



**Universidad Michoacana de San Nicolás  
de Hidalgo**

Instituto de Investigaciones Químico Biológicas



**Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Biológicas**

**Opción en Biología Experimental**

**“Análisis y comparación genómica de *Pseudomonas fluorescens*  
UM270: una cepa con capacidades de biocontrol y promoción del  
crecimiento vegetal”**

**TESIS**

Para obtener el grado de

**DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Presenta:

**M.C. Julie Eliene Hernández Salmerón**

Director de Tesis:

**D.C. Gustavo Santoyo Pizano**

Co-Director de Tesis:

**D.C. Gabriel Moreno-Hagelsieb**

Morelia, Mich., Noviembre, 2016

Este trabajo se realizó en el Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, en el Laboratorio de Diversidad Genómica, bajo la dirección del D.C. Gustavo Santoyo Pizano.



Agradezco el financiamiento de este trabajo al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo recibido con número de becario 232463, además de la Beca Mixta recibida y al proyecto de Ciencia Básica con número 169346. Así como a la Coordinación de la Investigación Científica de esta Universidad con el proyecto CIC 2015-2016.



Agradezco infinitamente a la Wilfrid Laurier University en Waterloo, Ontario, Canada, en especial a mi Co-Director el D.C. Gabriel Moreno-Hagelsieb, quien me recibió en su Laboratorio “Computational con-Sequences Lab”, donde realicé gran parte de los análisis genómicos. Gracias al Departamento de Biología y todos los que intervinieron y facilitaron el proceso de convenio con nuestra Universidad.



Especialmente agradezco el financiamiento por el Gobierno de Canadá, a través del Programa “Emerging Leaders in the Americas Program”, para la realización de mi estancia y el desarrollo de este trabajo.



# ÍNDICE

<b>ÍNDICE</b>	<b>i</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>iii</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	<b>iv</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>v</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>vi</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>Mecanismos de promoción del crecimiento vegetal por las especies de <i>Pseudomonas</i></b>	<b>1</b>
<b>Colonización y crecimiento</b>	<b>1</b>
<b>Modulación y síntesis de fitohormonas</b>	<b>2</b>
Ácido indolacético	2
Citocininas	3
Etileno	4
<b>Solubilización de nutrientes y fijación de nitrógeno</b>	<b>4</b>
<b>Mecanismos de antagonismo ejercidos por <i>Pseudomonas</i> spp. hacia hongos fitopatógenos</b>	<b>6</b>
Síntesis de metabolitos antifúngicos y su papel en la supresión de enfermedades	6
Competencia por nutrientes y nichos	8
Producción de enzimas líticas, detoxificación y degradación de factores de virulencia	8
Inhibición por compuestos orgánicos volátiles (VOC´s)	9
Inducción de la resistencia sistémica en plantas (ISR)	12
<b>La especie <i>Pseudomonas fluorescens</i> en el control biológico de hongos patógenos de plantas</b>	<b>12</b>
<b>ANTECEDENTES</b>	<b>15</b>
<b>JUSTIFICACIÓN</b>	<b>17</b>
<b>HIPÓTESIS</b>	<b>18</b>
<b>OBJETIVO GENERAL</b>	<b>19</b>
<b>OBJETIVOS PARTICULARES</b>	<b>19</b>
<b>METODOLOGÍA</b>	<b>20</b>
Secuenciación del genoma de <i>Pseudomonas fluorescens</i> UM270	20
Anotación del genoma	20
Análisis filogenético de <i>P. fluorescens</i> UM270	20
Ensamble de “contigs” y mapa genómico	20
Análisis comparativo de cepas de <i>P. fluorescens</i>	21
Búsqueda de genes involucrados en biocontrol y promoción de crecimiento vegetal	21
Análisis del “core-genoma” y genes únicos de las cepas de <i>P. fluorescens</i>	21
Expresión de los genes <i>phlD</i> y <i>hcnC</i> de UM270 en presencia de hongos fitopatógenos	22

<b>RESULTADOS</b>	<b>24</b>
<b>Capítulo I.</b>	<b>24</b>
<b>Descripción y análisis del genoma de <i>Pseudomonas fluorescens</i> UM270</b>	<b>24</b>
<b>Capítulo II.</b>	<b>32</b>
<b>Comparación genómica de <i>Pseudomonas fluorescens</i> UM270 revela genes únicos relacionados con la colonización y competencia rizosférica</b>	<b>32</b>
Características genómicas	33
Genómica comparativa de cepas de <i>P. fluorescens</i>	34
Análisis del “core-genoma”	41
Genes codificantes únicos en el genoma de la cepa UM270	43
<b>Capítulo III.</b>	<b>47</b>
<b>Expresión de los genes <i>phlD</i> y <i>hcnC</i> de <i>Pseudomonas fluorescens</i> UM270 en interacción con hongos fitopatógenos</b>	<b>47</b>
Genes <i>phlD</i> y <i>hcnC</i> en <i>Pseudomonas</i>	48
Inhibición del crecimiento micelial de hongos fitopatógenos por la cepa UM270	48
Expresión del gen <i>phlD</i>	49
Expresión del gen <i>hcnC</i> .	51
<b>DISCUSIÓN GENERAL</b>	<b>54</b>
<b>RESUMEN DE RESULTADOS</b>	<b>60</b>
<b>CONCLUSIÓN</b>	<b>61</b>
<b>COAUTORÍAS</b>	<b>62</b>
Isolation and characterization of genetic variability in bacteria with $\beta$ -hemolytic and antifungal activity isolated from the rhizosphere of <i>Medicago truncatula</i> plants.	62
Diversidad de bacterias endófitas en raíces de tomate ( <i>Physalis ixocarpa</i> ) mediante el análisis de genes de la subunidad 16S de ARN ribosomal.	64
Recent advances on the role of abiotic factors modulating the plant-microbe-soil interactions.	66
Conociendo el genoma de <i>Pseudomonas fluorescens</i> UM270: una bacteria que protege y beneficia la salud de las plantas.	68
<b>COAUTORÍA DE TESIS DE LICENCIATURA</b>	<b>70</b>
<b>ANEXO I.</b>	<b>71</b>
<b>ANEXO II.</b>	<b>72</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>76</b>

# ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Metabolitos secundarios producidos por especies de *Pseudomonas* relevantes en el biocontrol. Todos los compuestos son solubles excepto el HCN es un compuesto volátil. **7**
- Figura 2.** Resumen de compuestos solubles y volátiles y su efecto en el biocontrol, la resistencia sistémica y la promoción del crecimiento vegetal. Modificado de (Ali et al., 2015). **11**
- Figura 3.** Morfología de la cepa *P. fluorescens* UM270 empleando microscopía electrónica de barrido (izquierda y derecha) y contraste de fase (centro). Fotografía tomada por Julie E. Hernández **16**
- Figura 4.** Comparación funcional de los genomas completos de *P. fluorescens* y la cepa UM270. El tamaño del círculo es proporcional al número de genes encontrados en cada una de las categorías de la base de datos SEED. Graficado en MEGAN 5. **36**
- Figura 5.** Genes que comparte *P. fluorescens* UM270 con el resto de cepas de la misma especie. Al centro se muestra el total de CDS de UM270; los círculos externos contienen el nombre de cada cepa y el total de CDS compartidos con UM270. **41**
- Figura 6.** Core-genoma de las cepas de *P. fluorescens*. El círculo central indica el total de genes que conforman el core-genoma de las cepas representadas en cada uno de los óvalos. El número en los óvalos representa los genes únicos de la cepa. **42**
- Figura 7.** Representación de la abundancia de funciones de las 192 proteínas predichas como únicas en la cepa *P. fluorescens* UM270. El tamaño de letra es proporcional con el número de veces que se repite la función. **44**
- Figura 8.** Ensayo de inhibición hacia hongos fitopatógenos por la cepa *P. fluorescens* UM270. Cuatro discos de micelio de hongo se colocaron en puntos equidistantes de la caja petri, al centro se inoculó la cepa UM270 y se midió el porcentaje de inhibición de micelio. *Bc*, *Botrytis cinerea*; *Fo*, *Fusarium oxysporum*; *Fs*, *Fusarium solani*; *Rs*, *Rhizoctonia solani*. T-student  $p < 0,05$ ,  $n = 4$ . **49**
- Figura 9.** Expresión relativa del gen *phlD* en UM270 en interacción con hongos fitopatógenos. A) Gel de agarosa 1% que muestra las bandas correspondientes al gen *phlD* de un tamaño de 1000pb en cada una de las condiciones probadas, así como el gen endógeno 16S ADNr, región v1-v3 (500 pb). B) Gráficas de expresión relativa, prueba de Duncan  $p < 0.05$ ,  $n = 3$ . *Bc*, *Botrytis cinerea*; *Fo*, *Fusarium oxysporum*; *Fs*, *Fusarium solani*; *Rs*, *Rhizoctonia solani*. **50**
- Figura 10.** Expresión relativa del gen *hcnC* en UM270 en interacción con hongos fitopatógenos. A) Gel de agarosa 2% muestra la expresión de *hcnC* de un tamaño de 200pb en cada una de las condiciones, así como el gen endógeno 16S ADNr, región v1-v3 (500 pb). B) Gráficas de expresión relativa (inferior), prueba de Duncan  $p < 0.05$ ,  $n = 3$ . *Bc*, *Botrytis cinerea*; *Fo*, *Fusarium oxysporum*; *Fs*, *Fusarium solani*; *Rs*, *Rhizoctonia solani*. **52**

# ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características genómicas de cepas de <i>P. fluorescens</i> .	<b>34</b>
Tabla 2. Presencia de genes biosintéticos que participan en la promoción del crecimiento vegetal y biocontrol en genomas de <i>P. fluorescens</i> .	<b>39</b>
Tabla 3. Actividades biológicas de los genes codificantes únicos predichos en el genoma de <i>P. fluorescens</i> UM270.	<b>45</b>

## RESUMEN

En el presente estudio se llevó a cabo el análisis de la secuencia genómica de una bacteria promotora del crecimiento vegetal *Pseudomonas fluorescens* UM270, la cual ha mostrado la capacidad de producir compuestos volátiles y difusibles que participan en la protección y promoción de crecimiento en plantas de *Medicago truncatula* en ensayos *in vitro*. La cepa *P. fluorescens* UM270 fue aislada de la rizósfera de plantas de *Medicago* sp. El genoma de esta bacteria está contenido en un solo cromosoma circular, no se detectaron plásmidos, con un tamaño de 6,050,830pb, un porcentaje de contenido de GC de 60.8 y contiene 5,388 secuencias codificantes (CDS). Se realizó un análisis filogenético y se encontró que UM270 se encuentra relacionada a la cepa *P. fluorescens* Pf0-1, la cual se empleó como genoma de referencia para realizar el ordenamiento de los genes y construir el mapa cromosómico de UM270. Adicionalmente, se llevó a cabo la comparación genómica de esta cepa con siete genomas completos de *P. fluorescens*. En esta comparación se agruparon las funciones de acuerdo a la base de datos de SEED y resaltaron aquellas como mas abundantes las relacionadas al metabolismo, señalización, respuesta al estrés, virulencia, enfermedad y defensa; que son funciones indispensables para la sobrevivencia. Por otro lado, se determinó el “core-genoma” de la especie *P. fluorescens*, el cual contiene 3,039 genes; en este análisis se observó que la cepa UM270 contiene un mayor número de CDS homólogos con el genoma de *P. fluorescens* F113. Además, se identificó el número de genes únicos con que cuenta el genoma de UM270 con 599 CDS, de los cuales 192 cuentan con función reportada en otros organismos y los 407 restantes son aún desconocidos, lo cual abre la posibilidad de nuevas investigaciones al respecto. Por otro lado, se determinó la expresión relativa de genes involucrados en el biocontrol de hongos fitopatógenos, los genes *phlD* y *hcnC*, cuyos productos participan en la síntesis de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana, el 2,4-Diacetilfloroglucinol y Cianuro de Hidrógeno (HCN), respectivamente. Se observó que la expresión de dichos genes es modulada tanto positiva como negativamente por la especie de fitopatógeno, principalmente *Botrytis cinerea* y *Fusarium* spp.

**Palabras clave:** *Pseudomonas*, genómica, comparación, core-genoma, expresión

## ABSTRACT

In the present study the analysis of the genomic sequence of a plant growth promoting bacterium *Pseudomonas fluorescens* UM270 was carried out, which has shown the capacity to produce volatile and diffusible compounds that participate in the protection and growth promotion in plants of *Medicago truncatula* *in vitro* assays. The strain *P. fluorescens* UM270 was isolated from the rhizosphere of *Medicago* sp. The genome of this bacterium is contained in a single circular chromosome, no plasmids were detected, with a size of 6,050,830bp, GC content of %60.8 and contains 5,388 coding DNA sequences (CDS). A phylogenetic analysis was performed and it was found that UM270 is related to the strain *P. fluorescens* Pf0-1, which was used as reference genome to carry out the ordering of the genes and to construct the chromosomal map of UM270. Additionally, the genomic comparison of this strain was carried out with seven complete *P. fluorescens* genomes. In this comparison, the functions were grouped according to the SEED database and highlighted those as more abundant related to metabolism, signaling, stress response, virulence, disease and defense, which are essential functions for survival. Furthermore, we determined the "core-genome" of the species *P. fluorescens*, which contains 3,039 genes. In this analysis it was observed that the UM270 strain contains a larger number of CDS shared with the genome of *P. fluorescens* F113. In addition, we identified the number of unique genes in the UM270 genome with 599 CDS, of which 192 have a reported function in other organisms and the remaining 407 are still unknown, which opens the possibility of further research. On the other hand, we determined the relative expression of genes involved in the biocontrol of phytopathogenic fungi, *phlD* and *hcnC* genes, whose products are involved in the synthesis of secondary metabolites with antimicrobial activity, 2,4-Diacetylphloroglucinol and Hydrogen Cyanide, respectively. It was observed that the expression of these genes is modulated both positively and negatively by the phytopathogen species, mainly *Botrytis cinerea* and *Fusarium* spp.



## INTRODUCCIÓN

El género *Pseudomonas* representa un grupo de bacterias Gram-negativas ampliamente distribuidas en diversos ambientes. Algunas especies son patógenas, por ejemplo de humanos (Cullen and McClean, 2015) y de plantas (Park et al., 2014). Otras especies pueden tener un estilo de vida libre. Diversas especies de *Pseudomonas* habitan ambientes terrestres, y por lo tanto, son habitantes comunes de la rizósfera de las plantas (Silby et al., 2009; Redondo-Nieto et al., 2013). Estas bacterias pueden llevar a cabo funciones que promueven el desarrollo, salud y crecimiento de las plantas, en cuyo caso se les denomina PGPR por sus siglas en inglés (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria) (Kloepper and Schroth, 1978; Lugtenberg and Kamilova, 2009).

Por razones obvias, la principal fuente de aislamiento de PGPR ha sido la rizósfera, la cual se define como la porción de suelo directamente en contacto con la raíz de las plantas. La rizósfera es la zona de interacción entre la microbiota del suelo y la planta, interacción que se establece mediante los exudados radiculares y el intercambio de nutrientes planta-microorganismo (Hiltner et al., 1904). Las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal fueron inicialmente descritas en el año de 1978 (Kloepper and Schroth, 1978), como una alternativa a la reducción en el uso de fertilizantes químicos (Adesemoye and Kloepper, 2009).

### ***Mecanismos de promoción del crecimiento vegetal por las especies de *Pseudomonas****

Se conocen varios mecanismos por los cuales las PGPR, particularmente las *Pseudomonas*, llevan a cabo las actividades de promoción de crecimiento de las plantas, así como la inhibición de hongos fitopatógenos, actuando tanto de manera directa como indirecta, respectivamente (Haas and Défago, 2005).

### ***Colonización y crecimiento***

El primer paso para una interacción exitosa planta-microorganismo es la competencia para colonizar tanto los tejidos externos como internos de la planta. Esto se lleva a cabo mediante diferentes pasos, como el reconocimiento, adherencia e invasión (en el caso de patógenos o endófitos) (Lugtenberg and Kamilova, 2009).

Para lo cual, los microorganismos han establecido interacciones de comunicación a través de señales químicas iniciadas por la planta, atrayendo a los organismos del suelo que, a su vez, perciben dichas señales e inician la colonización (Badri and Vivanco, 2009).

Otro aspecto importante para la colonización es la movilidad, así como la adherencia, se ha observado que este último influye directamente en la duración e intensidad de la interacción (Berg, 2009). En el caso de *Pseudomonas* spp., la presencia de flagelos es una característica de ventaja para estos organismos, así como también la presencia de lipopolisacáridos, en especial la cadena del antígeno-O. Si bien, dicho antígeno resulta ser un determinante importante para la colonización, su estructura y función es dependiente a la cepa bacteriana (Rocchetta et al., 1999; Whitfield and Trent, 2014).

### **Modulación y síntesis de fitohormonas**

Las bacterias PGPR tienen la capacidad de sintetizar reguladores de crecimiento, tales como las fitohormonas. Uno de los géneros más estudiados es el de *Bacillus*, que produce citocininas (Arkhipova et al., 2007) y ácido indolacético (AIA) (Idris et al., 2007). Hasta la fecha se ha descrito que algunas especies de *Pseudomonas* tienen la capacidad de sintetizar reguladores como: AIA, citocininas y giberelinas (GA) (Glick, 2012).

### **Ácido indolacético**

Las auxinas son las fitohormonas estimulantes del crecimiento vegetal por excelencia, siendo el ácido indol-3-acético (AIA) el más estudiado. Esta hormona coordina diferentes procesos de desarrollo que afectan la división, extensión y diferenciación celular en las plantas. Específicamente, lleva a cabo las siguientes funciones: estimulación de semillas y tubos de germinación, modificación de la estructura de la raíz, como la formación de raíces laterales y adventicias (Patten and Glick, 2002), mediación de respuestas a la luz y fluorescencia, estimula la producción de pigmentos y biosíntesis de varios metabolitos, participa en la resistencia al estrés (Spaepen and Vanderleyden, 2011) y se ha sugerido como molécula señal en el patógeno *Pseudomonas savastanoi* (Aragón et al., 2014).

Esta hormona se sintetiza a partir del aminoácido triptófano, que es exudado a través de la raíz y tomado por las rizobacterias para sintetizar AIA (Spaepen and Vanderleyden, 2011). La concentración de triptófano varía en los exudados de las diferentes plantas. Se ha probado que hay una correlación positiva en la producción de auxinas por diversos microorganismos y la cantidad de AIA endógeno en plantas de trigo (Ali et al., 2009), siendo igualmente equivalente el efecto en la estimulación del crecimiento de la planta.

Asimismo, en una cepa modificada sobreexpresante de AIA, *P. fluorescens* CHA0, se observó un mayor efecto en el crecimiento y desarrollo de la raíz de plantas de pepino, a diferencia de la cepa control (baja productora de AIA) (Beyeler et al., 1999), lo cual es relevante para una posible aplicación en la agricultura con el fin de contrarrestar el excesivo uso de productos químicos, logrando incrementar naturalmente la producción de cultivos.

### **Citocininas**

Las citocininas son hormonas vegetales que promueven y mantienen la división celular en plantas. Estas fitohormonas participan en la formación del tallo, el crecimiento de la raíz primaria y la formación de callo. Su síntesis deriva de las purinas y son producidas tanto en plantas como en microorganismos (Ortíz-Castro et al., 2009).

Se ha estudiado el efecto de las citocininas en el crecimiento de las plantas y los genes involucrados en la percepción y señalización del tipo histidina cinasas, *CRE1/AHK4/WOL*, *AHK2*, *AHK3* (Kakimoto, 2003). En microorganismos se ha logrado determinar su síntesis y efecto positivo en el crecimiento de plantas. En cuanto a la transducción de señales de esta fitohormona, se han realizado pocos estudios, estableciendo las primeras bases de su entendimiento.

Para ello, se ha empleado la rizobacteria promotora de crecimiento vegetal *Bacillus megaterium* UMCV1, la cual tiene la capacidad de modificar la arquitectura de la raíz de *Arabidopsis thaliana* incrementando la formación de raíces laterales y la longitud de pelos radiculares. Para determinar las vías por las que ejerce su actividad de promoción, inicialmente se observó que el efecto era independiente de la señalización por auxinas y etileno (Katta et al., 1999), por lo que se sugirió una posible vía por medio de citocininas; posteriormente, se demostró el papel de los

receptores a citocininas en plantas de *A. thaliana* que carecían de uno, dos o los tres receptores de cinasas reportados por Kimoto (2003). Esto resultó en la reducción del crecimiento de la planta, confirmando así el resultado anterior y concluyendo la importancia en la percepción de citocininas en respuesta a la presencia de la bacteria (Ortíz-Castro et al., 2008).

### **Etileno**

El etileno es una fitohormona importante para el desarrollo de las plantas, involucrada en procesos como: la germinación, iniciación de la raíz, crecimiento de tallo y raíz, floración, maduración de la fruta, senescencia, en la respuesta de la planta al estrés ambiental y al ataque de patógenos. Sin embargo, altas concentraciones de esta hormona en la planta pueden conducir a la senescencia y marchitamiento prematuros (Glick et al, 1999; Glick, 2005).

Un mecanismo que ha tomado gran relevancia por la capacidad de disminuir la concentración de etileno en plantas, es la participación de la enzima ACC desaminasa, presente en algunas PGPR. Esta enzima, degrada al precursor directo del etileno, el ACC (Aminociclopropano-1-carboxilato), dando como productos amonio y  $\alpha$ -cetobutirato. La enzima ACC-desaminasa también ha sido ampliamente investigada en bacterias del género *Pseudomonas* (Glick, 2005), como un mecanismo indirecto de promoción de crecimiento vegetal, contrarrestando los efectos negativos inducidos por el estrés ambiental.

### **Solubilización de nutrientes y fijación de nitrógeno**

Otros mecanismos bien estudiados por los cuales las PGPR promueven el crecimiento de las plantas están relacionados con proveer los nutrientes más escasos en los suelos agrícolas, como son nitrógeno, fósforo y hierro. Si bien estos elementos pueden estar presentes en el suelo, con frecuencia se encuentran formando compuestos complejos o en un estado de oxidación que la planta no puede asimilar.

En el caso de la **fijación biológica del nitrógeno**, las bacterias rizobias (por ejemplo, *Rhizobium* spp.) son las responsables de llevar a cabo la conversión del nitrógeno atmosférico ( $N_2$ ) a amonio ( $NH_4$ ), principalmente en los nódulos de plantas

leguminosas, así como también de forma endófito en otros grupos de plantas. Por ejemplo, en plantas que no forman nódulos, las bacterias de vida libre, como *Azospirillum* spp., son capaces de fijar nitrógeno al internalizarse en tejidos tales como el tallo (Santoyo et al., 2015).

En el caso de *Pseudomonas* spp., no se ha reportado su actividad de fijación de nitrógeno a través de la enzima nitrógeno reductasa, como sería el caso de las Rhizobiaceae. Sin embargo, otra vía mediante la cual provee de nitrógeno a la planta es a través de la enzima ACC desaminasa, la cual al degradar el ACC provee a la planta de una fuente alterna de N en forma de amonio. Se ha estimado que el 1-10% de las cepas rizosféricas poseen la enzima ACC desaminasa (Glick, 2012).

La **solubilización de fosfatos** es otra actividad que llevan a cabo las PGPR para beneficio de las plantas, ya que el fósforo es un elemento esencial en ácidos nucleicos, coenzimas, fosfolípidos y en moléculas de transferencia de energía, como ADP y ATP. Los compuestos más comunes de fósforo en el suelo se encuentran en las formas inorgánicas insolubles  $K_2PO_4^-$  y  $HPO_4^{-2}$ , por lo cual es necesario solubilizarlo. Estos compuestos se solubilizan por la acción de enzimas tales como: fosfatasas, fitasas, fosfonatasas y liasas que liberan el fósforo soluble de compuestos orgánicos del suelo (Teresa and Rodríguez, 2005).

El ion de **hierro  $Fe^{3+}$**  es otro elemento nutrimental que tiene muy poca solubilidad a pH neutro y por ende no puede ser utilizado directamente por los organismos. Por lo tanto, los microorganismos y plantas como las gramíneas producen compuestos quelantes llamados sideróforos. Los sideróforos secretados hacia el exterior de la célula quelan el  $Fe^{3+}$  para formar complejos sideróforo-Fe que son reconocidos por proteínas membranales, e internalizados por la célula mediante mecanismos de transporte activo. La mayoría de los sideróforos consisten en derivados del ácido hidroxámico, el cual actúa como quelante férrico, mientras que algunos de estos compuestos son péptidos no ribosomales (Aguado-Santacruz et al., 2012).

