



Artículo Científico

Aislamiento y caracterización de *Exserohilum turcicum*, y su inhibición *in vitro* por compuestos orgánicos volátiles producidos por rizobacterias

Estefanía Fonseca-Chávez, Irvin Alonso Molina-Marañón, Luz Irela Lugo-Zambrano, ¹Departamento de Ciencias Naturales y Exactas. ²Unidad de Investigación en Ambiente y Salud, Universidad Autónoma de Occidente, Unidad Regional Los Mochis, Blvd. Macario Gaxiola S/N, Col. Conrado Espinoza, C.P. 81223, Los Mochis, Sinaloa, México; **Juan Carlos Martínez-Álvarez**, Instituto Politécnico Nacional, Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Sinaloa, Departamento de Biotecnología Agrícola. Boulevard Juan de Dios Bátiz Paredes No. 250, Col. San Joachin, Guasave, Sinaloa C.P. 81101, México; **Guadalupe Arlene Mora-Romero**², **Jesús Damián Cordero-Ramírez**, Universidad Autónoma de Occidente, Unidad Regional Guasave. Avenida Universidad S/N, C.P. 81048, Guasave, Sinaloa, México; **Karla Yeriana Leyva-Madrigal**^{2*}.

*Autor de
correspondencia:

Karla Yeriana
Leyva-Madrigal
yeriana.leyva@uadeo.mx

Sección:
Número Especial

Recibido:
01 Julio, 2024

Aceptado:
13 Noviembre, 2024

Publicado:
4 Diciembre, 2024

Cita:

Fonseca-Chávez E,
Molina-Marañón IA,
Lugo-Zambrano LI,
Martínez-Álvarez JC,
Mora-Romero GA, *et al.*, 2024. Aislamiento
y caracterización de
Exserohilum turcicum, y
su inhibición *in vitro* por
compuestos orgánicos
volátiles producidos por
rizobacterias.
Revista Mexicana de
Fitopatología 42(4): 41.
[https://doi.org/10.18781/R.
MEX.FIT.2024-14](https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2024-14)

RESUMEN

Antecedentes/Objetivo. El control biológico es una estrategia promisoría para el manejo de enfermedades en la agricultura. En el presente estudio, se evaluó el potencial antifúngico de los compuestos orgánicos volátiles emitidos por rizobacterias, en el crecimiento y capacidad infectiva de cuatro aislamientos de *E. turcicum* obtenidos de plantas de maíz sintomáticas, en Sinaloa.

Materiales y Métodos. Los aislamientos fúngicos fueron caracterizados morfológica y molecularmente, y su patogenicidad se corroboró en un ensayo de hoja desprendida. La capacidad de los COV para inhibir el crecimiento micelial y la infección de hojas de maíz por *E. turcicum*, se evaluó en ensayos *in vitro* en placas Petri divididas. Se determinó cualitativamente la producción de ácido cianhídrico bacteriano.

Resultados. El crecimiento micelial de *E. turcicum*, se redujo por los COV de al menos una rizobacteria, con inhibiciones entre 22 y 63%. La infección de hojas de maíz se redujo entre 63 y 98% en presencia de los COV de las rizobacterias. Se detectó la producción de ácido cianhídrico en las cepas B3 y B9.

Conclusión. La cepa B95 fue más efectiva en la reducción del crecimiento micelial e infección por *E. turcicum*. La producción de ácido cianhídrico podría estar



implicada en su efecto antagónico. Se requieren ensayos *in planta*, para corroborar su efectividad, así como caracterizar su perfil de volátiles.

Palabras clave: Biocontrol, *Bacillus*, *Pseudomonas*, tizón foliar, compuestos volátiles.

INTRODUCCIÓN

El tizón foliar del maíz, causado por *Exserohilum turcicum*, es una de las enfermedades foliares del maíz más importantes en todo el mundo. El desarrollo de la enfermedad se ve favorecido por la alta humedad relativa (> 90%) y temperatura media diaria de 18-26 °C. Los síntomas típicos son lesiones largas (2.5 y 15 cm de longitud), elípticas, y de color verde grisáceo. A medida que la enfermedad se extiende, las lesiones se vuelven bronceadas con zonas oscuras, y coalescen para formar el tizón. La reducción del área fotosintética foliar puede llegar hasta el 65%, ocasionando pérdidas del 15 al 75% en rendimiento (Félix-Gastélum *et al.*, 2018).

El manejo actual del tizón de maíz, implica el uso de fungicidas sintéticos de los grupos químicos ditiocarbamato, nitrilo, triazol y estrobirulina (De Rossi *et al.*, 2020). Sin embargo, el uso ordinario de fungicidas sintéticos aumenta la presión de selección sobre la población del patógeno, lo que lleva al desarrollo de resistencia a los fungicidas e inconsistencias en el control químico (Wise y Mueller, 2011).

En los últimos años, la bioprotección ha surgido como una alternativa al control químico de múltiples enfermedades de las plantas. Algunas rizobacterias tienen gran potencial para la supresión de fitopatógenos, debido a su capacidad para producir una amplia gama de enzimas líticas, y compuestos antimicrobianos difusibles y volátiles, que limitan el crecimiento y la infección de fitopatógenos, además de estimular el crecimiento de las plantas, mediante la producción y modulación de fitohormonas (Sartori *et al.*, 2015, 2017; Sehrawat *et al.*, 2022).

Los compuestos orgánicos volátiles (COV) son metabolitos secundarios de bajo peso molecular y baja polaridad, por lo que, pueden difundirse fácilmente en el suelo y la atmósfera (Zhao *et al.*, 2023). Diversos COV emitidos por rizobacterias son capaces de inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos, por lo que, tienen potencial para emplearse en el control de enfermedades *in planta* y post cosecha (Poulaki y Tjamos, 2023; Zhao *et al.*, 2023). Este efecto antifúngico se atribuye a la alteración de la integridad de la pared celular, la fluidez de la membrana celular, disrupción del balance redox, e incluso a la alteración del transcriptoma del patógeno, disminuyendo la expresión de genes de virulencia y genes de metabolismo energético.

Entre los principales géneros de rizobacterias productoras de COV con actividad antifúngica, encontramos a *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Paenibacillus*, *Brevibacillus* y *Ralstonia* (Zhao *et al.*, 2023). Además de su actividad antifúngica, algunos COV bacterianos promueven el crecimiento e inducen resistencia sistémica en las plantas, lo que les permite una defensa más rápida y eficaz contra los patógenos (Poulaki y Tjamos, 2023).

El ácido cianhídrico o cianuro de hidrógeno (HCN), es un COV con actividad antimicrobiana, que se une al citocromo c oxidasa, e interfiere con la respiración celular (Anand *et al.*, 2023). Algunas rizobacterias como *Pseudomonas*, utilizan esta molécula como uno de sus principales mecanismos para combatir patógenos en las plantas (Anand *et al.*, 2020).

Por lo anterior, los objetivos de este estudio fueron: 1) obtener y caracterizar aislamientos de *Exserohilum turcicum* de maíz; 2) evaluar el efecto de los COV producidos por rizobacterias, sobre el crecimiento micelial y la infección *in vitro* de *E. turcicum*; y 3) determinar la producción de ácido cianhídrico o cianuro de hidrógeno (HCN), importante COV con efecto antifúngico, producido por rizobacterias.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención y purificación de los aislamientos fúngicos. Durante febrero y marzo de 2020, se colectaron hojas de maíz con síntomas típicos de tizón foliar, de los municipios Ahome, El Fuerte y Guasave, en Sinaloa, México. Las hojas se cortaron en trozos pequeños (25 mm²) a partir del borde de la lesión, se desinfectaron por 3 min en una solución de hipoclorito de sodio al 0.5%, y se lavaron tres veces con agua destilada estéril. Los trozos de tejido desinfectados se colocaron en placas de Petri con Agar Papa Dextrosa (PDA; MCD LAB, Tlalnepantla, Estado de México), suplementado con neomicina (0.1125 mg/mL) y sulfato de estreptomicina (0.5 mg/mL), y se incubaron a 25 °C por 3 días. Las colonias fúngicas se transfirieron a placas con PDA y se incubaron a 25 °C por 14 días. Se obtuvieron cultivos monospóricos y se preservaron en papel filtro a 4 °C (Hiruma y Saijo, 2016).

