos los países del mundo. Los estudios muestran que el PIB mundial anual podría disminuir en aproximadamente un 1% y habría un 5–7% de pérdida en los países en desarrollo para 2050. Este porcentaje se traduce en última instancia en \$ 100-210 billones. En su reporte titulado “Abordar una crisis para la salud y la riqueza de las naciones” del 2014 el departamento de salud de los reinos unidos estimó que la resistencia a antibióticos sería la principal causa de muerte para 2050 causando un total de 10 millones de muertes por año (Neill, 2014).

1.6 Estrategias para la búsqueda de productos naturales en microorganismos

Debido a la generación de múltiples patógenos resistentes a los antibióticos, se deben hacer esfuerzos para descubrir nuevos productos naturales bioactivos, que proporcionen una posibilidad adicional para el tratamiento de patógenos resistentes y otras enfermedades, además de que puedan ser útiles para nuevas aplicaciones industriales. La revolución genómica y las nuevas capacidades tecnológicas han cambiado la manera de realizar la búsqueda de nuevos bioproductos. Sin desaparecer completamente las prácticas tradicionales siguen

conviviendo con las nuevas tecnologías para darles a los investigadores las herramientas que permitan orientar los estudios a objetivos más precisos y hacer más eficiente el proceso de descubrimiento de nuevos productos naturales.

1.7 Acercamiento Clásico o tradicional

En bacterias, la biosíntesis, regulación y transporte de metabolitos secundarios es controlados por *clústeres* de genes biosintéticos (figura 1) que son dos o más genes no homólogos, en la vecindad de un cromosoma en particular, que están involucrados en una vía biosintética común para producir un metabolito especializado o un grupo de metabolitos similares (Ziemert, Alanjary y Weber, 2016). El método tradicional (figura 2) para identificar *clústeres* de genes bacterianos que codifican enzimas que participan en la biosíntesis de metabolitos secundarios, se basa en el discernimiento (screening) guiado por la bioactividad de extractos de caldo de fermentación crudo, y la utilización de métodos basados en la química, como la espectrometría de masa y resonancia magnética nuclear para aislar e identificar los metabolitos activos. Posteriormente se aíslan e identifican los genes biosintéticos correspondientes mediante mutagénesis o delección genética aleatorizada, seguido de la detección de clones no productores (Bachmann, Lanen y Baltz, 2014; Lee *et al.*, 2020). La identificación de regiones conservadas en los genes biosintéticos identificados ha permitido mejorar mucho esta estrategia ya que los metabolitos secundarios pueden ser altamente diversos, pero la maquinaria biosintética incluyendo los enzimas de ensamblaje pertenecen a las mismas familias altamente conservadas, como las enzimas policétido sintetasas (PKS) y las sintetasas de péptidos no ribosomales (NRPS) (Lee *et al.*, 2020). No obstante, esta estrategia tiene limitantes como, por ejemplo, menos del 1% de las bacterias tienen un método apropiado para ser cultivadas en laboratorio por lo que todas aquellas que no sean cultivadas no pueden ser aisladas y estudiadas con las técnicas de la estrategia tradicional mencionadas anteriormente. Además, dado que la expresión de los *clústeres* está estrictamente controlada por tensiones bióticas y abióticas que se encuentran en el hábitat natural de las bacterias, esas suelen desactivar muchos *clústeres* de genes biosintéticos cuando están cultivadas *in vitro*, además de que

pueden contener genes crípticos (que no se expresan) (Clardy *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2020).

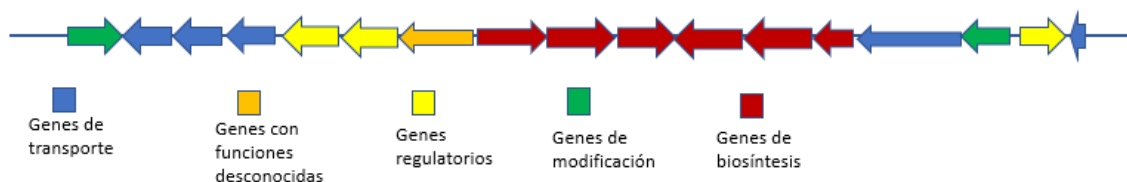


Figura 1. Ejemplo de *cluster* de genes biosintéticos. Además de los genes biosintéticos un *cluster* puede incluir otros genes involucrados en la regulación o en el transporte del producto final.

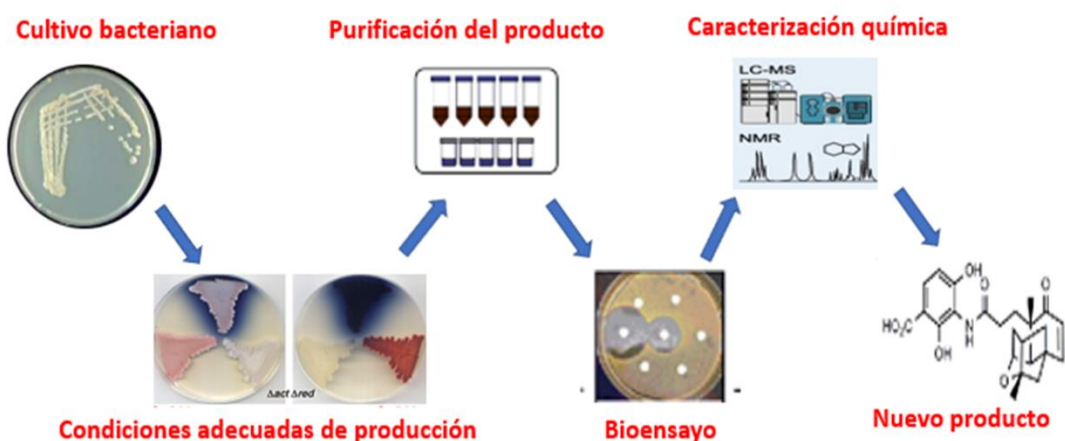


Figura 2. Acercamiento tradicional para la búsqueda de nuevos productos naturales. Como se indica en el segundo paso, este acercamiento es altamente dependiente de que se logren las condiciones adecuadas para que las bacterias produzcan sus metabolitos, condiciones que pueden ser muy tan diversas como específicas involucrando factores bióticos y abióticos.

1.8 Minería de genomas (Genome mining)

La minería del genoma es una nueva estrategia, útil para el descubrimiento de metabolitos secundarios (figura 3). En los últimos años, el acceso fácil y relativamente económico a las secuencias genómicas, como resultado de la llegada de las tecnologías de secuenciación de nueva generación ha puesto al alcance de todo aquel que esté interesado un repertorio gigantesco de datos que abre la puerta

a informaciones genómicas al que nunca antes se había tenido acceso. También se han desarrollado muchas herramientas bioinformáticas para la minería y anotación de genomas, como las que se basan en la comparación de secuencias e identificación de regiones altamente conservadas de *clústeres* de genes biosintéticos localizados en las regiones codificantes de los genomas (Ren, Shi y Zhao, 2020; Cibichakravarthy y Jose, 2021). Estas tecnologías han revelado que el potencial biosintético de las bacterias ha sido subestimado. Por ejemplo, los análisis genómicos han mostrado que las especies de *Streptomyces*, a diferencia de los cuatro metabolitos descubiertos en 30 años con el enfoque tradicional, en realidad poseen aproximadamente 30 *clústeres* de genes biosintéticos, por lo que pueden producir muchos metabolitos aún no identificados (Bentley *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2020).

Entre las herramientas bioinformáticas de mayor uso para la anotación y minería de genomas tenemos:

- RAST (rapid annotation using subsystem): identifica genes que codifican proteínas, rRNA y tRNA, asigna funciones a los genes, predice qué subsistemas están representados en el genoma. Un subsistema es una agrupación de genes con funciones específicas. RAST utiliza esta información para reconstruir la red metabólica y hace que el resultado sea fácilmente accesible para el usuario. Además, el genoma anotado se puede explorar en un entorno que admite el análisis comparativo con otros genomas anotados (Aziz *et al.*, 2008).
- antiSMASH: Desde su lanzamiento inicial en 2011, antiSMASH se ha convertido en la herramienta más utilizada para la búsqueda de *clústeres* de genes biosintéticos secundarios y especializados en hongos y bacterias incluidos los que producen policétidos, péptidos no ribosomales, terpenos, aminoglucósidos, aminocoumarinas, indolcarbazoles, antibióticos, bacteriocinas, nucleósidos, betalactámicos, butirólactonas, sideróforos, melaninas y otros (Medema *et al.*, 2011). Además de usar los genes característicos de los perfiles HMM (Hidden Markov Models) para la identificación de *clústeres* genes, antiSMASH utiliza un enfoque algorítmico para extender el grupo de genes en 5, 10 o 20 kb en ambos

lados; por lo tanto, los *clústeres* poco espaciados se pueden fusionar en "superclusters" (Blin *et al.*, 2021). AntiSMASH también proporciona opciones adicionales para análisis e identificación de dominios NRPS / PKS y anotación, predicción de la estructura química central de policétidos y péptidos no ribosomales, análisis comparativo de *clústeres* de genes mediante ClusterBlast y también para el análisis de familias de enzimas que participan en el metabolismo secundario (Blin *et al.*, 2021).

Los enfoques de minería del genoma permiten la predicción de los *clústeres* de genes biosintéticos a partir de los datos del genoma de las bacterias de forma rápida y sencilla, pero la caracterización de estos todavía requiere un trabajo de laboratorio extenso, incluida la activación de los *clústeres* de metabolitos secundarios silenciados, la purificación de los productos finales y la elucidación acertada de su estructura química (Lee *et al.*, 2020).

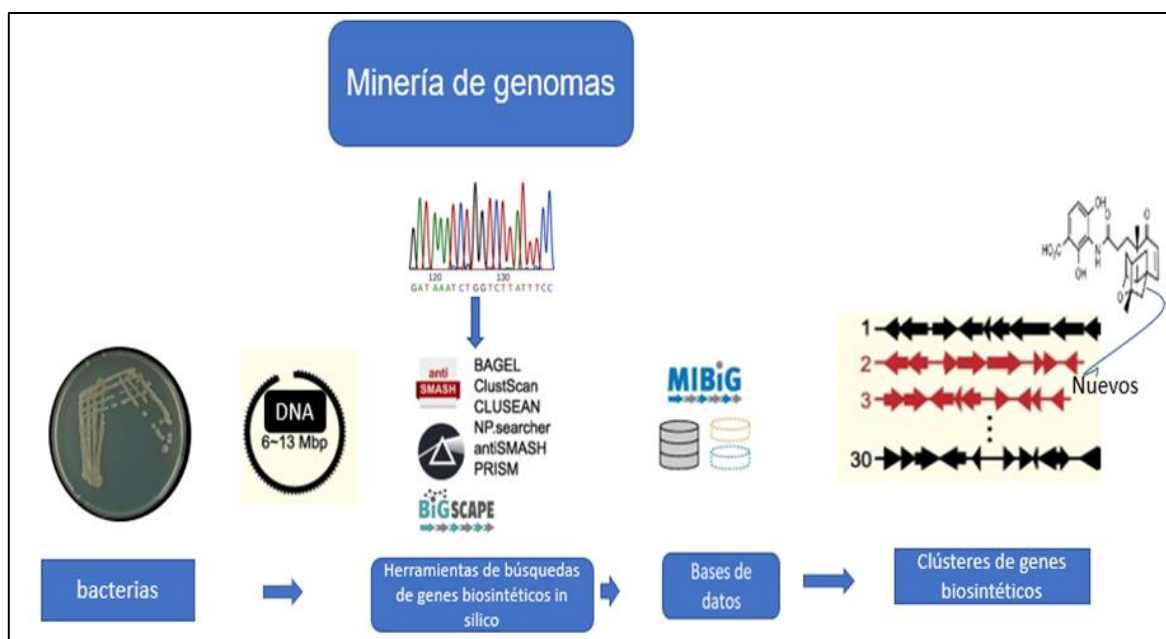


Figura 3. Identificación de islas o *clústeres* de genes potencialmente implicados en la producción de metabolitos secundarios mediante la minería de genomas. A diferencia del acercamiento tradicional, con este acercamiento se pueden predecir los BGCs sin necesidad de condiciones específicas.

1.9 Integración del *genome mining*, la metabolómica, la ecología y la búsqueda dirigida por función

La integración de distintas estrategias puede jugar un rol crucial en el descubrimiento y estudio de metabolitos secundarios bioactivos en bacterias. Por ejemplo, combinando genómica y metabolómica, se descubrió un nuevo lipopéptido no ribosómico, la estendomicina, a partir de *Streptomyces hygroscopicus* (Kersten *et al.*, 2011). En otro estudio, se mapearon productos naturales de *Streptomyces roseosporus* mediante la integración de una red molecular y metabolómica, lo que condujo al descubrimiento de la estenotricina (Liu *et al.*, 2014). Dichas estrategias, aunadas a la búsqueda dirigida por función, pueden hacer más eficiente la búsqueda de metabolitos secundarios.

1.10 Tipos de los *clústeres* de genes biosintéticos

Existen distintas clases de *clústeres* de genes biosintéticos (BGC) de productos naturales (cuadro 6). Los metabolitos secundarios bacterianos se clasifican de acuerdo con su origen y naturaleza química. en productos ribosomales y no ribosomales. Los primeros, conocidos como RiPPs (Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides), son péptidos sintetizados en el ribosoma y que sufren de algunas modificaciones estructurales después de la traducción, lo que hace que sea un grupo químicamente diverso (Arnison, 2013). Los RiPPs agrupan un gran número de clases de metabolitos, sin embargo, todos son sintetizados a partir de un péptido precursor. Los genes que acompañan a los genes de biosíntesis en los BGC son los responsables de modificar al péptido y generar diversidad (McIntosh, Donia y Schmidt, 2009). Por otro lado, los productos naturales no ribosomales son sintetizados por un grupo de enzimas codificadas en los BGC y son de naturaleza química diversa (Martínez y López, 2016). Dos grandes grupos de enzimas de biosíntesis han sido estudiadas con mayor énfasis debido a su gran incidencia en los genomas bacterianos; sintetasas de péptidos no ribosomales y policétidos sintetasas. Otros representantes incluyen grupos como los terpenos,

aminoglucósidos, aminocumarinas, indolocarbazoles, lantibióticos, bacteriocinas, nucleósidos, betalactámicos, butirolactonas, sideróforos y melaninas.

1.10.1 Sintetasas de péptidos no ribosomales.

Las sintetasas de péptidos no ribosomales o NRPS (*Non-Ribosomal Peptide Synthetase*), dan lugar a péptidos pequeños, los cuales representan para las bacterias una enorme fuente de diversidad química y funcional. Las NRPS son enzimas multimodulares que condensan aminoácidos de forma lineal, para formar péptidos inusuales distintos a los sintetizados en el ribosoma, ya que además de los 20 aminoácidos proteinogénicos, logran integrar más de 500 aminoácidos no proteinogénicos, elementos heterocíclicos y residuos glicosilados (Walsh, 2010), mediante rutas biosintéticas dependientes de ATP.

Las sintetasas están formadas de distintos módulos (figura 4). Cada uno es responsable de la incorporación de un monómero del producto final. El número y el orden de los módulos corresponden al número y orden de aminoácidos. Los módulos a su vez, están conformados por distintos dominios catalíticos, que se encargan de llevar a cabo una reacción específica en la síntesis (Marahiel, 2009). Tres dominios son esenciales en cada uno de los módulos que llevan a cabo la selección del sustrato (T), su activación (A) y la formación del enlace peptídico (C). Adicionalmente, otros dominios pueden encontrarse en cada uno de los módulos, lo que incrementa la diversidad química de los péptidos. Por ejemplo, el dominio de epimerización (E) que da lugar a arreglos estereoquímicos inusuales. Los dominios pueden ser identificados a nivel genómico ya que la secuencia de sus motivos tiene firmas específicas de residuos catalíticamente importantes (Martínez-Núñez & López, 2016).

Para la síntesis de NPRS, el ataque del aminoácido al dominio activado de tiolación se lleva a cabo por el dominio de adenilación, que en algunos casos es altamente específico por un solo tipo de monómero. Primero, el aminoácido es activado por ATP, enseguida, se forma el enlace tioéster entre el residuo fosfopanteteinil y el grupo carboxílico del monómero. Cuando dos monómeros

vecinos ya han sido activados, el dominio de condensación cataliza la formación del enlace peptídico entre ambos. En orden de terminar con el ensamblaje del péptido el dominio tioesterasa (TE) se localiza al final de muchas NRPS, el cual cataliza la liberación del péptido. La molécula puede ser liberada por hidrólisis de forma lineal o cíclica gracias al dominio TE. Alternativamente algunas NRPS poseen un dominio reductasa (R) que reduce el grupo carboxilo, mediante la formación de un grupo aldehídico o alcohólico para dar lugar a una molécula lineal (Marahiel, 2009; Sieber y Marahiel, 2005). No todas las NRPS poseen un dominio TE o R, y son liberadas gracias a la naturaleza química del producto.

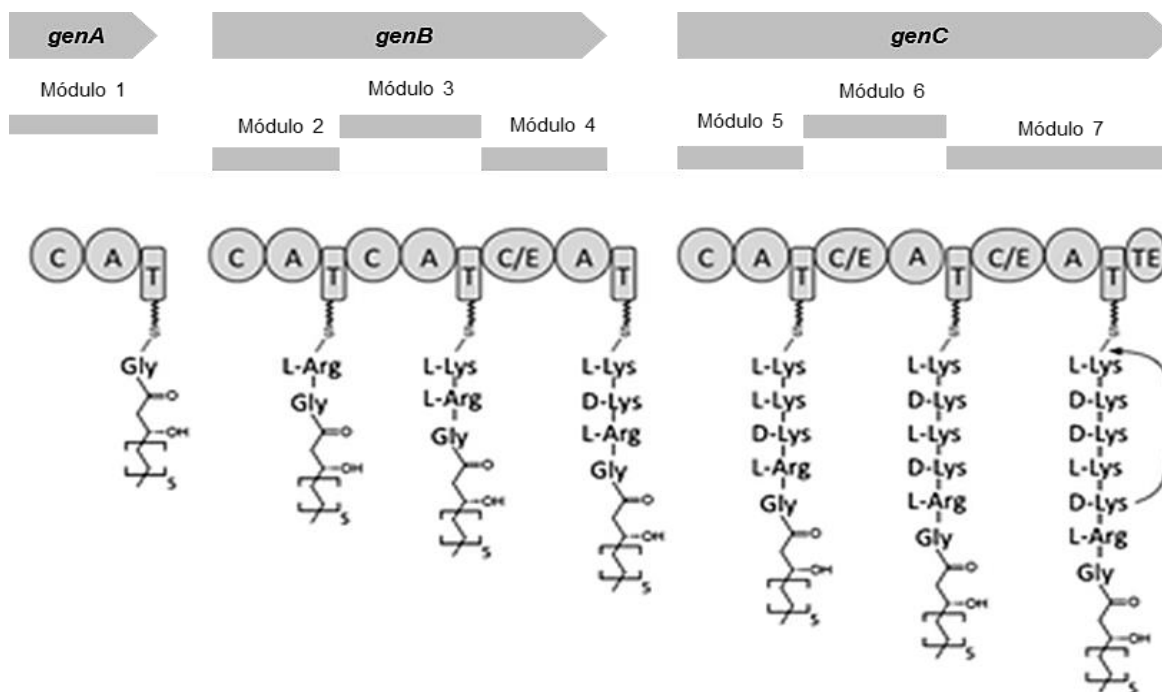


Figura 4. Organización modular de una sintetasa de péptidos no ribosomales (NRPS). Las NRPS se forman de un conjunto de módulos codificados en genes de biosíntesis. Cada módulo se encarga de la adición de un aminoácido y están formados por distintos dominios catalíticos. Por ejemplo; de condensación (C), adenilación (A), tiolación (T), epimerización (E) y tioesterasa (TE). Figura tomada y adaptada de (Fuchs *et al.*, 2011).

1.10.2 Policétidos sintetas.

Las policétido sintetas (PKS, poliketides synthases) son un extenso grupo de enzimas de biosíntesis, cuya actividad provoca la condensación de monómeros de acil-CoA (Fischbach, 2006). Cada módulo contiene un dominio de proteína

acarreadora de acilos (ACP), cetosintasa (KS) y aciltransferasa (AT). La AT transporta un monómero de acil-CoA a la ACP y la cetosintasa cataliza la formación del enlace carbono-carbono con el intermediario del módulo siguiente. Los módulos pueden contener dominios adicionales, que son los principales responsables de generar la diversidad química. Los dominios pueden modificar el grupo β -ceto de la creciente cadena reduciéndolo a un grupo hidroxilo mediante la actividad de la β -ceto reductasa (KR), forman un doble enlace por la β -hidroxiacil dehidratasa (DH), o forman un enlace sencillo por la actividad de α , β -enol reductasa (ER). El dominio tioesterasa (TE) se encuentra al final del sistema modular del *cluster* para liberar a la molécula por ciclación o hidrólisis (Dutta *et al.*, 2014; Walsh, 2010).

Existen tres tipos de policétidos sintasas (figura 5). Las PKS tipo I son enzimas multifuncionales no iterativas, es decir, que la secuencia de biosíntesis no es repetitiva. Las PKS tipo II realizan actividades catalíticas iterativas, ya que efectúan varias condensaciones sucesivas. Esta clase usualmente sintetiza policétidos aromáticos. Por último, las PKS de tipo III son enzimas iterativas que también producen cetoácidos, pero contienen múltiples funciones catalíticas y son independientes a la proteína acarreadora de acilos, ya que actúa directamente en el sustrato de acil-CoA. Además, son mucho más simples y pequeñas que los tipos I y II, por lo que es comparable la limitada diversidad química y estructural que pueden llegar a tener (Shen, 2003).

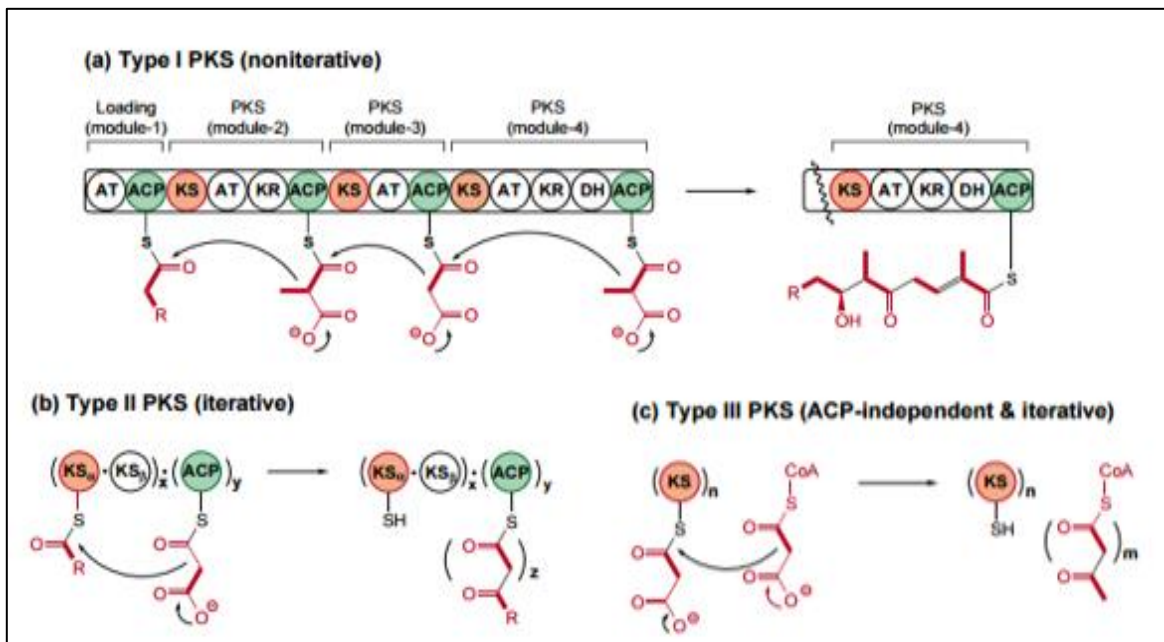


Figura 5. Los tres tipos de policétidos sintasas. Las PKS tipo I (a) son complejos enzimáticos que adicionan un solo monómero en cada uno de los módulos (no iterativas). Las PKS tipo II (b) son enzimas iterativas. Y las PKS tipo III son complejos enzimáticos no iterativos e independientes de ACP. Figura tomada de Shen, 2003.

1.10.3 Péptidos sintetizados ribosomalmente y modificados postraduccionalmente (RiPP).

Los péptidos modificados postraduccionalmente (RiPPs) y sintetizados ribosomalmente son una familia grande y diversa de productos naturales. Poseen interesantes propiedades biológicas como actividades antibióticas o anticancerígenas, lo que las hace atractivas para aplicaciones biotecnológicas. A diferencia de los policétidos y los péptidos no ribosómicos, los RiPPs se derivan de los péptidos ribosómicos y son modificados postraduccionalmente por diversas familias de enzimas (Benjdia *et al.*, 2017; Ziemert *et al.*, 2016).

Los componentes mínimos de un grupo de genes biosintéticos (BGC) de RiPPs generalmente consisten en un péptido precursor corto, que generalmente incluye un N-terminal y un péptido C-terminal central, y enzimas de modificaciones postraduccionales (PTM). Varias enzimas PTM, como la enzima radical SAM (figura 6), el citocromo P450, y la diel-alderasa, instalan distintos restos en el péptido lineal

precursor para dar la proteína madura, lo que da como resultado diferentes clases de RiPPs. Hasta ahora, se han encontrado más de 13 tipos representativos de RiPPs clasificados y muchos otros no clasificados en bacterias, hongos, arqueas y plantas (Gerke & Moss, 2002; Zhong *et al.*, 2020).

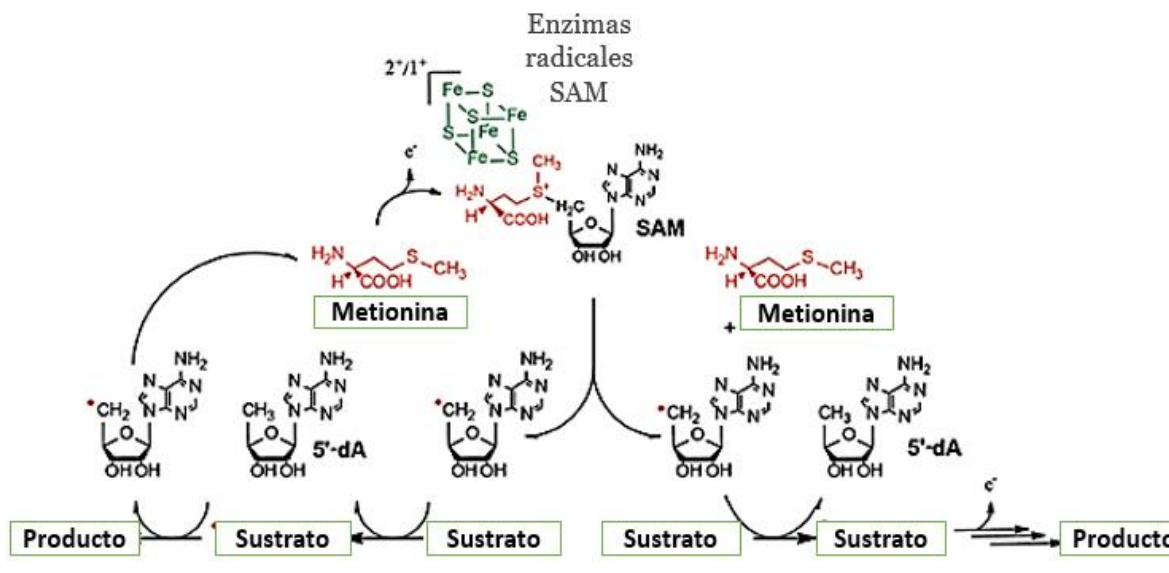


Figura 6. Mecanismo general de las enzimas radicales SAM. Los grupos radicales [4Fe-4S] interactúan con S-adenosil-L-metionina (SAM). Después de la escisión reductora de SAM, se forma la especie de radical 5'-dA y generalmente extrae un átomo de hidrógeno del sustrato. Se forma un sustrato radical intermedio que, después de reordenamientos posteriores, conduce al producto. En la mayoría de los casos, SAM se utiliza como cosustrato (vía correcta). Sin embargo, varias enzimas reciclan SAM durante la catálisis (vía izquierda). Figura tomada de (Benjdia *et al.*, 2017).