Se conocen algunos compuestos sideróforos producidos por *Pseudomonas*, como la pioverdina, de tipo catecolato; así como las pseudobactinas y ferribactinas, que corresponden al tipo hidroxamato. Estos sideróforos pueden ser específicos de las diferentes especies de *Pseudomonas* (Aguado-Santacruz et al., 2012). Por ejemplo,

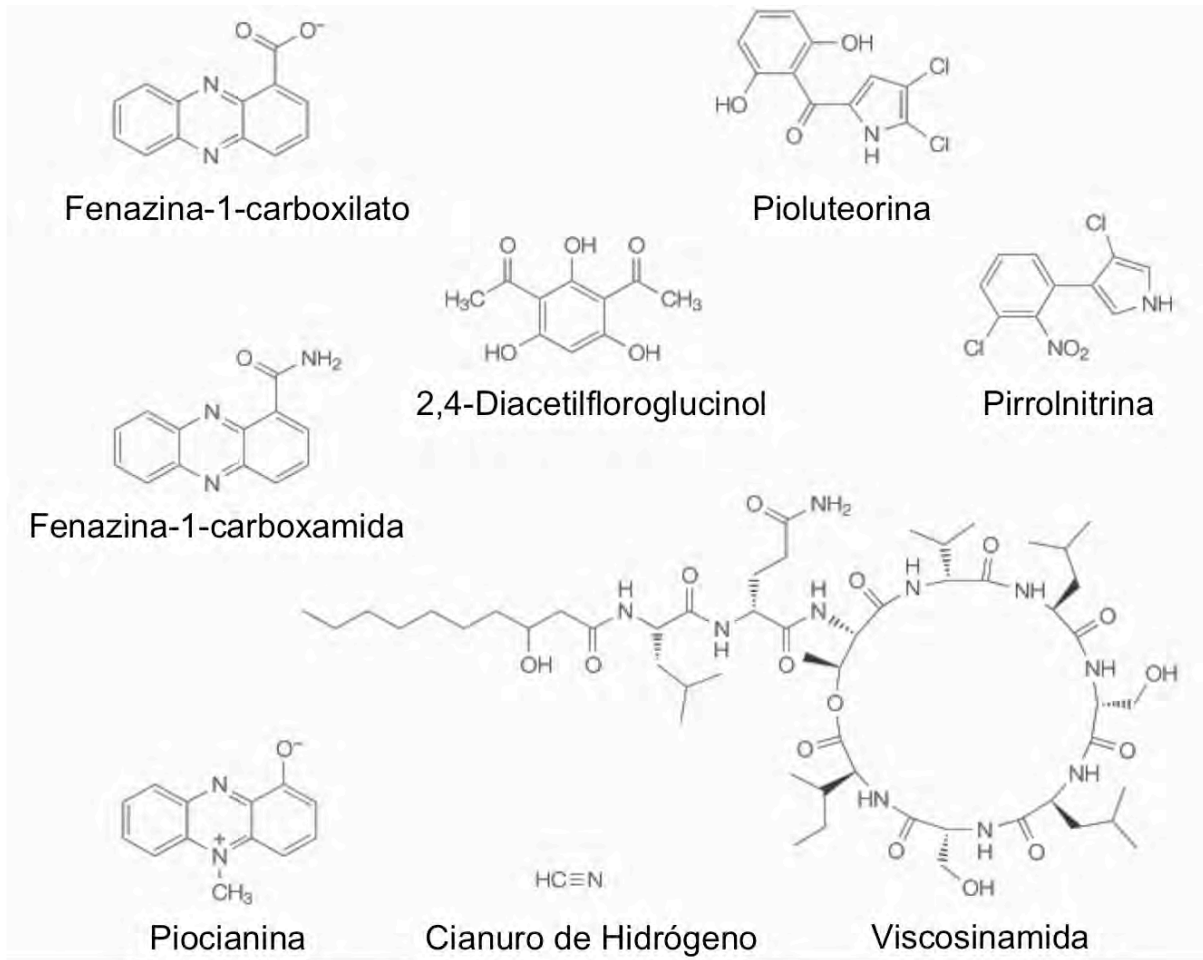
la pioquelina es uno de los principales sideróforos sintetizados por *P. aeruginosa* PAO1 para asimilar el hierro (Braud et al., 2009).

### ***Mecanismos de antagonismo ejercidos por Pseudomonas spp. hacia hongos fitopatógenos***

#### **Síntesis de metabolitos antifúngicos y su papel en la supresión de enfermedades**

Otra capacidad importante de las PGPR es la síntesis de agentes antimicrobianos y la gran diversidad de estos, como son: fenazina-1-ácido carboxílico (PCA), 2,4-diacetilfloroglucinol (2,4-DAPG), pirrolnitrina (Prn), cianuro de hidrógeno (HCN), pioluteorina (Plt) y compuestos proteicos (Fig. 1), así como las bacteriocinas; todos ellos con capacidades de antibiosis (Haas and Keel, 2003; Santoyo et al., 2012; Validov et al., 2005; Voisard et al., 1989; Weller et al., 2002)

Las especies de *Pseudomonas* pueden sintetizar una gran variedad de estos compuestos. Por ejemplo, la cepa *P. fluorescens* CHA0 produce 2,4-DAPG, Plt, Prn y HCN (Haas et al., 1991; Keel, 1992). Estos antibióticos varían entre las especies y les brindan mejores capacidades de biocontrol. Tal es la relevancia de los tipos de antibióticos producidos por las distintas cepas de este género, que incluso se creó una nueva especie en este grupo bacteriano, *Pseudomonas protegens*, donde se incluyen a aquellas productoras de 2,4-DAPG y Plt, (Ramette et al., 2011), dentro de la cual ahora pertenecen las cepas *P. fluorescens* CHA0 y Pf5.



**Figura 1.** Metabolitos secundarios producidos por especies de *Pseudomonas* relevantes en el biocontrol. Todos los compuestos son solubles excepto el HCN es un compuesto volátil.

### **Competencia por nutrientes y nichos**

Los estudios iniciales sobre el control biológico de bacterias hacia hongos patógenos de plantas sugerían que, de manera natural, la competencia por el nicho y nutrientes eran los mecanismos principales para evitar la proliferación de patógenos en la rizósfera, ya que los microorganismos no patógenos crecen rápidamente colonizando la superficie de las plantas y así obteniendo la mayoría de nutrientes disponibles (Lugtenberg and Kamilova, 2009). Sin embargo, esta explicación se atribuía de manera general ya que se carecía de pruebas experimentales para ello. Con el avance en los estudios moleculares se facilitó este tipo de estudios, por lo que el interés se centró en la competencia por el hierro (Kloepper et al., 1980).

En la competencia por nutrientes en la rizósfera, las PGPR productoras de sideróforos tienen una ventaja sobre los hongos patógenos, una vez formado el complejo sideróforo- $\text{Fe}^{3+}$ , las bacterias internalizan el  $\text{Fe}^{2+}$  activo en el citoplasma, o bien es tomado por las plantas. Las bacterias producen una gran variedad de sideróforos, por lo cual pueden inhibir el crecimiento de hongos patógenos cuando la concentración de  $\text{Fe}^{3+}$  es baja en la rizósfera (Whipps, 2001).

En particular, los sideróforos sintetizados por *P. fluorescens* tienen una alta afinidad al hierro y han sido ampliamente estudiados (Kloepper et al., 1980; Weller, 2007), principalmente la pioverdina y su conocido efecto en el control de hongos como *Pythium* y *Fusarium* spp. (Loper and Buyer, 1991); así como en *Colletotrichum lindemuthianum*, *Colletotrichum gloesporioides* y *Phytophthora cinnamomi*, donde además se observó un porcentaje de inhibición de un 76, 72 y 70%, respectivamente, por parte de los sideróforos producidos por *P. fluorescens* ZUM80 (Santoyo et al., 2010).

### **Producción de enzimas líticas, destoxificación y degradación de factores de virulencia**

Otro de los mecanismos de antibiosis ejercido por las PGPR es la síntesis de enzimas que pueden degradar la pared celular de hongos, tales como quitinasas, glucanasas, celulasas, proteinasas y lipasas, las cuales se asocian con la capacidad de la bacteria para suprimir el crecimiento del micelio (Compant et al., 2005).

Existen reportes de diferentes especies de PGPR que sintetizan algunas de estas enzimas y llevan a cabo la actividad de biocontrol hacia diferentes hongos patógenos de plantas como *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*, *Sclerotium rolfii* y *Pythium ultimum* (Glick, 2012).

El proceso de destoxificación, por su parte, se da cuando ciertos agentes de control biológico producen proteínas que se unen irreversiblemente a la toxina o factor de virulencia de algún patógeno, ya sea hongo o bacteria. Por ejemplo, esto ocurre durante la interacción de especies de *Pseudomonas* que son capaces de hidrolizar el ácido fusárico, que es una micotoxina de plantas y animales producido por varias especies del fitopatógeno *Fusarium* spp. (Bacon et al., 1996; Toyoda et al., 1988).

Para que los microorganismos expresen factores de virulencia, se necesitan altos niveles de densidad poblacional, debido a la producción y detección de moléculas de percepción de quórum que regulan estos procesos. Dentro de estas, las más estudiadas son las acil-homoserina lactonas (AHL) (Hartmann and Schikora, 2012). Recientemente, se ha descubierto que algunas PGPR tienen la capacidad de degradar este tipo de moléculas a través de enzimas como AHL acilasas o lactonasas. De esta manera se reprime la expresión de numerosos genes de virulencia (Kalia, 2013). Esto también se conoce como interferencia de la señal o “Quorum-quenching” y representa un mecanismo de biocontrol con un elevado potencial de ser investigado en diversos sistemas.

### **Inhibición por compuestos orgánicos volátiles (VOC´s)**

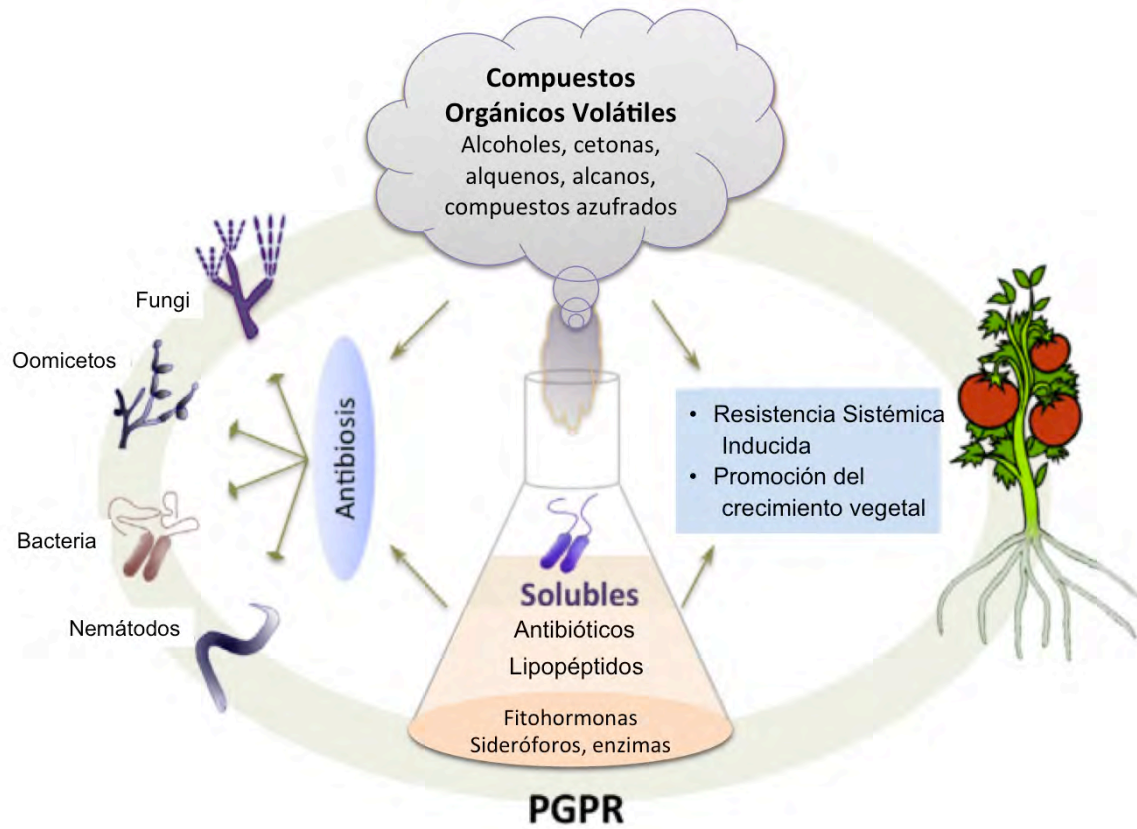
Los compuestos orgánicos volátiles se definen como aquellos compuestos de bajo peso molecular con suficiente presión de vapor que, en condiciones normales, pueden vaporizarse y entrar en la atmósfera. Algunos de estos compuestos son alcoholes, cetonas, aldehídos e hidrocarburos (Fig. 2) (Ortíz-Castro et al., 2009).

Recientemente, se ha descrito cómo estos VOCs bacterianos participan como moléculas señal en la rizósfera y en su interacción con la planta. Algunos de ellos han mostrado un efecto promotor en el crecimiento de plantas, como en *Medicago truncatula* (del Carmen Orozco-Mosqueda et al., 2013) y *A. thaliana* (Ping and Boland, 2004) y en el efectivo control de patógenos (Vespermann et al., 2007). En este respecto, se han estudiado distintas especies de los géneros *Arthrobacter*,

*Stenotrophomonas*, *Serratia*, *Bacillus* y *Pseudomonas*, que inhibieron el crecimiento micelial del fitopatógeno *Rhizoctonia solani*, mediante la producción de VOC's (Kai et al., 2007; Vespermann et al., 2007).

Particularmente, en el género *Pseudomonas* se analizó el perfil de volátiles de cuatro cepas que presentaron efecto inhibitorio hacia diferentes hongos patógenos, *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani*, *Diaporthe phaseolorum* y *Colletotrichum lindemuthianum*. Dentro de los principales compuestos se encontraron derivados azufrados, como el Dimetil disulfuro (DMDS). Otro compuesto como la N,N-Dimetilhexadecilamina (DMHDA) también mostró capacidades de biocontrol (Hernández-León et al., 2015; Huang et al., 2012; Velázquez-Becerra et al., 2011).

Además de estos compuestos, existen numerosos reportes que muestran actividad antifúngica de diversos compuestos volátiles: HCN, amonio, butirolactonas, fenazina-1-ácido carboxílico y alcoholes (Ortíz-Castro et al., 2009).



**Figura 2.** Resumen de compuestos solubles y volátiles y su efecto en el biocontrol, la resistencia sistémica y la promoción del crecimiento vegetal. Modificado de (Ali et al., 2015).

### **Inducción de la resistencia sistémica en plantas (ISR)**

Varias especies de *Pseudomonas* no patógenas tienen la capacidad de inducir un estado de resistencia sistémica en plantas (ISR), brindando protección hacia un gran número de organismos fitopatógenos, como pueden ser hongos, bacterias y virus (Bloemberg and Lugtenberg, 2001). Existen varios determinantes bacterianos que llevan a cabo esta inducción: sideróforos, flagelos, el antígeno-O de lipopolisacáridos, compuestos orgánicos volátiles (VOC) y antibióticos (Bakker et al., 2007), así como el ácido salicílico (Fig. 2) (De Meyer and Höfte, 1997).

En *Pseudomonas chlororaphis*, se ha determinado el efecto del compuesto volátil 2,3-butanediol, responsable de la inducción de ISR en plantas de tabaco, en presencia del patógeno *Erwinia carotovora* (Han et al., 2006). Por su parte, en la cepa *P. fluorescens* CHA0, se ha determinado el efecto de inducción de ISR por el antibiótico 2,4-DAPG en *A. thaliana* (Iavicoli et al., 2003).

### **La especie *Pseudomonas fluorescens* en el control biológico de hongos patógenos de plantas**

Una de las principales causas de las pérdidas en los cultivos agrícolas es la presencia de hongos fitopatógenos, los cuales pueden ser específicos al cultivo, o en su mayoría generalistas, como el caso del hongo *Botrytis cinerea*, que es el causante de la enfermedad del moho gris y ataca a más de 200 especies de plantas (Nambeesan et al., 2012).

Desde los años 1950's se incrementó el interés sobre el biocontrol de enfermedades causadas por hongos con el uso de microorganismos antagonistas (Wood and Tveit, 1955). Con ello se inició la búsqueda y el aislamiento de bacterias con capacidades de biocontrol (Burr et al., 1978; Weinhold and Bowman, 1968). De esta manera, se han encontrado varios géneros con dicha capacidad de antagonismo, entre los cuales, *Pseudomonas* y *Bacillus* han mostrado, además, la característica de promover el crecimiento en distintas especies vegetales (Santoyo et al., 2012).

La especie *P. fluorescens* se ha distinguido por la gran variedad de compuestos y metabolitos antifúngicos que sintetiza (Gross and Loper, 2009), así como de una elevada eficiencia en la colonización en la rizósfera (Compant et al., 2010), lo cual le

permite una mayor competitividad como agente de biocontrol. Sin embargo, falta por resolver el único problema que ha retrasado su producción comercial como bioinoculante, el hecho de carecer de esporas como el género *Bacillus*, ya que esto complica mantenerla por mucho tiempo en el anaquel. A pesar de ello, ya existen algunos productos comerciales en base a esta especie (Berg, 2009).

Por otro lado, aún se desconocen muchos de los mecanismos asociados a la inhibición de hongos patógenos, así como la especificidad de los metabolitos antifúngicos; además, el entendimiento sobre los sistemas de comunicación y señalización durante la interacción de estos dos tipos de organismos es todavía muy básico.

Hasta la fecha sólo se cuenta con un reporte de la participación de *P. fluorescens* en la inhibición de *B. cinerea*, el fitopatógeno que en el año 2012 se enlistó como el segundo patógeno de plantas de interés económico y de investigación mundial (Dean et al., 2012; Hernández-León et al., 2015). Sin embargo, sólo se sugieren los posibles metabolitos que pueden participar en el antagonismo pero no se han probado ni caracterizado.

El quinto patógeno de la misma lista, *F. oxysporum*, ha sido ampliamente reportado como patógeno de más de 100 tipos de plantas, causando enormes pérdidas en cultivos de tomate, algodón y plátano. Algunas PGPR que se han reportado con actividad antifúngica a este organismo son principalmente *P. chlororaphis* (Chin-A-Woeng et al., 1998) y *P. fluorescens* (Bakker et al., 2007), mediante la síntesis de fenazinas e ISR, respectivamente.

Por lo anterior, el género *Pseudomonas* se ha establecido como un agente de biocontrol por excelencia (Walsh et al., 2001); sin embargo, aún falta profundizar sobre los determinantes responsables de llevar a cabo esta actividad, así como la posible comunicación, señalización, inducción/interferencia de dicha interacción bacteria-hongo.

Con los avances en las tecnologías de secuenciación y la publicación de nuevos genomas completos, se han establecido nuevos retos para los estudios de genómica comparativa y funcional en la identificación de genes presentes

específicamente en bacterias rizosféricas benéficas (Bloemberg and Lugtenberg, 2001).

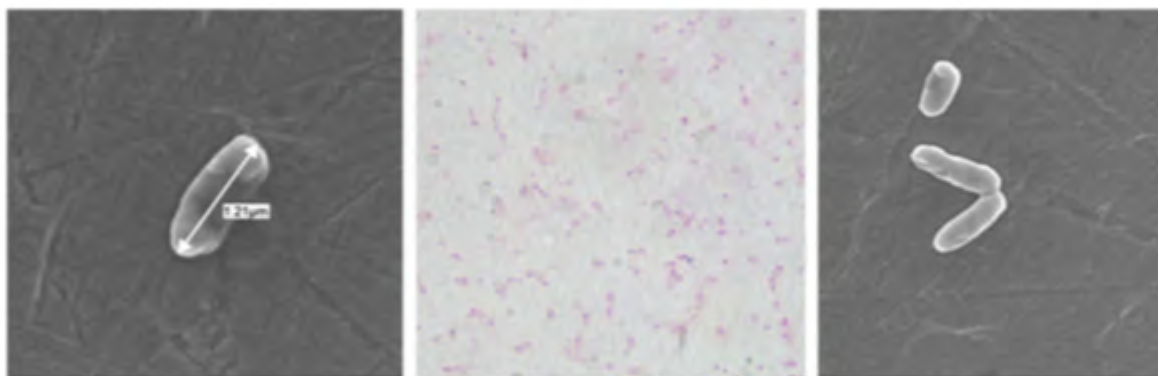
## ANTECEDENTES

Actualmente, la base de datos del GenBank, contenida en el NCBI, contiene 88 genomas completos de *Pseudomonas*, de los cuales sólo siete pertenecen a la especie *P. fluorescens*. En nuestro grupo de trabajo se han aislado diferentes cepas de *P. fluorescens* (UM16, UM240, UM256 y UM270) de la rizósfera de *Medicago truncatula*, las cuales se han analizado experimentalmente y mostrado excelentes capacidades directas e indirectas como PGPRs (Hernández-León et al., 2015).

Dentro de las actividades de biocontrol hacia hongos fitopatógenos y de promoción de crecimiento en plantas de alfalfa y tomate, se ha encontrado que producen antibióticos como 2,4-DAPG y fenazinas, que inhiben el crecimiento de dichos patógenos, así como sideróforos que permiten a la planta obtener Fe en su forma soluble, además participa en la síntesis de AIA (Hernández-León et al., 2015).

De acuerdo con los datos publicados por Hernández-León y colegas (2015), la cepa *P. fluorescens* UM270 presenta un mayor número de actividades de promoción de crecimiento en plántulas de *M. truncatula* y mostró inhibición en el crecimiento de diversos hongos fitopatógenos de importancia agroeconómica, tales como: *B. cinerea*, *R. solani*, *D. phaseolorum* y *C. lindemuthianum*.

La cepa *P. fluorescens* UM270 tiene un tamaño aproximado de 1.2µm (Fig. 3), es una bacteria gram negativa (Fig. 3, centro), no produce esporas, tiene forma de bacilo y es móvil; cuenta con las características morfológicas del género *Pseudomonas*.



**Figura 3.** Morfología de la cepa *P. fluorescens* UM270 empleando microscopía electrónica de barrido (izquierda y derecha) y contraste de fase (centro). Fotografía tomada por Julie E. Hernández

En ensayos de biocontrol *in vitro*, dicha cepa redujo los síntomas de la enfermedad causada por *B. cinerea* en las plántulas de *M. truncatula* (Hernández-León et al, 2015). Por lo que se identificaron algunos compuestos mediante los cuales *P. fluorescens* UM270 lleva a cabo su actividad de PGPR, ya sea a través de compuestos difusibles (fenazinas, 2,4-DAPG, sideróforos y proteasas) y/o volátiles (como Dimetil disulfuro, Dimetilhexadecilamina y HCN) (Hernández-León et al, 2015). Lo cual hace de esta cepa un agente de biocontrol potencial que permita limitar el uso de agroquímicos tóxicos para el ambiente y la salud humana.

Finalmente, en nuestro grupo de trabajo se analizó la capacidad de colonización de UM270 en plantas de maíz (*Zea mays*), donde se mostró su excelente capacidad para colonizar y sobrevivir en la rizósfera de estas plantas, incrementando de  $1 \times 10^4$  a  $1 \times 10^7$  UFC (unidades formadoras de colonias), lo cual representa un mecanismo indispensable para la sobrevivencia y competencia en un microambiente tan hostil como la rizósfera, además de ser una capacidad esencial si se desea emplear cierta bacteria como un agente biopromotor (Rojas-Solís et al., 2016).

Por las razones anteriores, se llevó a cabo la secuenciación, así como la caracterización del genoma completo de de la cepa *P. fluorescens* y comparación UM270 con otras *Pseudomonas* fluorescentes.

## JUSTIFICACIÓN

Las bacterias del género *Pseudomonas* presentan excelentes capacidades de protección contra enfermedades causadas por fitopatógenos, además de que exhiben mecanismos directos de promoción del crecimiento vegetal, por lo que representan una excelente opción en la producción de bioinoculantes. En este sentido, la cepa de *P. fluorescens* UM270 presenta diversas funciones benéficas durante su interacción con la planta, por lo que conocer su genoma permitirá realizar un análisis de los elementos genéticos involucrados en la producción del arsenal de metabolitos que produce, así como sus capacidades colonizadoras y de competencia en la rizósfera. Adicionalmente, el conocimiento de su genoma permitirá la comparación *in silico* con otros genomas del grupo fluorescente, identificando los genes responsables del biocontrol y promoción del crecimiento vegetal, con el fin de comprender sus funciones únicas en la interacción bacteria-planta-patógeno en la rizósfera.

## **HIPÓTESIS**

El genoma de *P. fluorescens* UM270 contiene un grupo de genes únicos relacionados con actividades de promoción de crecimiento vegetal y de biocontrol.

