

ANTIFUNGAL ACTIVITY AND MOLECULAR IDENTIFICATION OF NATIVE STRAINS OF *Bacillus subtilis*

ACTIVIDAD ANTIFUNGICA E IDENTIFICACION MOLECULAR DE CEPAS NATIVAS DE *Bacillus subtilis*

Esaú Ruiz-Sánchez¹, Miguel Ángel. Mejía-Bautista¹, Alejandra Serrato-Díaz², Arturo Reyes-Ramírez¹,
Yokiushirdhilmara Estrada-Girón³, Alberto J. Valencia-Botín^{4*}

¹División de Estudios de Postgrado e Investigación, Instituto Tecnológico de Conkal, Conkal, Yucatán, México. ²Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, Laboratorio Divisional de Biología Molecular, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Rafael Atlixco 186, Colonia Vicentina, México. ³Universidad de Guadalajara, Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías, Bulevard Marcelino García Barragán 1421, Colonia Olímpica, Guadalajara, Jalisco, 44430 México. ⁴Universidad de Guadalajara, Centro Universitario de la Ciénega. Avenida Universidad 1115, Colonia Lindavista, Ocotlán, Jalisco, 47810, México. (botin77@gmail.com).

ABSTRACT

The bioprospection for antagonistic bacteria, as biological control agents to manage plant pathogenic fungi, is a preponderant activity to reduce the use of chemical fungicides. The bacterium *Bacillus subtilis* has shown an excellent capacity to inhibit the growth and sporulation of a wide variety of plant pathogenic fungi. The phenotypic and biochemical characteristics to differentiate among subspecies of *B. subtilis* vary at the regional level. In this research, *Bacillus* strains were isolated from the Yucatan Peninsula in Mexico and their antagonistic activities were assessed by direct confrontation in a completely randomized design. To identify the most active strains, molecular characterization was performed. For an accurate identification, partial 16S rRNA, *gyrA* and *rpoB* genes were sequenced and compared with those deposited in the GenBank. The most active strains CBCC2, CBMT2, CBMN22, CBRF24, CBCK36, CBCK47, and CBMT51 caused 32 to 78 % inhibition of mycelial growth in *Alternaria alternata*, *Helminthosporium rostratum* and *Curvularia lunata* in direct confrontation tests; likewise the cell-free culture filtrates of these *Bacillus* strains showed significant differences ($p \leq 0.05$) in the degree of inhibition of conidial germination of the plant pathogenic fungi. The amplification, sequencing and comparison of 16S rRNA, *gyrA* and *rpoB* genes showed that the strains had 95 to 100 % identity with *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* and *B. subtilis* subsp. *subtilis*. The *gyrA* gene showed the

RESUMEN

La bioprospección de bacteria antagonicas, como agentes de control biológico para el manejo de hongos fitopatógenos, es una actividad preponderante para reducir el uso de fungicidas químicos. La bacteria *Bacillus subtilis* ha mostrado una excelente capacidad para inhibir el crecimiento y esporulación de una gama amplia de hongos fitopatógenos. Las características bioquímicas para diferenciar entre subespecies de *B. subtilis* varían a nivel regional. En esta investigación se aislaron cepas de *Bacillus* de la Península de Yucatán en México y se evaluaron sus actividades antagonicas por confrontación directa en un diseño completamente al azar. Para identificar las cepas más activas se realizó una caracterización molecular. Para una identificación precisa se secuenciaron parte de los genes 16S rRNA, *gyrA* y *rpoB* y se compararon con los depositados en el GenBank. Las cepas más activas CBCC2, CBMT2, CBMN22, CBRF24, CBCK36, CBCK47 y CBMT51 causaron la inhibición del crecimiento micelial de 32 a 78 % en *Alternaria alternata*, *Helminthosporium rostratum* y *Curvularia lunata* en pruebas de confrontación directa; asimismo, los filtrados de cultivos libres de células de estas cepas *Bacillus* mostraron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en el grado de inhibición de germinación conidial de los hongos fitopatógenos. La amplificación, secuenciación y comparación de los genes 16S rRNA, *gyrA* y *rpoB* mostraron que las cepas tenían una identidad de 95 a 100 % con *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* y *B. subtilis* subsp. *subtilis*. El gen *gyrA* mostró la tasa evolutiva más alta al usar el análisis de la relación filogenética con las cepas estudiadas.

* Autor responsable ♦ Author for correspondence.

Recibido: septiembre, 2014. Aprobado: noviembre, 2015.

Publicado como ARTÍCULO en Agrociencia 50: 133-148. 2016.

highest evolutionary rate using the analysis of phylogenetic relationship within the strains studied.

Key words: *Bacillus subtilis*, biocontrol, gene-protein sequence, DNA gyrase, RNA polymerase.

INTRODUCTION

Fungi form a large eukaryotic group of organisms characterized by their chitinous cell walls and also by their lack of photosynthetic pigment. Although the majority of fungal species are saprophytes, a number of them are plant parasites, damaging different organs in cultivated and wild plants (Agrios, 2005; González-Fernández *et al.*, 2010). Chemical fungicides are essential for the effective control of plant diseases (Knight *et al.*, 1997). In the last two decades new classes of fungicides with novel modes of action were developed and new molecules will be identified for the foreseeable future (Knight *et al.*, 1997; De Ward *et al.*, 1993).

The extensive and irrational uses of synthetic fungicides caused damage to the environment and to human health due particularly to occupational exposure and to their residues in food products. In addition, resistant populations of fungi in high artificially managed agro-ecosystems are increasingly detected (Blasco *et al.*, 2002; Waard *et al.*, 2006). To cope with the risk associated to the use of chemical fungicides, antagonistic microorganisms represent a feasible alternative to manage plant pathogenic fungi. In this context, the bacterium *Bacillus subtilis* has shown an excellent capacity to inhibit *in vitro* and *in vivo* the growth and sporulation of a wide variety of plant pathogenic fungi (Korsten and Jager, 1995; Podile and Laxmi, 1998; Schisler *et al.*, 2004).

The antagonistic effects of *B. subtilis* are associated at least to five mechanisms: 1) direct parasitism, where bacteria move to germinating spore and attach to the surface via polarity (Korsten and Jager, 1995); 2) production of extracellular antibiotics, like bacilomycin, iturin, mycosubtilin and zwittermicin (Pal and Gardener, 2006; Fickers, 2012); 3) production of lytic enzymes, like chitinase, protease, β -1,3 glucanase and cellulase (Kumar *et al.*, 2012); 4) competition for nutrients on the host, which causes nutrient stress and starvation in the germinating fungus (Janiciewickz *et al.*, 2003); and 5) stimulation of host defenses through induced systemic resistance via jasmonic acid pathway (Van Loon, 2007).

Palabras clave: *Bacillus subtilis*, biocontrol, secuencia gen-proteína, DNA girasa, RNA polimerasa.

INTRODUCCION

Los hongos forman un gran grupo eucariótico de organismos que se caracterizan por sus paredes celulares quitinosas y también por su falta de pigmento fotosintético. Si bien la mayoría de las especies fúngicas son saprófitas, un número de ellas son parásitas de plantas y dañan diferentes órganos en plantas silvestres y sembradas (Agrios, 2005; González-Fernández *et al.*, 2010). Los fungicidas químicos son esenciales para el control efectivo de las enfermedades en plantas (Knight *et al.*, 1997). En las dos décadas recientes se desarrollaron nuevas clases de fungicidas con nuevos modos de acción, y se identificarán nuevas moléculas en el futuro previsible (Knight *et al.*, 1997; De Ward *et al.*, 1993).

El uso extensivo e irracional de fungicidas sintéticos causó daños ambientales y a la salud humana, debido, sobre todo, a la exposición ocupacional y a sus residuos en productos alimenticios. Además, se detectan cada vez más poblaciones resistentes de hongos en agroecosistemas controlados artificialmente (Blasco *et al.*, 2002; Waard *et al.*, 2006). Para tratar con el riesgo relacionado al uso de fungicidas químicos, los microorganismos antagonísticos representan una alternativa factible para el control de hongos fitopatógenos. En este contexto, la bacteria *Bacillus subtilis* ha mostrado una excelente capacidad de inhibir *in vitro* e *in vivo* el crecimiento y la esporulación de una amplia variedad de hongos fitopatógenos (Korsten y Jager, 1995; Podile y Laxmi, 1998; Schisler *et al.*, 2004).

Los efectos antagonísticos de *B. subtilis* se relacionan con al menos cinco mecanismos: 1) parasitismo directo, donde las bacterias se mueven hacia las esporas en germinación y se adhieren a la superficie por medio de la polaridad (Korsten y Jager, 1995); 2) producción de antibióticos extracelulares como bacilomicina, iturina, micosubtilina y zwittermicina (Pal y Gardener, 2006; Fickers, 2012); 3) producción de enzimas líticas como quitinasa, proteasa, β -1,3 glucanasa y celulosa (Kumar *et al.*, 2012); 4) competencia por los nutrientes en el hospedante, que causa estrés por nutrientes e inanición en el hongo en germinación (Janiciewickz *et al.*, 2003); y 5) estimulación de defensas del hospedante a través de la resistencia sistémica inducida por medio de la ruta del ácido jasmónico (Van Loon, 2007).

Bacillus subtilis has also shown other beneficial applications in agricultural production, environmental engineering and industrial processes. For example, some strains can promote plant growth in horticultural, field and fruit crops (Adesemoye *et al.*, 2008; Lugtenberg and Kamilova, 2009). *Bacillus subtilis* can also be used for bioremediation of crude-oil and heavy metal polluted soils, as well as for bioremediation of textile industrial effluents (Augusto-Costa and Pereira-Duta, 2001; Cubitto *et al.*, 2004; Ajao *et al.*, 2011).

There are well-documented cases of success using *Bacillus subtilis* for production of antibiotic, surfactant and enzymes (Harwood, 1992; Price *et al.*, 2007). *Bacillus subtilis* is a species commonly found in the environment, its taxonomy and that of related species has been extensively studied in the last two decades (Rooney *et al.*, 2009). *Bacillus subtilis* and related species have high levels of similarity in their 16S rRNA gene sequence (99 % or higher), therefore their identity has to be aided by other genes that give more precision to the species level.