Caracterización morfológica de los aislamientos fúngicos. Para evaluar las características morfológicas de los aislamientos, se cultivaron en PDA y agar-V8, y se incubaron a 25 °C por 10 y 15 días, respectivamente. La tasa de crecimiento micelial y las características macroscópicas de las colonias (textura, tipo de borde, y pigmentación frontal e inversa) se evaluaron en PDA. En un microscopio Axio Imager M2 (Carl Zeiss), se evaluó la forma, número de septos, longitud y ancho de 30 conidios de cada aislado cultivado en V8.

Identificación molecular de los aislamientos fúngicos

Extracción de ADN, PCR y secuenciación. El ADN genómico se extrajo a partir de 50 mg de micelio fresco, cultivado en medio PDA por 10 días, utilizando el kit de ADN genómico YeaStar™ (N. cat D2002, Zymo Research, Irvine, CA, EUA), de acuerdo con el protocolo del fabricante. La amplificación de la región ITS, los genes de la actina (*act*) y la segunda subunidad más grande de la ARN polimerasa II (*rpb2*), se realizó con los cebadores ITS1/ITS4 (White *et al.*, 1990), Ex-actF/Ex-actR (5' - CCCCAGCAGTCTTCCGTA - 3'/5' - GTACGTCCAGAGGCGTACAG - 3'; 480 pb) y Ex-rpb2F/Ex-rpb2R (5' - CTTCGTGGAACAAA-YACWCCTG - 3'/5' - CRCAGTGRGTRTAGGCATGG - 3'; 760 pb), respectivamente. Los cebadores para *act* y *rpb2* se diseñaron para este estudio, utilizando el programa Primer3 (Untergasser *et al.*, 2012). La PCR se realizó en un termociclador Apollo ATC-201 (Nyx Technik, San Diego, CA, EUA) con 1 ng de ADN, 1.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de cada dNTP, 0.5 mM de cada cebador y 1 U de ADN polimerasa (Invitrogen, Brasil, Cat. N° 11615-050) en un volumen final de 25 mL. El programa de PCR consistió en 5 min de desnaturalización inicial a 94 °C, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 40 s, anillamiento a 55 °C para ITS y 60 °C para *act* y *rpb2* por 40 s, 1 min de extensión a 72 °C y una extensión final a 72 °C por 5 min. Los productos de PCR se secuenciaron en Macrogen Inc. (Seúl, Corea del Sur).

Análisis filogenético multigen. Las secuencias se editaron en BioEdit v 7.0.5.3 (Hall, 1999) y se compararon en la base de datos del NCBI utilizando el algoritmo BLASTn. Se generó un alineamiento concatenado *act+ITS+rpb2* con MUSCLE (Edgar, 2004), implementado en MEGA X (Kumar *et al.*, 2018). El esquema de particiones se evaluó en PartitionFinder v 1.1.1 (Lanfear *et al.*, 2012), con base al criterio de información de Akaike (AIC). La reconstrucción filogenética se realizó con el método de Máxima Verosimilitud (ML) en RAXML v 7.2.8 (Stamatakis, 2006), utilizando el modelo GTRGAMMAI y 1000 réplicas bootstrap. El filograma se editó utilizando iTOL (Letunic y Bork, 2021; <https://itol.embl.de/>).

Prueba de patogenicidad

Ensayo en hoja desprendida. La patogenicidad de cuatro aislamientos de *E. turcicum* se evaluó siguiendo la metodología de Perochon y Doohan (2016), con modificaciones. Se emplearon fragmentos de hoja de 6 cm de largo, de la segunda hoja verdadera de plantas de maíz de 20 días de edad, cultivadas en condiciones controladas en laboratorio. Los fragmentos de hoja fueron previamente desinfectados superficialmente con una solución de hipoclorito de sodio al 0.75% por

1 min, seguido de cuatro lavados con agua destilada estéril. Una vez desinfectados, se colocaron en cajas de Petri cuadradas (100 mm × 100 mm), con el lado adaxial hacia arriba. Los extremos de las hojas se colocaron entre dos capas de agua agar, a modo de “sándwich”, adicionado con 50 µg/mL de 6-bencilamino purina (BAP; Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) (Aregbesola *et al.*, 2020).

Las hojas se inocularon con tres gotas de 5 mL (~ 120 conidios) de una suspensión de conidios a 2.4×10^4 conidios/mL, obtenidos de un cultivo en agar V8 solidificado de 15 días de edad. Como testigos, se utilizaron hojas inoculadas con una solución estéril de Tween 80 al 1%. Las placas se incubaron a 25 °C, con un fotoperiodo de 12 h luz/12 h oscuridad, por 6 días, en un diseño completamente aleatorizado, con tres repeticiones por tratamiento. El ensayo se realizó dos veces.

Efecto antifúngico de los COV bacterianos sobre *E. turcicum*

Cepas bacterianas. Se evaluó el efecto antagónico de seis rizobacterias previamente aisladas y caracterizadas por Morales-Ruíz (2022). Las cepas B2 (*Staphylococcus warneri*), B3 (*Bacillus aryabhattai*), B9 (*Staphylococcus saccharolyticus*), B11 (*Acinetobacter radioresistens*) y B15 (*Bacillus velezensis*) fueron aisladas de la rizosfera de *Arundo donax* (carrizo), y la cepa B95 (*Pseudomonas aeruginosa*) se obtuvo de la rizosfera de maíz.

Ensayo en placa dividida. El ensayo de antagonismo por COV se realizó en placas de Petri con dos divisiones (90 mm de diámetro), que contenían Agar Nutritivo (AN) y PDA, respectivamente. Las cepas bacterianas se inocularon por estría en el lado de la placa con AN, y se incubaron a 25 °C por 12 h. Luego, se inoculó un disco de PDA con crecimiento micelial (5 mm de diámetro) del aislado fúngico, en el lado de la placa de Petri que contenía PDA. Inmediatamente, las placas se sellaron e incubaron a 25 °C por 10 días, en un arreglo completamente aleatorizado, con cinco repeticiones para cada combinación bacteria/hongo. Como testigos, se utilizaron placas de Petri con PDA inoculadas con el aislamiento fúngico en ausencia de las bacterias. Se midió el diámetro de las colonias fúngicas y se calculó el porcentaje de inhibición con la fórmula propuesta por Vincent (1947). El ensayo se realizó dos veces, de forma independiente, en diferentes tiempos.

Ensayo en hoja desprendida. Las bacterias que mostraron porcentajes de inhibición $\geq 40\%$, con al menos dos aislamientos de *E. turcicum* en el ensayo de placas divididas, fueron seleccionadas para evaluar su efecto en la reducción de la infección de hojas de maíz por cuatro aislamientos de *E. turcicum*. El ensayo se realizó en placas de Petri divididas (100 mm × 15 mm); de un lado se colocó la hoja de maíz, y se inoculó con una suspensión de conidios fúngicos, siguiendo la metodología

previamente descrita para la prueba de patogenicidad. Del otro lado de la placa, se colocó una caja de Petri de 35 mm de diámetro, con la cepa bacteriana inoculada por estría, en medio AN. Se usaron testigos de patogenicidad para cada aislamiento fúngico, en el que se colocó la placa Petri (35 mm) con AN estéril, sin bacteria inoculada. Además, se usaron testigos bacterianos en los que las hojas no se inocularon con los hongos, para descartar un posible efecto fitotóxico de los COV bacterianos en la hoja de maíz, que pudiera interferir con la estimación del daño ocasionado por el hongo. Las placas se sellaron herméticamente para evitar la fuga de los COV. Se realizaron cuatro réplicas por tratamiento. Las placas se distribuyeron en un diseño completamente al azar, y se incubaron a 25 °C, con un fotoperiodo de 16 h luz/ 8 h oscuridad, por seis días. El porcentaje de área foliar afectada (%AFA) se estimó utilizando el software Image J versión 1.8.0 (Schindelin *et al.*, 2012). El ensayo se realizó dos veces de forma independiente, en diferentes tiempos.