## **OBJETIVO GENERAL**

Identificar los genes únicos involucrados en la promoción del crecimiento vegetal y el biocontrol presentes en *P. fluorescens* UM270.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Determinar las características y funciones genómicas de *P. fluorescens* UM270.
2. Conocer la diversidad de genes involucrados en la promoción de crecimiento vegetal y biocontrol en cepas de *P. fluorescens*.
3. Determinar los genes únicos de las cepas de esta especie cuyo genoma se conoce, incluyendo la cepa UM270.
4. Analizar la expresión de genes involucrados en las capacidades de antagonismo de la cepa *P. fluorescens* UM270 hacia diversos hongos fitopatógenos.

## METODOLOGÍA

### **Secuenciación del genoma de *Pseudomonas fluorescens* UM270**

El ADN genómico de *P. fluorescens* UM270 se aisló empleando el kit Wizard Genomic DNA Isolation (Promega), posteriormente se purificó con el kit Wizard Genomic DNA Purification, de la misma casa comercial. El ADN purificado se secuenció en el LANGEBIO, Irapuato, utilizando MiSeq Sequencer (Illumina, Inc.), donde se llevó a cabo la secuenciación por síntesis. Para la obtención de “contigs” se empleó el software Newbler v2.9.

### **Anotación del genoma**

Los contigs obtenidos de la secuenciación se anotaron en RAST, que emplea una base de datos de subsistemas del SEED, para asignar las funciones correspondientes a cada uno de los genes por homología. Asimismo, se anotó en el “Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP)”, del NCBI, para ser depositado el WGS “Whole Genome Shotgun” en DDBJ/EMBL/GenBank.

### **Análisis filogenético de *P. fluorescens* UM270**

Los genes 16S ribosomales de UM270 se aislaron y secuenciaron previamente a la obtención de la secuencia del genoma (Hernández-León et al., 2015). Una vez ensamblado el genoma, se buscaron todos los genes de ARNr 16S, en las 48 cepas del género *Pseudomonas* secuenciadas hasta el momento, usando un modelo de Markov con el software INFERNAL (Nawrocki and Eddy, 2013). Encontramos que en promedio, los integrantes de este género cuentan con cinco copias de genes 16S ribosomales, por lo cual se escribió un programa (Perl) para elegir sólo una de las copias al azar y de esta manera realizar el análisis filogenético con la cepa UM270. Para ello, se utilizó el modelo evolutivo de Máxima Verosimilitud (PhyML), con el modelo de sustitución de HGT, y un valor de “bootstrap” de 1000.

### **Ensamble de “contigs” y mapa genómico**

El ensamble de los contigs (secuencias consenso, “contiguous sequences”) se realizó tomando como cepa de referencia a *P. fluorescens* Pf0-1 (Silby et al., 2009). Para ello se realizó una comparación de las proteínas codificadas por ambos genomas con el programa UBLAST (Edgar, 2010), con lo cual se obtuvo la localización cromosómica de cada uno de los genes de UM270 respecto a Pf0-1.

Posteriormente se escribió un programa en Perl para ordenar los contigs en un solo ensamble. Una vez obtenido el ensamble se utilizó otro programa en Perl para separar las secuencias y colocar los genes en sentido correcto, es decir, directo y reverso. Con este ensamble fue posible dibujar el mapa cromosómico en el programa DNA Plotter (Carver et al., 2009).

### **Análisis comparativo de cepas de *P. fluorescens***

La comparación de las funciones génicas de la cepa UM270 con las siete cepas de la misma especie secuenciadas hasta el momento se llevó a cabo en el paquete MEGAN 5 (Huson et al., 2007). Para lo cual se compararon, usando UBLAST, cada uno de los genomas de nuestro interés contra la base de datos nr (non-redundant) del NCBI, para asignar funciones de los genomas completos. Posteriormente, se analizaron y compararon en conjunto sus funciones de acuerdo a las bases de datos de SEED y KEGG.

### **Búsqueda de genes involucrados en biocontrol y promoción de crecimiento vegetal**

Este análisis se realizó primero en la literatura, identificando los genes reportados para dichas actividades, posteriormente se hizo la búsqueda en los archivos fasta y tablas del GenBank generadas en la anotación; la búsqueda se realizó manualmente en línea de comandos. Esto se realizó para la cepa UM270 y para los siete genomas completos en la base de datos del NCBI.

### **Análisis del “core-genoma” y genes únicos de las cepas de *P. fluorescens***

Se analizó el core genómico de siete genomas empleando el algoritmo RBH (Reciprocal Best Hits) (Ward and Moreno-Hagelsieb, 2014). Esto consiste en la comparación de las proteínas codificadas por los siete genomas todas contra todas usando BLASTP (e-value  $1e-6$ ). Para cada par de genomas comparados, se eligieron como ortólogos potenciales las proteínas con el mayor score en ambos sentidos, como lo indica el nombre del algoritmo. De esta manera, se construyó un solo archivo con todos los resultados de las comparaciones y se contaron aquellos genes compartidos por las siete cepas, conformando el core-genoma de la especie. Por el contrario aquellos genes que se encontraron solo una vez, se denominaron genes “únicos” para cada genoma.

En el caso de *P. fluorescens* UM270, se analizaron las funciones encontradas en sus secuencias codificantes “únicas” de acuerdo a lo reportado en la literatura, a genes ortólogos y bases de datos de proteínas, las referencias se incluyen en la Tabla 2.

### **Expresión de los genes *phlD* y *hcnC* de UM270 en presencia de hongos fitopatógenos**

Se determinaron los cambios en los niveles de expresión de los genes reportados para la síntesis de compuestos antimicrobianos: *phlD* y *hcnC* en la cepa UM270, en interacción con hongos fitopatógenos: *B. cinerea*, *F. oxysporum*, *F. solani* y *R. solani*. Para ello, se realizó un ensayo de antagonismo (Filippi et al., 1984), colocando cuatro discos de micelio de 1 cm de diámetro de cada uno de los hongos en puntos equidistantes del centro de una caja petri, incubada con 24 h de anticipación a la inculación de la bacteria UM270 crecida en caldo nutritivo; ésta se colocó al centro de la caja en forma de cruz en un volumen de 50  $\mu$ l con una D.O. 1.0 a  $\lambda$  590 nm. Para este ensayo se emplearon agar nutritivo (AN) y agar dextrosa papa (ADP) a una concentración de 50%. Se incubaron 24 h en interacción a una temperatura de 28°C; transcurrido este tiempo, se recuperaron las colonias de la caja y se aisló el ARN genómico de la cepa UM270 empleando el reactivo TRI REAGENT® (Sigma). A partir del ARN se sintetizó el ADNc siguiendo las instrucciones del Kit comercial GoScript™ Reverse Transcription System (Promega). Posteriormente, se amplificaron los genes de interés mediante un PCR semi-cuantitativo, para lo cual, se emplearon los oligos Phl2a y Phl2b para el gen *phlD* (Raaijmakers et al., 1997) y FhcnC y RhcnC para el gen *hcnC* del complejo de la sintasa de HCN (diseñados en este trabajo).

Como gen constitutivo, se amplificó la región V1-V3 (500 pb) del gen 16S ADNr, empleando los oligos FD1 (Weisburg et al., 1991) y P2 (Muyzer G et al., 1993). Es importante mencionar que el PCR semi-cuantitativo implica la eliminación del tercer ciclo o extensión final; es decir, se mide la expresión relativa en la fase exponencial de amplificación.

Finalmente, se compararon los niveles de expresión de los genes amplificados de UM270 en presencia y ausencia de los fitopatógenos. Para la estimación estadística

se utilizó la prueba de Duncan, con una  $p < 0.05$  y una  $n=3$ , la cual se realizó en el paquete IBM SPSS Statistics (Statistical Package for the Social Sciences).

# RESULTADOS

## *Capítulo I.*

### *Descripción y análisis del genoma de *Pseudomonas fluorescens* UM270*

Este capítulo ha sido publicado como:


**Hernández-Salmerón, J.E.,** Hernández-León, R., Orozco-Mosqueda, M.D.C., Valencia-Cantero, E., Moreno-Hagelsieb, G., Santoyo, G., 2016. **Draft Genome Sequence of the Biocontrol and Plant Growth-Promoting Rhizobacterium *Pseudomonas fluorescens* strain UM270.** Stand. Genomic Sci. 11, 5. doi:10.1186/s40793-015-0123-9.

## SHORT GENOME REPORT

## Open Access



# Draft Genome Sequence of the Biocontrol and Plant Growth-Promoting Rhizobacterium *Pseudomonas fluorescens* strain UM270

Julie E. Hernández-Salmerón<sup>1</sup>, Rocio Hernández-León<sup>1</sup>, Ma. Del Carmen Orozco-Mosqueda<sup>1</sup>, Eduardo Valencia-Cantero<sup>1</sup>, Gabriel Moreno-Hagelsieb<sup>2</sup> and Gustavo Santoyo<sup>1\*</sup> 

## Abstract

The *Pseudomonas fluorescens* strain UM270 was isolated from the rhizosphere of wild *Medicago* spp. A previous work has shown that this pseudomonad isolate was able to produce diverse diffusible and volatile compounds involved in plant protection and growth promotion. Here, we present the draft genome sequence of the rhizobacterium *P. fluorescens* strain UM270. The sequence covers 6,047,974 bp of a single chromosome, with 62.66 % G + C content and no plasmids. Genome annotations predicted 5,509 genes, 5,396 coding genes, 59 RNA genes and 110 pseudogenes. Genome sequence analysis revealed the presence of genes involved in biological control and plant-growth promoting activities. We anticipate that the *P. fluorescens* strain UM270 genome will contribute insights about bacterial plant protection and beneficial properties through genomic comparisons among fluorescent pseudomonads.

**Keywords:** *Pseudomonas fluorescens*, Biocontrol, PGPR

## Introduction

Plant pathogens cause diverse crop plant diseases resulting in drastic economic losses around the world. An alternative to the use of chemicals to control plant pathogens is the employment of eco-friendly bacterial agents [1, 2]. An ideal bacterial biocontrol agent would be one with the additional capacity to directly stimulate plant growth [3]. Here, we report the draft genome sequence of the novel strain *Pseudomonas fluorescens* strain UM270. This strain was previously isolated and characterized for its excellent capacities for biocontrol of phytopathogens and plant growth promotion [4].

In a previous report, our group showed that the *P. fluorescens* strain UM270, among other three pseudomonad strains, was the best in promoting the growth of *Medicago truncatula* Gaertn. plants by significantly increasing biomass and chlorophyll content. During confrontation assays, strain UM270 inhibited the growth of agro-economically important fungal phytopathogens such as *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani*, *Diaporthe*

*phaseolorum*, and *Colletotrichum lindemuthianum* [4]. In biocontrol experiments, the strain UM270 protected *M. truncatula* plants from *B. cinerea* infection, reducing general stem disease symptoms, root browning and necrosis [4].

Importantly, the strain UM270 exerted these activities through the emission of either diffusible compounds (such as phenazines, cyanogens, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase, siderophores, proteases and indole-3-acetic acid) or volatiles (like dimethyl disulfide and dimethylhexadecylamine) [4], revealing that the strain UM270 contains direct and indirect mechanisms to promote plant growth [5].

## Organism Information

### Classification and features

*P. fluorescens* strain UM270 is a Gram-negative, non-sporulating, motile, rod-shaped bacterium belonging to the Order *Pseudomonadales* and the Family *Pseudomonadaceae* (Fig. 1). The strain exhibits the general and

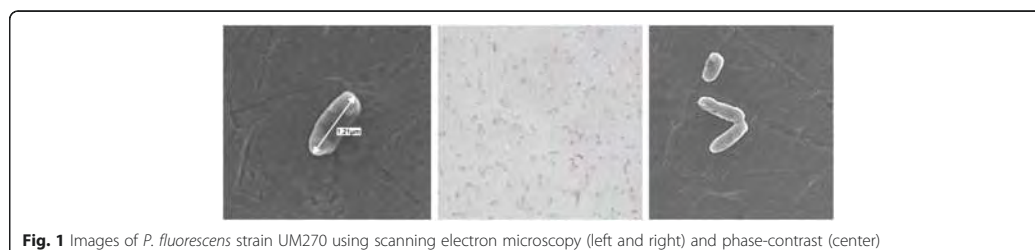
\* Correspondence: gsantoyo@umich.mx

<sup>1</sup>Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, México

Full list of author information is available at the end of the article



© 2015 Hernández-Salmerón et al. **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.



**Fig. 1** Images of *P. fluorescens* strain UM270 using scanning electron microscopy (left and right) and phase-contrast (center)

common features of a *Pseudomonas* species phenotype (Table 1) [6].

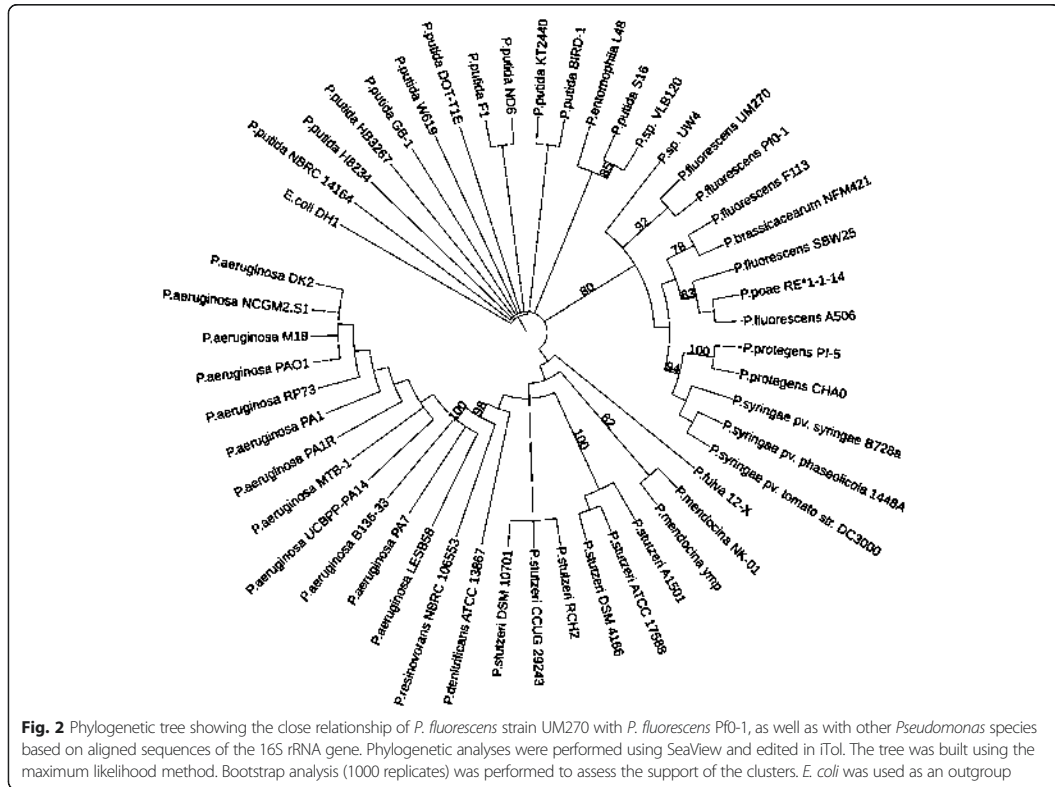
The UM270 strain was isolated from the rhizosphere of *Medicago* spp. located in an agricultural field in Morelia, Michoacán, México. As mentioned above, this

bacterium was further characterized and found to produce several diffusible and volatile compounds involved in biocontrol against several fungal pathogens, particularly effective against the grey mold disease caused by *Botrytis cinerea* [4]. Recent work in our lab

**Table 1** Classification and general features of *Pseudomonas fluorescens* strain UM270

MIGS ID	Property	Term	Evidence code <sup>a</sup>
	Current classification	Domain <i>Bacteria</i>	TAS [14]
		Phylum <i>Proteobacteria</i>	TAS [15]
		Class <i>Gammaproteobacteria</i>	TAS [16, 17]
		Order <i>Pseudomonadales</i>	TAS [18, 19]
		Family <i>Pseudomonadaceae</i>	TAS [18, 20]
		Genus <i>Pseudomonas</i>	TAS [18, 21]
		Species <i>Pseudomonas fluorescens</i>	TAS [18, 22]
		Strain UM270	TAS [4]
	Gram stain	Negative	TAS [6]
	Cell shape	Rod-shaped	TAS [6]
	Motility	Motile	NAS [6]
	Sporulation	None	NAS
	Temperature range	Mesophilic	IDA
	pH range; Optimum	6-8,5;7-8	IDA
	Optimum temperature	28 °C	IDA
	Carbon source	Heterotroph	IDA, [6]
	Energy source	Chemoorganotroph	NAS
MIGS-6	Habitat	Rhizospheric soil	TAS [4]
MIGS-6.3	Salinity	NaCl 1-4 %	IDA
MIGS-22	Oxygen Requirement	Aerobic	IDA
MIGS-15	Biotic relationship	<i>Medicago</i> spp. root associated	TAS [4]
MIGS-14	Pathogenicity	Non-pathogenic	TAS [4]
MIGS-4	Geographic location	Morelia, México	TAS [4]
MIGS-5	Sample collection	March, 2012	NAS
MIGS-4.1	Latitude	19° 46' 6" N	TAS [4]
MIGS-4.2	Longitude	101° 11' 22" W	TAS [4]
MIGS-4.3	Depth	10-20 cm	NAS
MIGS-4.4	Altitude	1800 M.A.S.L.	NAS

<sup>a</sup>Evidence codes - IDA: Inferred from Direct Assay; TAS: Traceable Author Statement (i.e., a direct report exists in the literature); NAS: Non-traceable Author Statement (i.e., not directly observed for the living, isolated sample, but based on a generally accepted property for the species, or anecdotal evidence). These evidence codes are from the Gene Ontology project



**Table 2** Project information

MIGS ID	Property	Term
MIGS 31	Finishing quality	High-quality draft (Full genome representation)
MIGS-28	Libraries used	3 libraries of 400–450 bp, 600 bp and 1,000 bp.
MIGS 29	Sequencing platforms	Illumina MiSeq
MIGS 31.2	Fold coverage	45.0 x
MIGS 30	Assemblers	Newbler v. 2.9
MIGS 32	Gene calling method	NCBI Prokaryotic Genome, Annotation Pipeline
	Locus Tag	RL74
	Genbank ID	JXNZ00000000
	GenBank Date of Release	2014-12-09
	GOLD ID	Gb0118948
	BIOPROJECT	PRJNA269735
MIGS 13	Source Material Identifier	UM270
	Project relevance	Agriculture, Plant-Bacteria Interaction, Biocontrol

**Table 3** Genome statistics

Attribute	Value	% of total
Genome size (bp)	6,047,974	100.00
DNA coding (bp)	5,284,158	87.00
DNA G + C (bp)	3,772,331	62.00
DNA scaffolds	524	100.00
Total genes	5,509	100.00
Protein coding genes	5,396	98.00
RNA genes	59	-
Pseudo genes	110	1.90
Genes in internal clusters	NA	-
Genes with function prediction	4,490	82.00
Genes assigned to COGs	3,821	68.00
Genes with Pfam domains	4,297	78.00
Genes with signal peptides	5	0.09
Genes with transmembrane helices	30	0.50
CRISPR repeats	0	-

has demonstrated that this strain is highly competitive and an efficient root and rhizosphere colonizer, as well as an inducer of ISR (Induced systemic resistance) in plants [Rojas-Solis and Santoyo, Unpublished results]. The Minimum Information about the Genome Sequence of *P. fluorescens* strain UM270 is summarized in Table 1. Its phylogenetic position is shown in Fig. 2, where the 16S rRNA gene of *P. fluorescens* strain UM270 is 99 % similar to that of *P. fluorescens* strain Pf0-1 [7–9].

### Genome sequencing information

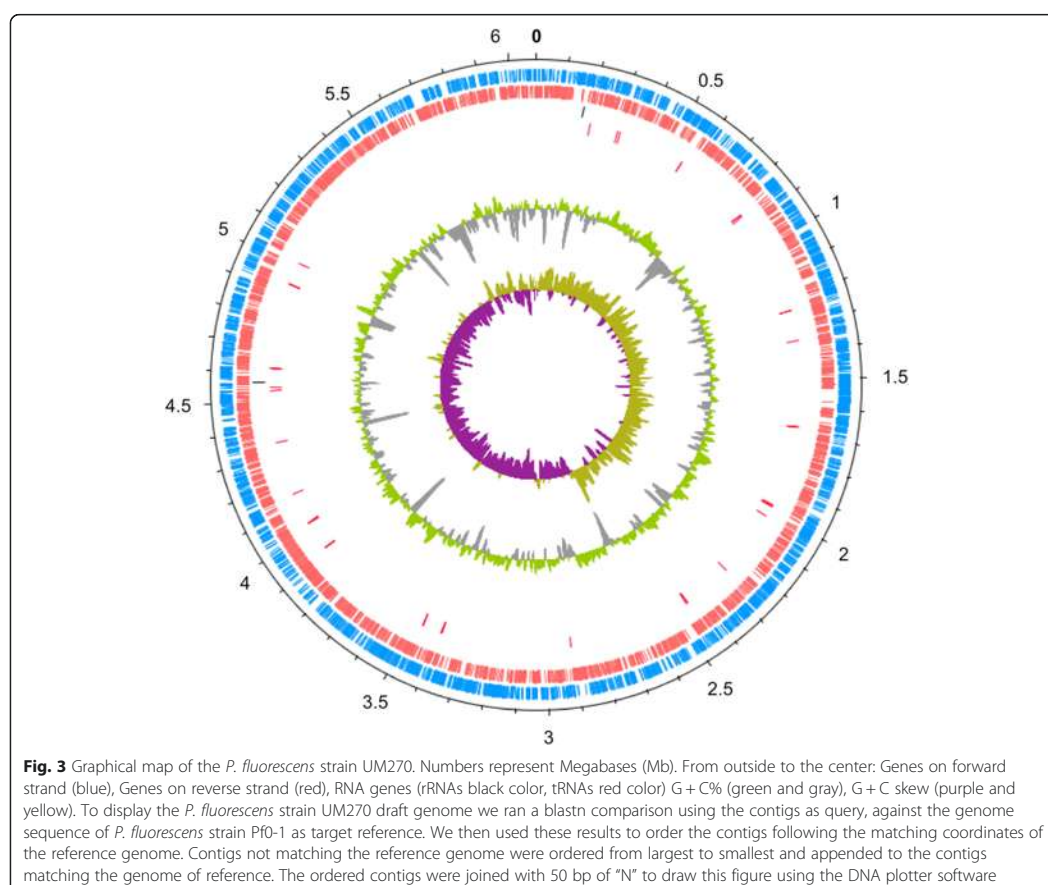
#### Genome project history

The *P. fluorescens* strain UM270 was selected among other pseudomonads for its higher ability to control fungal pathogens and protect *Medicago truncatula* Gaertn. from *B. cinerea* infection [4], for being highly competitive, an excellent root and rhizosphere colonizer of

maize plants and for inducing ISR in plants (Rojas-Solis and Santoyo, Unpublished results). A high-quality draft sequence of the genome has been deposited at DDBJ/EMBL/GenBank. A summary of the project information is shown in Table 2.

#### Growth conditions and genomic DNA preparation

From a single colony culture the *P. fluorescens* strain UM270 was inoculated on 50 ml of King's B medium [10], grown overnight at 28 °C with in agitation (250 rpm). One milliliter of the culture was serially diluted to be analyzed further. We confirmed the morphology and antibiotic-resistance phenotype of the strain. From the culture, 20 ml were taken to isolate the genomic DNA by using the Wizard® Genomic DNA Purification Kit following manufacture's instructions (Promega). DNA samples were subjected to an additional purification step with the same Wizard®



Genomic DNA Purification Kit (Promega). The quality and quantity of the final DNA sample were evaluated by agarose gel electrophoresis and by using a NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific).

#### Genome sequencing and assembly

Genomic DNA samples of *P. fluorescens* strain UM270 were sent to a sequencing service at the LANGEBIO-Irapuato, México. Genome sequencing was performed using a MiSeq Sequencer (Illumina, Inc.) generating three paired-end libraries (400–450 bp, 600 bp and 1,000 bp, respectively) with a coverage of approximately 45x. The *P. fluorescens* strain UM270 draft genome we ran a blastn comparison using the contigs as query, against the genome sequence of *P. fluorescens* Pf0-1 as target reference. To order the contigs we followed the matching coordinates of the reference genome. Project information is shown in Table 2.

#### Genome annotation

Genome annotation was carried out with RAST [11] and the Prokaryotic Genome Annotation Pipeline tools [12]. Statistics for the genome assembly were calculated using software Newbler v2.9 (Roche) and are shown in Table 2. This Whole Genome Shotgun sequence project has been deposited at DDBJ/EMBL/GenBank under accession JXNZ00000000. The version described in this paper is version JXNZ00000000.