Moreover, there are few phenotypic and biochemical characteristics to differentiate among subspecies of *B. subtilis*, which make the scenario more difficult to identify species among the *B. subtilis* complex, as well as to resolve the evolutionary relationship of such species. In this respect, the use of amplification, sequencing and comparison of genes *gyrA*, that codify for the subunit A of DNA gyrase, and *rpoB*, that codifies for the subunit β of the RNA polymerase, may be integrated to the analysis of 16S rRNA to identify *B. subtilis* strains (Chun and Bae, 2000; Geetha *et al.*, 2007; Geetha and Manonmani, 2008; Geetha and Manonmani, 2010).

This study was carried out to evaluate the antagonistic activity of native strains of *Bacillus* isolated from the Yucatan Peninsula, Mexico, and to identify the most active strains by molecular characterization using the genes 16S rRNA, *gyrA* and *rpoB*. The hypothesis was that the knowledge of the particular characteristics of endemic *Bacillus* strains will contribute to the enrichment of the genetic records in the region, with the possibility of future applications of such resources for the control of plant fungi.

Bacillus subtilis también ha mostrado otras aplicaciones benéficas en la producción agrícola, la ingeniería ambiental y procesos industriales. Por ejemplo, algunas cepas pueden estimular el crecimiento de plantas en cultivos hortícolas, de campo y frutales (Adesemoye *et al.*, 2008; Lugtenberg y Kamilova, 2009). *Bacillus subtilis* también puede usarse para la biorremediación de crudo y tierras contaminadas con metales pesados, y para la biorremediación de efluentes de las industrias textiles (Augusto-Costa y Pereira-Duta, 2001; Cubitto *et al.*, 2004; Ajao *et al.*, 2011).

Hay casos de éxito bien documentados de usos de *B. subtilis* para la producción de antibióticos, surfactantes y enzimas (Harwood, 1992; Price *et al.*, 2007). *Bacillus subtilis* es una especie común en el ambiente; su taxonomía y la de especies relacionadas se estudió de manera extensa en las dos últimas décadas (Rooney *et al.*, 2009). *B. subtilis* y las especies relacionadas tienen altos grados de semejanza en sus secuencias génicas 16S rRNA (99 % o más), por lo que su identidad debe ser auxiliada por otros genes que dan mayor precisión al nivel de especie.

Asimismo, hay pocas características fenotípicas y bioquímicas para diferenciar entre subespecies de *B. subtilis*, lo que dificulta la identificación de especies dentro del complejo *B. subtilis*, así como para resolver la relación evolutiva de dicha especie. En este sentido, el uso de la amplificación, secuenciación y comparación de genes *gyrA* que codifican para la subunidad A de la ADN girasa, y *rpoB*, que codifica para la subunidad β de la ARN polimerasa, puede integrarse al análisis de 16S rRNA para identificar cepas de *B. subtilis* (Chun y Bae, 2000; Geetha *et al.*, 2007; Geetha y Manonmani, 2008; Geetha y Manonmani, 2010).

El presente estudio se realizó para evaluar la actividad antagónica de cepas nativas de *Bacillus* aisladas de la Península de Yucatán, México, y para identificar las cepas más activas por caracterización molecular usando los genes 16S rRNA, *gyrA* y *rpoB*. La hipótesis fue que conocer las características particulares de las cepas endémicas de *Bacillus* contribuirá a enriquecer los registros genéticos de la región, con la posibilidad de aplicaciones futuras de dichos recursos para el control de hongos fitopatógenos.

MATERIALS AND METHODS

Isolation of *Bacillus* strains

The strains were isolated from soil samples collected in the Yucatan Peninsula in Mexico. Soil samples were taken from natural vegetated areas by scraping off surface material with a sterile spatula and about 200 g samples were obtained from 10 to 20 cm depth. All samples were placed in sterile plastic bags and stored at 4 °C until processed. Isolation was carried out using the methodology described by Basurto-Cadena *et al.* (2012). Briefly, 1 g of each sample was suspended in 10 mL sterile distilled water and pasteurized at 80 °C for 20 min. Subsequently, 50 µL of the suspension was placed in microfuge tubes with 500 µL of distilled water.

Aliquots of 50 µL of the diluted suspensions were spread in duplicate on a thin layer of nutrient agar (NA) (Merck, Germany) in Petri dishes. The incubation was carried out under aerobic conditions at 30 °C for 48 h. After incubation the *Bacillus*-like colonies, roughly identified based on their morphology, were transferred and incubated in new Petri dishes for one week at the above conditions, before storing at 4 °C. The colonies were counted and the results expressed as bacteria count per milliliter (CFU mL⁻¹). Prior to use, all isolates were reactivated in NA for five days.

Evaluation of antagonistic activity

Plant pathogenic fungi were kindly donated by Dr. Jairo Cristobal from the Laboratory of Plant Pathology at the Instituto Tecnológico de Conkal. *Alternaria alternata* and *Curvularia lunata* were originally isolated from *Chamaedorea elegans*, and in turn, *Helminthosporium rostratum* was isolated from *Heliconia wagneriana*. Antagonistic activity was evaluated by the inhibition of fungal colony growth in direct confrontation and by inhibition of conidial germination using the *Bacillus* culture filtrates.

Bioassays of direct confrontation were carried out in potato-dextrose-agar (PDA) medium. Briefly, discs of PDA (5 cm diameter) from axenic fungal culture were inoculated in the center of a 15 cm diameter Petri dish with PDA. Spore suspensions (1x10⁷ CFU mL⁻¹) of *Bacillus* strains were obtained in sterilized distilled water by scraping with sterile scalpel blade 5-day-old bacterial cultures grown in NA. Bacterial spore suspensions were inoculated 2 cm from the margin of PDA discs that contained the fungal culture. All control fungal colonies were not confronted with the antagonists. Petri dishes with fungal cultures were incubated at 30 °C. The inhibition of radial growth of fungal colony was daily evaluated and the percentage of mycelial growth inhibition was calculated with respect to the

MATERIALES Y METODOS

Aislamiento de cepas de *Bacillus*

Las cepas se aislaron de muestras de suelos obtenidas en la Península de Yucatán en México. Las muestras de suelos se recolectaron en áreas con vegetación natural al raspar material de superficie con una espátula esterilizada y se obtuvieron muestras de unos 200 g de una profundidad de 10 a 20 cm. Todas las muestras se colocaron en bolsas de plástico esterilizadas y almacenadas a 4 °C hasta ser procesadas. El aislamiento se realizó usando la metodología descrita por Basurto-Cadena *et al.* (2012). Brevemente, 1 g de cada muestra se suspendió en 10 mL agua destilada estéril y pasteurizó a 80 °C por 20 min. Luego, 50 µL de la suspensión se colocaron en tubos de microcentrífuga con 500 µL de agua destilada.

Alícuotas de 50 µL de las suspensiones diluidas fueron dispersadas por duplicado sobre una capa delgada de agar nutritivo (AN) (Merck, Alemania) en cajas de Petri. La incubación se realizó en condiciones aeróbicas a 30 °C por 48 h. Después de la incubación, las colonias semejantes a *Bacillus*, identificadas de manera aproximada según su morfología, se transfirieron e incubaron en cajas nuevas de Petri por una semana, bajo las condiciones ya mencionadas, antes de ser almacenadas a 4 °C. Las colonias se contaron y los resultados se expresaron como conteo de bacterias por mililitro (CFU mL⁻¹). Antes de usarse, todos los aislamientos se reactivaron en AN por cinco días.

Evaluación de actividad antagonica

Los hongos fitopatógenos fueron donados amablemente por el Dr. Jairo Cristóbal del Laboratorio de Fitopatología del Instituto Tecnológico de Conkal. *Alternaria alternata* y *Curvularia lunata* fueron aislados originalmente de *Chamaedorea elegans*, y a su vez, *Helminthosporium rostratum* fue aislado de *Heliconia wagneriana*. La actividad antagonica fue evaluada por la inhibición del crecimiento de la colonia fúngica en confrontación directa y por la inhibición de la germinación conidial usando las filtraciones de cultivo de *Bacillus*.

Bioensayos de confrontación directa se realizaron en un medio de papa-dextrosa-agar (PDA). Brevemente, discos de PDA (diámetro de 5 cm) de cultivos axenicos fúngicos se inocularon en el centro de una caja de Petri de 15 cm de diámetro con PDA. Suspensiones de esporas (1x10⁷ CFU mL⁻¹) se obtuvieron de cepas de *Bacillus* en agua destilada estéril al raspar con una hoja de bisturí esterilizada cultivos bacteriales de 5 d de cultivo en AN. Las suspensiones de esporas bacteriales se inocularon a 2 cm del margen de los discos de PDA que contenían el cultivo fúngico. Ninguna de las colonias fúngicas testigo se confrontaron con

control colony according to Korsten and Jager (1995) as follows: $GI(\%) = ((RC - RE)/RC) \times 100$, where GI (%) is the percentage of mycelial growth inhibition, RC is the radius of the fungal colony in the control Petri dish, and RE is the radius of the fungal colony that was confronted with the antagonistic *Bacillus*.

For the bioassays of conidial germination, *Bacillus* strains were cultured in agar broth (BD, USA) for 72 h in an orbital shaker at 150 rpm and 30 °C. Cultures were centrifuged at 7000 g for 10 min and the precipitate (vegetative cells and spores) was discarded. A previous study carried out in our laboratory showed that autoclaved culture filtrates from *Bacillus* spp. revealed antifungal activity on *Colletotrichum gloeosporioides*. Thus, in this study, filtered free-cell culture were autoclaved at 120 °C for 15 min and cooled down before using. Culture filtrates were mixed with conidial suspensions of fungi (1:1 v/v) obtained from colony grown in PDA. Mixture of culture filtrate and conidial suspensions were then inoculated in a PDA plate and observed for 12 h for conidial germination using a light microscope (LEICA DM500°, USA) at 100x magnification. Conidia were counted as germinated when the germ tube had at least the length of the germinated conidia, according to Mahadthanapuk *et al.* (2007).