Prueba de producción de ácido cianhídrico (HCN). Se evaluó la producción de HCN en cuatro cepas bacterianas, siguiendo la metodología reportada por Anand *et al.* (2020). Cuadros (1 cm²) de papel filtro, se sumergieron hasta saturación en el reactivo Feigl y Anger, el cual consta de 10 mL de cloroformo (CTR Scientific, Ciudad de México, México), 50 mg de acetoacetato de etilo de cobre (II) (Thermo scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) y 50 mg de 4,4-metilen bis (N, N-dimetilanilina) (Sigma Aldrich, San Luis, Misuri, EUA). El papel filtro se retiró y se dejó secar toda la noche a temperatura ambiente (25 °C). Las bacterias se sembraron por estría sobre el AN contenido en placas de Petri (60 mm de diámetro), luego se colocó un papel filtro en el lado interno de la tapa de la caja de Petri. Se realizaron tres réplicas por tratamiento. Las placas se sellaron y se incubaron a 25 °C por 48 h. Se consideraron cepas positivas a la producción de HCN si el papel filtro viraba a color azul.

Análisis estadístico. Los análisis estadísticos se realizaron en R Studio versión 1.4.1106 (RStudio Team 2020), utilizando el paquete “*agricolae*” (de Mendiburu, 2020). El diámetro de la colonia fúngica y el %AFA se analizaron con un análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de separación de medias post hoc de Tukey ($\alpha = 0.05$). El %AFA se transformó con la fórmula del arcoseno previo al análisis estadístico. La normalidad de los residuales se corroboró con la prueba de Shapiro Wilks y mediante un gráfico QQ Normal.

RESULTADOS

Caracterización morfológica de los aislamientos fúngicos. Se obtuvieron cuatro aislamientos monospóricos, cuyas características morfológicas variaron ligeramen-

te (Cuadro S1, S2). Las tasas de crecimiento oscilaron entre 7.56 a 19.89 mm/día. Las colonias presentaron una coloración verde olivo en el anverso, con textura algodonosa y borde fimbriado (Figura 1A). Por el reverso presentaron un color negro oliváceo, con márgenes color crema o blanco (Figura 1B). Los conidios de los cuatro aislamientos eran ahusados, ligeramente curvos a rectos, y alargados, de color olivo, con hilio prominente (Figura 1C), longitud de 54.49 a 124.34 μm ($91.77 \mu\text{m} \pm 16.75$), ancho de 11.81 a 29.86 μm ($21.01 \mu\text{m} \pm 3.24$), y seis septos en promedio (Cuadro S2).

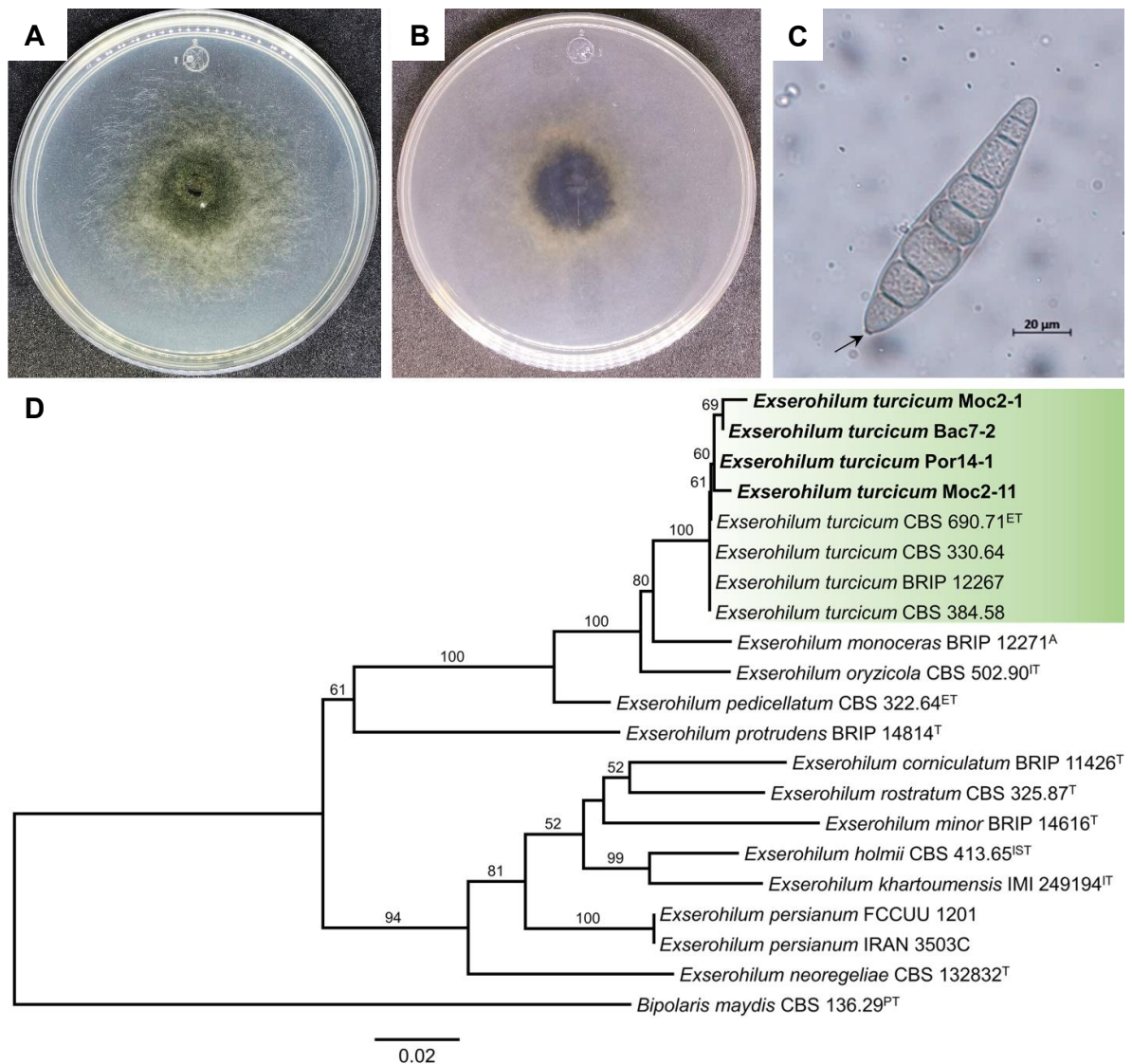


Figura 1. Caracterización de los aislamientos de *Exserohilum turcicum*. **A-C** Características morfológicas del aislado representativo Bac7-2. **A)** Vista frontal del cultivo en PDA; **B)** Vista trasera del cultivo en PDA; **C)** conidio; **D)** Filograma de Máxima Verosimilitud inferido a partir de la matriz combinada de los marcadores *act*+*ITS*+*rpb2* de *Exserohilum*.

Identificación molecular de los aislamientos fúngicos. La comparación de secuencias de los genes *act* y *rpb2*, así como de la región ITS, mostraron porcentajes de identidad de 96.63 a 100%, con la especie *Exserohilum turcicum*. Las secuencias de los aislamientos se depositaron en la base de datos GenBank, y los números de acceso se presentan en la Cuadro S1.

