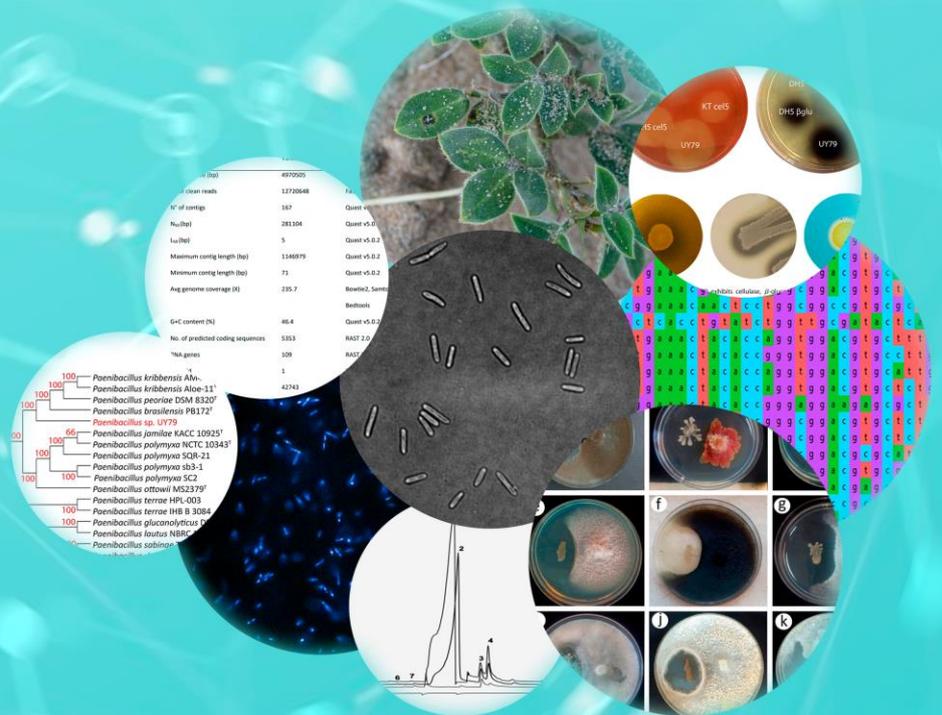


## Tesina de grado

## Licenciatura en Ciencias Biológicas

# Caracterización de una cepa de *Paenibacillus* aislada de nódulo de *Arachis villosa* con potencial como agente de control biológico frente a fitopatógenos

Bach. Andrés Costa



Orientadora: Dra. Vanesa Amarelle

Departamento de Bioquímica y Genómica Microbianas

Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

## Tabla de contenido

RESUMEN .....	7
INTRODUCCIÓN .....	8
La raíz y su entorno: rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) .....	8
Mecanismos de promoción de crecimiento vegetal (PGP) indirectos: Agentes de Control Biológico (ACB) .....	10
Hiperparasitismo .....	11
Depredación .....	12
Competencia .....	12
Resistencia sistémica inducida .....	13
Producción de enzimas hidrolíticas.....	13
Producción de sideróforos .....	14
Producción de antibióticos y compuestos volátiles .....	14
Mecanismos PGP directos.....	15
Solubilización de fósforo .....	15
Producción de sideróforos .....	16
Producción de fitohormonas.....	17
Fijación de nitrógeno.....	18
ANTECEDENTES .....	20
OBJETIVO .....	20
Objetivo General .....	20
Objetivos específicos.....	20
MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
Actividad antagonista mediada por compuestos difusibles producidos en medio sólido.....	21
Evaluación de actividad antagonista mediada por compuestos difusibles producidos en medio líquido .....	23
Actividad antagonista mediada por compuestos volátiles .....	24
Producción de cianuro de hidrógeno (HCN) .....	25
Análisis del volatiloma.....	26
Producción de enzimas hidrolíticas.....	27
Actividad celulasa y xilanasa .....	27

Actividad $\beta$ -glucosidasa.....	27
Actividad proteasa.....	28
Evaluación de posibles mecanismos directos de promoción del crecimiento vegetal .....	28
Fijación biológica de N <sub>2</sub> .....	28
Producción de Ácido Indol Acético (AIA).....	28
Solubilización de fosfatos.....	29
Producción de sideróforos .....	29
Efecto de la cepa UY79 en el crecimiento vegetal y en el establecimiento de la simbiosis rizobio-leguminosa.....	30
Afiliación taxonómica.....	30
Secuenciación, ensamblado, anotación y análisis del genoma de la cepa UY79 .....	31
Análisis multilocus e identidad nucleotídica promedio .....	32
RESULTADOS La cepa UY79 es capaz de antagonizar un amplio espectro de hongos y Oomycetes mediante la producción de compuestos difusibles .....	33
La cepa UY79 produce compuestos volátiles con actividad antagonista frente a hongos y Oomycetes .....	36
Análisis del volatiloma producido por la cepa UY79 .....	37
La cepa UY79 produce enzimas que podrían estar involucradas en su capacidad antagonista .....	39
Las principales características directas de promoción del crecimiento vegetal no están presentes en la cepa UY79 .....	40
La cepa UY79 no afecta el establecimiento de la simbiosis ni la promoción de crecimiento de alfalfa ( <i>Medicago sativa</i> cv. Crioula) ejercida por rizobios .....	41
Identificación, ensamblaje y anotación del genoma de la cepa UY79.....	42
La cepa UY79 presenta en su genoma un repertorio de genes que podrían estar involucrados en el antagonismo observado.....	45
Discusión .....	52
Bibliografía .....	58
Anexo .....	77
Medios de cultivo.....	77
PDA (Difco™).....	77
PDB (Difco™) .....	77
TSA (Difco™).....	77
TSB (Difco™).....	77
NBRIP.....	77
PVK .....	78
CAS .....	78

Reactivos .....	79
Reactivo de Salkowski .....	79
Condiciones y mix utilizados para las PCR.....	79
<i>nifH</i> .....	79
<i>ARNr 16S</i> .....	79
Secuencias.....	80
Figuras suplementarias .....	82

## AGRADECIMIENTOS

Primeramente, agradecerle a Elena Fabiano, quien me abrió las puertas del laboratorio y a este fascinante mundo. Su invaluable experiencia, paciencia y apoyo constante han sido fundamentales para mi formación y para consolidar mi pasión, aprendiendo lo necesario para ejercer este oficio.

A Vanesa Amarelle, quien, además de agradecerle por aceptar llevar adelante mi tutoría, ha sido, junto a Elena, otro pilar fundamental en mi formación, dejando su impronta en mi forma de hacer ciencia.

Durante años, hemos compartido mañanas, tardes y noches de trabajo, tanto en el laboratorio como en el campo, y siempre encontré en ellas grandes compañeras, tanto en lo profesional como en lo humano. De verdad les agradezco muchísimo por todo lo que hemos vivido y aprendido juntos, así como por la confianza que siempre pusieron en mí. Son mis grandes mentoras y amigas.

También agradezco a Raúl Platero y Federico Battistoni, que siempre han estado para dar una mano, gracias por confiar en mí y por las oportunidades que me han brindado a lo largo de estos años trabajando juntos. También por esas discusiones que se dan en torno a esto de hacer ciencia, que son apasionantes y sumamente enriquecedoras.

Al resto de los compañeros de BIOGEM, con quienes compartimos incontables momentos y que, de alguna forma, han aportado e influido en la realización y escritura de esta tesis.

A Dinorah Pan, Susana Tiscornia y Belén Corallo, de la Sección Micología de la Facultad de Ciencias y la Facultad de Ingeniería (UdelaR), por abrirme sus puertas para aprender y realizar parte de este trabajo, por las horas compartidas y por el lindo grupo de trabajo que se ha formado. En especial a mi amiga Belén, que siempre está dispuesta a dar una mano con la mejor energía.

A mis amigos del piso 8 (Sección Entomología, Facultad de Ciencias, UdelaR), quienes siempre me han recibido con las puertas abiertas y me han dado lugar para desarrollar actividades que me motivan profundamente. En especial, a Damián Hagopián, Miguel Simó, Víctor Pacheco y Estrellita Lorier, en quienes siempre he encontrado apoyo y consejos sinceros.

A Matilde, mi pareja; a mis suegros, Gonzalo y Analía; y a mi cuñado Manuel, quienes siempre me han dado apoyo incondicional y me han mostrado el lado positivo en tiempos de oscuridad. Gracias por hacerme parte de su familia.

A mis compañeros de facultad, que han sido muchos durante todos estos años, desde quienes arrancamos juntos hasta quienes hemos coincidido en el trayecto final de este camino. Todos han sido sumamente importantes para poder sobrellevar y superar las adversidades que se han presentado.

Por último, a mis perritos Polo, Kala y Arakis (Pirulito), que han sido un cable a tierra y motivo para seguir adelante siempre, por esos amorosos recibimientos luego de largas jornadas laborales.

Me quedan muchos nombres en el tintero, pero este agradecimiento está siendo escrito a contrarreloj.

¡Gracias a todos los que han sido parte de este camino!

..."Hay que sembrar mucho.... Toda semilla no germina; ni todo lo que germina florece:

ni todo lo que florece da frutos: ni todo fruto madura; ni todo lo que madura es bueno....

Sembremos con ordenado ritmo y sembremos como el viento.

El viento siembra más allá de todos los surcos,  
más allá de toda tierra labrantía,  
más allá de todo regadío.

No siempre se sabe dónde cae la simiente,  
pero la tierra se pone verde....

Es el verde nuevo que amanece a la nueva luz del tiempo.

El entusiasmo es el viento de nuestras almas y  
siembra pródigamente todo lo que hay en las almas..."

Clemente Estable

## RESUMEN

Una remarcable característica de las leguminosas es su capacidad de establecer asociaciones simbióticas con un grupo de bacterias conocidas como rizobios, pertenecientes a los órdenes Rhizobiales y Burkholderiales. Como parte de esta simbiosis, estructuras distintivas, llamadas nódulos, son producidas en la raíz (u ocasionalmente en los tallos) de las leguminosas, donde el proceso de fijación biológica de nitrógeno tiene lugar.

Durante muchos años, se consideró que los nódulos de leguminosas estaban exclusivamente ocupados por rizobios, pero con el avance de las técnicas moleculares y su reducción en costos, se ha demostrado que los nódulos radiculares también albergan una comunidad diversa de microorganismos. Los principales filos bacterianos que se han encontrado consistentemente como cohabitantes de los nódulos incluyen *Actinobacteria*, *Firmicutes* y *Proteobacteria*, particularmente los géneros *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Bosea*, *Enterobacter*, *Micromonospora*, *Mycobacterium*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas* y *Stenotrophomonas*. Si bien el papel de estos cohabitantes de los nódulos es desconocido, se ha observado que algunas cepas poseen actividad de biocontrol contra fitopatógenos, convirtiendo a los nódulos en un nicho interesante y aún poco explorado para la prospección de cepas con actividad biocontroladora.

En un trabajo previo de nuestro grupo se realizó un relevamiento de la diversidad de endosimbiontes de leguminosas presentes en el Parque Nacional Esteros de Farrapos e Islas del Río Uruguay. A partir de un nódulo radicular de maní nativo (*Arachis villosa*) se aisló, además de rizobios del género *Bradyrhizobium*, una cepa cuyo fenotipo de colonia no coincidía con el de *Bradyrhizobium*. La cepa, a la que denominamos UY79, se identificó mediante amplificación, secuenciación y análisis del gen que codifica para el ARNr 16S, resultando pertenecer al género *Paenibacillus*. Este género está reportado como un habitante común en la comunidad bacteriana de los nódulos radiculares. Por otro lado, varias especies de *Paenibacillus* son capaces de antagonizar hongos y oomycetes fitopatógenos, siendo utilizadas como agentes de control biológico en productos comerciales. Además, se ha reportado que muchas especies del género son promotoras directas del crecimiento vegetal.

Considerando estos antecedentes, en este trabajo nos propusimos determinar si la cepa *Paenibacillus* sp. UY79 tiene potencial como agente de control biológico. Con esta finalidad se evaluó la capacidad antagonista de la cepa UY79 frente a diversos hongos y Oomycetes. Los resultados obtenidos muestran que la cepa tiene un amplio rango de antagonismo siendo capaz de antagonizar a 10 hongos y 2 Oomycetes distintos, actividad ejercida por la producción de compuestos difusibles y compuestos volátiles. Mediante GC/MS identificamos los compuestos volátiles producidos por la cepa UY79, siendo la acetoina, 2,3-butanediol, y 2-methyl-1-butanol posibles candidatos responsables de la actividad antagonista observada. También se evaluó la producción de enzimas hidrolíticas que han sido reportadas como mecanismos de control biológico. Constatamos que la cepa UY79 produce una batería de enzimas hidrolíticas que incluye actividad celulasa,  $\beta$ -glucosidasa, xilanasa y proteasa. Además, es capaz de producir sideróforos, otro posible mecanismo de control biológico de fitopatógenos mediado por competencia por hierro.

Se evaluaron características involucradas en la promoción directa del crecimiento vegetal, resultando la cepa UY79 incapaz de solubilizar fosfato y de producir ácido indolacético en ensayos llevados a cabo *in vitro*. Además, no detectamos la presencia del gen *nifH* implicado en

la fijación biológica del nitrógeno, y la inoculación de plantas de alfalfa con la cepa UY79 no produjo una promoción del crecimiento vegetal.

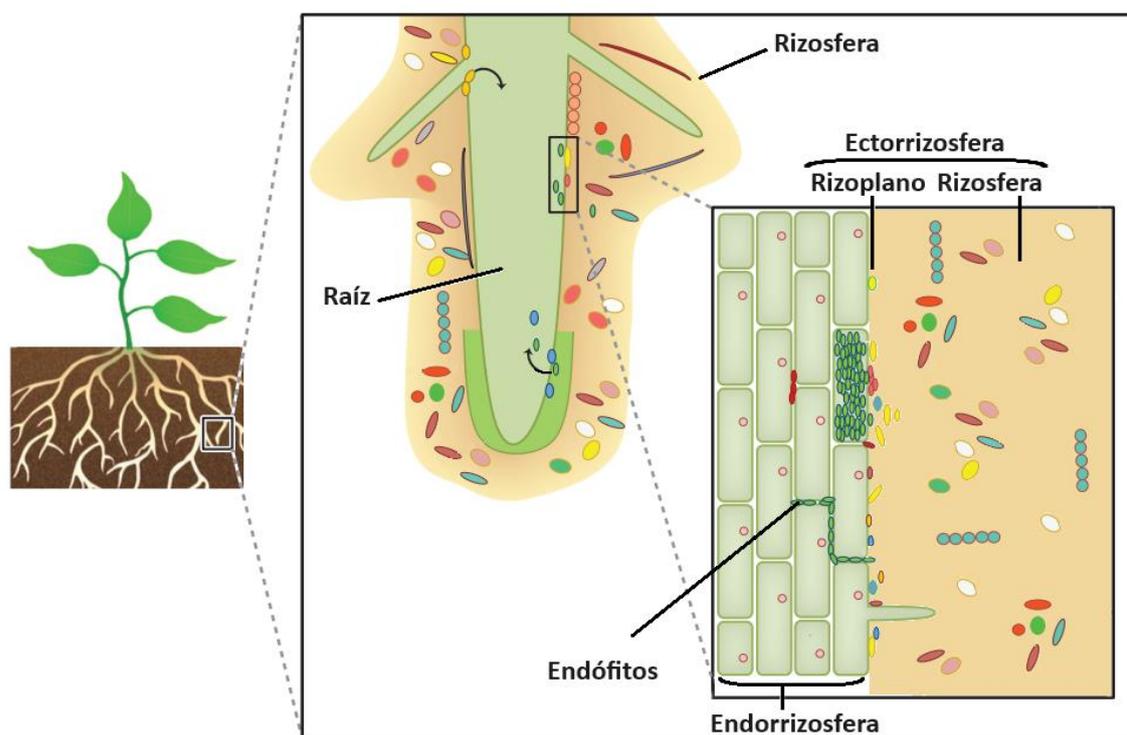
Mediante análisis filogenéticos determinamos que la cepa *Paenibacillus* sp. UY79 forma parte del complejo *Paenibacillus polymyxa* integrado por *Paenibacillus kribbensis*, *Paenibacillus peoriae*, *Paenibacillus ottowii*, *Paenibacillus terrae*, *Paenibacillus brasilensis* y *Paenibacillus polymyxa*. Tras secuenciar y anotar el genoma de la cepa UY79 se obtuvo un 'draft genome' con una cobertura promedio de 235,7x, un tamaño de 4,9 Mb y un contenido de GC del 46,4% repartidos en 167 contigs, conteniendo 5353 secuencias codificantes. El análisis del genoma entero determinó que la cepa UY79 es una nueva especie de *Paenibacillus*. Mediante minería del genoma identificamos diversos genes que podrían estar involucrados en la actividad biocontroladora (celulasas, beta-glucosidasas, xilanasas, quitinasas, proteasas, sideróforos, y otros compuestos), así como posibles genes involucrados en la síntesis de los compuestos volátiles identificados por GC/MS. No se encontraron ortólogos a genes involucrados en la fijación biológica de nitrógeno (*nifH*, *anfH*, *vnfH*), ni genes vinculados a la producción de auxinas.

En conclusión, identificamos una nueva especie de *Paenibacillus* endófito de nódulo que pertenece al grupo de *P. polymyxa*. El amplio espectro de su efecto antagonista, junto con la diversidad de mecanismos posiblemente involucrados, hace de la cepa UY79 un promisorio agente de control biológico contra fitopatógenos.

## INTRODUCCIÓN

### La raíz y su entorno: rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR)

Las plantas, a través de sus raíces, se relacionan con una gran variedad de microorganismos presentes en los suelos, siendo éste el principal reservorio de la microbiota de la planta (1). Se definen distintos microhábitats en la interfase planta-suelo donde se puede dar la interacción planta-microorganismo (Fig. 1). A la estrecha zona del suelo que rodea al sistema radicular, y que está directamente influenciada por éste y sus exudados, se le denomina rizosfera, mientras que a la superficie de las raíces, rica en nutrientes y a la cual se adhieren microorganismos, se le denomina rizoplano. La rizosfera en conjunto con el rizoplano constituyen la ectorrizosfera. Por otro lado, encontramos la endorrizosfera que refiere a los tejidos internos de la raíz colonizados por microorganismos a los que se denomina endófitos, los cuales colonizan el interior de plantas sanas sin causar daño aparente a la misma.



**Figura 1. La raíz y su entorno inmediato.** Esquema representativo de la raíz y los microhábitats existentes en la interfase planta-suelo. Se muestra primer plano de la raíz y la rizosfera, con zoom en los microhábitats donde ocurre la interacción planta-microorganismo. Se muestra la ectorrizosfera (rizoplasma + rizosfera), la endorrizosfera, y microorganismos asociados. Modificado de Reinhold-Hurek y colaboradores (2)

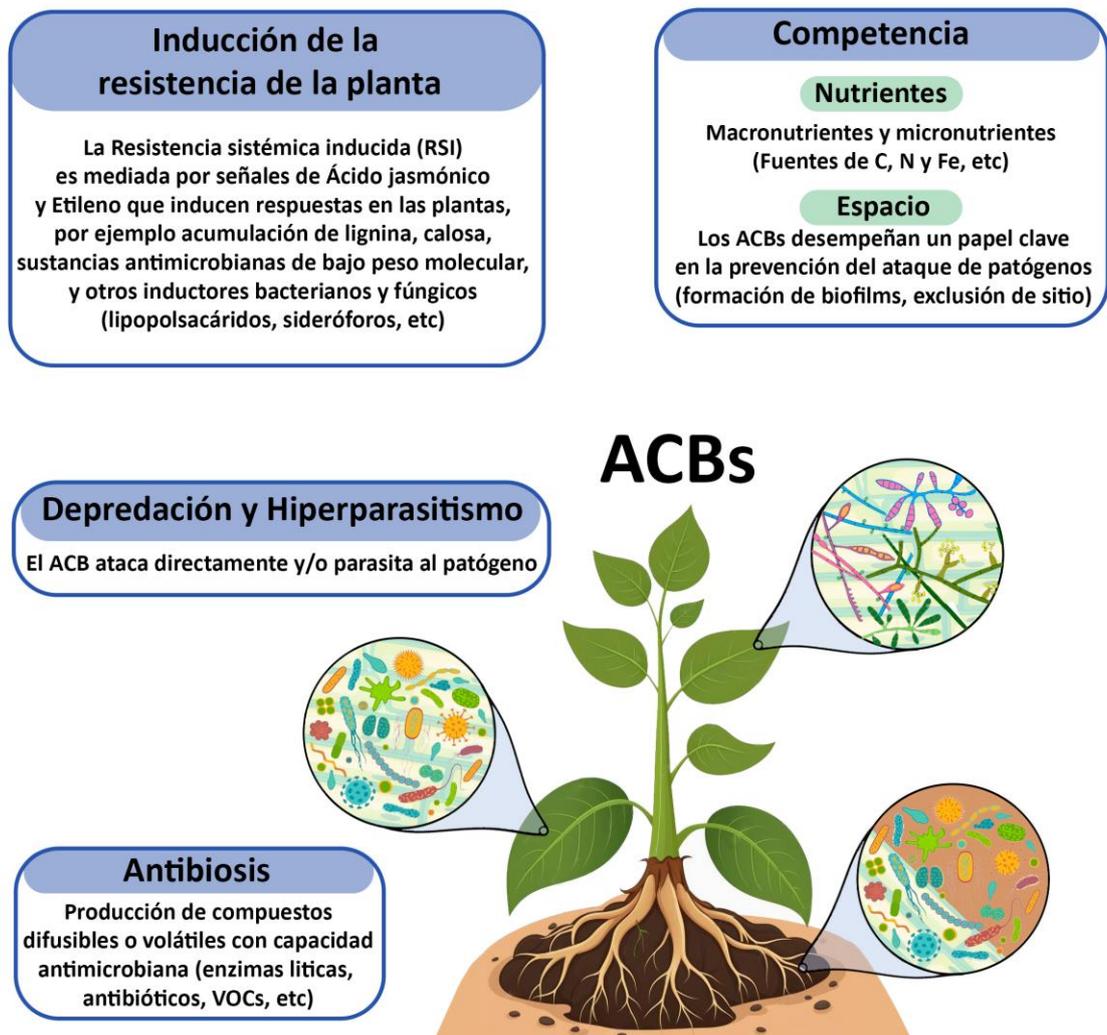
La rizosfera alberga una considerable cantidad de células microbianas, llegando hasta  $10^{11}$  células por gramo de suelo (3), lo que significa entre 10 y 100 veces más cantidad que en el suelo propiamente (4). Esta gran abundancia de microorganismos en la rizosfera se debe a la presencia de una diversa variedad de compuestos secretados por las raíces de las plantas (5), denominados exudados radiculares. Estos exudados son capaces de modificar las propiedades fisicoquímicas del suelo regulando así la estructura de la comunidad microbiana en la rizosfera (6). Algunos de estos exudados actúan como atrayentes químicos mientras que otros ejercen un efecto repelente para ciertos grupos de microorganismos. La composición de estos exudados depende del estado fisiológico y de la especie vegetal en sí (7).

A aquellas bacterias que se asocian a las raíces de la planta se las denomina rizobacterias, y pueden tener un efecto tanto benéfico, neutral, o perjudicial en el crecimiento de las mismas. Para las rizobacterias benéficas se ha acuñado el término “rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal” (o PGPR por sus siglas en inglés, Plant Growth Promoter Rhizobacteria) utilizado por primera vez en la década de 1970 por Joseph W. Kloepper. En general, la capacidad de colonización de la rizosfera es una de las características más importantes que determinan la supervivencia y la propagación de las PGPR, que a su vez son prerequisites para poder ejercer su efecto benéfico en la planta (8). Algunas PGPR son capaces de colonizar el rizoplasma y posteriormente la endorrizosfera, estableciéndose como endófitos. La colonización se da de forma pasiva a través de heridas que se producen por el crecimiento de las raíces laterales,

estomas y lenticelas, o activamente a través de la liberación de enzimas como celulasas, pectinasas, xilanasas y endoglucanas. Estas enzimas provocan la hidrólisis de la pared celular de la planta permitiendo la entrada de las bacterias y su dispersión en los tejidos internos (9). Como endófitos, estas PGPR pueden ejercer un efecto promotor del crecimiento (10). En este nicho la bacteria se encuentra protegida respecto de la rizosfera obteniendo como beneficio una alta disponibilidad de nutrientes, baja competencia, y protección contra el estrés ambiental (11). Se han reportado diversos mecanismos de promoción del crecimiento presentes en las PGPR y se pueden clasificar en mecanismos indirectos o directos. Los mecanismos directos de promoción del crecimiento vegetal son por ejemplo la fijación biológica del nitrógeno atmosférico, producción de sideróforos, solubilización de minerales como el fósforo y síntesis de fitohormonas. Dentro de los mecanismos indirectos de promoción del crecimiento vegetal se encuentra el control biológico, mediante el cual las PGPR reducen el efecto perjudicial causado por fitopatógenos (12).

## Mecanismos de promoción de crecimiento vegetal (PGP) indirectos: Agentes de Control Biológico (ACB)

Se ha estimado que las pérdidas de cultivos debido a enfermedades fúngicas están cerca del 30% de la producción agrícola mundial (13). En trabajos recientes se ha destacado la importancia de un equilibrio adecuado entre microorganismos benéficos y patogénicos para garantizar la salud de las plantas. En ambientes saludables, se pueden encontrar diversos microorganismos capaces de suprimir fitopatógenos, ya sea fortaleciendo el sistema inmunológico de la planta o mediante la inhibición directa del patógeno (14). Los microorganismos con la capacidad de controlar el desarrollo de fitopatógenos pertenecen al grupo de los agentes de control biológico (ACB) definidos como “enemigos naturales, antagonistas, u otro organismo, usado para el control de plagas” (ISPM 05; International Standards for Phytosanitary Measures) (15), y actúan de forma indirecta en la promoción del crecimiento vegetal. Los ACB son constituyentes ubicuos del suelo y de la microbiota asociada a las plantas, encontrándose en la rizósfera o como endófitos de raíces, tallos, hojas, nódulos de leguminosas, y flores de diversos géneros de plantas (16–18). Se han descrito varios mecanismos involucrados en el control biológico de fitopatógenos, que van desde el hiperparasitismo y la depredación, ocupando el tipo más directo de antagonismo donde se requiere un contacto directo entre el biocontrolador y el fitopatógeno, hasta la estimulación de las vías de defensa de la planta como el caso más indirecto de antagonismo (Fig. 2). A continuación, se detallan algunos de los mecanismos reportados para los ACB.



**Figura 2. Principales mecanismos de acción de los agentes de control biológico (ACB).** Los agentes de control biológico son ubicuos siendo encontrados con frecuencia en suelo rizosférico y en compartimentos de la planta como nódulos, raíz, tallos, hojas, etc. Los ABC presentan una amplia gama de mecanismos por los cuales pueden ejercer su efecto controlador ya sea de forma directa (parasitismo, depredación, hiperparasitismo, competencia por nicho, por nutrientes, producción de antimicrobianos difusibles y volátiles, enzimas líticas entre otros) o indirecta (inducción de la resistencia sistémica de la planta). Imagen generada en este trabajo inspirada en Palmieri y colaboradores (19).

### Hiperparasitismo

El hiperparasitismo se trata del fenómeno donde un parásito se encuentra parasitado por otro, y ocurre comúnmente en la naturaleza, principalmente de dos formas: i) hiperparasitismo obligado, donde los organismos parásitos se especializan en infectar a otros parásitos; ii) hiperparasitismo facultativo, donde un parásito generalista tiene entre su rango de organismos hospederos algún parásito. El hiperparasitismo es frecuente en la vida microbiana ya que el pequeño tamaño de estos organismos les permite ocupar hospederos parásitos tanto microbianos como multicelulares (20). En el contexto de los ACB, hiperparasitismo frecuentemente refiere al evento donde un hongo infecta el micelio de otro hongo patógeno mediante estructuras especializadas (apresorios) liberando enzimas líticas que degradan la

pared celular causando un efecto negativo sobre el crecimiento del patógeno (21). *Trichoderma* es un género de hongos reconocido por su potencial como ACB, siendo el hiperparasitismo uno de sus principales mecanismos de acción frente a hongos fitopatógenos. Para el caso en el que un hongo parasita a otro hongo, el término utilizado es mycoparasitismo (22). Existen reportes de hiperparasitismo ejercido por cepas bacterianas del género *Streptomyces* spp. sobre hongos fitopatógenos como *Alternaria brassicicola*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Mycocentrospora acerina*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Phomopsis sclerotioides* y *Pythium ultimum* (23,24).

## Depredación

Si bien el término depredador se utiliza con frecuencia para referirse a animales alimentándose de animales en el mundo macroscópico, también se utiliza en el mundo microscópico para referirse a protistas, nematodos, microartrópodos, hongos y bacterias capaces de atacar y matar a otros microbios para consumirlos como sustento (25). Estos depredadores microscópicos influyen en el modelado de las comunidades microbianas y en la evolución de las poblaciones presas (26,27). Las estrategias de depredación bacteriana se han clasificado en 2 categorías basadas en cómo los depredadores interactúan con la presa: estrategias endobióticas (invasión directa) y epibióticas (28). En la estrategia endobiótica los depredadores penetran en el periplasma o citoplasma de las células de su presa para consumir macromoléculas intracelulares como nutrientes. El ciclo de vida típico de estos depredadores endobióticos implica una fase de ataque en la que nadan o se deslizan de forma libre para encontrar y penetrar en la presa, seguida de una fase de crecimiento interno (consumo de nutrientes) antes de que la progenie escape de la presa ya agotada (29). La estrategia de los depredadores epibióticos consiste en lisar a la presa y consumir sus macromoléculas de forma externa. La depredación epibiótica puede ser en forma solitaria o bajo un ataque grupal. *Bdellovibrionota* y *Myxococcota* son los filos bacterianos (filos recientemente propuestos) que agrupan la mayor diversidad de bacterias depredadoras (30). Debido a la necesidad de generar soluciones de manejo sostenibles del medio ambiente se ha investigado el potencial uso de estas bacterias depredadoras como ACB, siendo *Coralloccoccus* sp. EGB un ejemplo efectivo de ello, logrando controlar la marchitez causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* en plantas de *Cucumis sativus* L. (pepino) (31).