Extraction of DNA of *Bacillus* strains

All *Bacillus* strains were cultured in Brain Heart Infusion Broth (BHI) (BIOXON, USA) in 10 mL tubes at 30 °C for 48 h. Cultures were centrifuged at 2500 g for 5 min and washed with saline solution (0.85 %). Pellet was collected and supernatant discarded. DNA extraction was carried out with the kit Master Pure® Gram Positive DNA purification (Epicentre Biotechnologies, USA). Briefly, pellet was suspended in 150 µL TE buffer (Tris-EDTA), then added with 1 µL of lizozime ready lyse and incubated at 37 °C for 30 min. Subsequently, 159 µL of proteinase K was added and incubated at 65 °C for 15 min; tubes were agitated every 5 min. Then, tubes were maintained for 2 min at 37 °C, followed by 5 min in ice, to cool down. Samples were precipitated in a 175 µL of MPC (protein precipitation reagent) solution, agitated vigorously and centrifuged at 10 000 g for 10 min. The supernatant was separated and mixed with 1 µL RNase in a new tube. Samples were incubated at 37 °C for 30 min and 500 µL isopropanol was added. Tubes were centrifuged at 10000 x g for 10 min, the supernatant eliminated and the pellet remixed to suspension in 500 µL of ethanol (ETOH 70 %). Tubes were again centrifuged at 13000 x g for 1 min, supernatant eliminated and the pellet remixed to suspension in 35 µL of TE buffer (10 mM Tris-HCl and 1 mM EDTA Na₂, pH 8.0; PROMEGA Corp., USA). The DNA was kept in a freezer at -20 °C. DNA quality was confirmed by agarose gel electrophoresis 1.2 % (87 V for 60 min). Gel was

los antagonistas. Las cajas de Petri con cultivos fúngicos se incubaron a 30 °C. La inhibición de crecimiento radial del cultivo fúngico se evaluó cada día y el porcentaje de crecimiento micelial se calculó con respecto al cultivo testigo, según lo indicado por Korsten y Jager (1995), de la siguiente forma: $GI(\%) = ((RC - RE)/RC) \times 100$, donde GI (%) es el porcentaje de inhibición de crecimiento micelial, RC es el radio del cultivo fúngico en la placa de Petri de control, y RE es el radio del cultivo fúngico que fue confrontado con el antagonista *Bacillus*.

Para las biopruebas de germinación conidial, se cultivaron cepas de *Bacillus* en caldo agar (BD, USA) 72 h en un agitador orbital a 150 rpm y 30 °C. Los cultivos se centrifugaron a 7000 g por 10 min y el precipitado (células vegetales y esporas) se descartó. Un estudio en nuestro laboratorio mostró que las filtraciones de cultivo esterilizado de *Bacillus* spp. revelaban actividad antifúngica en *Colletotrichum gloeosporioides*. Por ello, en este estudio se esterilizó por autoclave y se filtró a 120 °C por 15 min y se dejaron enfriar antes de usarse. Las filtraciones de cultivos fueron mezcladas con suspensiones conidiales de hongos (1:1 v/v) obtenidos de cultivos en PDA. La mezcla de filtraciones de cultivos y suspensiones conidiales se inoculó después en una caja con PDA y observada por 12 h para germinación conidial usando un microscopio óptico (LEICA DM500°, USA) a una magnificación de 100x. Los conidios se contaron como germinados cuando el tubo de germinación alcanzaba, por lo menos, el largo de los conidios germinados, según Mahadthanapuk *et al.* (2007).

Extracción de ADN de cepas de *Bacillus*

Todas las cepas de *Bacillus* fueron cultivadas en un Caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI) (BIOXON, USA) en tubos de 10 mL a 30 °C por 48 h. Los cultivos se centrifugaron a 2500 g por 5 min y lavados con una solución salina (0.85 %). El agregado se juntó y se descartó el flotante. La extracción de DNA se realizó con el kit Master Pure® Gram Positive DNA purification (Epicentre Biotechnologies, USA). Brevemente, se suspendió el agregado en 150 µL amortiguador TE (Tris-EDTA) y se adicionó 1 µL de lisozima ready lyse e incubado a 37 °C por 30 min. Después se agregó 159 µL de proteinasa K y se incubó a 65 °C por 15 min; los tubos se agitaron cada 5 min. Luego los tubos se mantuvieron 2 min a 37 °C, seguido por 5 min en hielo para enfriarlos. Las muestras fueron precipitadas en una solución de 175 µL de MPC (reactivo de precipitación de proteína), agitadas vigorosamente y centrifugadas a 10 000 x g por 10 min. El flotante se separó y se mezcló con 1 µL RNasa en un tubo nuevo. Las muestras se incubaron a 37 °C por 30 min y se agregaron 500 µL de isopropanol. Los tubos se centrifugaron a 10000 x g por 10 min, se eliminó el flotante y el agregado se suspendió con 500 µL de etanol (ETOH 70 %). Los tubos se volvieron a centrifugar

stained with ethidium bromide ($0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$) for 30 min. Image was taken using a photo documentation system (Canon-Biotop, USA).

Polymerase Chain Reaction (PCR) analysis for molecular identification

For molecular identification of the strains, gen amplification by polymerase chain reaction (PCR) was carried out using the partial genes 16S rRNA, species-specific *rpoB* and *gyrA*. The methodology for each case was as follows:

For PCR analysis of 16S rRNA gene, specific primers for the internal portion of the "*B. subtilis* group" 16S rRNA, Bsub5F (5'-AAG TCG AGC GGA CAG ATG G-3') and Bsub3R (5'-CCA GTT CCA ATG ACC CTC CCC-3') were used (Wattiau *et al.*, 2001; Geetha *et al.*, 2007). The reaction mixtures ($25 \mu\text{L}$) consisted of $12.5 \mu\text{L}$ master mix 1X (PROMEGA Corp., USA), $1 \mu\text{L}$ of the primer (0.4 mM) (IDT Technologies, USA), $9.5 \mu\text{L}$ DNase-free water and $1 \mu\text{L}$ genomic DNA. The PCR program consisted of denaturation at 94°C for 12 min, followed by 30 cycles of denaturation at 95°C for 30 s, annealing at 65°C for 2 min, extension at 72°C for 2 min and, a final extension at 72°C for 7 min.

For PCR analysis of *rpoB* gene specific primers corresponding to *B. subtilis* position 6-585; *rpoB*-f (5'-AGG TCA ACT AGT TCA GTA TGG AC-3') and *rpoB*-r (5'-AAG AAC CGT AAC CGG CAA CTT-3') were used (De Clerck *et al.*, 2004; Geetha and Manonmani, 2010). The reaction mix ($25 \mu\text{L}$) consisted of $12.5 \mu\text{L}$ master mix 1X (PROMEGA Corp., USA), $0.5 \mu\text{L}$ primer (0.2 mM) (IDT Technologies, USA), $10.5 \mu\text{L}$ DNase-free water and $1 \mu\text{L}$ genomic DNA. The PCR program consisted of denaturation at 94°C for 2 min, followed by 40 cycles of denaturation at 94°C for 30 s, alignments at 51°C for 45 sec, extension at 68°C for 50 min and, final extension at 68°C for 90 sec.

For PCR analysis *gyrA* gene, specific primers corresponding to *B. subtilis*, position 43-1070; *gyrA*-f (5'-CAG TCA GGA AAT GCG TAC GTC CTT-3') and *gyrA*-r (5'-CAA GGT AAT GCT CCA GGC ATT GCT-3') were used (De Clerck *et al.*, 2004; Geetha and Manonmani, 2008). The PCR reaction mixture ($25 \mu\text{L}$) consisted of $12.5 \mu\text{L}$ master mix 1X (PROMEGA, Corp., USA), $0.5 \mu\text{L}$ primer (10 mM) (IDT Technologies, USA), $10.5 \mu\text{L}$ DNase-free water and $1 \mu\text{L}$ genomic DNA. The PCR program consisted of denaturation at 94°C for 2 min, 40 cycles denaturation at 94°C for 30 s, alignment at 51°C for 45 s, extension at 68°C for 50 min and, a final extension at 68°C for 10 min.

The resulted amplicons were visualized in agarose gel 1.2% , purified with the kit Qiagen QIAquick (Qiagen Corp., USA) and sequenced in both directions using the corresponding primers (Bioscience, San Diego, CA. USA).

a $13000 \times g$ por 1 min, se eliminó el flotante y el agregado se volvió a mezclar y se suspendió con $35 \mu\text{L}$ de amortiguador TE (10 mM Tris-HCl y 1 mM EDTA Na_2 , pH 8.0; PROMEGA Corp., USA). El ADN se mantuvo en un congelador a -20°C . La calidad del se confirmó por electroforesis de gel de agarosa 1.2% (87 V por 60 min). El gel se tiñó con bromuro de etidio ($0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$) por 30 min. Una imagen se tomó con un sistema de fotodocumentación (Canon-Biotop, USA).

Análisis de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la identificación molecular

Para la identificación molecular de las cepas, se usaron los genes parciales 16S rRNA, y los *rpoB* y *gyrA*, específico de especies. La metodología para cada caso fue la siguiente:

Para el análisis de PCR del gen 16S rRNA se usaron iniciadores específicos para la región interna del "grupo *B. subtilis*" 16S rRNA, Bsub5F (5'-AAG TCG AGC GGA CAG ATG G-3') y Bsub3R (5'-CCA GTT CCA ATG ACC CTC CCC-3') (Wattiau *et al.*, 2001; Geetha *et al.*, 2007). Las mezclas de reacción ($25 \mu\text{L}$) consistieron de $12.5 \mu\text{L}$ mezcla maestra 1X (PROMEGA Corp., USA), $1 \mu\text{L}$ del iniciador (0.4 mM) (IDT Technologies, USA), $9.5 \mu\text{L}$ agua libre de ADNasa y $1 \mu\text{L}$ ADN genómico. El programa de PCR consistió de desnaturalización a 94°C por 12 min, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 s, alineamiento a 65°C por 2 min, extensión a 72°C por 2 min y una extensión final a 72°C por 7 min.