1.10.4 Terpenoides/isoprenoides

Con casi 400 familias estructurales distintas que comprenden en total más de 55,000 compuestos descritos, los metabolitos secundarios terpenoides/isoprenoides son una de las clases más grandes de metabolitos bioactivos, muchos producidos por plantas, hongos y también bacterias (Knappe *et al.*, 2008; Ziemert *et al.*, 2016). Las unidades centrales de los terpenoides se ensamblan a partir de un número variable de unidades de isopreno enlazadas (catalizadas por terpeno sintasas) que pueden sufrir una multitud de ciclaciones intramoleculares, catalizadas por terpeno ciclasas, a menudo seguidas de extensos pasos de

adaptación. Aunque el terpeno sintetasas/ciclasas a menudo no están tan altamente conservadas como, por ejemplo, NRPS o PKS, es posible usar secuencias caracterizadas individuales como sondas. Usando estas estrategias, una variedad de isoprenoides se identificaron y caracterizaron mediante la minería del genoma, por ejemplo, el monoterpene cineolole (Christianson, 2008), o el sesterterpene ácido estelático (Matsuda *et al.*, 2015). Para cubrir un amplio número de secuencias e identificar enzimas relacionadas más lejanamente, también se usó con éxito un enfoque basado en perfiles y modelos ocultos de Markov (HMM), para detectar nuevas vías e identificar un conjunto diverso de nuevos terpenoides (Yamada *et al.*, 2015). La lógica biosintética de la formación de terpenos (figura 7) difiere significativamente de la lógica empleada por otras clases de rutas biosintéticas de metabolitos secundarios. Las unidades de cinco carbonos llamadas isoprenos se unen para crear un polieno lineal con grupos metilo ramificados que forman la estructura central del hidrocarburo en un solo paso catalizado por la enzima que se llama terpeno ciclasa. La enzima mantiene el polieno ramificado con metilo lineal en una conformación definida que inicia una serie de ciclaciones y reordenamientos impulsados por carbocationes, creando el esqueleto de hidrocarburo básico de un terpeno. Este esqueleto de hidrocarburo básico luego se modifica para generar una gran cantidad de estructuras terpenoides, que pueden modificarse aún más mediante la adición de otros componentes básicos, como azúcares, aminoácidos o ácidos grasos. Los terpenos reciben su nombre por el número de unidades de cinco carbonos que forman sus esqueletos de hidrocarburos (Helfrich *et al.*, 2019).

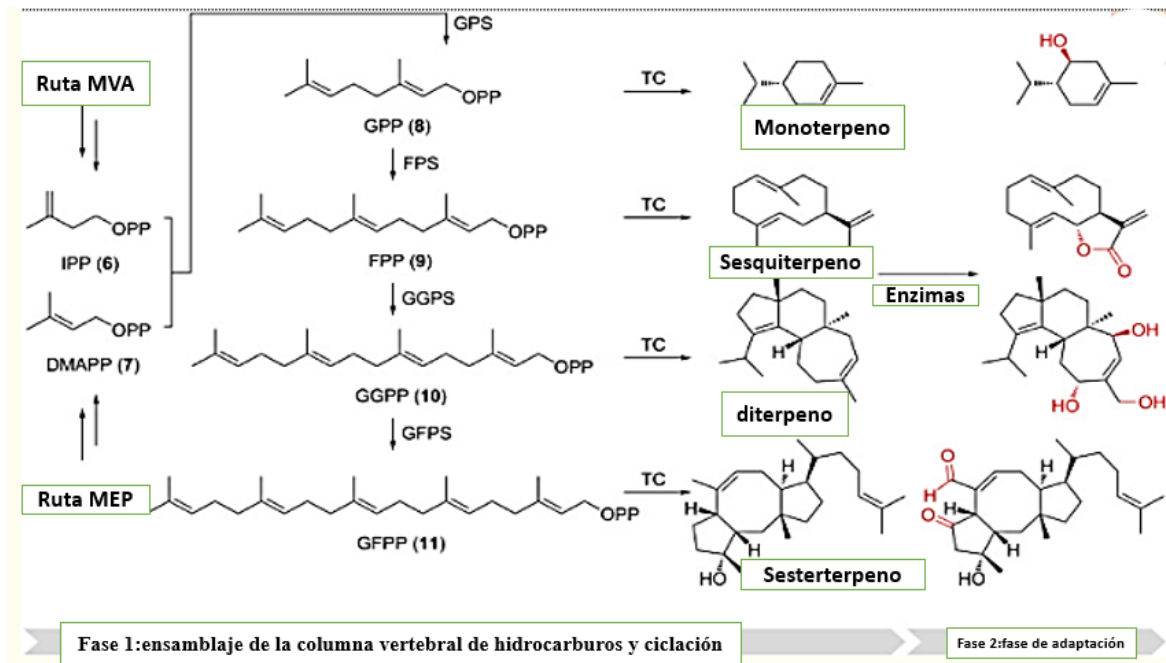
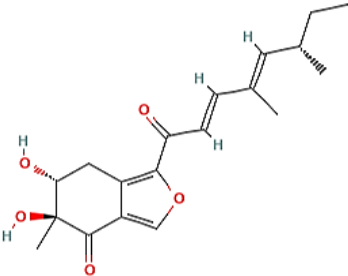
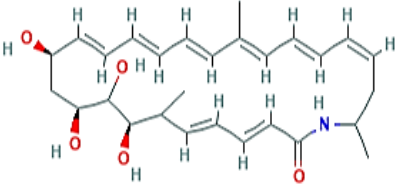
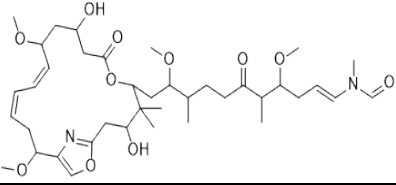
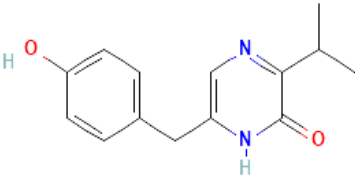
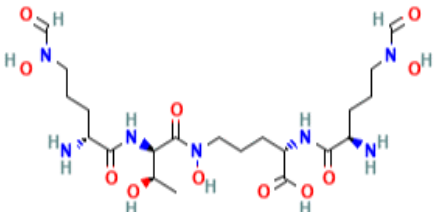
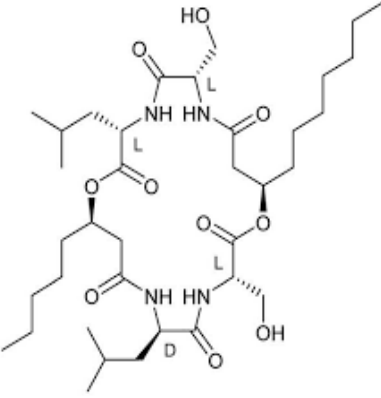
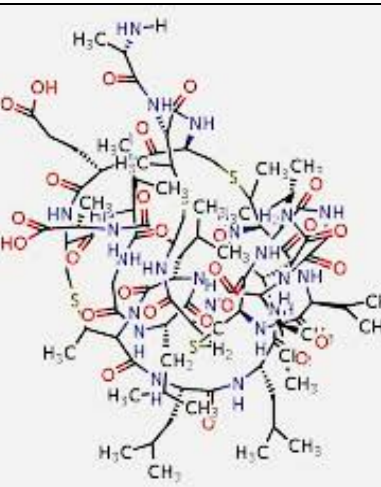
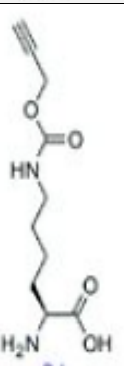
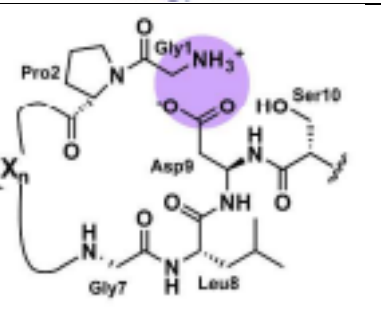
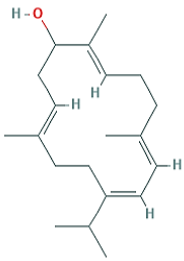
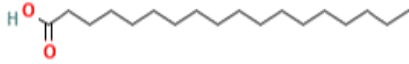
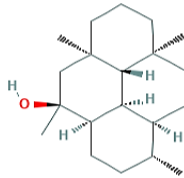


Figura 7. Biosíntesis de terpenoides. La biosíntesis de terpenoides se divide en dos fases, 1) generación de andamios de terpenos y 2) funcionalización de andamios de terpenos. Se muestran ejemplos representativos con las modificaciones instaladas en el paso de sastrería resaltadas en rojo. MEP: vía del 4-fosfato del 2- C -metil-D-eritritol, MVA: vía del ácido mevalónico, IPP: pirofosfato de isopentenilo, DMAPP: pirofosfato de dimetilalilo, GPS: pirofosfato sintasa de geranilo, GPP: pirofosfato de geranilo, FPS: pirofosfato sintasa de farnesilo, FPP: farnesil pirofosfato, GGPS: geranil geranil pirofosfato sintasa, GGPP: geranilgeranil pirofosfato, GFPS: geranilfarnesil pirofosfato sintasa y GFPP geranilfarnesil pirofosfato. Figura tomada de (Helfrich *et al.*, 2019).

Cuadro 6. Ejemplos de compuestos novedosos identificados mediante minería de clústeres biosintéticos.

Nombre del compuesto	Estructura química	ID MIBiG/Genbank	Referencia
Policétidos			
Asperfuranona		BGC0000022	Chiang <i>et al.</i> , 2009
Salinilactam		BGC0000142	Udway <i>et al.</i> , 2007
Rizopodina		BGC0001111	Pistorius y Müller, 2012
NRPS			
Aureusiminas		BGC0000308	Wyatt <i>et al.</i> , 2010
Coechilina		BGC0000325	Lautru <i>et al.</i> , 2005

Nombre del compuesto	Estructura química	ID MIBiG/Genbank	Referencia
Orfamida		BGC0000399	Gross <i>et al.</i> , 2007
RiPPs			
Venezuelina		BGC0001226	Goto <i>et al.</i> , 2010
Capistruín		BGC0000572	Knappe <i>et al.</i> , 2008
Astexina-1		BGC0000570	Zimmerman <i>et al.</i> , 2013

Nombre del compuesto	Estructura química	ID MIBiG/Genbank	Referencia
Terpenoides/isoprenoides			
Cembrana		Genbank: AB738085	(Meguro <i>et al.</i> , 2013)
Ácido estelático		Genbank: LC073704	(Matsuda <i>et al.</i> , 2015)
Hidropirenol		Genbank: CM000914	(Yamada <i>et al.</i> , 2015)

1.11 Fitopatógenos utilizados en este estudio

1.11.1 *Colletotrichum gloeosporioides*

Es el patógeno responsable de la enfermedad conocida como antracnosis que ataca a numerosos cultivos de frutas de climas tropicales y templados como: papaya, mango, manzana, pera, uva, arándano y fresa. Se manifiesta en lesiones semicirculares con hundimientos en forma de anillos concéntricos (Báez, *et al.*, 2017). Dean *et al.*, (2012) lo clasificaron como el octavo (8) género económicamente más importante de hongos fitopatógenos en el mundo. Ataca tanto en floración como en postcosecha. La antracnosis genera pérdidas importantes en pre y postcosecha ya que ocasionan una reducción en la calidad y cantidad de diversos cultivos. Las pérdidas pueden llegar hasta el 100 % (Dowling *et al.*, 2020). Calzada *et al.*, (2015) ha reportado que el uso continuo de fungicidas sintéticos ha generado resistencia en cepas de *Colletotrichum* a fungicidas como el azoxystrobin y tiabendazol. Los controles físicos como uso de aire caliente, tratamientos hidrotérmicos, atmósferas modificadas luz ultravioleta, ozono resultan ser costosos y en ocasiones los frutos salen dañados. Con base en estas razones se ha

incrementado el interés por desarrollar otros métodos de control que sean efectivos y seguros para el consumidor y el ambiente, tal es el caso del control biológico (Báez, et al.,2017).

1.11.2 *Alternaria alternata*

Alternaria alternata es uno de los hongos más importantes que induce el deterioro en postcosecha; aunque también infecta otras partes de las plantas como semillas hojas tallos y flores; y en cultivos de frutas (manzana, pera, melón, albaricoque, uvas, uvas pasas, fresa, aceituna, cítricos e higos desecados), hortalizas (tomate, pimiento y zanahoria) y tubérculos (patata), en los que causa podredumbre el tizón temprano y manchas negras (Díaz *et al.*, 2018). De igual manera es responsable del deterioro de numerosos alimentos procesados elaborados con materias primas contaminadas (zumos, conservas, salsas, etc.). Además de estar implicado en la queratitis fúngica y alergias en humanos (Pavón Moreno *et al.*, 2012).

El control que se realiza sobre la enfermedad en la actualidad es mediante tratamiento químico con fungicidas, siendo el mancozeb y otros compuestos cúpricos los más utilizados cuando se dan las condiciones óptimas para el desarrollo del hongo. Existen pocas alternativas de control biológico reportadas y, por otra parte, no tienen la misma eficacia en todas las condiciones. Es por ello que la búsqueda de alternativas biológicas sigue siendo crucial (Troncoso-Rojas y Tiznado-Hernández, 2014).

1.11.3 *Fusarium oxysporum*

Clasificado como el número cinco (5) del top (10) de los hongos fitopatógenos del mundo (Dean *et al.*, 2012). Este hongo es el responsable de muchos casos de marchitez vascular y podredumbre de las raíces en más de cien (100) especies de plantas entre las cuales: chile habanero, tomate y caña de azúcar son cultivos en los que se han reportado pérdidas entre 21 y 47% a libre exposición y bajo cubierta. También es uno de los hongos más devastadores para las cosechas de granos,

nueces y frutas almacenadas pudiendo provocar entre un 10 a 50 % de pérdidas (Chehri, 2017; Gordon, 2017; Kloepper *et al.*, 1980).

El control de *F. oxysporum* no es fácil ni barato, por la enorme cantidad de especies que ataca la rotación de cultivos no es una buena opción. Los otros métodos para el manejo enfermedades causadas por *f. oxysporum* incluyen la aplicación de varios productos químicos para pretratar el suelo (bromuconazole y procloraz, azoxystrobin, benomil, Carbendazim), cultivo de variedades resistentes, solarización y biocontrol del suelo (*Pseudomonas fluorescens* y *Burkholderia cepacia*, hongos, como *Trichoderma spp.*, «RootShield», *Gliocladium virens* “Soil-Gard” aislamientos no patogénicos de *Fusarium spp* (Chehri, 2017; Kloepper *et al.*, 1980; Sampaio *et al.*, 2020; Veloso & Díaz, 2012). Es un hecho que estos métodos no son perfectos, usar grandes cantidades de los agentes químicos producen efectos peligrosos en el medio ambiente. Las limitaciones climáticas locales pueden limitar la solarización del suelo. El biocontrol de los brotes de *Fusarium* es un método interesante para luchar contra estos hongos. Sin embargo, alternativas similares se imponen debido a factores bióticos y abióticos que pueden afectar su eficacia (Chehri, 2017).

1.12 Hipótesis

La microbiota nativa edáfica de Calakmul, contiene taxas de bacterias no explorados, con *clústeres* de genes biosintéticos que codifican enzimas que producen metabolitos novedosos útiles para combatir fitopatógenos de cultivos tropicales.

1.13 Objetivo general

Identificar *clústeres* de genes posible o potencialmente relacionados con el fenómeno de antagonismo de las bacterias aisladas de las aguadas en la reserva de la biosfera de Calakmul.

1.14 Objetivos específicos

- Seleccionar un grupo de bacterias que inhiban el crecimiento de fitopatógenos de importancia agrícola en el trópico (*Colletotricum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum* y *Alternaria alternata*),
- Identificar y caracterizar morfológica y molecularmente las especies bacterianas seleccionadas,
- Generar dos librerías genómicas de cepas bacterianas con mayor capacidad de inhibición a los hongos evaluados.
- Inferir *clústeres* biosintéticos potencialmente responsables de la actividad antagónica.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

Flujo de trabajo para la realización del trabajo (figura 8):

- 1) Selección de bacterias con actividad antagónica a hongos fitopatógenos y caracterización morfológica de las bacterias seleccionadas
- 2) Identificación molecular de aislamientos antagónicos mediante amplificación por PCR del gen RNA16S.
- 3) Secuenciación de genomas de cepas seleccionadas por su mayor respuesta antagónica.
- 4) Análisis de las secuencias genómicas para identificación de *clústeres* biosintéticos mediante minería genómica.

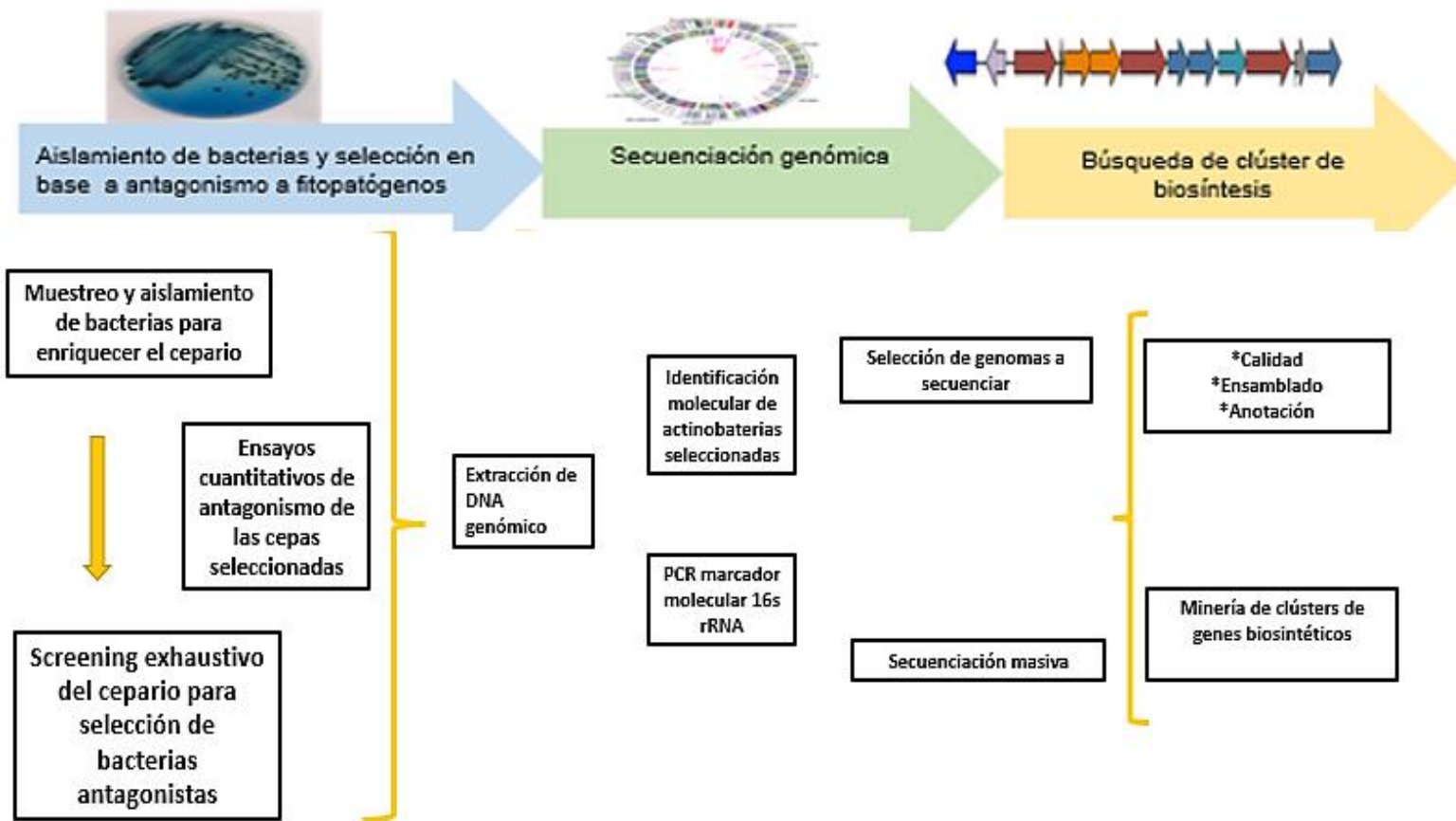


Figura 8. Esquema del flujo de trabajo para la identificación de *clústeres* biosintéticos de metabolitos bioactivos en los genomas de bacterias nativas de suelos de la biosfera de Calakmul.

2.1 Material biológico

Las bacterias aisladas se obtuvieron del cepario del laboratorio de Agrogenómica del Colegio de Postgraduados campus Campeche. Las cuales fueron previamente aisladas de suelos del sistema de humedales (aguadas) en la Reserva de la biósfera de Calakmul en los periodos de junio- septiembre de los años 2017, 2018, y 2019, en el marco del proyecto de **metagenómica de aislamientos bacterianos del sistema de aguadas en Calakmul, Campeche**, liderado por la Dra. Karina Verdel Aranda. Las muestras se colectaron en tres aguadas, una en la zona de amortiguamiento y dos en la zona núcleo. El cuadro 7 muestra la información resumida de la ubicación de los sitios de recolección.

Cuadro 7. Sitios de colecta de los aislamientos bacterianos dentro de la RBC

ZONA DE MUESTREO	KM 20 (zona núcleo)	KM 20 (zona núcleo)	KM 16 (zona de amortiguamiento)
DENOMINACIÓN	AG1	AG2	AG3
GEOLOCALIZACIÓN	18°22'0.40"N, 89°53'7.30"O	18°21'34.50"N, 89°54'14.60"O	18°24'24.40"N, 89°53'54.70"O
PROFUNDIDAD*	5, 15, 25 cm	5, 15, 25 cm	5, 15,25 cm
TIPO	Cíclico	Cíclico	Cíclico
MES/AÑO	Jun-sep. 2017	Jun-sep. 2018	Jun- sep. 2019

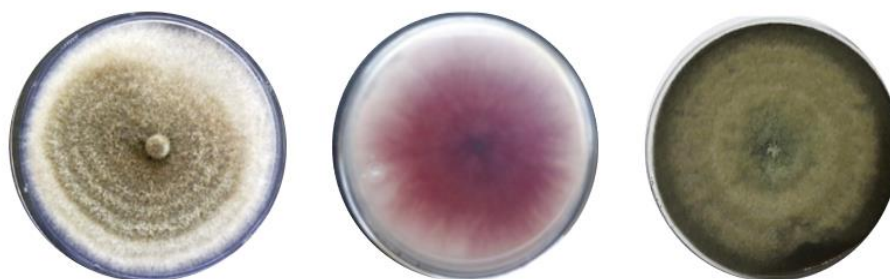
*AG1: aguada 1

*AG2: aguada 2

* AG3: aguada 3

2.2 Hongos fitopatógenos (HF) utilizados

Las tres cepas de hongos fitopatógenos (figura 9) se obtuvieron de la colección del Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY), donde fueron previamente aislados y caracterizados.



ESPECIE	<i>C. Gloeosporioides</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Alternaria alternata</i>
HOSPEDERO	<i>Carica papaya</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>
GENEBANK	JX982231	MF996561	MN330033

Figura 9. Especies de hongos fitopatógenos evaluadas en este trabajo como indicadores de la capacidad antagonista de los aislamientos bacterianos. Debajo de cada hongo se muestra el hospedero de donde se aisló y el código de acceso de Genbank.

2.3 Ensayos de antagonismo y selección de bacterias

Los ensayos de antagonismo se realizaron siguiendo la metodología propuesta por Macedo *et al.*, (2012), sin modificaciones. Que de forma breve incluye:

- 1- Una discriminación de los aislamientos con actividad antagonista
- 2- Una evaluación cuantitativa de los dichos aislamientos.

2.3.1 Discriminación de aislamientos con actividad antagonista

Todos los aislamientos fueron evaluados en cuanto a su capacidad para inhibir el crecimiento del micelio de las especies *Colletotrichum gloeosporioides*, *Alternaria alternata* y *Fusarium oxysporum* mediante ensayos de confrontación y evaluación cualitativa, de acuerdo con el procedimiento previamente reportado (Castillo *et al.*, 2012) a continuación brevemente descrito.

Segmentos de medio de 1 cm² aproximadamente, con micelio de siete días de edad de cada HF, se depositaron al centro de una caja Petri con medio agar nutritivo fresco. En cada caja inoculada con el hongo se sembraron cuatro diferentes aislamientos bacterianos en cada punto cardinal (figura 10).

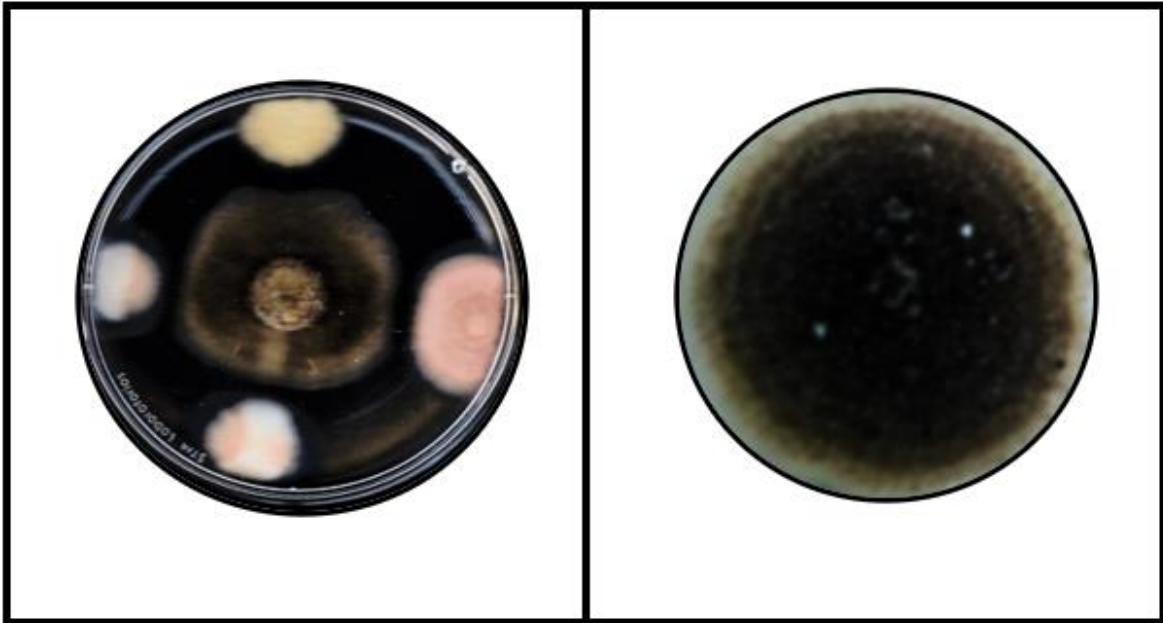


Figura 10. Ensayo de confrontación bacteria *versus* HF en caja Petri (izquierda). El control sin antagonista (HF) (derecha).

Las cajas se incubaron a 28°C durante quince días. Se consideró como potenciales antagonistas aquellos aislamientos que causaron algún grado de inhibición del crecimiento del micelio de los hongos. Se repitió el experimento de la misma manera, pero confrontando con solo dos aislamientos bacterianos colocados en lados opuestos de la caja Petri y seleccionando en el segundo screening se seleccionaron las cepas bacterianas que mostraron actividad contra los tres fitopatógenos (cuadro 10).

2.3.2 Evaluación cuantitativa

Las bacterias que mostraron actividad antagónica contra los tres hongos se seleccionaron para la evaluación cuantitativa. Para eso los aislamientos bacterianos fueron crecidos en LB líquido durante toda la noche. El número de células de cada cultivo fue monitoreado midiendo la densidad óptica en un espectrofotómetro (Beckman Coulter DU 530) a 600 nm (DO), y se cuantificó el número de células sembrando una dilución para calcular las unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC mL⁻¹). Con este valor, se ajustó la DO para que a 600nm cada cultivo bacteriano tuviera una concentración ajustada a 10⁶ células.

Para la confrontación, cajas Petri de nueve cm de diámetro con medio Agar nutritivo se inocularon en un extremo, a 1 cm de distancia del borde de la caja con círculos de 0.785 cm² de medio que contenían micelio de 8 días de edad de cada HF, para garantizar el mismo estado fisiológico. Los círculos de medio PDA con inóculo se cortaron con sacabocados de hierro. Posteriormente se inocularon 5 µl de cada aislamiento bacteriano (10⁶ células) en el extremo contrario a donde se inoculó el hongo (figura 11). Como control se sembraron únicamente los hongos creciendo de manera individual. Las confrontaciones se realizaron por cuadruplicado y se incubaron a 28°C por 15 días.

El crecimiento de los hongos se documentó escaneando cada caja Petri al día 15. La fotodocumentación se realizó con un escáner Epson (mod. V39, serie: perfection). Las imágenes digitalizadas se transformaron en imágenes de alto contraste (blanco y negro) con el software GIMP versión 2.10.24. El cálculo del área de crecimiento se transformó a mm² mediante el programa de distribución libre ImageJ (<https://ij.imjoy.io>). Para la calibración del programa, cada serie de fotos de las confrontaciones fueron tomadas con una escala de referencia, la validación de la medición se realizó con un estándar de calibración de un área en mm² conocida.