En la figura 1D, se presenta el filograma inferido a partir del alineamiento concatenado *act*+ITS+*rpb2*, donde se muestra que los aislamientos Bac7-2, Por14-1, Moc2-1 y Moc2-11 pertenecen a *Exserohilum turcicum*, puesto que se agrupan en un mismo clado con el aislado tipo *E. turcicum* CBS 330.64 (bootstrap de 100%).

Pruebas de patogenicidad. Los cuatro aislamientos de *E. turcicum* produjeron lesiones típicas en las hojas, evidenciadas en el ensayo de hoja desprendida (Figura 2). Las primeras lesiones tales como manchas cloróticas en el área inoculada, se observaron cuatro días después de la inoculación y progresaron a lesiones necróticas (Figura 2B). Las hojas del tratamiento testigo permanecieron sin lesiones durante el ensayo (Figura 2A).

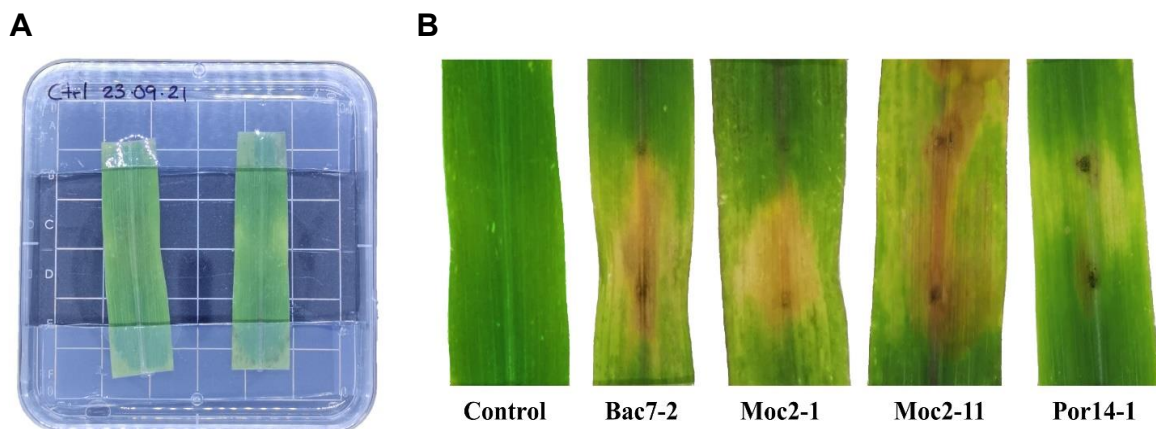


Figura 2. Prueba de patogenicidad. A Sistema de hoja desprendida empleado para la confirmación de patogenicidad. B Síntomas ocasionados por los aislamientos de *Exserohilum turcicum* en hojas desprendidas de maíz.

Efecto antifúngico de los COV bacterianos sobre *E. turcicum*

Ensayo en placa dividida. El crecimiento micelial de los aislamientos de *E. turcicum*, excepto el aislamiento Moc2-11, se redujo por los COV de al menos una rizo-bacteria (Figura 3; Cuadro 1). Los COV de las cepas B3 y B95 inhibieron en mayor proporción a los aislamientos fúngicos. Las cepas B9 y B15 solo inhibieron el crecimiento de los aislamientos Bac7-2 y Moc2-1, y favorecieron el crecimiento del aislamiento Por14-1. La cepa B15 inhibió mayormente (63.29%), el crecimiento

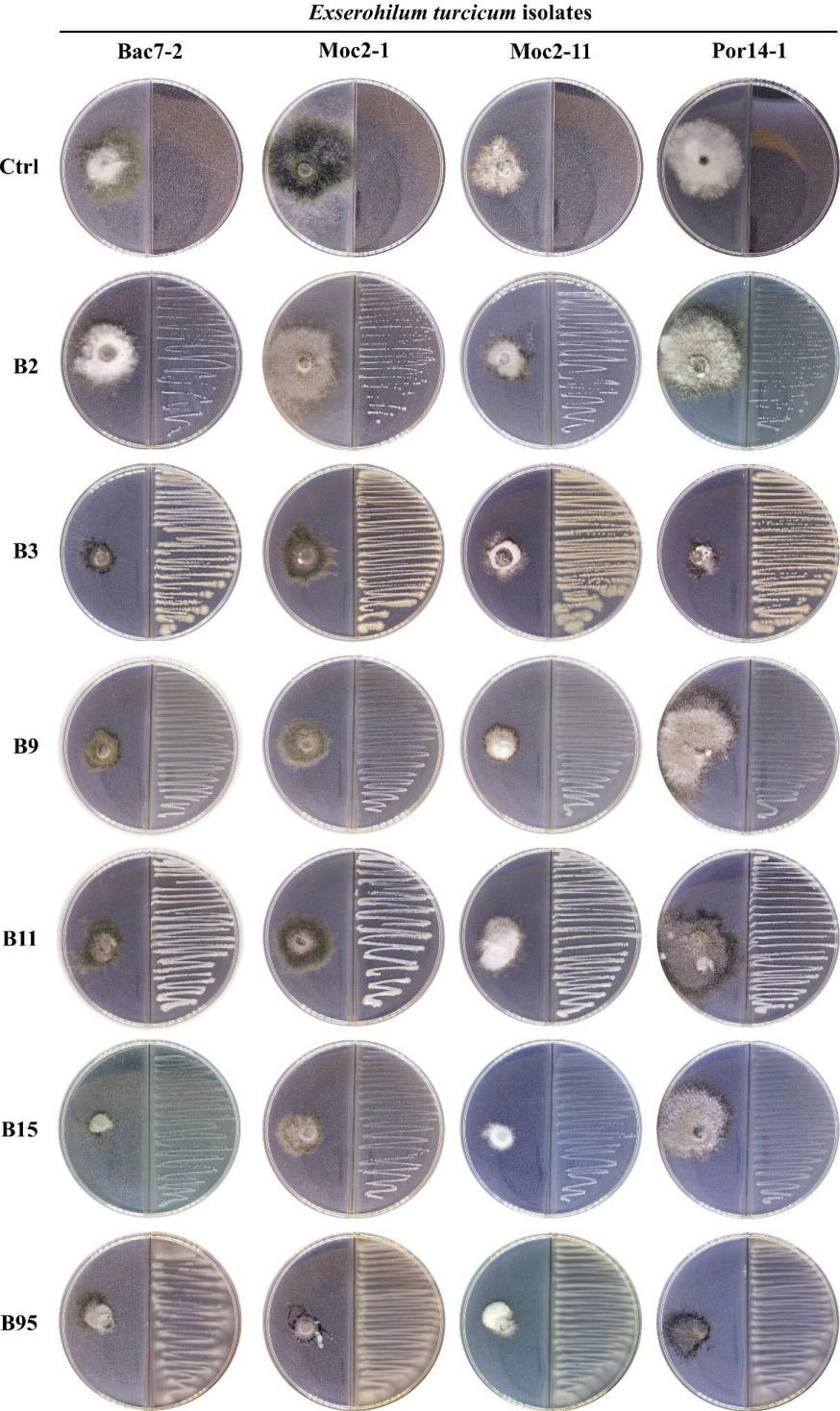


Figura 3. Efecto de los compuestos orgánicos volátiles bacterianos, sobre el crecimiento micelial de *Exserohilum turcicum*, en placas de Petri divididas.

Cuadro 1. Efecto de los compuestos orgánicos volátiles (COV) bacterianos, en el crecimiento micelial de *Exserohilum turcicum*, en placas divididas.