Para el análisis de PCR del gen *rpoB*, se usaron iniciadores específicos correspondientes a *B. subtilis* posición 6-585; *rpoB*-f (5'-AGG TCA ACT AGT TCA GTA TGG AC-3') y *rpoB*-r (5'-AAG AAC CGT AAC CGG CAA CTT-3') (De Clerck *et al.*, 2004; Geetha y Manonmani, 2010). La mezcla de reacción ($25 \mu\text{L}$) consistió de $12.5 \mu\text{L}$ mezcla maestra 1X (PROMEGA Corp., USA), $0.5 \mu\text{L}$ iniciador (0.2 mM) (IDT Technologies, USA), $10.5 \mu\text{L}$ agua libre de ADNasa y $1 \mu\text{L}$ de ADN genómico. El programa de PCR consistió de desnaturalización a 94°C por 12 min, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 s, alineamiento a 51°C por 45 seg, extensión a 68°C por 50 min y extensión final a 68°C por 90 seg.

Para el análisis de PCR del gen *gyrA*, se usaron iniciadores específicos correspondientes a *B. subtilis*, posición 43-1070; *gyrA*-f (5'-CAG TCA GGA AAT GCG TAC GTC CTT-3') y *gyrA*-r (5'-CAA GGT AAT GCT CCA GGC ATT GCT-3') (De Clerck *et al.*, 2004; Geetha y Manonmani, 2008). La mezcla de reacción de PCR ($25 \mu\text{L}$) consistió en $12.5 \mu\text{L}$ de mezcla maestra 1X (PROMEGA, Corp., USA), $0.5 \mu\text{L}$ iniciador (10 mM) (IDT Technologies, USA), $10.5 \mu\text{L}$ agua libre de ADNasa y $1 \mu\text{L}$ ADN genómico. El programa de PCR consistió en la desnaturalización a 94°C por 2 min, 40 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 s, alineamiento a 51°C por 45 s, extensión a 68°C por 50 min y una extensión final a 68°C por 10 min.

Phylogenetic analysis

Gene sequences were edited and aligned with the software BioEdit version 7.1.3.0 (Hall, 1999). To obtain the identity, the sequences were compared with those of the database from GenBank (National Center for Biotechnology Information), using the program BLASTN (Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool). All sequences were deposited in the GenBank.

To study the relationship of the isolates with other members of the genus *Bacillus*, sequences of the regions used for each gene were obtained from GenBank and multiple alignments were carried out in the program CLUSTALW (Larkin *et al.*, 2007). The evolutionary model for each gene was estimated and the analyses of Neighbor-Joining with Bootstrap of 1000 replicates were carried out in the program MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) 5 (Tamura *et al.*, 2011).

A matrix of partitions, with the sequences of the three analyzed regions, was built. The homogeneity test suggested that the three regions show a similar phylogenetic signal; therefore, a combined of such partitions may be built. *Bacillus sonorensis* as external group was used. The analysis of Neighbor-Joining was carried out with analysis Bootstrap of 1000 replicates. A matrix of evolutionary distances was built using the program MEGA 5 to determine the highest evolutionary rate of the analyzed region.

Data analysis

Experimental data were statistically analyzed using ANOVA with a completely randomized design. The Tukey test was used to determine significant differences among means ($p \leq 0.05$), using SAS 9.1. Unless otherwise indicated, all measurements were carried out in triplicate. Prior to run, data in percent were transformed to arcsin [$y = \arcsin(\sqrt{x/100})$].

RESULTS AND DISCUSSION

Antagonistic activity of the *Bacillus* strains on three plant pathogenic fungi

The antagonistic activity of the strains by direct confrontation and by the use of the cell-free culture filtrate was evaluated in three plant pathogenic fungi: *Alternaria alternata*, *Helminthosporium rostratum* and *Curvularia lunata*. The strains used in this were molecularly identified as *B. subtilis* subsp. *inaquosorum* and *B. subtilis* subsp. *subtilis*. The results showed that the percentage of mycelial growth inhibition ranged from 32 to 78 % (Table 1). Moreover, the strain CBK36 presented the

Los amplicones resultantes fueron visualizados en gel de agarosa 1.2 %, purificados con el kit Qiagen QIAquick (Qiagen Corp., USA) y secuenciados en ambas direcciones usando los iniciadores correspondientes (Bioscience, San Diego, CA. USA).

Análisis filogenético

Las secuencias génicas se editaron y alinearon con el software BioEdit versión 7.1.3.0 (Hall, 1999). Para obtener la identidad, las secuencias se compararon con las de la base de datos del GenBank (Centro Nacional para la Información de Biotecnología); usando el programa BLASTN (Herramienta Búsqueda Básica de Alineamiento de Nucleótidos). Todas las secuencias se depositaron en el GenBank.

Para estudiar la relación de los aislamientos con otros miembros del género *Bacillus*, se obtuvieron secuencias de las regiones usadas para cada gen en el GenBank y se realizaron múltiples alineamientos en el programa CLUSTALW (Larkin *et al.*, 2007). El modelo evolutivo para cada gen fue estimado y los análisis de Neighbor-Joining con Bootstrap de 1000 repeticiones se realizaron en el programa MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) 5 (Tamura *et al.*, 2011).

Una matriz de particiones se construyó con las secuencias de las tres regiones analizadas. La prueba de homogeneidad sugirió que las tres regiones muestran una señal filogenética similar; por lo tanto, una combinación de tales particiones se puede construir. *Bacillus sonorensis* se usó como grupo externo. El análisis Neighbor-Joining se realizó con un análisis Bootstrap de 1000 repeticiones. Una matriz de distancias evolutivas se construyó usando el programa MEGA 5 para determinar la tasa evolutiva más alta según la región analizada.

Análisis de datos

Los datos experimentales se analizaron estadísticamente usando ANDEVA con un diseño completamente al azar. La prueba de Tukey se utilizó para determinar diferencias significativas entre promedios ($p \leq 0.05$), usando SAS 9.1. A menos que se indique lo contrario, todas las medidas se realizaron por triplicado. Antes del análisis, los datos en porcentajes fueron transformados en arcoseno [$y = \arcseno(\sqrt{x/100})$].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Actividad antagónica de cepas de *Bacillus* cepas sobre tres hongos fitopatógenos

La actividad antagónica de las cepas por confrontación directa y por el uso de los filtrados de cultivos

Table 1. Effects of *Bacillus* strains on the percentage of mycelial growth inhibition of three plant pathogenic fungi.
Cuadro 1. Efectos de cepas de *Bacillus* sobre el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial en tres hongos fitopatógenos.

<i>Bacillus</i> strains	Inhibition of conidial germination (%)		
	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Curvularia lunata</i>	<i>Helminthosporium rostratum</i>
CBCK36	71.9 ± 1.3 a	64.4 ± 5.3 ab	78.3 ± 3.5 a
CBCC2	65.1 ± 1.0 a	70.8 ± 4.1 a	50.0 ± 3.7 b
CBCK47	64.1 ± 1.6 b	75.8 ± 0.0 ab	56.6 ± 3.1 ab
CBMN22	63.0 ± 1.0 b	73.7 ± 3.6 ab	48.3 ± 4.0 b
CBRF24	53.3 ± 2.2 c	78.3 ± 3.4 a	32.1 ± 0.1 b
CBMT2	48.7 ± 1.6 c	68.3 ± 1.8 ab	33.3 ± 6.4 b
CBMT51	38.2 ± 1.1 d	59.5 ± 5.4 b	36.9 ± 3.0 b
CV	5.7	13.3	29.3
HSD	6.6	18.7	28.2

Mean values (± standard errors) in a column followed by different letters are significantly different (Tukey; $p \leq 0.05$). CV(%): Coefficient of variation, HSD: Tukey's Honest Significant Differences ♦ Valores promedio (± errores estándar) en una columna seguidos de diferentes letras son estadísticamente diferentes (Tukey; $p \leq 0.05$). CV (%): Coeficiente de variación; DSH: Diferencia Significativa Honesta de Tukey.

highest activity, causing more than 60 % inhibition of mycelial growth among the three evaluated fungi. In contrast, the strain CBMT51 showed the lowest effect, less than 40 % inhibition of colony growth in two of the tested fungi (Table 1).

The antagonistic activity of *B. subtilis* on plant pathogenic fungi is reported in literature. *In vitro* effects, specifically on mycelial growth and conidial germination are reported. *In vivo* effects are also reported, particularly on incidence and severity of foliar spots and blights, postharvest fruit rots and root rots (Chaurasia *et al.*, 2005; Guillén-Cruz *et al.*, 2006; Zongzheng *et al.*, 2009; Basurto-Cardena *et al.*, 2012).

The effect of culture filtrates on conidial germination of the fungi showed significant differences ($p \leq 0.05$). Culture filtrate of the strains CBCK36, CBMN22 and CBRF24 caused up to 37 % inhibition of conidial germination in at least two of the evaluated fungi. The culture filtrates of the strains CBCC2 and CBCK47 caused up to 46 % inhibition of conidial germination in *A. alternata*, but their effects on the other two fungi were lower (Table 2).

Moreover, the culture filtrate of this strain showed also one of the highest effects on conidial germination of the evaluated fungi, which suggest that part of its activity is mediated by the production of antifungal compounds. Culture filtrates of *B. subtilis* have suppressed the mycelial growth as well

libres de células se evaluó en tres hongos fitopatógenos: *Alternaria alternata*, *Helminthosporium rostratum* y *Curvularia lunata*. Las cepas usadas en este estudio se identificaron molecularmente como *B. subtilis* subsp. *inaquosorum* y *B. subtilis* subsp. *subtilis*. Los resultados mostraron que el porcentaje de inhibición de crecimiento micelial varió de 32 a 78 % (Cuadro 1). Además, la cepa CBK36 presentó la mayor actividad, causando más de 60 % de inhibición de crecimiento micelial entre los tres hongos evaluados. En contraste, la cepa CBMT51 presentó el efecto más bajo, menos de 40 % de la inhibición de crecimiento colonial en dos de los hongos examinados (Cuadro 1).