## Competencia

La competencia refiere a la interacción entre individuos de la misma o diferentes especies (competencia intraespecífica e interespecífica) que disputan por recursos en un mismo hábitat. Los nutrientes como el carbono, nitrógeno, fósforo, hierro y vitaminas, junto con el espacio físico, son ejemplos de recursos por los cuales los organismos compiten. El acceso a estos recursos es determinante para el crecimiento, la reproducción, y la supervivencia de los organismos, influyendo de forma directa en su distribución y abundancia en los ecosistemas (32). En el contexto del control biológico, los ACB son utilizados para restringir a los fitopatógenos el acceso a estos recursos limitantes mediante la competencia (33). Por ejemplo, los ACB pueden competir por recursos específicos como el hierro mediante la producción de sideróforos (19). En esta línea, se ha demostrado que los sideróforos producidos por

*Pseudomonas fluorescens* ATCC 17400 participan por competencia en el antagonismo que esta cepa ejerce sobre *Pythium* sp. en condiciones de laboratorio (34). Otro ejemplo de competencia es el caso de *Bacillus cereus* alf-87A que compite por espacio físico con las ascosporas del hongo fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum*. Previo a la infección, las ascosporas colonizan tejidos muertos, heridos o senescentes. La cepa alf-87A coloniza los tejidos, reduciendo de esta forma los posibles puntos de infección y como consecuencia, la incidencia y severidad de la infección (35).

### Resistencia sistémica inducida

La resistencia sistémica (RS) es un estado fisiológico en el cual las capacidades defensivas de las plantas están aumentadas y es producto de estímulos ambientales específicos. Esto supone un estado de alerta del sistema de defensa de la planta, dejándola mejor preparada para enfrentar situaciones de estrés biótico y es efectivo contra un amplio rango de fitopatógenos (36). Existen dos tipos definidos de RS: la resistencia sistémica adquirida (RSA) y la resistencia sistémica inducida (RSI). Éstos se diferencian en la naturaleza del estímulo inductor y las vías reguladoras involucradas (37). En la RSA actúa como estímulo inductor el reconocimiento de patógenos y la respuesta involucra cascadas de señalización que llevan a la acumulación intracelular de ácido salicílico y proteínas relacionadas a la patogénesis al igual que quitinasas y glucanasas. Por otro lado, en la RSI actúa como estímulo inductor el reconocimiento de PGPR y está regulada por las vías del ácido jasmónico y el etileno (38). Diversos estudios reportan la utilización de PGPR de los géneros *Bacillus* y *Paenibacillus* como estímulos inductores de la RSI, siendo ésta efectiva contra hongos, bacterias, nematodos y virus fitopatógenos (39–43).

### Producción de enzimas hidrolíticas

La producción y secreción de enzimas hidrolíticas es una característica presente en muchos ACB. Algunos ejemplos de estas enzimas son las celulasas,  $\beta$ -glucosidasas, quitinasas, y proteasas, las cuales tienen la capacidad de degradar la pared celular de hongos y Oomycetes antagonizando el crecimiento de los mismos (44,45). A su vez, las celulasas y  $\beta$ -glucosidasas también están implicadas en facilitar la colonización del tejido vegetal permitiendo a los ACB un estilo de vida endofítico (46). Por otro lado, las xilanasas actúan de forma indirecta induciendo la resistencia sistémica de la planta (44).

La producción de quitinasas y  $\beta$ -glucanasas como mecanismos de control biológico ha sido reportada para especies de los géneros *Bacillus* y *Paenibacillus* entre otros (47,48). Por ejemplo, *Paenibacillus ehimensis* IB-X, *P. ehimensis* MA2012, y *P. polymyxa* A21 producen quitinasas y glucanasas capaces de afectar las estructuras de la pared celular comprometiendo así el crecimiento del Oomycete *Pythium aphanidermatum* y de los hongos *Rhizoctonia solani*, *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides*, y *Drechlera sorokiniana* (48). También existen reportes sobre actividad antagonista de *Streptomyces*, *Bacillus*, *Paenibacillus* y otras bacterias frente a distintas especies de hongos y Oomycetes donde la producción de celulasas podría estar ejerciendo parte de la actividad observada (49,50). Tal es el caso de la cepa *Paenibacillus ehimensis* KWN38, cuyo extracto enzimático crudo es capaz de destruir las hifas de *Rhizoctonia solani* AG-1 (IA), *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* y *Phytophthora capsici* (51).

Respecto al efecto antagonista mediado por proteasas, se ha demostrado en *Bacillus licheniformis* TG116 la producción de proteasas de serina con actividad antagonista frente a diversos fitopatógenos (52) y es también un mecanismo propuesto para especies de *Paenibacillus*. Por ejemplo, las proteasas producidas por *P. polymyxa* NI4 y *P. polymyxa* APEC136 podrían estar involucradas en el antagonismo contra *Valsa pyri*, *Colletotrichum gloeosporioides* y *Colletotrichum acutatum*, respectivamente (49,53).

#### Producción de sideróforos

El término sideróforo proviene del griego “siderophore” y significa “portador de hierro”. Los sideróforos son un grupo químicamente diverso de metabolitos secundarios que tienen una alta afinidad por el hierro, pudiendo capturarlo a partir de reservorios ambientales, e incorporarlo a las células para su uso como fuente de hierro (54). La mayoría de los organismos requieren hierro como elemento esencial en una variedad de vías celulares metabólicas y de señalización, y los fitopatógenos no son la excepción. Los ACB bacterianos producen sideróforos como uno de sus mecanismos para ejercer su actividad biocontroladora, limitando el suministro de hierro al fitopatógeno y restringiendo así su crecimiento (55). Existen diversos reportes del efecto biocontrolador ejercido por ACB productores de sideróforos, por ejemplo, *Bacillus licheniformis* y *Bacillus subtilis*, ambos inhiben efectivamente a los fitopatógenos *Macrophomina phaseolina* y *Sclerotium rolfsii* (56). Si bien para el género *Paenibacillus* no se ha reportado un rol de los sideróforos en el control de fitopatógenos, sí se ha reportado su actividad antibacteriana. Por ejemplo, *Paenibacillus triticisoli* BJ-18 produce sideróforos que mostraron actividad antimicrobiana *in vitro* frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis* (57).

#### Producción de antibióticos y compuestos volátiles

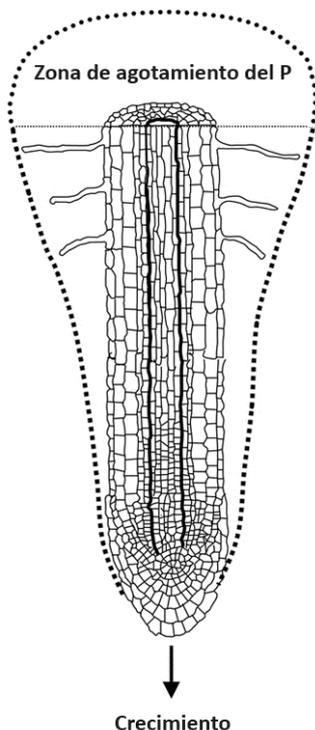
Mientras que el metabolismo primario se define como aquellos procesos esenciales para el crecimiento y la supervivencia celular (glucólisis, respiración, fotosíntesis, síntesis de proteínas y ácidos nucleicos, etc), el metabolismo secundario refiere a la producción de compuestos especializados que, si bien no son esenciales, confieren ventajas adaptativas (58). Esto incluye la síntesis de metabolitos secundarios difusibles con actividad antimicrobiana, los cuales le confieren al microorganismo productor una ventaja para la supervivencia en diferentes hábitats (59). La secreción de antibióticos y toxinas es un mecanismo ampliamente distribuido entre los ACB (60). A modo de ejemplo, para el género bacteriano *Streptomyces* se reporta la producción de unos 100.000 compuestos antibióticos que representan entre un 70% y 80% de los productos naturales con aplicaciones en farmacéutica y agroquímica. Algunos de los compuestos producidos por *Streptomyces* incluyen macrólidos, tetraciclinas, aminoglucósidos, glicopéptidos, ansamicinas y terpenos (61). El género *Bacillus* produce compuestos como bacteriocinas, péptidos y lipopéptidos con actividad antimicrobiana de amplio espectro pudiendo inhibir el crecimiento de bacterias y hongos fitopatógenos (59). Dentro del género *Paenibacillus* se encuentran muchas especies productoras de antimicrobianos. En cepas de *Paenibacillus polymyxa*, la especie tipo del género, se ha reportado la producción y secreción de antibióticos como la fusaricidina, un lipopéptido que ejerce un efecto antagonista frente a diversos patógenos fúngicos (62,63).

Otros metabolitos con actividad antimicrobiana son los compuestos volátiles, siendo también un mecanismo ampliamente distribuido entre los ACB. Los compuestos volátiles son sustancias químicas, liberadas en forma gaseosa, que constituyen una vía de comunicación entre distintos dominios de la vida. Tienen un rol fundamental en la defensa contra patógenos debido a su actividad antifúngica, su largo alcance y su eficacia a bajas concentraciones. Entre los metabolitos volátiles producidos por microorganismos, podemos diferenciar principalmente moléculas orgánicas e inorgánicas. Las moléculas inorgánicas volátiles de mayor relevancia son CO, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>S, NO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub>, SO<sub>3</sub> y HCN, siendo el HCN reportado como agente antimicrobiano clave en el control biológico ejercido por bacterias (64). Varias especies bacterianas son capaces de producir HCN como metabolito secundario, siendo los principales productores especies de *Pseudomonas* y *Bacillus* (65); aunque también es producido por especies de *Paenibacillus* (66). Los compuestos orgánicos volátiles (VOCs) son moléculas pequeñas (generalmente menores de 300 Da) y se caracterizan por presentar una baja solubilidad en agua y una alta presión de vapor lo que ayuda a mantenerlas en estado gaseoso bajo condiciones ambientales normales. Son un conjunto heterogéneo de moléculas con alta variabilidad estructural que incluyen alcoholes, compuestos carbonílicos, hidrocarburos, compuestos aromáticos y compuestos que contienen azufre y nitrógeno (67). Las especies del género *Paenibacillus* son grandes productoras de VOCs, tal es el caso de *P. polymyxa* WR-2 que cuenta con 42 VOCs identificados en su volatiloma, y de estos al menos 30 poseen actividad antifúngica contra *F. oxysporum* (48). Si bien el uso de compuestos volátiles producidos por microorganismos como antagonistas de fitopatógenos ha recibido poca atención, los nuevos descubrimientos y la creciente tendencia en la comunidad científica a adoptar un enfoque más holístico sugieren que podría haber oportunidades interesantes para aprovechar estos compuestos con esta finalidad (68)

## Mecanismos PGP directos

### Solubilización de fósforo

El fósforo es un macronutriente esencial para todos los organismos vivos. Cumple diversas funciones biológicas fundamentales como elemento estructural en los ácidos nucleicos y los fosfolípidos, en el metabolismo energético, en la activación de intermediarios metabólicos, como componente en cascadas de transducción de señales y en la regulación de enzimas (69). El fósforo con frecuencia es limitante de la productividad en sistemas naturales y agrícolas debido a su alta capacidad de adsorción en el suelo (por ejemplo, por adsorción a óxidos metálicos), su mineralización (por ejemplo, la formación de fosfatos de calcio como los presentes en la apatita) y/o su fijación en la materia orgánica del suelo (mediante la conversión de fósforo soluble e inorgánico en moléculas orgánicas) (70). Esto resulta en una baja disponibilidad de este macronutriente para la absorción por las plantas (71). El fósforo es absorbido por las plantas en forma de ortofosfato (Pi, fosfato inorgánico) cuya concentración en la solución del suelo raramente alcanza los 10 µM y puede incluso disminuir a niveles sub-micromolares en la interfaz raíz/suelo, donde la absorción de Pi por las plantas y los microorganismos que colonizan la superficie de la raíz conducen a la generación de una zona de agotamiento de Pi alrededor del cilindro de la raíz, que se mantiene debido a la lenta difusión de Pi desde regiones distantes a la superficie de la raíz (69) (Fig. 3).



**Figura 3. Esquema de zona de agotamiento de fosfato inorgánico.** Se muestra una sección transversal de la punta de una raíz primaria. La línea punteada indica el borde exterior de la zona de agotamiento de fosfato inorgánico, donde su concentración raramente alcanza los 10  $\mu\text{M}$ . La flecha señala la dirección del crecimiento de la raíz. Modificado de Poirier y colaboradores (69).

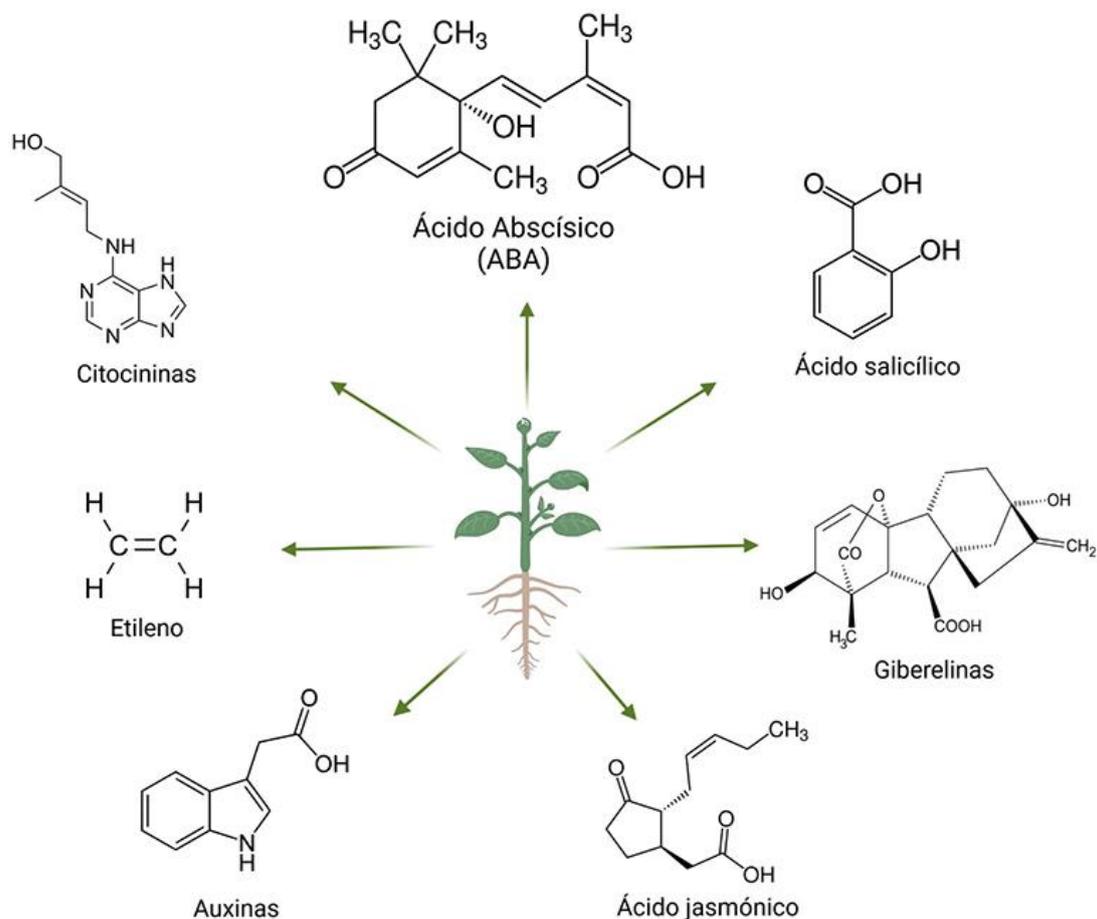
La deficiencia de fósforo tiene un efecto negativo sobre los cultivos agrícolas que se compensa con un alto aporte de fertilizantes fosfatados. Sin embargo, estos fertilizantes sufren una rápida mineralización al incorporarse al suelo y sumado al lixiviado natural con el escurrimiento de aguas, se pierden rápidamente. Además, la erosión y las filtraciones en suelos agrícolas altamente fertilizados pueden causar problemas ambientales como la eutrofización de lagos y ríos (69). En este contexto, los microorganismos solubilizadores de fosfato (MSF) representan una alternativa ambientalmente sostenible. Los MSF son bacterias u hongos con la capacidad de descomponer formas insolubles de fósforo presentes en el suelo, como los fosfatos, convirtiéndolos en una forma soluble, accesible para las plantas (72). Este grupo abarca una amplia variedad de microorganismos beneficiosos, entre ellos especies de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Aspergillus*, *Rhizobium*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Serratia*, *Micrococcus*, *Stenotrophomonas*, *Acinetobacter* y *Agrobacterium* (73).

### Producción de sideróforos

Además de participar de forma indirecta en la promoción del crecimiento de las plantas, los sideróforos también juegan un papel importante en la promoción directa. En las plantas, el hierro desempeña un papel esencial en las reacciones de oxidación y reducción, la respiración, la fotosíntesis y las reacciones enzimáticas. Si bien el hierro es uno de los metales más abundantes en la corteza terrestre se encuentra poco biodisponible, siendo la falta de hierro el factor que mayor impacto tiene en el crecimiento de las plantas (74). En contexto, los microorganismos rizosféricos desempeñan un papel crucial en la disponibilización de hierro mediada por sideróforos (75). Se ha reportado la producción de sideróforos y promoción del crecimiento en frutillas hidropónicas por parte de especies del género *Gluconacetobacter* y *Azospirillum* (76), *Brucella* y *Pseudomonas* en poroto chino (*Vigna radiata*) (77), y *Bacillus* en trigo en condiciones hidropónicas (78).

## Producción de fitohormonas

Dado su carácter sésil, las plantas no cuentan con otra opción más que hacer frente a las condiciones ambientales. Factores como la luz, temperatura, humedad relativa del aire, contenido hídrico del suelo, disponibilidad de nutrientes, entre otros, actúan como señales de los cambios ambientales. La respuesta de las plantas a las señales del entorno con el que interactúa está mediada por fitohormonas, sustancias sintetizadas en pequeñas cantidades por el metabolismo secundario de algunos tejidos y que están involucradas en diversas respuestas morfogénéticas y de crecimiento (79). Las fitohormonas son moléculas simples con una composición química diversa que incluye compuestos indólicos, terpenos, derivados de adenina, esteroides, hidrocarburos alifáticos, y derivados de carotenoides o ácidos grasos, siendo algunas de ellas gaseosas (80).



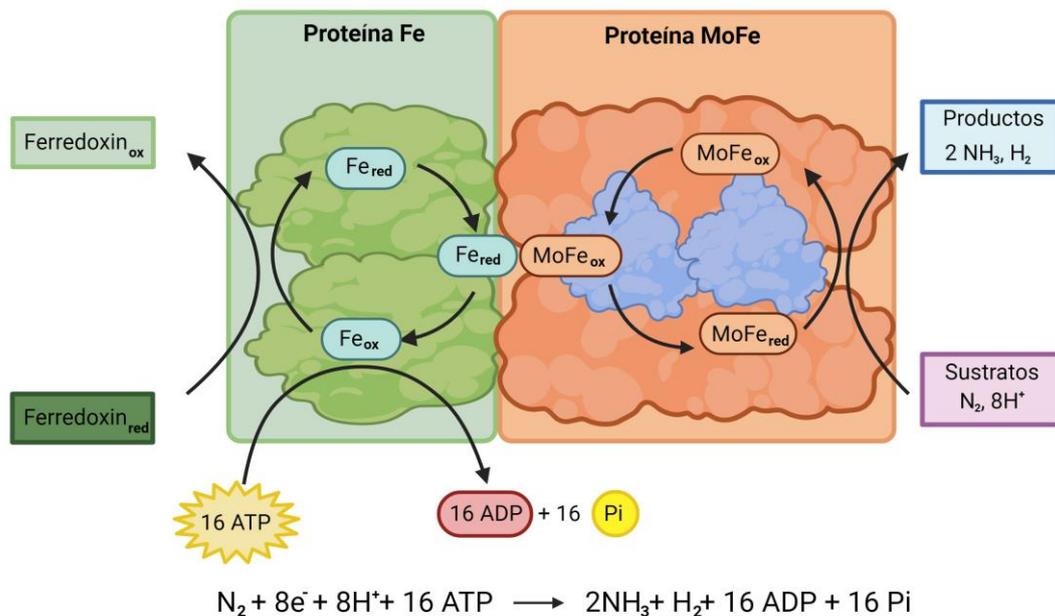
**Figura 4 – Estructura química de algunas fitohormonas involucradas en el crecimiento y desarrollo de las plantas.**

El ácido abscísico participa en la regulación del crecimiento de la raíz, desarrollo y germinación de la semilla, inicio de la floración, entre otras. El ácido salicílico regula el crecimiento radical y también la respuesta de defensa de la planta frente a patógenos. Las giberelinas intervienen en la regulación de procesos como el crecimiento longitudinal de tallos y la promoción de la germinación de semillas. El ácido jasmónico interviene en la resistencia de la planta a patógenos como microorganismos e insectos promoviendo la producción de compuestos de resistencia. Las auxinas participan en la división, elongación y diferenciación celular, promoviendo por ejemplo la elongación de tallos entre otras funciones. El etileno es una hormona gaseosa e interviene en procesos como la maduración de frutos, entre otros. Las citocininas o citoquininas están involucradas en la elongación de las raíces y en la generación de brotes axilares. Tomado de Muñoz Contreras y colaboradores (81).

Pueden clasificarse según sus funciones en dos grupos: i) las fitohormonas que participan en procesos de promoción del crecimiento vegetal, como la división celular, la elongación celular, crecimiento trópico, la floración, y el desarrollo de frutas y semillas; ii) las fitohormonas que están involucradas en la respuesta de la planta a daño celular y a otros factores de estrés biótico y abiótico (80). Las auxinas son el grupo más importante de fitohormonas responsables de la regulación del crecimiento vegetal (82,83) siendo el ácido indol-3-acético (AIA) la más abundante, presente en la mayoría de las plantas. Resulta interesante que la capacidad de sintetizar fitohormonas no está restringida a plantas (84). Los microorganismos han co-evolucionado con las plantas de forma que casi todas las fitohormonas son también producidas por algún microorganismo. Para ejemplificar, existen 6 fitohormonas primarias (auxinas, giberelinas, ácido abscísico, citoquininas, etileno y brasinoesteroides), y para todas ellas hay bacterias capaces de producirlas y secretarlas (85). Recientemente, la aplicación de microorganismos productores de fitohormonas como bioestimulantes del crecimiento vegetal ha ganado terreno entre las prácticas agrícolas sustentables (86,87). Por ejemplo, mediante la inoculación con PGPR productores de la auxina AIA y giberelinas, se ha logrado mitigar los efectos negativos de la sequía en algunos cultivos (86). También se ha reportado la promoción del crecimiento vegetal en condiciones no estresantes mediante la inoculación con PGPR productoras de AIA, como lo son algunas especies de *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas* y *Chryseobacterium* entre otras (88,89).

### Fijación de nitrógeno

El nitrógeno es el nutriente limitante más importante para el crecimiento y productividad de las plantas. A pesar de su alta disponibilidad en la atmósfera (80% de  $N_2$ ), las plantas no pueden hacer uso del nitrógeno atmosférico ( $N_2$ ). Sin embargo, el  $N_2$  puede ser transformado a amonio, el cual es utilizable por las plantas, mediante la fijación biológica del nitrógeno (FBN), proceso que llevan a cabo ciertos microorganismos denominados diazótrofos; recientemente se ha reportado que un alga unicelular (*Braarudosphaera bigelowii*) es capaz de realizar la FBN en un organelo llamado nitroplasto(90). La FBN es llevada a cabo a través de un gran complejo enzimático conocido como “nitrogenasa” formado por dos componentes proteicos: la proteína Fe codificada por el gen *nifH*, y la proteína Mo-Fe codificada por los genes *nifD* y *nifK* (Fig. 5) (91,92).



**Figura 5. Representación esquemática del complejo enzimático nitrogenasa y estequiometría de la reacción que cataliza.** A la izquierda se representa la proteína Fe; a la derecha se representa la proteína Mo-Fe. De manera general la nitrogenasa es una dupla de proteínas metálicas: la proteína de hierro (proteína Fe) y la proteína de molibdeno-hierro (proteína Mo-Fe) (pudiendo también ser vanadio o hierro en lugar de molibdeno). La Mo-Fe, es un tetrámero formado por dos subunidades alfa y dos betas. En la proteína Mo-Fe, están coordinados dos metaloclusters, el Fe-Mo (que es el encargado de reducir el sustrato) y P-cluster (que es el aceptor inicial de electrones). Por otro lado, la proteína de hierro es una proteína dimérica que coordina un clúster [4Fe:4S] y posee sitios de unión al ATP (93). La FBN se trata de un proceso energéticamente costoso para la célula procarionta ya que por cada molécula de  $\text{N}_2$  fijado se consumen 16 moléculas de ATP. Imagen generada en este trabajo.

La FBN representa aproximadamente dos tercios del nitrógeno fijado a nivel mundial, mientras que el resto del nitrógeno se sintetiza industrialmente mediante el proceso de Haber-Bosch (94) por lo que la FBN representa una alternativa económicamente beneficiosa y ambientalmente sostenible en comparación con los fertilizantes químicos (95). Los diazótrofos se dividen generalmente en dos grupos: i) los diazótrofos de vida libre como las Cianobacterias (*Anabaena*, *Nostoc*), *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Paenibacillus* y *Azocarus*, entre otros (96,97), ii) los diazótrofos asociativos, como los simbióticos, algunos de ellos denominados rizobios, pertenecientes a los órdenes *Rhizobiales* y *Burkholderiales* que establecen simbiosis con plantas de la familia Fabaceae (98), aunque algunos rizobios pueden hacerlo con plantas del género *Parasponia* (Cannabaceae) (99). La instauración de la simbiosis rizobio-leguminosa implica una compleja interacción entre el huésped y el simbiote (100), resultando en la formación de estructuras simbióticas distintas llamadas nódulos. En estas estructuras los rizobios se establecen como simbiotes intracelulares diferenciándose a bacteroides, una forma especializada capaz de llevar a cabo el proceso de FBN (101). Durante muchos años se consideró que los nódulos de leguminosas estaban exclusivamente ocupados por rizobios. Con el avance de las técnicas moleculares y su reducción en costos, evidencias sólidas han demostrado que los nódulos radiculares también albergan una comunidad diversa de microorganismos (18,102–104). Los principales filos bacterianos que se han encontrado consistentemente como cohabitantes de los nódulos incluyen *Actinobacteria*, *Firmicutes* y *Proteobacteria*. Se ha reportado la presencia de los géneros *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Bosea*, *Enterobacter*, *Micromonospora*, *Mycobacterium*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas* y *Stenotrophomonas*, siendo las cepas de *Bacillus* spp. y *Paenibacillus* spp. a menudo aisladas en

este nicho (18,102,103). El papel de los endófitos de los nódulos es desconocido, pero se ha observado que algunas cepas poseen actividad de biocontrol contra fitopatógenos (104). Este hecho convierte a los nódulos en un nicho interesante y aún poco explorado para la prospección de cepas con actividad biocontroladora de hongos fitopatógenos.

## ANTECEDENTES

En un trabajo previo realizado por nuestro grupo se realizó un relevamiento de la diversidad de endosimbiontes de leguminosas presentes en el Parque Nacional Esteros de Farrapos e Islas del Río Uruguay (105). A partir de un nódulo radicular de maní nativo (*Arachis villosa*) se aisló, además de rizobios del género *Bradyrhizobium*, la cepa UY79 cuyo fenotipo de colonia no era el esperado para un rizobio. La cepa se identificó mediante PCR del gen que codifica para el ARNr 16S, resultando pertenecer al género *Paenibacillus*. Este género está reportado en la literatura como un habitante común en la comunidad bacteriana de los nódulos radiculares (103,104,106,107). Por otro lado, varias especies de *Paenibacillus* son capaces de antagonizar hongos y oomycetes (46,108), siendo utilizadas como agentes de control biológico en productos comerciales (46). Además, se ha reportado que muchas especies del género son promotoras directas del crecimiento vegetal (109).

Considerando estos antecedentes, ensayamos de forma preliminar la capacidad de la cepa UY79 de antagonizar al fitopatógeno *Fusarium graminearum* mediante enfrentamientos duales, resultando ser un buen controlador. Decidimos entonces continuar ahondando en su caracterización.

## OBJETIVO

### Objetivo General

- El objetivo de este trabajo es determinar si la cepa *Paenibacillus* sp. UY79 tiene potencial como agente de control biológico y promotor del crecimiento vegetal.