#### Genome Properties

The total length of the assembled sequences obtained was 6,047,974 bp belonging to one chromosome, with a G+C content of 62.66 %. The sequenced fragments of the genome are predicted to contain 5,509 genes, consisting of 5,396 coding sequences, 59 RNA genes, 110 pseudogenes and 14 frameshifted genes. Genome statistics are in Table 3 and a graphical map is represented in Fig. 3. The

**Table 4** Number of genes associated with the 25 general COG functional categories

Code	Value	% of total <sup>a</sup>	Description
J	159	2.94	Translation, ribosomal structure and biogenesis
A	0	0.00	RNA processing and modification
K	342	6.33	Transcription
L	117	2.16	Replication, recombination and repair
B	3	0.00	Chromatin structure and dynamics
D	32	0.59	Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning
Y	0	0.00	Nuclear structure
V	55	1.01	Defense mechanisms
T	216	4.00	Signal transduction mechanisms
M	212	3.92	Cell wall/membrane biogenesis
N	142	2.63	Cell motility
Z	0	0.00	Cytoskeleton
W	0	0.00	Extracellular structures
U	55	1.01	Intracellular trafficking and secretion
O	150	2.77	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones
C	244	4.52	Energy production and conversion
G	190	3.52	Carbohydrate transport and metabolism
E	434	8.04	Amino acid transport and metabolism
F	78	1.44	Nucleotide transport and metabolism
H	143	2.65	Coenzyme transport and metabolism
I	185	3.42	Lipid transport and metabolism
P	226	4.18	Inorganic ion transport and metabolism
Q	67	1.24	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism
R	364	6.74	General function prediction only
S	372	6.89	Function unknown
-	1,610	29.83	Not in COGs

<sup>a</sup>The total is based on the total number of protein coding genes in the annotated genome

Table 4 presents the number of genes associated with the COG functional categories.

### Insights from the genome sequence

The draft genome sequence reported here covers its full genome and at first analysis reveals the presence of multiple genes participating in the synthesis of diffusible metabolites and volatile organic compounds produced by *P. fluorescens* strain UM270. Some of this antimicrobial arsenal includes compounds like phenazine (*phzFABCD*), pyocyanin (*pcnCDE*), pyoverdine (*pvdPD*), 2,4-diacetylphloroglucinol (*phlACBD*) and the volatile hydrogen cyanide (*hcnCB*), important for the biological control of several plant diseases caused by phytopathogenic fungi, oomycetes, and bacteria [2]. Other plant-bacteria communication genes detected in the strain UM270 genome are *acdS* and *iaaMH*, encoding for an ACC deaminase (1-aminocyclopropane-1-carboxylate) protein and IAA (indole-3-acetic acid) biosynthesis. The synergistic interaction of ACC deaminase and both plant and bacterial auxin, IAA, is relevant for the optimal functioning of PGPR to directly promote plant growth and also protect plants against environmental stresses, and bacterial and fungal pathogens [5]. Other genes such as *pcdQ*, which codes for an Acyl-homoserine lactone acylase, important for bacterial communication and biofilm formation, were detected, as well as Secretion Systems Type II to VI and orthologs of the toxin-antitoxin loci *vapBC-1* and *vapXD*. These last determinants are important for survival, competence and colonization of the rhizosphere and root systems [13].

### Conclusions

The strain UM270 was selected for genome sequencing due to its biocontrol and plant growth promoting properties [4]. The plant beneficial mechanisms exerted by this rhizobacterium involved direct and indirect mechanisms. Here, the draft genome sequence of the *P. fluorescens* strain UM270 revealed further genetic elements involved in plant-bacterial communication, as well as in rhizosphere competence and colonization. We anticipate that the genome of *P. fluorescens* strain UM270 will contribute to new insights about biocontrol and plant beneficial activities through genomic comparisons among available complete genomes of pseudomonad strains.

### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

### Authors' contributions

JHS, RHL and MCOM performed the experiments. JHS and GM-H performed the annotation and sequence homology searches. GM-H and GS wrote the manuscript. EVC and GS conceived and designed the experiments. All authors commented on the manuscript before submission. All authors read and approved the final manuscript.

### Acknowledgements

We thank CONACYT-México (Project Number: 169346) and CIC-UMSNH (2014–2015) for financial support to our research projects. JEH-S and RH-L received scholarships from CONACYT-México. JEH-S acknowledges a scholarship from the Government of Canada under The Emerging Leaders in the Americas Program (ELAP). This paper is a requirement to obtain the Ph.D. of JEH-S.

### Author details

<sup>1</sup>Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, México. <sup>2</sup>Department of Biology, Wilfrid Laurier University, Waterloo, Ontario, Canada.

Received: 27 May 2015 Accepted: 9 September 2015

Published online: 13 January 2016

### References

- Adesemoye AO, Torbert HA, Kloepper JW. Plant growth-promoting rhizobacteria allow reduced application rates of chemical fertilizers. *Microb Ecol.* 2009;58:921–9. doi:10.1007/s00248-009-9531-y.
- Santoyo G, Orozco-Mosqueda Ma Del C, Govindappa M. Mechanisms of biocontrol and plant growth-promoting activity in soil bacterial species of *Bacillus* and *Pseudomonas*: a review. *Biocon Sci Technol.* 2012;22:855–72. doi:10.1080/09583157.2012.694413.
- Compant S, Duffy B, Nowak J, Clement C, Barka EA. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71:4951–9. doi:10.1128/AEM.71.9.4951-4959.2005.
- Hernández-León R, Rojas-Solis D, Contreras-Pérez M, Orozco-Mosqueda Ma Del C, Macías-Rodríguez LI, Reyes-de La Cruz H, et al. Antifungal and plant-growth promoting effects of diffusible and volatile sulfur-containing compounds produced by *Pseudomonas fluorescens* strains. *Biol Control.* 2014;81:83–92. doi:10.1016/j.biocontrol.2014.11.011.
- Glick BR. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiol Res.* 2014;169(1):30–9.
- Palleroni NJ. *Pseudomonadaceae*. In: Krieg NR, Holt JG, editors. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore: The Williams and Wilkins Co; 1984. p. 141–99.
- Anzai Y, Kim H, Park JY, Wakabayashi H, Oyaizu H. Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *Intl J Sys Evol Microbiol.* 2000;50:1563–89.
- Silby MW, Cerdeño-Tárraga AM, Vernikos GS, Giddens SR, Jackson RW, Preston GM, et al. Genomic and genetic analyses of diversity and plant interactions of *Pseudomonas fluorescens*. *Genome Biol.* 2009;10:R51. doi:10.1186/gb-2009-10-5-r51.
- Loper JE, Hassan KA, Mavrodi DV, Davis EW, Lim CK, Shaffer BT, et al. Comparative genomics of plant-associated *Pseudomonas* spp.: insights into diversity and inheritance of traits involved in multitrophic interactions. *PLoS Genet.* 2012;8(7):e1002784.
- King EO, Ward M, Raney D. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *J Lab Clin Med.* 1954;44:301–7.
- Aziz RK, Bartels D, Best AA, DeJongh M, Disz T, Edwards RA, et al. The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics.* 2008;9:75. doi:10.1186/1471-2164-9-75.
- NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline. [www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation\\_prok/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation_prok/)
- Annette A. Angus and Ann M Hirsch: *Biofilm Formation in the Rhizosphere: Multispecies Interactions and Implications for Plant Growth*. *Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere*, Volume 2, First Edition. Edited by Frans J. de Bruijn. U S A: John Wiley & Sons, Inc.; 2013.
- Woese CR. Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87:4576–9.
- Garrity GM, Bell JA, Lilburn T: *Phylum XIV. Proteobacteria* phyl. nov. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* 2005, 2, Part B: 1.
- Garrity GM, Bell JA, Lilburn T: *Class III. Gammaproteobacteria* class. nov. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* 2005, 2, Part B: 1.
- List Editor: Validation of publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSEM. List no. 106. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2005, 55: 2235–2238.

18. Skerman VBD, McGowan V, Sneath PHA. Approved Lists of Bacterial Names. *Int J Syst Bacteriol.* 1980;30:225–420.
19. Orla-Jensen S. The main lines of the natural bacterial system. *J Bacteriol.* 1921;6:263–73.
20. Winslow CEA, Broadhurst J, Buchanan RE, Krumwiede C, Rogers LA, Smith GH. The Families and Genera of the Bacteria: Preliminary Report of the Committee of the Society of American Bacteriologists on Characterization and Classification of Bacterial Types. *J Bacteriol.* 1917;2:505–66.
21. Migula W. Über ein neues System der Bakterien. *Arbeiten aus dem Bakteriologischen Institut der Technischen Hochschule zu Karlsruhe.* 1894;1:235–8.
22. Migula W. Bacteriaceae (Stabchenbakterien). *Die Natürlichen Pflanzenfamilien.* 1895;1:20–30.

**Submit your next manuscript to BioMed Central  
and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at  
[www.biomedcentral.com/submit](http://www.biomedcentral.com/submit)



## **Capítulo II.**

***Comparación genómica de *Pseudomonas fluorescens* UM270 revela genes únicos relacionados con la colonización y competencia rizosférica***

### Características genómicas

En total se analizaron seis genomas completos de *P. fluorescens* y una *Pseudomonas* sp. UW4, obtenidos del GenBank, y se compararon con el genoma de la cepa UM270. Las características genómicas de los ocho genomas se resumen en la Tabla 1. El tamaño de sus cromosomas varía desde 5,962,570 pb a 6,845,832 pb en las cepas A506 y F113, respectivamente; lo cual representa aproximadamente 1 Mb de diferencia entre estos genomas. Esto, a su vez, se ve reflejado en la variación del número de secuencias codificantes, las cuales van de un rango de 5,179 a 6,009, es decir, casi mil CDS's (por sus siglas en inglés, "Coding DNA Sequences") de diferencia en la cepa SBW25, respecto de UK4.

Cabe resaltar que si bien, la cepa A506 cuenta con el menor tamaño en su cromosoma, no es la que tiene menor cantidad de CDS's; esto se debe a que es la única cepa que contiene un plásmido; sin embargo, para los análisis comparativos sólo se tomó en cuenta su contenido genético en el cromosoma y no en el plásmido, para unificar con el resto de genomas que no cuentan con estos elementos.

Por otro lado, en el genoma de la cepa F113 tampoco se correlaciona el mayor tamaño de cromosoma con la cantidad de CDS's, siendo la cepa SBW25 la de más CDS's. El porcentaje en el contenido de GC prácticamente no varía entre estos organismos (60.0-60.8%), mientras que el total de ARNr varía de 81 a 114.

En cuanto al lugar de donde fueron aislados estos microorganismos y sus funciones ecológicas determinadas, encontramos que tres de ellos son rizosféricos (UM270, F113 y UW4), dos fueron aislados de la filósfera, es decir, de la superficie de las hojas de plantas de pera y betabel (A506 y SBW25, respectivamente). La cepa Pf0-1 es la única comensal de suelo, mientras que PICF-7 es endófito de plantas de olivo y, recientemente, se secuenció la cepa UK4 formadora de "biofilm" en agua potable y productora de amiloides. Con excepción de la cepa UK4, el resto de los microorganismos presentaron funciones posiblemente involucradas en el biocontrol de patógenos de plantas, así como mecanismos potenciales de promoción del crecimiento vegetal (Tabla 1).

Cabe resaltar que la cepa UM270 es la única, hasta el momento, que se ha reportado con ambas actividades, directas e indirectas de promoción del crecimiento

vegetal. Esta diversidad de nichos y capacidades sugiere diferencias en sus genomas, que se reflejan en una gran variabilidad de funciones; por lo tanto, es posible encontrar actividades importantes en estos organismos con los análisis comparativos de las funciones génicas.

Tabla 1. Características genómicas de cepas de *P. fluorescens*.

Cepa	Tamaño (pb)	Plásmido	GC %	CDS	ARNr	Origen de aislamiento	Papel determinado	Referencia
UM270	6,050,830	-	60.6	5,396	114	Rizósfera de alfalfa	PGPB, biocontrol	(Hernández-Salmerón et al., 2016)
A506	5,962,570	1	60	5,267	87	Filósfera de pera	Biocontrol	(Loper et al., 2012)
PF0-1	6,438,405	-	60.6 2	5,741	92	Suelo	Comensal de suelo	(Silby et al., 2009)
SBW25	6,722,539	-	60.5	6,009	82	Filósfera de betabel	PGPB	(Silby et al., 2009)
F113	6,845,832	-	60.8	5,862	81	Rizósfera de betabel	Biocontrol	(Miguel et al., 2012)
PICF7	6,136,735	-	60.4	5,567	88	Endósfera de olivo	PGPB, biocontrol	(Martínez-García et al., 2015)
UK4	6,064,456	-	60.1	5,178	86	Formadora de biofilm en agua potable	Productora de amiloides	(Dueholm et al., 2014)
UW4	6,183,388	-	60.0 5	5,423	94	Rizósfera de juncos	PGPB	(Duan et al., 2013)

### Genómica comparativa de cepas de *P. fluorescens*

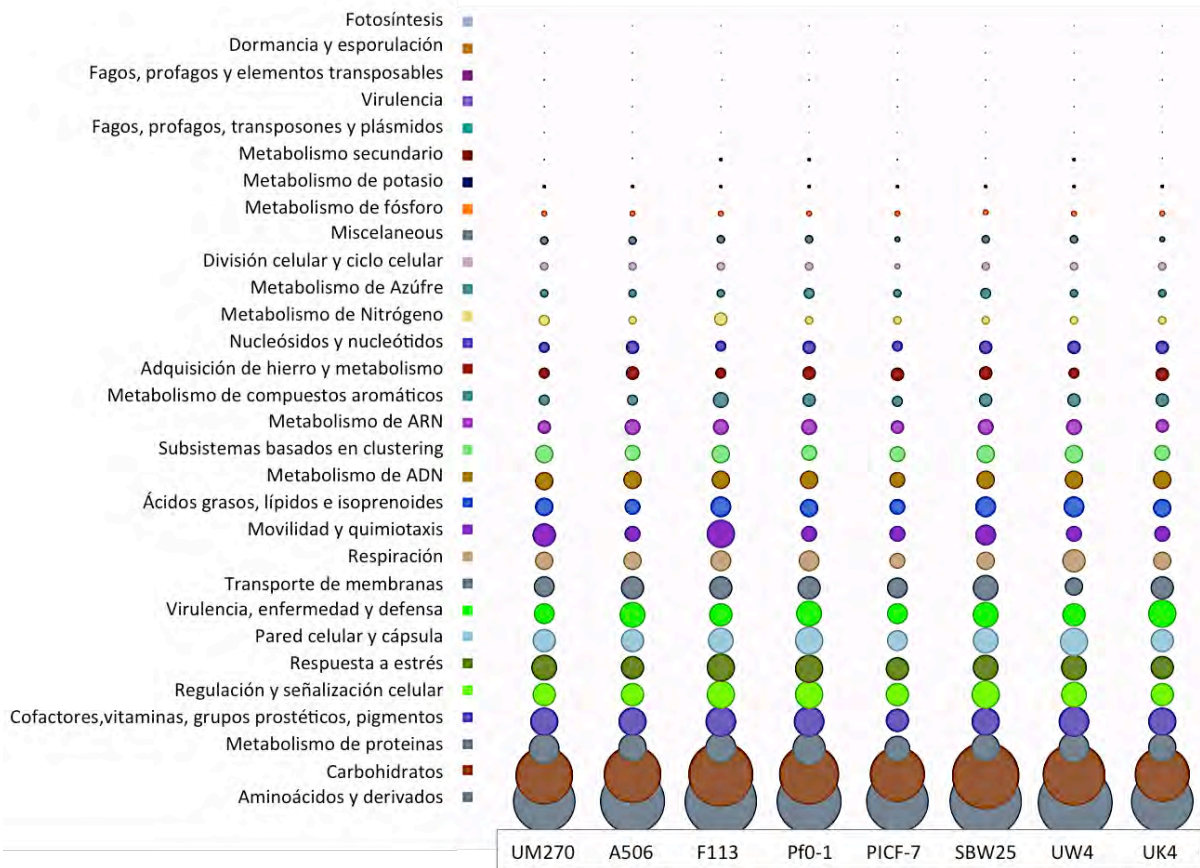
Para la comparación genómica se realizó un UBLAST tanto de la cepa *P. fluorescens* UM270, como de las siete cepas de *P. fluorescens* (A506, F113, PF0-1, PICF7-1, SBW25, UW4 y UK4). UBLAST es un algoritmo modificado de BLAST contenido en el paquete USEARCH (Edgar, 2010), el cual lleva a cabo la búsqueda

de ortólogos en las bases de datos con una mayor sensibilidad a alineamientos de baja similitud. De esta manera se obtuvieron las funciones génicas del total de las ocho cepas, las cuales se cargaron en el programa MEGAN 5 para realizar la comparación a nivel de genomas siguiendo la clasificación de SEED (Fig. 4) y KEGG (Anexo I).

En cuanto a la comparación realizada de acuerdo a la clasificación de SEED (Fig. 4); de manera general, se observa que la abundancia de funciones es muy similar en el total de las ocho cepas, resaltando aquellas relacionadas con el metabolismo de aminoácidos, carbohidratos, proteínas y procesamiento de ADN, que son funciones primarias de todo ser vivo. Asimismo, el metabolismo de nutrientes como potasio, fósforo, azufre y hierro no muestra variación en contenido genético con estas funciones entre las cepas; igualmente en las funciones de virulencia, defensa y enfermedad, por lo que estas son cualidades comunes en esta especie bacteriana.

Por otro lado, las funciones que sí varían entre los miembros de estas bacterias fluorescentes son: metabolismo del nitrógeno, respiración, cápsula y pared celular, respuesta al estrés, biosíntesis de metabolitos secundarios, regulación y señalización celular. La variabilidad en el contenido de material genético que lleva a cabo estas funciones representa diferentes capacidades de responder a los estímulos y estrés ambientales y abre una gran oportunidad para el entendimiento en la señalización y comunicación intra e inter especies; además, ayudará a profundizar en el entendimiento de la colonización y gran adaptabilidad de estos microorganismos (Fig. 4).

Asimismo, cabe mencionar algunas diferencias puntuales entre las funciones génicas de algunas cepas; por ejemplo, los genomas de UM270 y F113 mostraron mayor abundancia de funciones en el grupo de virulencia, movilidad y quimiotaxis, a diferencia del resto de genomas analizados (Fig. 4). Siendo ambos organismos rizosféricos, este resultado probablemente se relaciona con actividades importantes de competencia y colonización de nichos, importantes para sobrevivir en un ambiente tan competitivo como es la rizósfera.



**Figura 4.** Comparación funcional de los genomas completos de *P. fluorescens* y la cepa UM270. El tamaño del círculo es proporcional al número de genes encontrados en cada una de las categorías de la base de datos SEED. Graficado en MEGAN 5.

Finalmente, se realizó la búsqueda de los genes presentes en *P. fluorescens* UM270 relacionados con las actividades de promoción de crecimiento vegetal y biocontrol (Tabla 2) y se compararon con el resto de las cepas. Este análisis reveló la presencia de genes participantes en la síntesis de metabolitos, tanto difusibles como volátiles, importantes como agentes de biocontrol hacia otros microorganismos, tales como fenazinas (genes *phzFABCD*), piocianina (*pcnCDE*), pioverdina (*pvdPD*), 2,4-diacetilfloroglucinol (*phiACBD*), y el cianógeno volátil (*hcnCB*).

Asimismo, se confirmó la presencia de genes importantes como *acdS* y *iaaMH*, los cuales codifican la ACC-desaminasa y el AIA, respectivamente, que son reguladores importantes para la promoción del crecimiento en plantas, además de protegerlas del estrés ambiental (Tabla 2) (Glick, 2014).

Se identificaron, además, genes involucrados en la comunicación celular como *pcdQ*, que codifica para una Acil homoserina lactona acilasa, importante para la formación de biofilm, así como los Sistemas de Secreción tipo II, III y IV, y algunos sistemas toxina-antitoxina (TA) *vapBC-1* y *vapXD*, las cuales son importantes para la competencia y colonización de la rizósfera y otros nichos (Yamaguchi et al., 2011).

Por otra parte, hay una alta diversidad genómica entre las cepas de *P. fluorescens*, siendo más notable en los genes involucrados en la síntesis de antibióticos y toxinas, así como de algunos sideróforos. (Tabla 2). Es importante remarcar que la cepa UM270 contiene genes involucrados en la síntesis de todos los metabolitos secundarios con actividad antagónica analizados (HCN, 2,4-DAPG, fenazinas, etc.). El resto de los genomas contienen uno o dos genes con dichas funciones, lo cual confiere a esta cepa de gran ventaja como agente de control biológico.

A diferencia de lo anterior, solo los genomas de PICF-7 y Pf0-1 mostraron capacidades de actividad quitinasa, importante en la degradación de quitina de la pared celular de hongos. A su vez, la presencia de genes biosintéticos de bacteriocinas son comunes a estos genomas, con excepción de UM270 que carece de genes para producir microcina.

En lo que respecta a las interacciones planta-bacteria, las fitohormonas producidas por bacterias juegan un papel crucial en el crecimiento vegetal; la cepa UM270 es la única que contiene los genes necesarios para la síntesis de AIA, la auxina más común, así como para el ácido fenilacético (PAA), también conocido por su actividad antimicrobiana (Kim et al., 2004; Wightman and Lighty, 1982).

Genes para la enzima desaminasa de ACC están presentes en todo este grupo de *Pseudomonas*, no así para el 2,3-butanediol, reportado con actividad antifúngica. Por su parte, los sistemas de “Quorum sensing” (QS) se encuentran representados por el inductor Acil homoserina lactona sintasa sólo en los genomas de A506 y PICF-7, mientras que el receptor de *LuxI*, *LuxR* se encontró solamente en UM270. Otras moléculas señal como homoserina deshidrogenasa y acil homoserina lactona acilasa son parte del sistema de “Quorum-Quenching”, es decir, en la degradación de las moléculas señal, interrumpiendo así la comunicación celular. Ambas están presentes en todos los genomas, lo cual sugiere un mecanismo de defensa y/o de ataque importante y conservado en este taxón (Tabla 2).

Otra característica relevante de las PGPR es su capacidad de producir sideróforos, los cuales llevan a cabo dos importantes funciones: la primera, facilitar la adquisición de hierro soluble a las plantas, ya que muchas especies pueden reconocer los sideróforos bacterianos y tomar el hierro unido al complejo, por lo tanto, internalizar el  $Fe^{2+}$ . La segunda función importante es la de prevenir las infecciones fúngicas en la planta ya que ante la toma del  $Fe^{3+}$  disponible en el suelo, éste se convierte en un nutrimento escaso para los patógenos, lo cual reduce su crecimiento y, por lo tanto, evita la infección de la planta.

En *P. fluorescens* sp. es bien conocido el sideróforo pioverdina, se encontraron los genes en este estudio en los ocho genomas, genes para los siguientes sideróforos analizados sólo se encontraron en uno o dos genomas (Tabla 2). En UM270 se encontraron, además de pioverdina, acromobactina y un hemóforo; mientras que la cepa A506 fue el genoma donde se identificó una mayor diversidad de estos compuestos

Tabla 2. Presencia de genes biosintéticos que participan en la promoción del crecimiento vegetal y biocontrol en genomas de *P. fluorescens*.