La actividad antagónica de *B. subtilis* sobre los hongos fitopatógenos está reportada en la literatura. Efectos *in vitro*, están documentados específicamente en crecimiento micelial y germinación de conidios. También hay efectos *in vivo*, en particular en la incidencia y severidad de manchas foliares y mildiú, pudrición poscosecha de frutas y raíces (Chaurasia *et al.*, 2005; Guillén-Cruz *et al.*, 2006; Zongzheng *et al.*, 2009; Basurto-Cardena *et al.*, 2012).

El efecto de filtrados de cultivos sobre la germinación de conidios de los hongos mostró diferencias significativas ($p \leq 0.05$). Los filtrados de las cepas CBCK36, CBMN22 y CBRF24 causaron hasta 37 % de la inhibición de la germinación de conidios en al menos dos de los hongos evaluados. Los filtrados de las cepas CBCC2 y CBCK47 causaron hasta 46 % de la inhibición de la germinación de conidios en

Table 2. Effect of the *Bacillus* culture filtrates on the inhibition of conidial germination in three plant pathogenic fungi. Cuadro 2. Efecto de los filtrados de *Bacillus* sobre la inhibición de la germinación conidial en tres hongos fitopatógenos.

<i>Bacillus</i> strains	Inhibition of conidial germination (%)		
	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Curvularia lunata</i>	<i>Helminthosporium rostratum</i>
CBCK47	45.9 ± 4.5 ^a	14.9 ± 1.6 ^b	18.0 ± 7.7 ^{abc}
CBCC2	40.1 ± 3.8 ^{ab}	17.6 ± 3.5 ^{ab}	4.2 ± 1.9 ^{bc}
CBRF24	36.6 ± 3.9 ^{ab}	14.4 ± 1.7 ^b	26.7 ± 7.0 ^a
CBCK36	32.2 ± 3.4 ^{ab}	24.8 ± 3.0 ^a	7.4 ± 2.4 ^{abc}
CBMN22	25.7 ± 2.9 ^b	16.5 ± 1.5 ^{ab}	21.0 ± 3.8 ^{ab}
CBMT51	0.0 ± 0.0 ^c	0.0 ± 0.0 ^c	18.1 ± 3.1 ^{abc}
CBMT2	0.0 ± 0.0 ^c	0.0 ± 0.0 ^c	0.0 ± 0.0 ^c
CV	37.4	39.8	81.1
HSD	17.4	9.1	20.0

Mean values (± standard errors) in a column followed by different letters are significantly different (Tukey; $p \leq 0.05$). CV (%) = Coefficient of variation; HSD = Tukey's Honest Significant Differences ♦ Valores promedios (± errores estándar) es una columna seguidos de diferentes letras son estadísticamente diferentes (Tukey; $p \leq 0.05$). CV (%) = Coeficiente de variación; DSH = Diferencia Significativa Honesta de Tukey.

as the conidial germination of plant pathogenic fungi (Zongzheng *et al.*, 2009; Islam *et al.*, 2012). Notice that particularly the culture filtrates of the strains CBCK36, CBCC2 and CBCK47 showed more than 30 % inhibition of conidial germination at least in one of the tested fungi. As these culture filtrates were autoclaved prior to use, the antifungal compounds responsible for the effects were heat resistant. The identities of these compounds were not determined in this study, but we might hypothesize that heat resistant lipopeptides are likely involved. Heat resistant antifungal lipopeptides, like iturins, were extracted from the culture media of various strains of *B. subtilis* (Rezuanul *et al.*, 2012). Indeed, culture filtrates containing heat resistant antifungal compounds were used to suppress the incidence and severity of fungal disease *in vivo* (Cubeta *et al.*, 1985).

PCR amplification and phylogenetic analysis

To confirm the identity of the *Bacillus* isolates, sequence of partial regions of the 16S rRNA, *gyrA* and *rpoB* genes were obtained by PCR. Amplification of the hyper variable region of 16S rRNA, species-specific *gyrA* and *rpoB* genes of the seven *Bacillus* strains yielded amplicons of the 535 bp, 960-1005 bp and 546 bp, respectively (Figure 1).

On the basis of this analysis all the isolates were placed taxonomically as *B. subtilis* subsp. *inaquosorum* and *B. subtilis* subsp. *subtilis* on phylogenetic trees. Chun and Bae (2000) showed the use of the *rpoB*

A. alternata, aunque sus efectos sobre otros dos los hongos fueron menores (Cuadro 2).

Además, el filtrado de esta cepa también mostró uno de los mayores efectos sobre la germinación de conidios de los hongos evaluados, lo cual sugiere que parte de su actividad es mediada por la producción de compuestos antifúngicos. Los filtrados de *B. subtilis* reprimen el crecimiento micelial, así como la germinación conidial de los hongos fitopatógenos (Zongzheng *et al.*, 2009; Islam *et al.*, 2012). En especial, los filtrados de las cepas CBCK36, CBCC2 y CBCK47 mostraron más de 30 % de inhibición de la germinación de conidios en al menos uno de los hongos estudiados. Al ser estos filtrados esterilizados antes de ser usados, los compuestos antifúngico responsables de los efectos mostraron resistencia al calor. Las identidades de estos compuestos no se determinaron en este estudio, aunque se podría dar una hipótesis de que los lipopéptidos resistentes al calor estén involucrados. Hay lipopéptidos antifúngicos resistentes al calor, como iturinas, extraídos del medio de cultivo de varias cepas de *B. subtilis* (Rezuanul *et al.*, 2012). En efecto, los filtrados de cultivo que contienen compuestos antifúngico resistentes al calor se han usado para disminuir la incidencia y severidad de enfermedades fúngicas *in vivo* (Cubeta *et al.*, 1985).

Amplificación de PCR y análisis filogenético

Para confirmar la identidad de los aislados de *Bacillus*, se obtuvieron secuencias de regiones

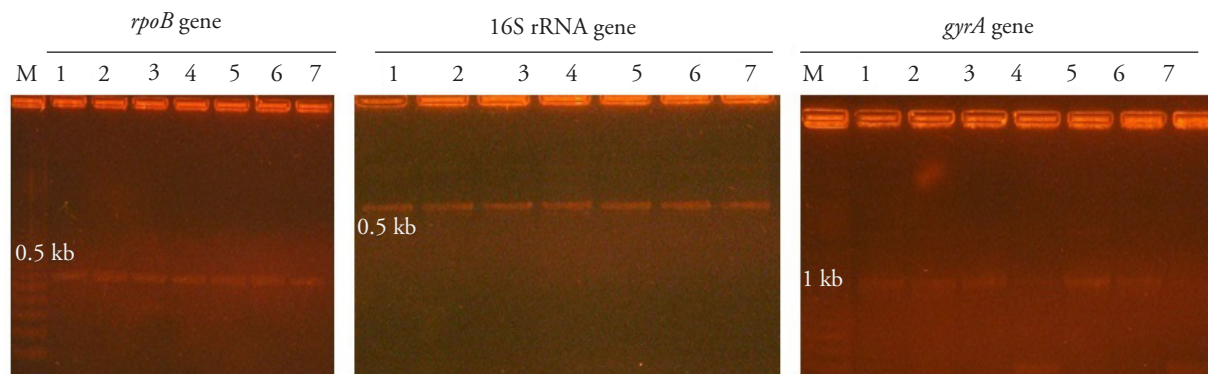


Figure 1. Agarose gel (1.2 %) electrophoresis of the PCR amplification of *rpoB* DNA, 16S rRNA and *gyrA* DNA genes of seven native *Bacillus subtilis*. Lane M: 1 kb ladder Promega, 1: CBCC2, 2: CBMT2, 3: CBMN22, 4: CBRF24, 5: CBCK36, 6: CBCK47 and 7: CBMT51.

Figura 1. Gel de agarosa (1.2 %) electroforesis de la amplificación por PCR de los genes *rpoB* DNA, 16S rRNA y *gyrA* DNA de siete *Bacillus subtilis* nativas. Carriles M: marcador Promega 1 kb, 1: CBCC2, 2: CBMT2, 3: CBMN22, 4: CBRF24, 5: CBCK36, 6: CBCK47 and 7: CBMT51.

gene sequences in *Bacillus*. Later, Geetha and Manonmani (2010) also showed the utility of this gene sequence to identify the isolate *B. subtilis* subsp. *subtilis* VCRC B471. The protein *rpoB* was also used to infer relationships among archaea orders and Gram positive and Gram-negative bacteria (Matte-Tailliez *et al.*, 2002; Morse *et al.*, 2002).

The highest BLASTN identity of each of the strain was confirmed and also the genus identity of *Bacillus subtilis* group (Table 3). The gene sequences 16S rRNA, *rpoB* and *gyrA*-based PCR had values in a range of 95 to 100 %, similar to those deposited in Genbank (Table 3).

The amplicons obtained for regions 16S rRNA, *rpoB* and *gyrA* were 535, 546 and 953 bp, respectively. The Neighbor-Joining analyses of each of the regions (Figures 2, 3 and 4) and the total evidence (Figure 5) showed that the isolates were separated into two clades. In all analyses, the isolates CBRF24 and CBMT2 were grouped in a different clade. Using the 16S rRNA region, the strains CBMT2, CBMN22, CBCK36, CBMT51 and CBCK47 formed a clade (Figure 2), with sequences of *B. subtilis* taken from GenBank. These isolates formed a clade with stand of 100 with *B. subtilis* subsp. *subtilis*; while with the analysis performed using the regions *gyrA* and *rpoB*, the mentioned strains formed a clade with *B. subtilis* subsp. *inaquosorum*.

The analysis of matrix partitions separated the isolates into two distinct clades, forming a clade with

parciales de los genes 16S rRNA, *gyrA* y *rpoB* por PCR. La amplificación de la región hipervariable de 16S rRNA, genes especie específicos *gyrA* y *rpoB* de las siete cepas de *Bacillus* produjeron amplicones de 535 pb, 960-1005 pb y 546 bp, respectivamente (Figura 1).