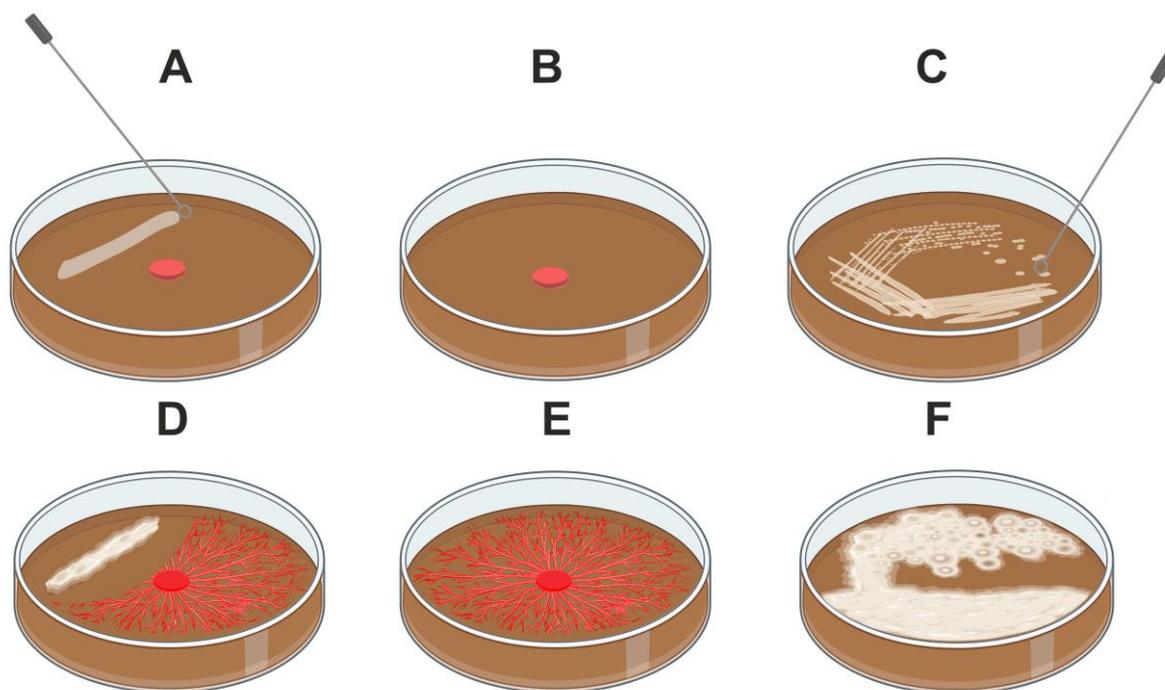
### Objetivos específicos

- Caracterizar *in vivo* la capacidad antagónica de la cepa UY79 frente a hongos y Oomycetes fitopatógenos.
- Determinar posibles mecanismos involucrados en el control biológico y en la promoción del crecimiento vegetal
- Determinar el efecto de la cepa UY79 en la promoción del crecimiento vegetal y en el establecimiento de la simbiosis rizobio-leguminosa
- Asignación taxonómica y caracterización *in silico* de la cepa UY79

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Actividad antagonista mediada por compuestos difusibles producidos en medio sólido

Como primera aproximación se caracterizó *in vivo* la capacidad de la cepa UY79 de antagonizar diversos hongos y Oomycetes fitopatógenos mediante la producción de compuestos difusibles. Con esta finalidad se realizaron ensayos de enfrentamiento dual en placa de Petri conteniendo medio de cultivo sólido, según lo descrito por Geels y Scrippers (110). En esta aproximación, el hongo y la bacteria se inoculan en una misma placa conteniendo un medio de cultivo que permita el crecimiento de ambos microorganismos. El hongo se inocula en el centro de la placa ya que debido a su crecimiento apical estricto y polarizado crece de forma radial. Si la bacteria produce compuestos difusibles con actividad antagónica, se observará un halo de inhibición de crecimiento del hongo alrededor del inóculo bacteriano. La extensión de este halo de inhibición dependerá de la naturaleza, concentración, y capacidad de difusión de el/los compuestos producidos por la bacteria. En la Tabla 1 se detallan las cepas utilizadas en esta aproximación, seleccionadas por encontrarse comúnmente afectando cultivos de leguminosas en nuestro país; además se incluyó una cepa del género *Trichoderma* con el fin de evaluar la cepa UY79 frente a un habitante típico de los suelos, conocido por su capacidad de suprimir patógenos. Como material de partida se utilizaron cultivos puros de hongos y Oomycetes crecidos en medio PDA (medio V8 agar para *Phytophthora sojae* Ps25) por 5 días a 25°C. A partir de estos cultivos se obtuvieron discos de micelio de 0,9 cm de diámetro cortados con sacabocado estéril del borde de crecimiento de la colonia, ya que es la zona donde el hongo tiene mayor actividad citoplasmática y se encuentra más saludable. La cepa UY79 fue crecida en 5 mL de medio TSB por 16 horas a 30°C y en agitación (200 rpm) a partir de un cultivo fresco en medio TSA. La composición de los medios de cultivo se detalla en el anexo. Para la realización del ensayo, en el centro de la placa con PDA se dispuso un disco de micelio fúngico y a la mitad de la distancia entre el disco y el borde de la placa se inoculó la cepa UY79 a partir del cultivo líquido, generando con un ansa una línea de cultivo de 2 cm aproximadamente (Fig. 6A). Como controles de crecimiento, la cepa UY79 y los hongos se crecieron de forma independiente en placas con PDA. El control del hongo se realizó disponiendo un disco de micelio en el centro de la placa de Petri en ausencia de bacteria (Fig. 6B) y el de la bacteria se realizó mediante estría a partir de cultivo líquido (Fig. 6C). Las placas fueron incubadas en estufa a 25°C hasta que el crecimiento del micelio en la placa control alcanzó el borde de la placa, y se registró la presencia/ausencia de halo de inhibición. El ensayo fue realizado por triplicado. La figura 6D representa un resultado positivo para antagonismo. Las figuras 6E y 6F representan controles de crecimiento del hongo en ausencia de la bacteria y de la bacteria en ausencia del hongo respectivamente. Los tratamientos y controles realizados se detallan en la Tabla 2.



**Figura 6. Esquema del ensayo de enfrentamientos duales para evaluar antagonismo mediado por compuestos difusibles.** Arriba, tratamientos a tiempo 0. (A) Diagrama de enfrentamiento, (B) placa con inóculo fúngico en rojo, (C) placa con inóculo bacteriano en blanco. Abajo, tratamientos a tiempo final. (D) Ejemplo de restricción del crecimiento (halo de inhibición) del hongo por producción de difusibles, (E) control de crecimiento fúngico en rojo, (F) control de crecimiento bacteriano en blanco. Imagen generada en este trabajo.

**Tabla 1.** Cepas microbianas utilizadas en ensayos de actividad antagonista.

Cepa	Descripción	Referencia
<b>Hongos</b>		
<i>Botrytis cinerea</i> Pers. A1	Hongo fitopatógeno aislado de planta de limón	(111)
<i>Fusarium graminearum</i> Schwabe S127	Hongo fitopatógeno aislado de grano de sorgo	Sección Micología <sup>a</sup>
<i>Fusarium oxysporum</i> Schltdl J38	Hongo fitopatógeno aislado de soja	Sección Micología <sup>a</sup>
<i>Fusarium semitectum</i> Berk. & Ravenel J41	Hongo fitopatógeno aislado de soja	Sección Micología <sup>a</sup>
<i>Fusarium verticillioides</i> (Sacc.) Nirenberg A71	Hongo fitopatógeno aislado de grano de maíz	Sección Micología <sup>a</sup>
<i>Macrophomina phaseolina</i> (Tassi) Goid J431	Hongo fitopatógeno aislado de soja	Sección Micología <sup>a</sup>
<i>Phomopsis longicolla</i> Hobbs J429	Hongo fitopatógeno aislado de soja	Sección Micología <sup>a</sup>
<i>Rhizoctonia solani</i> J.G. Kühn Rz01	Hongo fitopatógeno aislado de soja	INIA <sup>b</sup>
<i>Sclerotium rolfsii</i> Sacc. 1948	Hongo fitopatógeno aislado de remolacha	Sección Micología <sup>a</sup>
<i>Trichoderma atroviridae</i> P.Karst 1607	Agente de control biológico contra enfermedades fúngicas de plantas, aislado de turba	Sección Micología <sup>a</sup>
<b>Oomycetes</b>		
<i>Phytophthora sojae</i> Kaufm. & Gerd Ps25	Oomycete fitopatógeno	INIA <sup>b</sup>
<i>Pythium ultimum</i> Trow Py03	Oomycete fitopatógeno	INIA <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Sección Micología, Facultad de Ciencias-Universidad de la República– Colección de cepas del laboratorio

<sup>b</sup> Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Programa Cultivos de Secano. Estación Experimental La Estanzuela – Colección de cepas del laboratorio

**Tabla 2.** Tratamientos realizados para evaluar la actividad antagonista en los ensayos de enfrentamientos duales por difusibles y volátiles realizados en medio sólido.

Tratamientos y controles	Hongos y Oomycetes	Bacteria
T1	<i>B. cinérea</i> A1	<i>Paenibacillus</i> sp. UY79
T2	<i>F. graminearum</i> S127	<i>Paenibacillus</i> sp. UY79
T3	<i>F. oxysporum</i> J38	<i>Paenibacillus</i> sp. UY79
T4	<i>F. semitectum</i> J41	<i>Paenibacillus</i> sp. UY79
T5	<i>F. verticillioides</i> A71	<i>Paenibacillus</i> sp. UY79
T6	<i>M. phaseolina</i> J431	<i>Paenibacillus</i> sp. UY79
T7	<i>P. longicolla</i> J429	<i>Paenibacillus</i> sp. UY79
T8	<i>R. solani</i> Rz01	<i>Paenibacillus</i> sp. UY79
T9	<i>S. rolfsii</i> 1948	<i>Paenibacillus</i> sp. UY79
T10	<i>T. atroviridae</i> 1607	<i>Paenibacillus</i> sp. UY79
T11	<i>P. sojae</i> Ps25	<i>Paenibacillus</i> sp. UY79
T12	<i>P. ultimum</i> Py03	<i>Paenibacillus</i> sp. UY79
C1	<i>B. cinérea</i> A1	-----
C2	<i>F. graminearum</i> S127	-----
C3	<i>F. oxysporum</i> J38	-----
C4	<i>F. semitectum</i> J41	-----
C5	<i>F. verticillioides</i> A71	-----
C6	<i>M. phaseolina</i> J431	-----
C7	<i>P. longicolla</i> J429	-----
C8	<i>R. solani</i> Rz01	-----
C9	<i>S. rolfsii</i> 1948	-----
C10	<i>T. atroviridae</i> 1607	-----
C11	<i>P. sojae</i> Ps25	-----
C12	<i>P. ultimum</i> Py03	-----
C13	-----	<i>Paenibacillus</i> sp. UY79

## Evaluación de actividad antagonista mediada por compuestos difusibles producidos en medio líquido

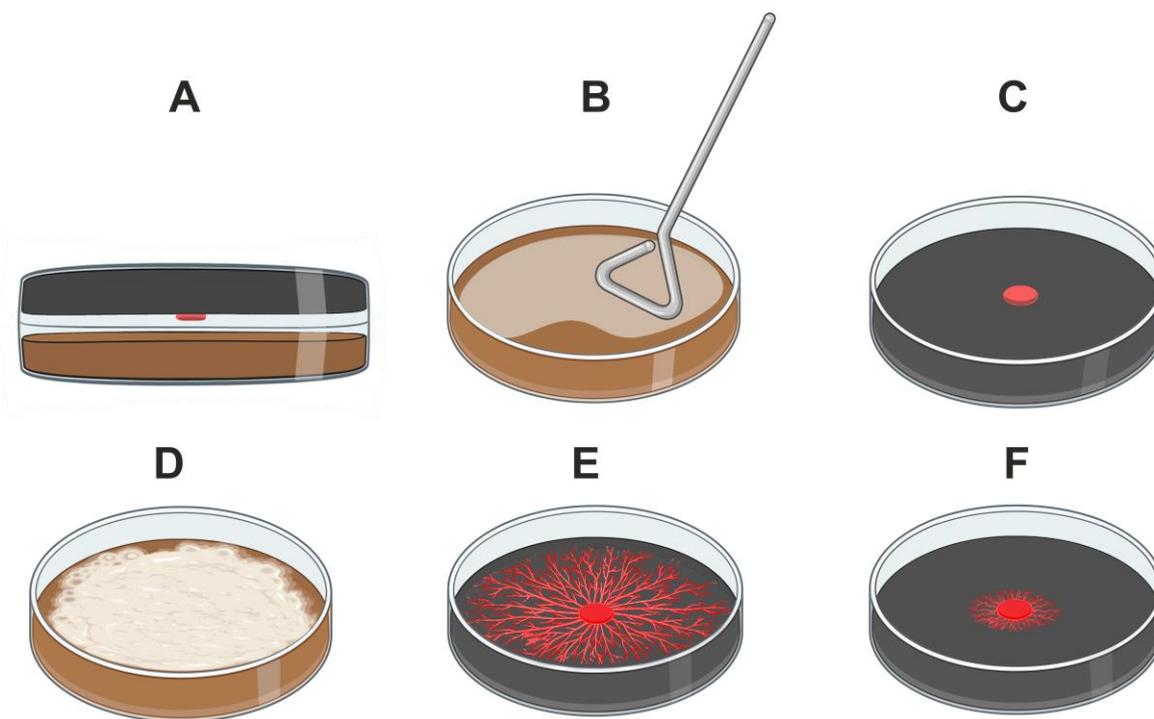
Para detectar la presencia de compuestos con actividad antifúngica en cultivos líquidos, la cepa UY79 fue crecida en 100 mL de medio PDB e incubada durante 16 horas a 25°C y en agitación (200 rpm). Se colectaron muestras de 10 mL de cultivo a las 30, 44, 68, 88 y 96 horas post inoculación, se centrifugaron a 10.000 x g durante 10 minutos, y el sobrenadante fue colectado y filtrado a través de filtros de acetato de celulosa de 0,45 µm de poro. Se tomaron 2 mL de sobrenadante libre de células colectado a las distintas horas, se mezcló con 2 mL de PDA fundido (45°C) conteniendo 40 g/L de agar, y se vertió en una placa de 6 pocillos. De esta manera, al mezclar los sobrenadantes con el medio se obtiene una concentración final de 20 g/L de agar, que es la habitualmente utilizada. Como control negativo se utilizó 2 mL de medio PDB en lugar de sobrenadante libre de células. En el centro de cada uno de los 6 pocillos se dispuso un disco

de micelio de 0,5 cm proveniente de un cultivo fresco de *Fusarium verticillioides* A71. Las placas se incubaron a 25°C hasta que el hongo alcanzó el borde del pocillo en el control negativo, y se midió el crecimiento fúngico en presencia de los sobrenadantes. *F. verticillioides* A71 fue seleccionado al azar para este ensayo. El ensayo fue realizado por triplicado.

## Actividad antagonista mediada por compuestos volátiles

Se determinó *in vivo* la capacidad de la cepa UY79 de antagonizar hongos y Oomycetes fitopatógenos mediante la producción de compuestos volátiles. Para ello se realizaron ensayos de enfrentamiento dual en placa de Petri como se describió previamente (112). En esta aproximación, el hongo y la bacteria se inoculan en distintas placas conteniendo medio de cultivo sólido, las tapas se descartan y las bases se enfrentan entre sí y se sellan con Parafilm para retener los compuestos volátiles producidos. Dado que el hongo tiene un crecimiento radial, si la bacteria produce compuestos volátiles con actividad inhibitoria del crecimiento, se observará un menor diámetro en el crecimiento del hongo en los enfrentamientos respecto del control en ausencia de bacteria. Las cepas utilizadas en esta aproximación son las mismas que se utilizaron en la aproximación por difusibles (Tabla 1). Como material de partida se utilizaron cultivos puros crecidos en medio PDA (medio V8 agar para *Phytophthora sojae* Ps25) por 5 días a 25°C de los cuales se obtuvieron discos de micelio de 0,9 cm de diámetro cortados con sacabocado estéril del borde de la colonia. La cepa UY79 fue crecida en 5 mL de medio TSB por 16 horas a 30°C y en agitación (200 rpm) a partir de un cultivo fresco en medio TSA. En el centro de una placa con PDA se dispuso un disco de micelio fúngico (Fig. 7C) y en otra placa con PDA se inoculó en superficie y rastrilló 100 µL de cultivo líquido de la cepa UY79 (Fig. 7B). Ambas placas se enfrentaron, se sellaron con Parafilm (Fig. 7A) y fueron incubadas en estufa a 25°C. La placa conteniendo la bacteria se dejó en la parte de abajo de la dupla, de forma que la bacteria no pudiera dispersarse, por medio de las gotas de condensación, a la placa conteniendo el hongo. El control de la bacteria (Fig. 7B) y de los Hongos y Oomycetes (Fig. 7D) se realizó de forma análoga, enfrentándose a una placa conteniendo únicamente medio PDA. El ensayo fue realizado por triplicado. Cuando el micelio del control fúngico alcanzó el borde de la placa, se registraron las medidas del diámetro de la colonia en los ensayos de enfrentamiento dual. El antagonismo fue determinado midiendo el porcentaje de inhibición:  $\%Inh = [(R - r) * 100] / R$ , donde R corresponde al radio del micelio en el tratamiento control y r es el radio del micelio en el enfrentamiento. Los tratamientos y controles realizados son los mismos que en la aproximación por compuestos difusibles y se detallan en la Tabla 2.

A la hora de realizar este ensayo se presentaron problemas con el Parafilm utilizado para sellar las placas enfrentadas, ya que al incubarlas por varios días en estufa de 25°C el Parafilm se rompe perdiéndose el efecto deseado de retener y concentrar los compuestos volátiles producidos por la bacteria. Para solventar este inconveniente se utilizaron 3 tiras de Parafilm para cada enfrentamiento y la última se aplicó con muy poca tensión para evitar la ruptura en la estufa y lograr así una atmósfera concentrada dentro de las placas.



**Figura 7. Esquema del ensayo de enfrentamientos duales para evaluar antagonismo mediado por compuestos volátiles.** Arriba, tratamientos a tiempo 0. (A) diagrama de enfrentamiento, (B) placa con inòculo bacteriano en blanco, (C) placa con inòculo fúngico en rojo. Abajo, tratamientos a tiempo final. (D) Control de crecimiento bacteriano en blanco, (E) control de crecimiento fúngico en rojo, (F) ejemplo de restricción del crecimiento del hongo por producción de volátiles. Imagen generada en este trabajo.

## Producción de cianuro de hidrógeno (HCN)

Dado que el ácido cianhídrico (HCN) es un compuesto volátil con actividad antimicrobiana conocida (113) y que su producción ha sido reportada en algunas especies de *Paenibacillus* (114), decidimos determinar si la cepa UY79 era capaz de producirlo. Para ello se evaluó de forma cualitativa la producción de HCN por el método del papel de filtro con picrato (115). El picrato o sales de picrato, de coloración amarilla, se forman a partir del ácido pícrico (2,4,6-trinitrofenol) y una base como el carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ). Estas sales reaccionan con el HCN dando lugar a ácido isopurpúrico (2,6-dinitro-5-hydroxy-4-hydroxylamino-1,3-dicyanobenzene) de coloración roja (116). La cepa UY79 fue crecida en 5 mL de medio TSB por 16 horas a 30°C y en agitación (200 rpm) a partir de un cultivo fresco en medio TSA. Brevemente, en la tapa de una placa de Petri se dispuso un recorte de papel de filtro Whatman embebido en una solución de ácido pícrico 0,5% (p/v) y carbonato de sodio 2,5% (p/v). En la base de la placa de Petri se dispuso medio PDA o TSA, ambos con y sin el adición de 4,4 g/L de glicina. La glicina se agregó como estimulador de la producción de HCN por ser precursor del mismo en hongos y bacterias (117). Se inoculó la cepa UY79 mediante estría con ansa de tal forma que cubriera toda la placa (para formar un tapiz bacteriano). Las placas se sellaron con Parafilm con motivo de retener el HCN producido por la cepa y se incubaron en estufa de 30°C por 7 días. La actividad cianogénica se visualizó como un cambio de color en el papel de filtro que vira del amarillo al naranja/rojo

(debido a la formación de ácido isopurpúrico como resultado de la reacción de las sales de picrato con el HCN). Como control positivo de este ensayo se utilizó la cepa productora de HCN *Pseudomonas fluorescens* UP61; como control negativo se usó el medio en ausencia de bacteria. El ensayo se realizó por triplicado en cada condición.

## Análisis del volatiloma

Para identificar los compuestos volátiles producidos por la cepa UY79, se analizó su volatiloma por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masa (GC/MS). Para ello se llevó a cabo un ensayo análogo al descrito previamente para evaluar la actividad antagonista mediada por compuestos volátiles. Para identificar los compuestos volátiles producidos por la cepa UY79, ésta se creció en 5 mL de medio TSB por 16 horas a 30°C y en agitación (200 rpm), y se rastrillaron 100 µL en una placa de Petri con medio PDA. La placa con la cepa UY79 fue enfrentada a una placa de PDA sin inocular y se sellaron con Parafilm para retener los volátiles producidos. Las placas se incubaron en estufa de 25°C durante 36 horas o durante 7 días. Tomando en cuenta el trabajo publicado por Ebadzadsahrai y colaboradores (118) que muestra que los compuestos volátiles producidos por co-cultivos de hongos-bacteria no son la suma de los producidos en monocultivo, también analizamos el volatiloma del hongo *S. rolfsii* 1954 y del enfrentamiento entre este y la cepa UY79. Para ello se realizaron enfrentamientos duales según el protocolo descrito anteriormente utilizando el hongo *S. rolfsii* 1948. Como control de volátiles producidos por el hongo, éste se enfrentó a una placa de PDA sin inocular. También se enfrentaron dos placas de PDA sin inocular que oficiaron como tratamiento blanco del diseño experimental. Las placas se sellaron e incubaron durante 7 días a 25°C. Los compuestos volátiles producidos fueron colectados utilizando la técnica de micro extracción en fase sólida (SPME, del inglés Solid Phase Micro-Extraction) (119) con una fibra StableFlex de divinilbenceno/carboxeno/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS) (50 µm DVB/30 µm CAR/PDMS) (Supelco, USA). Dentro de la cámara de flujo, la fibra fue insertada entre ambas placas enfrentadas y se dejó expuesta por 10 o 30 minutos a los compuestos volátiles presentes. Posteriormente, la fibra fue desorbida dentro del puerto del cromatógrafo de gases a 250°C por 1 min y los compuestos fueron separados e identificados por cromatografía de gases acoplado a un espectrómetro de masas (Shimadzu QP2010 Ultra) equipado con una columna TR-5MS (30m, 0,25-mm diámetro interior, d<sub>f</sub> 0,25µm). La temperatura inicial fue de 33°C durante 3 minutos, luego se subió a 80°C a una tasa de 3°C/min, de 80°C a 180°C a una tasa de 10°C/min, y de 180°C a 240°C a una tasa de 40°C/min, manteniéndose la temperatura en 240°C por 2 minutos. El espectrómetro de masas fue operado en modo de ionización electrónica a 70 eV y 225°C, escaneando desde 30 hasta 500 m/z. Para la identificación de los compuestos volátiles detectados, los espectros de masa fueron comparados con los de las librerías de espectrometría de masa de Wiley 139 y NIST08/NIST08s. El área de los picos fue utilizada para estimar la abundancia relativa de cada compuesto volátil. Se realizaron duplicados del análisis del volatiloma.

## Producción de enzimas hidrolíticas

Se evaluó mediante aproximaciones bioquímicas la capacidad de la cepa UY79 de llevar a cabo ciertas actividades enzimáticas reportadas como componentes del control biológico ejercido por los agentes de control biológico. Cabe destacar que la presencia de estas actividades enzimáticas no implica que efectivamente estén jugando un rol en la actividad controladora ejercida por un ABC.

### Actividad celulasa y xilanasa

Para determinar la presencia de actividad celulasa (120) y xilanasa (121) se creció la cepa UY79 en 5 mL de medio TSB durante 16 horas a 30°C y en agitación (200 rpm). Se dispusieron gotas de 10 µL del cultivo primario sobre placas de Petri con medio TSA enmendado con carboximetilcelulosa 0,5% (p/v) y xilano de madera de haya 0,5% (p/v) respectivamente. Las placas fueron incubadas en estufa a 30°C por 3 días y se revelaron con una solución de colorante Rojo Congo 0,05% (p/v). Este colorante se adhiere a ambos sustratos, dando una coloración roja intensa. La actividad celulasa y xilanasa afectan la estructura de sus respectivos sustratos y por consiguiente la unión del colorante. De esta manera, la actividad celulasa y xilanasa se evidencian como un halo de color naranja/amarillo alrededor de la colonia sobre el fondo rojo. Para revelar este ensayo se debe quitar las colonias bacterianas con un algodón húmedo, luego se incorpora el colorante y se incuba por 10 minutos a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se lava la placa con agua destilada y se deja incubando con NaCl 1 M por otros 10 minutos para lograr un mayor contraste. Por último, se retira el NaCl y se observa la placa. Las cepas *Escherichia coli* DH5α Cel5 y *Pseudomonas putida* KT2440 Cel5, ambas portadoras de la endoglucanasa Cel5A de *Bacillus subtilis* que les confiere actividad celulasa, fueron usadas como control positivo para el ensayo de actividad celulasa (cepas generadas en nuestro laboratorio). Las cepas *E. coli* DH5α (122) y *P. putida* KT2440 (123) fueron usadas como control negativo. El ensayo se realizó por triplicado.

### Actividad β-glucosidasa

Para evidenciar la presencia de actividad beta-glucosidasa se creció la cepa UY79 en 5 mL de medio TSB durante 16 horas a 30°C y en agitación (200 rpm). Se dispusieron gotas de 10 µL del cultivo primario sobre placas de Petri con medio TSA enmendado con esculina 0,2% (p/v) y FeCl<sub>3</sub> 0,03% (p/v) (124). Las placas fueron incubadas en estufa a 30°C por 3 días. La esculina es un glucósido (β-D-glucosa -6,7- dihidroxicumarina) capaz de ser hidrolizado por la actividad β-glucosidasa resultando en la liberación de glucosa y 6,7 dihidroxicumarina (esculetina). La esculetina reacciona con los iones Fe del medio formando un compuesto de color negro. De esta forma, la actividad β-glucosidasa se evidencia como un halo negro/marrón alrededor de la colonia. Las cepas *E. coli* DH5α β-glu y *P. putida* KT2440 β-glu fueron usadas como controles positivos (125), mientras *E. coli* DH5α y *P. putida* KT2440 fueron utilizadas como controles negativos. El ensayo se realizó por triplicado.

## Actividad proteasa

Para determinar la producción de proteasas extracelulares (126) se creció la cepa UY79 en 5 mL de medio TSB durante 16 horas a 30°C y en agitación (200 rpm). Se realizó una estría del cultivo primario sobre placas de Petri con medio de cultivo TSA diluido 1:100 y suplementado con leche desnatada en polvo 5% (p/v). Las placas fueron incubadas en estufa a 30°C por 3 días. La principal proteína de la leche es la caseína, la cual otorga un color blanco opaco al medio TSA suplementado. Al ser hidrolizada por acción de las proteasas se genera un halo translúcido alrededor de la colonia con actividad positiva. Para preparar este medio de cultivo, se autoclava por separado el TSA diluido 1:100 con 40 g/L de agar, y por otro lado leche en polvo desnatada al 10% (p/v) en agua destilada, la cual se debe autoclavar únicamente por 8 minutos. Luego, en cámara de flujo estéril se mezclan 1:1 ambos preparados y se pasa a placas de Petri. La cepa *Bacillus* sp. UYFA144 (127) fue utilizada como control positivo. El ensayo se realizó por triplicado.

## Evaluación de posibles mecanismos directos de promoción del crecimiento vegetal

### Fijación biológica de N<sub>2</sub>

Para evaluar el potencial de la cepa UY79 de fijar nitrógeno se evaluó la presencia del gen *nifH*, que codifica para la Fe-proteína de la nitrogenasa, mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los cebadores PoIF (5'-TGCGAYCCSAARGCBGACTC-3') y PoIR (5'-ATSGCCATCATYTCRCCGGA-3') que amplifican una región intra-génica de 350 pares de bases (128), y los EuF (5'-ATYGTCGGYTYGAYCCSAARGC-3') y EuR (5'-ATGGTGTGGCGGCRTAVAKSGCC-3') que amplifican una región intra-génica de 327 pares de bases (129). Como control positivo de la PCR se utilizó ADN genómico de *Ensifer meliloti* 1021. El ADN genómico utilizado como molde de la PCR fue extraído con el kit comercial Zymo Quick-DNA fungal/bacterial miniprep kit como lo describe el fabricante. Las condiciones utilizadas en la PCR se muestran en el Anexo. Los productos de la PCR fueron visualizados en un gel de agarosa al 0,8% (p/v) (Anexo).

### Producción de Ácido Indol Acético (AIA)

Para determinar si la cepa UY79 es capaz de producir AIA se empleó una prueba colorimétrica utilizando el reactivo de Salkowski según el método descrito por Gordon y colaboradores (130). La reacción entre el reactivo y los compuestos indólicos da lugar a la oxidación de estos últimos, otorgando una coloración al medio de reacción que va desde el rosa claro hasta el rosa intenso según la concentración de indoles presentes en la mezcla. Dado que el AIA es sintetizado a partir del triptófano en varios microorganismos, se agregó este aminoácido al medio con el fin de inducir la producción de AIA (131). Para este ensayo se creció la cepa UY79 en 6 mL de TSB, con y sin el agregado de 100 µg/mL de triptófano, durante 72 hs a 30°C y en agitación (200 rpm). Se midió la densidad óptica a 620nm (DO<sub>620nm</sub>) para posteriormente normalizar los valores de AIA

obtenidos. El cultivo se centrifugó a 12.000 x g durante 5 min, se tomó 150 µL de sobrenadante y se mezcló con 100 µL del reactivo de Salkowski. La mezcla se incubó durante 30 min en oscuridad. Para cuantificar la presencia de AIA se midió la absorbancia a 540 nm ( $Ab_{540nm}$ ) con espectrofotómetro. Se utilizó 540 nm ya que es la longitud de onda determinada para la medición de indoles oxidados en este ensayo. La concentración de AIA en los cultivos líquidos fue extrapolada a partir de una curva de calibración realizada con AIA puro en el rango de 0 a 200 µM; los valores obtenidos fueron normalizados respecto a la  $DO_{620nm}$ . La cepa *Microbacterium* sp. UYFA68 (127) se utilizó como control positivo. El ensayo se realizó por triplicado.