Genes biosintéticos, (función asignada)	UM270	SBW25	PF0-1	F113	A506	UK4	PICF-7	UW4
<b>Metabolitos secundarios</b>								
PhzC-PhzF (fenazinas)	n	n			n	n	n	n
<i>phlD</i> (2,4-DAPG)	n			n	n		n	
<i>hcnACB</i> (ácido cianhídrico)	n			n				
HPR (2-hexil-5-propil-resorcinol)	n							
<i>thiG/O</i> (tiazol)	n	n	n	n	n	n	n	n
Monooxigenasa-síntesis de antibióticos	n	n	n	n	n	n	n	n
MbtH (síntesis de mycobactina)	n	n	n	n	n	n	n	n
MarC	n							n
<b>Exoenzimas</b>								
Quitinasa			n				n	
Proteína de unión a quitina	n	n	n		n			
Pectato liasa		n						
<b>Bacteriocinas</b>								
Piocina		n	n	n	n	n	n	n
Colicina ( <i>cvpA</i> )	n	n	n	n	n	n	n	n
Microcina B17-like		n	n	n	n	n	n	n
<b>Sideróforos</b>								
<i>pvdPD</i> (pioverdina)	n	n	n	n	n	n	n	n
Acromobactina	n							n
<i>hasDE</i> (hemóforo)	n	n						
Rizobactina					n			
Pioquelina					n		n	
Pseudomonina-tipo					n			
<b>Comunicación planta-bacteria</b>								
<i>iaaMH</i> (ácido indolacético)	n							
<i>paa</i> (ácido fenilacético)	n							
<i>acdS</i> (ACC desaminasa)	n	n	n	n	n	n	n	n
2,3-butanediol	n			n				
Acil-homoserina-lactona sintasa					n		n	
Homoserina deshidrogenasa	n	n	n	n	n	n	n	n
Acil-homoserina lactona	n	n	n	n	n	n	n	n

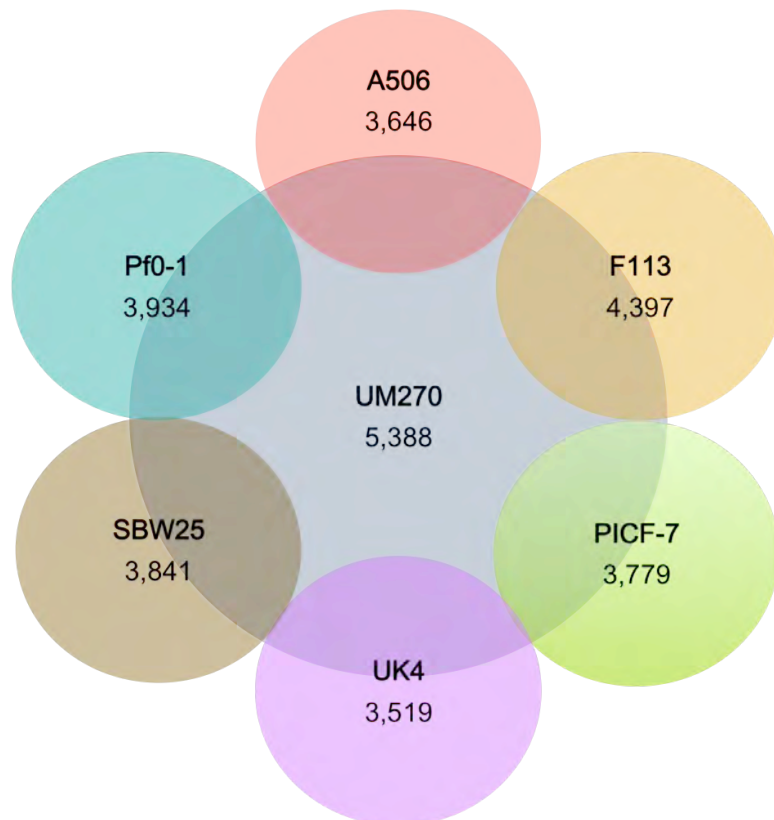
acilasa								
<i>LuxR</i> (receptor <i>LuxI</i> )	n							
Acetoina deshidrogenasa	n			n	n		n	
<b>Sistemas de Secreción</b>								
I	n		n	n	n	n	n	n
II	n	n	n	n	n	n	n	n
III	n	n	n	n	n	n	n	n
IV	n	n	n	n	n	n	n	n
VI	n	n	n	n	n	n	n	n
<b>Toxinas</b>								
<i>vapBC</i>	n							
<i>higAB</i>	n				n			
RTX	n							
MATE	n							
RelEK		n	n		n			
RelEB				n	n	n	n	n
HicAB					n			
RatA		n	n	n	n	n	n	
HipA				n				
Toxina-Antitoxina no nombrada		n	n	n	n	n		n
Toxina Zeta			n	n				n
Toxina Insecticida	n			n			n	n
Exotoxina		n					n	
<b>Lipopéptidos cíclicos</b>								
Viscosina	n	n						

Cuadros color gris representan la presencia del gen involucrado en la actividad biosintética indicada.

### Análisis del “core-genoma”

Inicialmente se analizó la similitud entre las secuencias codificantes de la cepa *P. fluorescens* UM270; se observó que si bien la cepa UM270 se relaciona filogenéticamente a la cepa Pf0-1 (Hernández-Salmerón et al., 2016), de acuerdo al análisis del gen ribosomal 16S ARNr, comparte un mayor número de secuencias homólogas con la cepa F113 (4,397 CDS´s), lo que representa el 81.6% del total de CDS de UM270 (Fig. 5). A su vez, se encontró la menor similitud génica con la cepa UK4 (3,519 CDS´s), con un 65% de genes compartidos.

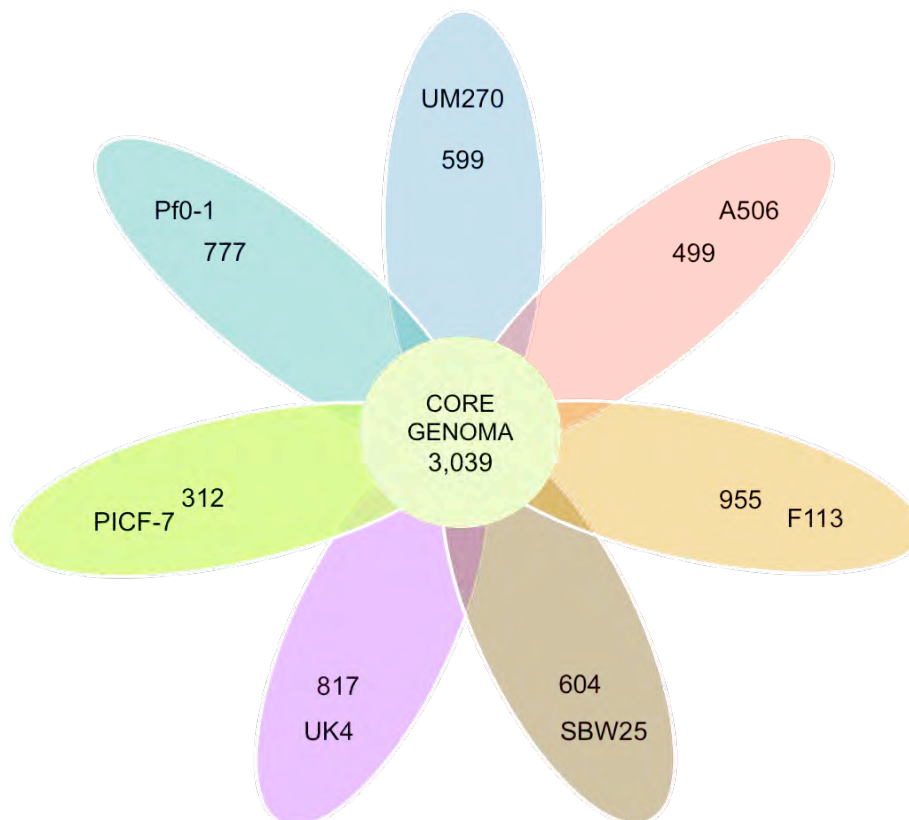
Este resultado puede reflejar, una vez más, las funciones comunes con el tipo de hábitat e interacción que llevan a cabo las cepas UM270 y F113 en la rizósfera; a diferencia de la UK4, que proviene de un ambiente totalmente diferente (agua); donde además, la competencia, fuentes de nutrientes y papel ecológico son muy distintas entre ambos organismos.



**Figura 5.** Genes que comparte *P. fluorescens* UM270 con el resto de cepas de la misma especie. Al centro se muestra el total de CDS de UM270; los círculos externos contienen el nombre de cada cepa y el total de CDS compartidos con UM270.

Con el objetivo de lograr un mayor entendimiento de las relaciones funcionales entre las cepas de *P. fluorescens* se analizó el core-genoma, el cual se refiere al total de genes compartidos en el total de cepas de una especie; a su vez, este análisis permite conocer el número de genes únicos de cada cepa; es decir, aquellos que no están presentes en otras cepas o especies.

El resultado del análisis arrojó el siguiente resultado: 3,039 genes conforman el core-genoma de esta especie (Fig. 6), el cual representa el 56% del total de genes codificantes en el caso de la cepa UM270. Para el resto de genomas, representa el 51-58% de genes compartidos.



**Figura 6.** Core-genoma de las cepas de *P. fluorescens*. El círculo central indica el total de genes que conforman el core-genoma de las cepas representadas en cada uno de los óvalos. El número en los óvalos representa los genes únicos de la cepa.

En cuanto a los genes únicos, la cepa F113 cuenta con el mayor número, 955 CDS's, mientras que el genoma con menor número de genes únicos es la cepa PICF-7 con 312 CDS's, esto representa el 16% y 5% del total de secuencias codificadas, respectivamente. En el caso de la cepa UM270 cuenta con 599 genes únicos (11% del total) (Fig. 6), los cuales representan un gran potencial para encontrar nuevos genes con funciones importantes para esta cepa y sus capacidades de biocontrol y promoción del crecimiento vegetal.

### **Genes codificantes únicos en el genoma de la cepa UM270**

A partir del resultado de los CDS's únicos de *P. fluorescens* UM270, se encontró que cuenta con 599; sin embargo, al analizar las funciones específicas de cada uno, se observó que 407 CDSs' corresponden a funciones desconocidas o hipotéticas, lo que representa el 68% del total de genes únicos. Por lo cual, los 192 CDS restantes fueron analizados en base a lo reportado en la literatura, o bien, en bases de datos de proteínas. La lista completa de estas funciones génicas se presenta en el Anexo II. De manera general, se puede observar que la mayor parte de estas funciones corresponden a estructura y movilidad flagelar (17 CDS's), incluyendo las proteínas biosintéticas FlhABPQR, así como proteínas flagelares FleQ y de movimiento motor (FliN) y proteínas estructurales del cuerpo basal del flagelo (FlgCDFG). En total se encontraron 15 transportadores (11 de tipo ABC), y 14 proteínas reguladoras, principalmente transcripcionales (8). La figura 7 resume algunas actividades deshidrogenasas, fagos y proteínas de unión a ATP. Resaltan también como las funciones más abundantes en este organismo (Fig. 7).



Tabla 3. Actividades biológicas de los genes codificantes únicos predichos en el genoma de *P. fluorescens* UM270.

Función (nombre del gen)	Actividad Biológica	Referencia
3-oxoacil-[proteína transportadora de acil] sintasa, KASII	Regulación de factores de virulencia. Biosíntesis de ácidos grasos.	Taguchi et al., 2006
Catalasa	Cataliza la degradación de peróxido de hidrógeno. Esencial para prevenir estrés oxidativo en bacterias y sobrevivir en la planta (colonización).	Guo et al., 2012
Exportación de polisacáridos de cápsula. Proteína de unión a ATP ( <i>ctrD</i> )	Implicada en factores de virulencia en bacterias y patógenos.	Silver et al., 2001
Precursor de Endoglucanasa D	Cataliza la hidrólisis del enlace $\beta$ -1,4-glicosídico de celulosa.	Bianchetti et al., 2013
Epóxido hidrolasa	Enzima importante para la destoxificación de compuestos genotóxicos y control de la señalización.	Arand et al., 2005
Isocorismatasa	Participa en la biosíntesis de un grupo de sideróforos y algunas fenazinas.	Parsons et al., 2003
Proteína de secreción-familia HlyD	Sistema de secreción tipo I. Esencial para la secreción de la toxina hemolítica RTX.	Linhartová et al., 2010
NAD glicohidrolasa; Halovibrina ( <i>hvnA</i> )	Involucrada en la mediación de señalización entre bacteria-hospedero en <i>Vibrio fischeri</i> .	Stabb et al., 2001
Proteína de biosíntesis del antígeno-O	Importante determinante de virulencia en bacterias Gram-negativas. También conocida como endotoxina.	Whitfield and Trent, 2014
Proteína permeasa RfbD	Proteína permeasa del sistema de exportación del antígeno-O.	
Oligopeptidasa A	Degradación de péptidos pequeños (no proteicos), como hormonas. Importante en la modificación o interrupción de moléculas señal contra patógenos.	Barrett and Rawlings, 1992

Opina oxidasa subunidad B/ cianuro de hidrógeno sintasa B ( <i>hcnB</i> )	Factor de virulencia en <i>P. aeruginosa</i> . Actividad antagónica contra patógenos.	Laville et al., 1998, Blier et al., 2012
Caja sensorial histidina cinasa/ regulador de respuesta	Importante en la transducción de señales. Receptor celular para moléculas señal.	Jung et al., 2012
Transducción de señal histidina cinasa CheA	Sistema sensorial de dos componentes.	Bilwes et al., 1999
Tauropina deshidrogenasa	Síntesis de octopinas ( <i>Abrobacterium</i> spp.). encontrada en tumores de callo en plantas. Regulador de Quorum-sensing.	de Kievit et al., 2000
Activador transcripcional de acetoína deshidrogenasa. Operón AcoR	Acetoína deshidrogenasa es el intermediario inmediato para la síntesis de 2,3-butanediol.	Xiao and Xu, 2007
Proteína de unión a ATP- secreción de Ciclolisina.	Ciclolisina es un factor de virulencia con actividad adenilato ciclasa y hemolítica ( <i>Bordetella pertusis</i> ).	Glasser et al 1988
Diguanilato ciclasa (DGC)/fosfodiesterasa (dominios GGDEF & EAL) con sensor PAS/PAC.	DGC involucrado en la formación de biofilm en <i>P. fluorescens</i> Pf0-1. PAS/PAC. Dominios relacionados con señalización para oxígeno, potencial redox, luz y otros estímulos.	Newell et al., 2011

---

### **Capítulo III.**

***Expresión de los genes *phlD* y *hcnC* de *Pseudomonas fluorescens* UM270 en interacción con hongos fitopatógenos***

### **Genes *phlD* y *hcnC* en *Pseudomonas***

La rizobacteria promotora del crecimiento vegetal *P. fluorescens* UM270 presenta un gran arsenal de metabolitos secundarios que cumplen un papel importante para promover el crecimiento vegetal, así como para la actividad antifúngica. Destacan dos compuestos, el 2,4-Diacetilfloroglucinol y HCN y (2,4-DAPG), cuyos genes involucrados en su síntesis se conocen (Hernández-León et al., 2015; Hernández-Salmerón et al., 2016).

El gen *phlD* forma parte del operón biosintético del compuesto 2,4-DAPG, un antibiótico ampliamente reportado en el biocontrol de hongos patógenos de plantas (Yang and Cao, 2012). Dentro del operón descrito, *phlACBD*, destaca el gen *phlD*, que codifica una poliquétido sintasa, como principal responsable de la producción de Monoacetilfloroglucinol (MAPG), el cual es el precursor directo de 2,4-DAPG mediante una acetilación llevada a cabo por los productos de los genes *phlA*, *phlB* y *phlC* (Banger and Thomashow, 1999).

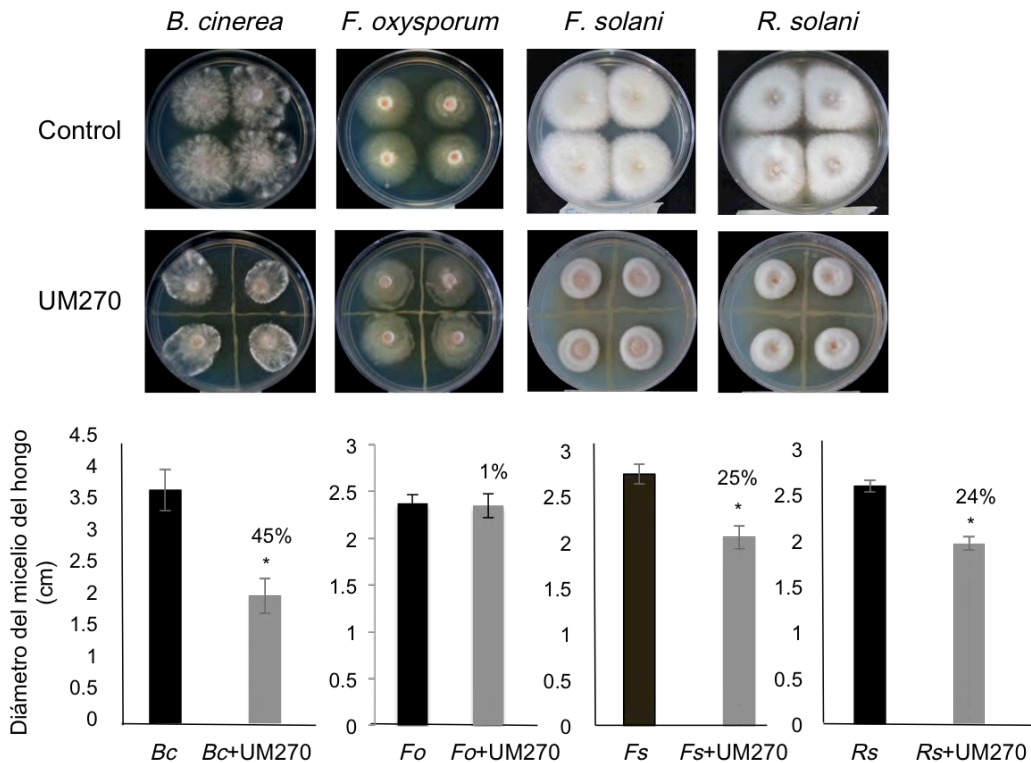
Por su parte, el gen *hcnC* codifica la subunidad C de la sintasa de ácido cianhídrico o HCN sintasa, que cataliza la reacción para la formación del HCN a partir del aminoácido glicina, el cual es un factor de virulencia conocido en las especies de *Pseudomonas* (Laville et al., 1998). Por lo tanto, resulta ser un candidato como mecanismo de biocontrol hacia patógenos.

En el trabajo presentado en este capítulo se determinó y comparó la expresión relativa de ambos genes en la cepa UM270 al interactuar con diferentes especies de hongos fitopatógenos.

### **Inhibición del crecimiento micelial de hongos fitopatógenos por la cepa UM270**

Los resultados de los experimentos de antagonismo mostraron diferencias en cuanto al crecimiento y morfología del micelio de los cuatro hongos probados en presencia de *P. fluorescens* UM270. En el caso de la interacción con *B. cinerea*, se observó el mayor efecto de inhibición por parte de la bacteria de hasta un 45% (Fig. 8), la cual es significativa; asimismo, se presentó una inhibición significativa en el crecimiento del micelio de 25 y 24% al interactuar con *F. solani* y *R. solani*, respectivamente. Por otro lado, no se observó un efecto significativo sobre el hongo *F. oxysporum* aún cuando hay reportes del antagonismo en cepas de *Pseudomonas*

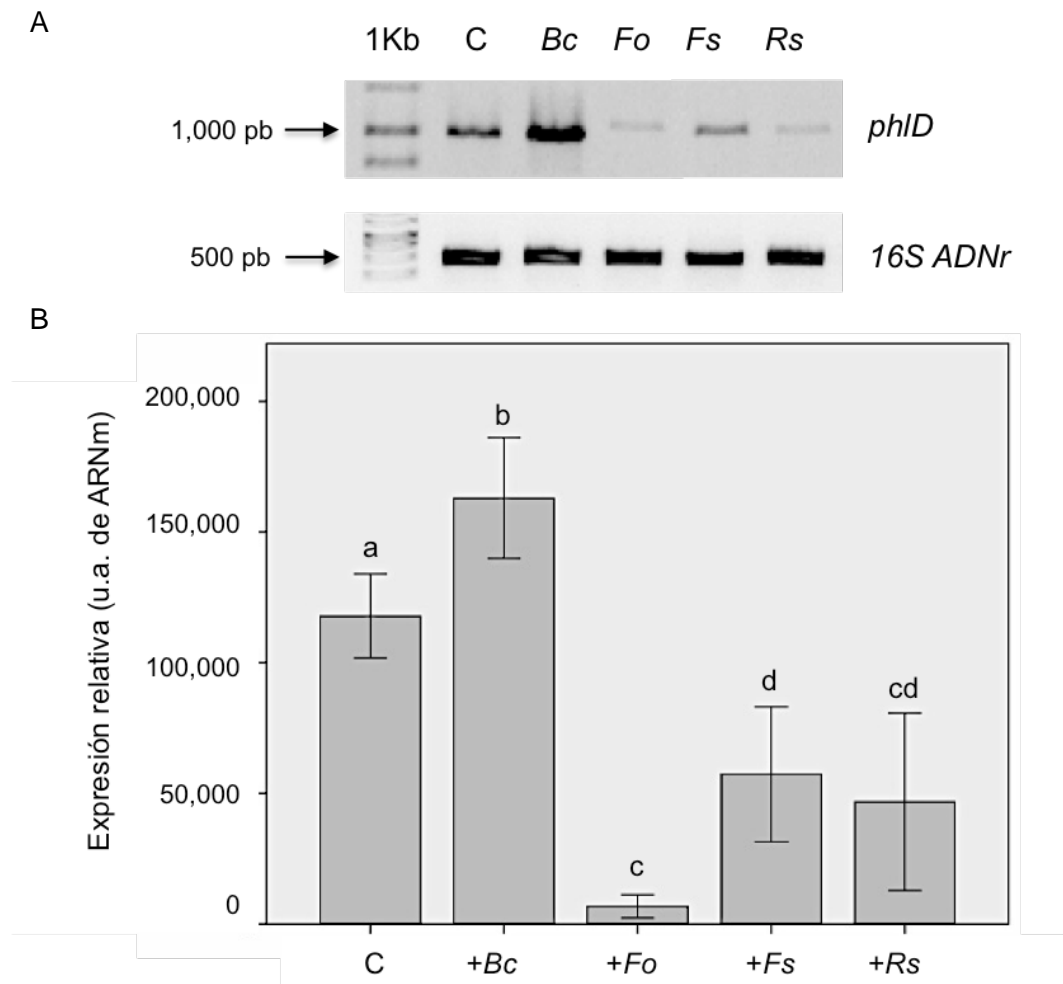
sp. sobre este organismo; sin embargo, visualmente se observó un ligero cambio en la coloración y en la morfología del micelio, para lo cual sería interesante analizar con mayor detalle los posibles mecanismos responsables de dichos cambios.



**Figura 8.** Ensayo de inhibición hacia hongos fitopatógenos por la cepa *P. fluorescens* UM270. Cuatro discos de micelio de hongo se colocaron en puntos equidistantes de la caja petri, al centro se inoculó la cepa UM270 y se midió el porcentaje de inhibición de micelio. *Bc*, *Botrytis cinerea*; *Fo*, *Fusarium oxysporum*; *Fs*, *Fusarium solani*; *Rs*, *Rhizoctonia solani*. T-student  $p < 0,05$ ,  $n = 4$ .

### Expresión del gen *phID*

A continuación se midió la expresión relativa del gen *phID* en la bacteria UM270 al interactuar con las diferentes especies de fitopatógenos. En la figura 9 se presenta el resultado correspondiente a la expresión de este gen. Se observa una expresión significativa del gen en interacción con *B. cinerea*, mientras que la expresión del mismo en presencia de *F. oxysporum* y *F. solani* y *R. solani* fue significativamente menor. En el caso de *F. oxysporum* la expresión de este gen en la cepa UM270 fue prácticamente inhibida. Lo que sugiere que la expresión de este gen es modulada por la presencia de los hongos fitopatógenos.



**Figura 9.** Expresión relativa del gen *phID* en UM270 en interacción con hongos fitopatógenos. A) Gel de agarosa 1% que muestra las bandas correspondientes al gen *phID* de un tamaño de 1000pb en cada una de las condiciones probadas, así como el gen endógeno 16S ADNr, región v1-v3 (500 pb). B) Gráficas de expresión relativa, prueba de Duncan  $p < 0.05$ ,  $n = 3$ . Bc, *Botrytis cinerea*; Fo, *Fusarium oxysporum*; Fs, *Fusarium solani*; Rs, *Rhizoctonia solani*.