De acuerdo con este análisis, todos los aislados fueron colocados taxonómicamente como *B. subtilis* subsp. *inaquosorum* y *B. subtilis* subsp. *subtilis* en árboles filogenéticos. Chun y Bae (2000) mostraron el uso de las secuencias genéticas de *rpoB* en *Bacillus*. Luego, Geetha y Manonmani (2010) también mostraron la utilidad de esta secuencia genética para identificar el aislado *B. subtilis* subsp. *subtilis* VCRC B471. La proteína *rpoB* también se usó para inferir relaciones entre órdenes arquea y bacterias Gram positiva y Gram negativa (Matte-Tailliez *et al.*, 2002; Morse *et al.*, 2002).

La máxima identidad BLASTN de cada cepa y del género del grupo *Bacillus subtilis* fue confirmada (Cuadro 3). Las secuencias de PCR basados en los genes 16S rRNA, *rpoB* y *gyrA* tenían valores en el rango de 95 a 100 %, similares a los depositados en Genbank (Cuadro 3).

Los amplicones obtenidos para las regiones 16S rRNA, *rpoB* y *gyrA* fueron 535, 546 y 953 bp, respectivamente. Los análisis Neighbor-Joining de cada una de las regiones (Figuras 2, 3 y 4) y la evidencia total (Figura 5) mostraron que los aislados fueron separados en dos clados. En todos los análisis, los aislados

Table 3. Maximum identity values (%) of identified *Bacillus* strains based on the analysis of 16S rRNA, *gyrA* and *rpoB* genes.
Cuadro 3. Valores máximos de identidad (%) de cepas de *Bacillus* identificadas con base en el análisis de los genes 16S rRNA, *gyrA* y *rpoB*.

Gene	Strain	Accession no.	Identity	Maximum identity (%)
16S rRNA	CBCC2	KC223570	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i> (= <i>B. inaquosus</i>)	100
	CBMT2	KC223571	<i>Bacillus subtilis</i>	100
	CBMN22	KC223572	<i>Bacillus subtilis</i>	100
	CBRF24	KC223573	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i>	100
	CBCK36	KC223574	<i>Bacillus subtilis</i>	100
	CBCK47	KC223575	<i>Bacillus subtilis</i>	100
	CBMT51	KC223576	<i>Bacillus subtilis</i>	100
<i>gyrA</i>	CBCC2	KC253388	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i>	96
	CBMT2	KC253389	<i>Bacillus subtilis</i>	96
	CBMN22	KC253390	<i>Bacillus subtilis</i>	99
	CBRF24	KC253391	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i>	99
	CBCK36	KC253392	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i>	95
	CBCK47	KC253393	<i>Bacillus subtilis</i>	99
	CBMT51	KC253394	<i>Bacillus subtilis</i>	99
<i>rpoB</i>	CBCC2	KC253395	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	99
	CBMT2	KC253396	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	99
	CBMN22	KC253397	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	100
	CBRF24	KC253398	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	99
	CBCK36	KC253399	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	99
	CBCK47	KC253400	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	99
	CBMT51	KC253401	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	99

CBRF24 and CBMT2, completely independent of the other strains (Figure 5). Amplification, sequencing and sequence analysis of 16S rRNA, *rpoB* and *gyrA* genes for molecular identification of *Bacillus* species are reported only in separate studies (Geetha *et al.*, 2007; Geetha and Manonmani, 2008; Geetha and Manonmani, 2010). In our research, however, the first sequence analysis of 16S rRNA, *gyrA* and *rpoB* genes to locate taxonomically seven native strains of *B. subtilis* was successfully integrated. This molecular technique allowed us to infer the species of *Bacillus* and the existence of two new subspecies. Although 16S rRNA gene sequence was very useful for the determination of bacterial species, in the genus *Bacillus* some problems have arisen (Wattiau *et al.*, 2001; Janda *et al.*, 2007).

Evolutionary distance matrices

The region that showed lower evolutionary distances was the 16S rRNA (from zero to 0.002) followed by the *rpoB* gene (up to 0.004). In contrast,

CBRF24 y CBMT2 se agruparon en un clado diferente. Al usar la región 16S rRNA, las cepas CBMT2, CBMN22, CBCK36, CBMT51 y CBCK47 formaron un clado (Figura 2), con secuencias de *B. subtilis* tomadas de GenBank. Estos aislados formaron un clado con valor de 100 con *B. subtilis* subsp. *subtilis*; mientras que con el análisis realizado usando las regiones *gyrA* y *rpoB*, las cepas mencionadas formaron un clado con *B. subtilis* subsp. *inaquosorum*.

El análisis de particiones de matrices separaron los aislados en dos clados distintos, formando un clado con CBRF24 y CBMT2, completamente independiente de las otras cepas (Figura 5). La amplificación, secuenciación y el análisis de secuencias de los genes 16S rRNA, *rpoB* y *gyrA* para la identificación molecular de especies de *Bacillus* sólo están reportados en estudios separados (Geetha *et al.*, 2007; Geetha y Manonmani, 2008; Geetha y Manonmani, 2010). Sin embargo, en nuestra investigación, el primer análisis de secuencias de los genes 16S rRNA, *gyrA* y *rpoB* para ubicar taxonómicamente a siete cepas nativas de *B. subtilis* se integró de manera exitosa. Esta

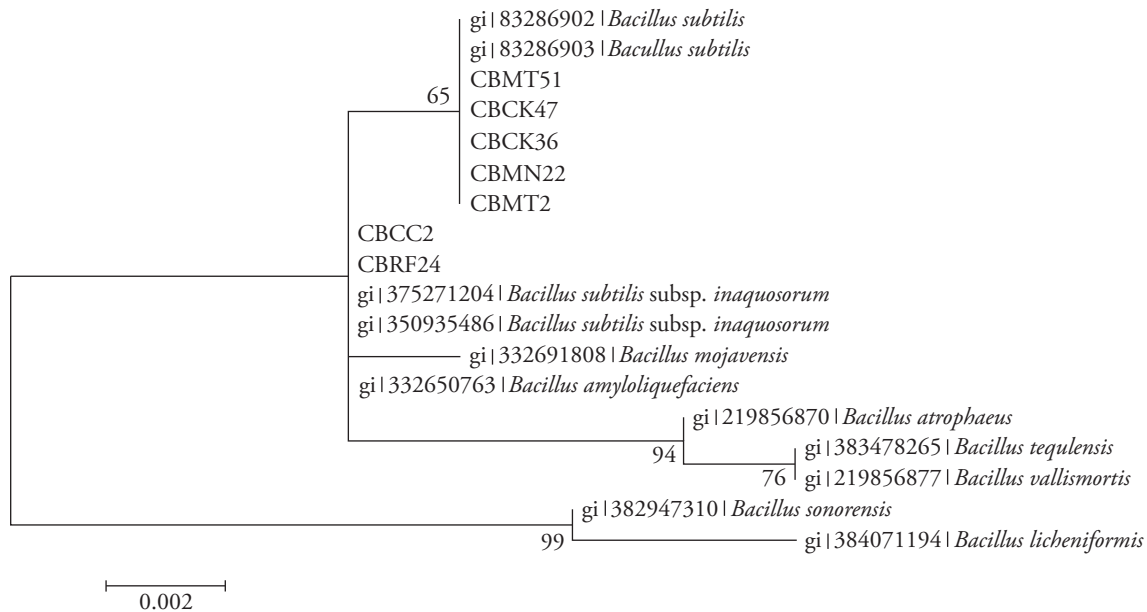


Figure 2. Neighbor-joining tree with bootstrap values based on partial sequences of the 16S rRNA gene. Analysis made with a nucleotide substitution model of Jukes-Cantor.

Figura 2. Árbol Neighbor-joining con valores bootstrap basados en secuencias parciales del gen 16S rRNA. Análisis realizado con un modelo de sustitución nucleotídica Jukes-Cantor.

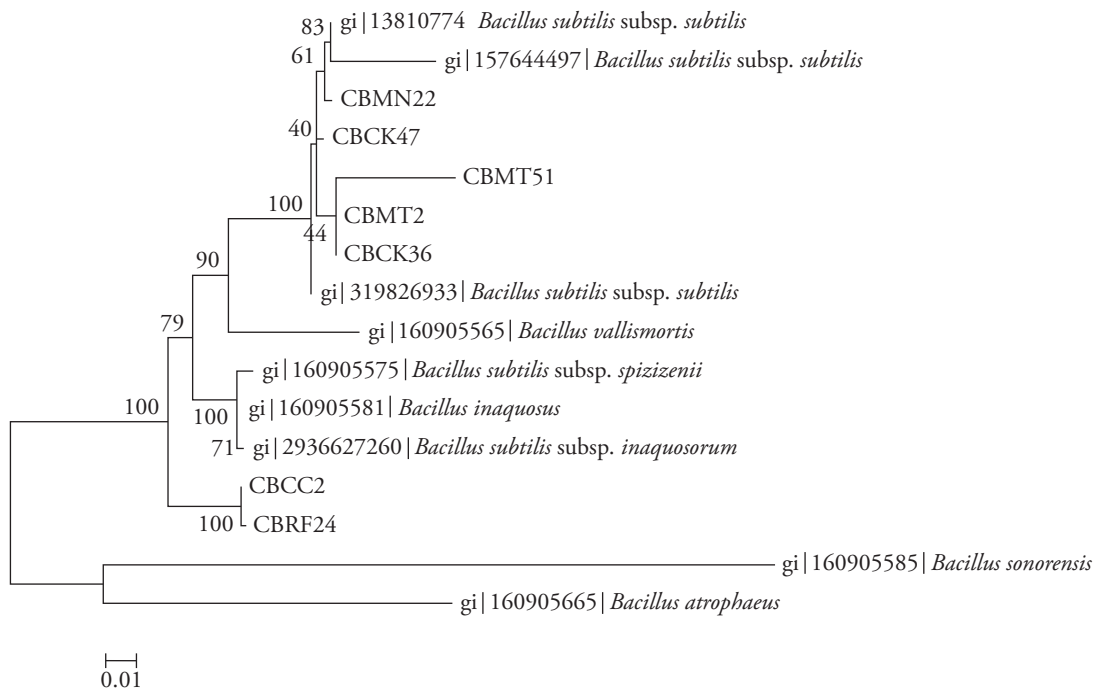


Figure 3. Neighbor-Joining tree with bootstrap values based on partial sequences of the *gyrA* gene. Analysis made with a nucleotide substitution model of Tamura-Nei with discrete gamma distribution.