Con los datos transformados se calculó el área de crecimiento de los hongos al día 15 promediando el área de crecimiento de cada una de las repeticiones. También se calculó el valor del porcentaje de inhibición que corresponde al porcentaje de crecimiento del hongo, sustraído con respecto al 100% (hongo creciendo sin antagonistas).

La inhibición se expresó en porcentaje usando la formula:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{(\text{hongo sin confrontación}) - (\text{hongo en confrontación})}{(\text{hongo sin confrontación})} \times 100$$



Figura 11. Esquema de la evaluación cuantitativa de los aislamientos contra los hongos fitopatógenos.

2.4 Caracterización morfológica de los aislamientos bacterianos seleccionados

Un total de 12 aislamientos bacterianos fueron seleccionados por presentar los mayores valores de inhibición. Los 12 aislamientos fueron caracterizados a nivel macroscópico (morfología colonial), microscópico (morfología celular), clasificados conforme la tinción de Gram. Como parámetros macroscópicos se evaluaron: el borde, la forma, la elevación el color y la textura de la colonia, así como la pigmentación del medio. Por otro lado, las características microscópicas evaluadas fueron: la morfología celular, forma y presencia de esporas. (Bergey *et al.*, 2000).

2.5 Identificación Molecular

Para la identificación molecular se realizó extracción de DNA y amplificación del gen que codifica para la subunidad 16s del RNA ribosomal.

La extracción de gADN se realizó por el método de fenol-cloroformo usando un protocolo modificado de (Alves *et al.*, 2001). Se crecieron cultivos bacterianos toda la noche en agitación (150 rpm) en un agitador orbital a 28°C; los contenidos celulares fueron recuperados por centrifugación a 5500 rpm por 8 minutos en una

centrífuga Allegra (Modelo 64R de Beckman Coulter de alto rendimiento). Se descartó el sobrenadante y se homogeneizó la pastilla con el líquido residual. A continuación, 100 µL de cultivos celulares se transfirieron a tubos Eppendorf de 2ml y se agregaron 500µl de buffer de lisis (tris pH 8 1M, EDTA 500mM, SDS a 5%) con 1/100 volumen de RNAsa (Invitrogen) de 10 mM. La solución se incubó por 4 horas en agitación a 65°C. Una vez transcurrido el tiempo, se agregaron 500 µl de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (24:25:1) agitando el tubo por inversión durante 5 minutos. Posteriormente los tubos fueron centrifugados a 8000 rpm por 8 minutos, y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo Eppendorf evitando la fase fenólica. La fase acuosa, que contenía al gADN se adicionó acetado de sodio 3M (1/10 del volumen total del volumen recuperado), invirtiendo el tubo manualmente por 2 minutos; posteriormente se agregaron 2 volúmenes de etanol (-20°C) y se incubó en hielo por 30 minutos. El siguiente paso consistió en centrifugar a 10000 rpm por 8 minutos y en seguida lavar en 2 ocasiones la pastilla con 1ml de etanol al 70%. Se descarta el sobrenadante y se secaron los ácidos nucleicos en el bloque termoeléctrico a 37°C. Finalmente se resuspendieron las pastillas agregando 25 o 35µl de agua ultrapura estéril dependiendo del tamaño de la pastilla y las muestras se guardaron a -20°C para su posterior cuantificación y usos posteriores. La integridad física de la muestra de ADN se verificó mediante la electroforesis de la muestra en gel de agarosa 0.8%. Finalmente se midió la concentración en nanogramos por µl y las relaciones 260/280 y 260/230.

Todos los aislamientos bacterianos que presentaron los mayores valores de inhibición fueron identificados mediante la secuenciación del gen ribosomal 16S.

Para la amplificación del gen de la subunidad 16sRNAr, se usaron los oligonucleótidos universales F6 (5'- GAAGAGTTTGATCATGGCTC-3') y R1522 (5'- AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3') (Tailliez, 2006) con 1 microlitro de muestra de ADN. Las muestras con una concentración de ADN superior a 150 ng/µl fueron diluidos a un factor de 1:20.

Se usó el Kit de Invitrogen DNA polimerasa Platinum SuperFi (catálogo 12351010). El programa de PCR que se utilizó fue 95°C por 15 minutos para la iniciación, 40 ciclos de amplificación con 94°C por 1 minuto, 63°C por 1 minuto y 72°C por 1 minuto y la elongación final a 72°C por 5 minutos. Posteriormente se verificaron visualmente los tamaños y especificidad de los productos de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa a 1%. Los productos de PCR se purificaron en columna con el kit QIAQuick de la marca QIAGEN (Núm. Cat. 28104) y se cuantificaron.

Finalmente, se verificó que cada muestra tenía una concentración superior a 40ng/μl y se enviaron al servicio de secuenciación de LANGEBIO-CINVESTAV. La secuenciación de cada producto se realizó por duplicado y en los dos sentidos.

Se estableció un límite de 99.5 de porcentaje de identidad para delinear la identificación a nivel especie las bacterias de acuerdo con Barco *et al.*, (2020).

2.6 Ensamblaje de genomas

El ADN genómico de las cepas seleccionadas CKM138 y CKM127 fue secuenciado con la tecnología Illumina NextSeq en la unidad de secuenciación de LANGEBIO CINVESTAV. El servicio de secuenciación incluyó la construcción de bibliotecas tipo TruSeq DNA nano con amplificación de insertos de más o menos 550 pb. Se corrieron cuatro líneas de cada biblioteca. Se realizó el filtrado de calidad de las lecturas (puntaje de Phred >20) usando la herramienta Trimmomatic (Bolger *et al.*, 2014) desde la plataforma Galaxy con el parámetro pair-end y después se analizó la calidad de las secuencias en FastQC. Se concatenaron los archivos filtrados en el gitbash con el comando “cat” y se ensamblaron las lecturas en la plataforma Patric versión 3.6.12 (Davis JJ *et al.*, 2020).

2.7 Métricas de ensamblaje

Para obtener las métricas de ensamblaje se utilizó la plataforma MiGA (del inglés Microbial Genomes Atlas) que proporciona una clasificación taxonómica basada en la identidad promedio de nucleótidos, ANI (del inglés Average Nucleotide

Identity) y aminoácidos en el genoma, y también proporciona las métricas de calidad los genomas.

Para la clasificación taxonómica MiGA evalúa los genomas y calcula la probabilidad de que el genoma de estudio sea una nueva especie. Genomas de la misma especie comparten típicamente más del 95% de ANI. Por lo tanto, un genoma de con un valor de ANI de mejor coincidencia menor a 95% y de P-value mayor a 0.05 probablemente representa una especie nueva, (Rodríguez *et al.*, 2018).

Las métricas de calidad que ofrece son: el porcentaje de contaminación del genoma y por con siguiente de la calidad, la densidad génica, el tamaño del genoma y el número de proteínas que codifica. También proporciona el número de contigs (son segmentos de ADN superpuestos o lecturas, que juntos representan una región de la secuencia de ADN a ensamblar), la longitud promedio de los contigs, el N50 (la longitud de los contigs tal que usando contigs de igual o mayor tamaño produce la mitad de las bases del genoma es como una medida de la longitud media de un conjunto de secuencias nucleotídicas) y el porcentaje de GC.

2.8 Anotación y predicción de *clústeres* biosintéticos

La anotación de genomas hace referencia a la identificación de secuencias de genes codificantes de proteínas, así como de otras estructuras funcionales, tales como ARNs, pseudogenes, regiones de control, entre otras. La anotación general de genes se realizó con RAST (anotación rápida usando la tecnología de subsistemas). La anotación funcional de los *clústeres* de genes biosintéticos (BGC) se llevó a cabo con antiSMASH que es una herramienta que predice y brinda una descripción general exploratoria de las predicciones de *clústeres* de genes biosintéticos disponibles en su base de datos, así como su anotación más habitual, y el porcentaje de identidad con otros BGC descritos en su base de datos.

2.9 Identificación de BGC de CKM138 y CKM127 en la plataforma BiGSCAPE /CORASON con sus parientes cercanos según genes constitutivos

Los genomas de los aislamientos CKM138 y CKM127 se compararon con sus homólogos en el BLASTn de los genes 16S rRNA y *rpoD*, para hacer una comparación más detallada con genomas cercanos con el fin de encontrar posibles *clústeres* que contuvieran los genomas CKM138 y CKM127 ya que varios *clústeres* daban baja identidad de secuencia en la base de datos de antiSMASH, estos resultados también permitirían complementar la clasificación taxonómica. Se eligieron los 15 parientes más cercanos del aislamiento CKM127 (*Pseudomonas spp.*) y 16 de CKM138 (*Bacillus subtilis*) (cuadro 8 y 9). Los genomas de los respectivos homólogos se descargaron de la base de datos del NCBI en el formato genbank (gbk) y se realizó la anotación de los BGC de cada una de las secuencias descargadas en antiSMASH ya que el archivo resultante se usa de entrada de para el software BiGSCAPE (Motor de prospección y agrupamiento de genes biosintéticos por similitud), el cual fue propuesto por Navarro *et al.*, 2020 como un set de herramientas para explorar la diversidad de *clústeres* de genes biosintéticos en un gran número de genomas, mediante la construcción de redes de similitud de secuencias de BGC, agrupando los BGC en familias y explorando su diversidad con base en la filogenia de las enzimas y su contexto genómico. BiGSCAPE facilita el cálculo rápido y la exploración interactiva de las redes de similitud de secuencias BGC; tomado en cuenta las diferencias en la evolución entre las clases de BGC, agrupa los genes en múltiples niveles jerárquicos e introduce un modo de alineación para manejar BGC fragmentados.

Está compuesto de dos herramientas: 1) la comparación de los datos biosintéticos de la base de datos MIBiG usando los datos de identificación de los *clústeres* de genes biosintéticos de antiSMASH y 2) CORASON por su parte emplea un enfoque filogenético para elucidar las relaciones evolutivas entre *clústeres* de genes y permite identificar de manera integral todos los contextos genómicos en los

que se pueden encontrar casetes de genes de interés ("subgrupos" dentro de BGC más grandes).

Para el procesamiento de datos ensamblados, estos se renombraron con los nombres de las especies y los identificadores en los archivos gbk, se realizó un archivo de metadatos para un mejor manejo de la información y se siguió el tutorial de la siguiente liga

<https://bigscape-corason.secondarymetabolites.org/tutorial/index.html>

Cuadro 8. Genomas comparados con el CKM138

#	Gen	RefSeqId	Especie
1	16S rRNA	CP026662.1	<i>Bacillus subtilis</i> cepa H1
2	16S rRNA	CP028215.1	<i>Bacillus subtilis</i> cepa SRCM102750
3	16S rRNA	CP028217.1	<i>Bacillus subtilis</i> cepa SRCM102751
4	16S rRNA	CP028218.1	<i>Bacillus subtilis</i> cepa SRCM102756
5	16S rRNA	CP045672.1	<i>Bacillus subtilis</i> cepa 2014-3557
6	16S rRNA	CP050532.1	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> str. SMY
7	16S rRNA	CP051465.1	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> cepa UCMB5121
8	16S rRNA	CP052842.1	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> str. 168
9	16S rRNA	CP053102.1	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> str. 168
10	<i>rpoB</i>	CP003695.1	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> str. BSP1
11	<i>rpoB</i>	CP014858.1	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> cepa D12-5
12	<i>rpoB</i>	CP045672.1	<i>Bacillus subtilis</i> cepa 2014-3557
13	<i>rpoB</i>	CP045825.1	<i>Bacillus subtilis</i> cepa 75
14	<i>rpoB</i>	CP047325.1	<i>Bacillus subtilis</i> cepa GOT9
15	<i>rpoB</i>	CP051306.1	<i>Bacillus subtilis</i> cepa RI4914
16	<i>rpoB</i>	CP053102.1	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> str. 168

Cuadro 9. Genomas comparados con el CKM127

#	Gen	refSeqId	Especie
1	16S rRNA	CP077076.1	<i>Pseudomonas fakonensis</i> cepa COW40
2	16S rRNA	CP077075.1	<i>Pseudomonas xanthosomae</i> cepa COR54
3	16S rRNA	CP011789.1	<i>Pseudomonas putida</i> cepa PC2,
4	16S rRNA	CP081016.1	<i>Pseudomonas</i> sp. 2hn
5	16S rRNA	CP077096.1	<i>Pseudomonas wayambapalatensis</i> cepa RW3S1
6	16S rRNA	CP075595.1	<i>Pseudomonas</i> sp. RC3H12
7	16S rRNA	CP026674.1	<i>Pseudomonas</i> sp. SWI44
8	16S rRNA	CP073661.1	<i>Pseudomonas</i> sp. JS425
9	16S rRNA	CP002290.1	<i>Pseudomonas putida</i> BIRD-1
10	16S rRNA	CP077095.1	<i>Pseudomonas xantholysinigenes</i> cepa RW9S1A
11	<i>rpoB</i>	LN847264.1	<i>Pseudomonas</i> sp. CCOS 191
12	<i>rpoB</i>	AP023348.1	<i>Pseudomonas</i> sp. RtIB026
13	<i>rpoB</i>	CP081966.1	<i>Pseudomonas mosselii</i> cepa DSM 17497
14	<i>rpoB</i>	CP077077.1	<i>Pseudomonas maumuensis</i> cepa COW77
15	<i>rpoB</i>	NZ_CP077073.1	<i>Pseudomonas muyukensis</i> cepa COW39

2.10 Porcentaje de identidad promedio de nucleótidos de CKM127 con sus parientes más cercanos según genes constitutivos en la plataforma ANVI'O y análisis filogenético en base al gen *rpoD*

La identidad de nucleótidos promedio (ANI) es una medida de similitud genómica a nivel de nucleótidos entre las regiones codificantes de dos o más genomas que se puede utilizar para definir especies de Archaea y Bacteria. El cálculo de ANI generalmente implica la fragmentación de las secuencias del genoma, seguida de la búsqueda de la secuencia de nucleótidos, el alineamiento y el cálculo de la identidad (Yoon *et al.*, 2017). En el caso de este estudio este análisis se realizó únicamente para el aislamiento CKM127 (*Pseudomonas* spp.) con el objetivo de discernir si en realidad es una nueva especie. Para ello se usó el software ANVI'O, una plataforma de análisis y visualización de "datos ómicos" (Eren *et al.*, 2015). Se usaron los mismos genomas que se usaron para el análisis en BiGSCAPE (cuadro 8), pero esta vez en formato fasta. El flujo de trabajo se realizó

siguiendo el tutorial para realizar los análisis en ANVI'O que disponible en <https://merenlab.org/2016/11/08/pangenomics-v2/> (Eren *et al.*, 2015).

Otra posibilidad que ofrece ANVI'O es la capacidad de visualizar y analizar pangenomas de una especie para establecer relaciones entre los genomas individuales basadas en sus *clústeres* de genes. Se usa generalmente en estudios meta "ómicas" y de genética de poblaciones microbianas, pero en este estudio se utilizó para la visualización geométrica comparativa del genoma completo del aislamiento CKM127 con sus parientes cercanos a través del ANI.

Además del ANI se realizó un análisis para ubicar a CKM127 filogenéticamente respecto a sus parientes más cercanos en base al Gen *rpoB* designado según Girard *et al.*, (2021), como el marcador más preciso para la definición a nivel especie de bacterias del género *Pseudomonas*.

El análisis se realizó en el software MEGA X (Molecular Evolutionary Genetics Analysis). La historia evolutiva se infirió utilizando el método neighbor-joining con 1000 réplicas. Las distancias evolutivas se calcularon usando el método Tamura-Nei y la variación entre sitios se modeló con una distribución gamma (parámetro de forma = 1). Se utilizó *Bacillus subtilis* como grupo externo

3 RESULTADOS

3.1 Selección las bacterias con actividad antagonica a los fitopatógenos *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum* y *Alternaria alternata*.

Todos lo aislados bacterianos fueron evaluados en confrontación *in vitro* contra *Colletotrichum gloeosporioides*, *Alternaria alternata* y *Fusarium oxysporum*. Esta selección preliminar resultado en un total de 100 bacterias que presentaron actividad contra al menos 1 de los fitopatógenos (cuadro 10). De ese total, 12 aislamientos presentaron inhibición contra las tres especies de HF (figura 12), y fueron sometidos a la evaluación cuantitativa. **CKM109, CKM113, CKM115, CKA027, CKM127, CKM138, CKM182, CKZ205, CKZ202, CKZ197, CKZ194, CKZ208.**

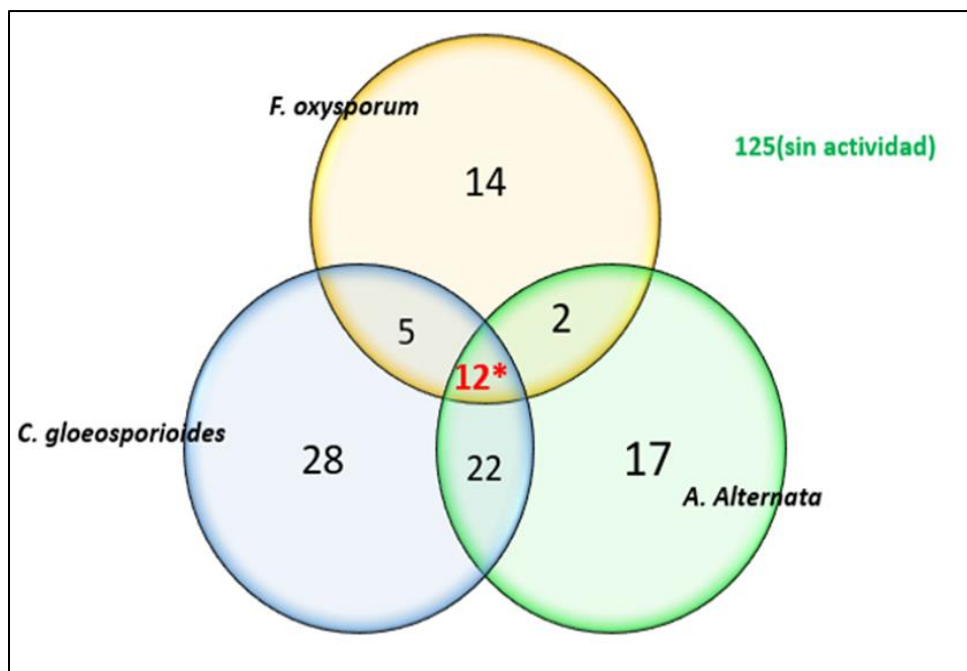


Figura 12. Número de aislamientos con actividad inhibitoria contra cada fitopatógeno. El diagrama de Venn muestra el número de bacterias que inhibió a un solo hongo: *F. oxysporum* (14), *C. gloeosporioides* (28), *A. alternata* (17). Solo dos de ellos: *F. oxysporum* y *C. gloeosporioides* (5), *F. oxysporum* y *A. alternata* (2), *C. gloeosporioides* y *A. alternata* (22). Inhibición a los tres fitopatógenos (12). Total = 100.

Cuadro 10. 100 aislamientos con por lo menos actividad inhibitoria contra uno de los fitopatógenos

Clave	<i>F.oxys</i>	<i>C.gloe</i>	<i>A.alt</i>	Clave	<i>F.oxys</i>	<i>C.gloe</i>	<i>A.alt</i>	Clave	<i>F.oxys</i>	<i>C.gloe</i>	<i>A.alt</i>
CKM095	+	+	-	CKM155	+	+	-	CKA052	-	-	+
CKM097	-	+	+	CKM156	-	-	+	CKA055	-	+	+
CKM098	-	-	+	CKM157	+	-	+	CKA057	-	-	+
CKM103	-	+	+	CKM158	-	-	+	CKA059	+	-	-
CKM107	+	+	-	CKM159	-	+	+	CKA060	-	+	-
CKM108	-	+	+	CKM160	-	-	+	CKA065	-	+	+
CKM109	+	+	+	CKM161	-	+	+	CKA069	+	-	-
CKM110	-	-	-	CKM162	+	-	-	CKA080	-	+	-
CKM111	+	-	-	CKM165	-	+	+	CKA081	+	-	-
CKM113	+	+	+	CKM167	-	-	+	CKZ189	-	+	-
CKM114	+	-	-	CKM168	+	-	+	CKZ190	-	+	-
CKM115	+	+	+	CKM169	-	-	+	CKZ194	+	+	+
CKM116	+	-	-	CKM170	-	+	-	CKZ196	+	-	-
CKM119	-	+	-	CKM176	-	+	+	CKZ197	+	+	+
CKM121	-	+	+	CKM179	+	-	-	CKZ198	-	-	+
CKM124	+	+	-	CKM180	-	-	+	CKZ201	-	+	-
CKM126	-	-	+	CKM181	-	-	+	CKZ202	+	+	+
CKM127	+	+	+	CKM182	+	+	+	CKZ204	-	+	-
CKM128	-	+	+	CKM183	-	-	+	CKZ205	+	+	+
CKM129	+	-	-	CKM184	-	+	-	CKZ206	-	-	-
CKM130	-	+	+	CKM185	-	+	+	CKZ208	-	+	-
CKM131	+	+	-	CKA012	+	-	-	CKZ209	-	-	+
CKM136	-	+	+	CKA013	-	-	+	CKV213	-	+	+
CKM138	+	+	+	CKA015	-	-	+	CKV214	-	+	+
CKM144	+	+	+	CKA020	+	+	-	CKV215	+	-	-
CKM146	-	-	+	CKA025	+	-	-	CKV217	-	+	-
CKM147	+	-	-	CKA027	+	+	+	CKV218	+	-	-
CKM148	-	-	+	CKA030	-	-	+	CKV229	-	+	-
CKM150	-	-	+	CKA032	-	+	+	CKV230	-	+	-
CKM151	-	+	-	CKA047	+	-	-	CKV231	-	+	-
CKM153	-	+	+	CKA048	-	-	+				

*En amarillo están señalados los aislamientos con actividad inhibitoria contra los tres fitopatógenos.
F.oxys: *Fusarium oxysporum*; *C.gloe*: *Coletotrichum gloeosporioides*; *A.alt*: *Alternaria alternata*

3.2 Evaluación cuantitativa

Los 12 aislamientos bacterianos seleccionados fueron sometidos a la confrontación individual contra los fitopatógenos y se evaluó cuantitativamente su efecto antagónico (Macedo *et al.*, 2012). La evaluación cuantitativa permitió identificar los aislamientos con mayor actividad antagónica contra los tres fitopatógenos, por lo que los aislamientos **CKM127**, **CKM138** y **CKZ202** fueron seleccionados para la secuenciación y minería de genomas completos (figura 12).

Cabe destacar o mencionar que las colonias bacterianas tienen un comportamiento diferente frente a los diferentes hongos. un mismo aislamiento puede tener un crecimiento invasivo frente a una especie de hongo y un crecimiento limitado contra una especie distinta. Los casos más claros observados en este trabajo fueron los aislamientos CKZ202 y CKM138 que fueron invasivos contra *F. oxysporum*, pero tuvieron un crecimiento evidentemente más limitado contra *C. gloeosporioides* y *Alternaria alternata* (figura 13, 14, 15 y 16).

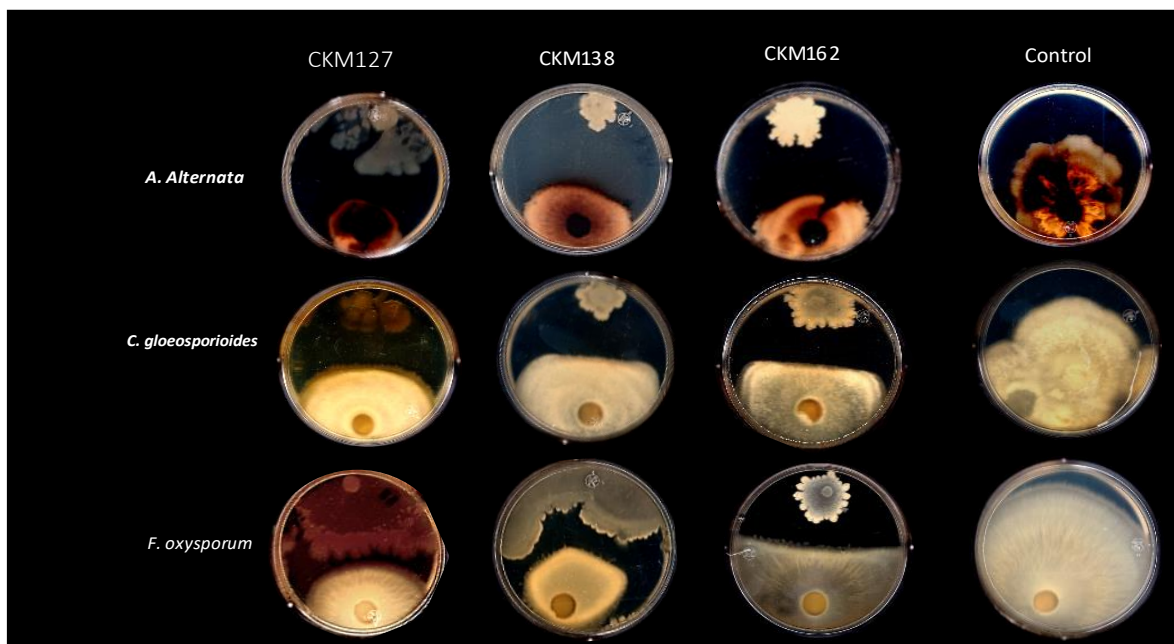


Figura 13. Imagen del efecto inhibitorio de los aislamientos bacterianos sobre el crecimiento de los hongos fitopatógenos al final de la evaluación (15 días), comparando con su crecimiento de forma aislada.

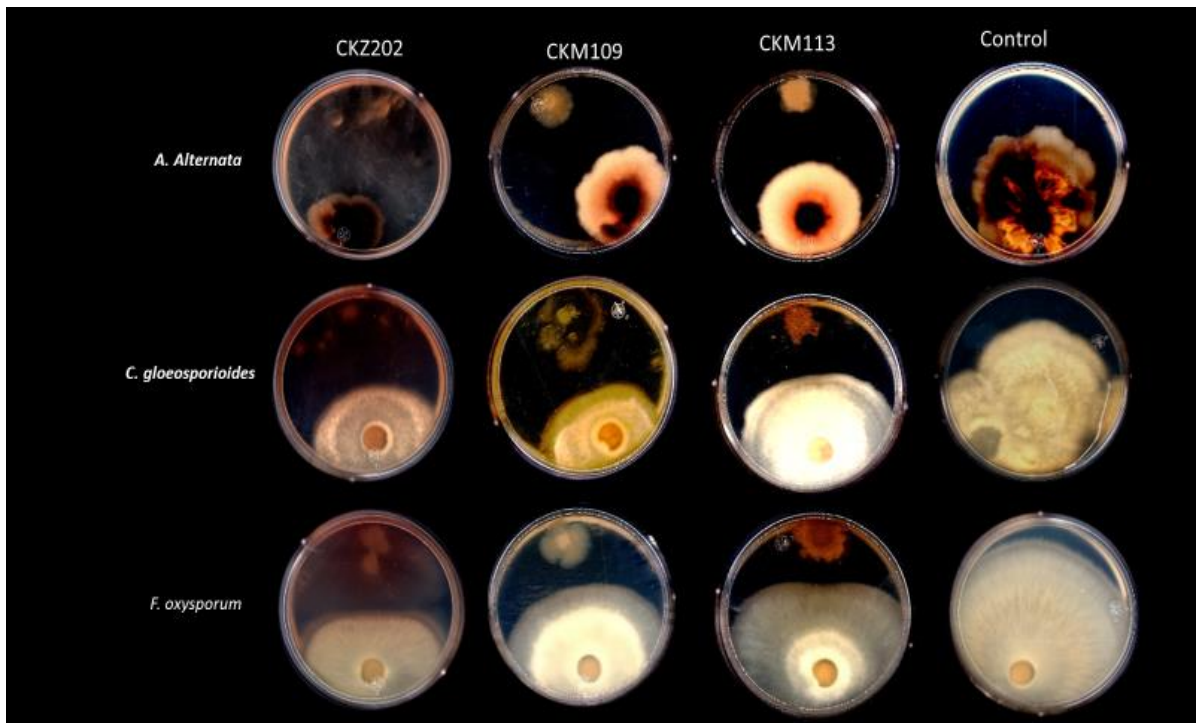


Figura 14. Imagen del efecto inhibitorio de los aislamientos bacterianos sobre el crecimiento de los hongos fitopatógenos al final de la evaluación (15 días), comparando con su crecimiento de forma aislada.