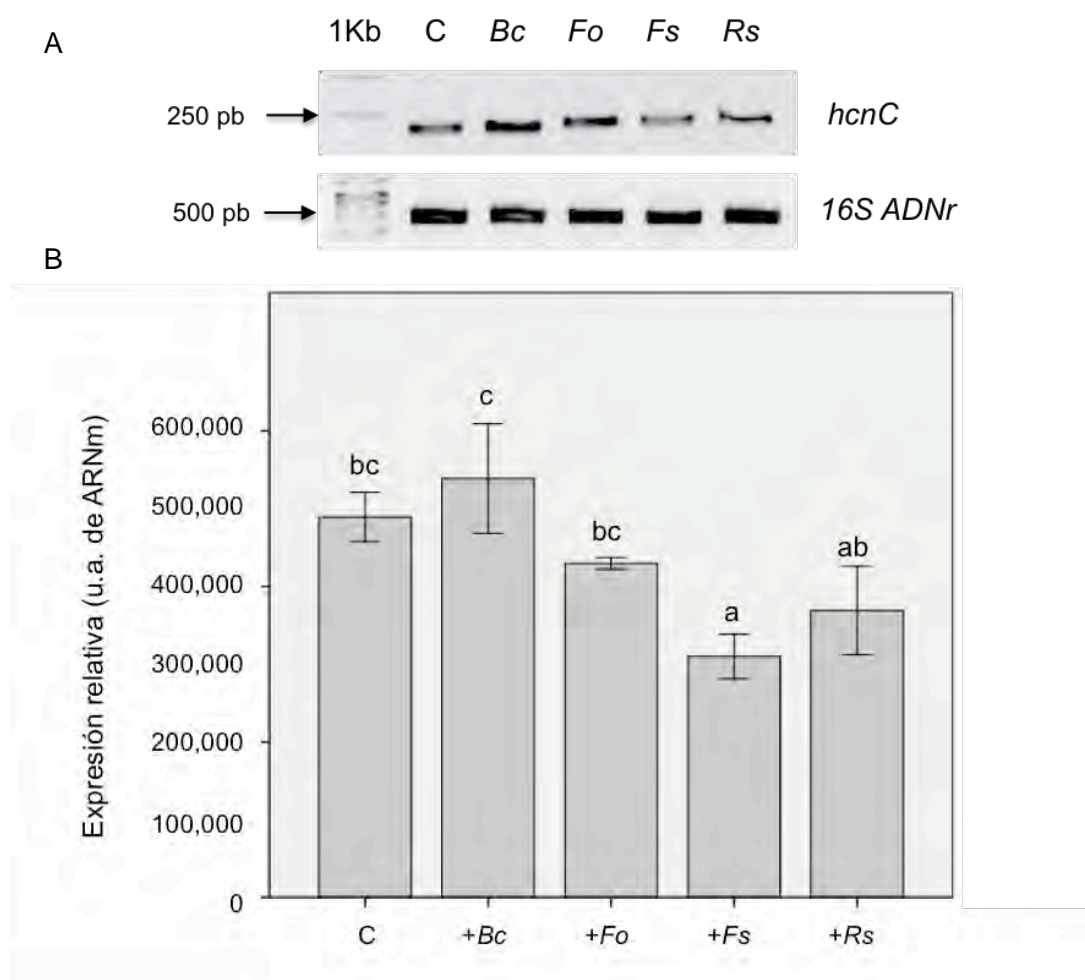
Es de gran relevancia que esta rizobacteria tenga un mayor porcentaje de inhibición sobre el crecimiento del hongo *B. cinerea*, uno de las especies más agresivas en cuanto a pérdidas de cultivos de plantas, siendo aún más importante que el gen *phID* se encuentre sobreexpresado al estar en contacto la bacteria con el hongo. Cabe mencionar que el compuesto 2,4-DAPG se ha reportado como una posible molécula señal que induce la expresión de algunos genes involucrados en la promoción del crecimiento vegetal en *Azospirillum* (Combes-Meynet et al., 2011), lo cual es viable ya que es un metabolito de bajo peso molecular que produce su

efecto a bajas concentraciones. Algo similar podría ocurrir en la bacteria UM270, sin embargo, es algo que aún falta probar.

Son pocos los estudios que se enfocan en estudiar la señalización entre hongos y bacterias; sin embargo, dos estudios han detectado esta comunicación entre *Pythium debaryanum* que indujo la sobreexpresión de genes de biocontrol en *P. fluorescens* ATCC 17400 (Gaballa et al., 1997). Por su parte, otra especie de *Pythium ultimum* desencadenó una supresión de cinco grupos de genes en *P. fluorescens* F113, que es una bacteria que muestra antagonismo hacia este patógeno (Fedi et al., 1997).

### **Expresión del gen *hcnC***

En la determinación de la expresión relativa del gen *hcnC* de UM270, se observó una tendencia al incremento en contacto con el hongo *B. cinerea*. Los niveles de ARNm de este gen con respecto al resto de especies de hongos fue ligeramente menor, aunque significativamente diferente en presencia de *F. solani*, donde incluso se observa que fue suprimida la expresión de este gen, a diferencia del control. Con el resto de los hongos no se observan diferencias significativas aunque si se advierten niveles bajos en la expresión, a diferencia del control, lo cual puede sugerir que la expresión de este gen está siendo modulado por la presencia de los hongos fitopatógenos (Fig. 10).



**Figura 10.** Expresión relativa del gen *hcnC* en UM270 en interacción con hongos fitopatógenos. A) Gel de agarosa 2% muestra la expresión de *hcnC* de un tamaño de 200pb en cada una de las condiciones, así como el gen endógeno 16S ADNr, región v1-v3 (500 pb). B) Gráficas de expresión relativa (inferior), prueba de Duncan  $p < 0.05$ ,  $n=3$ . Bc, *Botrytis cinerea*; Fo, *Fusarium oxysporum*; Fs, *Fusarium solani*; Rs, *Rhizoctonia solani*.

Existen diversos factores que regulan la expresión de genes en bacterias, principalmente los factores Sigma (Haas and Keel, 2003). Particularmente, para la síntesis de HCN se ha sugerido que el oxígeno es un factor importante, por lo que condiciones microaerobias son óptimas para su producción en *Pseudomonas* (Laville et al., 1998). Incluso se ha determinado que la síntesis de HCN varía dependiendo del medio de cultivo donde se analice (Michelsen and Stougaard, 2012); sin embargo, se sigue avanzando en determinar las condiciones óptimas que permitan detectar la síntesis de este compuesto ( and Banks, 2015). Por lo tanto, la medida de la expresión del gen *hcnC* puede ser un excelente acercamiento que nos permita entender el papel de este gen en la interacción con los hongos.

Si bien se han realizado ya estimaciones por PCR-Q en la expresión de los genes *hcnC* y *phlD* en *Pseudomonas* spp., éstas sólo se han determinado en diferentes tiempos de crecimiento de la bacteria (De Coste et al., 2011), no se han determinado niveles de expresión en presencia de hongos fitopatógenos.

Con los resultados expuestos sugerimos que existe una modulación dada por la interacción de la bacteria con el hongo; sin embargo, desconocemos el mecanismo involucrado, por lo que surgen nuevas preguntas que pueden dar pie a mayor investigación sobre esta interesante interacción de antagonismo, por ejemplo: ¿La síntesis de estos compuestos tendrá algún tipo de regulación también a nivel transcripcional o post-transcripcional, o bien, a nivel traduccional?, ¿Actúan como moléculas señal? ¿Cómo son percibidas estas moléculas por el hongo? ¿Qué tipo de respuestas de defensa podrán activar en el caso de los hongos donde no se observa ningún cambio en la expresión?

Al comparar la expresión de los genes *phlD* y *hcnC* en cada uno de los hongos, se puede notar lo siguiente: la bacteria en contacto con *B. cinerea*, incrementa los niveles de expresión de *phlD*, por lo que, o bien el hongo no percibe a la bacteria o no cuenta con mecanismos para regular su expresión. Por otro lado, en el caso de *F. oxysporum*, los niveles de *phlD* están siendo abatidos, mientras que los de *hcnC* se mantienen igual que el control, por lo que es posible que este hongo tenga la capacidad de inhibir el compuesto 2,4-DAPG, y a su vez, no ser afectado por el HCN. Finalmente, los hongos *F. solani* y *R. solani* también mostraron diferencias significativas al regular negativamente la expresión de ambos genes, por lo que igualmente es posible que dichos compuestos no logren inhibir el crecimiento de estas dos especies. Sin embargo, sigue siendo de gran relevancia determinar los mecanismos por los cuales estos organismos logran disminuir la expresión de dos genes importantes en la interacción inter-reino de bacterias y el hongos.

## DISCUSIÓN GENERAL

El conocimiento del contenido del genoma de *P. fluorescens* UM270 nos permite ahondar y detallar sobre los determinantes genéticos que le dan la característica a este organismo como promotor del crecimiento vegetal y biocontrolador. Cabe resaltar que, al menos en los genomas completos reportados (Tabla 1), la cepa UM270 es la única que posee ambas actividades probadas experimentalmente *in vitro*. El resto de bacterias relacionadas sólo reportan una de las actividades, ya sea a través de un mecanismo directo o indirecto, a excepción de UK4 que no posee ninguna de estas características.

Por lo cual resulta relevante su estudio genómico. Inicialmente se realizó un árbol filogenético basado en el marcador 16S ADNr (Capítulo I), donde se eligió al azar sólo una copia de este gen de los 48 genomas completos existentes hasta el momento del género *Pseudomonas*. A partir de entonces, la cepa UM270 se agrupó con la cepa Pf0-1, la cual se utilizó como referencia para el ensamble de las secuencias consenso de UM270.

Estos datos no se mantienen fijos, con el constante aumento en la secuenciación de genomas; actualmente el género *Pseudomonas* es amplio y megadiverso, con 451 cepas secuenciadas, tanto de genomas completos y semi-completos (“draft”, genomas que contienen algunos huecos pequeños en su secuencia). A su vez, existe una alta heterogeneidad entre las especies relacionadas incluso dentro de una misma especie, lo cual ha llevado a varios intentos de organizar filogenéticamente este grupo fluorescente de bacterias (Garrido-Sanz et al., 2016).

Una clasificación muy interesante para establecer las relaciones filogenéticas en este grupo bacteriano, basada en un análisis Multi-locus (MLSA), es decir, empleando secuencias parciales de múltiples genes marcadores (16S rRNA, *gyrB*, *rpoB* and *rpoD*), logró agrupar un total de 107 cepas de *Pseudomonas* en linajes, grupos y subgrupos, siendo el linaje de *P. fluorescens* el más amplio y diverso (Mulet et al., 2010).

Con este análisis se ha propuesto ahora un grupo importante, el “complejo *Pseudomonas* fluorescentes”, el cual incluye 93 cepas con genomas secuenciados

divididas en ocho grupos filogenómicos, es decir, empleando todo el genoma para reconstruir la filogenia. Dentro de estos grupos se incluyen: *P. fluorescens*, *P. gessardii*, *P. mandelii*, *P. jessenii*, *P. koreensis*, *P. corrugata*, *P. chlororaphis* y *P. protegens*. Con esto los autores proponen una nueva clasificación de este extenso grupo que probablemente no cambiaría con la secuenciación de nuevos organismos (Garrido-Sanz et al., 2016).

En cuanto a la comparación genómica de los miembros de esta especie, se utilizaron seis genomas completos (Pf0-1, SBW25, A506, F113, PICF-7 y UK4), una *Pseudomonas* sp. UW4 y la cepa UM270. Las principales similitudes genómicas de la cepa UM270 fueron con F113, tanto en la comparación de funciones génicas de la clasificación de SEED (Fig. 4), como en los genes homólogos compartidos (Fig. 5).

Es interesante notar que, siendo ambos organismos rizosféricos, fueron aislados de lugares distantes (Irlanda y México), de condiciones ambientales y especies de plantas distintas (alfalfa y remolacha), mantengan tanta similitud (82%). Ambos organismos han sido reportados con capacidades de biocontrol; en el caso de F113, resalta su capacidad de inhibición de hongos y nemátodos como *Pectobacterium caratovorum*, *F. oxysporum*, *Pythium ultimum* y *Globodera* spp., características atribuidas principalmente a los compuestos 2,4-DAPG y HCN (Miguel et al., 2012; Redondo-Nieto et al., 2013). En el caso de UM270 se reportó actividad de inhibición hacia *B. cinerea*, *F. solani* y *R. solani* (Capítulo III, Fig. 8, 9 y 10); donde se sugiere a los mismos compuestos como responsables de este efecto antagónico.

Con el análisis del core-genoma, es posible establecer las relaciones de función entre los organismos analizados, ya que se describe el repertorio completo de genes en una especie bacteriana. Por lo que se ha establecido que el Pan- y core-genoma poseen una medida para la variación intra especies en el contenido génico (Xu et al., 2015).

En este trabajo se analizó el core de los ocho genomas listados en la Tabla 1, en el cual se encontraron 3,039 secuencias codificantes compartidas. Este número representa el 51-58% del total de CDS's en dichos genomas. Si comparamos este resultado con el reportado para *P. aeruginosa*, una especie cercana

taxonómicamente, vemos un core mucho más elevado, con 5,316 CDS's, el cual incluyó el análisis de doce genomas secuenciados (Ozer et al., 2014). Si bien el tamaño de su genoma es ligeramente mayor, en promedio 6.52 Mbp, esto es menos de 1Mb de diferencia respecto a las cepas fluorescentes, la diferencia en CDS's es mayor a 2000, lo cual efectivamente es mayor. Por el contrario, una especie más relacionada en cuanto al ambiente y funciones que lleva a cabo es *P. putida*, en la cual se determinó un core de 3,386 genes de 9 genomas analizados, el cual resulta ser muy similar al de *P. fluorescens*, probablemente debido al tipo de ambiente en el que se desarrollan y las funciones necesarias para sobrevivir en él (Udaondo et al., 2015).

Esta relación se ha observado anteriormente en especies de *Bacillus*, ya que al comparar el core y pan genoma de diferentes especies como *B. thuringiensis*, *B. cereus* y *B. anthracis*, se observan similitudes entre las dos primeras especies; sin embargo, *B. anthracis* muestra un pan genoma cerrado, debido a que es mucho más reciente que los otros genomas, y además sus características morfológicas y funcionales son distintas (Fang et al., 2011), lo cual explica dicha diferencia genómica.

En el caso de *P. fluorescens*, recientemente se estudió de manera comparativa un grupo de cepas con genomas secuenciados y se compararon con los tres únicos genomas completos secuenciados en ese momento de esta especie. Se encontró un core genoma de 3,115 genes en las cuatro cepas analizadas (Pf-5, SBW25, Pf0-1 y WH6), el cual representaba del 25-35% del genoma total de cada cepa (Loper et al., 2012). Si observamos, este core-genoma no ha disminuído significativamente al reportado en este estudio con el doble de genomas analizados (menos de 100 CDS's), lo cual sugiere que esta especie ha conservado un core importante a lo largo del tiempo; es probable que incrementando exponencialmente el número de genomas, este core no disminuya significativamente.

Si bien el repertorio completo del core-genoma es un aspecto evolutivo importante, también lo son las regiones variables, o genes accesorios y, por supuesto, los genes únicos; ya que son toda la información que refleja la historia ecológica de la cepa y de varios ambientes, así como la presión selectiva a la que se ha enfrentado en el

tiempo (Loper et al., 2012). Por lo tanto, este análisis se enfocó a estudiar las funciones de los genes únicos de *P. fluorescens* UM270.

Los genes determinados como únicos en este estudio se definen como aquellos que no tuvieron un homólogo bidireccional en ninguno de los 7 genomas con los que se comparó.

Se ha mencionado que cuando un organismo es buen colonizador, su actividad de biocontrol está dada principalmente por metabolitos secundarios con efecto de antibiosis; sin embargo, aquellos que no son competitivos en la colonización, actúan desencadenando las respuestas ISR en la planta (Lugtenberg and Kamilova, 2009). Por mencionar algunos ejemplos, *B. subtilis* GB03 induce ISR a través de sus compuestos orgánicos volátiles (acetoína y 2,3-butanediol), al no ser un organismo efectivo en la colonización (Ryu et al., 2003).

Por lo cual, no es extraño que en el genoma de UM270 resalten como genes únicos aquellos involucrados en la colonización. De los 192 CDS's únicos, 17 participan en la estructura y funcionalidad del flagelo, que además de ser indispensable en la movilidad celular, también se ha reportado como determinante para activar los sistemas de defensa de la planta (Bakker et al., 2007).

Otra función sobresaliente en abundancia fue la relacionada con transportadores, principalmente los de tipo ABC. En el Anexo II se encuentran enlistados el total de genes únicos, donde se puede puntualizar la gran diversidad de transportadores hacia distintos compuestos como: pioverdina, sulfonatos, hexuronato, glutatión, varios polioles, así como algunos aminoácidos (metionina, arginina, histidina, prolina/glicina). En general, corresponden a varios compuestos tóxicos, lo cual abre la posibilidad de esta cepa como posible acción rizorremediadora (Kuiper et al., 2004).

Asimismo, la gran cantidad de reguladores en su mayoría pertenecen a los del tipo transcripcional (familias AraC, LysR, GntR, Cro/CI, MerR, TetR), dos de ellos del tipo de respuesta histidina/cinasa.

Por otro lado, resulta de gran relevancia mencionar aquellos genes únicos, que, si bien no son los más abundantes, sí resultan importantes para conocer su función en

este organismo. Debido a lo extenso que resultaría detallarlos todos, se presentaron en la Tabla 3 algunos de los que potencialmente pueden ser genes candidatos por su homología con funciones, tanto de biocontrol, como de colonización y sobrevivencia. Por lo tanto sería muy interesante probar la función de dichos genes.

Finalmente, en el capítulo III se llevó a cabo el análisis de expresión de los genes *phlD* y *hcnC* en UM270 en contacto con cuatro hongos patógenos de plantas. Es de gran relevancia que esta PGPR tenga un mayor porcentaje de inhibición hacia *B. cinerea*, uno de las especies más agresivas en cuanto a pérdidas de cultivos de plantas, siendo aún más importante que el gen *phlD* se encuentre sobreexpresado al estar en contacto la bacteria con el hongo; lo anterior sugiere una participación del compuesto 2,4-DAPG en la antibiosis a dicho patógeno. Sin embargo, cabe mencionar que el compuesto 2,4-DAPG se ha reportado como una posible molécula señal que induce la expresión de algunos genes involucrados en la promoción del crecimiento vegetal en *Azospirillum* (Combes-Meynet et al., 2011), lo cual es viable ya que es un metabolito de bajo peso molecular que produce su efecto a bajas concentraciones. Algo similar podría ocurrir en la bacteria UM270, sin embargo, es algo que aún falta probar.

Son pocos los estudios que se enfocan en estudiar la señalización entre hongos y bacterias; sin embargo, dos estudios han detectado esta comunicación entre *Pythium debaryanum* que indujo la sobreexpresión de genes de biocontrol en *P. fluorescens* ATCC 17400 (Gaballa et al., 1997). Por su parte, otra especie de *Pythium ultimum* desencadenó una supresión de cinco grupos de genes en *P. fluorescens* F113, que es una bacteria que muestra antagonismo hacia este patógeno (Fedi et al., 1997).

Siguiendo con el gran potencial de UM270 como agente exitoso de biocontrol, Loper et al. (2012), hacen referencia a tres aspectos que se deben cumplir y evaluar para demostrar la efectividad del biocontrol: 1) la capacidad de colonización de las PGPR en la superficie de la planta, (2) la infección o blanco específico y (3) producción de antibióticos tóxicos hacia el patógeno, o bien, inducción de ISR. Características ya probadas en la cepa UM270. Lo que demuestra un gran potencial, ahora probado, de la cepa *P. fluorescens* UM270 para proteger plantas de la infección causada por hongos fitopatógenos, así como para la promoción del crecimiento vegetal. Lo

anterior abre la puerta a futuros estudios que demuestren el papel benéfico de aquellos genes únicos (por ejemplo, la generación de mutantes) presentes en el genoma de la cepa UM270.

## RESUMEN DE RESULTADOS

1. El genoma de *P. fluorescens* UM270 tiene un tamaño de 6,047,974 pb, cuenta con un total de 5,509 genes, de los cuales 5,388 son genes codificantes (CDS) y tiene un %GC de 62.66. En el análisis filogenético se encontró que se relaciona con la cepa *P. fluorescens* Pf0-1, la cual fue empleada como cepa de referencia para el ensamble genómico del cromosoma.
2. El core-genoma de la especie *P. fluorescens* contiene 3,039 CDS, la cepa UM270 presentó 599 genes únicos en comparación con los seis genomas completos de esta especie. De estos genes, 407 aún no tienen una función conocida o reportada en genes homólogos, mientras que 192 sí han sido reportados en otros organismos y se les conoce alguna función. Dentro de estas funciones resaltan las involucradas en la estructura y movilidad, transportadores y enzimas.
3. Los niveles de expresión de los genes *phlD* y *hcnC* en la cepa UM270 son modulados, tanto de manera positiva como negativa por la presencia de los hongos fitopatógenos: *B. cinerea*, *F. oxysporum*, *F. solani* y *R. solani*.

## CONCLUSIÓN

El genoma de la cepa *Pseudomonas fluorescens* UM270 contiene un grupo de genes únicos con función desconocida, así como genes relacionados con la colonización y competencia rizosférica.

## COAUTORÍAS

Hernandez-Salmeron, J.E., Prieto-Barajas, C.M., Valencia-Cantero, E., Moreno-Hagelsieb, G., Santoyo, G., 2014.

**Isolation and characterization of genetic variability in bacteria with  $\beta$ -hemolytic and antifungal activity isolated from the rhizosphere of *Medicago truncatula* plants.**

Genet. Mol. Res. 13, 4967–4975.



## Isolation and characterization of genetic variability in bacteria with $\beta$ -hemolytic and antifungal activity isolated from the rhizosphere of *Medicago truncatula* plants

J.E. Hernández-Salmerón<sup>1</sup>, C.M. Prieto-Barajas<sup>1</sup>, E. Valencia-Cantero<sup>1</sup>, G. Moreno-Hagelsieb<sup>2</sup> and G. Santoyo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, México

<sup>2</sup>Department of Biology, Wilfrid Laurier University, Waterloo, Ontario, Canada

Corresponding autor: G. Santoyo

E-mail: gustavo\_santoyo@yahoo.com / gsantoyo@umich.mx

Genet. Mol. Res. 13 (3): 4967-4975 (2014)

Received May 28, 2013

Accepted November 1, 2013

Published July 4, 2014

DOI <http://dx.doi.org/10.4238/2014.July.4.11>

**ABSTRACT.** In the present study, we analyzed the frequency of hemolytic and antifungal activities in bacterial isolates from the rhizosphere of *Medicago truncatula* plants. Of the 2000 bacterial colonies, 96 showed  $\beta$ -hemolytic activities (frequency,  $4.8 \times 10^{-2}$ ). Hemolytic isolates were analyzed for their genetic diversity by using random amplification of polymorphic DNA, yielding 88 haplotypes. The similarity coefficient of Nei and Li showed a polymorphic diversity ranging from 0.3 to 1. Additionally, 8 of the hemolytic isolates showed antifungal activity toward plant pathogens, *Diaporthe phaseolorum*, *Colletotrichum acutatum*, *Rhizoctonia solani*, and *Fusarium oxysporum*. The 16S ribosomal sequencing analysis showed that antagonistic bacterial isolates corresponded to *Bacillus subtilis* (UM15, UM33, UM42, UM49, UM52, and UM91), *Bacillus pumilus* (UM24), and *Bacillus licheniformis*

Hernández-Pacheco, C., Hernández-Salmerón, J.E., Hernández-León, R., Prieto-Barajas, C., Martínez-Absalón, S., Eduardo Valencia-Cantero, E. Santoyo, G., 2013.

**Diversidad de bacterias endófitas en raíces de tomate (*Physalis ixocarpa*) mediante el análisis de genes de la subunidad 16S de ARN ribosomal.**

Ciencia Nicolaita. 42–50.

# Diversidad de bacterias endófitas en raíces de tomate (*Physalis ixocarpa*) mediante el análisis de genes de la subunidad 16S de ARN ribosomal

*Claudia E. Hernández Pacheco, Julie E. Hernández-Salmerón, Rocío Hernández-León, Cristina M. Prieto-Barajas, Sofía Martínez-Absalón, Eduardo Valencia-Cantero y Gustavo Santoyo*

Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, UMSNH

## Resumen

La diversidad de bacterias endófitas fue estimada en raíces de plantas de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa*) por medio de la amplificación y secuenciación de genes ribosomales 16S. Se identificaron 16 unidades taxonómicas operacionales (OTUs) en una biblioteca de clonas mediante el análisis tipo Blast, incluyendo las clases Gammaproteobacteria, Betaproteobacteria, Actinobacteria, Bacilli y bacterias no cultivables. Los cinco géneros predominantes fueron *Stenotrophomonas*, *Microbacterium*, *Burkholderia*, *Bacillus* y *Pseudomonas*. Nuestros resultados sugieren que la diversidad bacteriana endófitas dentro de las raíces de plantas de tomate pertenecen a géneros bacterianos asociados a la rizósfera y con gran potencial para llevar a cabo funciones de promoción del crecimiento vegetal.

**Palabras clave:** Endófitos, diversidad bacteriana, *Physalis ixocarpa*, rRNA 16S.

Hernández-Pacheco, C., Hernández-Salmerón, J.E., Hernández-León, R., Santoyo, G.

**Recent advances on the role of abiotic factors modulating the plant-microbe-soil interactions.**

Revisión.

Artículo **aceptado** en la revista Spanish Journal of Agricultural Research

**Title:** Recent advances on the role of abiotic factors modulating the plant-microbe-soil interactions

**Authors:** Claudia Hernández-Pacheco<sup>1</sup>, Julie Hernández-Salmerón<sup>1</sup>, Rocio Hernández-León<sup>1</sup>, Gustavo Santoyo<sup>1</sup>

**Affiliations:** <sup>1</sup>Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, Mexico.

**\*Corresponding author:** Gustavo Santoyo. Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Ciudad Universitaria, Edificio A1', Morelia, Michoacán, México. C.P. 58030. e-mail: [gsantoyo@umich.mx](mailto:gsantoyo@umich.mx)

## **Abstract**

Microbial soil communities are active players in biogeochemical cycles, impacting soil fertility and interacting with aboveground organisms. Although soil microbial diversity has been studied in good detail, the factors that modulate its structure are still relatively unclear, especially the environmental factors. Several abiotic elements may play a key role in modulating the diversity of soil microbes, including those inhabiting the rhizosphere (known as the rhizosphere microbiome). This review summarizes relevant and recent studies that have investigated the abiotic factors at different scales, such as pH, temperature, soil type, and geographic and climatic conditions, that modulate the bulk soil and rhizosphere microbiome, as well as their indirect effects on plant health and development. The plant-microbiome interactions and potential benefits of plant growth-promoting rhizobacteria are also discussed. In the last part of this review, we highlight the impact of climate change on soil microorganisms via global temperature changes and increases in ultraviolet radiation and CO<sub>2</sub> production. Finally, we propose the need to understand the function of soil and rhizospheric ecosystems in greater detail, in order to effectively manipulate or engineer the rhizosphere microbiome to improve plant growth in agricultural production.