Figura 3. Árbol Neighbor-joining con valores bootstrap basados en secuencias parciales del gen *gyrA*. Análisis realizado con un modelo de sustitución nucleotídica Tamura-Nei con distribución gamma discreta.

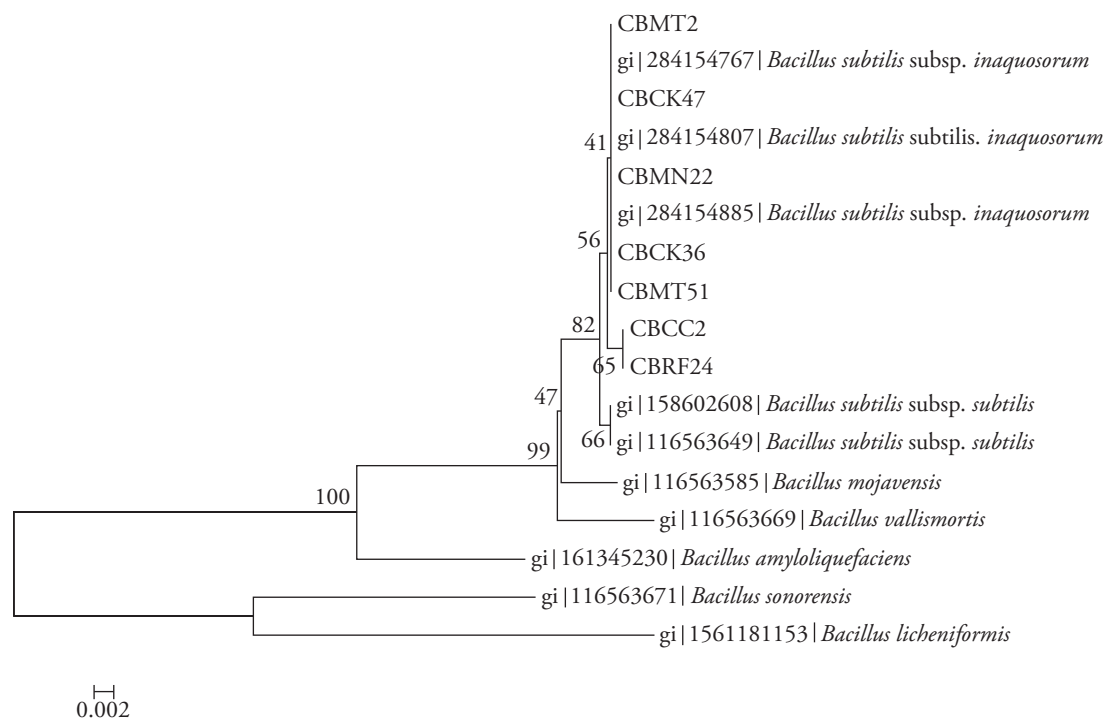


Figure 4. Neighbor-Joining tree with bootstrap values based on partial sequences *rpoB* gene. Analysis made with a nucleotide substitution model of Tamura-3 parameter using discrete gamma distribution.

Figura 4. Árbol Neighbor-joining con valores bootstrap basados en secuencias parciales del gen *rpoB*. Análisis realizado con un modelo de sustitución nucleotídica Tamura-3 parámetro usando una distribución gamma discreta.

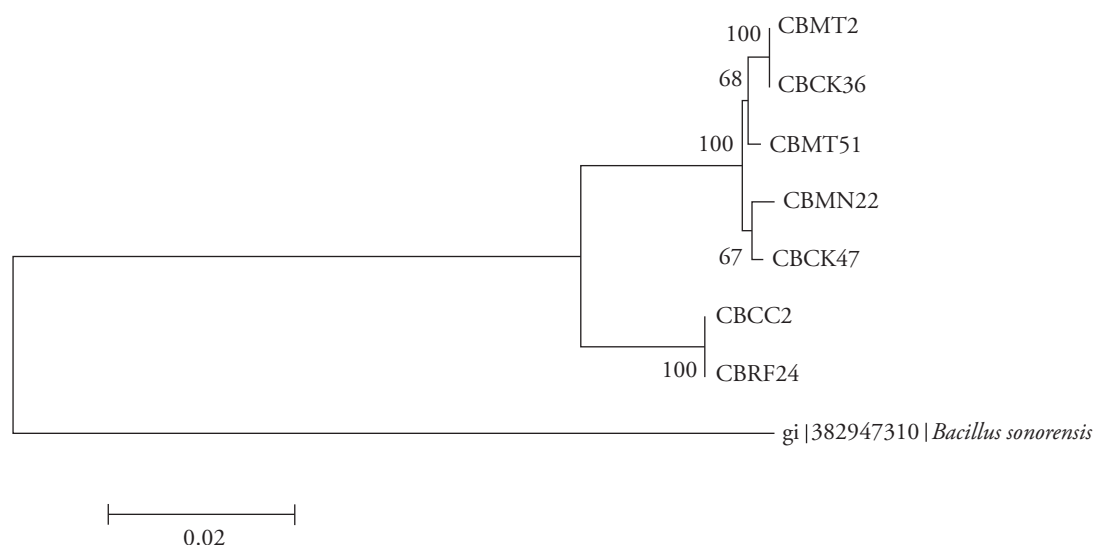


Figure 5. Neighbor-Joining tree with bootstrap values based on partial sequences of the 16S rRNA, *gyrA* and *rpoB* genes. Analysis made with a nucleotide substitution model of Tamura-3 parameter using discrete gamma distribution.

Figura 5. Árbol Neighbor-joining con valores bootstrap basados en secuencias parciales de los genes 16S rRNA, *gyrA* y *rpoB*. Análisis realizado con un modelo de sustitución nucleotídica Tamura-3 parámetro usando una distribución gamma discreta.

the *gyrA* gene showed the highest evolutionary rate (up to 0.09), being even higher than that obtained from the matrix partitions, which includes information from the three regions analyzed (0.034 maximum).

The greatest distances were observed between the isolates CBRF24 and CBMT2. Thus, for the 16S rRNA, the proper determination of the *B. subtilis* subspecies could be difficult. In contrast, for the *gyrA* gene, its higher evolutionary rate allowed to allocate *B. subtilis* at the subspecies level. In particular, the comparative analysis of *gyrA* sequences proved to be robust for rapid classification and identification of *B. subtilis* and related taxa (Chun and Bae, 2000), as shown in our study. The characterization of all strains at the subspecies level was not possible with the data obtained. The strains CBMT2 and CBRF24 might eventually form new subspecies, since the rest of the strains were grouped into clades with different subspecies.

CONCLUSIONS

The native *Bacillus* strains from the Yucatan Peninsula, Mexico, were identified as *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* and *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* by the analysis of gene: 16S rRNA, *gyrA* and *rpoB*. Seven strains showed antagonistic activity on mycelial growth inhibition of the plant pathogenic fungi *Alternaria alternata*, *Helminthosporium rostratum* and *Curvularia lunata*. The cell-free culture filtrates of CBCK36, CBCC2 and CBCK47 strains showed inhibition of mycelial growth and caused different degree of inhibition of conidial germination in the evaluated plant pathogenic fungi. The strain CBCK36 showed the highest activity on inhibition of fungal mycelial growth.

LITERATURE CITED

- Adesemoye, A. O., M. Obini, and E. O. Ugoji. 2008. Comparison of plant growth promotion with *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus subtilis* in three vegetables. *Braz. J. Microbiol.* 36: 423-426.
- Agrios, G. N. 2005. *Plant Pathology*. Elsevier Academic Press, San Diego, California, USA. 903 p.
- Ajao, A. T., G. B. Adebayo, and S. E. Yakubu. 2011. Bioremediation of Textile Industrial Effluent using mixed culture of *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus subtilis* immobilized on agar-agar in a Bioreactor. *J. Microbiol. Biotech. Res.* 1: 50-56.
- técnica molecular nos permitió inferir las especies de *Bacillus* y la existencia de dos nuevas subespecies. Aunque la secuencia genética 16S rRNA fue muy útil para determinar las especies bacteriales, en el género *Bacillus* han surgido algunos problemas (Wattiau *et al.*, 2001; Janda *et al.*, 2007).

Matrices de distancia evolutiva

La región que presentó las distancias evolutivas menores fue el 16S rRNA (de cero a 0.002), seguida del gen *rpoB* (hasta 0.004). En contraste, el gen *gyrA* mostró la tasa evolutiva mayor (hasta 0.09), resultando incluso más alta que la obtenida por las particiones de matrices, que incluye información de las tres regiones analizadas (0.034 máximo).

Las distancias mayores observadas fueron entre los aislados CBRF24 y CBMT2. Así, para el 16S rRNA, una determinación adecuada de la subespecie *B. subtilis* podría resultar difícil. En contraste, para el gen *gyrA*, su tasa evolutiva más alta permitió colocar a *B. subtilis* en el nivel de subespecie. En particular, el análisis comparativo de secuencias de *gyrA* probó ser robusto para una clasificación e identificación rápida *B. subtilis* y taxones relacionados (Chun y Bae, 2000), como lo muestra nuestro estudio. La caracterización de todas las cepas a nivel de subespecie no fue posible con los datos obtenidos. Las cepas CBMT2 y CBRF24 podrían, a la larga, formar nuevas subespecies, porque las demás cepas se agruparon en clados con diferentes subespecies.