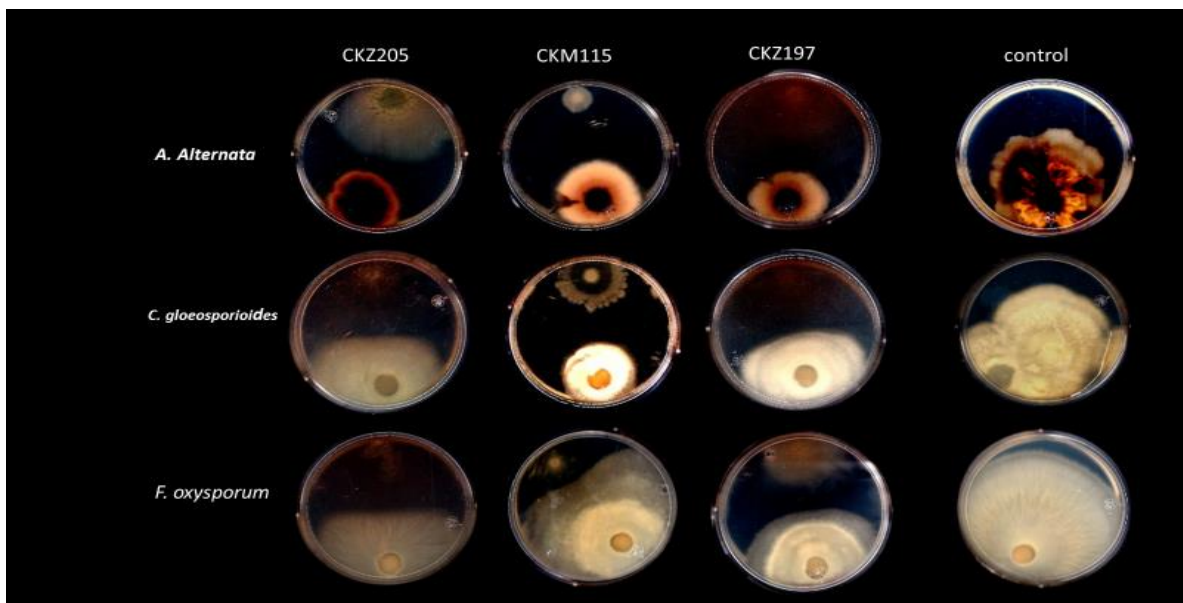


Figura 15. Imagen del efecto inhibitorio de los aislamientos bacterianos sobre el crecimiento de los hongos fitopatógenos al final de la evaluación (15 días), comparando con su crecimiento de forma aislada.

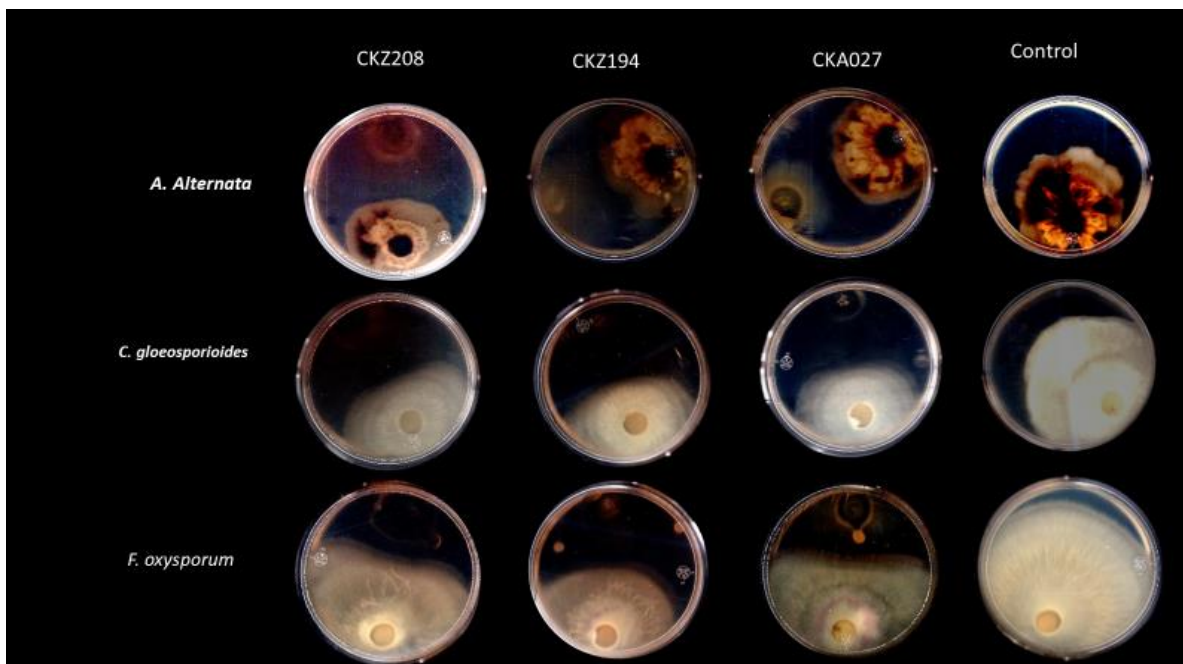


Figura 16. Imagen del efecto inhibitorio de los aislamientos bacterianos sobre el crecimiento de los hongos fitopatógenos al final de la evaluación (15 días), comparando con su crecimiento de forma aislada.

Los aislamientos CKZ202, CKZ205, CKM127, CKM138 presentaron los mayores valores de inhibición, contra las tres especies (figura 17). Aunque, desde un punto de vista del comportamiento individual, el aislamiento CKM115 presentó la mayor inhibición contra *C. gloeosporioides* (figura 18), y los aislamientos CKZ202 y CKM138 mostraron mayor inhibición contra *Alternaria alternata* y *Fusarium oxysporum*, respectivamente.

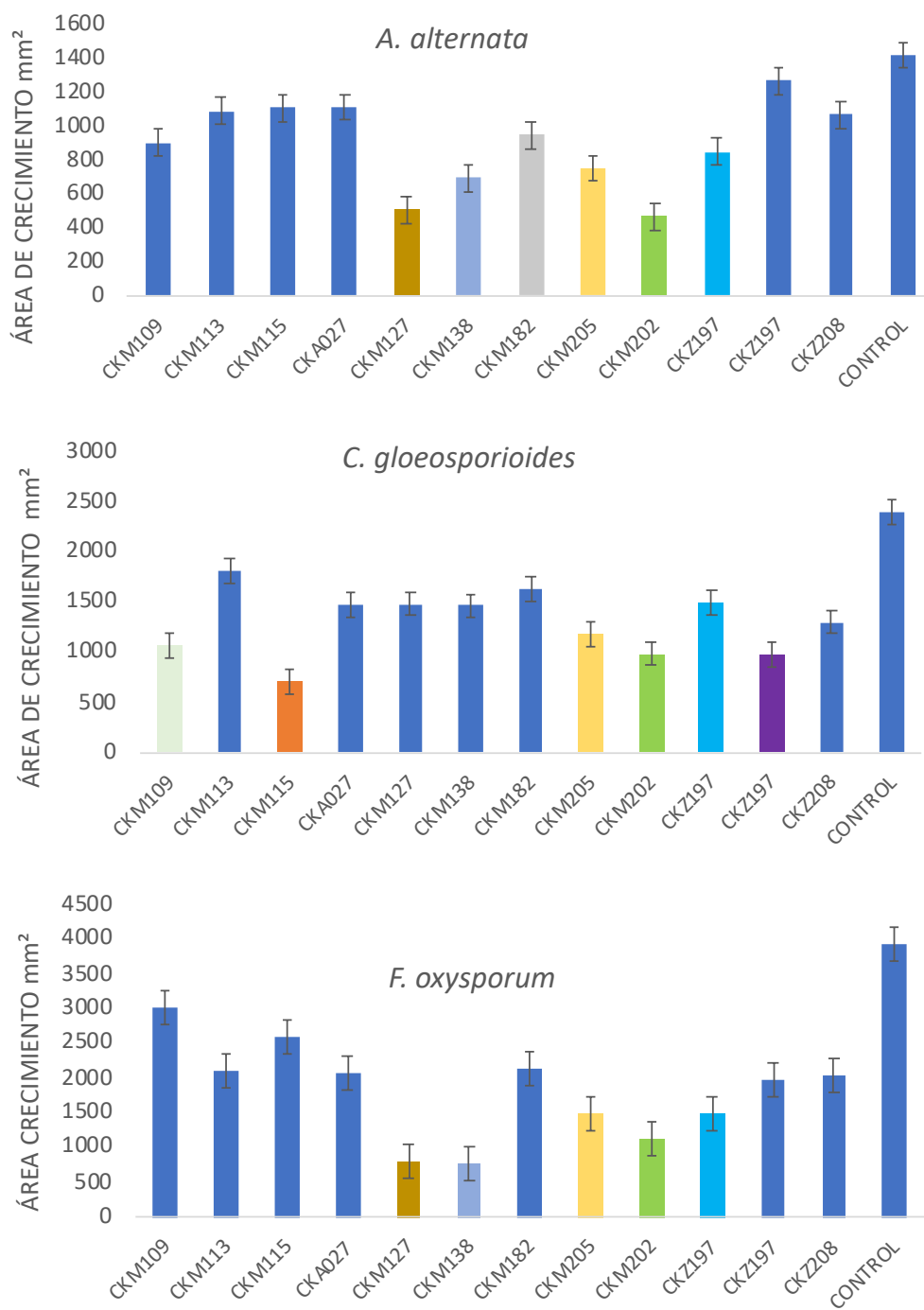


Figura 17. Inhibición de los aislamientos bacterianos en contra de las tres especies de fitopatógenos. La inhibición se observa en la gráfica en función del área de crecimiento: los aislamientos con menor valor son los mejores antagonistas en contra de la especie de HF.

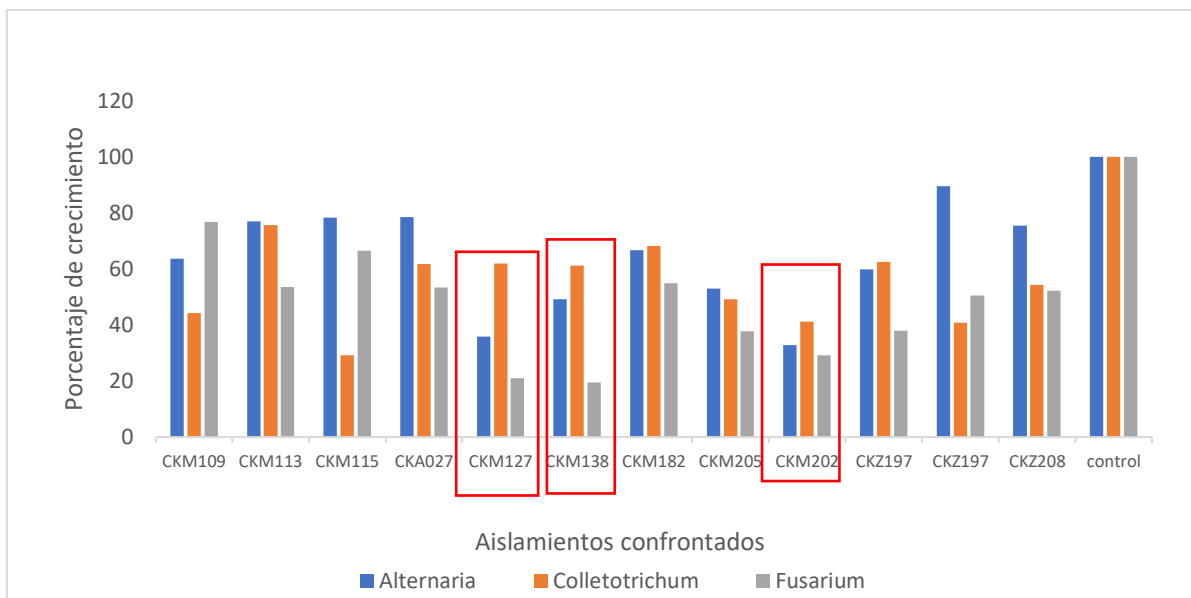


Figura 18. Actividad inhibitoria de los aislamientos contra los tres fitopatógenos. Los aislamientos que mejor actividad antagónica tuvieron considerando los 3 fitopatógenos son señalados dentro de los cuadros rojos.

3.3 Caracterización microbiológica de las bacterias seleccionadas

Los 12 aislamientos que presentaron la mayor inhibición en contra de los fitopatógenos ensayados se muestran en el cuadro 10. Como parte de la caracterización e identificación de las cepas se realizó una caracterización microbiológica.

Cuadro 11. Caracterización microbiológica de los 12 aislamientos con mayor actividad antagónica contra los tres hongos fitopatógenos

Aislamiento	Características Macroscópicas						Características microscópicas		
	Borde	Forma	Pigmentación del medio	Color	Textura	Elevación	Gram	Forma	Crecimiento
CKM109	ondulado	circular	no	verdoso	mucosa	plana	-	bacilo	individual
CKM113	lobulado	circular	no	blanco-cremoso	mucosa-venosa	plana	-	cocobacilo	individual
CKM115	Ondulado-filamentoso	circular	no	blanco-amarillento	mucosa-rugosa	plana	-	bacilo	individual
CKA027	liso	irregular	si	Verde-amarillento	mucosa	plana	-	bacilo	individual
CKM127	lobulado	circular	si	verdoso	mucosa	plana	-	bacilo	individual
CKM138	ondulado	irregular	no	crema	filamentosa	irregular	+	bacilo	individual
CKM182	lobulado	circular	no	crema	filamentosa	irregular	+	coco	individual
CKZ205	liso	irregular	si	marrón-rojizo	mucosa	plana	-	bacilo	individual
CKZ202	liso	irregular	si	marrón-rojizo	mucosa	plana	-	bacilo	individual
CKZ197	liso	irregular	si	marrón-rojizo	mucosa	plana	-	cocobacilo	individual
CKZ194	liso	circular	si	marrón-rojizo	mucosa-puntiforme	plana	-	bacilo	individual
CKZ208	liso	irregular	si	rojizo	mucosa	plana	-	bacilo	individual

3.4 Extracción y purificación de DNA

La integridad de los gADN extraídos a partir de los 12 aislamientos con mayor actividad fueron verificados por electroforesis en gel de agarosa. Como se puede observar en la figura 19, se obtuvieron bandas sin degradación, con diferentes intensidades. En el caso de las muestras (CKM127 Y CKM138), seleccionadas para secuenciar los genomas completos, se repitió la extracción de DNA en donde se incrementó la cantidad de RNAsa. En la figura 20 se puede observar las bandas de gADN sin presencia de ARN.

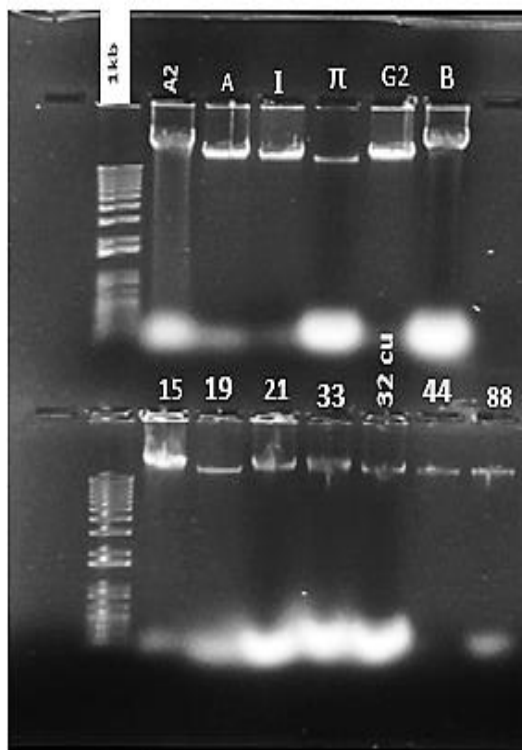


Figura 19. DNAs genómicos extraídos de los 12 aislamientos seleccionados. Carriles: M, marcador de peso molecular; **A2**, **A1**, CKZ205; A, CKZ194; I, CK208; π , CKZ197; **G2**, CKZ202; **B**, CKM138; **15**, CKM109; **19**, CKM113; 21, CKM115; **33**, CKM127; **44**, CKA027; **88**, CKM182.

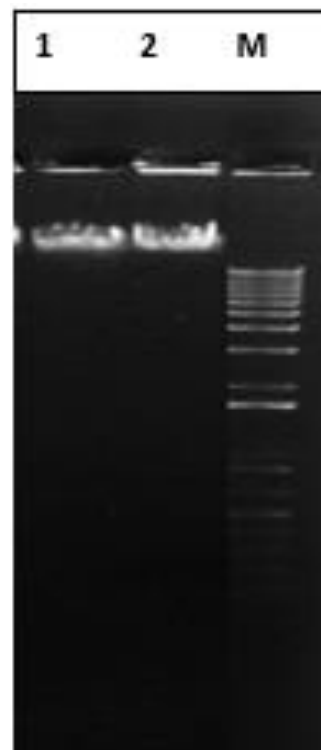


Figura 20. DNAs genómicos de los aislamientos 1: CKM127 Y 2: CKM138

Cuadro 12. Resultados de la cuantificación de las muestras de DNA en el nanodrop

Muestra	ng/ul	A260	A280	260/280	260/230
CKM109	159.69	3.194	1.687	1.89330172	2.16
CKM113	93.4	1.868	0.99	1.88686869	2.06
CKM115	140.96	2.819	1.489	1.89321692	2.16
CKA027	109.45	2.189	1.159	1.88869715	2.11
CKM127	83.4	1.668	0.863	1.93279258	2.14
CKM138	62.25	1.305	0.737	1.77069199	1.44
CKM182	103.3	2.066	1.072	1.92723881	2.18
CKZ205	40	2.708	1.622	1.66954377	2.14
CKZ202	21.57	2.241	1.25	1.7928	1.8
CKZ197	100.35	2.007	1.087	1.84636615	1.86
CKZ194	147.85	2.957	1.581	1.87033523	1.8
CKZ208	1003.36	20.067	10.724	1.87122342	1.93
CKM109	719.96	14.399	7.784	1.84982014	2.01

3.5 Imágenes de la electroforesis en gel de la amplificación del gen 16S de los aislamientos

La integridad de los amplicones se comprobó mediante electroforesis en gel (figura 21). Se obtuvieron bandas únicas de 1500 pb bien definidas lo que dio luz verde para proceder con la secuenciación. Las secuencias obtenidas se presentan en el anexo I.

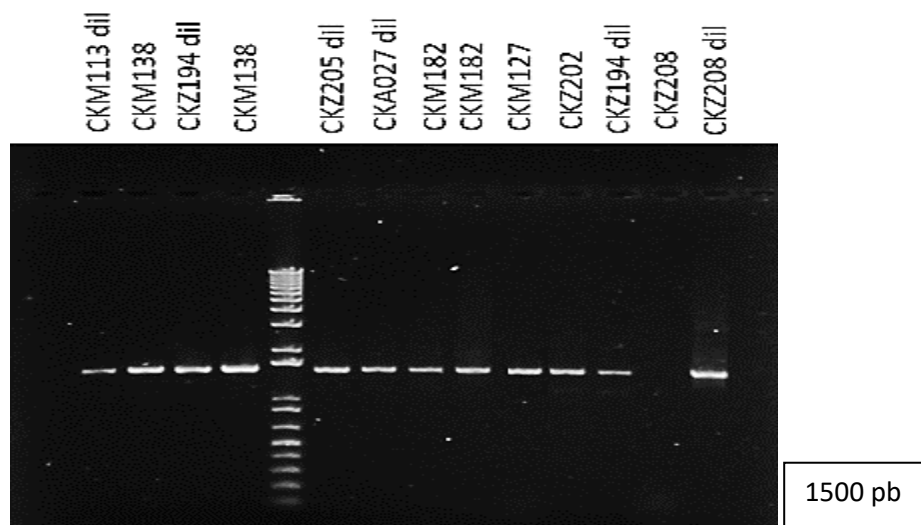


Figura 21. Electroforesis en gel de la amplificación del gen 16S. * Dil: diluida. Se obtuvieron bandas definidas sin degradaciones. marcado con una flecha se puede observar que la muestra CKZ208 no diluida no se amplifica solo cuando está diluida.

3.6 Identificación molecular

Se ensamblaron las secuencias de los genes 16S rRNA de los aislamientos y se depositaron en la base de datos GenBank de la NCBI. Para la identificación se utilizó la herramienta BLASTn de la NCBI. Los aislamientos, CKM113, CKM115, CKA027, CKM182, CKM138, CKZ205, CKZ208 tuvieron coincidencias con una sola especie y con porcentajes de identidad > 99.5%, y un E-value =0 (cuadro 12). Mientras que los aislamientos CKM109, CKZ202, CKZ194, CKZ197 tuvieron porcentajes de identidad inferiores a 99.5% con sus coincidencias más cercanas además de que incluyen distintas especies. El aislamiento CKM127 tuvo 100 % de porcentaje de identidad y el E-value 0 con 3 distintas especies todas del género *Pseudomonas* (cuadro 13).

La identificación taxonómica de los aislamientos CKM138 y CKM127, de los que se generó el genoma, se utilizaron tres regiones más de los genes conservados como lo son *rpoB*, *rpoD*, y *gyrB*. En el caso de CKM127 la coincidencia más alta fue con *Pseudomonas muyukensis* una especie de bacteria descrita recientemente por Girard *et al.*, (2021) y tuvo porcentajes de identidad de 98.22% con los genes *gyrB* y *rpoD*, y 98.75% con *rpoB*.

Cuadro 13. Aislamientos identificables a nivel especie con 16S rRNA

Aislamiento	Accesión en Genbank	Coincidencia BLASTn	% identidad	e-value
CKM109	OM540942	<i>Pseudomonas mosselii</i>	99.64	0
CKM113	OM540933	<i>Alcaligenes faecalis</i>	100	0
CKA027	OM540936	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	99.64	0
CKM138	OM540938	<i>Bacillus subtilis</i>	100	0
CKM182	OM540939	<i>Lactococcus garvieae</i>	99.58	0
CKZ205	OM540940	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	99.78	0
CKZ194	OM540932	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	99.57	0
CKZ208	OM540943	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100	0

Cuadro 14. Aislamientos donde el 16S es insuficiente para identificarlos a nivel especie

AISLAMIENTO	Coincidencia BLASTn	% identidad	e-value
CKM115 Código de accesión: OM540935			
	<i>Proteus mirabilis</i>	99.08	0
	<i>Proteus mirabilis</i>	99.08	0
	<i>Proteus mirabilis</i>	99.08	0
	<i>Proteus mirabilis</i>	99.08	0
	<i>Proteus mirabilis</i>	99.08	0
	<i>Proteus sp.</i>	99.01	0
	<i>Proteus mirabilis</i>	99.01	0
CKM127 Código de accesión: OM540937			
	<i>Pseudomonas xantholysinigenes</i>	100	0
	<i>Pseudomonas fakonensis</i>	100	0
	<i>Pseudomonas xanthosomae</i>	100	0
	<i>Pseudomonas putida</i>	99.87	0
	<i>Pseudomonas sp. CCOS 191</i>	99.87	0
	<i>Pseudomonas sp. 2hn</i>	99.87	0
	<i>Pseudomonas wayambapatensis</i>	99.87	0
	<i>Pseudomonas muyukensis</i>	99.87	0
<i>Pseudomonas mosselii</i>	99.8	0	

AISLAMIENTO	Coincidencia BLASTn	% identidad	e-value
CKZ202 Código de accesoión: OM540934	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	99.36	0
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	99.36	0
	<i>uncultured bacterium</i>	99.36	0
	<i>uncultured bacterium</i>	99.29	0
CKZ197 Código de accesoión: OM540941	<i>Mixta calida</i>	99.36	0
	<i>Mixta calida</i>	99.36	0
	<i>Mixta calida</i>	99.36	0
	<i>Mixta calida</i>	99.36	0
	<i>Pantoea sp. PSNIH2</i>	99.36	0
	<i>Mixta calida</i>	99.29	0
	<i>Mixta calida</i>	99.29	0
	<i>Mixta calida</i>	99.21	0
	<i>Enterobacteriaceae bacterium Z4076</i>	99.14	0

3.6.1 Confirmación de la identidad de los aislamientos CKM138 y CKM127

La plataforma MiGA también proporciona una clasificación taxonómica (cuadro 15) que se realiza con base en promedio de identidad de nucleótidos (ANI, Average Nucleotide Identity) y el promedio de identidad de aminoácidos (AAI, average amino acid Identity) comparando con la base de datos NCBI para procariontes. Para la cepa CKM127 los parientes más cercanos encontrados por MiGA en la base de datos fueron *Pseudomonas putida* NZ CP014343 (89,98 % ANI, 94.9% AAI) y *Pseudomonas mosselii* NZ CP023299 (89,96% ANI, 96.28% AAI). Y el valor de la probabilidad de la mejor coincidencia es de 0.8 por lo que posiblemente según estos datos CKM127 sea una especie nueva. En el caso de la cepa CKM138 los parientes más cercanos encontrados por MiGA en la base de datos fueron *Bacillus subtilis subsp. subtilis str. BSP1 NC 019896* (99,97% ANI, 99.94 AAI) y *Bacillus subtilis* NZ CP017112 (98,82% ANI, 99.04 AAI). Por los valores obtenidos en todos los casos son superiores a 95% tanto para ANI y AAI por lo que muy probablemente CKM138 sea una cepa de *Bacillus subtilis*.

Cuadro 15. Clasificación taxonómica de ambos genomas según en el análisis de MiGA basado en ANI y AAI

	CKM127	p-value	CKM138	p-value
Raíz		0****		0****
Dominio	Bacteria	0****	Bacteria	0****
Filo	Proteobacteria	3.86 e-5****	Firmicutes	0****
Clase	<i>Gamma proteobacteria</i>	0.000116****	<i>Bacilos</i>	0****
Orden	<i>Pseudomonadales</i>	0.000541****	<i>Bacillales</i>	0****
Familia	<i>Pseudomonadaceae</i>	0.00162****	<i>Bacillaceae</i>	0****
Género	<i>Pseudomonas</i>	0.00927****	<i>Bacillus</i>	8.02 e-5*****
Especies	<i>Pseudomonas putida</i>	0.329*	<i>Bacillus subtilis</i>	8.02 e-5****
Subespecies		0.787	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	0.646
Conjunto de datos		0.812		0.669

3.6.2 Porcentaje de identidad nucleotídica ANI y análisis filogenético del aislamiento CKM127 con otras *Pseudomonas* cercanas para determinar novedad genómica

Para profundizar con la identificación de la cepa CKM127 a nivel especie se procedió a la realización de un análisis ANI con las herramientas de la plataforma ANVI'O que, a diferencia del ANI obtenido de la plataforma MiGA, permite crear una base de datos con los genomas de interés. Los genomas que se usaron para este análisis fueron los seleccionados a partir de los resultados del Blastn, a partir de la base de datos no redundante del NCBI, usando como *query* los genes constitutivos *rpoB* y 16S rRNA de CKM127.

Basados en los valores de ANI mostrados en el cuadro 18, *Pseudomonas muyukensis* es la especie más cercana con 79% seguido de *Pseudomonas xantholysinigenes* cepa RW9S1A con 72% de identidad nucleotídica.

Cuadro 16. Porcentaje promedio de identidad de nucleótidos del aislamiento CKM127 con sus parientes más cercanos basado en *rpoB* y 16S rRNA

gen	RefSeqId	Especie	% ANI con CKM127
rpoD	NZ_CP077073.1	<i>Pseudomonas muyukensis</i> cepa COW39	79%
16s	CP077095.1	<i>Pseudomonas xantholysinigenes</i> cepa RW9S1A	72%
rpoD	LN847264.1	<i>Pseudomonas</i> sp. CCOS 191	66%
16s	CP026674.1	<i>Pseudomonas</i> sp. SWI44	66%
16s	CP077096.1	<i>Pseudomonas wayambapatensis</i> cepa RW3S1	64%
rpoD	AP023348.1	<i>Pseudomonas</i> sp. RtIB026	64%
rpoD	CP077077.1	<i>Pseudomonas maumuensis</i> cepa COW77	64%
rpoD	CP081966.1	<i>Pseudomonas mosselii</i> cepa DSM 17497	60%
16s	CP075595.1	<i>Pseudomonas</i> sp. RC3H12	56%
16s	CP011789.1	<i>Pseudomonas putida</i> cepa PC2,	54%
16s	CP077075.1	<i>Pseudomonas xanthosomae</i> cepa COR54	53%
16s	CP077076.1	<i>Pseudomonas fakonensis</i> cepa COW40	53%
16s	CP081016.1	<i>Pseudomonas</i> sp. 2hn	51%
16s	CP073661.1	<i>Pseudomonas</i> sp. JS425	50%
16s	CP002290.1	<i>Pseudomonas putida</i> BIRD-1	48%

El dendograma resultado de ANVI'O (figura 22 A), así como el árbol filogenético (figura 22 B) del genoma del aislamiento CKM127 señala que este está más relacionado con *Pseudomonas muyukensis*, pero siendo una especie diferente.