**Keywords:** Abiotic factors, Plant Growth-Promoting Rhizobacteria, Rhizosphere Microbiome, Sustainable Agriculture, Bulk Soil.

Hernández-Salmerón J.E., Santoyo G. 2016.

**Conociendo el genoma de *Pseudomonas fluorescens* UM270: una bacteria que protege y beneficia la salud de las plantas.**

Artículo de divulgación. Aceptado Revista Saber Más.

Revista de Divulgación "**Saber más**"  
*Revista electrónica*  
ISSN: 2007-7041  
Año 5, número 27  
31 de Mayo de 2016  
<http://www.sabermas.umich.mx/>

*Estimados Julie Eliene Hernández Salmerón y Gustavo Santoyo Pizano:*

Nos resulta muy grato comunicarles que el comité editorial de la Revista **Saber más** ha tomado la decisión de **ACEPTAR** su artículo "**Conociendo el genoma de *Pseudomonas fluorescens* UM270: una bacteria que protege y beneficia la salud de las plantas**", que será publicado en el No. 27 en el mes de agosto del 2016. Agradecemos su colaboración y les invitamos a seguir participando en la revista, así como a ayudarnos a difundir **Saber más**.



Dr. Horacio Cano Camacho  
Editor

*Copyright © 2012-2013 Revista de divulgación Saber más. Todos los derechos reservados.*

# COAUTORÍA DE TESIS DE LICENCIATURA



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO  
FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS



**DIVERSIDAD DE GENES *phlD* Y *hcnC* DE CEPAS ENDÓFITAS Y RIZOSFÉRICAS PRODUCTORAS DE SIDERÓFOROS EN PLANTAS DE ZARZAMORA (*Rubus fruticosus*)**

**TESIS**

PRESENTA

**BENJAMÍN ROGELIO HERNÁNDEZ FLORES**

PARA OBTENER EL GRADO DE  
**QUÍMICO FARMACOBIOLOGO**

ASESOR

**D.C. GUSTAVO SANTOYO PIZANO**

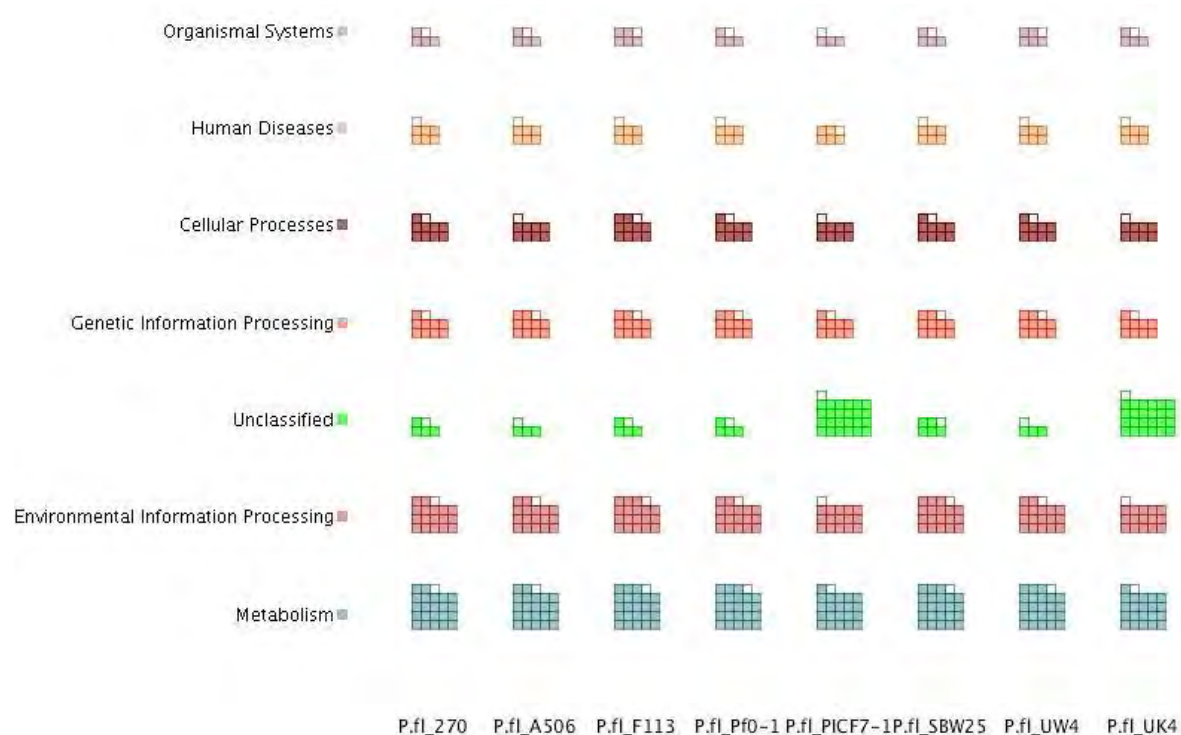
CO – ASESORA

**M.C JULIE ELIENE HERNÁNDEZ SALMERÓN**

MORELIA, MICHOACÁN NOVIEMBRE 2016

# ANEXO I.

Comparación de funciones de genomas de acuerdo a la base de datos de KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes).



## ANEXO II.

Tabla suplementaria 1. Total de funciones únicas predichas en *P. fluorescens* UM270.

1. 2,3,4,5-tetrahydropyridine-2,6-dicarboxylate N-acetyltransferase (EC 2.3.1.89)
2. 2-octaprenyl-3-methyl-6-methoxy-1,4-benzoquinol hydroxylase related protein
3. 3-demethylubiquinone-9 3-methyltransferase (EC 2.1.1.64)
4. 3-oxoacyl-[acyl-carrier protein] reductase (EC 1.1.1.100)
5. 3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase, KASII (EC 2.3.1.41)
6. 4-hydroxyproline epimerase (EC 5.1.1.8)
7. ABC transporter in pyoverdinin gene cluster, permease component
8. ABC-type metal ion transport system, periplasmic component/surface adhesin
9. ABC-type nitrate/sulfonate/bicarbonate transport systems, periplasmic components
10. ATP-dependent DNA helicase UvrD/PcrA
11. ATPase involved in DNA repair
12. Abortive infection bacteriophage resistance protein
13. Acetoacetyl-CoA reductase (EC 1.1.1.36)
14. Acetyltransferase (EC 2.3.1.-)
15. Acetyltransferases
16. Aconitate hydratase (EC 4.2.1.3)
17. Additional periplasmic component NikK of nickel ECF transporter
18. Aldehyde dehydrogenase (EC 1.2.1.3); Probable coniferyl aldehyde dehydrogenase (EC 1.2.1.68)
19. Alkanesulfonates ABC transporter ATP-binding protein / Sulfonate ABC transporter, ATP-binding subunit SsuB
20. Alkanesulfonates transport system permease protein
21. Alkyl hydroperoxide reductase subunit C-like protein
22. Anthranilate synthase, aminase component (EC 4.1.3.27)
23. Anticodon nuclease
24. AraC family transcription regulator
25. Arginine/ornithine ABC transporter, permease protein AotQ
26. Branched-chain amino acid ABC transporter, amino acid-binding protein (TC 3.A.1.4.1)
27. Capsule polysaccharide export ATP-binding protein ctrD (EC 3.6.3.38)
28. Catalase (EC 1.11.1.6)
29. Cation ABC transporter, periplasmic cation-binding protein
30. ClpB protein
31. Conidiation-specific protein 10
32. Conserved domain protein
33. Cyanide insensitive terminal oxidase, putative subunit III
34. Cysteine desulfurase (EC 2.8.1.7)
35. Cysteinyl-tRNA synthetase (EC 6.1.1.16)
36. Cytidine/deoxycytidylate deaminase family protein
37. Cytochrome c4
38. Cytosine/purine/uracil/thiamine/allantoin permease family protein
39. DNA repair protein RadC
40. DNA-binding heavy metal response regulator
41. DNA-binding protein HU-beta
42. Dipeptide transport system permease protein DppB (TC 3.A.1.5.2)
43. Endoglucanase D precursor (EC 3.2.1.4)

44. Enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase [NADPH] (EC 1.3.1.10)
45. Epoxide hydrolase (EC 3.3.2.9)
46. Esterase/lipase
47. Exopolyphosphatase (EC 3.6.1.11)
48. Predicted ATP-dependent endonuclease of the OLD family
49. Fe<sup>2+</sup>/Zn<sup>2+</sup> uptake regulation proteins
50. Ferredoxin reductase
51. Ferredoxin, 2Fe-2S
52. Ferrichrome-iron receptor
53. Flagellar L-ring protein FlgH
54. Flagellar M-ring protein FliF
55. Flagellar P-ring protein FlgI
56. Flagellar basal-body rod modification protein FlgD
57. Flagellar basal-body rod protein FlgC
58. Flagellar basal-body rod protein FlgF
59. Flagellar basal-body rod protein FlgG
60. Flagellar biosynthesis protein FlhA
61. Flagellar biosynthesis protein FlhB
62. Flagellar biosynthesis protein FliP
63. Flagellar biosynthesis protein FliQ
64. Flagellar biosynthesis protein FliR
65. Flagellar hook protein FlgE
66. Flagellar hook-basal body complex protein FliE
67. Flagellar motor switch protein FliN
68. Flagellar regulatory protein FleQ
69. Flagellum-specific ATP synthase FliI
70. GNAT family acetyltransferase VC2332
71. GbcA Glycine betaine demethylase subunit A
72. General secretion pathway protein F
73. Gentsiate 1,2-dioxygenase (EC 1.13.11.4)
74. Glutarate-semialdehyde dehydrogenase (EC 1.2.1.20); Succinate-semialdehyde dehydrogenase [NADP<sup>+</sup>] (EC 1.2.1.16)
75. Glutathione-regulated potassium-efflux system protein KefB
76. Glycine cleavage system transcriptional activator
77. Glycine cleavage system transcriptional activator GcvA
78. Glycine/D-amino acid oxidases (deaminating)
79. Glycolate utilization operon transcriptional activator GlcC
80. Glycosyl transferase, group 1 family protein
81. Hexuronate transporter
82. Histidine ABC transporter, ATP-binding protein HisP (TC 3.A.1.3.1)
83. Histidine kinase/response regulator hybrid protein
84. HlyD family secretion protein
85. Hydrolase, carbon-nitrogen family
86. INTEGRAL MEMBRANE PROTEIN (Rhomboid family)
87. Inosine-uridine preferring nucleoside hydrolase (EC 3.2.2.1)
88. Isochorismatase (EC 3.3.2.1)
89. L-Proline/Glycine betaine transporter ProP
90. L-serine dehydratase (EC 4.3.1.17)
91. LSU ribosomal protein L36p
92. Long-chain-fatty-acid--CoA ligase (EC 6.2.1.3)
93. LysR family transcriptional regulatory protein
94. Lysine N6-hydroxylase/L-ornithine N5-oxygenase family protein
95. Manganese transport protein MntH
96. Manganese transport system ATP-binding protein mntA
97. Metal-dependent hydrolase

98. Methionine ABC transporter ATP-binding protein
99. Methionyl-tRNA synthetase-related protein
100. Methyl-accepting chemotaxis protein
101. Mobile element protein
102. Multiple polyol-specific dehydrogenase (EC 1.1.1.-)
103. NAD glycohydrolase, hvnA; Halovibrin
104. NAD-dependent epimerase/dehydratase family protein
105. NADH-ubiquinone oxidoreductase chain L (EC 1.6.5.3)
106. NADPH:quinone oxidoreductase 2
107. Nicotinamidase family protein YcaC
108. Nicotinate-nucleotide adenylyltransferase (EC 2.7.7.18) ## bacterial NadD family
109. Non-ribosomal peptide synthetase modules, pyoverdine
110. O-antigen biosynthesis protein
111. O-antigen export system permease protein RfbD
112. Oligopeptidase A (EC 3.4.24.70)
113. Opine oxidase subunit B
114. Organic hydroperoxide resistance protein
115. Ornithine cyclodeaminase (EC 4.3.1.12)
116. Outer membrane porin, OprD family
117. Outer membrane protein
118. Phage DNA replication protein
119. Phage capsid and scaffold
120. Phage integrase
121. Phage integrase family protein
122. Phage major capsid protein
123. Phage minor capsid protein - DNA pilot protein
124. Phage protein
125. Phage terminase small subunit
126. Phage terminase, ATPase subunit
127. Phage-associated protease
128. Phenylalanyl-tRNA synthetase alpha chain (EC 6.1.1.20)
129. Phenylpropionate dioxygenase and related ring-hydroxylating dioxygenases, large terminal subunit
130. Phosphogluconate repressor HexR, RpiR family
131. Phospholipid-binding protein
132. Predicted D-glucarate or D-galactarate regulator, GntR family
133. Putative glutathione transporter, ATP-binding component
134. Putative predicted metal-dependent hydrolase
135. Putrescine/proton symporter, putrescine/ornithine antiporter PotE
136. RNA polymerase sigma factor for flagellar operon
137. RNA polymerase sigma-70 factor, ECF subfamily
138. RNA:NAD 2'-phosphotransferase
139. Ribonucleotide reductase of class III (anaerobic), activating protein (EC 1.97.1.4)
140. SAM-dependent methyltransferases
141. Saccharopine dehydrogenase
142. Sensory box sensor histidine kinase/response regulator (EC 2.7.3.-)
143. Serine acetyltransferase (EC 2.3.1.30)
144. Serine/threonine protein phosphatase (EC 3.1.3.16)
145. Short-chain dehydrogenase/reductase SDR
146. Signal transduction histidine kinase
147. Signal transduction histidine kinase CheA (EC 2.7.3.-)
148. Stress induced hydrophobic peptide
149. Succinate-semialdehyde dehydrogenase [NADP+] (EC 1.2.1.16)
150. Tauropine dehydrogenase
151. TesB-like acyl-CoA thioesterase 1

152. Topoisomerase IV subunit B (EC 5.99.1.-)
153. Transcriptional activator of acetoin dehydrogenase operon AcoR
154. Transcriptional regulator
155. Transcriptional regulator, AraC family
156. Transcriptional regulator, Cro/CI family
157. Transcriptional regulator, LysR family
158. Transcriptional regulator, MerR family
159. Transcriptional regulator, TetR family
160. Two-component system response regulator QseB
161. Type I secretion outer membrane protein, TolC precursor
162. UDP-2-acetamido-2-deoxy-D-glucuronic acid dehydrogenase (NAD<sup>+</sup> cofactor)
163. UDP-glucose 4-epimerase (EC 5.1.3.2)
164. Uncharacterized conserved protein
165. Uncharacterized protein conserved in bacteria, NMA0228-like
166. Urea carboxylase-related ABC transporter, ATPase protein
167. Vanillate monooxygenase( EC:1.14.13.82 )
168. Various polyols ABC transporter, ATP-binding component
169. VgrG protein
170. Y4yB
171. YD repeat protein
172. acetyltransferase, GNAT family
173. acyltransferase 3
174. bll2187; hypothetical protein
175. cl repressor protein
176. cyclolysin secretion ATP-binding protein
177. diguanylate cyclase/phosphodiesterase (GGDEF & EAL domains) with PAS/PAC sensor(s)
178. ortholog of Bordetella pertussis (BX470248) BP2101
179. oxidoreductase, short-chain dehydrogenase/reductase family
180. possible serine protease homolog
181. probable exported protein YPO0432
182. protein of unknown function DUF1130
183. protein of unknown function DUF201
184. protein of unknown function DUF6, transmembrane
185. putative 3-oxoadipate enol-lactone hydrolase/4-carboxymuconolactone decarboxylase
186. putative ABC transporter ATP binding protein
187. putative cytochrome P450 hydroxylase
188. putative lipoprotein
189. putative membrane protein
190. putative tail protein
191. terminase B protein, putative
192. transcriptional regulator, AraC family

## REFERENCIAS

- Adesemoye, A.O., Kloepper, J.W., 2009. Plant-microbes interactions in enhanced fertilizer-use efficiency. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* doi:10.1007/s00253-009-2196-0
- Aguado-Santacruz, G. a., Moreno-Gómez, B., Jiménez-Francisco, B., García-Moya, E., Preciado-Ortiz, R.E., 2012. Impacto de los sideróforos microbianos y fitosideróforos en la asimilación de hierro por las plantas: Una síntesis. *Rev. Fitotec. Mex.* 35, 9–21.
- Ali, B., Sabri, a. N., Ljung, K., Hasnain, S., 2009. Auxin production by plant associated bacteria: Impact on endogenous IAA content and growth of *Triticum aestivum* L. *Lett. Appl. Microbiol.* 48, 542–547. doi:10.1111/j.1472-765X.2009.02565.x
- Ali, G.S., Norman, D., El-Sayed, A.S., 2015. Soluble and Volatile Metabolites of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPRs): Role and Practical Applications in Inhibiting Pathogens and Activating Induced Systemic Resistance (ISR), *Advances in Botanical Research*. Elsevier Ltd. doi:10.1016/bs.abr.2015.07.004
- Aragón, I.M., Pérez-Martínez, I., Moreno-Pérez, A., Cerezo, M., Ramos, C., 2014. New insights into the role of indole-3-acetic acid in the virulence of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. *FEMS Microbiol. Lett.* 356, 184–192. doi:10.1111/1574-6968.12413
- Arand, M., Cronin, A., Adamska, M., Oesch, F., 2005. Epoxide hydrolases: structure, function, mechanism, and assay. *Methods Enzymol.* 400, 569–88. doi:10.1016/S0076-6879(05)00032-7
- Arkhipova, T.N., Prinsen, E., Veselov, S.U., Martinenko, E. V., Melentiev, A.I., Kudoyarova, G.R., 2007. Cytokinin producing bacteria enhance plant growth in drying soil. *Plant Soil* 292, 305–315. doi:10.1007/s11104-007-9233-5
- Bacon, C.W., Porter, J.K., Norred, W.P., Leslie, J.F., 1996. Production of fusaric acid by *Fusarium* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 4039–4043.
- Badri, D. V., Vivanco, J.M., 2009. Regulation and function of root exudates. *Plant. Cell Environ.* 32, 666–681. doi:10.1111/j.1365-3040.2008.01926.x
- Bakker, P.A.H.M., Pieterse, C.M.J., Loon, L.C. Van, 2007. Induced Systemic Resistance by Fluorescent *Pseudomonas* spp. *Am. Phytopathol. Soc.* 97, 239–243. doi:10.1094/PHYTO-97-2-0239

- Bangera, M.G., Thomashow, L.S., 1999. Identification and characterization of a gene cluster for synthesis of the polyketide antibiotic 2,4-diacetylphloroglucinol from *Pseudomonas fluorescens* q2-87. *J. Bacteriol.* 181, 3155–3163. doi:10322017
- Barrett, A.J., Rawlings, N.D., 1992. Oligopeptidases, and the emergence of the prolyl oligopeptidase family. *Biol. Chem. Hoppe. Seyler.* 373, 353–60.
- Berg, G., 2009. Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: Perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* doi:10.1007/s00253-009-2092-7
- Beyeler, M., Keel, C., Michaux, P., Haas, D., 1999. Enhanced production of indole-3-acetic acid by a genetically modified strain of *Pseudomonas fluorescens* CHA0 affects root growth of cucumber, but does not improve protection of the plant against *Pythium* root rot. *FEMS Microbiol. Ecol.* 28, 225–233.
- Bianchetti, C.M., Brumm, P., Smith, R.W., Dyer, K., Hura, G.L., Rutkoski, T.J., Phillips, G.N., 2013. Structure, dynamics, and specificity of endoglucanase D from *Clostridium cellulovorans*. *J. Mol. Biol.* 425, 4267–85. doi:10.1016/j.jmb.2013.05.030
- Bilwes, A.M., Alex, L.A., Crane, B.R., Simon, M.I., 1999. Structure of CheA, a signal-transducing histidine kinase. *Cell* 96, 131–141. doi:10.1016/S0092-8674(00)80966-6
- Blier, A.S., Vieillard, J., Gerault, E., Dagorn, A., Varacavoudin, T., Le Derf, F., Orange, N., Feuilloley, M., Lesouhaitier, O., 2012. Quantification of *Pseudomonas aeruginosa* hydrogen cyanide production by a polarographic approach. *J. Microbiol. Methods* 90, 20–24. doi:10.1016/j.mimet.2012.04.005
- Bloemberg, G. V, Lugtenberg, B.J.J., 2001. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Curr. Opin. Plant Biol.* doi:10.1016/S1369-5266(00)00183-7
- Braud, A., Hannauer, M., Mislin, G.L.A., Schalk, I.J., 2009. The *Pseudomonas aeruginosa* pyochelin-iron uptake pathway and its metal specificity. *J. Bacteriol.* 191, 3517–3525. doi:10.1128/JB.00010-09
- Burr, T.J., Schroth, M.N., Suslow, T., 1978. Increased Potato Yields by Treatment of Seed Pieces with Specific Strains of *Pseudomonas-Fluorescens* and *Pseudomonas-Putida*. *Phytopathology* 68, 1377–1383.
- Carver, T., Thomson, N., Bleasby, A., Berriman, M., Parkhill, J., 2009. DNAPlotter: Circular and linear interactive genome visualization. *Bioinformatics* 25, 119–120.

doi:10.1093/bioinformatics/btn578

Chin-A-Woeng, T.F.C., Bloemberg, G. V, van der Bij, A.J., van der Drift, K.M.G.F., Schripsema, J., Kroon, B., Scheffer, R.J., Keel, C., Bakker, P. a H.M., Tichy, H. V, de Bruijn, F.J., Thomas-Oates, J.E., Lugtenberg, B.J.J., 1998. Biocontrol by phenazine-1-carboxamide-producing *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 of tomato root rot caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* 11, 1069–1077. doi:10.1094/MPMI.1998.11.11.1069

Combes-Meynet, E., Pothier, J.F., Moënne-Loccoz, Y., Prigent-Combaret, C., 2011. The *Pseudomonas* secondary metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol is a signal inducing rhizoplane expression of *Azospirillum* genes involved in plant-growth promotion. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 24, 271–284. doi:10.1094/MPMI-07-10-0148

Compant, S., Clément, C., Sessitsch, A., 2010. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biol. Biochem.* doi:10.1016/j.soilbio.2009.11.024

Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Cle, C., Barka, E. a, 2005. Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases : Principles , Mechanisms of Action , and Future Prospects MINIREVIEW Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases : Principles , Mechanisms of Action , and. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 4951–4959. doi:10.1128/AEM.71.9.4951

Cullen, L., Mcclean, S., 2015. Bacterial Adaptation during Chronic Respiratory Infections. *Pathogens* 4, 66–89. doi:10.3390/pathogens4010066

De Coste, N.J., Gadkar, V.J., Fillion, M., 2011. Relative and absolute quantitative real-time PCR-based quantifications of hcnC and phlD gene transcripts in natural soil spiked with *Pseudomonas* sp. strain LBUM300. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 41–47. doi:10.1128/AEM.01387-10

de Kievit, T.R., Iglewski, B.H., Kievit, T.R. De, Teresa, R., 2000. MINIREVIEW Bacterial Quorum Sensing in Pathogenic Relationships. *Infect. Immun.* 68, 4839–4849. doi:10.1128/IAI.68.9.4839-4849.2000.Updated

De Meyer, G., Höfte, M., 1997. Salicylic Acid Produced by the Rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 Induces Resistance to Leaf Infection by *Botrytis cinerea* on Bean. *Biol. Control* 87, 588–593. doi:10.1094/PHYTO.1997.87.6.588

Dean, R., Van Kan, J.A.L., Pretorius, Z.A., Hammond-Kosack, K.E., Di Pietro, A., Spanu,