CONCLUSIONES

Las cepas de *Bacillus* nativas de la Península de Yucatán, México, fueron identificadas como *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* y *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* por el análisis de los genes 16S rRNA, *gyrA* y *rpoB*. Siete cepas presentaron actividad antagónica en la inhibición de crecimiento micelial en los hongos fitopatógenos *Alternaria alternata*, *Helminthosporium rostratum* y *Curvularia lunata*. Los filtrados libres de células de CBCK36, CBCC2 y CBCK47 presentaron inhibición de crecimiento micelial y causaron diferentes grados de inhibición de germinación de conidios en los hongos fitopatógenos evaluados. La cepa CBCK36 presentó la actividad más alta de inhibición de crecimiento fúngico micelial.

- Augusto-Costa, A. C., and F. Pereira-Duta. 2001. Bioaccumulation of copper, zinc, cadmium and lead by *Bacillus* SP., *Bacillus cereus*, *Bacillus speaereus* and *Bacillus subtilis*. Braz. J. Microbiol. 32:1-5.
- Basurto-Cadena, M. G. L., M. Vázquez-Arista, J. García-Jiménez, R. Salcedo Hernández, D. K. Bideshi, and J. E. Barboza-Corona. 2012. Isolation of a new Mexican strain of *Bacillus subtilis* with antifungal and antibacterial activities. Scientific World J. doi:10.1100/2012/384978, 7 p.
- Blasco, C., Y. Picó, J. Mañes, and G. Font. 2002. Determination of fungicide residues in fruits and vegetables by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. J. Chromatogr. 947: 227-235.
- Chaurasia, B., A. Pandey, L. M. S. Palni, P. Trivedi, B. Kumar, and N. Colvin. 2005. Diffusible and volatile compounds produced by an antagonistic *Bacillus subtilis* strain cause structural deformations in pathogenic fungi *in vitro*. Microbiol. Res. 160: 75-81.
- Cubeta, M. A., G. L. Hartman, and J. B. Sinclair. 1985. Interaction between *Bacillus subtilis* and fungi associated with soybeans seeds. Plant Dis. 69:506-509.
- Cubitto, M. A., A. C. Morán, M. Commendatore, M. N. Chiarello, M. D. Baldini, and F. Siñeriz. 2004. Effects of *Bacillus subtilis* O9 biosurfactant on the bioremediation of crude oil-polluted soils. Biodegradation 15: 281-287.
- Chun, J., and K. S. Bae. 2000. Phylogenetic analysis of *Bacillus subtilis* and related taxa based on partial *gyrA* gene sequences. Anton. Leeuw. 78: 123-127.
- De Clerck, E., T. Vanhouette, T. Hebb, J. Geerinck, and P. De Vos. 2004. Isolation, characterization and identification of bacterial contaminants in semifinal gelatin extracts. Appl. Environ. Microb. 70: 3664-3672.
- De Waard, M. A., S. G. Georgopoulos, D. W., Hollomon, H. Ishii, P. Leroux, N. M. Ragsdale, and F. J. Schwin. 1993. Chemical control of plant diseases: problems and prospects. Annu. Rev. Phytopathol. 31: 403-421.
- Fickers, P. 2012. Antibiotic compounds from *Bacillus*: Why are they so amazing? Am. J. Biochem. Biotechnol. 8: 40-46.
- Geetha, I., G. Prabakaran, K. P. Paily, and A. M. Manonmani. 2007. Characterisation of three mosquitocidal *Bacillus* strains isolated from mangrove forest. Biol. Control. 42: 34-40.
- Geetha, I., and A. M. Manonmani. 2008. Mosquito pupicidal toxin production by *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis*. Biol. Control. 44: 242-247.
- Geetha, I., and A. M. Manonmani. 2010. Surfactin: a novel mosquitocidal biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* ssp. *subtilis* (VCRC B471) and influence of abiotic factors on its pupicidal efficacy. Lett. Appl. Microbiol. 51: 406-412.
- González-Fernández, R., E. Prats, and J. Jorrín-Novo. 2010. Proteomics of plant pathogenic fungi. Journal of Biomedicine and Biotechnology. doi:10.1155/2010/932527, 36 p.
- Guillén-Cruz, R., F. D. Hernández-Castillo, G. Gallegos-Morales, R. Rodríguez-Herrera, C. N. Aguilar-González, E. Y. Padrón-Corral, y M. H. Reyes-Valdés. 2006. *Bacillus* spp. como biocontrol en un suelo infestado con *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani* Kühn y *Phytophthora capsici* Leonian y su efecto en el desarrollo y rendimiento del cultivo de chile (*Capsicum annuum* L.). Rev. Mex. Fitopatol. 24: 105-114.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acid. S. 41: 95-98.
- Harwood, C. R. 1992. *Bacillus subtilis* and its relatives: molecular biological and industrial workhorses. Trends Biotechnol. 10: 247-56.
- Islam, M. R., Y. T. Jeong, Y. S. Lee, and C. H. Song. 2012. Isolation and identification of antifungal compounds from *Bacillus subtilis* C9 inhibiting the growth of plant pathogenic fungi. Mycobiology 40: 59-66.
- Janda, J. M., L. Sharon, and Abbott, S. L. 2007. 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. J. Clin. Microbiol. 45: 2761-2764.
- Janiciewicz, W.J., Leverentz, B., Conway, W.S., Saftner, R.A., Reed, A.N., and Camp, M.J. 2003. Control of bitter rot and blue mold of apples integrating heat and antagonistic treatments on 1-MCP treated fruits stored under controlled atmosphere conditions. Postharvest Biology and Technology 29: 129-143.
- Knight, S. C., V. M. Anthony, A. M. Brady, A. J. Greenland, S. P. Heaney, D. C. Murray, K. A. Powell, M. A. Schulz, C. A. Spinks, P. A. Worthington, and D. Youle. 1997. Rationale and perspectives on the development of fungicides. Annu. Rev. Phytopathol. 35: 349-372.
- Korsten, L., and E. E. Jager. 1995. Mode of action of *Bacillus subtilis* for control of avocado postharvest pathogens. SAAGA Yearbook 18: 124-130.
- Kumar D. J. M., C. L. Poovai, P. Kumar, Y. S. Saroja, A. Manimaran, and P. T. Kalaichelvan. 2012. Optimization of *Bacillus cereus* MRK1 cellulase production and its Biostoning activity. Der Pharmacia Lettre 4: 881-888.
- Larkin, M. A., G. Blackshields, N. P. Brown, R. Chenna, P. A. Mcgettigan, H. Mcwilliam, F. Valentin, I. M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J. D. Thompson, T. J. Gibson, and D. G. Higgins. 2007. ClustalW and ClustalX version 2. Bioinformatics 23: 2947-2948.
- Lugtenberg, B., and F. Kamilova. 2009. Plant-growth-promoting rhizobacteria. Annu. Rev. Microbiol. 63: 541-556.
- Mahadatanapuk, S., M. Sanguanserm, R. W. Cutler, V. Sardud, and S. Anuntalabhochai. 2007. Control of Anthracnose caused by *Colletotrichum musae* on *Curcuma alismatifolia* Gagnep. using antagonistic *Bacillus* spp. ARPN. 2: 54-61.
- Matte-Tailliez, O., C. Brochier, P. Forterre, and H. Philippe. 2002. Archaeal phylogeny based on ribosomal proteins. Mol. Biol. Evol. 19: 631-639.
- Morse, R., K. O'hlanon, and M. D. Collins. 2002. Phylogenetic, amino acid content and indel analyses of the beta subunit of DNA-dependent RNA polymerase of grampositive and gram-negative bacteria. IJSEM 52: 1477-1484.
- Pal, K. K., and B. M. Gardener. 2006. Biological control of plant pathogens. The plant health instructor. Biological control. DOI: 10.1094/PHI-A-2006-1117-02.
- Podile, A. R., and V. D. V. Laxmi. 1998. Seed bacterization with *Bacillus subtilis* AF1 increases phenylalanine ammonia lyase and reduces the incidence of fusarial wilt in pigeonpea. J. Phytopathol. 146: 255-259.
- Price, N. P. J., A. P. Rooney, J. L. Swezey, E. Perry, and F. M. Cohan. 2007. Mass spectroscopic analysis of lipopeptide for

- Bacillus* strains isolated from diverse geographical locations. FEMS Microbiol. Lett. 271: 83-89.
- Rezuanul, I., Y. T. Jeong., Y. S. Lee, and C. H. Song. 2012. Isolation and Identification of Antifungal Compounds from *Bacillus subtilis* C9 Inhibiting the Growth of Plant Pathogenic Fungi. Mycobiology 40: 59-66.
- Rooney, A. P., N. P. J. Price., C. Ehrhardt., J. L. Swezey, and J. D. Bannan. 2009. Phylogeny and molecular taxonomy of the *Bacillus subtilis* complex and description of *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* subsp. nov. Int. J. Syst. Evol. Micr. 59: 2429-2436.
- Schisler, D. A., P. J. Slininger., R. W. Behle, and M. A. Jackson. 2004. Formulation of *Bacillus* spp. for biological control of plant disease. Phytopathology 94: 1267-1271.
- Tamura, K., D. Peterson., N. Peterson., G. Stecher., M. Nei, and S. Kumar. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. Mol. Biol. Evol. 28: 2731-2739.
- Van Loon L. C. 2007. Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. Eur. J. Plant Pathol. 119: 243-254.
- Wattiau, P., M. E. Renard., P. Ledent., V. Debois., G. Blackman, and S. N. Agathos. 2001. A PCR test to identify *Bacillus subtilis* and closely related species and its application to the monitoring of wastewater biotreatment. Appl. Microbiol. Biotechnol. 56: 816-819.
- Ward, M. A., A. C. Andrade., K. Hayashi., H. J. Schoonbeek., I. Stergiopoulos, and L. H. Zwiers. 2006. Impact of fungal drug transporters on fungicide sensitivity, multidrug resistance and virulence. Pest Manag. Sci. 62: 195-207.
- Zongzheng, Y., L. Xin., L. Zhong., P. Jinzhao., Q. Jin, and Y. Wenyan. 2009. Effect of *Bacillus Subtilis* SY1 on antifungal activity and plant growth. IJABE 2: 55-61.