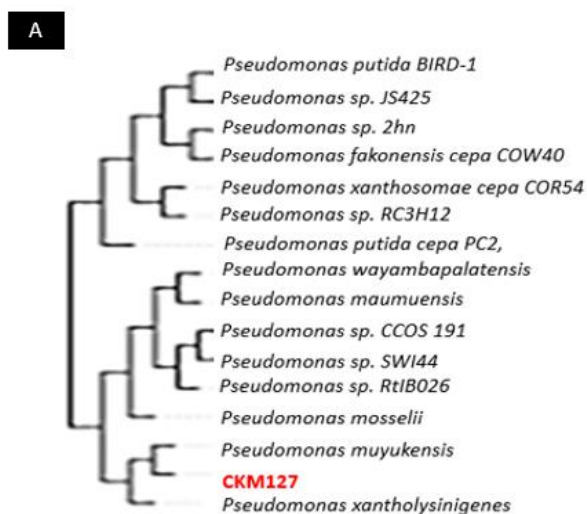


Figura 22 A. Dendograma basado en el porcentaje de identidad nucleotídica realizado con ANVI'o. El aislamiento CKM127 está señalado en rojo.

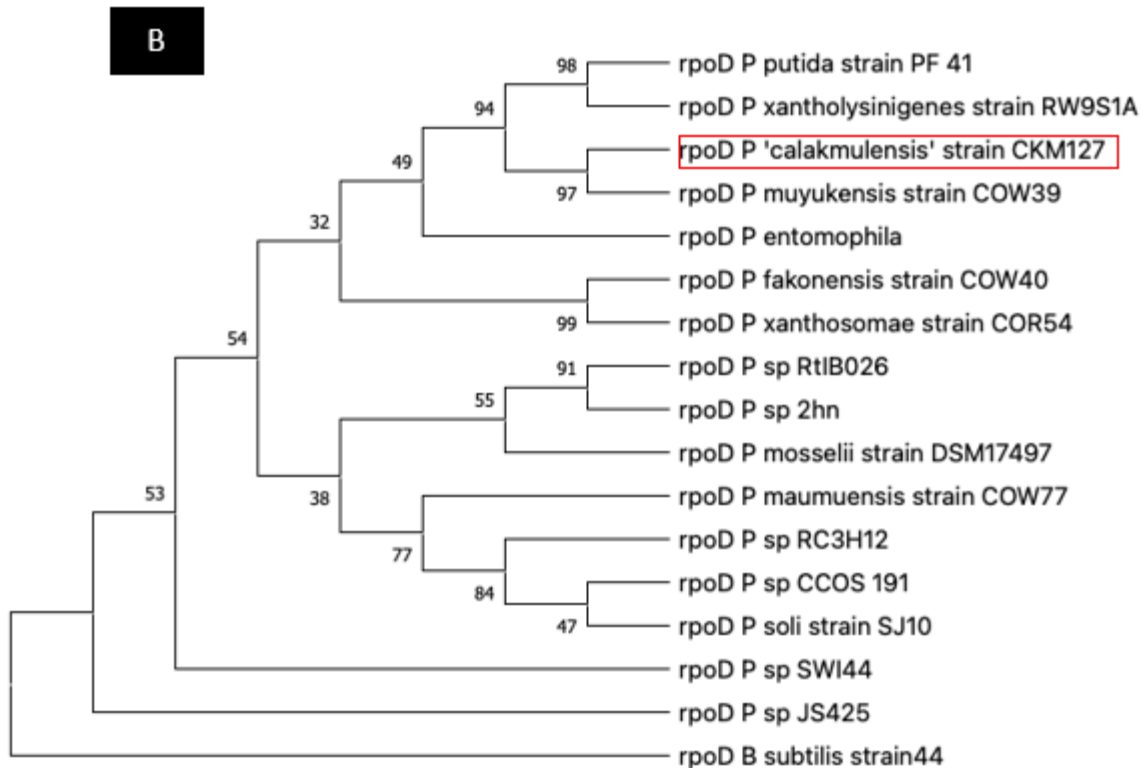


Figura 22 B. Relación filogenética entre las secuencias directas del gen *rpoD* de CKM127 y sus parientes cercanos obtenidos de la base de datos del NCBI. La reconstrucción filogenética se realizó con programa MEGAX usando el método neighbor joining con un bootstrap de 1000. Se utilizó *Bacillus subtilis* como grupo externo.

3.7 Métricas de ensamblaje de los genomas secuenciados

Se secuenciaron los genomas completos de los aislamientos CKM127 y CKM138, el número de lecturas pareadas que se obtuvieron en cada línea secuenciada están en el cuadro 14. Las lecturas obtenidas fueron filtradas con la herramienta Trimmomatic y verificadas en FastQC para obtener la calidad deseada típicamente debajo de un valor de Phred de 20 (Figuras 23 y 24).

Cuadro 17. Resultados de la secuenciación NexSeq formato 2x150 de las dos bibliotecas generadas, se realizó la secuenciación en cuatro líneas para cada caso.

ID cepas	Reads Identificadas Línea 1	Reads Identificadas as Línea 2	Reads Identificadas as Línea 3	Reads Identificadas as Línea 4	Reads totales (R1+R2)	Bases (Gb)
CKM138	7,492,106	7,428,831	7,374,498	6,901,676	29,197,111	4.379567
CKM127	10,717,870	11,088,584	10,714,052	10,521,946	43,042,453	6.456368

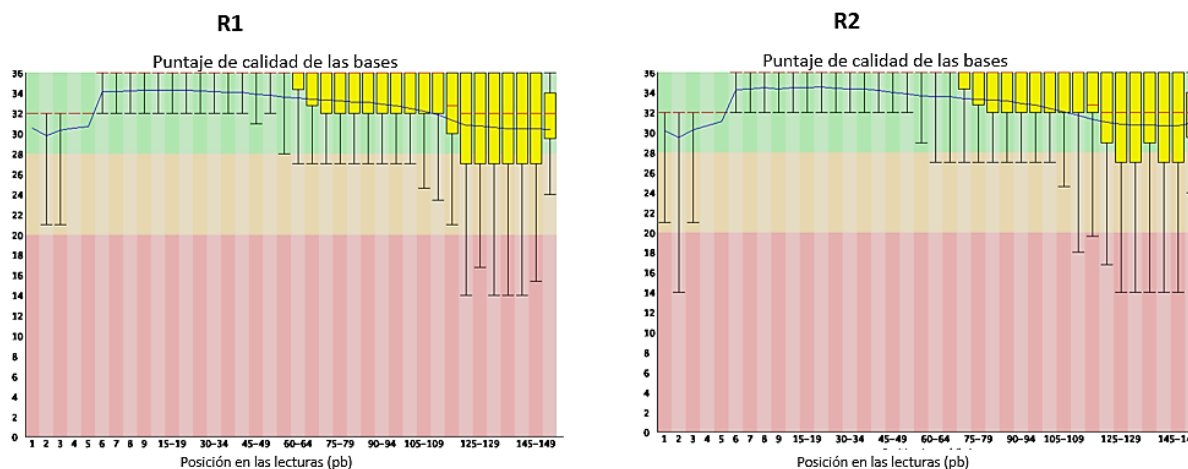


Figura 23. Calidad obtenida por secuencia de bases del genoma del aislamiento CKM138 después del filtrado de las lecturas R1 y R2. El puntaje de calidad asignada a cada base indica la probabilidad de que esa base este incorrecta (20 = 0.01) y (30 =0.001).

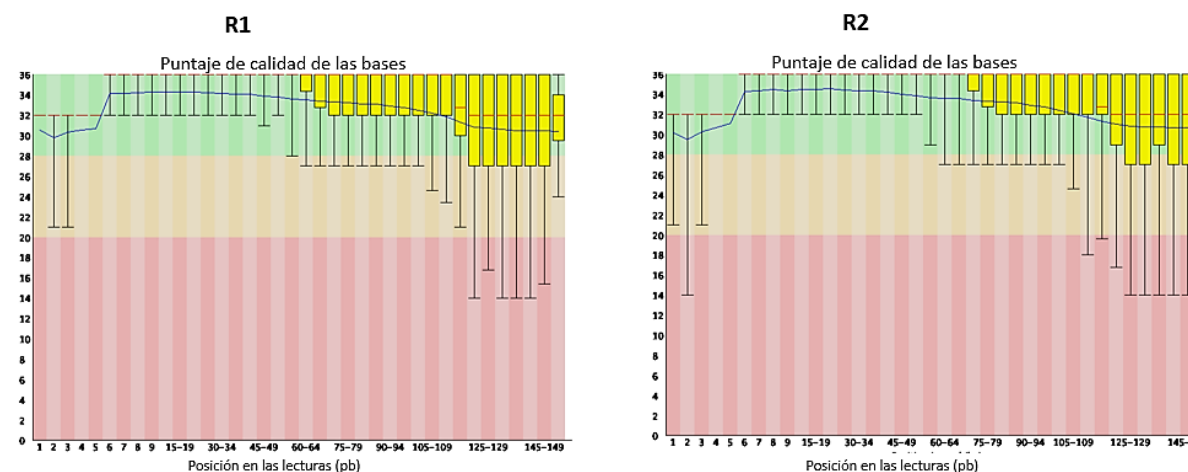


Figura 24. Calidad obtenida por secuencia de bases del genoma del aislamiento CKM127 después del filtrado de las lecturas R1 y R2. El nivel de calidad asignada a cada base indica la probabilidad de que esa base este incorrecta (20 = 0.01) y (30 =0.001).

Las lecturas fueron ensamblados en la plataforma Patric (Davis JJ *et al.*, 2020) con los parámetros por defecto. Una vez completado el ensamblado los genomas fueron subidos en la plataforma MiGA para hacer una identificación taxonómica y obtener los parámetros de calidad de los ensamblados. como lo muestra el cuadro 14, el porcentaje de contaminación para la muestra CKM127 fue de 0.9% y de 5.7% para la CKM138. Ambos genomas fueron completados a 99.1%. Los Scaffolds (termino que designa un grupo de lecturas o contigs que forman un pedazo del genoma) más grandes están del tamaño de 1000000 pb para los dos genomas. El número total de contigs fue de 60 para CKM127 y 33 para CKM138. En el cuadro 14 se muestran también las estadísticas generales de cada uno de los genomas en términos de su tamaño, N50, contenido de GC y proteínas predichas.

Cuadro 18. Características y métricas de calidad de los genomas CKM127 Y CKM138 secuenciados y ensamblados.

Aislamiento	CKM127	CKM138
Número totales de bases (Tamaño en pb)	5,481,143pb	4,123,424 bp
Número de contigs	66	30
N50*	199.707pb	1,058,096 bp
Scaffold de mayor tamaño	909,121pb	1,061,511 bp
Puntaje de calidad	94.6	70.6
Secuencia completa	99.10%	99.10%
Porcentaje contaminación	0.90%	5.70%
%GC	64.33%	43.54%
Densidad génica	89.57%	88.7%
Proteínas predichas	4,884	4,136

* El N50 definido como la longitud de los contigs tal que usando contigs de igual o mayor tamaño produce la mitad de las bases del genoma.

3.8 Anotación general en RAST De los genomas ensamblados

De acuerdo con la anotación obtenida en RAST, las secuencias codificantes (CDS) de los genomas de los aislamientos CKM138 Y CKM127 se agruparon en 27 sistemas y 333 subsistemas en el caso del aislamiento CKM127 (Figura 25) y 366 subsistemas en el caso del aislamiento CKM138 (Figura 26).

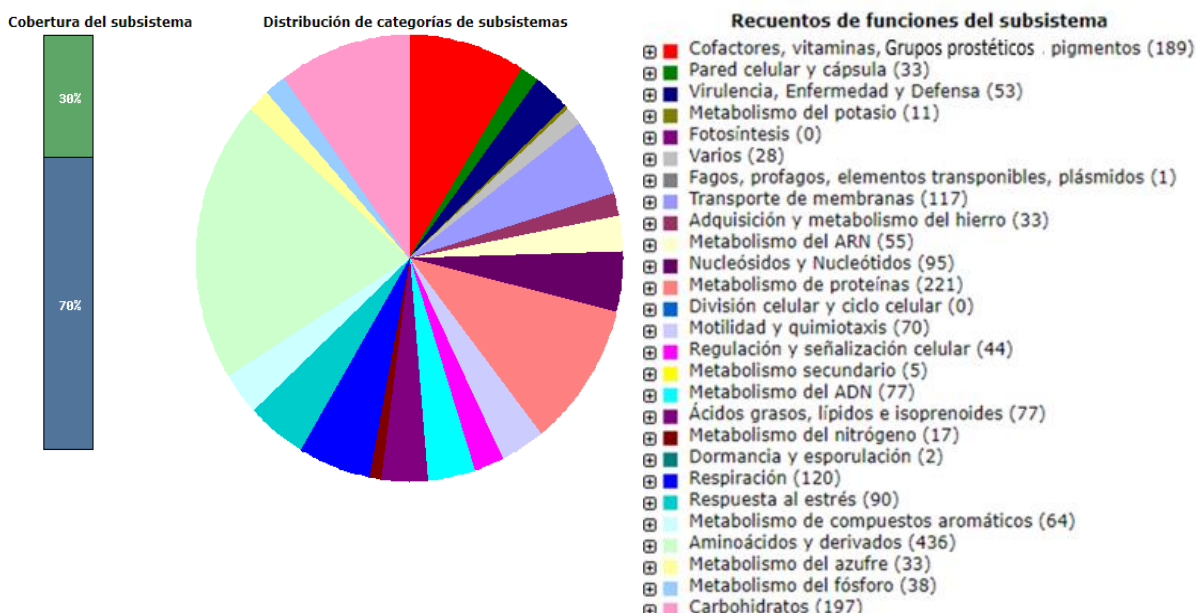


Figura 25. Distribución y funciones de los subsistemas identificados en el aislamiento CKM127. La cobertura del subsistema representa el porcentaje del genoma agrupado dentro de subsistemas. Entre paréntesis se muestra el número de subsistemas asociado a cada función.



Figura 26. Distribución y funciones de los subsistemas identificados en el aislamiento CKM138. La cobertura del subsistema representa el porcentaje del genoma agrupado dentro de subsistemas. Entre paréntesis se muestra el número de subsistemas asociado a cada función.

3.9 Clusters de genes biosintéticos del aislamiento CKM138 identificados con AntiSMASH

En el aislamiento CKM138 identificado como *Bacillus subtilis* con una significancia estadística (p-value) de 0.01, se identificaron 13 regiones (figura 27) que contienen *clústeres* de genes, de los cuales siete que posiblemente sinteticen nuevos antibióticos, dos de tipo terpeno, uno de tipo policétido sintasas tipo 3 (T3PKS), y uno de tipo ciclodipéptidos (CDPS) que no coincidieron con ningún *cluster* conocido. También se identificó un híbrido de sintasa de péptidos no ribosomales (NPRS) con betalactona que se parece en un 80% a la fengicina, dos NPRS que tienen un 43% de similitud con la surfactina y un NPRS adicional que tiene 38% de similitud con la plipastatina (cuadro 16).

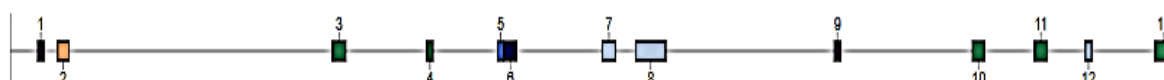


Figura 27. Ubicación de los *clústeres* de genes biosintéticos en el genoma del aislamiento CKM138 (*Bacillus subtilis*)

Cuadro 19. *Clusters* de genes biosintéticos del aislamiento CKM138 (*Bacillus subtilis*)

Región	Tipo	De	A	Cluster conocido más similar	% Similitud
Región 1	terpeno	98,355	119,415		
Región 2	T3PKS	168,353	208,860		
Región 3	NRPS	1,143,609	1,189,618	bacilibactina	100%
Región 4	CDPS	1,478,527	1,499,273		
Región 5	sactipéptido	1,729,165	1,750,149	subtilosina A	100%
Región 6	otro	1,753,556	1,794,974	bacilicina	100%
Región 7	NRPS, betalactona	2.099.902	2,147,201	fengicina	80%
Región 8	NRPS	2,219,122	2,324,387	bacillaene	100%
Región 9	terpeno	2,923,312	2,944,115		
Región 10	NRPS	3.413.172	3.455.286	surfactina	43%
Región 11	NRPS	3.632.718	3.677.904	surfactina	39%
Región 12	sactipéptido	3.812.859	3.835.812	factor de muerte por esporulación	100%
Región 13	NRPS	4.060.597	4.123.424	plipastatina	38%

3.10 Clusters de genes biosintéticos del aislamiento CKM127 identificados con AntiSMASH

El aislamiento CKM127 fue clasificado como una bacteria del género *Pseudomonas* con un p-value con significancia estadística de 0.05, según el análisis de MiGA mostró. Se identificaron 10 *clústeres* de genes biosintéticos (figura 28) de los cuales los más similares a *clústeres* conocido son tres del tipo NRPS, entre ellos uno que tiene un 62% de similitud con el *cluster* biosintético de la putisolvina y los otros dos tienen un 55 y 33% de similitud con los de la sesilina A. De los otros siete, cuatro son desconocidos y dos se parecen en un 9 y 14% a los que biosintetizan la pyoverdina y otro tiene un 13% de similitud con los genes que biosintetizan la lankacidina C (cuadro16).



Figura 28. Ubicación de los *clústeres* de genes biosintéticos en el genoma del aislamiento CKM127 (*Pseudomonas spp.*)

Cuadro 20. *Clusters* de genes biosintéticos del aislamiento CKM127 (*Pseudomonas spp.*).

Región	Tipo	De	Para	Clúster conocido más similar	% Similitud
Región 1	NAGGN	662,223	677,122		
Región 2	cofactor redox	1.248.276	1,270,423	lankacidina C	13%
Región 3	Similar a RiPP	1.324.686	1.335.513		
Región 4	Similar a NRPS	2.840.406	2.869.190	Borrelidina	4%
Región 5	NRPS	3,573,270	3.638.949	pyoverdin	14%
Región 6	NRPS	4.320.924	4.373.180	pyoverdin	9%
Región 7	REGAZO	4.644.069	4.679.554		
Región 8	NRPS	5.119.456	5.176.117	sesilina A	55%
Región 9	NRPS	5.287.956	5.345.727	putisolvin	62%
Región 10	Similar a NRPS	5.381.887	5.481.143	sesilina A	33%

3.11 Comparación de *clústeres* biosintéticos en BiGSCAPE

BiGSCAPE permite analizar los *clústeres* mediante la construcción de redes de similitud de secuencias de BGC, agrupándolos en familias y explorando su diversificación con base en la filogenia de las enzimas. Así se puede identificar un *cluster* nuevo en el caso de los que no pertenecen a ninguna de las familias ya conocidas presentes en las bases de datos. Realiza agrupaciones en familias para cada tipo de BGC ya sea PKS, NRPS, RiPPs o híbridos de tipo NPRS-PKS. De esta manera, en el grupo de datos que se introducen identifica el número total de BGCs, el número de familias formadas, el número de uniones que son las familias compartidas entre genomas para cada tipo de BGCs y el número de singletons que son los *clústeres* de genes biosintéticos que no pertenecen a ninguna familia conocida y por lo tanto con probabilidad de ser *clústeres* nuevos. En un estudio metagenómico se consideran todas las familias de la base de datos. En este trabajo se consideraron las familias en las cuales las cepas de estudio tuvieron por lo menos un BGC (cuadro 17).

Del análisis del aislamiento CKM127 (*Pseudomonas spp.*) y sus 16 parientes, se agruparon 82 familias de BGCs, 20 de tipo PKS, 33 de tipo NPRS, 15 de tipo RiPPs y 13 de otros tipos. El aislamiento CKM127 tuvo *clústeres* presentes en ocho familias (cuadro 17), dos de cada tipo, y solo tuvo un singleton de tipo RiPPs (figura 29) que contiene un dominio de subtilasa y uno de isochorismatasa situado en la región 7 del genoma (figura 30).

En el caso del aislamiento CKM138 (*Bacillus subtilis*) y sus 16 parientes se agruparon 40 familias de BGCs de los cuales 14 son de tipo NPRS, cinco de tipo PKS, ocho de tipo RiPPs, dos de tipo terpenos y cuatro de híbridos PKS-NRPS. El aislamiento CKM138 tuvo *clústeres* presentes en 17 familias (cuadro 17): 6 NPRS de los cuales tres son singletons uno de ellos ubicado en la región 13 del genoma contiene también un dominio isochorismatasa (figura 31), los demás son dos PKS, dos RiPPs, dos terpenos, un híbrido NPRS-PKS y dos de otros tipos no identificados por el programa BiGSCAPE de los cuales unos es singleton (figuras 32 y 33).

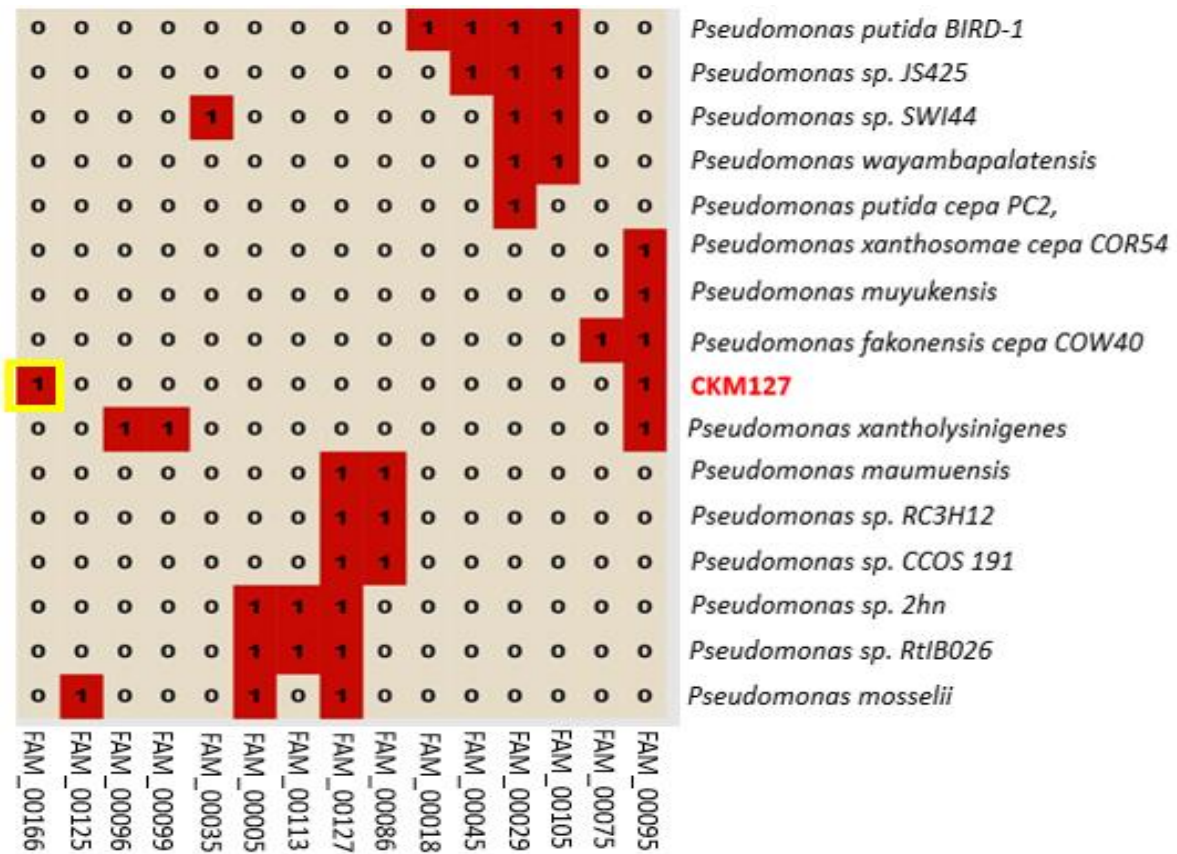


Figura 29. Mapa de calor de presencia y ausencia de *clústeres* en las familias de tipo NPRS donde se identificó el singleton del aislamiento CKM127 señalado en amarillo.

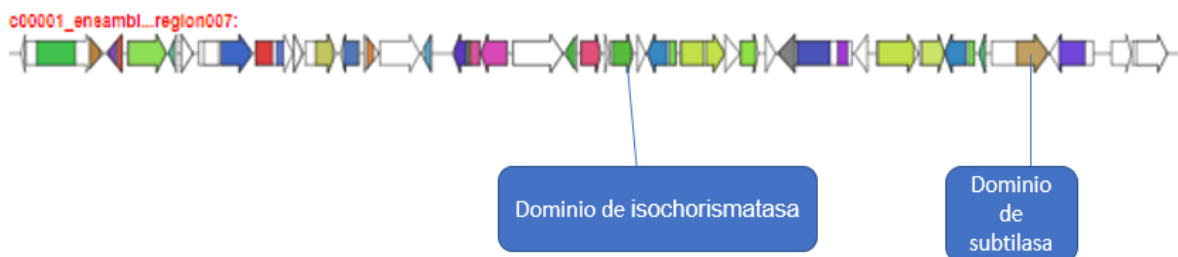


Figura 30. Contexto genómico del singleton de la familia FAM166 identificado en CKM127 (*Pseudomonas spp* CKM127).

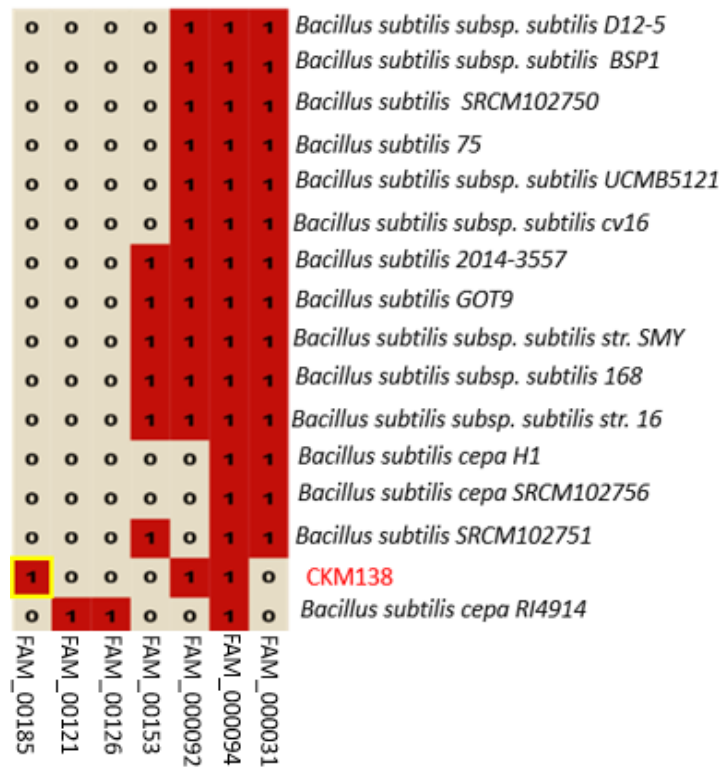


Figura 31. Mapa de calor de presencia y ausencia de *clústeres* en las familias donde se identificó uno de los cuatro singletones del aislamiento CKM138 señalado en amarillo.

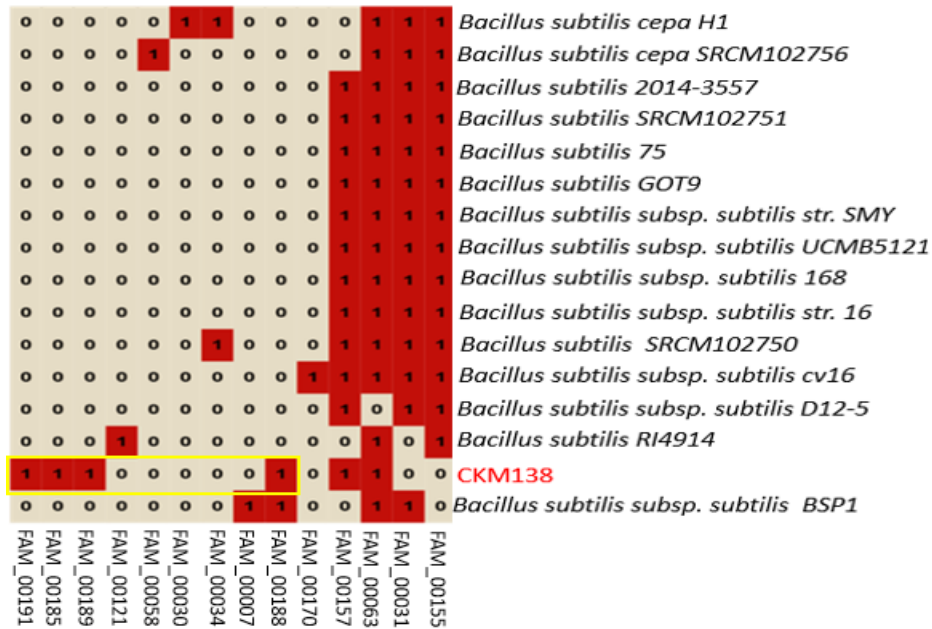


Figura 32. Mapa de calor de presencia y ausencia de BCG en las familias de tipo NPRS donde se identificaron 3 de los 4 singletones del aislamiento CKM138. Señalados en amarillo.