### Solubilización de fosfatos

Para evaluar la capacidad de solubilizar fosfatos se creció la cepa UY79 en 5 mL de medio TSB durante 16 horas a 30°C y en agitación (200 rpm). Se dispusieron gotas de 10 µL del cultivo primario sobre placas de Petri con medio NBRIP (132) o PVK (133) (Anexo) conteniendo fosfato de roca o  $(PO_4)_2Ca_3$  (fosfato tricálcico) como única fuente de fósforo. Las placas fueron incubadas en estufa a 30°C por 5 días. Ambas fuentes de fosfatos son polvos de color blanco y prácticamente insolubles en agua por lo que permanecen en forma de partículas suspendidas en el medio, otorgándole un color blanco opaco. La solubilización de fosfatos se visualiza como un halo translúcido rodeando la colonia, en contraste con el fondo blanco del medio de cultivo. La cepa *Pantoea* sp. UYSB45 (134) fue utilizada como control positivo. El ensayo se realizó por triplicado.

### Producción de sideróforos

La producción de sideróforos fue evaluada utilizando el método colorimétrico de Cromo Azurol S (CAS) (135) (Anexo). Este colorante tiene una gran afinidad por el hierro y en presencia de este metal adquiere un color azul. Cuando un quelante fuerte, como son los sideróforos, remueve el hierro del colorante, éste vira al naranja. Para determinar la producción de sideróforos, se creció la cepa UY79 en 5 mL de medio TSB durante 16 horas a 30°C y en agitación (200 rpm), y se dispusieron gotas de 10 µL del cultivo primario sobre placas de Petri con medio CAS-agar. Las colonias que desarrollen un halo naranja a su alrededor serán positivas para la producción de sideróforos. La cepa *Herbaspirillum seropedicae* Z67 (136) fue utilizada como control positivo. El ensayo se realizó por triplicado.

## Efecto de la cepa UY79 en el crecimiento vegetal y en el establecimiento de la simbiosis rizobio-leguminosa

Dado que la cepa UY79 podría ser un buen candidato como ACB para protección de cultivos vegetales contra fitopatógenos y considerando que a nivel mundial la alfalfa es el cultivo de legumbre más importante después de la soja (137), decidimos evaluar el efecto de la inoculación con la cepa UY79 sobre el establecimiento de la simbiosis rizobio-leguminosa y sobre la promoción del crecimiento vegetal ejercida por rizobios en este cultivo.

Para ello desinfectamos la superficie de semillas de *Medicago sativa* var. Crioula según nuestra adaptación del protocolo previamente descrito (138). Brevemente, se sumergieron las semillas en etanol 70% (v/v) durante 5 minutos con agitación. Se descartó el etanol y se agregó NaClO 4% (p/v) por 5 minutos con agitación. Se descartó el NaClO y se realizaron 7 lavados con H<sub>2</sub>O destilada estéril, y 100 µL del agua del último lavado se plaqueó en medio TSA como control de la desinfección. Las semillas desinfectadas se germinaron en placas de Petri conteniendo agua destilada con 0,8% (p/v) de agar, y se incubaron en estufa a 30°C hasta la emergencia de la radícula. Luego de la germinación, transferimos las semillas a tubos de vidrio para plantas conteniendo 15 mL de medio de cultivo Jensen's sin nitrógeno (139) con 0,8% (p/v) de agar. Se dispuso una semilla por cada tubo para todos los tratamientos y se realizaron 8 réplicas en cada uno. Los tratamientos fueron los siguientes: i) inoculación con la cepa UY79, ii) inoculación con la cepa UY79 y *E. meliloti* 242 (140), iii) inoculación con la cepa UY79 y *E. meliloti* 1021 (141), iv) inoculación con *E. meliloti* 242, v) inoculación con *E. meliloti* 1021, vi) control sin inocular. La concentración de bacteria utilizada en este ensayo fue de  $1 \times 10^6$  unidades formadoras colonia por mililitro y cada semilla fue inoculada con un volumen de 1 mL de la cepa correspondiente. Los ensayos se mantuvieron a 24°C con un fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad. Se realizaron 2 ensayos independientes, y las plantas fueron cosechadas a las 6 y 10 semanas post-inoculación (ensayo 1 y 2, respectivamente). Para cada tratamiento se procesaron las 8 plantas (réplicas) registrando el peso seco de la parte aérea de la planta y el número de nódulos presentes en la raíz. Para ello, se cortó la parte aérea de cada planta y se las depositó en placas de Petri de vidrio que fueron incubadas en estufa a 60°C hasta peso constante. Los resultados de peso seco de la parte aérea fueron analizados con el test no paramétrico de Kruskal-Wallis, y las comparaciones de a pares se realizaron con el test de Wilcoxon. Para los datos del conteo de nódulos se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) y un test post hoc HDS (honestly significant difference) Tukey. Se utilizó un alfa de 0,05 como valor de corte (p-valor) para la significancia de los análisis estadísticos.

## Afiliación taxonómica

Con el fin de dar una asignación taxonómica a la cepa UY79, se amplificó por PCR el gen que codifica para el ARNr de la subunidad menor del ribosoma (ARNr 16S) con los cebadores universales 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-TACGGYTACCTGTTACGACTT-3') (142,143) que da lugar a un producto de 1465 pb. Como control positivo de la PCR se utilizó ADN genómico de *E. meliloti* 1021, y como control negativo se utilizó una reacción sin molde de ADN. Los productos de la PCR fueron visualizados en un gel de agarosa al 0,8% (p/v) (Anexo). El

producto obtenido se envió a Macrogen, Inc. (Seúl, Corea) para ser purificado y secuenciado. Las secuencias forward y reverse se ensamblaron y curaron utilizando el programa de ensamblado de secuencias DNA Baser V3. La secuencia obtenida fue depositada en la base de datos de Genbank NCBI bajo el número de acceso MT973969. Se identificó el aislamiento UY79 a nivel de género utilizando la herramienta “Identify” en el servidor web de EzBioCloud (144) (<https://www.ezbiocloud.net/identify>). Para evaluar si la cepa UY79 se relaciona filogenéticamente con otros aislamientos del mismo género obtenidos de entornos similares, se construyó un árbol filogenético que incluyó secuencias del gen ARNr 16S de 33 cepas tipo de especies del género *Paenibacillus* aisladas de suelo, compost, rizosfera, o diferentes compartimentos y tejidos de plantas (nódulo de raíz, raíz, hoja, semilla), y dos cepas patógenas (*Paenibacillus larvae* ATCC 9545 y *Paenibacillus lautus* NBRC 15380). Una vez reunidas todas las secuencias se realizó un alineamiento múltiple con el software MAFFT v7.453 y se depuró de regiones no informativas con Gblock v0.91b. Con Mega X se construyó un árbol filogenético basado en el método de máxima verosimilitud bajo el modelo de inferencia evolutiva Kimura 2 parámetros +G+I (145,146). La robustez de las ramas del árbol obtenido fue calculada mediante 1000 pseudoreplicas de Bootstrap.

## Secuenciación, ensamblado, anotación y análisis del genoma de la cepa UY79

El genoma de la cepa UY79 se secuenció utilizando el método de “secuenciación de lectura pareada” (paired-end-sequencing) en la plataforma TrueSeq de Illumina en Macrogen, Inc. (Seúl, Corea). La secuenciación paired-end consiste en la secuenciación de fragmentos del ADN en ambos sentidos 5'-3' y 3'-5'. Se realizó un filtrado de las secuencias obtenidas removiendo aquellas de baja calidad con “Trim Galore 0.4.4” con la siguiente línea de comando: `trim_galore -paired -three_prime_clip_R1 10 -three_prime_clip_R2 10 -length 50 UY79_1.fastq UY79_2.fastq`. Las secuencias filtradas fueron ensambladas “de novo” utilizando “Velvet Assembler 2.2.5” con la siguiente línea de comando: `VelvetOptimiser.pl -s 19 -e 81 -d AssemVelvetOptimizer -f '-shortPaired -fastq -separate UY79_1_val_1.fq UY79_2_val_2.fq' -t 8 -`. Las herramientas “Quast v5.0.2” y “FastQC” fueron utilizadas para analizar la calidad del genoma y de la secuenciación. “Bowtie2”, “Samtools”, “Bedtools” fueron necesarias para poder calcular la profundidad de secuenciación obtenida en el ensamblado ya que el ensamblador Velvet Assembler 2.2.5 con los parámetros utilizados no devolvió esa información estadística al finalizar el ensamblado. Esta fue una tarea engorrosa y que en general la mayoría de los ensambladores realizan por defecto, tener en cuenta esto a la hora de ensamblar con Velvet Assembler 2.2.5.

El genoma resultante fue anotado utilizando el “NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline” (147) y el “Rapid Annotation using Subsystem Technology” (RAST 2.0) (148). La secuencia del genoma de la cepa UY79 fue depositada en la base de datos del NCBI GenBank con el número de acceso JAFFQR010000000 y los datos crudos de secuenciación fueron subidos en las bases de datos del NCBI Sequence Read Archive (SRA) con el número de acceso PRJNA697992. Para profundizar en la anotación de genes dentro del genoma de la cepa UY79 la estrategia utilizada fue buscar dominios conservados en proteínas ortólogas utilizando PFAM. Luego se utilizó el

modelo oculto de Markov obtenido de PFAM (149) como una "semilla" de búsqueda en HAMMER (150) contra los ORFs predichos para el genoma de la cepa UY79. Los genes fueron sometidos a una etapa de depuración utilizando BLASTP (151), HHPRED (152) y MODELLER (153) cuando fue necesario.

Para identificar genes que podrían estar involucrados en la síntesis de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana se utilizó el servidor web "ANTISMASH 7.1.0" que se basa en modelos ocultos de Markov de genes específicos (154). También se utilizó los servidores web "PROPHAGE HUNTER" y "PHASTER" para predecir y anotar genes de bacteriófagos en el genoma de la cepa UY79 (155,156).

Se analizó el genoma de la cepa UY79 con la herramienta PlasFlow para la predicción de secuencias plasmídicas (157)

## Análisis multilocus e identidad nucleotídica promedio

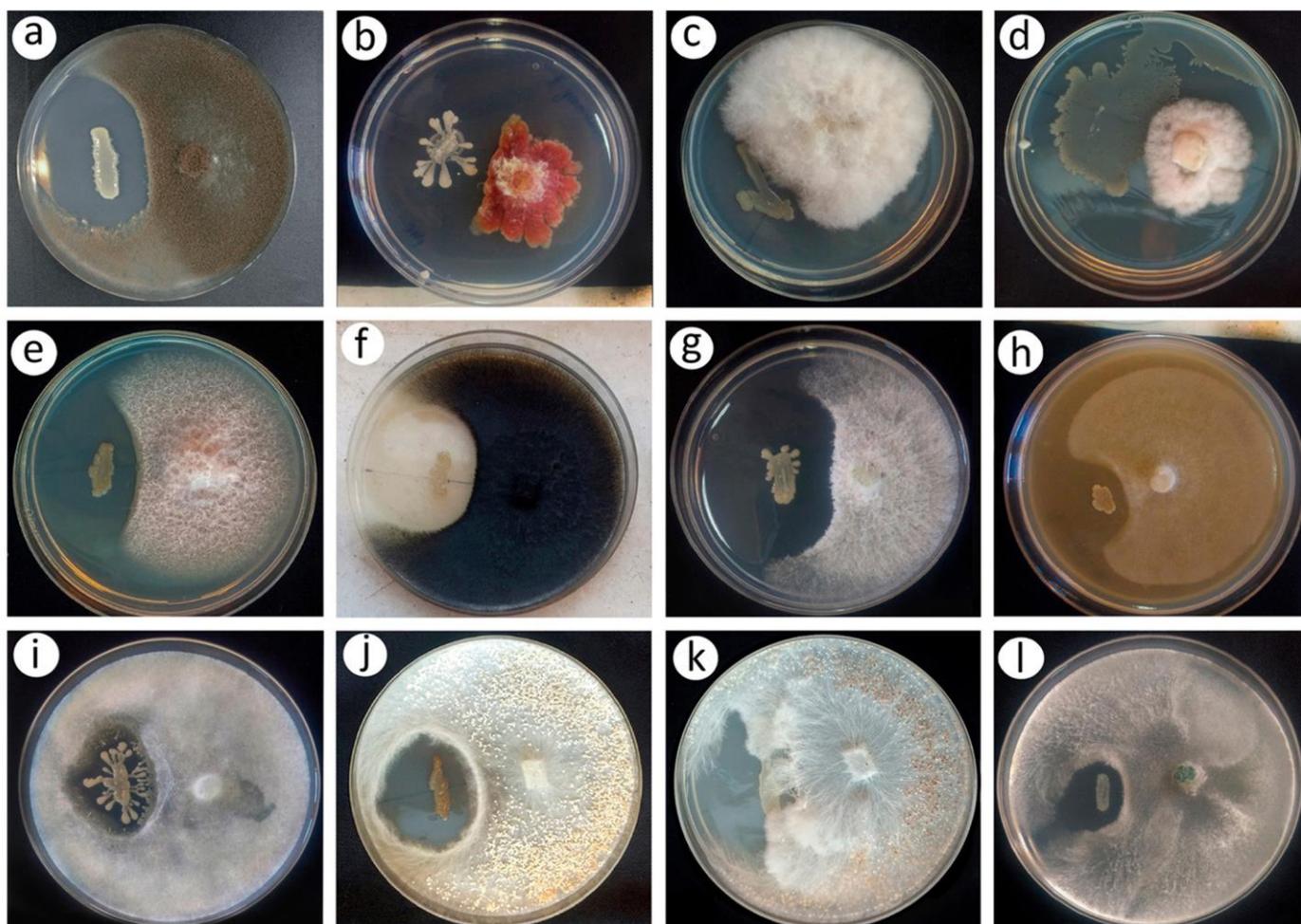
Se realizó un análisis filogenético basado en secuencias multilocus (MSLA). Para ello se concatenó la secuencia de los genes *ARNr 16S*, *gyrB*, *rpoB*, *recA*, y *recN* obtenidos de los genomas públicos disponibles en la base de datos de EZBioCloud (144). Las secuencias fueron alineadas con MAFFT v7.453 y depuradas con Gblock v0.91b. Con el alineamiento final se construyó en "MEGA X" un árbol filogenético basado en el método de máxima verosimilitud bajo el modelo de inferencia evolutiva "general time-reversible model" (+G+I) (158). La robustez de las ramas del árbol obtenido fue calculada mediante 1000 pseudoreplicas de Bootstrap.

La identidad nucleotídica promedio (ANI) es un valor porcentual que indica la similitud entre dos secuencias genómicas. Puede ser utilizado para la clasificación e identificación de bacterias ya que existe un valor de corte de ANI propuesto para delimitar especies (159). Se calculó el valor de ANI de los genomas entre las especies incluidas en el análisis MLSA utilizando el "ANI calculator tool" de EzBioCloud (144) con la finalidad de acercarnos a la identidad taxonómica de la cepa UY79.

## RESULTADOS

### La cepa UY79 es capaz de antagonizar un amplio espectro de hongos y Oomycetes mediante la producción de compuestos difusibles

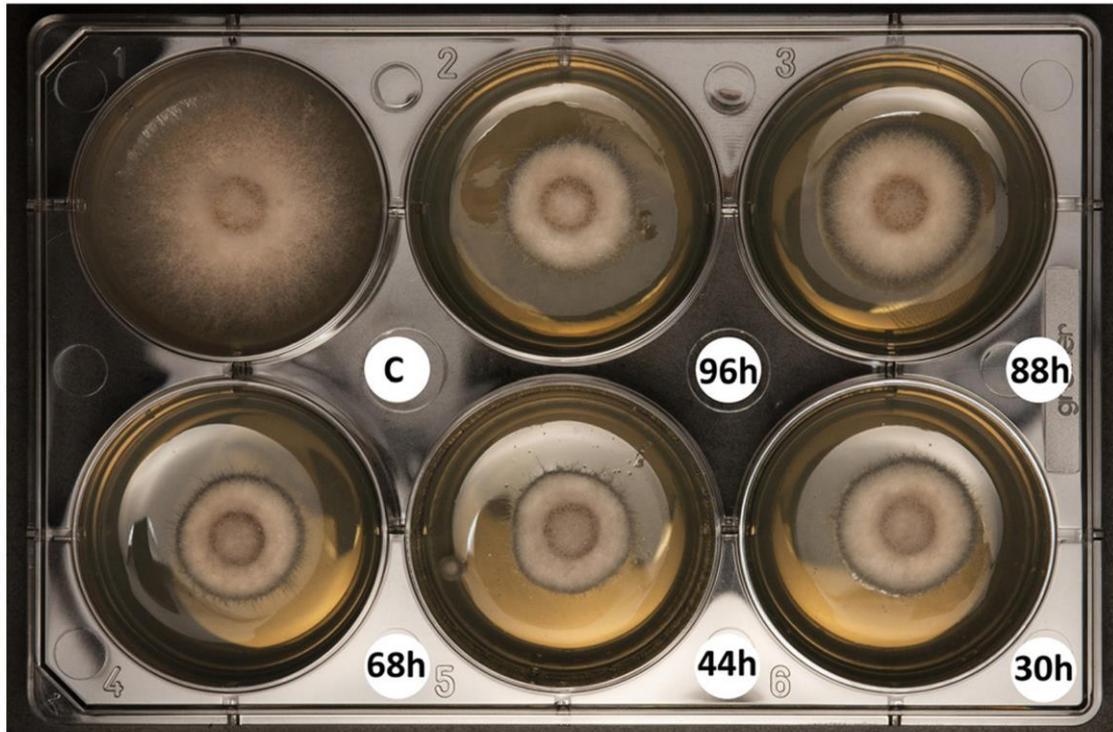
Como se muestra en la figura 8, en las condiciones ensayadas la cepa UY79 produce compuestos difusibles que son capaces de inhibir a los 10 hongos y a los 2 Oomycetes evaluados.



**Figura 8. Actividad antagonista *in vitro* de la cepa *Paenibacillus* sp. UY79 frente a hongos y Oomycetes fitopatógenos mediada por compuestos difusibles.** La actividad antagonista ejercida por la cepa UY79 (sembrada a la izquierda de cada placa) se observó como una zona de inhibición del crecimiento de los hongos y Oomycetes. Se incluyeron en el ensayo los hongos *Botrytis cinerea* A1 (a), *Fusarium graminearum* S127 (b), *Fusarium oxysporum* J38 (c), *Fusarium semitectum* J41 (d), *Fusarium verticillioides* A71 (e), *Macrophomina phaseolina* J431 (f), *Phomopsis longicolla* J429 (g), *Rhizoctonia solani* Rz01 (j), *Sclerotium rolfsii* 1948 (k), *Trichoderma atroviride* 1607 (l), y los Oomycetes *Phytophthora sojae* Ps25 (h) y *Pythium ultimum* Py03 (i). El ensayo fue realizado en medio PDA salvo el tratamiento con *P. sojae* Ps25, que se llevó a cabo en medio V8 agar. Todos los tratamientos fueron realizados por triplicado. Se muestran placas representativas.

A pesar de que no se realizó una evaluación cuantitativa, cualitativamente se observa que la cepa UY79 produce una importante inhibición del micelio de *Botrytis cinerea* A1 (Fig. 8a), *Fusarium verticillioides* A71 (Fig. 8e), *Macrophomina phaseolina* J431 (Fig. 8f), *Phomopsis longicolla* J429 (Fig. 8g), *P. sojae* Ps25 (Fig. 8h), y *Rhizoctonia solani* Rz01 (Fig. 8j), una moderada inhibición del crecimiento de *Fusarium graminearum* S127 (Fig. 8b), *Pythium ultimum* Py03 (Fig. 8i), y *Trichoderma atroviride* 1607 (Fig. 8l), y una ligera inhibición del crecimiento de *Fusarium oxysporum* J38 (Fig. 8c), *Fusarium semitectum* J141 (Fig. 8d), y *Sclerotium rolfsii* 1948 (Fig. 8k). Además, para *F. verticillioides* A71 enfrentado a la cepa UY79, se observó una zona de lisis micelial en el borde del crecimiento del micelio frente al inóculo bacteriano (Fig. 8e). En el caso de *R. solani* Rz01 (Fig. 8j) y *S. rolfsii* 1948 (Fig. 8k), se observó una menor densidad de estructuras de resistencia (esclerocios) en la proximidad de la zona de confrontación con la bacteria. Es interesante notar la pigmentación marrón oscura de la cepa UY79 cuando se enfrenta a *R. solani* Rz01 (Fig. 8j).

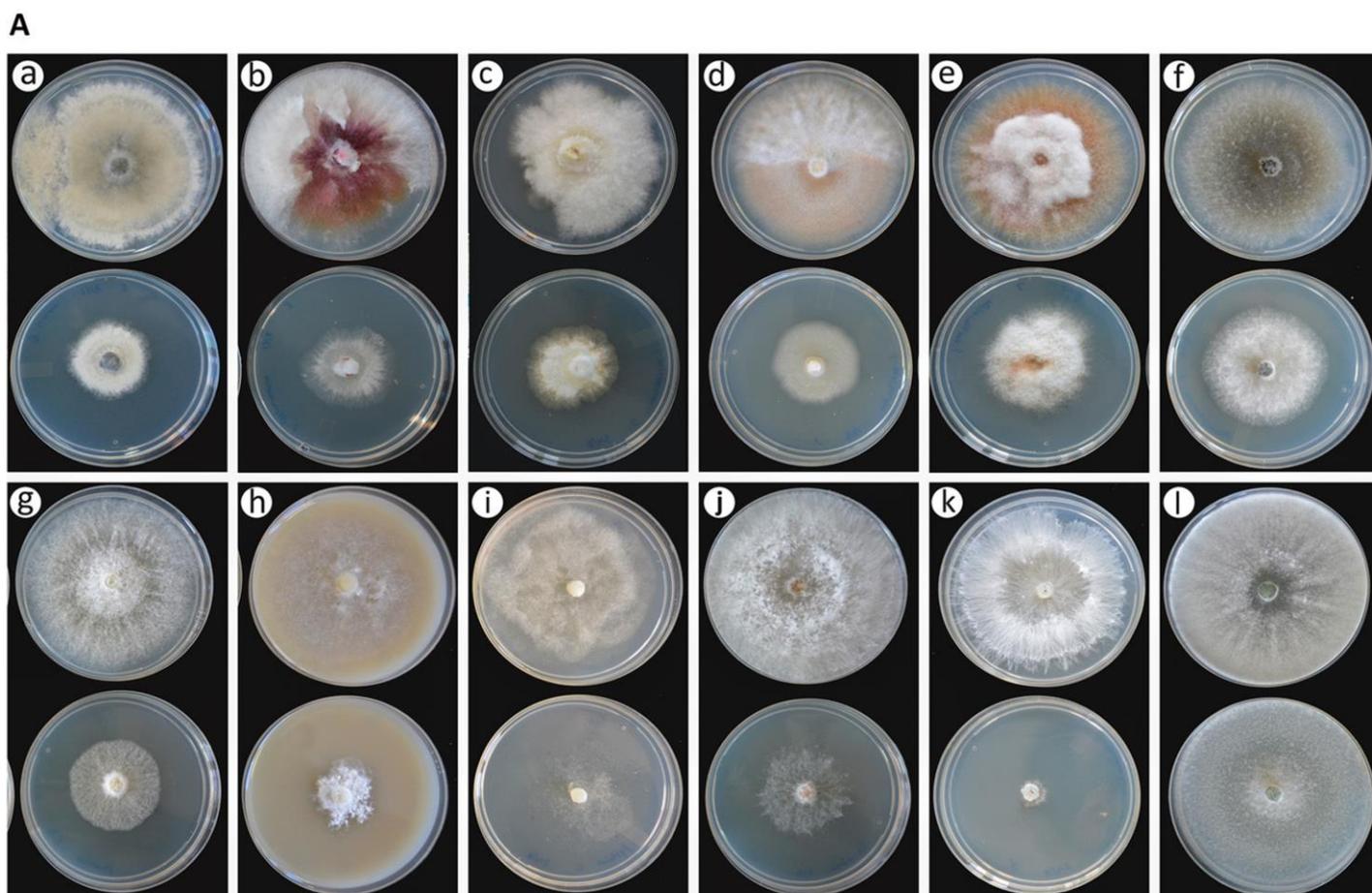
Como la cepa UY79 demostró ser capaz de producir compuestos difusibles con actividad antimicrobiana en presencia de los hongos y Oomycetes evaluados, nos preguntamos si también era capaz de producirlos al crecer sin la presencia de hongos y Oomycetes en medio líquido. Como se muestra en la figura 9, compuestos que inhiben el crecimiento de *F. verticillioides* A71 están presentes en el sobrenadante libre de células proveniente de cultivos puros de UY79 crecidos durante 30 horas. El fenotipo de inhibición se mantuvo en sobrenadantes de cultivos puros crecidos durante 44, 68, 88, y 96 horas, sugiriendo que la producción de los compuestos se mantiene por 96 horas, o bien que los compuestos producidos a horas tempranas se mantienen activos aun a las 96h. Considerando que el sobrenadante de cultivo bacteriano podría tener una menor carga nutritiva que el PDB utilizado como control (debido al consumo de nutrientes por parte de la cepa UY79), realizamos otro control sustituyendo el sobrenadante de cultivo por agua destilada. Esta condición sería un ejemplo extremo de limitación de nutrientes en el sobrenadante de cultivo. En esta condición control, *F. verticillioides* A71 creció sin problemas (resultados no mostrados) indicando que el efecto de inhibición de crecimiento se debe a componentes presentes en el sobrenadante de cultivo y no a una falta de nutrientes.



**Figura 9. Efecto antifúngico del sobrenadante libre de células de *Paenibacillus* sp. UY79 frente a *Fusarium verticillioides* A71.** Se incluyó en medio PDA sobrenadantes libres de células obtenidos de cultivos crecidos por 30, 44, 68, 88 y 96 horas. A modo de control (C), se sustituyó el sobrenadante de cultivo por medio PDB. En el centro del pocillo, sobre el medio de cultivo, se colocó un disco de micelio del hongo. Se evaluó el crecimiento del hongo cuando el control alcanzó el borde de la placa. El experimento se realizó por triplicado. Se muestra una placa representativa del ensayo.

## La cepa UY79 produce compuestos volátiles con actividad antagonista frente a hongos y Oomycetes

Como se muestra en la figura 10, en las condiciones ensayadas la cepa UY79 produce compuestos volátiles capaces de inhibir el crecimiento de 9 de los 10 hongos ensayados, y de los 2 Oomycetes.



**B**

---

Inhibición del crecimiento de hongos/oomycetes por la cepa UY79 (%)

---

a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l
72 ± 11	57 ± 10	46 ± 9	56 ± 5	33 ± 3	32 ± 3	57 ± 10	55 ± 4	43 ± 1	56 ± 29	93 ± 6	0 ± 0

---

**Figura 10. Actividad antagonista *in vitro* de la cepa *Paenibacillus* sp. UY79 frente a hongos y Oomycetes fitopatógenos mediada por compuestos volátiles.** El antagonismo se analizó mediante el método de placas enfrentadas. (A) La producción de compuestos volátiles con actividad antimicrobiana fue evidenciada como una inhibición del crecimiento de los hongos y Oomycetes enfrentados a la cepa UY79 (placa de abajo) en comparación con el crecimiento de los controles no enfrentados a la cepa UY79 (placas de arriba). Se evaluó el efecto de los

compuestos volátiles sobre los hongos *Botrytis cinerea* A1 (a), *Fusarium graminearum* S127 (b), *Fusarium oxysporum* J38 (c), *Fusarium semitectum* J41 (d), *Fusarium verticillioides* A71 (e), *Macrophomina phaseolina* J431 (f), *Phomopsis longicolla* J429 (g), *Rhizoctonia solani* Rz01 (j), *Sclerotium rolfsii* 1948 (k), *Trichoderma atroviride* 1607 (l), y los Oomycetes *Phytophthora sojae* Ps25 (h) y *Pythium ultimum* Py03 (i). Los enfrentamientos se realizaron en PDA salvo por el caso de *P. sojae* Ps25 que fue realizado en medio V8 agar. El experimento se realizó por triplicado. (A) fotografía de placas representativas de cada tratamiento. (B) porcentajes de inhibición del crecimiento del micelio para cada tratamiento (porcentaje promedio  $\pm$  desvío estándar).