Cepa	Bac7-2		Moc2-1		Moc2-11		Por14-1	
	Diámetro colonial	%ICM	Diámetro colonial	%ICM	Diámetro colonial	%ICM	Diámetro colonial	%ICM
B2	35.21 ^{a,b}	26.13 ± 9.41	52.95 ^a	-	32.38 ^a	-	49.48 ^a	-
B3	20.86 ^{cd}	56.22 ± 3.08	31.35 ^{bc}	37.52 ± 8.38	15.08 ^b	39.48 ± 13.81	19.56 ^c	33.83 ± 5.40
B9	19.91 ^{cd}	58.22 ± 2.19	25.10 ^c	49.99 ± 2.08	18.02 ^{ab}	27.68 ± 7.70	48.75 ^a	-
B11	37.14 ^b	22.09 ± 3.33	42.40 ^{ab}	15.52 ± 10.47	25.42 ^{ab}	-	47.39 ^a	-
B15	17.50 ^d	63.29 ± 1.46	23.96 ^c	52.26 ± 2.19	21.66 ^{ab}	13.10 ± 4.84	52.04 ^a	-
B95	28.14 ^{bc}	40.96 ± 5.70	23.25 ^c	53.67 ± 2.34	15.87 ^b	36.33 ± 3.63	19.12 ^c	35.32 ± 8.74
CTRL	47.67 ^a	-	50.19 ^a	-	24.92 ^{ab}	-	29.57 ^b	-

* Se muestra la media.

%ICM Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial.

- Indica que no hubo inhibición.

Datos seguidos de letras distintas en la misma columna son estadísticamente diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey (p < 0.05).

del aislamiento Bac7-2. Las cepas B2 y B11 solo redujeron el crecimiento del aislamiento Bac7-2, y favorecieron el crecimiento del aislamiento Por14-1 (Cuadro 1).

Ensayo en hoja desprendida. Derivado de los resultados del ensayo en placa dividida, se seleccionaron las cepas B3, B9, B15 y B95, para evaluar el efecto de protección de sus COV ante la infección ocasionada por aislamientos de *E. turcicum*, en hojas desprendidas de maíz. El %AFA en las hojas expuestas a los COV bacterianos fue estadísticamente menor (p < 0.05) a la registrada en las hojas del grupo testigo (Figura 4, Cuadro 2). Los valores más bajos del %AFA se registraron en los tratamientos con la cepa B95, con reducciones de la infección que oscilaron entre 95.58 y 98.63% en las hojas infectadas con los aislamientos Por14-1 y Moc2-1, respectivamente. Los COV de la cepa B15 redujeron la infección (>80%) en las hojas de maíz después de ser inoculadas con los aislamientos fúngicos. No se observó efecto fitotóxico en las hojas de maíz por los COV bacterianos (Figura 4).

Producción de ácido cianhídrico (HCN). Se detectó producción de HCN en las cepas B3 y B95. A las 24 h de incubación de las rizobacterias, se observó viraje de color (de blanco a azul) en el papel filtro sobre el cultivo de la cepa B95, el cual se intensificó a las 48 h de incubación. En la cepa B3, se observó una coloración azul tenue, en el papel filtro a las 48 h. La intensidad del color azul en la cepa B95 sugiere que produce una mayor concentración de este COV que la cepa B3 (Figura 5).

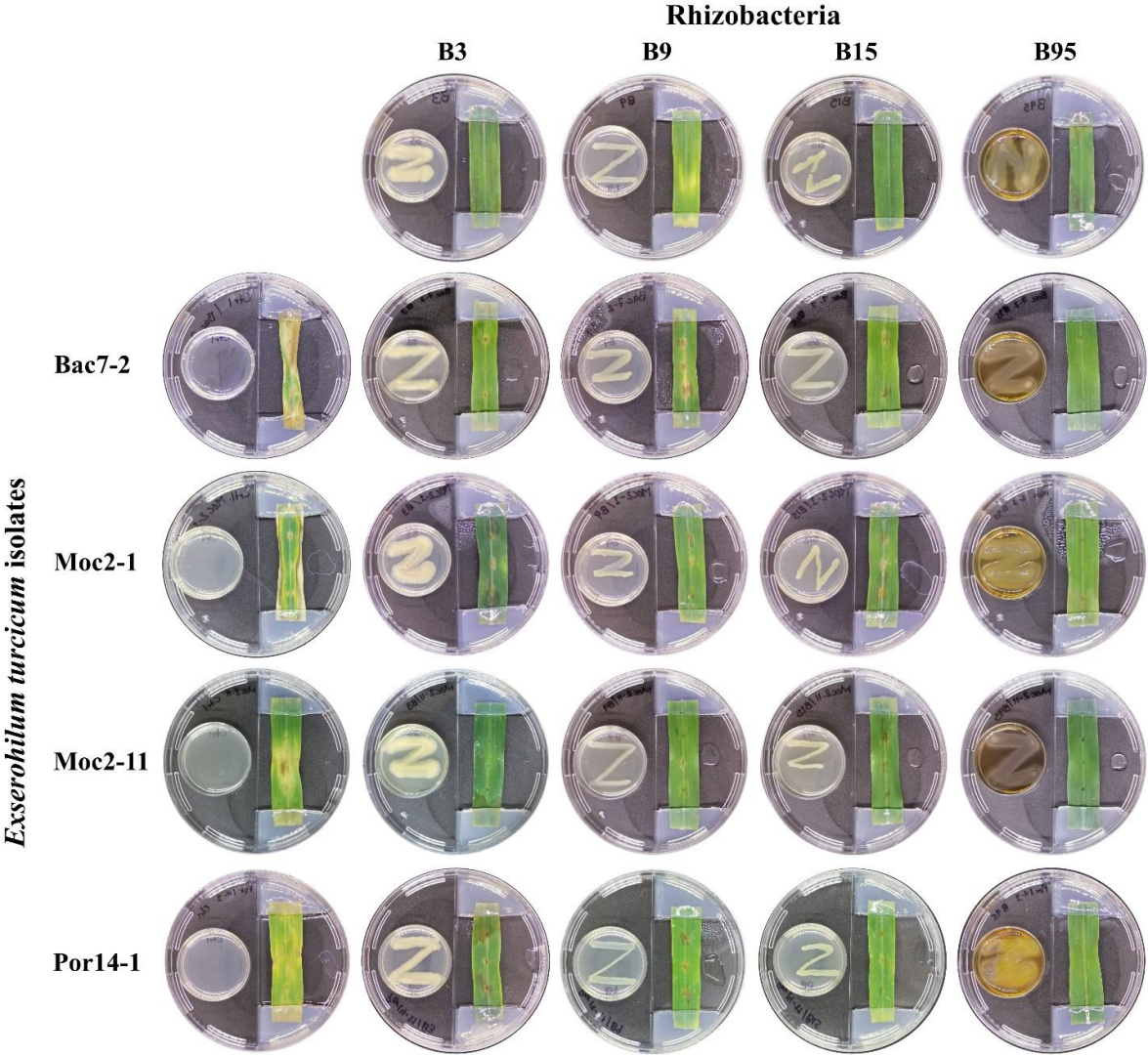


Figura 4. Efecto de los compuestos orgánicos volátiles bacterianos, sobre la capacidad infectiva de *Exserohilum turcicum*, en hojas desprendidas de maíz.

Cuadro 2. Efecto de los compuestos orgánicos volátiles (COV) bacterianos, en la capacidad infectiva de *Exserohilum turcicum* en hojas desprendidas de maíz.

Cepa	Bac7-2		Moc2-1		Moc2-11		Por14-1	
	%AFA	%RI	%AFA	%RI	%AFA	%RI	%AFA	%RI
B3	4.23 ^{*c}	92.82 ± 1.92	8.93 ^b	84.17 ± 4.79	4.47 ^b	89.98 ± 4.74	16.63 ^b	63.74 ± 12.08
B9	18.41 ^b	68.82 ± 7.24	4.44 ^{bc}	92.12 ± 2.80	5.48 ^b	87.71 ± 3.98	11.47 ^b	74.97 ± 7.59
B15	7.12 ^{bc}	87.92 ± 4.22	7.59 ^b	86.55 ± 4.17	8.48 ^b	80.98 ± 4.88	4.85 ^b	89.40 ± 5.26
B95	1.54 ^c	97.37 ± 1.32	0.76 ^c	98.63 ± 0.28	1.23 ^b	97.24 ± 1.04	2.02 ^b	95.58 ± 1.85
CTRL	59.06 ^a		56.48 ^a		44.65 ^a		45.87 ^a	

%AFA Porcentaje de área foliar afectada.