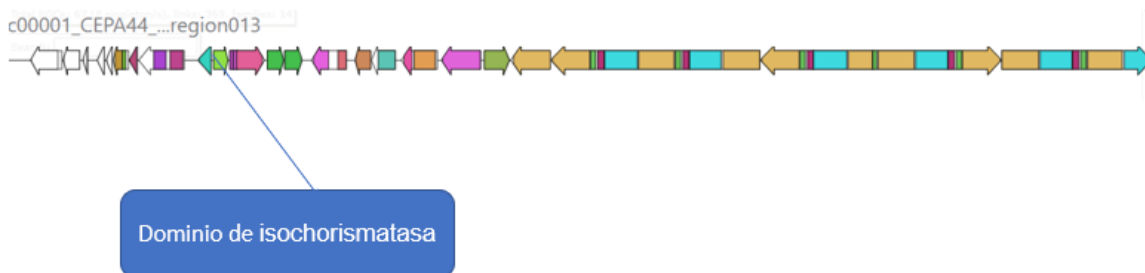


Figura 33. Contexto genómico del singleton de la familia FAM191 identificado en CKM138 (*B. subtilis*).

Cuadro 21. Familias de BGCs presentes en los aislamientos CKM127 y CKM138

Aislamientos	Tipos de BGCs					
	NPRS	PKS	RiPPs	Otros	Terpenos	NPRS-PKS
CKM127	FAM146	FAM146	FAM166	FAM24	N/A	N/A
	FAM159	FAM159	FAM95	FAM62		
CKM138	FAM31	FAM157	FAM190	FAM94	FAM159	FAM157
	FAM63	FAM86	FAM127	FAM92	FAM29	
	FAM188			FAM185		
	FAM191					
	FAM185					
	FAM189					

*las familias señaladas en amarillo corresponden a los singletones identificados.

En el aislamiento CKM127 el singleton en FAM166 se encuentra en la región 7 del genoma y el en el aislamiento CKM138 el singleton agrupado en FAM191 se encuentra en la región 4, el singleton NPRS en FAM185 en la región 11 el singleton FAM189 en la región 13 y el singleton FAM185 cuyo tipo no fue identificado en la región 7.

4 DISCUSIÓN

4.1 La minería de genomas guiado por función como estrategia para la búsqueda de nuevos productos naturales en Calakmul

En la búsqueda de productos naturales en nichos ecológicos poco explorados, la estrategia de minería de genomas guiada por bioactividad ha sido reportada como efectiva para evitar el redescubrimiento de metabolitos conocidos que han sido reportados poseen la misma funcionalidad (Fukuda *et al.*, 2020). También permite que se use la minería de genomas para aportar soluciones específicas como lo reporta de igual manera Fukuda *et al.*, 2020, donde pudieron a través de rondas repetitivas de bioensayos asistidos con datos genómicos descubrir la natalamycina A un nuevo policétido antifúngico contra el patógeno *Pseudoxyllaria sp. X802* y descartar la reportada geldanamicina.

La aplicación de esta estrategia en áreas como la biosfera de Calakmul puede ser prometedor ya que los bosques tropicales se han reportado como importantes fuentes de metabolitos secundarios de origen microbiológico. Por ejemplo, Qin *et al.*, 2009 aislaron en el bosque tropical de Xishuangbanna en china 46 aislamientos bacterianos que tuvieron actividad antagónica contra cepas patogénicas de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, y *Candida albicans*. En tanto que, Li *et al.*, 2008 estudiaron el efecto antitumoral contra células A549 P388D1 y BEL-7404 y el efecto antimicrobiano contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* de 24 especies del género *Streptomyces* aislados del bosque tropical de Yunnan en China. Por su parte Lindang *et al.*, 2021 aislaron en los suelos del bosque tropical Danum Valley de Malaysia una cepa de *Paenibacillus spp.* solubilizador de fósforo con capacidad de solubilizar 7,378.12 U mg⁻¹ de PO⁴ a partir de suelo, la actividad fosfatasa más alta registrada en comparación con otros estudios realizados hasta ahora.

En el presente trabajo el establecimiento de los ensayos de confrontación permitió limitar la búsqueda a las bacterias que mostraron la actividad de interés, pasando de 225 aislamientos a 12. Los datos genómicos ayudaron a descartar los

clústeres de genes que codifican para metabolitos ya reportados con un 100% de similitud con los *clústeres* de estudio y fue posible encontrar evidencia in silico tanto en *Bacillus subtilis* CKM138 como el *Pseudomonas* spp CKM127 de la presencia de *clústeres* con muy baja similitud con los ya reportados incluso se identificaron *clústeres* que no tuvieron ninguna coincidencia con los reportados en la base de datos de AntiSMASH y por consiguiente con alta probabilidad de ser nuevos.

4.2 Identificación de los 12 aislamientos bacterianos seleccionados

El gen 16S como marcador para la identificación de cepas bacterias hasta nivel especie ha sido ampliamente utilizado (Bueno-Gonzalez *et al.*, 2020; Janda y Abbott, 2007; Kim *et al.*, 2014). Los límites de porcentajes de identidad establecidos para una precisa identificación van desde >95% para género y >97% para especies (Janda y Abbott, 2007; Johnson *et al.*, 2019; Peker *et al.*, 2019). Por otro lado, se han reportado estudios donde se demuestra que se necesita más de un 99.5% de identidad para poder identificar a nivel especie con 16S. Para algunos géneros como *Pseudomonas* se ha demostrado que en 16 no es preciso ni al 100% para una identificación acertada (Girard *et al.*, 2021; Janda y Abbott, 2007). Estos reportes concuerdan con los resultados observados en este estudio donde, por ejemplo, el aislamiento CKZ194 tuvo 99.43% de identidad con secuencias de 16S de *Pseudomonas aeruginosa*, pero también con *Pseudomonas fluorescens* y para la cepa CKM127 que posteriormente se encontraron evidencias de que muy probablemente sea una especie nueva, se encontró 100% de identidad con secuencias de 16S de 3 especies de *Pseudomonas* diferentes además de varios otros con más del 99.5%. Basado lo anterior se estableció como límite un 99.5% para la identificación de aislamientos donde las coincidencias del Blastn del 16S rRNA fueron homogéneas con una sola especie y porcentajes inferiores a eso solo fueron considerados a nivel género. Para los aislamientos CKM138 y CKM127 de los que se secuenció el genoma se realizaron análisis adicionales. Los 12 aislamientos seleccionados fueron identificados con 16S como cepas de *Pseudomonas aeruginosa* (4 aislamientos con >99.5%) y *Pseudomonas* spp. (2

aislamientos), *Alcaligenes faecalis* 100%, *Proteus spp.* >99%, *Lactococcus garvieae* >99.5%, *Mixta spp.* >99% recientemente renombrado como *Pantoea*, y *Bacillus subtilis* 100%.

Los resultados sugieren que el género *Pseudomonas* está bien representado en las aguadas de la reserva de la biosfera de Calakmul resultado no sorprendente ya que es un género ubicuo en el medio ambiente (suelo y agua). Hay múltiples reportes de este género como controlador biológico de hongos fitopatógenos. Ha sido reportado como supresor de la enfermedad del mal del pie en gramíneas (Imran *et al.*, 2006), El control de *Erwinia amylovora* (Pujol *et al.*, 2005), además de la inhibición del crecimiento de *Fusarium oxysporum* y *Alternaria alternata* (Müller *et al.*, 2016).

Por otro lado, Gong *et al.* 2019 así como Shan *et al.*, 2019 reportaron *Alcaligenes faecalis* como productor de metabolitos secundarios volátiles que inhiben fitopatógenos como *Fusarium graminearum*, *F. equiseti*, *Alternaria alternata*, *Botrytis cinérea*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* y *Colletotrichum graminícola*.

Mientras que el género *Proteus* no ha sido muy estudiado con respecto a su capacidad antifúngica o de agente de control biológico en general ya que es más conocido como patógeno de humanos. Kerr, 1999 reportó actividad antagónica de *Proteus vulgaris* contra *Fusarium oxysporum*, *Gelasinospora cereales* y *Penicillium viridicatum*, y de *Proteus mirabilis* contra *C. albicans*.

Lactococcus garvieae se conoce como patógeno de animales principalmente peces que también infecta a humanos (Malek *et al.*, 2019). No se le encontraron reportes de actividad antifúngica o microbiana.

El género *Mixta* renombrado recientemente *Pantoea* ha sido reportado por Jiang *al.*, 2019, más precisamente la especie *Pantoea dispersa* como potente inhibidor de *Ceratocytis fimbriata* el agente causal de la podredumbre negra de la patata dulce la enfermedad más destructiva de este cultivo.

Bacillus subtilis es uno de los agentes de control biológico más usado y estudiado por su amplio espectro de actividad contra fitopatógenos tanto fúngicos como bacterianos y su capacidad para producir muchos y diversos tipos de metabolitos secundarios (Munjal *et al.*, 2016; Sharma y Gupta, 2014; Xie *et al.*, 2020).

4.2.1 Identificación del aislamiento CKM127 como una especie nueva

Los resultados obtenidos con el gen 16S para el aislamiento CKM127 lo identificaron como perteneciente al género *Pseudomonas*. Sin embargo, fueron inconsistentes para una identificación a nivel especie. Análisis adicionales dieron como pariente más cercana *Pseudomonas muyukensis*, una especie recientemente descrita por Girard *et al.*, 2021, mostrando porcentajes de identidad de 98.22% con los genes *gyrB* y *rpoD*, y 98.75% con *rpoB*. Por otro lado, en el mismo estudio donde estudiaron 273 especies y reportaron 43 nuevas, ellos encontraron que el gen *rpoD* es el más preciso para la identificación de especies del género *Pseudomonas*. propusieron en su estudio un límite de similitud de 100 % para asignación de la especie usando *rpoD*. Considerando estos parámetros CKM127 no se identificaría como *Pseudomonas muyukensis* por que solo se encontró 98% de similitud con su gen *rpoD*. El análisis del genoma completo en la plataforma MiGA lo clasificó como una especie nueva siendo su pariente más cercano en esta base de datos *Pseudomonas putida*. También se realizaron análisis de porcentaje de identidad y filogenético usando los genomas completos de los parientes encontrados anteriormente. La especie más cercana según este análisis fue *Pseudomonas muyukensis* con un 79% de similitud. Girard *et al.*, (2021) reportaron que, para la asignación de especies, se pueden considerar porcentajes de similitudes de entre 95-98% con *rpoD* si el ANI da un porcentaje mayor a 98% lo que no fue el caso para nuestro genoma de estudio. Con los resultados obtenidos, en conjunto, se concluye que en este estudio se aisló una nueva especie a la que denominamos *Pseudomonas calakmulensis* CKM127. Otros estudios con resultados similares a los encontrados en este estudio también clasificaron sus cepas de estudio como nueva especie dentro del género *Pseudomonas*, como es el caso de *Pseudomonas kirkieae* reportado por González *et al.*, 2020. Ellos encontraron porcentajes de

similitud de entre 93-95% con especies conocidas usando 16S, *rpoD* y *gyrB* y un 77.68% de ANI con sus parientes más cercanos. Otro caso similar es el de *Pseudomonas tructae* reportado por Oh *et al.*, 2019 con un ANI del 90% con su pariente más cercano *P. wadenswilerensis* CCOS 864. De acuerdo a Girard *et al.*, 2021, Drancourt y Raoult, 2005, Sant'anna *et al.*, 2020 el aislamiento CKM127 cumple los requisitos para ser identificado basado en sus secuencias como una nueva especie la que se le asignará el nombre de *Pseudomonas calakmulensis*.

4.3 Anotación funcional de los genomas

4.3.1 Anotación funcional del genoma del aislamiento CKM138 (*Bacillus subtilis*)

El aislamiento CKM138 se identificó como *Bacillus subtilis*. Las características de su genoma coincidieron con el reporte de ensamblaje y anotación de 511 genomas de la base de datos de la NCBI con una longitud del genoma de 4,123,424 pb, un porcentaje de GC del 43.5% y 4340 proteínas codificadas (NCBI, 2021). La predicción y anotación funcional de *clústeres* biosintéticos permite proponer que los siguientes *clústeres* biosintéticos son los posibles responsables de la actividad antagónica observada contra las cepas patogénicas de *C. gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum* y *Alternaria alternata*:

1- **Cluster con 38% de similitud con el BGC de la plipastatina (fengicina)**

También conocidas como plipastatinas, los fengicinas muestran fuerte eficacia antifúngica, particularmente contra hongos filamentosos (Yu *et al.*, 2012). Las plipastatina aisladas de la cepa pB2-L modificada mostraron una fuerte actividad antifúngica (MIC $16 \mu\text{g ml}^{-1}$) al alterar las paredes celulares, las membranas y el citoesqueleto de las hifas de *Fusarium oxysporum* (Fuentes *et al.*, 2010; Gong *et al.*, 2015; Patel *et al.*, 2011). Algunos estudios sobre fengicina han demostrado una actividad dependiente de la concentración mientras que otros muestran una actividad de todo o nada (Gong *et al.*, 2015; Patel *et al.*, 2011). Restricciones evolutivas en el rediseño de la composición de la membrana microbiana de los fitopatógenos, combinada con el modo de acción tipo detergente propuesto de la

fengicina podría permitir retrasar o eliminar resistencia potencial en hongos patógenos (fuertes *et al.*, 2010).

2- Cluster biosintético de la bacilibactina 100%

Es un sideróforo que ha sido identificado y aislado en múltiples cepas de *Bacillus subtilis* que ha mostrado efectos antagónicos contra distintos hongos fitopatógenos como *Verticillium dahliae*, *Fusarium verticillioides* entre otros (Gaméz *et al.*, 2018; Chen *et al.*, 2021) y también ha sido relacionado con la formación de biopelículas en presencia de cloruro y citrato de hierro (Hayrapetyan *et al.*, 2015).

3- Cluster biosintético de la subtilosina A 100%

Es una bacteriocina aislada por primera vez en comidas orientales fermentadas y su estructura fue elucidada por Kawulka *et al.*, (2014). Son potentes antimicrobianos y son muy útiles en la industria de los alimentos conservados. El detallado mecanismo de acción de la mayoría de las bacteriocinas no se ha establecido. Sin embargo, en al menos en algunos casos se trata de la permeabilización de la membrana celular por inserción del péptido después de la interacción con un receptor en superficie celular (Nilsen, Nes y Holo, 2003). Los organismos productores son insensibles a sus propias bacteriocinas debido a la producción de proteínas inmunitarias que protegen contra la rotura de la membrana (Sahl y Bierbaum, 1998). Como las bacteriocinas son relativamente no tóxicas para las células eucariotas (Van Kraaij *et al.*, 1999), no solo son importante para la conservación de los alimentos, sino que también en salud animal y humanas.

4- Cluster biosintético de la bacilicina 100%

Uno de los metabolitos característicos de *B. subtilis* que ha mostrado múltiples beneficios para la agricultura es la bacilicina. Mejora la germinación y el crecimiento de las plantas actuando contra patógenos fúngicos y bacterianos de los géneros *Rhizoctonia*, *Pythium*, *Fusarium* y *Phytophthora* (Pedraza *et al.*, 2018; Filho *et al.*, al 2015; Özcengiz y Ögülür, 2015). Bacilicina controla especialmente las

enfermedades utilizando un modo de acción de múltiples sitios por lo que es perfecto para el manejo efectivo de la resistencia (Parker y Walsh, 2013).

5- Cluster con 43% de similitud con el BGC de la surfactina

La surfactina se identificó por primera vez como un inhibidor de la formación del coagulo de fibrina. Pero de igual forma exhibe funciones antimicrobianas, y antifúngicas (Ariza y Sánchez 2012; Sánchez *et al.*, 2011). Sin embargo, su uso como tensioactivo en distintas aplicaciones industriales que incluyen: detergencia, emulsificación, lubricación, capacidad de formación de espuma, capacidad de humectación, solubilización y dispersión de fases son de lejos más importantes que su uso agrícola (Barros *et al.*, 2007).

4.3.2 Anotación funcional del genoma del aislamiento CKM127 (*Pseudomonas calakmulensis*)

El aislamiento CKM127, identificado como una nueva especie a la que se le asignó el nombre *Pseudomonas calakmulensis*, cuyo pariente más cercano es la especie *P. muyukensis* de la que se cuenta con un solo genoma en la base de datos de la NCBI, recientemente reportado por (Girard *et al.*, 2021). La comparación entre ambas especies muestra que las características de sus genomas resultan ser bastante similares con un tamaño del genoma de 5.48 Mb para CKM127 y de 5.52 Mb para *P. muyukensis*, 64.3 % de GC y 65.1%; 4985 proteínas codificadas contra 4770.

Al igual que en el caso de CKM138, la anotación funcional de *clústeres* biosintéticos condujo a la predicción de los *clústeres* de genes biosintéticos de metabolitos posiblemente responsables de la actividad antagónica observada con las cepas patogénicas de *C. gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum* y *Alternaria alternata*:

1- Cluster con 4% de similitud con el BGC de la borrelidina

En el presente estudio se identificó un *cluster* con 4% de similitud con los *clústeres* biosintéticos de la borrelidina, la cuál es un macrólido de 18 miembros

producido por varias especies de *Streptomyces*, Fue descubierta por su actividad antibiótica que implica la inhibición selectiva de la treonil-tRNA sintetasa y su estructura se elucidó en 1967 por análisis de resonancia magnética nuclear y confirmada por cristalografía de rayos x (Keller-Schierlein, 1967).

Se le conoce actividad antibiótica contra el género *Treponema* y la cepa *Plasmodium falciparum* (contra malaria), no se le conoce actividad antifúngica (Ishiyama, 2011). También se ha considerado como potencial anticancerígeno por su actividad inhibitoria a la angiogénesis (formación de tubos capilar) (Wakabayashi *et al.*, 1997). La estructura de borrelidina contiene varias características intrigantes que ha captado la atención por años, que incluyen un residuo de nitrilo en C-12 y un residuo de ácido ciclopentano-carboxílico disustituido trans -1, 2 en C-17, poco común en los productos naturales, por lo que es un compuesto de gran interés para la generación de nuevos derivados por biosíntesis combinatoria dirigida a mejorar sus propiedades (Keller-Schierlein, 1967; Olano, Méndez y Salas, 2011; Schulze *et al.*, 2014).

2- Clusters con 55 y 33% de similitud con la BGC de la sesilina

La sesilina pertenece al grupo de los lipopeptidos cíclicos producidos por sintetetasas de péptidos no ribosomales en bacterias, mayoritariamente *Bacillus pseudomonas*, *Streptomyces*, *Serratia* y *Burkholderia* (Raaijmakers *et al.*, 2006; D'aes *et al.*, 2010). Son metabolitos secundarios con amplias funciones biológicas. El interés hacía los CPL está dirigida hacia 2 aplicaciones principales, nuevos productos contra patógenos multirresistentes a antibióticos y como agente de control biológico y de bioestimulación en plantas para la agricultura (D'aes *et al.*, 2014).

La sesilina está reportada como inhibidor del movimiento en colonia en *Pseudomona putida* manteniendo así el equilibrio entre motilidad y la formación de biopelículas volviéndose importante para la colonización radical de las plantas (D'aes *et al.*, 2014). La sesilina sola tiene poco o ningún efecto inhibitorio contra *Rhizoctonia solani* mientras que, en coproducción con orfamida A, sí impiden

el crecimiento micelial (D'aes *et al.*, 2011). Se informó que las especies de *Pseudomonas* que producen sesilina- (T) y otros metabolitos como viscosina y poaeamida- (O), inhiben el crecimiento micelial de *Pythium ultimum* y *Phytophthora infestans in vitro* (Crouzet *et al.*, 2020).

3- Cluster con 62% de similitud con la BGC de la putisolvina

Pertenece de igual manera al grupo de los lipopéptidos cíclicos que fueron aislados de una cepa de *Pseudomona putida* aislada de suelos altamente contaminados por hidrocarburos poli aromáticos (Kuiper *et al.*, 2001). Esta cepa produce dos compuestos tensioactivos, putisolvin I y putisolvin II, con una estructura novedosa que consiste en un péptido de 12 aminoácidos unido a una cadena lipídica hexanoica y que contiene un enlace éster entre el noveno residuo de serina y el C-terminal. grupo carboxilo (Kuiper *et al.*, 2004). Se demostró que las putisolvinas I y II reducen la tensión superficial del medio, estimulan la motilidad e inhiben la formación de biopelículas también degradan las biopelículas existentes por lo que se cree que podría tener actividad antimicrobiana (Raaijmakers *et al.*, 2010).

4- Cluster con 62% de similitud con la BGC de la fragina

Aislado por primera vez en una cepa de *Pseudomonas fragi*. La fragina pertenece al grupo de diazeniumdiolatos una clase de compuestos naturales que han mostrado potencial antifúngica, antimicrobiana, antiviral y antitumoral. La Fragina ha mostrado actividad inhibitoria contra, *Fusarium solani*, *Aspergillus niger* y *E. coli* (Jenul *et al* 2018; Sieber *et al.*, 2020). La actividad biológica del fragina está muy ligada a su estructura, se realizó un estudio SAR (relación estructura-actividad) en relación con su actividad antibacteriana y antifúngica y se descubrió que el más mínimo cambio estructural reduce ampliamente su actividad antifúngica, pero no su actividad microbiana (Sieber *et al.*, 2020).

5- Cluster con 13% de similitud con la BGC de la lankacidina C

Lankacidina C es el padre de un grupo de antibióticos que son producidos por la bacteria *Streptomyces rochei* que habita en el suelo. Este grupo de

antibióticos fue aislado por primera vez en 1969 por Harada y colaboradores, y la caracterización completa del grupo se logró unos años más tarde (Ootsu y Matsumoto, 1973).

Lankacidina C, posee la estructura de un policétido macrocíclico de 17 miembros y se encontró que tiene una fuerte actividad antimicrobiana contra varias bacterias Gram positivas, algunas de las cuales son resistentes a los antibióticos macrólidos (Arakawa *et al.*, 2005). Se descubrió que la actividad antimicrobiana de la lankacidina C se debe a la interferencia con la formación de enlaces peptídicos durante la síntesis de proteínas bacterianas mediante la unión al centro de la peptidil transferasa de la subunidad ribosomal grande bacteriana (Yonath *et al.*, 2012). Lankacidina C y varios derivados también mostraron una considerable actividad antitumoral in vivo contra varios modelos tumorales como el linfosarcoma 6C3 HED / OG, la leucemia L1210 y el melanoma B16, además de las líneas celulares de cáncer de mama T47D (Ootsu y Matsumoto, 1973).

6- Clusters con 9 y 14% de similitud con la BGC de la pyoverdina

La pyoverdina es un sideróforo de color verde amarillento fluorescente producido por muchas especies de *Pseudomonas* al punto de considerarse un marcador metabólico para estas especies, se produce en condiciones de baja concentración de hierro y es muy importante para la patogenicidad de esas bacterias (Stintzi *et al.*, 1996). Las pyoverdina tienen un papel doble durante la infección. Son utilizados como sideróforos por *P. aeruginosa* para eliminar el hierro de las proteínas del huésped y también actúa como una molécula de señalización para la producción de dos factores de virulencia principales, la exotoxina A y la endoproteinasa PrpL (Bonneau, Roche y Schalk, 2020).

Las pyoverdinas también se han investigado como moléculas de "caballo de Troya" para la administración de antimicrobianos a cepas bacterianas que de otro modo serían resistentes, como quelantes que pueden utilizarse para la biorremediación de metales pesados y como indicadores fluorescentes utilizados

para analizar la presencia de hierro y potencialmente otros metales (Yoder y Kisaalita, 2011).

4.3.3 Análisis comparativo en BiGSCAPE

El análisis en BiGSCAPE permitió identificar cuatro *clústeres* de genes en el aislamiento CKM138 (*B. subtilis*) y uno en el CKM127 (*Pseudomonas spp.*) que no fueron representados en ninguno de los otros genomas con los que se compararon. En relación con la actividad antimicrobiana mostrada por ambas cepas, en el BGC de CKM127 y uno de los *clústeres* de CKM138 se identificó un dominio de la familia de las isochorismatasas que se han reportado como enzimas de importancia crucial para la actividad de los sideróforos (Goral *et al.*, 2012), moléculas importantes en la actividad antagónica de muchas bacterias.

Otro dominio interesante identificado en el aislamiento CKM127 fue el dominio de subtilasa familias de enzimas involucradas en importantes funciones celulares como la producción de pyoverdinas, formación de biopelículas entre otros en cepas de *Pseudomonas* (Pelzer *et al.*, 2014).

A diferencia de AntiSMASH que predice *clústeres* biosintéticos expresados en porcentaje de similitudes con secuencias ya conocidas, y mientras más bajo el porcentaje más alta la probabilidad de que el *cluster* sea nuevo de modo que los *clústeres* reportados sin coincidencias son altamente probables de que sean nuevos. Por su parte BiGSCAPE muestra la diversidad de estos *clústeres* biosintéticos separando los alejados filogenéticamente con los ya reportados en la base de datos en singletons que son altamente probables de ser *clústeres* nuevos. Lo que tienen en común los 2 programas es que dividen el genoma en regiones según las lecturas y comparando se puede deducir si los singletons de BiGSCAPE coinciden en las mismas regiones con *clústeres* no reconocidos por antiSMASH o de bajo porcentaje de identidad con *clústeres* de la base de datos. En base a lo anterior las regiones de los genomas del *B. subtilis* y *Pseudomonas calakmulensis* identificados con altas probabilidades de ser *clústeres* nuevos se muestran en el cuadro 18.

Cuadro 22. Regiones de los genomas secuenciados con altas probabilidades de ser clústeres biosintéticos nuevos

<i>B. subtilis</i>			<i>P. calakmulensis</i>		
Regiones del genoma	AntiSMASH	BiGSCAPE	Regiones del genoma	AntiSMASH	BiGSCAPE
Región 4	BGC no identificado	FAM191	Región 7	BGC no identificado	FAM166
Región 7	Fengicina80 %	FAM185 (NPRS)			
Región11	Surfactina 43%	FAM185 (otros)			
Región 13	Plipastatina 38%	FAM189			

5 CONCLUSIONES

A partir de los resultados de esta tesis se puede concluir que:

1. El microbiota nativo edáfica de Calakmul, sí contiene taxas de bacterias no explorados, con *clústeres* de genes biosintéticos que codifican productos naturales novedosos útiles para combatir fitopatógenos de cultivos tropicales. La búsqueda dirigida por función por medio de la realización de bioensayos previo a la minería genómica, permite enfocar el proceso de búsqueda de productos naturales hacía objetivos de interés predefinidos, no obstante, su éxito depende de la selección de sistemas ecológicos relevantes, donde se puede hipotetizar que las bacterias producen metabolitos con importantes funciones ecológicas especialmente de defensa y sobrevivencia.
2. El uso del gen 16S para la identificación de bacterias hasta nivel especie no siempre es precisa ya que nos permitió identificar todas las cepas. Una identificación acertada a base de secuencias requiere complementar el 16S con otros genes conservados *rpoD*, *rpoB* y *gyrB* que fue lo permitió confirmar la identidad del aislamiento CKM138 como *B. subtilis* y dio las primeras evidencias de que el aislamiento CKM127 es una especie nueva. Para la definición de una nueva especie contar con el genoma completo para poder hacer diferentes tipos de análisis tales como filogenéticos y de porcentaje de identidad nucleotídicos ANI lo que fue trascendental proponer como nueva a *la Pseudomonas calakmulensis*.
3. El éxito de un estudio de minería genómica depende en un alto porcentaje a la calidad de secuencias genómicas que se obtienen por esta razón es imprescindible utilizar prácticas y métodos que aseguren la más alta calidad de las secuencias que a procesar desde el proceso microbiológico hasta el ensamblaje de los genomas.
4. La minería genómica es más eficiente cuando se usan herramientas bioinformáticas con distintos algoritmos para tener disponibles distintos acercamientos al momento de analizar los *clústeres* biosintéticos. En el presente trabajo un acercamiento de mining comparativo en AntiSMASH ayudó a predecir

los *clústeres* de genes biosintéticos posiblemente involucrados en las actividades de antagonismo observados en los 2 aislamientos estudiados de Calakmul y un acercamiento filogenético con BiGSCAPE/CORASON permitió identificar los singletones y combinando los dos acercamientos se predijo en que regiones del genoma en más probable encontrar *clústeres* biosintéticos novedosos. Los metabolismos estudiados tanto de *B. subtilis* como de *P. calakmulensis* se revelaron novedosos. Primero en el *Bacillus subtilis* se predijeron seis *clústeres* de metabolitos secundarios con menos del 60% de identidad con algún *cluster* conocido de los cuales 4 son singletones de acuerdo a BiGSCAPE. Y *Pseudomonas calakmulensis* siendo una especie nuevamente identificada cuyos *clústeres* de genes biosintéticos no superan 62% de similitud con *clústeres* conocidos y con 6 *clústeres* de genes biosintéticos con menos de 20% de similitud con BGC reportados las perspectivas son prometedoras para la realización de estudios adicionales para confirmar y elucidar los productos naturales producidos por estas bacterias.