El crecimiento de 7 de los 11 fitopatógenos ensayados fue inhibido en más del 50% (Fig. 10B). Este fue el caso de *B. cinerea* A1 (Fig. 10a), *F. graminearum* S127 (Fig. 10b), *F. semitectum* J41 (Fig. 10d), *P. longicolla* J429 (Fig. 10g), *P. sojae* Ps25 (Fig. 10h), *R. solani* Rz01 (Fig. 10j), y *S. rolfsii* 1948 (Fig. 10k). Es de destacar que el crecimiento de *S. rolfsii* 1948 (Fig. 10k) y *B. cinerea* A1 (Fig. 10a) fue severamente comprometido (93%  $\pm$ 6% y 72%  $\pm$ 11%, respectivamente) al enfrentarlos con la cepa UY79. *M. phaseolina* J431 (Fig. 10f) y *F. verticillioides* A71 (Fig. 10e) fueron los menos afectados, resultando en aproximadamente un 30% de inhibición micelial por los compuestos volátiles de la cepa UY79. Para *F. graminearum* S127 (Fig. 10b) y *M. phaseolina* J431 (Fig. 10f) se observó una alteración en la pigmentación de la colonia respecto del control, y en menor medida lo mismo se observó para *F. semitectum* J41 (Fig. 10d) y *F. verticillioides* A71 (Fig. 10e), como respuesta a los compuestos volátiles producidos por la cepa UY79. Es interesante notar que una menor densidad de hifas fue observada en el enfrentamiento con *R. solani* Rz01 (Fig. 10j) mientras que, en contraste, una mayor densidad de hifas fue producida por *P. sojae* Ps25 (Fig. 10h). A pesar de que *T. atroviride* 1607 (Fig. 10l) no mostró una inhibición del crecimiento, se observó una alteración en el patrón de crecimiento de la colonia. Juntos, estos resultados indican que la cepa UY79 produce compuestos volátiles con un amplio espectro de actividad antagonica y que la respuesta de hongos y Oomycetes depende de cada microorganismo en particular.

Dado que el ácido cianhídrico (HCN) es un compuesto volátil con actividad antimicrobiana conocida (113) y que su producción ha sido reportada en algunas especies de *Paenibacillus* (114), se evaluó la capacidad de la cepa UY79 para producir este compuesto. De acuerdo con el método de papel de filtro con picrato, no se observó producción de HCN ni en medio PDA ni en medio TSA con o sin agregado de glicina (datos no mostrados). Estos resultados sugieren que la cepa UY79 produce compuestos volátiles antimicrobianos distintos del HCN.

## Análisis del volatiloma producido por la cepa UY79

Con la finalidad de elucidar la naturaleza de los compuestos volátiles involucrados en el antagonismo observado, analizamos el volatiloma de la cepa UY79. La identificación por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas de los compuestos volátiles producidos por la cepa UY79 muestra que en las condiciones ensayadas la acetoina (3-hydroxy-2-butanone) fue el más abundante de los compuestos volátiles producidos (>65% abundancia relativa) (Tabla 3). Otros compuestos detectados fueron el 2-methyl-1-butanol (4,3 a 5,3%), 2-methyl-1-propanol (1,7 a 2,5%), 3-methyl-1-butanol (0,9 a 2,7%), y 2,3-butanediol (1,1 a 1,7%). No se observaron variaciones relevantes en la composición o el contenido relativo de compuestos volátiles producidos por la cepa UY79, ni en diferentes tiempos de crecimiento (36 horas o 7 días) ni con diferentes tiempos de desorción (10 min o 30 min) (Tabla 3; Fig. S1A (Anexo)). En concordancia con los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro*, no se detectó producción de HCN.

**Tabla 3.** Compuestos volátiles relevantes producidos por *Paenibacillus* sp. UY79 creciendo de forma individual.

Compuesto <sup>a</sup>	RT <sup>b</sup>			Área (%)		
	36 h (30min) <sup>c</sup>	7 d (10min)	7 d (30min)	36 h (30min)	7 d (10min)	7 d (30min)
2-methyl-1-propanol	2.283	2.281	2.274	1.77	2.51	1.70
3-hydroxy-2-butanone	3.995	3.752	4.043	70.38	76.25	>65
3-methyl-1-butanol	4.399	4.398	4.391	1.11	0.90	2.66
2-methyl-1-butanol	4.501	4.497	4.495	4.40	4.33	5.31
2,3-butanediol	6.268	6.262	6.301	1.71	1.06	1.14

<sup>a</sup> Los compuestos fueron identificados por comparación del espectro de masa obtenido contra librerías de referencia (NIST 08, Wiley 139)

<sup>b</sup> RT: Tiempo de retención

<sup>c</sup> Los compuestos volátiles fueron colectados a partir de cultivos bacterianos crecidos por 36 horas o 7 días y extraídos por exposición de la fibra durante 10 o 30 minutos

El hongo *S. rolfesii* 1948 fue seleccionado para el ensayo ya que su crecimiento fue severamente comprometido en el ensayo previo de antagonismo mediado por compuestos volátiles (Fig. 10A y B). Los resultados obtenidos indican que la composición de los volatílicos producidos en co-cultivo corresponde con la suma de los producidos por las cepas cuando crecen de forma individual (Tabla 4; Fig. S1B (Anexo)). Cabe señalar que entre los compuestos producidos por la cepa UY79, el 2-methyl-1-propanol y 3-methyl-1-butanol fueron también producidos por *S. rolfesii* 1948, mientras que el 3-hydroxy-2-butanone (acetoína), 2,3-butanediol, y 2-methyl-1-butanol fueron producidos únicamente por la cepa UY79 (Tabla 4; Fig. S1B (Anexo)).

**Tabla 4.** Compuestos volátiles relevantes producidos por *Paenibacillus* sp. UY79 y por *S. rolfesii* 1948 creciendo de forma individual o enfrentados

Compuesto <sup>a</sup>	<i>Paenibacillus</i> sp. UY79 <sup>b</sup>		<i>S. rolfesii</i> 1948 <sup>b</sup>		Enfrentamiento <sup>b</sup>	
	RT (min) <sup>c</sup>	Área (%)	RT (min)	Área (%)	RT (min)	Área (%)
2-Methyl-1-propanol	2.274	1.70	2.299	3.36	2.285	2.27
2-Ethylfuran	ND <sup>d</sup>	ND	3.382	0.39	ND	ND
2,5-Dimethylfuran	ND	ND	3.512	1.13	3.510	0.14
3-Hydroxy-2-butanone	4.043	>65	ND	ND	4.094	50.08
3-Methyl-1-butanol	4.391	2.66	4.409	5.66	4.399	2.75
2-Methyl-1-butanol	4.495	5.31	ND	ND	4.501	5.00
2,3-Butanediol	6.301	1.14	ND	ND	ND	ND

<sup>a</sup> Los compuestos fueron identificados comparando su espectro de masa contra librerías de referencia (NIST08, Wiley 139)

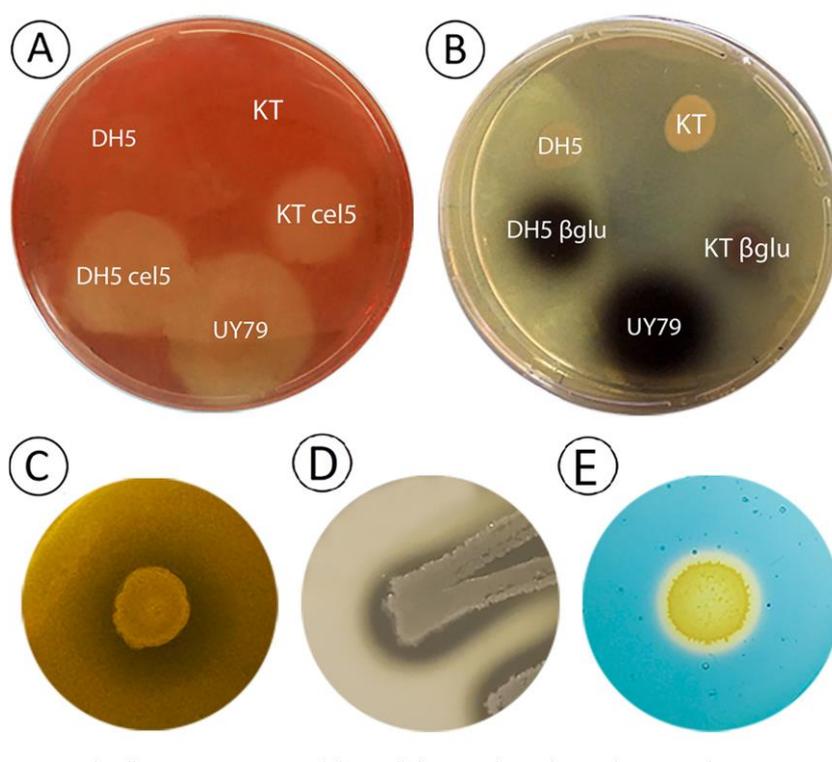
<sup>b</sup> Los compuestos volátiles fueron colectados de cultivos incubados por 7 días y se extrajeron exponiendo la fibra durante 30 min.

<sup>c</sup> RT, Tiempo de retención

<sup>d</sup> ND, no detectado

## La cepa UY79 produce enzimas que podrían estar involucradas en su capacidad antagonista

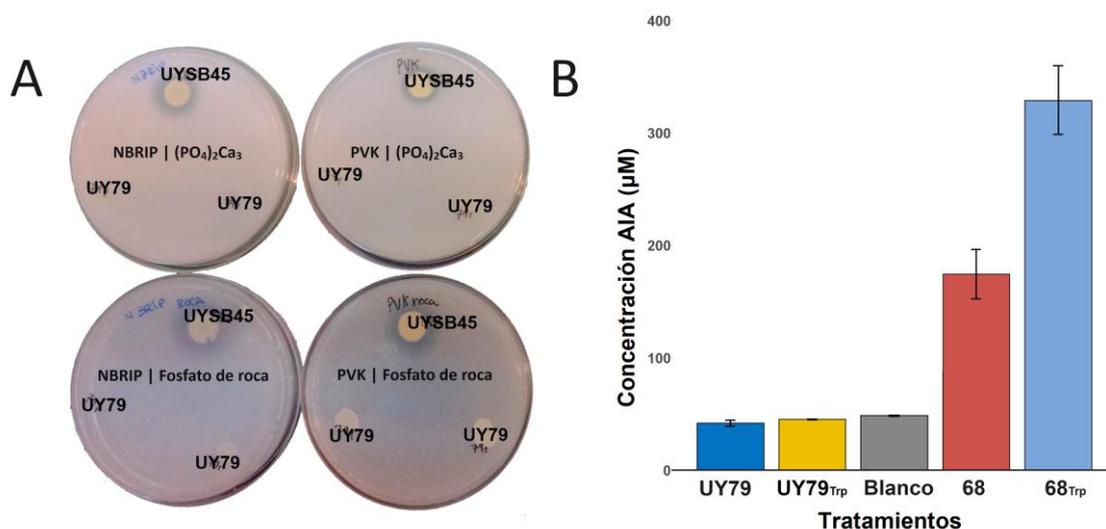
Como se muestra en la figura 11, la cepa UY79 exhibió actividad celulasa (Fig. 11A), beta-glucosidasa ( $\beta$ -glu) (Fig. 11B), xilanasa (Fig. 11C), y proteasa (Fig. 11D). Interesantemente, la cepa UY79 mostró mayor actividad celulasa y  $\beta$ -glucosidasa que los controles positivos, que son cepas de laboratorio conteniendo un plásmido que porta una celulasa o beta-glucosidasa de expresión constitutiva. La actividad xilanasa fue evidenciada sin la necesidad de tinción con rojo Congo, sugiriendo una alta actividad enzimática. Estos resultados muestran que la cepa UY79 alberga un conjunto de enzimas degradadoras de pared celular que podrían ser responsables del antagonismo mediado por compuestos difusibles. La cepa UY79 también demostró la capacidad de producir sideróforos, actividad detectada en medio CAS (Fig. 11E).



**Figura 11. *Paenibacillus* sp. UY79 posee actividad celulasa, beta-glucosidasa, xilanasa y proteasa, así como también la capacidad de producir sideróforos.** (A) La actividad celulasa fue detectada como un halo claro alrededor de las colonias creciendo en medio adicionado con carboximetil celulosa (CMC) luego de ser reveladas con rojo Congo. *E. coli* DH5 $\alpha$  cel5 (DH5 cel5) y *P. putida* KT2440 cel5 (KT cel5) se usaron como control positivo mientras que *E. coli* DH5 $\alpha$  (DH5) y *P. putida* KT2440 (KT) se usaron como control negativo. (B) la actividad  $\beta$ -glucosidasa fue detectada como un halo oscuro alrededor de las colonias crecidas en medio adicionado con esculina. *E. coli* DH5 $\alpha$   $\beta$ -glu (DH5  $\beta$ glu) y *P. putida* KT2440  $\beta$ -glu (KT  $\beta$ glu) se usaron como controles positivos, mientras *E. coli* DH5 $\alpha$  (DH5) y *P. putida* KT2440 (KT) como controles negativos. (C) La actividad xilanasa se detectó como un halo translúcido alrededor de la colonia de la cepa UY79 en medio adicionado con xilano. (D) La actividad proteolítica se detectó como un halo translúcido alrededor de las colonias de la cepa UY79 crecida en medio adicionado con leche en polvo. (E) La producción de sideróforos fue detectada en medio CAS como un halo naranja alrededor de la colonia de la cepa UY79.

## Las principales características directas de promoción del crecimiento vegetal no están presentes en la cepa UY79

Con el objetivo de evaluar si la cepa UY79 presentaba posibles mecanismos involucrados en la promoción directa del crecimiento vegetal, se evaluó la presencia del gen *nifH* involucrado en la fijación biológica de nitrógeno, la producción de ácido indolacético (AIA), y la capacidad de solubilizar compuestos fosfatados. Como se muestra en la figura S2, no se detectó la presencia del gen *nifH* mediante la técnica de PCR. La cepa UY79 tampoco es capaz de producir compuestos involucrados en la solubilización de fosfato (Fig. 12A) en ninguna de las dos fuentes de fosfato ensayadas, independientemente del medio de cultivo utilizado. Además, la cepa UY79 no produjo compuestos del tipo AIA ni en presencia ni ausencia de triptófano, mostrando la misma actividad que el blanco de reacción (Fig. 12B). Estos resultados sugieren que los principales mecanismos involucrados en la promoción del crecimiento vegetal no están presentes en la cepa UY79.

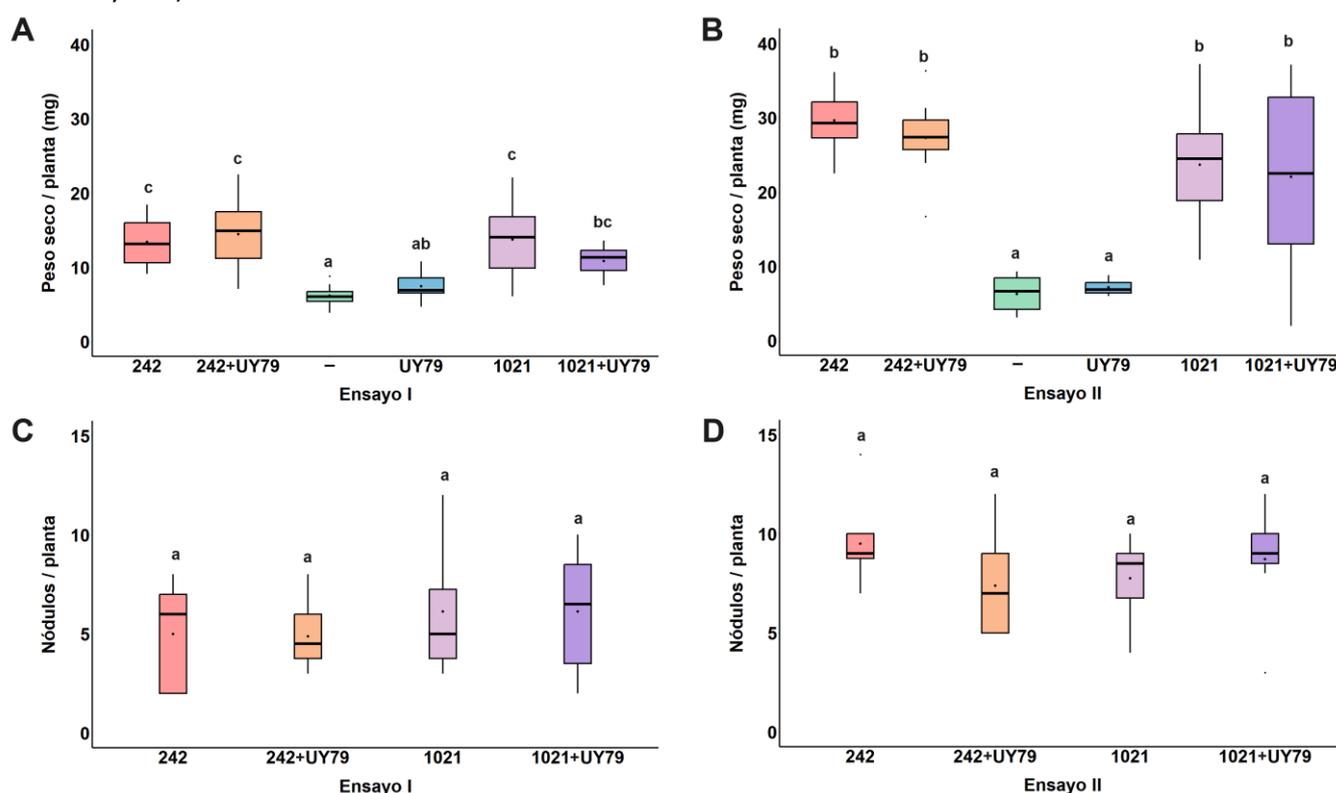


**Figura 12. Evaluación *in vitro* de características de promoción del crecimiento vegetal presentes en *Paenibacillus* sp. UY79. (A)** La solubilización de fosfato se visualiza como un halo translúcido alrededor de las colonias crecidas en medio NBRIP (izquierda) o PVK (derecha). Las fuentes de fosfato suplementadas fueron (PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>Ca<sub>3</sub> (placas de arriba) o con fosfato de roca (placas de abajo). *Pantoea* sp. UYSB45 se usó como control positivo. **(B)** Se evaluó la producción de AIA por el método colorimétrico que utiliza el reactivo de Salkowski. *Microbacterium* sp. UYFA68 (abreviada como 68 en figura) se usó como control positivo. Las condiciones adicionadas con triptófano se indican con “Trp”. Medio en ausencia de bacteria se utilizó como blanco del ensayo. Gráfico generado en R (160).

## La cepa UY79 no afecta el establecimiento de la simbiosis ni la promoción de crecimiento de alfalfa (*Medicago sativa* cv. Crioula) ejercida por rizobios

Considerando el potencial uso de la cepa UY79 como agente de control biológico para diversos cultivos, se evaluó su efecto sobre el establecimiento de la simbiosis y la promoción del crecimiento vegetal en la asociación rizobio-leguminosa. Dado que la alfalfa es uno de los cultivos de leguminosa más importante en áreas cultivadas luego de la soja (161), se utilizó el modelo alfalfa-*Ensifer meliloti*. Los resultados obtenidos muestran que la promoción del crecimiento ejercida por los rizobios, evaluada como peso seco de la parte aérea de la planta, (Fig. 13A y 13B) y el número de nódulos por planta (Fig. 13C y 13D) no se vió afectado negativamente por la co-inoculación con la cepa UY79.

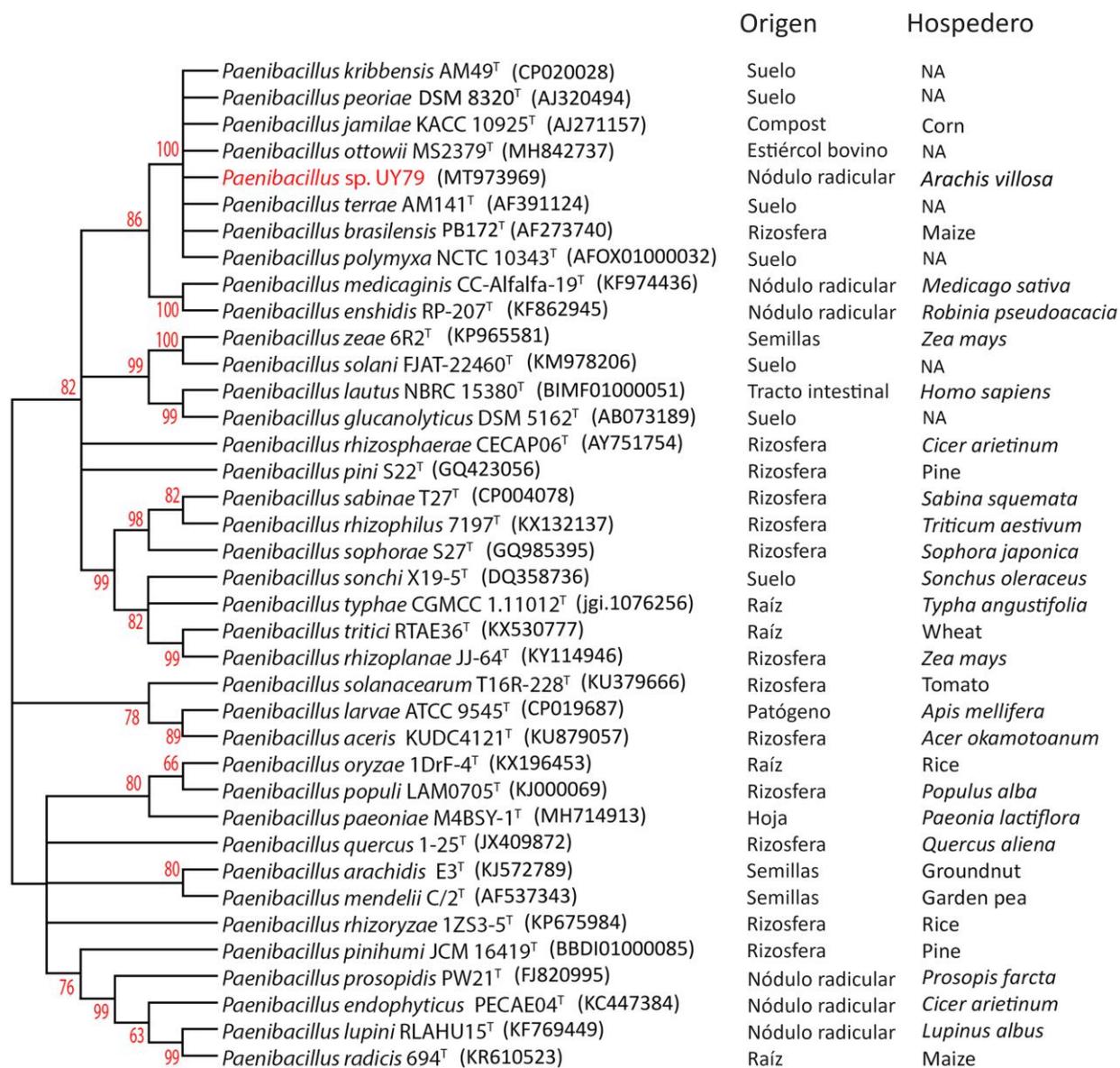
Con este experimento también pudimos determinar que la cepa UY79 no es capaz de promover de forma directa el crecimiento vegetal en plantas de alfalfa, ya que el peso seco de las plantas inoculadas con la cepa UY79 no fue significativamente distinto del control sin inocular (Fig. 13A y 13B).



**Figura 13. *Paenibacillus* sp. UY79 no afecta el establecimiento de la simbiosis ni la promoción del crecimiento ejercida por rizobios.** Peso seco de la parte aérea (A y B) y número de nódulos por planta (C y D). Los resultados del ensayo I se presentan en los paneles A y C, y los resultados del ensayo II se muestran en los paneles B y D. Se cultivaron plantas de *Medicago sativa* cv. Crioula en un medio sin nitrógeno. Las cepas *E. meliloti* 242 (242), *E. meliloti* 1021 (1021) y *Paenibacillus* sp. UY79 (UY79) fueron utilizadas para inocular las plántulas de alfalfa por separado o como co-inóculo en una mezcla 1:1, rizobio:UY79, (242 + UY79 y 1021 + UY79). Se incluyó un control negativo al cual no se lo inoculó con bacterias (-). Los datos de cada gráfico se analizaron de forma independiente según se describió en materiales y métodos; las diferentes letras en el mismo gráfico indican diferencias significativas entre los tratamientos. Gráfico generado en R (206)

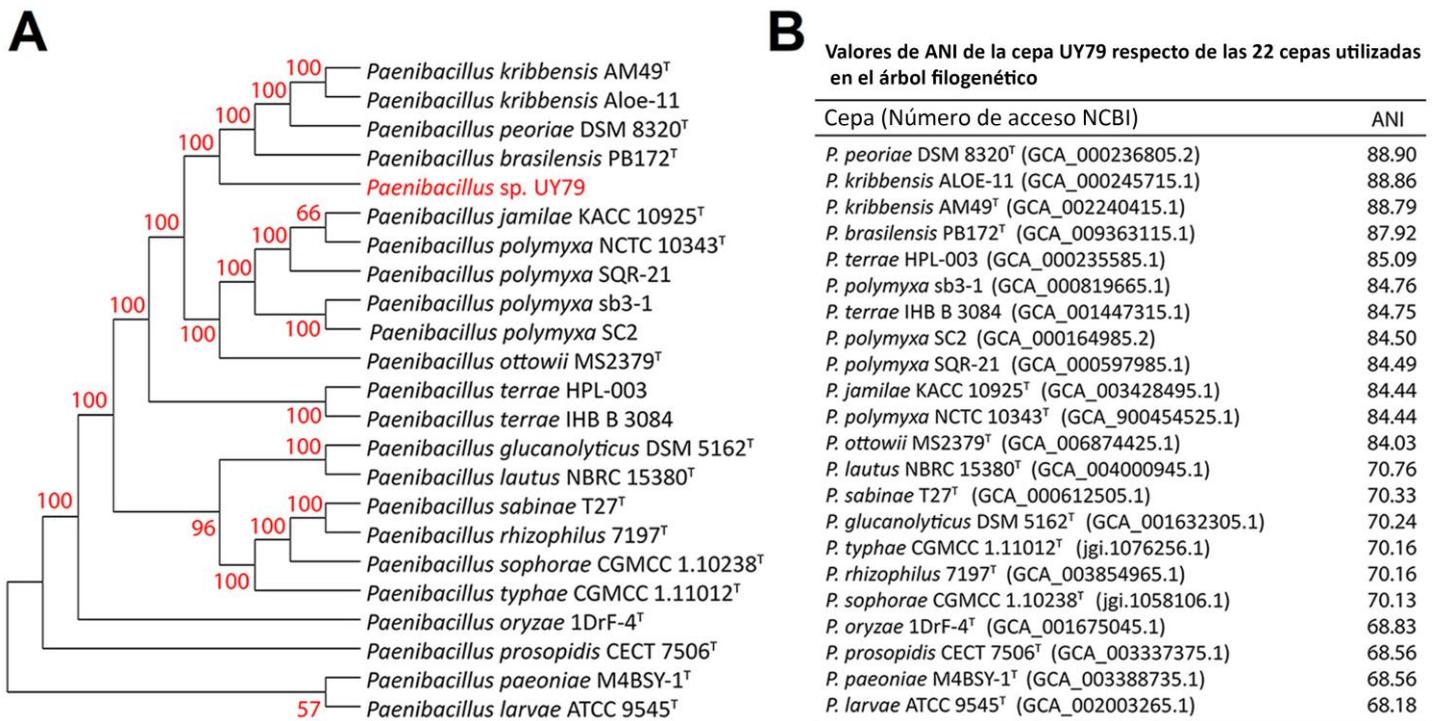
## Identificación, ensamblaje y anotación del genoma de la cepa UY79.

Previamente habíamos determinado, por amplificación, secuenciación y análisis del gen que codifica para el ARNr 16S de la cepa UY79 que se trataba de una cepa perteneciente al género *Paenibacillus*. En este trabajo profundizamos en la afiliación filogenética de la cepa secuenciando el gen en ambas direcciones, ensamblando las secuencias obtenidas y analizando la misma. Como se muestra en la figura 14, *Paenibacillus kribbensis*, *Paenibacillus peoriae*, *Paenibacillus jamilae* (recientemente reclasificada como *Paenibacillus polymyxa* (162)), *Paenibacillus ottowii*, *Paenibacillus terrae*, *Paenibacillus brasilensis* y *Paenibacillus polymyxa* forman un grupo monofilético (conocido como el complejo *Paenibacillus polymyxa* (109)), y la cepa UY79 claramente se agrupa dentro de este grupo. Determinamos también que no existe ninguna correlación entre la identidad taxonómica de los aislamientos y su origen ambiental (suelo, rizosfera, nódulos radiculares, raíz, hoja y semilla) (Fig. 14).



**Figura 14. Afiliación filogenética de la cepa *Paenibacillus sp. UY79* en base a la secuencia del gen *ARNr 16S* relativa a otras secuencias de *Paenibacillus spp.* aisladas de suelo, rizosfera, o diferentes compartimentos de plantas (nódulos radiculares, raíz, hoja, semilla). Se incluyeron en el análisis secuencias de *P. larvae* ATCC 5 9545 (patógeno de *Apis mellifera*) y de *P. lautus* NBRC15380 (patógeno humano). El árbol fue construido con MEGA X. La historia evolutiva fue inferida utilizando el método de máxima verosimilitud bajo el modelo de Kimura 2 parámetros (146). En cada nodo se muestra el porcentaje de soporte bootstrap calculado en base a 1.000 pseudorrelicas (163). Las ramas con valores de Bootstrap menores a 60% fueron colapsadas. La cepa UY79 se muestra en color rojo, las cepas tipo se indican con un superíndice "T", y el número de acceso de NCBI se muestra entre paréntesis.**

Dado que la resolución de la filogenia inferida mediante el análisis de la secuencia del *ARNr 16S* no es suficiente para discriminar entre las especies de *Paenibacillus*, secuenciamos el genoma de la cepa UY79 y realizamos un análisis de MLSA basado en secuencias concatenadas de los genes *ARNr 16S*, *gyrB*, *rpoB*, *recA* y *recN* recuperados del genoma de la cepa UY79 y de otras 22 secuencias genómicas de especies de *Paenibacillus* disponibles públicamente en GenBank. Como se muestra en la figura 15, la cepa UY79 se agrupó estrechamente con las cepas tipo de *Paenibacillus kribbensis*, *Paenibacillus brasilensis*, y *Paenibacillus peoriae* pero en una rama diferente con un soporte del 100 % basado en 1.000 pseudorrelicas de bootstrap.