%RI Porcentaje de reducción de la infección.

* Se muestra la media.

Datos seguidos de letras distintas en la misma columna son estadísticamente diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey (p < 0.05).

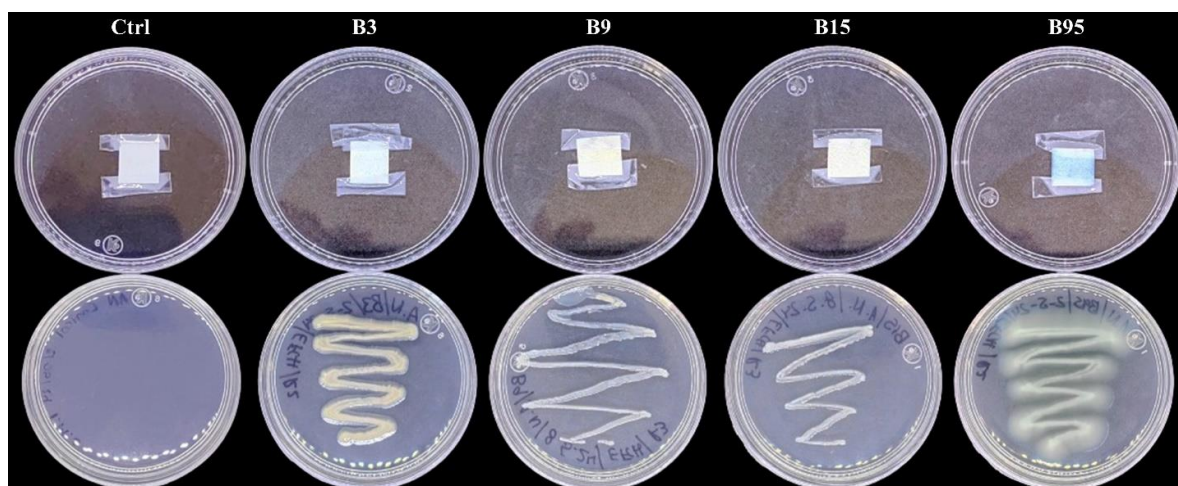


Figura 5. Detección de ácido cianhídrico volátil, emitido por rizobacterias.

DISCUSIÓN

Las características morfológicas y microscópicas de los aislamientos fúngicos, fueron similares a las reportadas para otros aislamientos de *E. turcicum* de la región (Félix-Gastélum *et al.*, 2018), y del mundo (Hernández-Rastrepo *et al.*, 2018). El análisis filogenético multigen corroboró la identidad de los cuatro aislamientos fúngicos patogénicos.

La variación observada en cuanto a la severidad de la enfermedad inducida por los aislamientos, ha sido reportado en otros estudios, y se ha atribuido a la alta

diversidad genética en las poblaciones de esta especie fúngica, aunado a la susceptibilidad de las variedades de maíz y/o a la combinación de ambos (Ahangar *et al.*, 2016; Nieuwoudt *et al.*, 2018; Cui *et al.*, 2022; Bankole *et al.*, 2023).

Se ha comprobado que cepas de géneros bacterianos como *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Pantoea*, *Paenibacillus* y *Sinomonas*, inhiben el crecimiento micelial de *E. turcicum*, mediante la producción de compuestos difusibles y enzimas hidrolíticas (Sartori *et al.*, 2020; Chen *et al.*, 2022). Sin embargo, el efecto de los COV bacterianos sobre este fitopatógeno ha sido poco explorado.

En este estudio se evidencia la capacidad de los COV de las cepas bacterianas (B3, B9, B15 y B95) en la inhibición del crecimiento micelial de *E. turcicum* y de protección de las hojas de maíz ante el ataque de este hongo, al reducir el área foliar afectada. La actividad antifúngica de estas cepas bacterianas fue previamente evaluada contra *Rhizoctonia zae*, registrando inhibiciones del crecimiento micelial entre 40% y 50%, mediante compuestos difusibles (Morales-Ruiz *et al.*, 2022). Los mismos autores reportaron que la cepa B95 fue ineficiente para inhibir a *R. zae*, lo que contrasta con los resultados de este estudio, puesto que esta cepa registró altos valores de inhibición por COV y compuestos difusibles (Datos no mostrados), contra todos los aislamientos de *E. turcicum*. Adicionalmente, los COV de la cepa B95, disminuyeron por arriba del 90%, el %AFA en hojas de maíz inoculadas con los aislamientos fúngicos.

Sartori *et al.* (2020), reportaron inhibiciones del crecimiento micelial de *E. turcicum* por COV emitidos por cepas de *Curtobacterium*, *Pantoea* y *Bacillus*, siendo este último género el que mostró mayor inhibición del hongo. Entre los COV producidos por estas bacterias podemos mencionar 2-Nonadecanona, indol, D-limoneno, 2-Tridecanon y, trisulfuro de dimetilo, cuya actividad antifúngica ya ha sido demostrada (Wu *et al.*, 2019). Gao *et al.* (2017) reportaron inhibiciones de 83 y 91% en *Alternaria alternata* y en *Botrytis cinerea*, respectivamente, mediante COV de *B. velezensis* cepa ZSY-1. Este efecto antifúngico lo atribuyeron a los COV; pirazina, benzotiazol, fenol y 1,1-dimetiletil. Las inhibiciones del crecimiento micelial en los aislados de *E. turcicum* por COV de *B. velezensis* cepa B15, son similares a los valores reportados por Gao *et al.* (2017).

Especies de *Pseudomonas* como *P. aureaginosa* y *P. fluorescens* producen COV como 2,5-Dimetil-3(2H)-furanona, silanediol, 2,4,4-Trimetil-1-penteno, HCN, el disulfuro de dimetilo (DMDS), trisulfuro de dimetilo (DMTS), con actividad antifúngica demostrada contra *Botryosphaeria rhodina*, *R. solani*, *Pythium aphanidermatum*, *Penicillium italicum*, entre otros (Michelsen y Stougaard, 2012; Wang *et al.*, 2020; Morales *et al.*, 2023). Las variaciones en cuanto a los porcentajes de inhibición (4 y 80%) reportados por estos autores para *P. aureaginosa* y *P. fluorescens*, las atribuyeron a las cepas bacteriana (antagonista) y fúngica (patógeno). Los valores de inhibición en aislados de *E. turcicum* por *P. aureaginosa* B95 fueron

altos, especialmente contra el aislado Moc2-1 al inhibirlo en 98%. Este valor es superior a los documentados por los autores arriba descritos.

El uso de miembros del género *Staphylococcus* como agente de control biológico, no es frecuente. Sin embargo, se han identificado algunas especies, que producen COV con actividad antifúngica. Alijani *et al.* (2019), documentaron un 34.52% de inhibición del crecimiento micelial y 82.81% de inhibición en la germinación de conidios de *Colletotrichum nymphaeae* por el efecto de los COV emitidos por *Staphylococcus sciuri*. El óxido de mesitil, ácido acético, tolueno, o-xileno, 4-metildecano y 2-metilpropil éster, fueron los COV más comunes producidos por *S. sciuri*, todos ellos con actividad antimicrobiana corroborada (Nakkeeran *et al.* 2020).