6 PERSPECTIVAS

La información generada a través de la presente tesis abre la puerta a que se realicen estudios de genómica funcional, metabolómica, biología sintética, filogenética y más, con distintos enfoques para generar más información con el fin de explorar toda la riqueza que la biosfera de Calakmul tiene para ofrecer hasta llegar a la creación de valor económico que es la definición misma y la misión principal de la bioprospección.

7 BIBLIOGRAFÍA

- Andryukov, B., Mikhailov, V., & Besednova, N. (2019). The Biotechnological Potential of Secondary Metabolites from Marine Bacteria. *Journal of Marine Science and Engineering* 2019, Vol. 7, Page 176, 7(6), 176.
<https://doi.org/10.3390/JMSE7060176>
- Aziz, R. K., Bartels, D., Best, A. A., DeJongh, M., Disz, T., Edwards, R. A., Formsma, K., Gerdes, S., Glass, E. M., Kubal, M., Meyer, F., Olsen, G. J., Olson, R., Osterman, A. L., Overbeek, R. A., McNeil, L. K., Paarmann, D., Paczian, T., Parrello, B., ... Zagnitko, O. (2008). The RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology. *BMC Genomics* 2008 9:1, 9(1), 1–15.
<https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-75>
- Bachmann, B. O., Lanen, S. G. Van, & Baltz, R. H. (2014). Microbial genome mining for accelerated natural products discovery: is a renaissance in the making? *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 41(2), 175.
<https://doi.org/10.1007/S10295-013-1389-9>
- Barco, R. A., Garrity, G. M., Scott, J. J., Amend, J. P., Neelson, K. H., & Emerson, D. (2020). A Genus Definition for Bacteria and Archaea Based on a Standard Genome Relatedness Index. *MBio*, 11(1).
<https://doi.org/10.1128/MBIO.02475-19>
- Barros, F. F. C., De Quadros, C. P., Maróstica, M. R., & Pastore, G. M. (2007). Surfactina: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. *Química Nova*, 30(2), 409–414.
<https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000200031>
- Beauregard, P. B., Chai, Y., Vlamakis, H., Losick, R., & Kolter, R. (2013). *Bacillus subtilis* biofilm induction by plant polysaccharides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(17), E1621.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1218984110>

- Benjdia, A., Balty, C., & Berteau, O. (2017). Radical SAM enzymes in the biosynthesis of ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides (RiPPs). *Frontiers in Chemistry*, 5(NOV), 87. <https://doi.org/10.3389/FCHEM.2017.00087/BIBTEX>
- Bentley, S. D., Chater, K. F., Cerdeño-Tárraga, A.-M., Challis, G. L., Thomson, N. R., James, K. D., Harris, D. E., Quail, M. A., Kieser, H., Harper, D., Bateman, A., Brown, S., Chandra, G., Chen, C. W., Collins, M., Cronin, A., Fraser, A., Goble, A., Hidalgo, J., ... Hopwood, D. A. (2002). Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* 2002 417:6885, 417(6885), 141–147. <https://doi.org/10.1038/417141a>
- Blin, K., Shaw, S., Kloosterman, A. M., Charlop-Powers, Z., van Wezel, G. P., Medema, M. H., & Weber, T. (2021). antiSMASH 6.0: improving cluster detection and comparison capabilities. *Nucleic Acids Research*, 49(W1), W29–W35. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAB335>
- Bonneau, A., Roche, B., & Schalk, I. J. (2020). Iron acquisition in *Pseudomonas aeruginosa* by the siderophore pyoverdine: an intricate interacting network including periplasmic and membrane proteins. *Scientific Reports* 2020 10:1, 10(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56913-x>
- Bueno-Gonzalez, V., Brady, C., Denman, S., Allainguillaume, J., & Arnold, D. (2020). *Pseudomonas kirkliae* sp. Nov., a novel species isolated from oak in the united kingdom, and phylogenetic considerations of the genera *pseudomonas*, *azotobacter* and *azomonas*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(4), 2426–2434. <https://doi.org/10.1099/IJSEM.0.004055/CITE/REFWORKS>
- Bull, C. T., Duffy, B., Voisard, C., Défago, G., Keel, C., & Haas, D. (2001). Characterization of spontaneous *gacS* and *gacA* regulatory mutants of *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strain CHA0. *Antonie van Leeuwenhoek* 2001 79:3, 79(3), 327–336. <https://doi.org/10.1023/A:1012061014717>

- Burley, J. ;(FAO. (2002). Panorámica de la diversidad biológica forestal. *Revista Internacional de Silvicultura e Industrias Forestales(UNASYLVA)*, 53.
<http://www.fao.org/3/y3582s/y3582s00.htm#TopOfPage>
- Calvo, H., Mendiara, I., Arias, E., Gracia, A. P., Blanco, D., & Venturini, M. E. (2020). Antifungal activity of the volatile organic compounds produced by *Bacillus velezensis* strains against postharvest fungal pathogens. *Postharvest Biology and Technology*, 166, 111208.
<https://doi.org/10.1016/J.POSTHARVBIO.2020.111208>
- Caneschi, W. L., Felestrino, É. B., Fonseca, N. P., Villa, M. M., Lemes, C. G. d. C., Cordeiro, I. F., Assis, R. de A. B., Sanchez, A. B., Vieira, I. T., Kamino, L. H. Y., do Carmo, F. F., Garcia, C. C. M., & Moreira, L. M. (2018). Brazilian Ironstone Plant Communities as Reservoirs of Culturable Bacteria With Diverse Biotechnological Potential. *Frontiers in Microbiology*, 9(JUL).
<https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.01638>
- Castillo, A. M., Martínez, A., Lara, J., Colegio, R., Campeche, C., & Haltunchén-edzná, C. (2012). *Rizobacterias Aisladas del Trópico Húmedo con Actividad Antagónica sobre Colletotrichum gloeosporioides , Evaluación Cuantitativa e Identificación Molecular Quantitative Evaluation and Molecular Identification of Rhizobateria from Tropical Region , Antago.*
- Chehri, K. (2017). FusariumSpecies in Agriculture Industry and Control of Them. *Agricultural Research & Technology: Open Access Journal*, 6(2), 10–12.
<https://doi.org/10.19080/artoaj.2017.06.555681>
- Chiang, Y. M., Szewczyk, E., Davidson, A. D., Keller, N., Oakley, B. R., & Wang, C. C. C. (2009). A gene cluster containing two fungal polyketide synthases encodes the biosynthetic pathway for a polyketide, asperfuranone, in *Aspergillus nidulans*. *Journal of the American Chemical Society*, 131(8), 2965–2970. <https://doi.org/10.1021/JA8088185>

- Christianson, D. W. (2008). Unearthing the roots of the terpenome. *Current Opinion in Chemical Biology*, 12(2), 141–150.
<https://doi.org/10.1016/J.CBPA.2007.12.008>
- Cibichakravarthy, B., & Jose, P. A. (2021). Biosynthetic Potential of Streptomyces Rationalizes Genome-Based Bioprospecting. *Antibiotics 2021*, Vol. 10, Page 873, 10(7), 873. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS10070873>
- Colla, G., Balestrini, R., Smith, D. L., Backer, R., Rokem, J. S., Ilangumaran, G., Lamont, J., Praslickova, D., Ricci, E., & Subramanian, S. (2018). *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria: Context, Mechanisms of Action, and Roadmap to Commercialization of Biostimulants for Sustainable Agriculture*.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01473>
- Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clément, C., & Barka, E. A. (2005). Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(9), 4951–4959. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.9.4951>
- CONANP, C. nacional de areas naturales Protegidas. (2010). *Reserva de la biosfera de Calakmul*.
- Crouzet, J., Arguelles-Arias, A., Dhondt-Cordelier, S., Cordelier, S., Pršić, J., Hoff, G., Mazeyrat-Gourbeyre, F., Baillieul, F., Clément, C., Ongena, M., & Dorey, S. (2020). Biosurfactants in Plant Protection Against Diseases: Rhamnolipids and Lipopeptides Case Study. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8.
<https://doi.org/10.3389/FBIOE.2020.01014>
- D'aes, J., Kieu, N. P., Léclère, V., Tokarski, C., Olorunleke, F. E., De Maeyer, K., Jacques, P., Höfte, M., & Ongena, M. (2014). To settle or to move? The interplay between two classes of cyclic lipopeptides in the biocontrol strain *Pseudomonas* CMR12a. *Environmental Microbiology*, 16(7), 2282–2300.
<https://doi.org/10.1111/1462-2920.12462>

- Dadgostar, P. (2019). Antimicrobial Resistance: Implications and Costs. *Infection and Drug Resistance*, 12, 3903. <https://doi.org/10.2147/IDR.S234610>
- Dekkers, L. C., Phoelich, C. C., van der Fits, L., & Lugtenberg, B. J. J. (1998). A site-specific recombinase is required for competitive root colonization by *Pseudomonas fluorescens* WCS365. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(12), 7051–7056. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.12.7051>
- Díaz, L., Del Río, J. A., & Ortuño, A. (2018). Mechanism of the *alternaria alternata* pathogenicity in 'fortune' mandarin. *Horticulturae*, 4(4). <https://doi.org/10.3390/horticulturae4040054>
- Dobrindt, U., & Hacker, J. (2001). Whole genome plasticity in pathogenic bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, 4(5), 550–557. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(00\)00250-2](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(00)00250-2)
- Doornbos, R. F., Geraats, B. P. J., Kuramae, E. E., Van Loon, L. C., & Bakker, P. A. H. M. (2011). Effects of Jasmonic Acid, Ethylene, and Salicylic Acid Signaling on the Rhizosphere Bacterial Community of *Arabidopsis thaliana*. *MPMI*, 24(4), 395–407. <https://doi.org/10.1094/MPMI>
- Dutta, S., Yu, S. M., Jeong, S. C., & Lee, Y. H. (2020). High-throughput analysis of genes involved in biocontrol performance of *Pseudomonas fluorescens* NBC275 against Gray mold. *Journal of Applied Microbiology*, 128(1), 265–279. <https://doi.org/10.1111/JAM.14475>
- Eren, A. M., Esen, O. C., Quince, C., Vineis, J. H., Morrison, H. G., Sogin, M. L., & Delmont, T. O. (2015). Anvi'o: An advanced analysis and visualization platform for 'omics data. *PeerJ*, 2015(10), e1319. <https://doi.org/10.7717/PEERJ.1319/SUPP-5>
- FAO. (n.d.). *Suelos Ácidos | Portal de Suelos de la FAO | Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura*. Retrieved September 9, 2020, from <http://www.fao.org/soils-portal/soil-management/manejo-de-suelos-problematicos/suelos-acidos/es/>

- Fuertes, G., García-Sáez, A. J., Esteban-Martín, S., Giménez, D., Sánchez-Muñoz, O. L., Schwille, P., & Salgado, J. (2010). Pores Formed by Bax α 5 Relax to a Smaller Size and Keep at Equilibrium. *Biophysical Journal*, 99(9), 2917–2925. <https://doi.org/10.1016/J.BPJ.2010.08.068>
- Fukuda, T. T. H., Cassilly, C. D., Gerdt, J. P., Henke, M. T., Helfrich, E. J. N., & Mevers, E. (2020). Research Tales from the Clardy Laboratory: Function-Driven Natural Product Discovery. *Journal of Natural Products*, 83(3), 744–755. <https://doi.org/10.1021/ACS.JNATPROD.9B01086>
- Gao, Z., Zhang, B., Liu, H., Han, J., Control, Y. Z.-B., & 2017, undefined. (n.d.). Identification of endophytic *Bacillus velezensis* ZSY-1 strain and antifungal activity of its volatile compounds against *Alternaria solani* and *Botrytis cinerea*. *Elsevier*. Retrieved January 15, 2022, from https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1049964416302249?casa_token=QAJV8mFZhA0AAAAA:xgl0oyHPkFgfeTtnoeEkFph5viDn61AMeZGCa9IoPYownB3yO9BG1aB_jcc4I3hQJ21nPPufNO0
- Gerke, V., & Moss, S. E. (2002). Annexins: From structure to function. *Physiological Reviews*, 82(2), 331–371. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00030.2001/ASSET/IMAGES/LARGE/9J0220191106.JPEG>
- Girard, L., Lood, C., Höfte, M., Vandamme, P., Rokni-Zadeh, H., van Noort, V., Lavigne, R., & De Mot, R. (2021). The Ever-Expanding *Pseudomonas* Genus: Description of 43 New Species and Partition of the *Pseudomonas putida* Group. *Microorganisms*, 9(8). <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS9081766>
- Gong, A. D., Li, H. P., Yuan, Q. S., Song, X. S., Yao, W., He, W. J., Zhang, J. B., & Liao, Y. C. (2015). Antagonistic Mechanism of Iturin A and Plipastatin A from *Bacillus amyloliquefaciens* S76-3 from Wheat Spikes against *Fusarium graminearum*. *PLoS ONE*, 10(2). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0116871>

- Goral, A. M., Tkaczuk, K. L., Chruszcz, M., Kagan, O., Savchenko, A., & Minor, W. (2012). Crystal structure of a putative isochorismatase hydrolase from *Oleispira antarctica*. *Journal of Structural and Functional Genomics*, 13(1), 27–36.
<https://doi.org/10.1007/S10969-012-9127-5>
- Gordon, T. R. (2017). *Fusarium oxysporum* and the Fusarium Wilt Syndrome. *Annual Review of Phytopathology*, 55, 23–39.
<https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080615-095919>
- Goto, Y., Li, B., Claesen, J., Shi, Y., Bibb, M. J., & van der Donk, W. A. (2010). Discovery of unique lanthionine synthetases reveals new mechanistic and evolutionary insights. *PLoS Biology*, 8(3).
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PBIO.1000339>
- Gotor-Vila, A., Teixidó, N., Di Francesco, A., Usall, J., Ugolini, L., Torres, R., & Mari, M. (2017). Antifungal effect of volatile organic compounds produced by *Bacillus amyloliquefaciens* CPA-8 against fruit pathogen decays of cherry. *Food Microbiology*, 64, 219–225. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2017.01.006>
- Govin Sanjudo, Alexander; Leal Sanabria, Güendis y López Hernández, D. (2019). Actividad antagónica de bacterias endófitas de *Leucocroton havanensis* Borhidi frente a hongos fitopatógenos. *Revista de Protección Vegetal*, 34.
http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1010-27522019000200006
- Gross, H., Stockwell, V. O., Henkels, M. D., Nowak-Thompson, B., Loper, J. E., & Gerwick, W. H. (2007). The Genom isotopic Approach: A Systematic Method to Isolate Products of Orphan Biosynthetic Gene Clusters. *Chemistry & Biology*, 14(1), 53–63. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMBIOL.2006.11.007>
- Guttman, D. S., McHardy, A. C., & Schulze-Lefert, P. (2014). Microbial genome-enabled insights into plant-microorganism interactions. *Nature Reviews Genetics*, 15(12), 797–813. <https://doi.org/10.1038/nrg3748>

- Helfrich, E. J. N., Lin, G. M., Voigt, C. A., & Clardy, J. (2019). Bacterial terpene biosynthesis: challenges and opportunities for pathway engineering. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, *15*, 2889. <https://doi.org/10.3762/BJOC.15.283>
- Hofmann, M., Heine, T., Schulz, V., Hofmann, S., & Tischler, D. (2020). Draft genomes and initial characterization of siderophore producing pseudomonads isolated from mine dump and mine drainage. *Biotechnology Reports*, *25*, e00403. <https://doi.org/10.1016/J.BTRE.2019.E00403>
- INE. (1999). *Programa de manejo de la reserva de la biosfera de Calakmul*. <http://www.paot.mx/centro/ine-semarnat/anp/AN08.pdf>
- Janda, J. M., & Abbott, S. L. (2007). 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology*, *45*(9), 2761–2764. <https://doi.org/10.1128/JCM.01228-07>
- Johnson, J. S., Spakowicz, D. J., Hong, B. Y., Petersen, L. M., Demkowicz, P., Chen, L., Leopold, S. R., Hanson, B. M., Agresta, H. O., Gerstein, M., Sodergren, E., & Weinstock, G. M. (2019). Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. *Nature Communications* 2019 *10*:1, *10*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13036-1>
- Keller-Schierlein, W. (1967). [Metabolic products of microorganisms. Concerning the constitution of borrelidin]. *Helvetica Chimica Acta*, *50*(3), 731–753. <https://doi.org/10.1002/HLCA.19670500303>
- Kersten, R. D., Yang, Y.-L., Xu, Y., Cimermancic, P., Nam, S.-J., Fenical, W., Fischbach, M. A., Moore, B. S., & Dorrestein, P. C. (2011). A mass spectrometry-guided genome mining approach for natural product peptidogenomics. *Nature Chemical Biology*, *7*(11), 794. <https://doi.org/10.1038/NCHEMBIO.684>

- Kim, M., Oh, H. S., Park, S. C., & Chun, J. (2014). Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(Pt 2), 346–351.
<https://doi.org/10.1099/IJS.0.059774-0>
- Kloepper, J. W., Leong, J., Teintze, M., & Schroth, M. N. (1980). Pseudomonas siderophores: A mechanism explaining disease-suppressive soils. *Current Microbiology*, 4(5), 317–320. <https://doi.org/10.1007/BF02602840>
- Knappe, T. A., Linne, U., Zirah, S., Rebuffat, S., Xie, X., & Marahiel, M. A. (2008). Isolation and structural characterization of capistruin, a lasso peptide predicted from the genome sequence of Burkholderia thailandensis E264. *Journal of the American Chemical Society*, 130(34), 11446–11454.
<https://doi.org/10.1021/JA802966G>
- Köhl, J., Kolnaar, R., & Ravensberg, W. J. (2019). Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: Relevance beyond efficacy. *Frontiers in Plant Science*, 10(July), 1–19.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00845>
- Lautru, S., Deeth, R. J., Bailey, L. M., & Challis, G. L. (2005). Discovery of a new peptide natural product by Streptomyces coelicolor genome mining. *Nature Chemical Biology*, 1(5), 265–269. <https://doi.org/10.1038/NCHEMBIO731>
- Lee, N., Hwang, S., Kim, J., Cho, S., Palsson, B., & Cho, B.-K. (2020). Mini review: Genome mining approaches for the identification of secondary metabolite biosynthetic gene clusters in Streptomyces. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 18, 1548. <https://doi.org/10.1016/J.CSBJ.2020.06.024>
- Liu, D., Yan, R., Fu, Y., Wang, X., Zhang, J., & Xiang, W. (2019). Antifungal, Plant Growth-Promoting, and Genomic Properties of an Endophytic Actinobacterium Streptomyces sp. NEAU-S7GS2. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2077.
<https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.02077/BIBTEX>

- Liu, W.-T., Lamsa, A., Wong, W. R., Boudreau, P. D., Kersten, R., Peng, Y., Moree, W. J., Duggan, B. M., Moore, B. S., Gerwick, W. H., Linington, R. G., Pogliano, K., & Dorrestein, P. C. (2014). MS/MS-based networking and peptidogenomics guided genome mining revealed the stenothricin gene cluster in *Streptomyces roseosporus*. *The Journal of Antibiotics*, *67*(1), 99.
<https://doi.org/10.1038/JA.2013.99>
- Long, S. R. (2001). Genes and signals in the rhizobium-legumes symbiosis. *Plant Physiology*, *125*(1), 69–72. <https://doi.org/10.1104/pp.125.1.69>
- Malek, A., De La Hoz, A., Gomez-Villegas, S. I., Nowbakht, C., & Arias, C. A. (2019). *Lactococcus garvieae*, an unusual pathogen in infective endocarditis: Case report and review of the literature. *BMC Infectious Diseases*, *19*(1), 1–10.
<https://doi.org/10.1186/S12879-019-3912-8/TABLES/1>
- Marahiel, M. A. (2009). Working outside the protein-synthesis rules: insights into non-ribosomal peptide synthesis. *Journal of Peptide Science*, *15*(12), 799–807.
<https://doi.org/10.1002/PSC.1183>
- Martínez-Granero, F., Capdevila, S., Sánchez-Contreras, M., Martín, M., & Rivilla, R. (2005). Two site-specific recombinases are implicated in phenotypic variation and competitive rhizosphere colonization in *Pseudomonas fluorescens*. *Microbiology*, *151*(3), 975–983.
<https://doi.org/10.1099/MIC.0.27583-0/CITE/REFWORKS>
- Martínez-Núñez, M. A., & López, V. E. L. y. (2016). Nonribosomal peptides synthetases and their applications in industry. *Sustainable Chemical Processes* *2016 4:1*, *4*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/S40508-016-0057-6>
- Martínez, E., & Galindo-Leal, C. (2017). La vegetación de Calakmul, Campeche, México: clasificación, descripción y distribución. *Botanical Sciences*, *71*, 7.
<https://doi.org/10.17129/botsci.1660>

- Matsuda, Y., Mitsuhashi, T., Quan, Z., & Abe, I. (2015). Molecular Basis for Stellatic Acid Biosynthesis: A Genome Mining Approach for Discovery of Sesterterpene Synthases. *Organic Letters*, 17(18), 4644–4647.
https://doi.org/10.1021/ACS.ORGLETT.5B02404/SUPPL_FILE/OL5B02404_SI_001.PDF
- McIntosh, J. A., Donia, M. S., & Schmidt, E. W. (2009). Ribosomal peptide natural products: bridging the ribosomal and nonribosomal worlds. *Natural Product Reports*, 26(4), 537–559. <https://doi.org/10.1039/B714132G>
- Medema, M. H., Blin, K., Cimermancic, P., Jager, V. de, Zakrzewski, P., Fischbach, M. A., Weber, T., Takano, E., & Breitling, R. (2011). antiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. *Nucleic Acids Research*, 39(Web Server issue), W339. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKR466>
- Meguro, A., Tomita, T., Nishiyama, M., & Kuzuyama, T. (2013). Identification and characterization of bacterial diterpene cyclases that synthesize the cembrane skeleton. *Chembiochem : A European Journal of Chemical Biology*, 14(3), 316–321. <https://doi.org/10.1002/CBIC.201200651>
- Melgarejo, L. M., Sánchez, J., Chaparro, A., Newmark, F., Santos, M., Burbano, C., & Reyes, C. (2002). *Aproximación al estado actual de la bioprospección en Colombia*.
- Munjal, V., Nadakkakath, A. V., Sheoran, N., Kundu, A., Venugopal, V., Subaharan, K., Rajamma, S., Eapen, S. J., & Kumar, A. (2016). Genotyping and identification of broad spectrum antimicrobial volatiles in black pepper root endophytic biocontrol agent, *Bacillus megaterium* BP17. *Biological Control*, 92, 66–76. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCONTROL.2015.09.005>

- Navarro-Muñoz, J. C., Selem-Mojica, N., Mallowney, M. W., Kautsar, S. A., Tryon, J. H., Parkinson, E. I., De Los Santos, E. L. C., Yeong, M., Cruz-Morales, P., Abubucker, S., Roeters, A., Lokhorst, W., Fernandez-Guerra, A., Cappelini, L. T. D., Goering, A. W., Thomson, R. J., Metcalf, W. W., Kelleher, N. L., Barona-Gomez, F., & Medema, M. H. (2020). A computational framework to explore large-scale biosynthetic diversity. *Nature Chemical Biology*, *16*(1), 60–68. <https://doi.org/10.1038/S41589-019-0400-9>
- Neill, J. O. '. (2014). *Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations The Review on Antimicrobial Resistance Chaired. December.*
- Nilsen, T., Nes, I. F., & Holo, H. (2003). Enterolysin A, a Cell Wall-Degrading Bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG 2333. *Applied and Environmental Microbiology*, *69*(5), 2975. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.5.2975-2984.2003>
- O'Brien, P. A. (2017). Biological control of plant diseases. *Australasian Plant Pathology*, *46*(4), 293–304. <https://doi.org/10.1007/s13313-017-0481-4>
- Oh, W. T., Jun, J. W., Giri, S. S., Yun, S., Kim, H. J., Kim, S. G., Kim, S. W., Kang, J. W., Han, S. J., Kwon, J., Kim, J. H., Smits, T. H. M., & Park, S. C. (2019). *Pseudomonas tructae* sp. nov., novel species isolated from rainbow trout kidney. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *69*(12), 3851–3856. <https://doi.org/10.1099/IJSEM.0.003696>
- Olano, C., Méndez, C., & Salas, J. A. (2011). Molecular insights on the biosynthesis of antitumour compounds by actinomycetes. *Microbial Biotechnology*, *4*(2), 144. <https://doi.org/10.1111/J.1751-7915.2010.00231.X>
- Ootsu, K., & Matsumoto, T. (1973). Effects of lankacidin group (T2636) antibiotics on the tumor growth and immune response against sheep erythrocytes in mice. *Gann, The Japanese Journal of Cancer Research*, *64*(5), 481–492. https://doi.org/10.20772/cancersci1959.64.5_481
- Pal, K. K., & Gardener, B. M. (2006). Biological Control of Plant Pathogens. The Plant Health Instructor. *Biological Control*. <https://doi.org/10.1094/PHI-A-2006-1117-02>

- Patel, H., Tscheka, C., Edwards, K., Karlsson, G., & Heerklotz, H. (2011). All-or-none membrane permeabilization by fengycin-type lipopeptides from *Bacillus subtilis* QST713. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1808(8), 2000–2008. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMEM.2011.04.008>
- Pavón Moreno, M. Á., González Alonso, I., Martín de Santos, R., & García Lacarra, T. (2012). Importancia del género *Alternaria* como productor de micotoxinas y agente causal de enfermedades humanas. *Nutricion Hospitalaria*, 27(6), 1772–1781. <https://doi.org/10.3305/nh.2012.27.6.6017>
- Peker, N., Garcia-Croes, S., Dijkhuizen, B., Wiersma, H. H., Van Zanten, E., Wisselink, G., Friedrich, A. W., Kooistra-Smid, M., Sinha, B., Rossen, J. W. A., & Couto, N. (2019). A comparison of three different bioinformatics analyses of the 16S-23S rRNA encoding region for bacterial identification. *Frontiers in Microbiology*, 10(MAR), 620. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.00620/BIBTEX>
- Pelzer, A., Polen, T., Funken, H., Rosenau, F., Wilhelm, S., Bott, M., & Jaeger, K. E. (2014). Subtilase SprP exerts pleiotropic effects in *Pseudomonas aeruginosa*. *MicrobiologyOpen*, 3(1), 89. <https://doi.org/10.1002/MBO3.150>
- Pistorius, D., & Müller, R. (2012). Discovery of the rhizopodin biosynthetic gene cluster in *Stigmatella aurantiaca* Sg a15 by genome mining. *Chembiochem : A European Journal of Chemical Biology*, 13(3), 416–426. <https://doi.org/10.1002/CBIC.201100575>
- Pushpangadan, P., George, V., Parambil Ijnu, T., & Ambika Chithra, M. (2018). Biodiversity, Bioprospecting, Traditional Knowledge, Sustainable Development and Value Added Products: A Review. *Journal of Traditional Medicine & Clinical Naturopathy*, 07(01), 1–7. <https://doi.org/10.4172/2573-4555.1000256>
- Raaijmakers, J. M., de Bruijn, I., Nybroe, O., & Ongena, M. (2010). Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics. *FEMS Microbiology Reviews*, 34(6), 1037–1062. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6976.2010.00221.X>

- Ren, H., Shi, C., & Zhao, H. (2020). *Computational Tools for Discovering and Engineering Natural Product Biosynthetic Pathways*.
<https://doi.org/10.1016/j.isci>
- Reyna, H. R. (2019). Vista de Aguadas de Calakmul, santuarios de vida silvestre. *Eco Fronteras*, 23(2007–4549), 9–12.
<https://revistas.ecosur.mx/ecofronteras/index.php/eco/article/view/1854/1856>
- Romera, F. J., García, M. J., Lucena, C., Martínez-Medina, A., Aparicio, M. A., Ramos, J., Alcántara, E., Angulo, M., & Pérez-Vicente, R. (2019). Induced Systemic Resistance (ISR) and Fe Deficiency Responses in Dicot Plants. *Frontiers in Plant Science*, 0, 287. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2019.00287>
- Sahl, H. G., & Bierbaum, G. (1998). Lantibiotics: biosynthesis and biological activities of uniquely modified peptides from gram-positive bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 52, 41–79. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.MICRO.52.1.41>
- Sampaio, A. M., De Sousa Araújo, S., Rubiales, D., & Patto, M. C. V. (2020). Fusarium wilt management in legume crops. *Agronomy*, 10(8), 1–25.
<https://doi.org/10.3390/agronomy10081073>
- Schneider, Y. K. (2021). Bacterial Natural Product Drug Discovery for New Antibiotics: Strategies for Tackling the Problem of Antibiotic Resistance by Efficient Bioprospecting. *Antibiotics 2021*, Vol. 10, Page 842, 10(7), 842.
<https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS10070842>
- Schulze, C. J., Bray, W. M., Loganzo, F., Lam, M. H., Szal, T., Villalobos, A., Koehn, F. E., & Linington, R. G. (2014). Borrelidin B: Isolation, biological activity, and implications for nitrile biosynthesis. *Journal of Natural Products*, 77(11), 2570–2574.
https://doi.org/10.1021/NP500727G/SUPPL_FILE/NP500727G_SI_001.PDF