**Figura 15. Afiliación taxonómica de *Paenibacillus* sp. UY79.** (A) Análisis filogenético multilocus basado en el concatenado de los genes *ARNr 16S*, *gyrB*, *rpoB*, *recA*, y *recN* (8535 posiciones) obtenidos de genomas secuenciados. El árbol fue construido usando MEGAX, el método de máxima verosimilitud y el modelo “general time reversible”. Los números en cada nodo son los porcentajes de replicas Bootstrap calculadas a partir de 1.000 réplicas. La cepa UY79 es mostrada en rojo, y cepas tipo están indicadas con un superíndice “T”. (B) Valores del promedio de identidad nucleotídica (ANI) entre la cepa UY79 y las especies más cercanas de *Paenibacillus* spp. Los números de acceso de NCBI de los genomas están mostrados entre paréntesis.

Comparando el promedio de identidad nucleotídica (ANI) del genoma de la cepa UY79 con los otros 22 genomas seleccionados de *Paenibacillus*, encontramos que los valores de ANI fueron menores a 88.9% en todos los casos (Fig. 15B) indicando que la cepa UY79 es una nueva especie dentro del género *Paenibacillus*.

El tamaño del genoma de la cepa UY79 es de 4,9 Mb y cuenta con 5.353 secuencias codificantes predichas según RAST 2.0; además la herramienta PlasFlow predijo la presencia de un plásmido con un tamaño aproximado de 43 Kb. El contenido de GC fue estimado en 46,4% (Tabla 5). Se ha encontrado una gran variación en el tamaño y contenido de GC de los genomas de cepas de *Paenibacillus*, con valores que van desde 4 hasta 8,8 Mb y 41 a 63% de contenido GC (164,165). Por lo tanto, el tamaño del genoma y el contenido de GC de la cepa UY79 se encuentra entre los valores más bajos reportados para cepas del género *Paenibacillus*.

**Tabla 5.** Estadísticas del genoma para la cepa *Paenibacillus* sp. UY79

Atributo	Valor	Herramienta utilizada
Tamaño del genoma (pb)	4.970.505	Quast v5.0.2
N° de reads depurados	12.720.648	FastQC
N° de contigs	167	Quast v5.0.2
N <sub>50</sub> (pb)	281.104	Quast v5.0.2
L <sub>50</sub> (pb)	5	Quast v5.0.2
Tamaño máximo de contig (pb)	1.146.979	Quast v5.0.2
Tamaño mínimo de contig (pb)	71	Quast v5.0.2
Cobertura promedio (X)	235,7	Bowtie2, Samtools, Bedtools
Contenido G+C (%)	46,4	Quast v5.0.2
N° de secuencias codificantes predichas	5.353	RAST 2.0
Genes ARN	109	RAST 2.0
Plásmidos	1	PlasFlow
Tamaño del plásmido (pb)	42.743	RAST 2.0
GenBank n° acceso	JAFFQR010000000	
SRA n° acceso	PRJNA697992	

## La cepa UY79 presenta en su genoma un repertorio de genes que podrían estar involucrados en el antagonismo observado

Analizamos manualmente la anotación del genoma de la cepa UY79 buscando funciones involucradas tanto en el control biológico de Hongos y Oomycetes fitopatógenos, como en posibles funciones de promoción del crecimiento vegetal. Como se muestra en la Tabla 6, se identificaron varios genes que podrían codificar enzimas hidrolíticas, entre ellos siete celulasas, tres  $\beta$ -glucosidasas, dieciséis xilanasas, dos quitinasas, y una proteasa. En cuanto a la producción de sideróforos encontramos genes relacionados con la biosíntesis de sideróforos del tipo de la achromobactina, así como genes posiblemente involucrados en la internalización de bacililbactina, ferricromo y otros sideróforos (Tabla 6).

También fueron detectados genes posiblemente involucrados en la síntesis de péptidos no ribosomales o clústers de policétidos (nonribosomal peptide-synthetase (NRPS) / Polyketide synthases (PKS)) que podrían estar relacionados con el control biológico ejercido por la cepa UY79. Para ahondar en la identificación de estas NRPS/PKS utilizamos el servidor AntiSMASH 7.1.0. Las NRPS son mega enzimas multidominio que sintetizan péptidos con una amplia gama

de bioactividades. De los 6 clústeres identificados (Tabla 6), cuatro mostraron similitud con clústeres de NRP conocidos los cuales se han reportado en la síntesis de tridecaptina, fusaricidina B y termoactinoamida A (Fig. S4 (Anexo)). Las dos NRPS restantes no mostraron similitud con clústeres conocidos. También identificamos tres clústeres de péptido sintetizado ribosomalmente y modificado postraduccionalmente (RiPP) posiblemente involucrados en la síntesis de lazo péptidos, dos de ellos identificados como paeninodina y proteusina (Tabla 6, Fig. S4 (Anexo)). Además, encontramos cuatro clústeres adicionales posiblemente involucrados en la síntesis de compuestos con una amplia gama de bioactividades, dos de ellos en la síntesis de terpenos, uno en la de fosfonatos (Tabla 6).

En base a los resultados obtenidos mediante el análisis de compuestos volátiles por GC/MS, decidimos explorar el genoma de la cepa UY79 en busca de genes posiblemente involucrados en la biosíntesis de acetoína, 2,3-butanodiol y 2-metil-1-butanol, encontrando genes candidatos para todos ellos (Tabla 6). La acetoína puede sintetizarse mediante la condensación de dos moléculas de piruvato para formar  $\alpha$ -acetolactato mediante una acetolactato sintasa. Luego, el  $\alpha$ -acetolactato puede convertirse en (3R)-acetoína en una reacción catalizada por la  $\alpha$ -acetolactato descarboxilasa (*ald*). Alternativamente, el  $\alpha$ -acetolactato puede descomponerse espontáneamente en diacetilo mediante descarboxilación oxidativa. El diacetilo puede reducirse posteriormente a (3S)-acetoína en una reacción catalizada por una diacetil reductasa (166,167). Si bien no se encontró ortólogo del gen *ald* en el genoma de la cepa UY79, se identificó un gen que codifica una presunta diacetil reductasa (Tabla 6). Por lo tanto, la acetoína podría sintetizarse en la cepa UY79 mediante la reducción de diacetilo, produciendo el enantiómero 3S. La acetoína puede reducirse a 2,3-butanodiol mediante una butanodiol deshidrogenasa (167), que también se identificó en el genoma de la cepa UY79 (Tabla 6). En cuanto a la presencia de genes posiblemente involucrados en la producción de 2-metil-1-butanol, identificamos una aminoácido amino transferasa (E.C. 2.6.1.42), una 2-cetoácido descarboxilasa, y una alcohol deshidrogenasa (E.C. 1.1.1.1), que podrían participar de la conversión de cetoisovalerato a 2-metilisobutiraldehído y luego a 2-metil-1-butanol (168).

En concordancia con los resultados obtenidos mediante los análisis *in vivo*, no encontramos un ortólogo del gen *nifH* (tampoco del *anfH* y *vnfH*, pertenecientes a nitrogenasas alternativas), ni genes de producción de auxinas en el genoma de la cepa UY79. Sin embargo, identificamos un gen potencialmente relacionado con la solubilización de fosfato ya que fue anotado como una fosfatasa alcalina (ID= UY79\_2289) (Tabla 6).

Estos resultados, junto con los datos obtenidos en el ensayo de plantas de alfalfa, donde no se observó promoción del crecimiento en plantas inoculadas con la cepa UY79 (Fig. 13), sugieren que la cepa UY79 no es una bacteria promotora directa del crecimiento vegetal.

Respecto a otras características relevantes para la colonización de la rizosfera, la aptitud de un estilo de vida endofítico se examinó el genoma en busca de genes relacionados con la motilidad bacteriana. Como se muestra en la Tabla 6, se identificaron algunos genes posiblemente involucrados en la motilidad.

Utilizando las herramientas bioinformáticas PROPHAGE HUNTER, identificamos ocho regiones profágicas en el genoma de la cepa UY79, cinco de ellas predichas como activas, mientras que utilizando PHASTER solo se predijeron dos como activas (Tabla 6). Curiosamente, detectamos varias regiones relacionadas con CRISPR: 84 repeticiones CRISPR y 76 espaciadores CRISPR, distribuidos entre 8 conjuntos de CRISPR, y dos sistemas CRISPR/CAS con la siguiente disposición de proteínas: Cas3-Cas5-Csd1(Cas8c)-Csd2/Csh2(Cas7)-Cas4-Cas1-Cas2, correspondiendo al

sistema de Tipo I-C; y Cmr6-Cmr1-Cmr2-Cmr3-Cmr4-Cmr5-Cmr6, correspondo al sistema de Tipo III-B (Tabla 6). Sistemas similares también se han descrito en *P. polymyxa* A18 (Tipo I-C y III-B), *Bacillus halodurans* (Tipo I-C) y *Pyrococcus furiosus* (Tipo III-B) (169,170).

**Tabla 6.** Proteínas o genes de interés para este trabajo detectados mediante el análisis del genoma de *Paenibacillus* sp. UY79

Actividad putativa	Función predicha	RAST ID	Herramienta utilizada
<b>Actividad celulasa</b>			
	Cellulose 1,4-beta-cellobiosidase (reducing end) (EC 3.2.1.176)	UY79_2001	RAST
	Cellulose 1,4-beta-cellobiosidase (reducing end) (EC 3.2.1.176)	UY79_4217	RAST
	Endo-1,4-beta-glucanase (cellulase) (EC 3.2.1.4)	UY79_2748	RAST
	Endo-1,4-beta-glucanase E1precursor (EC 3.2.1.4)	UY79_2705	RAST
	Endo-1,4-beta-glucanase B precursor (EC 3.2.1.4)	UY79_948	RAST
	Endoglucanase	UY79_2712	RAST
	Endo-beta-1,3-1,4 glucanase (licheninase) (EC 3.2.1.73)	UY79_916	RAST
<b>Actividad Beta-glucosidase</b>			
	Beta-glucosidase (EC 3.2.1.21)	UY79_4825	RAST
	Beta-glucosidase (EC 3.2.1.21)	UY79_1789	RAST
	Beta-glucosidase (EC 3.2.1.21)	UY79_1150	RAST
<b>Actividad quitinasa</b>			
	Chitinase (EC 3.2.1.14)	UY79_3954	RAST
	Chitin binding protein	UY79_1619	RAST
<b>Actividad xilanasa</b>			
	Endo-1,4-beta-xylanase A precursor (EC 3.2.1.8)	UY79_5258	RAST
	Endo-1,4-beta-xylanase A precursor (EC 3.2.1.8)	UY79_5194	RAST
	Endo-1,4-beta-xylanase (EC 3.2.1.8)	UY79_5111	RAST
	Endo-1,4-beta-xylanase (EC 3.2.1.8)	UY79_3919	RAST
	Endo-1,4-beta-xylanase A precursor (EC 3.2.1.8)	UY79_3218	RAST
	Endo-1,4-beta-xylanase A precursor (EC 3.2.1.8)	UY79_3217	RAST
	Endo-1,4-beta-xylanase (EC 3.2.1.8)	UY79_3987	RAST
	Endo-1,4-beta-xylanase A precursor (EC 3.2.1.8)	UY79_2728	RAST
	Endo-1,4-beta-xylanase A precursor (EC 3.2.1.8)	UY79_2727	RAST
	Endo-1,4-beta-xylanase A precursor (EC 3.2.1.8)	UY79_2726	RAST
	Endo-1,4-beta-xylanase (EC 3.2.1.8)	UY79_203	RAST
	Endo-1,4-beta-xylanase (EC 3.2.1.8)	UY79_178	RAST
	Endo-1,4-beta-xylanase (EC 3.2.1.8)	UY79_907	RAST
	Xylan 1,4-beta-xylosidase (EC 3.2.1.37)	UY79_1887	RAST
	Xylan 1,4-beta-xylosidase (EC 3.2.1.37)	UY79_135	RAST
	Xylan alpha-1,2-glucuronosidase (EC 3.2.1.131)	UY79_134	RAST
<b>Actividad proteasa</b>			
	Bacillopeptidase F	UY79_2733	RAST

<b>Producción de HCN</b>	No encontrado	
<b>NRPS, RiPP y otros antimicrobianos</b>		
NRPS: Tridecaptin	UY79_5151-5154, UY79_5160-5164 UY79_rep262-267	RAST, antiSMASH
NRPS-like	UY79_3011, UY79_3014, UY79_3016-17, UY79_3028-29, UY79_3034, UY79_3038, UY79_3043	RAST, antiSMASH
NRPS: Thermoactinoamide A	UY79_2548, UY79_2553, UY79_2566-2567, UY79-2575, UY79_2582, UY79_2586	RAST, antiSMASH
NRPS: Fusaricidin B	UY79_2158-2160, UY79_2171-2179, UY79_rep120-123	RAST, antiSMASH
NRPS: Tridecaptin	UY79_2077-2078, UY79_2080-2081, UY79_2086, UY79_2093-2096, UY79_rep111-114 UY79_2094-2093	RAST, antiSMASH
NRPS	UY79_1857	RAST, antiSMASH
RiPP - Lasso peptide Paeninodin	UY79_3787, UY79_3792-3795, UY79_3797-3798, UY79_3805, UY79_3807	antiSMASH
Phosphonate	UY79_34-36, UY79_39-41, UY79_43, UY79_45-48, UY79_52-54	antiSMASH
Proteusin	UY79_3912-3913, UY79_3920, UY79_3922-3923, UY79_3929	
RiPP-like / putative TOMM Microcin (lassopeptide)	UY79_495	RAST, antiSMASH
Terpene	UY79_497	RAST, antiSMASH
Terpene	UY79_1339, UY79_1341, UY79_1344-1350, UY79_1350	RAST, antiSMASH

**Fijación de Nitrógeno**

Nitrogenase iron protein, NifH	No encontrado
--------------------------------	---------------

**Producción de auxinas**

Indole acetic acid synthesis	No encontrado
------------------------------	---------------

**Solubilización de fosfatos**

Alkaline phosphatase (EC 3.1.3.1)	UY79_2289	RAST
-----------------------------------	-----------	------

**Biosíntesis de sideróforos y transporte de Fe / sideróforo**

ABC transporter (iron/B12/siderophore/hemin), PBP	UY79_5210	RAST
---	-----------	------

Siderophore biosynthesis diaminobutyrate--2-oxoglutarate aminotransferase (EC 2.6.1.76)	UY79_5202	RAST, antiSMASH
---	-----------	-----------------

PF06276.12 (Ferric iron reductase FhuF-like transporter)	UY79_5200	antiSMASH
--	-----------	-----------

Achromobactin biosynthesis protein, AcsC-like	UY79_5199	RAST, antiSMASH
---	-----------	-----------------

Achromobactin biosynthesis protein AcsB	UY79_5198	RAST, antiSMASH
---	-----------	-----------------

Diaminopimelate decarboxylase (EC 4.1.1.20)	UY79_5197	RAST, antiSMASH
---	-----------	-----------------

Achromobactin biosynthesis protein AcsA @ Siderophore synthetase superfamily, group B	UY79_5196	RAST, antiSMASH
---	-----------	-----------------

ABC-type Fe3+-siderophore transport system, PBP	UY79_5186	RAST
---	-----------	------

Fe-bacillibactin uptake system FeuB	UY79_5185	RAST
-------------------------------------	-----------	------

ABC-type Fe3+-siderophore transport system, permease	UY79_5184	RAST
--	-----------	------

ABC-type Fe3+-siderophore transport system	UY79_5183	RAST
--	-----------	------

Ferrichrome transport ATP-binding protein FhuC	UY79_4883	RAST
--	-----------	------

Ferric uptake regulation protein Fur	UY79_4700	RAST
--------------------------------------	-----------	------

Fe-bacillibactin uptake system FeuC	UY79_3500	RAST
-------------------------------------	-----------	------

Siderophore transport protein	UY79_3038	RAST
-------------------------------	-----------	------

Ferrichrome transport system permease protein FhuB	UY79_4121	RAST
--	-----------	------

Ferrichrome transport system permease protein FhuG	UY79_4120	RAST
--	-----------	------

ABC-type Fe3+-siderophore transport system, permease	UY79_2524	RAST
--	-----------	------

ABC-type Fe3+-siderophore transport system, permease	UY79_2038	RAST
--	-----------	------

Ferrous iron transport periplasmic protein EfeO,	UY79_1725	RAST
--	-----------	------

Ferrous iron transporter FeoB	UY79_1175	RAST
-------------------------------	-----------	------

	Ferrichrome-binding periplasmic protein precursor (TC 3.A.1.14.3)	UY79_825	RAST
<b>Motilidad</b>			
	<i>fla/che</i> operon	UY79_2937-2983, UY79_3019	RAST
	Large flagellar gene cluster	UY79_4992-5014	RAST
	Stator operon <i>motAB</i>	UY79_5051-5052, UY79_4227-4228	RAST
<b>Genes posiblemente involucrados en la producción de compuestos volátiles</b>			
	Acetolactate synthase (E.C. 2.2.1.6)	UY79_3438-3439, UY79_5281	RAST
	Acetoin biosynthesis (E.C. 1.1.1.304)	UY79_4819	BLASTP, HMMER, PFAM, HHPRED, MODELLER
	2,3-butanediol biosynthesis (E.C. 1.1.1.4)	UY79_2598	BLASTP, HMMER, PFAM, HHPRED, MODELLER
	2-methyl-1-butanol biosynthesis (Amino acid aminotransferase E.C. 2.6.1.42)	UY79_1834	RAST, BLASTP, HMMER, PFAM,
	2-methyl-1-butanol biosynthesis (2-ketoacid decarboxylase)	UY79_2174	BLASTP, HMMER, PFAM, HHPRED, MODELLER
	2-methyl-1-butanol biosynthesis (Alcohol dehydrogenase EC 1.1.1.1)	UY79_273, UY79_705, UY79_1349, UY79_2626, UY79_4296	RAST
<b>Sistemas CRISPR/Cas</b>			
	CRISPR-associated protein Cas1, Cas2, Cas3, Cas4, Cas5, Csd1(Cas8c), Csd2/Csh2(Cas7)	UY79_1015, UY79_5311-5317	
	CRISPR-associated RAMP Cmr1, Cmr2; Cmr3, Cmr4, Cmr5, Cmr6	UY79_1469-1464 UY79_1471, UY79_1472, UY79_1534	
<b>Quorum sensing</b>			
	Cyclic-lactone-autoinducer	UY79_418-419	antiSMASH
	Cyclic-lactone-autoinducer	UY79_1876-1877	antiSMASH
	Cyclic-lactone-autoinducer	UY79_2388	antiSMASH
	Cyclic-lactone-autoinducer	No encontrado	antiSMASH
	Cyclic-lactone-autoinducer	No encontrado	antiSMASH
<b>Fagos</b>			
	<i>Tenacibaculum</i> phage pT24 ( <i>Myoviridae</i> family)	UY79_2931-2972	Prophage hunter (A <sup>a</sup> )

<i>Vibrio</i> phage phi2 ( <i>Myoviridae</i> family)	UY79_383-469	Prophage hunter (A) Phaster (I <sup>b</sup> )
<i>Brevibacillus</i> phage Jimmer2 ( <i>Myoviridae</i> family)	UY79_3611-3691	Prophage hunter (A) Phaster (I)
<i>Bacillus</i> phage vB BtS BMBtp14 ( <i>Siphoviridae</i> family)	UY79_1908-1998	Prophage hunter (A) Phaster (IN <sup>c</sup> )
<i>Paenibacillus</i> phage Shelly ( <i>Siphoviridae</i> family)	UY79_2361-2429	Prophage hunter (AM <sup>d</sup> ) Phaster (IN)
<i>Lactococcus</i> phage bIL312 ( <i>Siphoviridae</i> family)	UY79_4988-5025	Prophage hunter (A)
<i>Paenibacillus</i> phage PG1 ( <i>Siphoviridae</i> family)	UY79_3855-3385	Prophage hunter (AM) Phaster (IN)
<i>Moraxella</i> phage mcat7 ( <i>Siphoviridae</i> family)	UY79_4609-4645	Prophage hunter (AM)

---

<sup>a</sup>A: activo

<sup>b</sup>I: intacto

<sup>c</sup>IN: incompleto

<sup>d</sup>AM: ambiguo

## Discusión

En este trabajo informamos sobre la identificación, la caracterización funcional y análisis del genoma de la cepa UY79 de *Paenibacillus*, aislada de un nódulo de *A. villosa*. Si bien durante muchos años se consideró que los nódulos de leguminosas estaban exclusivamente ocupados por rizobios, se ha demostrado que éstos también albergan una comunidad diversa de microorganismos. Bacterias pertenecientes al género *Paenibacillus* son habitualmente encontradas como miembros del microbioma de los nódulos de raíces (103,104,106). El rol que estos cohabitantes juegan en el nódulo no se comprende completamente, pero se ha observado que algunas cepas poseen actividad de biocontrol contra fitopatógenos. Muchas especies de *Paenibacillus* han demostrado actividad antagonista contra diferentes hongos y Oomycetes fitopatógenos (46,108), incluyendo cepas aisladas de nódulos de leguminosas (109). Además, diversos agentes comerciales de biocontrol se basan en especies de *Paenibacillus* (46). Estas observaciones nos motivaron a investigar el potencial de la cepa UY79 de *Paenibacillus* sp. como agente de control biológico.

Según el análisis de ANI de veintidós genomas de *Paenibacillus* spp. disponibles públicamente (Fig. 15B), la filogenia del ARNr 16S (Fig. 14) y el análisis MLSA (Fig. 15A), concluimos que la cepa UY79 es una nueva especie dentro del género *Paenibacillus* que pertenece al complejo *P. polymyxa*. Este complejo abarca seis especies de *Paenibacillus* (*P. brasiliensis*, *P. kribbensis*, *P. ottowii*, *P. peoriae*, *P. polymyxa* y *P. terrae*), y hasta hace muy poco no se habían aislado de nódulos radiculares cepas pertenecientes a este complejo. En 2021, Ali y colaboradores (109) informaron el aislamiento de cepas de *P. peoriae* a partir de nódulos de *Robinia pseudoacacia* y *Dendrolobium triangulare*, y cepas de *P. kribbensis* a partir de nódulos de *Ormosia semicastrata*; por lo tanto, hasta donde sabemos, *Paenibacillus* sp. UY79 es el tercer representante del complejo *P. polymyxa* que se aísla a partir de nódulos radiculares. Se deben realizar investigaciones adicionales para establecer qué características contribuyen a que las especies de *Paenibacillus* formen parte del complejo *P. polymyxa* y por qué las especies de *Paenibacillus* son integrantes frecuentes de la microbiota de los nódulos de leguminosas. Estudios genómicos comparativos entre cepas de *Paenibacillus* que habitan en nódulos y otras cepas de *Paenibacillus* podrían ayudar en el futuro cercano a comprender este comportamiento.

En cuanto a la caracterización funcional, la cepa UY79 demostró una notable capacidad de antagonismo. Mediante la producción de compuestos difusibles, la cepa UY79 fue capaz de inhibir el crecimiento de todos los hongos (incluidos los hongos fitopatógenos relevantes) y los dos Oomycetes fitopatógenos analizados (Fig. 8). El género *Paenibacillus* se caracteriza por ser una rica fuente de metabolitos secundarios con diversas actividades de interés biotecnológico. Muchas especies son capaces de inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos a través de la producción de compuestos difusibles con actividad antimicrobiana (48). Nuestros resultados refuerzan esta característica del género. La actividad antagonista de la cepa UY79 está presente en sobrenadantes libres de células y la producción/actividad del compuesto se mantiene aún a las 96 horas de crecimiento (Fig. 9). Esta es una característica prometedora en vista de una posible aplicación de estos compuestos inhibidores como supresores de patógenos en el campo.

Según el análisis del genoma, la cepa UY79 tendría el potencial de producir una variedad de compuestos con actividad antimicrobiana. Se encontró un clúster que podría estar involucrado

en la síntesis de un compuesto similar a la fusaricidina B (Tabla 6). Las fusaricidinas son péptidos no ribosomales producidos por el género *Paenibacillus* que exhiben actividad antagonista contra diversos hongos y también contra bacterias Gram-negativas (171). Consisten en un lipopéptido cíclico con seis aminoácidos y una cadena de ácido graso inusual de ácido 15-guanidino-3-hidroxipentadecanoico (172). Hay cuatro tipos de fusaricidinas conocidas (fusaricidinas A-D), las cuales muestran una secuencia de péptidos general L-Thr-X1-X2-D-allo-Thr-X3-D-Ala. Utilizando la herramienta bioinformática antiSMASH la secuencia de péptidos predicha para la fusaricidina de la cepa UY79 fue Ser-D-Val-Ser-D-Ser-Ser-D-Asn-Ala, que difiere de la reportada para las fusaricidinas conocidas. Por lo tanto, con los datos disponibles no podemos establecer si la cepa UY79 codifica una nueva fusaricidina o un compuesto diferente con una estructura molecular similar a la de las fusaricidinas. Para comprobar su producción y profundizar en la identificación del compuesto es necesario utilizar aproximaciones como la cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas y/o espectroscopia de resonancia magnética nuclear. Además, disponer de un genoma cerrado de alta calidad permitiría mejorar significativamente las anotaciones, especialmente cuando existen secuencias repetidas como en el caso de las NRPS.

El análisis del genoma también predijo otras cinco NRPS, dos de estos 5 clústeres de NRPS podrían estar involucrados en la síntesis de compuestos similares a la tridecaptina ya que presentan un 100% y 40% de genes con identidad de secuencia respecto a clústeres conocidos (Fig. S4 (Anexo)). Las tridecaptinas consisten en tridecapeptidos lineales acetilados que exhiben una fuerte actividad antibacteriana selectiva contra bacterias Gram-negativas y una actividad moderada contra bacterias Gram-positivas (173,174). Son producidas por especies de *Bacillus* y *Paenibacillus*, incluidas cepas del complejo *P. polymyxa* (175,176). De los 3 NRPS restantes, uno fue identificado posiblemente como termoactinoamida A presentando homología el 100% de los genes respecto del clúster de referencia (Fig. S4 (Anexo)). La termoactinoamida A, identificada inicialmente en *Thermoactinomyces vulgaris* ISCAR 2354, se trata de un hexa péptido cíclico que contiene en su estructura tanto L como D aminoácidos (177). La termoactinoamida A tiene actividad antibacteriana selectiva contra *Staphylococcus aureus* (177) y actividad antitumoral en modelo cáncer pancreático (178). Recientemente ha sido identificada en el genoma de especies de *Paenibacillus* y *Bacillus* (179–181). Della Sala y colaboradores (178) observaron que *Thermoactinomyces vulgaris* DSM 43016 produce termoactinoamida A y 10 variantes estructurales del compuesto a partir de un solo clúster biosintético. Teniendo esto en cuenta y que solo una de las estructuras fue caracterizada funcionalmente, resulta interesante pensar en el potencial biotecnológico que este clúster y sus productos presentan. Como se mencionó anteriormente, para comprobar la producción de termoactinoamida A por la cepa UY79 y para profundizar en la caracterización estructural se requieren de análisis más exhaustivos.

Además, se identificaron en el genoma de la cepa UY79 tres clústeres de péptidos sintetizados ribosomalmente y modificados post-traduccionalmente (RiPPs), y otros tres compuestos no proteicos (fosfonatos y terpenos). Respecto a los clústeres de RiPP, uno de ellos presenta un 40% de genes con identidad de secuencia respecto al lazo péptido paeninodina (Fig. S4 (Anexo)), el cual fue identificado inicialmente en la cepa *Paenibacillus dendritiformis* C454 (182). Los lazo péptidos tienen una estructura única que consta de 16-21 residuos, producidos por clústeres de organización única y bien conservada (183). Algunos lazo péptidos poseen actividades antimicrobianas y antivirales (184), siendo el más conocido la microcina. Los dos RiPP restantes carecen de homología con clústeres de referencia y se identificaron como posibles proteusinas

y microcinas. Las proteusinas son una familia recientemente identificada de RiPP, mayormente reportadas mediante análisis *in silico*. Algunas proteusinas han sido aisladas y caracterizadas, mostrando actividad antiviral y antibacteriana (185). Van Quyen y colaboradores (185) encontraron la presencia de genes que podrían estar involucrados en la síntesis de proteusinas el genoma de *P. polymyxa* #23.

En cuanto a los clústeres de terpenos y fosfonatos, ninguno presenta homología con clústeres biosintéticos de referencia, lo que sugiere que podrían tratarse de compuestos novedosos aún no identificados. Los terpenos, el grupo más diverso de compuestos orgánicos, tienen un esqueleto hidrocarbonado básico caracterizado por unidades de isopreno que forman un polieno lineal con grupos metilo ramificados. Este esqueleto se modifica posteriormente, generando la gran diversidad de estructuras dentro de este grupo (186). Algunos terpenos poseen actividad antimicrobiana y propiedades terapéuticas contra el cáncer y la malaria (187), mientras que otros proporcionan ventajas adaptativas como la resistencia al estrés oxidativo en las esporas de *B. subtilis* (188).