Los valores de inhibición de las cepas B2 (*S. warneri*) y B9 (*S. saccharolyticus*) en este estudio, son distintos a los reportados por Alijani *et al.* (2019). La cepa B9 inhibió en mayor medida a los aislamientos Bac7-2 y Moc2-1, mientras que la cepa B2 solo inhibió al aislado Bac7-2 en un 26.13%. El reducido %AFA observado en las hojas de maíz inoculadas con los aislados de *E. turcicum* y luego expuestas a los COV de la cepa B9, podría deberse a una inhibición de la germinación de los conidios de *E. turcicum*, puesto que éstos se utilizaron como inóculo para infectar las hojas de maíz.

El HCN es un COV con efecto antifúngico, que interfiere con la respiración celular, al inhibir al citocromo oxidasa. Es producido por rizobacterias, especialmente por *Pseudomonas*, aunque también se han reportado cepas cianogénicas de *Aeromonas*, *Chromobacterium*, *Burkholderia* y *Bacillus* (Sehrawat *et al.*, 2022). Las especies antifúngicas *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. chlororaphis*, *P. putida*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. paramycoides* y *B. aryabhatai*, han sido reportadas como productoras de HCN (Anand *et al.*, 2020; Shastri *et al.*, 2020; Sehrawat *et al.*, 2022; Riera *et al.*, 2023). Basado en la capacidad de las cepas B95 y B3 para producir HCN, podría sugerirse que su efecto antagónico es atribuible a este COV, especialmente en la cepa B95. Sin embargo, es posible que otros COV estén involucrados. Por otra parte, el efecto antifúngico de las cepas B9 y B15 es ocasionado por COV distintos al HCN, como los reportados por Alijani *et al.* (2019) para *Staphylococcus* (óxido de mesitil, ácido acético, tolueno, o-xileno, 4-metildecano, 2-metilpropil éster), o los reportados por Sartori *et al.* (2020) para *Bacillus* (2-Nonadecanona, indol, D-limoneno, 2-Tridecanon y, trisulfuro de dimetilo). Sin embargo, no se puede descartar la participación de COV no identificados previamente.

CONCLUSIONES

Los aislamientos fúngicos recuperados de hojas de maíz con síntomas de tizón foliar fueron identificados como *E. turcicum*, y se corroboró su patogenicidad. El

crecimiento micelial y capacidad infectiva de *E. turcicum* se vieron afectados por los COV emitidos por las rizobacterias evaluadas. Las cepas B3 (*Bacillus aryabhattai*), B15 (*Bacillus velezensis*) y B95 (*Pseudomonas aeruginosa*), fueron las más eficientes en la inhibición del crecimiento micelial de los aislamientos fúngicos y en la reducción del %AFA. La cepa B95 tiene un mayor potencial como agente de biocontrol contra *E. turcicum*, y es necesario continuar su estudio en ensayos *in planta*, para corroborar su efectividad. El HCN producido por las cepas B3 y B95 puede estar implicado en el efecto antifúngico que ejercen sobre *E. turcicum*. Las cepas B9 y B15 no produjeron HCN, sugiriendo que el antagonismo contra *E. turcicum* podía deberse a otros COV antifúngicos. Es necesario estudiar el perfil de volátiles de las cuatro cepas bacterianas y su efecto individual y conjunto (en mezclas) sobre *E. turcicum*, con el fin de explorar un posible efecto sinérgico entre COV y entre cepas bacterianas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Dirección General de Educación Superior Universitaria e Intercultural (DGESUI), por el financiamiento de este proyecto, a través de la convocatoria de Apoyo a la Incorporación de NPTC (Proyecto UDO-PTC-071). IAMM reconoce al Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por la beca de maestría otorgada. Todos los autores agradecen al Dr. Ignacio Maldonado Mendoza y al Dr. Damián Cordero Ramírez por proporcionar amablemente las cepas bacterianas evaluadas en este estudio.

LITERATURA CITADA

- Ahangar MA, Bhat ZA, Sheikh F, Dar ZA, Lone AA, Hooda KS and Reyaz MA. 2016. Pathogenic variability in *Exserohilum turcicum* and identification of resistant sources to *turcicum* leaf blight of maize (*Zea mays* L.). Journal of Applied and Natural Science 8:1523-1529. <https://doi.org/10.31018/jans.v8i3.994>
- Alijani Z, Amini J, Ashengroph M and Bahramnejad B. 2019. Antifungal activity of volatile compounds produced by *Staphylococcus sciuri* strain MarR44 and its potential for the biocontrol of *Colletotrichum nymphaeae*, causal agent strawberry anthracnose. International Journal of Food Microbiology 307:108276. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro>.
- Anand A, Chinchilla D, Tan C, Mène-Saffrané L, L'Haridon F and Weisskopf L. 2020. Contribution of hydrogen cyanide to the antagonistic activity of *Pseudomonas* strains against *Phytophthora infestans*. Microorganisms 28(8):1144. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8081144>.
- Anand A, Falquet L, Abou-Mansour E, L'Haridon F, Keel C, Weisskopf L. 2023. Biological hydrogen cyanide emission globally impacts the physiology of both HCN-emitting and HCN-perceiving *Pseudomonas*. mBio 14:e00857-23. <https://doi.org/10.1128/mbio.00857-23>
- Aregbesola E, Ortega BA, Falade T, et al., 2020. A detached leaf assay to rapidly screen for resistance of maize to *Bipolaris maydis*, the causal agent of southern corn leaf blight. European Journal of Plant Pathology 156:133–145. doi:10.1007/s10658-019-01870-4.

- Bankole FA, Badu AB, Salami AO. *et al.* 2023. Variation in the morphology and effector profiles of *Exserohilum turcicum* isolates associated with the Northern Corn Leaf Blight of maize in Nigeria. *BMC Plant Biology* 23:386. <https://doi.org/10.1186/s12870-023-04385-7>
- Cañedo V and Ames T. 2004 Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos. Centro Internacional de la Papa (CIP). Lima, Perú.
- Chen B, Han H, Hou J, Bao F, Tan H, Lou X, Wang G and Zhao F. 2022 Control of Maize Sheath Blight and Elicit Induced Systemic Resistance Using *Paenibacillus polymyxa* Strain SF05. *Microorganisms* 10(7):1318. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10071318>.
- Cui L, Deng J, Zhao L, Hu Y and Liu T. 2022 Genetic Diversity and Population Genetic Structure of *Setosphaeria turcica* From Sorghum in Three Provinces of China Using Single Nucleotide Polymorphism Markers. *Frontiers in Microbiology* 13:853202. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.853202>
- De Mendiburu F and Yaseen M. 2020. *Agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research*. R package version 1.4.0. <https://myaseen208.github.io/agricolae/https://cran.r-project.org/package=agricolae>.
- De Rossi RL. 2020. Aportes epidemiológicos para la generación de herramientas de manejo del tizón foliar común del maíz (*Exserohilum turcicum* (Pass.) Leonard & Suggs). Dissertation, Universidad Católica de Córdoba.
- Edgar RC. 2004 MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32:1792–1797. doi: 10.1093/nar/gkh340.
- Félix-Gastélum R, Lizárraga-Sánchez GJ, Maldonado-Mendoza IE, Leyva-Madriral KY, Herrera-Rodríguez G and Espinoza SM. 2018 Confirmation of the identity of *Exserohilum turcicum*, causal agent of maize leaf blight in Sinaloa. *Revista Mexicana de Fitopatología* 36(3):468-478. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1803-1>.
- Fu Y, Yan R, Liu D, Zhao J, Song J, Wang X, Cui L, Zhang J and Xiang W. 2019. Characterization of *Sinomonas gamaensis* sp. nov., a novel soil bacterium with antifungal activity against *Exserohilum turcicum*. *Microorganisms* 7(6):170. doi: <https://doi.org/10.3390/microorganisms7060170>.
- Gao Z, Zhang B, Liu H, Jucai H, and Zhang Y. 2017. Identification of endophytic *Bacillus velezensis* ZSY-1 strain and antifungal activity of its volatile compounds against *Alternaria solani* and *Botrytis cinerea*. *Biological Control* 105:27-39. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.11.007>
- Hall TA. 1999 BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 41:95-98.
- Hernández R M, Madrid H, Tan YP, da Cunha KC, Gené J, Guarro J and Crous PW. 2018. Multi-locus phylogeny and taxonomy of *Exserohilum*. *Persoonia* 41: 71-108. <https://doi.org/10.3767/persoonia.2018.41.05>.
- Hiruma K and Saijo Y. 2016. Methods for long-term stable storage of *Colletotrichum species*. In: *Environmental Responses in Plants: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology, Springer Science+Business Media, New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3356-3_23
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C and Tamura K. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35(6):1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>.
- Kumar S and Mauriya AK. 2015. Effect of fungicides and plant extracts for management of *turcicum* leaf blight of maize. *The bioscan* 10(4):1687-1690.
- Lanfear R, Calcott B, Ho SYW and Guindon S. 2012. PartitionFinder: Combined Selection of Partitioning Schemes and Substitution Models for Phylogenetic Analyses. *Molecular Biology and Evolution* 29(6):1695–1701. <https://doi.org/10.1093/molbev/mss020>.
- Letunic I and Bork P. 2021. Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Res* 49(W1): W293–W296. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab301>.
- Marag PS and Suman A. 2018. Growth stage and tissue specific colonization of endophytic bacteria having plant growth promoting traits in hybrid and composite maize (*Zea mays L.*). *Microbiological Research* 214:101-113. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.05.016>.