- Sharma, M., & Gupta, S. K. (2014). *Approaches and trends in plant disease management*. scientific publishers.
[https://books.google.com.mx/books?hl=es&lr=&id=1oOWDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA1&dq=bacteria+as+plant+diseases+biocontrol+agent+history&ots=98uhWYIJHx&sig=Ch4wa21w-GzWizQHo8R4XVjO4G0#v=onepage&q=bacteria as plant diseases biocontrol agent history&f=false](https://books.google.com.mx/books?hl=es&lr=&id=1oOWDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA1&dq=bacteria+as+plant+diseases+biocontrol+agent+history&ots=98uhWYIJHx&sig=Ch4wa21w-GzWizQHo8R4XVjO4G0#v=onepage&q=bacteria+as+plant+diseases+biocontrol+agent+history&f=false)
- Sieber, S., Daeppen, C., Jenul, C., Mannancherril, V., Eberl, L., & Gademann, K. (2020). Biosynthesis and Structure–Activity Relationship Investigations of the Diazeniumdiolate Antifungal Agent Fragin. *ChemBioChem*, 21(11), 1587–1592.
<https://doi.org/10.1002/cbic.201900755>
- Sinuco León, D. C., Coconubo Guio, L. C., Castellanos Hernández, L., Sinuco León, D. C., Coconubo Guio, L. C., & Castellanos Hernández, L. (2020). Fungicidal activity of volatile organic compounds from *Paenibacillus* bacteria against *Colletotrichum gloeosporioides*. *Revista Colombiana de Química*, 49(1), 20–25.
<https://doi.org/10.15446/REV.COLOMB.QUIM.V1N49.81996>
- Stintzi, A., Cornelis, P., Hohnadel, D., Meyer, J.-M., Dean, C., Poole, K., Kourambas, S., & Krishnapillai, V. (1996). Novel pyoverdine biosynthesis gene(s) of *Pseudomonas aeruginosa* PAO. *Microbiology*, 142(5), 1181–1190.
<https://doi.org/10.1099/13500872-142-5-1181>
- Troncoso-Rojas, R., & Tiznado-Hernández, M. E. (2014). *Alternaria alternata* (Black Rot, Black Spot). In *Postharvest Decay: Control Strategies*. Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-411552-1.00005-3>
- Udwary, D. W., Zeigler, L., Asolkar, R. N., Singan, V., Lapidus, A., Fenical, W., Jensen, P. R., & Moore, B. S. (2007). Genome sequencing reveals complex secondary metabolome in the marine actinomycete *Salinispora tropica*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(25), 10376–10381. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0700962104>

- Van Kraaij, C., De Vos, W. M., Siezen, R. J., & Kuipers, O. P. (1999). Lantibiotics: biosynthesis, mode of action and applications. *Natural Product Reports*, 16(5), 575–587. <https://doi.org/10.1039/A804531C>
- van Loon, L. B., & Pieterse, P. (1998). Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, 36, 453–483. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.PHYTO.36.1.453>
- Vázquez, Y. C., & Orozco, S. A. (1992). Manipulación de las Semillas y Problemas de Manejo. *Tree Planters' Notes*, 119–124. <https://www.uv.mx/personal/tcarmona/files/2010/08/Vazquez-y-Orozco-19921.pdf>
- Veloso, J., & Díaz, J. (2012). *Fusarium oxysporum* Fo47 confers protection to pepper plants against *Verticillium dahliae* and *Phytophthora capsici*, and induces the expression of defence genes. *Plant Pathology*, 61(2), 281–288. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02516.x>
- Vurukonda, S. S. K. P., Giovanardi, D., & Stefani, E. (2018). Plant growth promoting and biocontrol activity of streptomycetes spp. As endophytes. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(4). <https://doi.org/10.3390/ijms19040952>
- Wakabayashi, T., Kageyama, R., Naruse, N., Tsukahara, N., Funahashi, Y., Kitoh, K., & Watanabe, Y. (1997). Borrelidin is an angiogenesis inhibitor; disruption of angiogenic capillary vessels in a rat aorta matrix culture model. *The Journal of Antibiotics*, 50(8), 671–676. <https://doi.org/10.7164/ANTIBIOTICS.50.671>
- Walters, D. R., Ratsep, J., & Havis, N. D. (2013). Controlling crop diseases using induced resistance: challenges for the future. *Journal of Experimental Botany*, 64(5), 1263–1280. <https://doi.org/10.1093/JXB/ERT026>
- Wyatt, M. A., Wang, W., Roux, C. M., Beasley, F. C., Heinrichs, D. E., Dunman, P. M., & Magarvey, N. A. (2010). *Staphylococcus aureus* nonribosomal peptide secondary metabolites regulate virulence. *Science (New York, N.Y.)*, 329(5989), 294–296. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1188888>

- Xie, S., Liu, J., Gu, S., Chen, X., Jiang, H., & Ding, T. (2020). Antifungal activity of volatile compounds produced by endophytic *Bacillus subtilis* DZSY21 against *Curvularia lunata*. *Annals of Microbiology*, *70*(1), 1–10.
<https://doi.org/10.1186/S13213-020-01553-0/FIGURES/6>
- Yamada, Y., Arima, S., Nagamitsu, T., Johmoto, K., Uekusa, H., Eguchi, T., Shin-Ya, K., Cane, D. E., & Ikeda, H. (2015). Novel terpenes generated by heterologous expression of bacterial terpene synthase genes in an engineered *Streptomyces* host. *The Journal of Antibiotics*, *68*(6), 385.
<https://doi.org/10.1038/JA.2014.171>
- Yoder, M. F., & Kisaalita, W. S. (2011). Iron specificity of a biosensor based on fluorescent pyoverdinin immobilized in sol-gel glass. *Journal of Biological Engineering*, *5*(1), 4. <https://doi.org/10.1186/1754-1611-5-4>
- Yoon, S. H., Ha, S. min, Lim, J., Kwon, S., & Chun, J. (2017). A large-scale evaluation of algorithms to calculate average nucleotide identity. *Antonie van Leeuwenhoek*, *110*(10), 1281–1286.
<https://doi.org/10.1007/S10482-017-0844-4>
- Zamioudis, C., Proietti, S., Leon-Reyes, A., Samaras, A., Nikolaidis, M., Antequera-Gómez, M. L., Cámara-Almirón, J., Romero, D., Moschakis, T., Amoutzias, G. D., & Karaoglanidis, G. S. (2021). *Whole Genome Sequencing and Root Colonization Studies Reveal Novel Insights in the Biocontrol Potential and Growth Promotion by Bacillus subtilis* MBI 600 on Cucumber.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.600393>
- Zhang, Y., Li, T., Liu, Y., Li, X., Zhang, C., Feng, Z., Peng, X., Li, Z., Qin, S., & Xing, K. (2019). Volatile Organic Compounds Produced by *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* SPS-41 as Biological Fumigants To Control *Ceratocystis fimbriata* in Postharvest Sweet Potatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *67*(13), 3702–3710.
<https://doi.org/10.1021/ACS.JAFC.9B00289>

- Zhong, Z., He, B., Li, J., & Li, Y. X. (2020). Challenges and advances in genome mining of ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides (RiPPs). *Synthetic and Systems Biotechnology*, 5(3), 155–172. <https://doi.org/10.1016/J.SYNBIO.2020.06.002>
- Ziemert, N., Alanjary, M., & Weber, T. (2016). The evolution of genome mining in microbes - a review. *Natural Product Reports*, 33(8), 988–1005. <https://doi.org/10.1039/C6NP00025H>
- Zimmermann, M., Hegemann, J. D., Xie, X., & Marahiel, M. A. (2013). The Astexin-1 Lasso Peptides: Biosynthesis, Stability, and Structural Studies. *Chemistry & Biology*, 20(4), 558–569. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMBIOL.2013.03.013>

8 ANEXOS

ANEXO I secuencias 16s

1- Aislamiento CKM109

>CKM109_16S

```
TGCAGTCGAGCGGATGACGGGAGCTTGCTCCTTGATTTCAGCGGCGGACGGGT
GAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGACAACGTTTCGAAAGGAA
CGCTAATACCGCATACTGCTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTG
CGCTATCAGATGAGCCTAGGTTCGGATTAGCTAGTAGGTGAGGTAATGGCTCA
CCTAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAC
TGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAA
TGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGAT
TGTAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTAATACCTTACTGTT
TTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCGGCGG
TAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGT
AGGTGGTTCGTTAAGTTGGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGC
ATCCAAAACCTGGCGAGCTAGAGTATGGTAGAGGGTGGTGGAAATTTCTGTGT
AGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCAC
CTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTA
GATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCAACTAGCCGTTGGAATCCT
TGAGATTTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACG
GCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGA
GCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCCTTGACATG
CAGAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCTGACACAGGTG
CTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAA
CGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTACCAGCACGTCATGGTGGGCACTCTAAG
GAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCAT
GGCCCTTACGGCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAGAGGGTT
GCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCTCACAAAACCGATCGTAGTCCGGATCG
CAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAG
AATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCA
TGGGAGTGGGTTGCACCAGAAGTAGCTAGTCTAACCTTCGGGAGGACGGT
```

2- Aislamiento CKM113

>CKM113_16s

ATGCAGTCGAACGGCAGCGCGAGAGAGCTTGCTCTCTTGGCGGCGAGTGGCG
GACGGGTGAGTAATATATCGGAACGTGCCCAGTAGCGGGGGATAACTACTCG
AAAGAGTGGCTAATACCGCATAACGCCCTACGGGGGAAAGGGGGGGATCGCAA
GACCTCTCACTATTGGAGCGGCCGATATCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAA
AGGCTCACCAAGGCAACGATCCGTAGCTGGTTTGAGAGGACGACCAGCCACA
CTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTT
TGGACAATGGGGGAAACCCTGATCCAGCCATCCC GCGTGTATGATGAAGGCC
TTCGGGTTGTAAAGTACTTTTGGCAGAGAAGAAAAGGTACCTCCTAATACGA
GGTACTGCTGACGGTATCTGCAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCA
GCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAG
CGTGTGTAGGCGGTTTCGGAAAGAAAGATGTGAAATCCCAGGGCTCAACCTTG
GAACTGCATTTTTAACTGCCGAGCTAGAGTATGTCAGAGGGGGGTAGAATTC
CACGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGATATGTGGAGGAATACCGATGGCGAAGG
CAGCCCCCTGGGATAATACTGACGCTCAGACACGAAAGCGTGGGGAGCAAAC
AGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTAGCTGTTG
GGGCCGTTAGGCCTTAGTAGCGCAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCCTGGGG
AGTACGGTCGCAAGATTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGC
GGTGGATGATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCTACCCTT
GACATGTCTGGAAAGCCGAAGAGATTTGGCCGTGCTCGCAAGAGAACCGGAA
CACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAG
TCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCAATTAGTTGCTACGCAAGAGCACTCTAA
TGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCA
TGGCCCTTATGGGTAGGGCTTCACACGTCATAACAATGGTCCGGACAGAGGGT
CGCCAACCCGCGAGGGGGAGCCAATCTCAGAAACCCGATCGTAGTCCGGATC
GCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCA
GAATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACC
ATGGGAGTGGGTTTCACCAGAAGTAGGTAGCCTAACCGTAAGGAGGGCGCTA

3- Aislamiento CKM115

>CKM115_16S

CATGCAGTCGAGCGGTAACAGGAGAAAAGCGTTGCTTGTCTTGCTGACGAGC
GGCGGACGGGTGAGTAATGTATGGGGATCTGCCCCGATAGAGGGGGATAACTA
CTGGAAACGGTGGCTAATACCGCATAATGTCTACGGACCAAAGCAGGGGCTC
TTCGGACCTTGCACTATCGGATGAACCCATATGGGATTAGCTAGTAGGTGGG
GTAAAGGCTCACCTAGGCGACGATCTCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGC
CACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGA
ATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAA
GGCCTTAGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGTGATAAGGTTAAT
ACCCTTGTCAATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCCGGCTAACTCCGTGCC
AGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGT
AAAGCGCACGCAGGCGGTCAATTAAGTCAGATGTGAAAGCCCCGAGCTTAAC
TTGGGAATTGCATCTGAAACTGGTGGCTAGAGTCTTGTTTAGAGGGGGTAG
AATTTTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGGTGGC
GAAAGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAG
CAAACAGGATTAGATACCCCTGTTAGTCACGCTGTAAACGATGTCGATTTAG
AGGTTGTGGTCTTGAAACTGTGGCTTCTGGAGCTAACGCGTTAAATCGACCG
CCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCG
CACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACC
TACTCTTGACATCCAGCGAATCCTTTAGAGATAGAGGAGTGCCTTCGGGAAC
GCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTTGTGAAATGTTGGG
TTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGCGTAATGG
TGGGAACTCAAAGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGAC
GTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCA
GATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGAACTCATAAAGTCTGTC
GTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGT
AATCGTAGATCAGAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACC
GCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAGAAGTAGGTAGCTTAACCTTC
GGGAGGGCGCT

4- Aislamiento CKA027

>CKA027_16S

GCGAGTCGAGCGGATGAAGGGAGCTTGCTCCTGGATTCAGCGGCGGACGGGT
GAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGTCCGGAAACGGG
CGCTAATACCGCATACTCCTGAGGGAGAAAGTGGGGGATCTTCGGACCTCA
CGCTATCAGATGAGCCTAGGTTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTA
CCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAC
TGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAA
TGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGAT
TGTAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTAATACCTTGCTGTT
TTGACGTTACCAACAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCGGGGGGCG
GTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTAAGTGGGCGTAAAGCGCGCG
TAGGTGGTTCAGCAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTG
CATCCAAAACACTACTGAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAAATTCCTGTG
TAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCA
CCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATT
AGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACTAGCCGTTGGGATCC
TTGAGATCTTAGTGGCGCAGCTAACGCGATAAGTCGACCGCCTGGGGAGTAC
GGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGG
AGCATGTGGTTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACAT
GCTGAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCAGACACAGGT
GCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTA
ACGAGCGCAACCCTTGTCCTTAGTTACCAGCACCTCGGGTGGGCACTCTAAG
GAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCAT
GGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAAAGGGTT
GCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCATAAAAACCGATCGTAGTCCGGATCG
CAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGAATCAG
AATGTCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCA
TGGGAGTGGGTTGCTCCAGAAGTAGTCTAGTCTAACCAGCAAGGGG

5- Aislamiento CKM127

>CKM127_16S

TGAAGAGTTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACAT
GCAAGTCGAGCGGATGACGGGAGCTTGCTCCTTGATTCAGCGGCGGACGGGT
GAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGACAACGTTTCGAAAGGAA
CGCTAATACCGCATAACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTG
CGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTAGGTGAGGTAATGGCTCA
CCTAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAC
TGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAA
TGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGAT
TGTAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTAATACCTTGCTGTT
TTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGG
TAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTAAGTGGGCGTAAAGCGCGCGT
AGGTGGTTCGTTAAGTTGGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGC
ATCCAAAACCTGGCGAGCTAGAGTATGGTAGAGGGTGGTGGAATTTCCCTGTGT
AGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCAC
CTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTA
GATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCAACTAGCCGTTGGAATCCT
TGAGATTTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACG
GCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGA
GCATGTGGTTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCCTTGACATG
CAGAGAACTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCTGACACAGGTG
CTGCATGGCTGTTCGTCAGCTCGTGTTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGTAA
CGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTACCAGCACGTTATGGTGGGCACTCTAAG
GAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCAT
GGCCCTTACGGCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAGAGGGTT
GCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCTCACAAAACCGATCGTAGTCCGGATCG
CAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAG
AATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCA
TGGGAGTGGGTGCAACCAGAAGTAGCTAGTCTAACCTTCGGGAGGACGGTTA
CCACGGTGTGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAGGGG
AACCTGCGGCTGGATCACCTCCTT

6- Aislamiento CKM138

>CKM138_16S

TCGGAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACA
TGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACG
GGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAA
CCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGG
TGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTG
AGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCG
GCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGG
GAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATG
AAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCG
AATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGT
GCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGG
CGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTC
AACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGT
GGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTG
GCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGG
AGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTA
AGTGTTAGGGGGTTTTCCGCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTC
CGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCC
CGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTA
CCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGG
GCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTG
GGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTCACT
TGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGAC
GTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGAC
AGAACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTC
TCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGT
AATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACC
GCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTT
TAGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGGACAGATGATTGGGGTGAAGTCGTAACAA
GGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTTT

7- Aislamiento CKM182

>CKM182_16S

GCAGTCGAGCGATGATTAAAGATAGCGTTGCTATTTTTTATGAAGAGCGGCGA
ACGGGTGAGTAACGCGTGGGAAATCTGCCGAGTAGCGGGGACAACGTTTGG
AAACGAACGCTAATACCGCATAACAATGAGAATCGCATGATTCTTATTTGAA
AGAAGCAATTGCTTCACTACTTGATGATCCCGCGTTGTATTAGCTAGTTGGT
AGTGTAAGGACTACCAAGGCGATGATACATAGCCGACCTGAGAGGGTGATC
GGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAG
GGAATCTTCGGCAATGGGGGCAACCCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAA
GAAGGTTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACGTTAAGTAGAG
TGGAAAATTACTTAAGTGACGGTATCTAACCAGAAAGGGACGGCGTAACTAC
GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTCCCAAGCGTTGTCCGGATTTATTG
GGCGTAAAGCGAGCGCAGGTGGTTTTCTTAAGTCTGATGTAAAAGGCAGTGGC
TCAACCATTTGTGTGCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGGAGAGGAGAG
TGGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCGGA
GGCGAAAGCGGCTCTCTGGCCTGTAAGTACTGAGGCTCGAAAGCGTGGG
GAGCAAACAGGATTAGATAACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCT
AGCTGTAGGGAGCTATAAGTTCTCTGTAGCGCAGCTAACGCATTAAGCACTC
CGCCTGGGGAGGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGC
CCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTT
ACCAGGTCTTGACATACTCGTGCTATCCTTAGAGATAAGGAGTTCCTTCGGG
ACACGGGATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTT
GGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTACTAGTTGCCATCATTAAAG
TTGGGCACTCTAGTGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGA
CGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGA
TGGTACAACGAGTCGCCAACCCGCGAGGGTGCCTAATCTCTTAAAACCATT
CTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGTCGGAATCGCTAG
TAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACAC
CGCCCGTCACACCACGGAAGTTGGGAGTACCCAAAGTAGGTTGCTCTAACCG
TCACAGGAGGGCGCGT

8- Aislamiento CKZ194

>CKZ194_16S

TGCAGTCGAGCGGATGAAGGGAGCTTGCTCCTGGATTCAGCGGCGGACGGGT
GAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGTCCGGAAACGGG
CGCTAATACCGCATAACGTCCTGAGGGAGAAAGTGGGGGATCTTCGGACCTCA
CGCTATCAGATGAGCCTAGGTCCGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTA
CCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAC
TGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAA
TGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGAT
TGTAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTAATACCTTGCTGTT
TTGACGTTACCAACAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGGGGGGCGGGGCGC
GGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGC
GTAGGTGGTTCAGCAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACT
GCATCCAAACTACTGAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAAATTCCTGT
GTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACC
ACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGAT
TAGATAACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACTAGCCGTTGGGATC
CTTGAGATCTTAGTGGCGCAGCTAACGCGATAAGTCGACCGCCTGGGGAGTA
CGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTG
GAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACA
TGCTGAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCAGACACAGG
TGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGT
AACGAGCGCAACCCTTGTCCTTAGTTACCAGCACCTCGGGTGGGCACTCTAA
GGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCA
TGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCCGTACAAAGGGT
TGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCATAAAACCGATCGTAGTCCGGATC
GCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGAATCA
GAATGTCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACC
ATGGGAGTGGGTTGCTCCAGAAGTAGCTAGTCTAACCGCAAGGG

9- Aislamiento CKZ197

> CKZ197_16S

GCAAGTCGAACGGTAACAGGAAGCAGCGTTGCTGCTTCGCTGACGAGTGGCG
GACGGGTGAGTAATGTCTGGGGATCTGCCCCGATGGAGGGGGATAACCACTGG
AAACGGTGGCTAATACCGCATAACGTGCAAGACCAAAGTGGGGGACCTTCG
GGCCTCACACCATCGGATGAACCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAA
CGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACA
CTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATAT
TGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCC
TTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGGATGGTGTCTAATACGC
GCCGTCATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGGCAGCA
GCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAG
CGCACGCAGGCGGTCTGTTAAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTTAACCTGG
GAACTGCATTTGAAACTGGCAGAGCTTGAGTCTCGTAGAGGGGGGTAGAATT
CCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAC
GCGGCCCCCTGGACTAAAACCTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAA
CAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACTTGGAGGC
TGTTTCCTTGAGAAGTGGCTTCCGGAGCTAACCGCTTAASTCGACCGCCTGG
GGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCCGCACAA
GCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTC
TTGACATCCACGGAATTCGGCAGAGATGCCCTAGTGCCTTCGGGAACCGTGA
GACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAG
TCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGCGTGATGGCGGGA
ACTCAAAGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAA
GTCATCATGGCCCTTACGACCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATAAC
AAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTGCGTCGTAGT
CCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCG
TGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGCCCTTGTACACACCGCCCG
TCACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAAGAAGTAGGTAGCTTAACTTCGG

10-Aislamiento CKZ202

>CKZ202_16S

GCAAGTCGAGCGGATGAAGGGAGCTTGCTCCTGGATTCAGCGGCGGACGGGT
GAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGTCCGGAAACGGG
CGCTAATACCGCATACTCCTGAGGGAGAAAGTGGGGGATCTTCGGACCTCA
CGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTA
CCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAC
TGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAA
TGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGAT
TGTAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTAATACCTTGCTGTT
TTGACGTTACCAACAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGGGGGGGAGCCGCG
GTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTAAGTGGGCGTAAAGCGCGCG
TAGGTGGTTCAGCAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTG
CATCCAAAACACTACTGAGCTAGAGTAACGGTAGAGGGTGGTGAATTTCTGT
GTAGCGGTGGAAATGCGTAGATATAGGAAGGGAACACCAGTGGCGAAAGCGA
CCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAG
GATTAGATAACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCGACTAGCCGTTGGG
ATCCTTGAGATCTTAGTGGCGCAGCTAACGCGATAAGTCGACCGCCTGGGGA
GTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCG
GTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTG
ACATGCTGAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCAGACAC
AGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCC
CGTAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTACCAGCACCTCGGGTGGGCACTC
TAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCA
TCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGTTCGGTACAAAG
GGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCATAAAACCGATCGTAGTCCGG
ATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGAA
TCAGAATGTCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCAC
ACCATGGGAGTGGGTTGCTCCAGAAGTAGCTAGTCTAACCGCAAGGGGGACG

11-Aislamiento CKZ205

>CKZ205_16S

AAGTCGAGCGGATGAAGGGAGCTTGCTCCTGGATTTCAGCGGCGGACGGGTGA
GTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGTCCGGAAACGGGCG
CTAATACCGCATAACGTCTGAGGGAGAAAGTGGGGGATCTTCGGACCTCACG
CTATCAGATGAGCCTAGGTTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACC
AAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAACCTG
AGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATG
GGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTG
TAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTAATACCTTGCTGTTTT
GACGTTACCAACAGAATAAGCACC GGCTAACTTCGTGCGAGCGGGCGCGGTA
ATACGAAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTA CTGGGCGTAAAGCGCGCGTAG
GTGGTTCAGCAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCAT
CCAAA ACTACTGAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAAATTCCTGTGTAG
CGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCT
GGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGA
TACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACTAGCCGTTGGGATCCTTG
AGATCTTAGTGGCGCAGCTAACCGGATAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGC
CGCAAGGTTAAA ACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGC
ATGTGGTTTTAATTCGAAGCAACCGCAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGCT
GAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCAGACACAGGTGCT
GCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACG
AGCGCAACCCTTGTCCTTAGTTACCAGCACCTCGGGTGGGCACTCTAAGGAG
ACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGC
CCTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGTTCGGTACAAAGGGTTGCC
AAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCATAAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAG
TCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGAATCAGAAT
GTCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGG
GAGTGGGTTGCTCCAGAAGTAGCTAGTCTAACCGCAAGG

12-Aislamiento CKZ208

>CKZ208_16S

CATGCAAGTCGAGCGGATGAAGGGAGCTTGCTCCTGGATTTCAGCGGCGGACG
GGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGTCCGGAAAC
GGGCGCTAATACCGCATACGTCCTGAGGGAGAAAGTGGGGGATCTTCGGACC
TCACGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGC
CTACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGG
AACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGA
CAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCG
GATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTAATACCTTGCT
GTTTTGACGTTACCAACAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCG
CGGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTAAGTGGGCGTAAAGCGCG
CGTAGGTGGTTCAGCAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAC
TGCATCCAAAATACTGAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAAATTTCTG
TGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGAC
CACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGA
TTAGATAACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACTAGCCGTTGGGAT
CCTTGAGATCTTAGTGGCGCAGCTAACGCGATAAGTCGACCGCCTGGGGAGT
ACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGT
GGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGAC
ATGCTGAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACCTCAGACACAG
GTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCG
TAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTACCAGCACCTCGGGTGGGCACTCTA
AGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATC
ATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAAAGGG
TTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCATAAAACCGATCGTAGTCCGGAT
CGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGAATC
AGAATGTCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACAC
CATGGGAGTGGGTTGCTCCAGAAGTAGCTAGTCTAACCGCAAGGGGGACGGT

ANEXO II

Cuadro 23. Áreas en mm² de crecimiento de *Alternaria alternata* en confrontación con los aislamientos de Calakmul

CKM109	CKM113	CKM115	CKM127	CKM138	CKM182	CKA027	CKZ194	CKZ197	CKZ202	CKZ205	CKZ208	CONTROL
835.717	784.722	1059.717	644.109	770.036	1021.774	441.384	992.509	744.095	995.568	1225.456	473.486	1411.099
1018.171	973.429	1207.477	440.52	717.03	1161.733	791.208	913.789	739.526	1014.931	1417.11	401.529	1423.641
853.256	1317.227	1219.791	442.808	817.917	994.448	863.176	965.617	891.301	1112.296	1256.23	526.031	1433.822
912.694	1303.118	979.298		710.267	1271.061		926.426	1026.407	1168.999	1198.195		1424.561

Cuadro 24. Áreas en mm² de crecimiento de *Colletotricum gloeosporioides* en confrontación con los aislamientos de Calakmul

CKM109	CKM113	CKM115	CKM127	CKM138	CKM182	CKA027	CKZ194	CKZ197	CKZ202	CKZ205	CKZ208	CONTROL
1064.564	1616.509	1351.612	1481.057	1087.549	581.505	1569.386	1648.158	1642.97	1083.837	1152.224	1094.055	2671.978
1771.66	1943.463	1439.696	1601.772	1171.549	714.195	1480.097	1543.672	1238.825	1224.531	951.098	997.555	2297.487
772.579	1878.277	1559.264	1373.802	1271.601	807.436	1341.965	1721.426	1807.161	1543.358	955.797	1034.048	2247.892
635.703		1570.32					1624.922	1306.143	1351.673	852.706	815.001	2373.991

Cuadro 25. Áreas en mm² de crecimiento de *Fusarium oxysporum* en confrontación con los aislamientos de Calakmul

CKM109	CKM113	CKM115	CKM127	CKM138	CKM182	CKA027	CKZ194	CKZ197	CKZ202	CKZ205	CKZ208	CONTROL
3100.765	2380.169	2077.315	510.937	1364.221	2725.995	580.422	1871.906	1202.694	2199.235	1488.498	1355.058	3800.462
3094.598	1955.22	2115.513	711.092	1440.806	2575.921	1092.427	1645.681	1267.03	1776.648	2128.401	1277.444	4081.27
2949.196	2189.916	1975.552	1233.94	1553.986	2496.312	605.898	2451.666	1346.208	2115.535	2038.181	784.195	3855.568
2874.377	1843.39	2179.903		1538.419	2594.208		2611.816	2133.118	2077.693	2231.56		