Los fosfonatos son ácidos organofosfóricos caracterizados por presentar un enlace carbono-fósforo que les confiere una notable bioactividad, estabilidad y resistencia a la hidrólisis química, descomposición térmica, fotólisis y degradación enzimática (189). Algunos fosfonatos poseen actividad antibacteriana, antiviral y antifúngica (189,190), como las rhizocinas, un oligopéptido de fosfonato producido por *Bacillus subtilis* ATCC6633 (190).

En resumen, la cepa UY79 posee excelentes propiedades de control biológico contra hongos y oomycetes fitopatógenos lo que la hacen una buena cepa candidata para ser utilizada como agente de control biológico. La presencia de múltiples genes responsables de la biosíntesis de compuestos bioactivos, como tridecaptinas, fusaricidina B, termoactinoamida A y posibles variantes de la misma, fosfonatos, terpenos, paeninodina, microcina, proteusina y otros NRPs, sugiere un enorme potencial para producir una variedad de metabolitos secundarios con propiedades antimicrobianas potentes. Estos metabolitos pueden ser explotados para el desarrollo de nuevos medicamentos y tratamientos terapéuticos, ofreciendo alternativas innovadoras para combatir infecciones resistentes a los antibióticos y otras enfermedades. Por lo tanto, el amplio y diverso repertorio de compuestos bioactivos que esta cepa potencialmente produciría no solo la posiciona como un prometedor agente de control biológico, sino también como una fuente prometedora de nuevos compuestos bioactivos con aplicación biotecnológica en la industria farmacéutica, la salud y en múltiples sectores de interés.

Otros mecanismos involucrados en la protección de las enfermedades vegetales causadas por fitopatógenos se basan en la producción de enzimas hidrolíticas. Las enzimas capaces de degradar la pared celular de hongos y Oomycetes (quitinasas, celulasas,  $\beta$ -1,3-glucanasas) antagonizan el crecimiento micelial, mientras que las xilanasas pueden actuar como activadoras de la resistencia sistémica de las plantas (44,45) y las celulasas y  $\beta$ -glucosidasas pueden estar implicadas en facilitar la colonización del tejido vegetal permitiendo un estilo de vida endofítico bacteriano (46). Mediante un análisis funcional, encontramos que la cepa UY79 tiene actividad  $\beta$ -glucosidasa, celulasa y xilanasas (Fig. 11), y mediante la minería del genoma identificamos varios genes que podrían codificar estas enzimas (Tabla 6). Sin embargo, la presencia de estas actividades hidrolíticas no indica necesariamente que estén involucradas en el control biológico. Por ejemplo, Ali et al. (109) encontraron recientemente que la actividad  $\beta$ -1,3-glucanasa y quitinasa exhibida por algunas cepas de *Paenibacillus* sp. no estaba involucrada en su actividad antifúngica. Para confirmar si las actividades hidrolíticas observadas están relacionadas con el

antagonismo, es necesario la generación de cepas knockout para genes de interés como método de prueba de hipótesis. Estas cepas serían evaluadas en los mismos ensayos de inhibición de fitopatógenos para determinar el impacto de la ausencia del gen en la capacidad de la cepa para suprimir patógenos. De observar un fenotipo, el siguiente paso sería complementar la cepa knockout introduciendo el gen intacto en un plásmido, con el fin de evaluar si se restaura la capacidad de inhibir a los fitopatógenos.

El análisis funcional evidenció también la capacidad de la cepa UY79 de producir sideróforos. Los principales sideróforos producidos por el género *Paenibacillus* son paenibactina y bacillibactina (48). Mediante el análisis del genoma fueron identificados genes posiblemente involucrados en la síntesis del sideróforo staphyloferrin B o en su defecto acromobactina (Tabla 6), los cuales hasta donde sabemos no están reportados para especies de *Paenibacillus*. Además, se identificaron genes que podrían estar involucrados en la captación de los sideróforos bacillibactina y ferricromo (Tabla 6) lo que otorgaría a la cepa UY79 la capacidad de llevar a cabo pirateo de sideróforos. A los sideróforos producidos por bacterias asociadas a plantas se les han asignado diferentes funciones. Pueden ser responsables de la patogenicidad, como el sideróforo producido por *Erwinia chrysanthemi*, o pueden promover el crecimiento de las plantas a través de la solubilización del hierro o al controlar fitopatógenos (191–193). Al momento no tenemos suficiente información para determinar el papel que pueda estar jugando el/los sideróforos producidos por la cepa UY79 en el control biológico; sin embargo, considerando que los ensayos antagonistas realizados en este trabajo se llevaron a cabo en medio PDA con suficiente hierro, podemos especular que el sideróforo no se estaba produciendo y, por lo tanto, no contribuyó a la actividad antifúngica observada.

La cepa UY79 también fue capaz de inhibir el crecimiento de la mayoría de los hongos y Oomycetes evaluados mediante la producción de compuestos volátiles (Fig. 10). Este es un atributo interesante, ya que el uso de VCs para el biocontrol de fitopatógenos presenta algunas ventajas: i) pueden inducir resistencia sistémica en las plantas, ii) pueden usarse en condiciones donde el contacto físico entre el patógeno y el ACB no es posible, y iii) dejan menos residuos en el medio ambiente una vez aplicados (108). Además, los compuestos volátiles pueden participar en una gran cantidad de interacciones intra e inter-reino (67). En este contexto, el estudio del volatiloma producido por bacterias es un tema que ha suscitado un gran interés en los últimos años.

Mediante el análisis del volatiloma determinamos que la cepa *Paenibacillus* sp. UY79 es capaz de producir acetoína, 2,3-butanodiol y 2-metil-1-butanodiol creciendo tanto enfrentada a *S. rolfsii* 1954, como en ausencia del hongo (Tabla 3 y 4) e identificamos algunos genes posiblemente involucrados en las vías biosintéticas de estos compuestos (Tabla 6). Khalaf y Raizada (194) informaron que de 37 aislados de *Paenibacillus* sp. analizados, 18 de ellos eran capaces de producir acetoína y 2,3-butanodiol, y que la capacidad para producir estos compuestos se correlaciona con el antagonismo (194). Recientemente, Wu et al. (195) informaron que la acetoína era el principal VOC producido por una cepa de *Bacillus amyloloquefaciens* y que este compuesto era capaz de reducir el crecimiento micelial de *Botrytis cinera*, aunque con baja actividad antifúngica. Hasta donde sabemos, el mecanismo involucrado en el antagonismo fúngico ejercido por la acetoína aún no se ha descifrado. En el caso del 2-metil-1-butanol, Raza y colaboradores (196) determinaron que la cepa *P. polymyxa* WR-2 es capaz de producir este compuesto, el cual demostró inhibir completamente el crecimiento de *F. oxysporum*. La supresión del crecimiento micelial, la germinación de los conidios y la formación de apresorios se encuentran entre los mecanismos descritos que participan en el efecto

antagonista del 2-metil-1-butanol contra los hongos (197). Si bien estos tres compuestos podrían ser responsables del antagonismo (194,196,197) observado, se requerirán mayores esfuerzos para establecer si realmente están involucrados en la actividad antimicrobiana ejercida por la cepa UY79. Tampoco podemos descartar que otros compuestos presentes en el volatiloama sean responsables de la actividad antimicrobiana.

Es interesante destacar que, mediante el análisis del genoma, encontramos la presencia de diferentes sistemas involucrados en una posible antibiosis (NRPs, RiPP, fosfonatos y terpenos), señalización de quorum sensing y producción de profagos, así como varias regiones involucradas en la respuesta inmunitaria antiviral adaptativa CRISPR/Cas (Tabla 6). Estos resultados, junto con la capacidad de producir diversos compuestos difusibles y volátiles con actividad antagonista frente a hongos y Oomycetes, sugieren que la cepa UY79 podría coexistir o interferir con varios microorganismos asociados al suelo y las plantas, quizás modulando la microbiota asociada a las plantas, como se ha descrito para otras cepas de *Paenibacillus* que habitan en nódulos (104,198).

Si bien se ha reportado que muchas especies de *Paenibacillus* son promotoras directas del crecimiento vegetal (109), los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que la cepa UY79 no sería un promotor directo, ya que los principales mecanismos involucrados no fueron detectados en las condiciones ensayadas (Fig. S2 (Anexo) y 12) y no se evidenció promoción del crecimiento en plantas de alfalfa cuando se inocularon con la cepa UY79 (Fig. 13). En ese sentido, Agarás y colaboradores (199) después de evaluar múltiples rasgos que podrían estar involucrados en el control biológico y la promoción directa del crecimiento de las plantas por *Pseudomonas*, encontraron que "el mayor potencial antagónico fúngico junto con el mayor potencial directo de promoción del crecimiento de las plantas rara vez convergen en un solo aislado de *Pseudomonas*". Una conclusión similar fue reportada recientemente por Ali et al. (109) después de realizar un análisis de minería del genoma en cepas dentro del complejo *P. polymyxa*.

Mediante el mineo del genoma, identificamos el gen UY79\_2289 que podría estar involucrado en la solubilización de fosfato (Tabla 6) y genes involucrados en la posible biosíntesis e internalización de sideróforos. El hecho de haber obtenido un resultado negativo en el ensayo de solubilización de fosfatos en relación a la presencia del gen UY79\_2289 podría explicarse por una baja sensibilidad del ensayo o simplemente deberse a que el gen no se expresa en las condiciones ensayadas, o no está cumpliendo la función asignada por el anotador. Como alternativa a los ensayos en medio sólido existen métodos más sensibles, como el del vanadio-molibdeno, un método colorimétrico en medio líquido que consiste en la formación de ácido vanadomolibdofosfórico (de color amarillo), a partir de la reacción del ortofosfato y los reactivos vanadio-molibdeno, y que es capaz de detectar fosfatos solubles en el orden de los  $\mu\text{g/mL}$  (200,201).

Es importante destacar que la inoculación con la cepa UY79 no tuvo un efecto deletéreo en el crecimiento de las plantas de alfalfa, y que en la co-inoculación no interfirió con el establecimiento de la simbiosis rizobio-leguminosa ni con la promoción del crecimiento ejercida por los rizobios (Fig. 13). Estas son ventajas adicionales al pensar en su uso como agente de control biológico, ya que superan a algunos pesticidas químicos que han demostrado afectar el crecimiento de las plantas y también la simbiosis rizobio-leguminosa (202,203). De todas maneras, el efecto debe analizarse para cada cultivo y asociación leguminosa-rizobio en particular.

En conclusión, identificamos una potencial nueva especie de *Paenibacillus* aislada de nódulo que pertenece al grupo de *P. polymyxa*. El amplio espectro de su efecto antagonista, junto con la diversidad de mecanismos posiblemente involucrados que presenta, hacen de la cepa UY79 un promisorio agente de control biológico.

Como continuación de este trabajo final de carrera, se publicaron dos manuscritos. En uno de ellos se plasmaron los resultados de esta tesis, y en el otro, la cepa UY79 se presentó formalmente como nueva especie, a la cual se denominó *Paenibacillus farraposensis* en honor al Parque Nacional Esteros de Farrapos e Islas del Río Uruguay, sitio donde fue aislada.

*Paenibacillus* sp. Strain UY79, Isolated from a Root Nodule of *Arachis villosa*, Displays a Broad Spectrum of Antifungal Activity:

<https://doi.org/10.1128/AEM.01645-21>



*Paenibacillus farraposensis* sp. nov., isolated from a root nodule of *Arachis villosa*:

<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.005294>



## Bibliografía

1. Bulgarelli D, Schlaeppi K, Spaepen S, Van Themaat EVL, Schulze-Lefert P. Structure and Functions of the Bacterial Microbiota of Plants. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120106> [Internet]. 2013 May 2 [cited 2024 Jan 28];64:807–38. Available from: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-arplant-050312-120106>
2. Reinhold-Hurek B, Bünger W, Burbano CS, Sabale M, Hurek T. Roots shaping their microbiome: global hotspots for microbial activity. *Annu Rev Phytopathol* [Internet]. 2015 Aug 4 [cited 2024 Jan 31];53:403–24. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26243728/>
3. Egamberdieva D, Kamilova F, Validov S, Gafurova L, Kucharova Z, Lugtenberg B. High incidence of plant growth-stimulating bacteria associated with the rhizosphere of wheat grown on salinated soil in Uzbekistan. *Environ Microbiol* [Internet]. 2008 Jan 1 [cited 2024 Jan 28];10(1):1–9. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1462-2920.2007.01424.x>
4. Weller DM, Thomashow LS. Current Challenges in Introducing Beneficial Microorganisms into the Rhizosphere. *Molecular Ecology of Rhizosphere Microorganisms: Biotechnology and the Release of GMOs* [Internet]. 2007 Dec 21 [cited 2024 May 27];1–18. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/9783527615810.ch1>
5. Walker TS, Bais HP, Grotewold E, Vivanco JM. Root Exudation and Rhizosphere Biology. *Plant Physiol* [Internet]. 2003 May 1 [cited 2024 Jan 28];132(1):44–51. Available from: <https://dx.doi.org/10.1104/pp.102.019661>
6. Dakora FD, Phillips DA. Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments. *Plant Soil* [Internet]. 2002 Aug [cited 2024 Jan 28];245(1):35–47. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1020809400075>
7. Kang BG, Kim WT, Yun HS, Chang SC. Use of plant growth-promoting rhizobacteria to control stress responses of plant roots. *Plant Biotechnol Rep* [Internet]. 2010 Jul 25 [cited 2024 Jan 28];4(3):179–83. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11816-010-0136-1>
8. Mendes R, Garbeva P, Raaijmakers JM. The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. *FEMS Microbiol Rev* [Internet]. 2013 Sep 1 [cited 2024 Feb 5];37(5):634–63. Available from: <https://dx.doi.org/10.1111/1574-6976.12028>
9. Kandel SL, Joubert PM, Doty SL. Bacterial Endophyte Colonization and Distribution within Plants. *Microorganisms* [Internet]. 2017 Dec 1 [cited 2024 Apr 23];5(4). Available from: <https://pmc/articles/PMC5748586/>
10. Wu W, Chen W, Liu S, Wu J, Zhu Y, Qin L, et al. Beneficial Relationships Between Endophytic Bacteria and Medicinal Plants. *Front Plant Sci* [Internet]. 2021 Apr 22 [cited 2024 Apr 23];12. Available from: <https://pmc/articles/PMC8100581/>

11. Senthilkumar M, Anandham R, Madhaiyan M, Venkateswaran V, Sa T. Endophytic Bacteria: Perspectives and Applications in Agricultural Crop Production. *Bacteria in Agrobiolology: Crop Ecosystems* [Internet]. 2011 [cited 2024 Apr 23];61–96. Available from: [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-18357-7\\_3](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-18357-7_3)
12. Glick BR. *Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications*. Scientifica (Cairo). 2012;2012:1–15.
13. Savary S, Willocquet L, Pethybridge SJ, Esker P, McRoberts N, Nelson A. The global burden of pathogens and pests on major food crops. *Nature Ecology & Evolution* 2019 3:3 [Internet]. 2019 Feb 4 [cited 2024 Jan 28];3(3):430–9. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41559-018-0793-y>
14. Lugtenberg B, Kamilova F. Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro62081307162918> [Internet]. 2009 Sep 8 [cited 2024 Jan 28];63:541–56. Available from: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.micro.62.081307.162918>
15. Legein M, Smets W, Vandenheuvel D, Eilers T, Muyshondt B, Prinsen E, et al. Modes of Action of Microbial Biocontrol in the Phyllosphere. *Front Microbiol*. 2020 Jul 14;11:544057.
16. Eljounaidi K, Lee SK, Bae H. Bacterial endophytes as potential biocontrol agents of vascular wilt diseases – Review and future prospects. *Biological Control*. 2016 Dec 1;103:62–8.
17. Hong CE, Park JM. Endophytic bacteria as biocontrol agents against plant pathogens: current state-of-the-art. *Plant Biotechnol Rep* [Internet]. 2016 Nov 1 [cited 2023 Jan 31];10(6):353–7. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11816-016-0423-6>
18. Martínez-Hidalgo P, Hirsch AM. The nodule microbiome: N<sub>2</sub>fixing rhizobia do not live alone. *Phytobiomes J* [Internet]. 2017 Jun 27 [cited 2023 Jan 31];1(2):70–82. Available from: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PBIOMES-12-16-0019-RVW>
19. Palmieri D, Ianiri G, Del Grosso C, Barone G, De Curtis F, Castoria R, et al. Advances and Perspectives in the Use of Biocontrol Agents against Fungal Plant Diseases. *Horticulturae* 2022, Vol 8, Page 577 [Internet]. 2022 Jun 25 [cited 2024 Apr 18];8(7):577. Available from: <https://www.mdpi.com/2311-7524/8/7/577/htm>
20. Parratt SR, Laine AL. The role of hyperparasitism in microbial pathogen ecology and evolution. *ISME J* [Internet]. 2016 Aug 1 [cited 2024 Jun 26];10(8):1815–22. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26784356/>
21. Nehra S, Gothwal RK, Dhingra S, Varshney AK, Solanki PS, Meena P, et al. Mechanism of Antagonism: Hyperparasitism and Antibiosis. *Microbial Biocontrol: Sustainable Agriculture and Phytopathogen Management: Volume 1* [Internet]. 2022 Jan 1 [cited 2024 Feb 19];1:257–77. Available from: [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-87512-1\\_11](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-87512-1_11)
22. Halifu S, Deng X, Song X, Song R, Liang X. Inhibitory Mechanism of *Trichoderma virens* ZT05 on *Rhizoctonia solani*. *Plants* 2020, Vol 9, Page 912 [Internet]. 2020 Jul 19 [cited

- 2024 Feb 19];9(7):912. Available from: <https://www.mdpi.com/2223-7747/9/7/912/htm>
23. Ziedan ESH, Farrag ES, El-Mohamedy RS, Abd Alla MA. Streptomyces alni as a biocontrol agent to root-rot of grapevine and increasing their efficiency by biofertilisers inocula. Archives of Phytopathology and Plant Protection [Internet]. 2010 May [cited 2024 Apr 21];43(7):634–46. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/03235400802021264>
  24. Tapio E, Pohto-Lahdenperä A. Scanning electron microscopy of hyphal interaction between Streptomyces griseoviridis and some plant pathogenic fungi. Agricultural and Food Science [Internet]. 1991 Dec 1 [cited 2024 Apr 21];63(5):435–41. Available from: <https://journal.fi/afs/article/view/72422>
  25. Pal KK, Gardener BM. Biological Control of Plant Pathogens. The Plant Health Instructor. Biological Control. 2006;
  26. Wang J, Pan Z, Yu J, Zhang Z, Li Y zhong. Global assembly of microbial communities. mSystems [Internet]. 2023 Jun 29 [cited 2024 Apr 21];8(3). Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/msystems.01289-22>
  27. Nair RR, Velicer GJ. Predatory bacteria select for sustained prey diversity. Microorganisms [Internet]. 2021 Oct 1 [cited 2024 Apr 21];9(10):2079. Available from: <https://www.mdpi.com/2076-2607/9/10/2079/htm>
  28. Pérez J, Moraleda-Muñoz A, Marcos-Torres FJ, Muñoz-Dorado J. Bacterial predation: 75 years and counting! Environ Microbiol. 2016 Mar 1;18(3):766–79.
  29. Sockett RE. Predatory lifestyle of Bdellovibrio bacteriovorus. Annu Rev Microbiol [Internet]. 2009 Oct 13 [cited 2024 Apr 22];63(Volume 63, 2009):523–39. Available from: <https://www.annualreviews.org/content/journals/10.1146/annurev.micro.091208.073346>
  30. Zhang L, Guo L, Cui Z, Ju F. Exploiting predatory bacteria as biocontrol agents across ecosystems. Trends Microbiol [Internet]. 2024 Apr 1 [cited 2024 Apr 21];32(4). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37951768/>
  31. Ye X, Li Z, Luo X, Wang W, Li Y, Li R, et al. A predatory myxobacterium controls cucumber Fusarium wilt by regulating the soil microbial community. Microbiome [Internet]. 2020 Apr 6 [cited 2024 Apr 21];8(1):1–17. Available from: <https://link.springer.com/articles/10.1186/s40168-020-00824-x>
  32. Celar F. Competition for ammonium and nitrate forms of nitrogen between some phytopathogenic and antagonistic soil fungi. Biological Control. 2003 Sep 1;28(1):19–24.
  33. Janisiewicz WJ, Tworkoski TJ, Sharer C. Characterizing the Mechanism of Biological Control of Postharvest Diseases on Fruits with a Simple Method to Study Competition for Nutrients. <https://doi.org/101094/PHYTO200090111196> [Internet]. 2007 Feb 22 [cited 2024 Feb 19];90(11):1196–200. Available from: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PHYTO.2000.90.11.1196>

34. Matthijs S, Tehrani KA, Laus G, Jackson RW, Cooper RM, Cornelis P. Thioquinolobactin, a *Pseudomonas siderophore* with antifungal and anti-Pythium activity. *Environ Microbiol* [Internet]. 2007 Feb 1 [cited 2024 Feb 20];9(2):425–34. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1462-2920.2006.01154.x>
35. Huang HC, Kokko EG, Yanke LJ, Phillippe RC. Bacterial suppression of basal pod rot and end rot of dry peas caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. <https://doi.org/10.1139/m93-032> [Internet]. 2011 [cited 2024 May 30];39(2):227–33. Available from: <https://cdnsiencepub.com/doi/10.1139/m93-032>
36. Van Loon LC. Systemic Induced Resistance. *Mechanisms of Resistance to Plant Diseases* [Internet]. 2000 [cited 2024 May 20];521–74. Available from: [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-011-3937-3\\_13](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-011-3937-3_13)
37. Choudhary DK, Prakash A, Johri BN. Induced systemic resistance (ISR) in plants: mechanism of action. *Indian J Microbiol* [Internet]. 2007 Dec [cited 2024 May 20];47(4):289–97. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23100680/>
38. Pieterse C, Ton J, Loon LC. Cross-talk between plant defence signalling pathways: boost or burden? 2001;
39. Choi HK, Song GC, Yi HS, Ryu CM. Field evaluation of the bacterial volatile derivative 3-pentanol in priming for induced resistance in pepper. *J Chem Ecol* [Internet]. 2014 Aug 1 [cited 2024 May 22];40(8):882–92. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25149655/>
40. Antonopoulos DF, Tjamos SE, Antoniou PP, Rafeletos P, Tjamos EC. Effect of *Paenibacillus alvei*, strain K165, on the germination of *Verticillium dahliae* microsclerotia in planta. *Biological Control*. 2008 Aug 1;46(2):166–70.
41. Lee B, Farag MA, Park HB, Kloepper JW, Lee SH, Ryu CM. Induced resistance by a long-chain bacterial volatile: elicitation of plant systemic defense by a C13 volatile produced by *Paenibacillus polymyxa*. *PLoS One* [Internet]. 2012 Nov 28 [cited 2024 Jun 19];7(11). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23209558/>
42. Khan Z, Son SH, Akhtar J, Gautam NK, Kim YH. Plant growth-promoting rhizobacterium (*Paenibacillus polymyxa*) induced systemic resistance in tomato (*Lycopersicon esculentum*) against root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*). *Indian Journal of Agricultural Sciences*. 2012;82(7):603–10.
43. Kumar S, Chauhan PS, Agrawal L, Raj R, Srivastava A, Gupta S, et al. *Paenibacillus lentimorbus* Inoculation Enhances Tobacco Growth and Extenuates the Virulence of Cucumber mosaic virus. *PLoS One* [Internet]. 2016 Mar 1 [cited 2024 Jun 19];11(3). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26934600/>
44. Wu Q, Sun R, Ni M, Yu J, Li Y, Yu C, et al. Identification of a novel fungus, *Trichoderma asperellum* GDFS1009, and comprehensive evaluation of its biocontrol efficacy. *PLoS One* [Internet]. 2017 Jun 1 [cited 2023 Jan 31];12(6):e0179957. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0179957>
45. Veliz EA, Martínez-Hidalgo P, Hirsch AM, Veliz EA, Martínez-Hidalgo P, Hirsch AM. Chitinase-producing bacteria and their role in biocontrol. *AIMS Microbiology* 2017

- 3:689 [Internet]. 2017 [cited 2023 Jan 31];3(3):689–705. Available from: <http://www.aimspress.com/article/doi/10.3934/microbiol.2017.3.689>
46. Rybakova D, Cernava T, Köberl M, Liebminger S, Etemadi M, Berg G. Endophytes-assisted biocontrol: novel insights in ecology and the mode of action of *Paenibacillus*. *Plant and Soil* 2015 405:1 [Internet]. 2015 Jun 21 [cited 2023 Jan 31];405(1):125–40. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11104-015-2526-1>
  47. Zhao M, Liu D, Liang Z, Huang K, Wu X. Antagonistic activity of *Bacillus subtilis* CW14 and its  $\beta$ -glucanase against *Aspergillus ochraceus*. *Food Control*. 2022 Jan 1;131:108475.
  48. Grady EN, MacDonald J, Liu L, Richman A, Yuan ZC. Current knowledge and perspectives of *Paenibacillus*: A review. *Microb Cell Fact* [Internet]. 2016 Dec 1 [cited 2023 Feb 1];15(1):1–18. Available from: <https://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12934-016-0603-7>
  49. Yuan H, Yuan M, Shi B, Wang Z, Huang T, Qin G, et al. Biocontrol activity and action mechanism of *Paenibacillus polymyxa* strain NI4 against pear *Valsa* canker caused by *Valsa pyri*. *Front Microbiol* [Internet]. 2022 Jul 22 [cited 2024 Jun 22];13. Available from: </pmc/articles/PMC9354778/>
  50. Volynchikova E, Kim KD. Biological Control of Oomycete Soilborne Diseases Caused by *Phytophthora capsici*, *Phytophthora infestans*, and *Phytophthora nicotianae* in Solanaceous Crops. *Mycobiology* [Internet]. 2022 [cited 2024 May 30];50(5):269. Available from: </pmc/articles/PMC9645277/>
  51. Naing KW, Anees M, Kim SJ, Nam Y, Kim YC, Kim KY. Characterization of antifungal activity of *Paenibacillus ehimensis* KWN38 against soilborne phytopathogenic fungi belonging to various taxonomic groups. *Ann Microbiol* [Internet]. 2014 Mar 9 [cited 2024 Jun 22];64(1):55–63. Available from: <https://annalsmicrobiology.biomedcentral.com/articles/10.1007/s13213-013-0632-y>
  52. Ling L, Cheng W, Jiang K, Jiao Z, Luo H, Yang C, et al. The antifungal activity of a serine protease and the enzyme production of characteristics of *Bacillus licheniformis* TG116. *Arch Microbiol* [Internet]. 2022 Oct 1 [cited 2024 Jun 22];204(10). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36057891/>
  53. Kim YS, Balaraju K, Jeon Y. Effects of rhizobacteria *Paenibacillus polymyxa* APEC136 and *Bacillus subtilis* APEC170 on biocontrol of postharvest pathogens of apple fruits. *J Zhejiang Univ Sci B* [Internet]. 2016 Dec 1 [cited 2024 Jun 22];17(12):931. Available from: </pmc/articles/PMC5172598/>
  54. Kramer J, Özkaya Ö, Kümmerli R. Bacterial siderophores in community and host interactions. *Nature Reviews Microbiology* 2019 18:3 [Internet]. 2019 Nov 20 [cited 2024 Feb 5];18(3):152–63. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41579-019-0284-4>
  55. Deb CR, Tatung M. Siderophore producing bacteria as biocontrol agent against phytopathogens for a better environment: A review. *South African Journal of Botany*. 2024 Feb 1;165:153–62.