- Michelsen CF and Stougaard P. 2012. Hydrogen cyanide synthesis and antifungal activity of the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* In5 from Greenland is highly dependent on growth medium. *Canadian Journal of Microbiology* 58(4): 381-390. <https://doi.org/10.1139/w2012-004>.
- Morales CLR, Barajas BIA, Parra CFI, Valenzuela RV, de los Santos V S, Loeza LPD, Herrera PA, del Carmen OM and Santoyo G. 2023. Evaluation of Biocontrol Potential of *Bacillus* spp. and *Pseudomonas fluorescens* UM270 against Postharvest Fungal Pathogens. *Microbiological Research* 14:511–1523. <https://doi.org/10.3390/>
- Morales-Ruiz E, Zamudio-Aguilasocho GM, Martínez-Valenzuela CM, Maldonado-Mendoza IE and Cordero-Ramírez JD. 2022. Isolation and characterization of endophytic bacteria from maize and giant reed with biotechnological and biocontrol potential against *Rhizoctonia zeae* Pp:76-94 In: *Investigaciones Biológicas, Agrícolas y Ambientales de México*. Pantanal Editora. Brasil. 131 pp. <https://doi.org/10.46420/9786581460594>
- Nakkeeran S, Priyanka R, Rajamanickam S. *et al.* 2020. *Bacillus amyloliquefaciens* alters the diversity of volatile and non-volatile metabolites and induces the expression of defence genes for the management of Botrytis leaf blight of *Lilium* under protected conditions. *J Plant Pathol* 102: 1179–1189. <https://doi.org/10.1007/s42161-020-00602-6>
- Nieuwoudt A, Human MP, Craven M and Crampton BG. 2018. Genetic differentiation in populations of *Exserohilum turcicum* from maize and sorghum in South Africa. *Plant Pathology* 67: 1483-1491. <https://doi.org/10.1111/ppa.12858>
- Perochon A and Doohan FM. 2016. Assessment of Wheat Resistance to *Fusarium graminearum* by Automated Image Analysis of Detached Leaves Assay. *Bioprotocol* 6(24): e2065. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2065>.
- Poulaki EG and Tjamos SE. 2023 *Bacillus species*: factories of plant protective volatile organic compounds. *Journal of Applied Microbiology* 134(3): lxad037. doi: <https://doi.org/10.1093/jambio/lxad037>. PMID: 36822621.
- R Core Team (2020) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>.
- Riera N, Davyt D, Durán R, Iraola G, Lemanceau P and Bajsa N. 2023. An antibiotic produced by *Pseudomonas fluorescens* CFBP2392 with antifungal activity against *Rhizoctonia solani*. *Frontiers in Microbiology* 14:1286926. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1286926>
- RStudio Team. 2020. RStudio: Integrated Development for R. RStudio, PBC, Boston, MA. <http://www.rstudio.com/>.
- Sartori M, Nesci A, Formento A and Etcheverry M. 2015. Selection of potential biological control of *Exserohilum turcicum* with epiphytic microorganisms from maize. *Revista Argentina de Microbiología* 47(1):62-71.
- Sartori M, Nesci A, García J, Passone MA, Montemarani A and Etcheverry M. 2017. Efficacy of epiphytic bacteria to prevent northern leaf blight caused by *Exserohilum turcicum* in maize. *Revista Argentina de Microbiología* 49(1):75-82. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2016.09.008>.
- Sartori M, Bonacci M, Barra P, Fessia A, Etcheverry M, Nesci A and Barros G. 2020. Studies on Possible Modes of Action and Tolerance to Environmental Stress Conditions of Different Biocontrol Agents of Foliar Diseases in Maize. *Agricultural Sciences* 11:552-566. <https://doi.org/10.4236/as.2020.116035>.
- Schrawat, A, Sindhu SS, and Glick BR. 2022. Hydrogen cyanide production by soil bacteria: Biological control of pests and promotion of plant growth in sustainable agriculture. *Pedosphere* 32(1):15-38. [https://doi.org/10.1016/s1002-0160\(21\)60058-9](https://doi.org/10.1016/s1002-0160(21)60058-9)
- Schindelin, J, Arganda CI, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T and Cardona A. 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods* 9(7):676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Shastri B, Kumar R. and Lal RJ. 2020. Isolation, Characterization and Identification of Indigenous Endophytic Bacteria Exhibiting PGP and Antifungal Traits from the Internal Tissue of Sugarcane Crop. *Sugar Tech* 22:563–573 <https://doi.org/10.1007/s12355-020-00824-z>
- Stamatakis A. 2006 RAXML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 22(21):2688–2690. doi:10.1093/bioinformatics/btl446.
- Stenberg JA, Sundh I, Becher PG, *et al.*, 2021. When is it biological control? A framework of definitions, mechanisms, and classifications. *Journal of Pest Science* 94:665–676. <https://doi.org/10.1007/s10340-021-01354-7>.
- Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M and Rozen SG. 2012. Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research* 40(15): e115.

- Vincent JM. 1947. Distortion of fungal hyphae in the presence of certain inhibitors. *Nature* 159(4051):850. <https://doi.org/10.1038/159850b0>.
- Wang Z, Zhong T, Chen K, Du M, Chen G, Chen X, Wang K, Zalan Z, Takacs K and Kan J. 2020. Antifungal activity of volatile organic compounds produced by *Pseudomonas fluorescens ZX* and potential biocontrol of blue mold decay on postharvest citrus. *Food Control* doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107499>.
- White TJ, Bruns T, Lee S and Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, TJ, Eds, *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, New York, 315-322. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1>.
- Wise K and Mueller D. 2011. Are fungicides no longer just for fungi? An analysis of foliar fungicide use in corn. *APSnet Features*. <https://doi.org/10.1094/APSnetFeature-2011-0531>.
- Wu Y, Zhou J, Li C, Ma Y. 2019. Antifungal and plant growth promotion activity of volatile organic compounds produced by *Bacillus amyloliquefaciens*. *Microbiologyopen* 8(8):e00813. <https://doi.org/10.1002/mbo3.813>.
- Zhao X, Zhou J, Tian R and Liu Y. 2023. Microbial volatile organic compounds: Antifungal mechanisms, applications, and challenges. *Frontiers in Microbiology* 13:922450. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.922450>