- P.D., Rudd, J.J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J., Foster, G.D., 2012. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* 13, 414–430. doi:10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x
- del Carmen Orozco-Mosqueda, M., Macías-Rodríguez, L.I., Santoyo, G., Farías-Rodríguez, R., Valencia-Cantero, E., 2013. *Medicago truncatula* increases its iron-uptake mechanisms in response to volatile organic compounds produced by *Sinorhizobium meliloti*. *Folia Microbiol. (Praha)*. 58, 579–585. doi:10.1007/s12223-013-0243-9
- Duan, J., Jiang, W., Cheng, Z., Heikkilä, J.J., Glick, B.R., 2013. The Complete Genome Sequence of the Plant Growth-Promoting Bacterium *Pseudomonas* sp. UW4. *PLoS One* 8, 1–19. doi:10.1371/journal.pone.0058640
- Dueholm, M.S., Danielsen, H.N., Nielsen, P.H., 2014. Complete Genome Sequence of *Pseudomonas* sp. UK4, a Model Organism for Studies of Functional Amyloids in *Pseudomonas*. *Genome Announc.* 2, e00898-14. doi:10.1128/genomeA.00898-14
- Edgar, R.C., 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26, 2460–2461. doi:10.1093/bioinformatics/btq461
- Fang, Y., Li, Z., Liu, J., Shu, C., Wang, X., Zhang, X., Yu, X., Zhao, D., Liu, G., Hu, S., Zhang, J., Al-Mssallem, I., Yu, J., 2011. A pangenomic study of *Bacillus thuringiensis*. *J. Genet. Genomics* 38, 567–576. doi:10.1016/j.jgg.2011.11.001
- Fedi, S., Tola, E., Moenne-Loccoz, Y., Dowling, D.N., Smith, L.M., O’Gara, F., 1997. Evidence for signaling between *Pythium ultimum* and *P. fluorescens* F113 - *P. ultimum* represses the expression of genes in *P. fluorescens* F113, resulting in altered ecological fitness. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 4261–4266.
- Filippi, C., Bagnoli, G., Treggi, G., Picci, G., 1984. Antagonistic effects of soil bacteria on *Fusarium oxysporum*. *Plant Soil* 80, 119–125.
- Gaballa, A., Abeysinghe, P.D., Urich, G., Matthijs, S., De Greve, H., Cornelis, P., Koedam, N., 1997. Trehalose induces antagonism towards *Pythium debaryanum* in *Pseudomonas fluorescens* ATCC 17400. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 4340–4345.
- Garrido-Sanz, D., Meier-Kolthoff, J.P., Göker, M., Martín, M., Rivilla, R., Redondo-Nieto, M., 2016. Genomic and Genetic Diversity within the *Pseudomonas fluorescens* Complex. *PLoS One* 11, e0150183. doi:10.1371/journal.pone.0150183
- Glick, B.R., 2005. Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC

- deaminase. *FEMS Microbiol. Lett.* 251, 1–7. doi:10.1016/j.femsle.2005.07.030
- Glick, B.R., 2012. *Plant Growth-Promoting Bacteria : Mechanisms and Applications*. Scientifica (Cairo). 2012, 1–15. doi:10.6064/2012/963401
- Glick, B.R., 2014. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiol. Res.* 169, 30–9. doi:10.1016/j.micres.2013.09.009
- Gross, H., Loper, J.E., 2009. Genomics of secondary metabolite production by *Pseudomonas* spp. *Nat. Prod. Rep.* 26, 1408–1446. doi:10.1039/b817075b
- Guo, M., Block, A., Bryan, C.D., Becker, D.F., Alfano, J.R., 2012. *Pseudomonas syringae* Catalases Are Collectively Required for Plant Pathogenesis. *J. Bacteriol.* 194, 5054–64. doi:10.1128/JB.00999-12
- Haas, D., Défago, G., 2005. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 307–319. doi:10.1038/nrmicro1129
- Haas, D., Keel, C., 2003. Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* 41, 117–153. doi:10.1146/annurev.phyto.41.052002.095656
- Haas, D., Keel, C., Laville, J., Maurhofer, M., OberhÄnsli, T., Schnider, U., Voisard, C., Wüthrich, B., Defago, G., 1991. Secondary Metabolites of *Pseudomonas Fluorescens* Strain CHA0 Involved in the Suppression of Root Diseases, in: *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions Vol. 1 SE - 68*. Springer Netherlands, pp. 450–456. doi:10.1007/978-94-015-7934-6\_68
- Han, S.H., Lee, S.J., Moon, J.H., Park, K.H., Yang, K.Y., Cho, B.H., Kim, K.Y., Kim, Y.W., Lee, M.C., Anderson, A.J., Kim, Y.C., 2006. GacS-dependent production of 2R, 3R-butanediol by *Pseudomonas chlororaphis* O6 is a major determinant for eliciting systemic resistance against *Erwinia carotovora* but not against *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* in tobacco. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 19, 924–930. doi:10.1094/MPMI-19-0924
- Hartmann, A., Schikora, A., 2012. Quorum Sensing of Bacteria and Trans-Kingdom Interactions of N-Acyl Homoserine Lactones with Eukaryotes. *J. Chem. Ecol.* 38, 704–713. doi:10.1007/s10886-012-0141-7
- Hernández-León, R., Rojas-Solís, D., Contreras-Pérez, M., Orozco-Mosqueda, M. del C., Macías-Rodríguez, L.I., Reyes-de la Cruz, H., Valencia-Cantero, E., Santoyo, G., 2015.

- Characterization of the antifungal and plant growth-promoting effects of diffusible and volatile organic compounds produced by *Pseudomonas fluorescens* strains. *Biol. Control* 81, 83–92. doi:10.1016/j.biocontrol.2014.11.011
- Hernández-Salmerón, J.E., Hernández-León, R., Orozco-Mosqueda, M.D.C., Valencia-Cantero, E., Moreno-Hagelsieb, G., Santoyo, G., 2016. Draft Genome Sequence of the Biocontrol and Plant Growth-Promoting Rhizobacterium *Pseudomonas fluorescens* strain UM270. *Stand. Genomic Sci.* 11, 1–7. doi:10.1186/s40793-015-0123-9
- Huang, C.J., Tsay, J.F., Chang, S.Y., Yang, H.P., Wu, W.S., Chen, C.Y., 2012. Dimethyl disulfide is an induced systemic resistance elicitor produced by *Bacillus cereus* C1L. *Pest Manag. Sci.* 68, 1306–1310. doi:10.1002/ps.3301
- Huson, D.H., Auch, A.F., Qi, J., Schuster, S.C., 2007. MEGAN analysis of metagenomic data. *Genome Res.* 17, 377–386. doi:10.1101/gr.5969107
- Iavicoli, A., Boutet, E., Buchala, A., Métraux, J.-P., 2003. Induced Systemic Resistance in *Arabidopsis thaliana* in Response to Root Inoculation with *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 16, 851–858.
- Idris, E.E., Iglesias, D.J., Talon, M., Borriss, R., 2007. Tryptophan-dependent Production of Indole-3-acetic Acid (IAA) Affects Level of Plant Growth Promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Mol. Plant-Microbe Interact.* doi:10.1094
- Jung, K., Fried, L., Behr, S., Heermann, R., 2012. Histidine kinases and response regulators in networks. *Curr. Opin. Microbiol.* 15, 118–124. doi:10.1016/j.mib.2011.11.009
- Kai, M., Efmert, U., Berg, G., Piechulla, B., 2007. Volatiles of bacterial antagonists inhibit mycelial growth of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*. *Arch. Microbiol.* 187, 351–360. doi:10.1007/s00203-006-0199-0
- Kakimoto, T., 2003. Perception and signal transduction of cytokinins. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54, 605–627. doi:10.1146/annurev.arplant.54.031902.134802
- Kalia, V.C., 2013. Quorum sensing inhibitors: An overview. *Biotechnol. Adv.* 31, 224–245. doi:10.1016/j.biotechadv.2012.10.004
- Katta, S.K., Jackson, L.S., Sumner, S.S., Hanna, M.A., Bullerman, L.B., 1999. Effect of temperature and screw speed on stability of fumonisin B1 in extrusion-cooked corn grits. *Cereal Chem.* 76, 16–20. doi:10.1094
- Keel, C., 1992. CHA0: Importance of the Bacterial Secondary Metabolite 2,4-

- Diacetylphloroglucinol. *Mol. Plant-Microbe Interact.* doi:10.1094/MPMI-5-004
- Kim, Y., Cho, J.-Y., Kuk, J.-H., Moon, J.-H., Cho, J.-I., Kim, Y.-C., Park, K.-H., 2004. Identification and antimicrobial activity of phenylacetic acid produced by *Bacillus licheniformis* isolated from fermented soybean, *Chungkook-Jang*. *Curr. Microbiol.* 48, 312–7. doi:10.1007/s00284-003-4193-3
- Kloepper, J.W., Leong, J., Teintze, M., Schroth, M.N., 1980. *Pseudomonas* Siderophores : A Mechanism Explaining Disease-Suppressive Soils. *Curr. Microbiol.* 4, 317–320.
- Kloepper, J.W., Schroth, M., 1978. Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. *Proc. 4th Int. Conf. plant Pathog. Bact.*
- Kuiper, I., Lagendijk, E.L., Bloemberg, G. V, Lugtenberg, B.J.J., 2004. Rhizoremediation : A Beneficial Plant-Microbe Interaction Bioremediation : A natural method. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 17, 6–15.
- Laville, J., Blumer, C., Von Schroetter, C., Gaia, V., Défago, G., Keel, C., Haas, D., 1998. Characterization of the hcnABC gene cluster encoding hydrogen cyanide synthase and anaerobic regulation by ANR in the strictly aerobic biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *J. Bacteriol.* 180, 3187–3196.
- Linhartová, I., Bumba, L., Mašín, J., Basler, M., Osička, R., Kamanová, J., Procházková, K., Adkins, I., Hejnová-Holubová, J., Sadílková, L., Morová, J., Sebo, P., 2010. RTX proteins: a highly diverse family secreted by a common mechanism. *FEMS Microbiol. Rev.* 34, 1076–112. doi:10.1111/j.1574-6976.2010.00231.x
- Loper, J.E., Buyer, J.S., 1991. Siderophore in Microbial Interaction on Plant Surface. *Mol. plant- Microbe Interact.*
- Loper, J.E., Hassan, K.A., Mavrodi, D. V, Davis, E.W., Lim, C.K., Shaffer, B.T., Elbourne, L.D.H., Stockwell, V.O., Hartney, S.L., Breakwell, K., Henkels, M.D., Tetu, S.G., Rangel, L.I., Kidarsa, T.A., Wilson, N.L., van de Mortel, J.E., Song, C., Blumhagen, R., Radune, D., Hostetler, J.B., Brinkac, L.M., Durkin, A.S., Kluepfel, D.A., Wechter, W.P., Anderson, A.J., Kim, Y.C., Pierson, L.S., Pierson, E.A., Lindow, S.E., Kobayashi, D.Y., Raaijmakers, J.M., Weller, D.M., Thomashow, L.S., Allen, A.E., Paulsen, I.T., 2012. Comparative genomics of plant-associated *pseudomonas* spp.: Insights into diversity and inheritance of traits involved in multitrophic interactions. *PLoS Genet.* 8, 1–27. doi:10.1371/journal.pgen.1002784
- Lugtenberg, B., Kamilova, F., 2009. Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annu. Rev.*

- Microbiol. 63, 541–56. doi:10.1146/annurev.micro.62.081307.162918
- Martínez-García, P.M., Ruano-Rosa, D., Schilirò, E., Prieto, P., Ramos, C., Rodríguez-Palenzuela, P., Mercado-Blanco, J., 2015. Complete genome sequence of *Pseudomonas fluorescens* strain PICF7, an indigenous root endophyte from olive (*Olea europaea* L.) and effective biocontrol agent against *Verticillium dahliae*. *Stand. Genomic Sci.* 10, 10. doi:10.1186/1944-3277-10-10
- Michelsen, C.F., Stougaard, P., 2012. Hydrogen cyanide synthesis and antifungal activity of the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* In5 from Greenland is highly dependent on growth medium. *Can. J. Microbiol.* 58, 381–390. doi:10.1139/w2012-004
- Miguel, R.N., Barret, M., Morrissey, J.P., Germaine, K., Francisco, M.G., Barahona, E., Navazo, A., Mar??a, S.C., Moynihan, J.A., Giddens, S.R., Coppoolse, E.R., Muriel, C., Stiekema, W.J., Rainey, P.B., Dowling, D., O'gara, F., Mart??n, M., Rivilla, R., 2012. Genome sequence of the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* F113. *J. Bacteriol.* 194, 1273–1274. doi:10.1128/JB.06601-11
- Mulet, M., Lalucat, J., García-Valdés, E., 2010. DNA sequence-based analysis of the *Pseudomonas* species. *Environ. Microbiol.* 12, 1513–1530. doi:10.1111/j.1462-2920.2010.02181.x
- Muyzer G, De Waal E. C, Uitterlinden A. G., 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Env. Microbiol* 59, 695–700.
- Nambeesan, S., AbuQamar, S., Laluk, K., Mattoo, A.K., Mickelbart, M. V, Ferruzzi, M.G., Mengiste, T., Handa, A.K., 2012. Polyamines attenuate ethylene-mediated defense responses to abrogate resistance to *Botrytis cinerea* in tomato. *Plant Physiol.* 158, 1034–45. doi:10.1104/pp.111.188698
- Nawrocki, E.P., Eddy, S.R., 2013. Infernal 1.1: 100-fold faster RNA homology searches. *Bioinformatics* 29, 2933–2935. doi:10.1093/bioinformatics/btt509
- Newell, P.D., Yoshioka, S., Hvorecny, K.L., Monds, R.D., O'Toole, G.A., 2011. Systematic analysis of diguanylate cyclases that promote biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1. *J. Bacteriol.* 193, 4685–4698. doi:10.1128/JB.05483-11
- Ortíz-Castro, R., Contreras-Cornejo, H.A., Macías-Rodríguez, L., López-Bucio, J., 2009. The role of microbial signals in plant growth and development. *Plant Signal. Behav.* 4, 701–712. doi:10.4161/psb.4.8.9047

- Ortíz-Castro, R., Valencia-Cantero, E., López-Bucio, J., 2008. Plant growth promotion by *Bacillus megaterium* involves cytokinin signaling. *Plant Signal. Behav.* 3, 263–265. doi:10.4161/psb.3.4.5204
- Ozer, E.A., Allen, J.P., Hauser, A.R., 2014. Characterization of the core and accessory genomes of *Pseudomonas aeruginosa* using bioinformatic tools Spine and AGEnt. *BMC Genomics* 15, 1–7. doi:10.1186/1471-2164-15-737
- Park, Y.-S., Jeong, H., Sim, Y., Yi, H.-Y., Ryu, C.-M., 2014. Genome Sequence and Comparative Genome Analysis of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Type Strain ATCC 19310. *J. Microbiol. Biotechnol.* 24, 563–567.
- Parsons, J.F., Calabrese, K., Eisenstein, E., Ladner, J.E., 2003. Structure and mechanism of *Pseudomonas aeruginosa* PhzD, an isochorismatase from the phenazine biosynthetic pathway. *Biochemistry* 42, 5684–93. doi:10.1021/bi027385d
- Patten, C.L., Glick, B.R., 2002. Role of *Pseudomonas putida* Indoleacetic Acid in Development of the Host Plant Root System Role of *Pseudomonas putida* Indoleacetic Acid in Development of the Host Plant Root System. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 3795–3801. doi:10.1128/AEM.68.8.3795
- Ping, L., Boland, W., 2004. Signals from the underground: Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci.* 9, 263–266. doi:10.1016/j.tplants.2004.04.008
- Raaijmakers, J.M., Weller, D.M., Thomashow, L.S., 1997. Frequency of antibiotic-producing *Pseudomonas* spp. in natural environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 881–887.
- Ramette, A., Frapolli, M., Saux, M.F. Le, Gruffaz, C., Meyer, J.M., Défago, G., Sutra, L., Moënne-Loccoz, Y., 2011. *Pseudomonas protegens* sp. nov., widespread plant-protecting bacteria producing the biocontrol compounds 2,4-diacetylphloroglucinol and pyoluteorin. *Syst. Appl. Microbiol.* 34, 180–188. doi:10.1016/j.syapm.2010.10.005
- Randviir, E.P., Banks, C.E., 2015. The latest developments in quantifying cyanide and hydrogen cyanide. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 64, 75–85. doi:10.1016/j.trac.2014.08.009
- Redondo-Nieto, M., Barret, M., Morrissey, J., Germaine, K., Martínez-Granero, F., Barahona, E., Navazo, A., Sánchez-Contreras, M., Moynihan, J.A., Muriel, C., Dowling, D., O’Gara, F., Martín, M., Rivilla, R., 2013. Genome sequence reveals that *Pseudomonas fluorescens* F113 possesses a large and diverse array of systems for rhizosphere function and host interaction. *BMC Genomics* 14, 1–17. doi:10.1186/1471-

2164-14-54

- Rocchetta, H.L., Burrows, L.L., Lam, J.S., 1999. Genetics of O-antigen biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63, 523–53.
- Rojas-Solís, D., Hernández-Pacheco, C.E., Santoyo, G., 2016. Evaluation of *Bacillus* and *Pseudomonas* to colonize the rhizosphere and their effect on growth promotion in tomato (*Physalis ixocarpa* Brot. ex Horm.). *Rev. Chapingo Ser. Hortic.* XXII, 45–57. doi:10.5154/r.rchsh.2015.06.009
- Ryu, C.-M., Farag, M.A., Hu, C.-H., Reddy, M.S., Wei, H.-X., Paré, P.W., Kloepper, J.W., 2003. Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 4927–32. doi:10.1073/pnas.0730845100
- Santoyo, G., Moreno-Hagelsieb, G., Orozco-Mosqueda, M. del C., Glick, B.R., 2015. Plant Growth-Promoting Bacterial Endophytes. *Microbiol. Res.* 183, 92–99. doi:10.1016/j.micres.2015.11.008
- Santoyo, G., Orozco-Mosqueda, C.M. del, Govindappa, M., 2012. Mechanisms of biocontrol and plant growth-promoting activity in soil bacterial species of *Bacillus* and *Pseudomonas* : a review. *Biocontrol Sci. Technol.* 22, 855–872. doi:10.1080/09583157.2012.694413
- Santoyo, G., Valencia-Cantero, E., Orozco-Mosqueda, M.C., Farias-Rodriguez, Rodolfo Peña-Cabriales, J.J., 2010. PAPEL DE LOS SIDEROFOROS EN LA ACTIVIDAD ANTAGONICA DE *Pseudomonas fluorescens* ZUM80 HACIA HONGOS FITOPATÓGENOS. *Terra Latinoam.* 28, 53–60.
- Silby, M.W., Cerdeño-Tárraga, A.M., Vernikos, G.S., Giddens, S.R., Jackson, R.W., Preston, G.M., Zhang, X.-X., Moon, C.D., Gehrig, S.M., Godfrey, S.A.C., Knight, C.G., Malone, J.G., Robinson, Z., Spiers, A.J., Harris, S., Challis, G.L., Yaxley, A.M., Harris, D., Seeger, K., Murphy, L., Rutter, S., Squares, R., Quail, M.A., Saunders, E., Mavromatis, K., Brettin, T.S., Bentley, S.D., Hothersall, J., Stephens, E., Thomas, C.M., Parkhill, J., Levy, S.B., Rainey, P.B., Thomson, N.R., 2009. Genomic and genetic analyses of diversity and plant interactions of *Pseudomonas fluorescens*. *Genome Biol.* 10, 1–16. doi:10.1186/gb-2009-10-5-r51
- Silver, R.P., Prior, K., Nsahlai, C., Wright, L.F., 2001. ABC transporters and the export of capsular polysaccharides from Gram-negative bacteria. *Res. Microbiol.* 152, 357–364. doi:10.1016/S0923-2508(01)01207-4

- Spaepen, S., Vanderleyden, J., 2011. Auxin and Plant-Microbe Interactions. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3, a001438–a001438. doi:10.1101/cshperspect.a001438
- Stabb, E. V, Reich, K.A., Ruby, E.G., 2001. *Vibrio fischeri* genes *hvnA* and *hvnB* encode secreted NAD(+)-glycohydrolases. *J. Bacteriol.* 183, 309–17. doi:10.1128/JB.183.1.309-317.2001
- Taguchi, F., Ogawa, Y., Takeuchi, K., Suzuki, T., Toyoda, K., Shiraishi, T., Ichinose, Y., 2006. A homologue of the 3-oxoacyl-(acyl carrier protein) synthase III gene located in the glycosylation island of *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* regulates virulence factors via N-acyl homoserine lactone and fatty acid synthesis. *J. Bacteriol.* 188, 8376–8384. doi:10.1128/JB.00763-06
- Teresa, F.M., Rodríguez, H., 2005. El papel de solubilización de fósforo en los fertilizantes microbianos. *Red Rev. Científicas América Lat. el Caribe, España y Port.* XXXIX, 27–34.
- Toyoda, H., Hashimoto, H., Utsumi, R., H, K., Ouchi, S., 1988. Detoxification of Fusaric Acid by a Fusaric Acid-Resistant Mutant of *Pseudomonas solanacearum* and its Application to Biological Control of Fusarium Wilt of Tomato.pdf. *Dis. Control Pest Manag.* 78, 1307–1311.
- Udaondo, Z., Molina, L., Segura, A., Duque, E., Ramos, J.L., 2015. Analysis of the core genome and pangenome of *Pseudomonas putida*. *Environ. Microbiol.* 1–16. doi:10.1111/1462-2920.13015
- Validov, S., Mavrodi, O., De La Fuente, L., Boronin, A., Weller, D., Thomashow, L., Mavrodi, D., 2005. Antagonistic activity among 2,4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* spp. *FEMS Microbiol. Lett.* 242, 249–256. doi:10.1016/j.femsle.2004.11.013
- Velázquez-Becerra, C., Macías-Rodríguez, L.I., López-Bucio, J., Altamirano-Hernández, J., Flores-Cortez, I., Valencia-Cantero, E., 2011. A volatile organic compound analysis from *Arthrobacter agilis* identifies dimethylhexadecylamine, an amino-containing lipid modulating bacterial growth and *Medicago sativa* morphogenesis in vitro. *Plant Soil* 339, 329–340. doi:10.1007/s11104-010-0583-z
- Vespermann, A., Kai, M., Piechulla, B., 2007. Rhizobacterial volatiles affect the growth of fungi and *Arabidopsis thaliana*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 5639–5641. doi:10.1128/AEM.01078-07

- Voisard, C., Keel, C., Haas, D., Defago, G., 1989. Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* helps suppress black root rot of tobacco under gnotobiotic conditions. *EMBO J.* 8, 351–358. doi:10.1111/j.1574-6941.1997.tb00394.x
- Walsh, U.F., Morrissey, J.P., O’Gara, F., 2001. *Pseudomonas* for biocontrol of phytopathogens: From functional genomics to commercial exploitation. *Curr. Opin. Biotechnol.* doi:10.1016/S0958-1669(00)00212-3
- Ward, N., Moreno-Hagelsieb, G., 2014. Quickly finding orthologs as reciprocal best hits with BLAT, LAST, and UBLAST: How much do we miss? *PLoS One* 9, 1–6. doi:10.1371/journal.pone.0101850
- Weinhold, A.R., Bowman, T., 1968. Selective inhibition of the potato scab pathogen by antagonistic bacteria and substrate influence on antibiotic production. *Plant Soil* 28, 12–24. doi:10.1007/BF01349174
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., Lane, D.J., 1991. 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. *J. Bacteriol.* 173, 697–703.
- Weller, D.M., 2007. *Pseudomonas* biocontrol agents of soilborne pathogens: looking back over 30 years. *Phytopathology* 97, 250–256. doi:10.1094/PHYTO-97-2-0250
- Weller, D.M., Raaijmakers, J.M., Gardener, B.B.M., Thomashow, L.S., 2002. MICROBIAL POPULATIONS RESPONSIBLE FOR SPECIFIC SOIL SUPPRESSIVENESS TO PLANT PATHOGENS. *Annu. Rev. Phytopathol.* 40, 309–348. doi:10.1146/annurev.phyto.40.030402.110010
- Whipps, J.M., 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.* 52, 487–511. doi:10.1093/jexbot/52.suppl\_1.487
- Whitfield, C., Trent, M.S., 2014. Biosynthesis and Export of Bacterial Lipopolysaccharides. *Annu. Rev. Biochem.* 83, 99–128. doi:10.1146/annurev-biochem-060713-035600
- Wightman, F., Lighty, D.L., 1982. Identification of phenylacetic acid as a natural auxin in the shoots of higher plants. *Physiol. Plant.* 55, 17–24. doi:10.1111/j.1399-3054.1982.tb00278.x
- Wood, R.K.S., Tveit, M., 1955. Control of plant diseases by use of antagonistic organisms. *Bot. Rev.* 21, 441–492. doi:10.1007/BF02872441
- Xiao, Z., Xu, P., 2007. Acetoin metabolism in bacteria. *Crit. Rev. Microbiol.* 33, 127–40. doi:10.1080/10408410701364604

- Xu, K., Yuan, Z., Rayner, S., Hu, X., 2015. Genome comparison provides molecular insights into the phylogeny of the reassigned new genus *Lysinibacillus*. *BMC Genomics* 16, 1–12. doi:10.1186/s12864-015-1359-x
- Yamaguchi, Y., Park, J.-H., Inouye, M., 2011. Toxin-Antitoxin Systems in Bacteria and Archaea. *Annu. Rev. Genet.* 45, 61–79. doi:10.1146/annurev-genet-110410-132412
- Yang, F., Cao, Y., 2012. Biosynthesis of phloroglucinol compounds in microorganisms — review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93, 487–495. doi:10.1007/s00253-011-3712-6