56. Deb CR, Tatung M. Siderophore producing bacteria as biocontrol agent against phytopathogens for a better environment: A review. *South African Journal of Botany*. 2024 Feb 1;165:153–62.
57. Zhang Y, Ren J, Wang W, Chen B, Li E, Chen S. Siderophore and indolic acid production by *Paenibacillus triticisoli* BJ-18 and their plant growth-promoting and antimicrobe abilities. *PeerJ* [Internet]. 2020 Jul 14 [cited 2024 Jun 23];2020(7):e9403. Available from: <https://peerj.com/articles/9403>
58. Cavalier-Smith T. Origins of Secondary Metabolism. *Ciba Found Symp* [Internet]. 1992 [cited 2024 Feb 20];171:64–87. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/9780470514344.ch5>
59. Abriouel H, Franz CMAP, Omar N Ben, Galvez A. Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. *FEMS Microbiol Rev* [Internet]. 2011 Jan 1 [cited 2024 May 30];35(1):201–32. Available from: <https://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00244.x>
60. Sharma IP, Chandra S, Kumar N, Chandra D. PGPR: Heart of soil and their role in soil fertility. *Agriculturally Important Microbes for Sustainable Agriculture* [Internet]. 2017 Sep 18 [cited 2023 Jan 31];1:51–67. Available from: [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-981-10-5589-8\\_3](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-981-10-5589-8_3)
61. Alam K, Mazumder A, Sikdar S, Zhao YM, Hao J, Song C, et al. *Streptomyces*: The biofactory of secondary metabolites. *Front Microbiol* [Internet]. 2022 Sep 29 [cited 2024 May 30];13. Available from: [/pmc/articles/PMC9558229/](https://pmc/articles/PMC9558229/)
62. Tsai SH, Chen YT, Yang YL, Lee BY, Huang CJ, Chen CY. The Potential Biocontrol Agent *Paenibacillus polymyxa* TP3 Produces Fusaricidin-Type Compounds Involved in the Antagonism Against Gray Mold Pathogen *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* [Internet]. 2022 Apr 1 [cited 2024 Feb 20];112(4):775–83. Available from: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PHYTO-04-21-0178-R>
63. Yu C, Yang X, Liang X, Song Y, Zhu L, Xing S, et al. Fusaricidin produced by the rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa* NX20 is involved in the biocontrol of postharvest plant-pathogenic oomycete *Phytophthora capsici*. *Postharvest Biol Technol*. 2023 Nov 1;205:112545.
64. Flury P, Vesga P, Péchy-Tarr M, Aellen N, Dennert F, Hofer N, et al. Antimicrobial and insecticidal: Cyclic lipopeptides and hydrogen cyanide produced by plant-beneficial *Pseudomonas* strains CHA0, CMR12a, and PCL1391 contribute to insect killing. *Front Microbiol*. 2017 Feb 3;8(FEB):226553.
65. SEHRAWAT A, SINDHU SS, GLICK BR. Hydrogen cyanide production by soil bacteria: Biological control of pests and promotion of plant growth in sustainable agriculture. *Pedosphere*. 2022 Feb 1;32(1):15–38.
66. Kumari M, Thakur IS. Biochemical and proteomic characterization of *Paenibacillus* sp. ISTP10 for its role in plant growth promotion and in rhizostabilization of cadmium. *Bioresour Technol Rep*. 2018 Sep 1;3:59–66.
67. Weisskopf L, Schulz S, Garbeva P. Microbial volatile organic compounds in intra-kingdom and inter-kingdom interactions. *Nature Reviews Microbiology* 2021 19:6

- [Internet]. 2021 Feb 1 [cited 2024 Feb 20];19(6):391–404. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41579-020-00508-1>
68. Tilocca B, Cao A, Migheli Q. Scent of a Killer: Microbial Volatilome and Its Role in the Biological Control of Plant Pathogens. *Front Microbiol*. 2020 Feb 7;11:41.
  69. Poirier Y, Bucher M. Phosphate Transport and Homeostasis in Arabidopsis. *The Arabidopsis Book / American Society of Plant Biologists* [Internet]. 2002 Jan [cited 2024 Jan 29];1:e0024. Available from: [/pmc/articles/PMC3243343/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11811111/)
  70. Cong WF, Suriyagoda LDB, Lambers H. Tightening the Phosphorus Cycle through Phosphorus-Efficient Crop Genotypes. *Trends Plant Sci* [Internet]. 2020 Oct 1 [cited 2024 Jan 29];25(10):967–75. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32414603/>
  71. Marschner H. Mineral nutrition of higher plants. Second Edition. London: Academic Press; 1995. 889 p.
  72. Rawat P, Shankhdhar D, Shankhdhar SC. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria: A Booster for Ameliorating Soil Health and Agriculture Production. 2020 [cited 2024 Jan 29];47–68. Available from: [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-44364-1\\_3](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-44364-1_3)
  73. Rodríguez H, Fraga R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnol Adv*. 1999 Oct 1;17(4–5):319–39.
  74. Liliane TN, Charles MS, Liliane TN, Charles MS. Factors Affecting Yield of Crops. *Agronomy - Climate Change and Food Security* [Internet]. 2020 Jul 15 [cited 2024 Jan 29]; Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/70658>
  75. Dertz EA, Xu J, Stintzi A, Raymond KN. Bacillibactin-mediated iron transport in *Bacillus subtilis*. *J Am Chem Soc* [Internet]. 2006 Jan 11 [cited 2024 Jan 29];128(1):22–3. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16390102/>
  76. Delaporte-Quintana P, Lovaisa NC, Rapisarda VA, Pedraza RO. The plant growth promoting bacteria *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Azospirillum brasilense* contribute to the iron nutrition of strawberry plants through siderophores production. *Plant Growth Regul* [Internet]. 2020 Jun 1 [cited 2024 Jan 31];91(2):185–99. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10725-020-00598-0>
  77. Sun Y, Wu J, Shang X, Xue L, Ji G, Chang S, et al. Screening of Siderophore-Producing Bacteria and Their Effects on Promoting the Growth of Plants. *Curr Microbiol* [Internet]. 2022 May 1 [cited 2024 Jan 31];79(5):1–12. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00284-022-02777-w>
  78. Yue Z, Chen Y, Hao Y, Wang C, Zhang Z, Chen C, et al. *Bacillus* sp. WR12 alleviates iron deficiency in wheat via enhancing siderophore- and phenol-mediated iron acquisition in roots. *Plant Soil* [Internet]. 2022 Feb 1 [cited 2024 Jan 31];471(1–2):247–60. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11104-021-05218-y>
  79. Bottini AR. Fitohormonas. *Anales de la ANAV* [Internet]. 2019 [cited 2024 Jan 30];tomo LXX (2017). Available from: <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/87472>

80. Lalit Mohan Srivastava. STRUCTURE AND METABOLISM OF PLANT HORMONES. In: Plant growth and development Hormones and the environment. Oxford: Academic Press; 2003. p. 772.
81. Mónica Janett Muñoz Contreras, Claudia Anahí Pérez Torres, Diana Sánchez Rangel. ¿Por qué debería de interesarte el ácido abscísico? [Internet]. 2023 [cited 2024 Feb 5]. Available from: <https://www.inecol.mx/inecol/index.php/es/ct-menu-item-25/ct-menu-item-27/17-ciencia-hoy/2056-por-que-deberia-de-interesarte-el-acido-abscisico>
82. Salisbury FB, Ross CW. Fisiología vegetal. 1994 [cited 2024 Jan 31]; Available from: <https://latam.casadellibro.com/libro-fisiologia-vegetal/9789706250247/528350>
83. Petrášek J, Friml J. Auxin transport routes in plant development. Development [Internet]. 2009 Aug 15 [cited 2024 Jan 31];136(16):2675–88. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19633168/>
84. Lehmann T, Hoffmann M, Hentrich M, Pollmann S. Indole-3-acetamide-dependent auxin biosynthesis: a widely distributed way of indole-3-acetic acid production? Eur J Cell Biol [Internet]. 2010 Dec [cited 2024 Jan 31];89(12):895–905. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20701997/>
85. Karadeniz A, Topcuoğlu ŞF, Inan S. Auxin, gibberellin, cytokinin and abscisic acid production in some bacteria. World J Microbiol Biotechnol [Internet]. 2006 Oct 20 [cited 2024 Jan 30];22(10):1061–4. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11274-005-4561-1>
86. Ashry NM, Alaidaroos BA, Mohamed SA, Badr OAM, El-Saadony MT, Esmael A. Utilization of drought-tolerant bacterial strains isolated from harsh soils as a plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). Saudi J Biol Sci [Internet]. 2022 Mar 1 [cited 2024 Jan 30];29(3):1760–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35280578/>
87. Ahmad M, Khalid A, Ahmad Zahir Z. Phytohormones : Microbial Production and Applications. Biological Approaches to Regenerative Soil Systems [Internet]. 2023 Oct 27 [cited 2024 Jan 30];205–20. Available from: <https://www.taylorfrancis.com/chapters/edit/10.1201/9781003093718-22/phytohormones-maqshoof-ahmad-azeem-khalid-zahir-ahmad-zahir>
88. Ait Bessai S, Bensidhoum L, Nabti E hafid. Optimization of IAA production by telluric bacteria isolated from northern Algeria. Biocatal Agric Biotechnol. 2022 May 1;41:102319.
89. Xu F, Liao H, Yang J, Zhang Y, Yu P, Cao Y, et al. Auxin-producing bacteria promote barley rhizosheath formation. Nature Communications 2023 14:1 [Internet]. 2023 Sep 19 [cited 2024 Jan 30];14(1):1–12. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41467-023-40916-4>
90. Coale TH, Loconte V, Turk-Kubo KA, Vanslebrouck B, Mak WKE, Cheung S, et al. Nitrogen-fixing organelle in a marine alga. Science (1979) [Internet]. 2024 Apr 12 [cited 2024 Oct 26];384(6692):217–22. Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.adk1075>

91. Kim J, Rees DC. Nitrogenase and Biological Nitrogen Fixation. *Biochemistry* [Internet]. 1994 Jan 1 [cited 2024 Jan 29];33(2):389–97. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bi00168a001>
92. Wang L, Zhang L, Liu Z, Zhao D, Liu X, Zhang B, et al. A Minimal Nitrogen Fixation Gene Cluster from *Paenibacillus* sp. WLY78 Enables Expression of Active Nitrogenase in *Escherichia coli*. *PLoS Genet* [Internet]. 2013 Oct [cited 2024 Jun 19];9(10). Available from: [/pmc/articles/PMC3798268/](https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003268)
93. Einsle O, Rees DC. Structural Enzymology of Nitrogenase Enzymes. *Chem Rev*. 2020 Jun 24;120(12):4969–5004.
94. Rubio LM, Ludden PW. Biosynthesis of the Iron-Molybdenum Cofactor of Nitrogenase. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.62.081307.162737> [Internet]. 2008 Sep 11 [cited 2024 Jan 29];62:93–111. Available from: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.micro.62.081307.162737>
95. Ladha JK, de Bruijn FJ, Malik KA. Introduction: Assessing opportunities for nitrogen fixation in rice — a frontier project. *Opportunities for Biological Nitrogen Fixation in Rice and Other Non-Legumes* [Internet]. 1997 [cited 2024 Jan 29];1–10. Available from: [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-011-7113-7\\_1](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-011-7113-7_1)
96. Bhattacharyya PN, Jha DK. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 2011 28:4 [Internet]. 2011 Dec 24 [cited 2024 Jan 29];28(4):1327–50. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11274-011-0979-9>
97. Eastman AW, Heinrichs DE, Yuan ZC. Comparative and genetic analysis of the four sequenced *Paenibacillus polymyxa* genomes reveals a diverse metabolism and conservation of genes relevant to plant-growth promotion and competitiveness. *BMC Genomics* [Internet]. 2014 Dec 3 [cited 2024 May 28];15(1):851. Available from: <https://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-15-851>
98. Ferraz Helene LC, Klepa MS, Hungria M. New Insights into the Taxonomy of Bacteria in the Genomic Era and a Case Study with Rhizobia. *Int J Microbiol* [Internet]. 2022 Jan 1 [cited 2024 Jul 8];2022(1):4623713. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1155/2022/4623713>
99. Bu F. Parasponia: a missing piece of the evolutionary puzzle of nitrogen-fixing nodule symbiosis. 2020 Mar 31 [cited 2024 May 28]; Available from: <https://research.wur.nl/en/publications/parasponia-a-missing-piece-of-the-evolutionary-puzzle-of-nitrogen>
100. Giordano W, Hirsch AM. The expression of MaEXP1, a *Melilotus alba* expansin gene, is upregulated during the sweetclover-Sinorhizobium meliloti interaction. *Mol Plant Microbe Interact* [Internet]. 2004 [cited 2024 Jan 29];17(6):613–22. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15195944/>
101. Haag AF, Mergaert P. Terminal bacteroid differentiation in the *Medicago*–*Rhizobium* interaction – a tug of war between plant and bacteria. *The Model Legume *Medicago truncatula** [Internet]. 2019 Dec 13 [cited 2024 May 28];600–16. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/9781119409144.ch75>

102. De Meyer SE, De Beuf K, Vekeman B, Willems A. A large diversity of non-rhizobial endophytes found in legume root nodules in Flanders (Belgium). *Soil Biol Biochem.* 2015 Apr 1;83:1–11.
103. Leite J, Fischer D, Rouws LFM, Fernandes-Júnior PI, Hofmann A, Kublik S, et al. Cowpea nodules harbor non-rhizobial bacterial communities that are shaped by soil type rather than plant genotype. *Front Plant Sci.* 2017 Jan 20;7:2064.
104. Hansen BL, Pessotti R de C, Fischer MS, Collins A, El-Hifnawi L, Liu MD, et al. Cooperation, competition, and specialized metabolism in a simplified root nodule microbiome. *mBio* [Internet]. 2020 [cited 2023 Jan 31];11(4):1–20. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/mBio.01917-20>
105. Pereira-Gómez M, Ríos C, Zabaleta M, Lagurara P, Galvalisi U, Iccardi P, et al. Native legumes of the Farrapos protected area in Uruguay establish selective associations with rhizobia in their natural habitat. *Soil Biol Biochem.* 2020 Sep 1;148:107854.
106. Sharaf H, Rodrigues RR, Moon J, Zhang B, Mills K, Williams MA. Unprecedented bacterial community richness in soybean nodules vary with cultivar and water status. *Microbiome* [Internet]. 2019 Apr 16 [cited 2024 Feb 24];7(1):1–18. Available from: <https://microbiomejournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40168-019-0676-8>
107. Rodríguez-Rodríguez RM, Guimarães AA, de Castro JL, Siqueira JO, Carneiro MAC, de Souza Moreira FM. Rhizobia and endophytic bacteria isolated from rainforest fragments within an iron ore mining site of the Eastern Brazilian Amazon. *Brazilian Journal of Microbiology* [Internet]. 2021 Sep 1 [cited 2024 May 2];52(3):1461. Available from: </pmc/articles/PMC8324639/>
108. Rybakova D, Rack-Wetzlinger U, Cernava T, Schaefer A, Schmuck M, Berg G. Aerial warfare: A volatile dialogue between the plant pathogen *Verticillium longisporum* and its antagonist *Paenibacillus polymyxa*. *Front Plant Sci* [Internet]. 2017 Jul 27 [cited 2024 Feb 20];8:278579. Available from: [www.frontiersin.org](http://www.frontiersin.org)
109. Ali MA, Lou Y, Hafeez R, Li X, Hossain A, Xie T, et al. Functional Analysis and Genome Mining Reveal High Potential of Biocontrol and Plant Growth Promotion in Nodule-Inhabiting Bacteria Within *Paenibacillus polymyxa* Complex. *Front Microbiol* [Internet]. 2021 Jan 18 [cited 2024 Feb 20];11:618601. Available from: [www.frontiersin.org](http://www.frontiersin.org)
110. Geels FP, Schippers B. Selection of Antagonistic Fluorescent *Pseudomonas* spp. and their Root Colonization and Persistence following Treatment of Seed Potatoes. *Journal of Phytopathology* [Internet]. 1983 Dec 1 [cited 2023 Feb 2];108(3–4):193–206. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1439-0434.1983.tb00579.x>
111. De León IP, Oliver JP, Castro A, Gaggero C, Bentancor M, Vidal S. *Erwinia carotovora* elicitors and *Botrytis cinerea* activate defense responses in *Physcomitrella patens*. *BMC Plant Biol* [Internet]. 2007 Oct 8 [cited 2024 May 26];7(1):1–11. Available from: <https://bmcplantbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2229-7-52>
112. Raza W, Ling N, Liu D, Wei Z, Huang Q, Shen Q. Volatile organic compounds produced by *Pseudomonas fluorescens* WR-1 restrict the growth and virulence traits of *Ralstonia solanacearum*. *Microbiol Res.* 2016 Nov 1;192:103–13.

113. Ramette A, Frapolli M, Défago G, Moëgne-Loccoz Y. Phylogeny of HCN Synthase-Encoding *hcnBC* Genes in Biocontrol Fluorescent Pseudomonads and Its Relationship with Host Plant Species and HCN Synthesis Ability. <https://doi.org/10.1094/MPMI2003166525> [Internet]. 2007 Feb 20 [cited 2024 May 26];16(6):525–35. Available from: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/MPMI.2003.16.6.525>
114. Beims H, Bunk B, Erler S, Mohr KI, Spröer C, Pradella S, et al. Discovery of *Paenibacillus* larvae ERIC V: Phenotypic and genomic comparison to genotypes ERIC I-IV reveal different inventories of virulence factors which correlate with epidemiological prevalences of American Foulbrood. *International Journal of Medical Microbiology*. 2020 Feb 1;310(2):151394.
115. Boukaya N, Goudjal Y, Zamoum M, Chaabane Chaouch F, Sabaou N, Mathieu F, et al. Biocontrol and plant-growth-promoting capacities of actinobacterial strains from the Algerian Sahara and characterisation of *Streptosporangium becharensense* SG1 as a promising biocontrol agent. *Biocontrol Sci Technol* [Internet]. 2018 Sep 2 [cited 2024 May 23];28(9):858–73. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/09583157.2018.1501466>
116. Drochioiu G, Mangalagiu I, Tataru V. Specific spectrophotometric determination of hydrocyanic acid in the environment. *Analyst* [Internet]. 2000 Jan 1 [cited 2024 May 23];125(5):939–41. Available from: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2000/an/b001244k>
117. Castric PA. Glycine metabolism by *Pseudomonas aeruginosa*: hydrogen cyanide biosynthesis. *J Bacteriol* [Internet]. 1977 [cited 2024 May 23];130(2):826. Available from: [/pmc/articles/PMC235287/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/abstract/PMC235287/)
118. Ebadzadsahrai G, Higgins Keppler EA, Soby SD, Bean HD. Inhibition of Fungal Growth and Induction of a Novel Volatilome in Response to *Chromobacterium vaccinii* Volatile Organic Compounds. *Front Microbiol* [Internet]. 2020 May 20 [cited 2024 Feb 20];11:515430. Available from: [www.frontiersin.org](https://www.frontiersin.org)
119. Di Francesco A, Ugolini L, Lazzeri L, Mari M. Production of volatile organic compounds by *Aureobasidium pullulans* as a potential mechanism of action against postharvest fruit pathogens. *Biological Control*. 2015 Feb 1;81:8–14.
120. Kim SJ, Lee CM, Han BR, Kim MY, Yeo YS, Yoon SH, et al. Characterization of a gene encoding cellulase from uncultured soil bacteria. *FEMS Microbiol Lett* [Internet]. 2008 May 1 [cited 2023 Feb 2];282(1):44–51. Available from: <https://academic.oup.com/femsle/article/282/1/44/488001>
121. Kulkarni P, Gupta N. Screening and evaluation of soil fungal isolates for xylanase production. *Recent Research in Science and Technology* [Internet]. 2013 Mar 3 [cited 2023 Feb 2];5(2):33–6. Available from: <https://updatepublishing.com/journal/index.php/rrst/article/view/1020>
122. Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*. 1983 Jun 5;166(4):557–80.

123. Regenhardt D, Heuer H, Heim S, Fernandez DU, Strömpl C, Moore ERB, et al. Pedigree and taxonomic credentials of *Pseudomonas putida* strain KT2440. *Environ Microbiol* [Internet]. 2002 Dec 1 [cited 2024 May 26];4(12):912–5. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1462-2920.2002.00368.x>
124. Eberhart B, Cross DF, Chase LR.  $\beta$ -GLUCOSIDASE SYSTEM OF *NEUROSPORA CRASSA* I.  $\beta$ -J *Bacteriol* [Internet]. 1964 [cited 2023 Feb 2];87(4):761–70. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/jb.87.4.761-770.1964>
125. Amarelle V, Roldán DM, Fabiano E, Guazzaroni ME. Synthetic Biology Toolbox for Antarctic *Pseudomonas* sp. Strains: Toward a Psychrophilic Nonmodel Chassis for Function-Driven Metagenomics. *ACS Synth Biol* [Internet]. 2023 Mar 17 [cited 2024 Jun 24];12(3):722–34. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acssynbio.2c00543>
126. Martínez-Rosales C, Castro-Sowinski S. Antarctic bacterial isolates that produce cold-active extracellular proteases at low temperature but are active and stable at high temperature. *Polar Res* [Internet]. 2011 Apr 22 [cited 2023 Feb 2];30(SUPPL.1). Available from: [https://polarresearch.net/index.php/polar/article/view/3042/html\\_120](https://polarresearch.net/index.php/polar/article/view/3042/html_120)
127. de los Santos MC, Taulé C, Mareque C, Beracochea M, Battistoni F. Identification and characterization of the part of the bacterial community associated with field-grown tall fescue (*Festuca arundinacea*) cv. SFRO Don Tomás in Uruguay. *Ann Microbiol* [Internet]. 2016 Mar 1 [cited 2024 Jun 24];66(1):329–42. Available from: <https://annalsmicrobiology.biomedcentral.com/articles/10.1007/s13213-015-1113-2>
128. Poly F, Monrozier LJ, Bally R. Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of *nifH* genes in communities of nitrogen fixers in soil. *Res Microbiol*. 2001 Jan 1;152(1):95–103.
129. Olson JB, Steppe TF, Litaker RW, Paerl HW. N<sub>2</sub>-fixing microbial consortia associated with the ice cover of Lake Bonney, Antarctica. *Microb Ecol* [Internet]. 1998 [cited 2024 May 1];36(3):231–8. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s002489900110>
130. Gordon SA, Weber RP. Colorimetric Estimation of indoleacetic Acid. *Plant Physiol* [Internet]. 1951 Jan 1 [cited 2023 Feb 2];26(1):192–5. Available from: <https://academic.oup.com/plphys/article/26/1/192/6093171>
131. LARA C, OVIEDO L, ALEMÁN A. AISLADOS NATIVOS CON POTENCIAL EN LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO INDOL ACÉTICO PARA MEJORAR LA AGRICULTURA. *Bioteología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial* [Internet]. 2011 [cited 2024 May 23];9(1):17–23. Available from: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1692-35612011000100003&lng=en&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1692-35612011000100003&lng=en&nrm=iso&tlng=es)
132. Nautiyal CS. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol Lett* [Internet]. 1999 Jan 1 [cited 2023 Feb 2];170(1):265–70. Available from: <https://academic.oup.com/femsle/article/170/1/265/454487>

133. Pikovskaya R. Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital activity of some microbial species. *Mikrobiologiya* [Internet]. 1948 [cited 2023 Feb 2];17:362–70. Available from: <https://cir.nii.ac.jp/crid/1571417126003636736>
134. Mareque C, Taulé C, Beracochea M, Battistoni F. Isolation, characterization and plant growth promotion effects of putative bacterial endophytes associated with sweet sorghum (*Sorghum bicolor* (L) Moench). *Ann Microbiol* [Internet]. 2015 Jun 26 [cited 2024 May 26];65(2):1057–67. Available from: <https://link.springer.com/articles/10.1007/s13213-014-0951-7>
135. Schwyn B, Neilands JB. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal Biochem*. 1987 Jan 1;160(1):47–56.
136. Trovero MF, Scavone P, Platero R, de Souza EM, Fabiano E, Rosconi F. Herbaspirillum seropedicae differentially expressed genes in response to iron availability. *Front Microbiol* [Internet]. 2018 Jul 3 [cited 2024 Jun 24];9(JUL):1430. Available from: </pmc/articles/PMC6037834/>
137. Brambilla S, Frare R, Soto G, Jozefkowicz C, Ayub N. Absence of the Nitrous Oxide Reductase Gene Cluster in Commercial Alfalfa Inoculants Is Probably Due to the Extensive Loss of Genes During Rhizobial Domestication. *Microb Ecol* [Internet]. 2018 Aug 1 [cited 2024 Jan 31];76(2):299–302. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29330647/>
138. Howieson JG, Dilworth MJ, Australian Centre for International Agricultural Research. Working with rhizobia /. 312 p.
139. Vincent JM. A manual for the practical study of root-nodule bacteria [Internet]. Oxford: Blackwell Scientific Ltd; 1970 [cited 2024 Jan 31]. 164 p. Available from: <https://search.worldcat.org/title/133339>
140. Fabiano E, Gill PR, Noya F, Bagnasco P, De la Fuente L, Arias A. Siderophore-Mediated Iron Acquisition Mutants in *Rhizobium meliloti* 242 and its Effect on the Nodulation Kinetic of Alfalfa Nodules. *Symbiosis* [Internet]. 1995 [cited 2024 Jun 24];19:197–211. Available from: <https://DalSpace.library.dal.ca//handle/10222/77451>
141. Meade HM, Long SR, Ruvkun GB, Brown SE, Ausubel FM. Physical and genetic characterization of symbiotic and auxotrophic mutants of *Rhizobium meliloti* induced by transposon Tn5 mutagenesis. *J Bacteriol* [Internet]. 1982 [cited 2024 Jun 24];149(1):114–22. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6274841/>
142. Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol* [Internet]. 1991 [cited 2024 Jan 31];173(2):697–703. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/jb.173.2.697-703.1991>
143. Taulé C, Zabaleta M, Mareque C, Platero R, Sanjurjo L, Sicardi M, et al. New betaproteobacterial *Rhizobium* strains able to efficiently nodulate *Parapiptadenia rigida* (Benth.) Brenan. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 2012 Mar [cited 2024 Jan 31];78(6):1692–700. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AEM.06215-11>

144. Yoon SH, Ha SM, Kwon S, Lim J, Kim Y, Seo H, et al. Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *Int J Syst Evol Microbiol* [Internet]. 2017 May 1 [cited 2024 Jan 31];67(5):1613–7. Available from: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijsem.0.001755>
145. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol Biol Evol* [Internet]. 2018 Jun 1 [cited 2024 Jan 31];35(6):1547–9. Available from: <https://dx.doi.org/10.1093/molbev/msy096>
146. Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* [Internet]. 1980 Jun [cited 2024 Jan 31];16(2):111–20. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF01731581>
147. Haft DH, DiCuccio M, Badretdin A, Brover V, Chetvernin V, O’Neill K, et al. RefSeq: an update on prokaryotic genome annotation and curation. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2018 Jan 4 [cited 2024 Jan 31];46(D1):D851–60. Available from: <https://dx.doi.org/10.1093/nar/gkx1068>
148. Aziz RK, Bartels D, Best A, DeJongh M, Disz T, Edwards RA, et al. The RAST Server: Rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics* [Internet]. 2008 Feb 8 [cited 2024 Jan 31];9(1):1–15. Available from: <https://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-9-75>
149. Finn RD, Bateman A, Clements J, Coggill P, Eberhardt RY, Eddy SR, et al. Pfam: the protein families database. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2014 Jan 1 [cited 2024 Feb 24];42(Database issue):D222. Available from: [/pmc/articles/PMC3965110/](https://pmc/articles/PMC3965110/)
150. Finn RD, Clements J, Eddy SR. HMMER web server: interactive sequence similarity searching. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2011 Jul 7 [cited 2024 Feb 24];39(Web Server issue):W29. Available from: [/pmc/articles/PMC3125773/](https://pmc/articles/PMC3125773/)
151. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*. 1990 Oct 5;215(3):403–10.
152. Zimmermann L, Stephens A, Nam SZ, Rau D, Kübler J, Lozajic M, et al. A Completely Reimplemented MPI Bioinformatics Toolkit with a New HHpred Server at its Core. *J Mol Biol*. 2018 Jul 20;430(15):2237–43.
153. Gabler F, Nam SZ, Till S, Mirdita M, Steinegger M, Söding J, et al. Protein Sequence Analysis Using the MPI Bioinformatics Toolkit. *Curr Protoc Bioinformatics* [Internet]. 2020 Dec 1 [cited 2024 Feb 24];72(1):e108. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/cpbi.108>
154. Blin K, Shaw S, Steinke K, Villebro R, Ziemert N, Lee SY, et al. antiSMASH 5.0: updates to the secondary metabolite genome mining pipeline. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2019 Jul 2 [cited 2024 Jan 31];47(W1):W81–7. Available from: <https://dx.doi.org/10.1093/nar/gkz310>

155. Arndt D, Grant JR, Marcu A, Sajed T, Pon A, Liang Y, et al. PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2016 Jul 8 [cited 2024 Feb 24];44(W1):W16–21. Available from: <https://dx.doi.org/10.1093/nar/gkw387>
156. Song W, Sun HX, Zhang C, Cheng L, Peng Y, Deng Z, et al. Prophage Hunter: an integrative hunting tool for active prophages. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2019 Jul 2 [cited 2024 Feb 24];47(W1):W74–80. Available from: <https://dx.doi.org/10.1093/nar/gkz380>
157. Krawczyk PS, Lipinski L, Dziembowski A. PlasFlow: predicting plasmid sequences in metagenomic data using genome signatures. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2018 Apr 6 [cited 2024 Oct 26];46(6):E35. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29346586/>
158. Nei M, Kumar S. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. New York: Oxford university press, INC; 2000.
159. Lee I, Kim YO, Park SC, Chun J. OrthoANI: An improved algorithm and software for calculating average nucleotide identity. *Int J Syst Evol Microbiol* [Internet]. 2016 Feb 1 [cited 2024 Jan 31];66(2):1100–3. Available from: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijsem.0.000760>
160. RStudio Team. *RStudio: Integrated Development for R*. Boston, MA: RStudio, PBC; 2020.
161. Brambilla S, Frare R, Soto G, Jozefkowicz C, Ayub N. Absence of the Nitrous Oxide Reductase Gene Cluster in Commercial Alfalfa Inoculants Is Probably Due to the Extensive Loss of Genes During Rhizobial Domestication. *Microb Ecol* [Internet]. 2018 Aug 1 [cited 2024 Feb 23];76(2):299–302. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00248-018-1145-9>
162. Kwak MJ, Choi S Bin, Ha SM, Kim EH, Kim BY, Chun J. Genome-based reclassification of *paenibacillus jamilae* aguilera et al. 2001 as a later heterotypic synonym of *paenibacillus polymyxa* (prazmowski 1880) ash et al. 1994. *Int J Syst Evol Microbiol* [Internet]. 2020 Apr 24 [cited 2024 Feb 20];70(5):3134–8. Available from: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijsem.0.004140>
163. Felsenstein J. CONFIDENCE LIMITS ON PHYLOGENIES: AN APPROACH USING THE BOOTSTRAP. *Evolution (N Y)* [Internet]. 1985 Jul 1 [cited 2024 Feb 24];39(4):783–91. Available from: <https://dx.doi.org/10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x>
164. Xie J, Shi H, Du Z, Wang T, Liu X, Chen S. Comparative genomic and functional analysis reveal conservation of plant growth promoting traits in *Paenibacillus polymyxa* and its closely related species. *Scientific Reports* 2016 6:1 [Internet]. 2016 Feb 9 [cited 2024 Feb 20];6(1):1–12. Available from: <https://www.nature.com/articles/srep21329>
165. Xu H, Qin S, Lan Y, Liu M, Cao X, Qiao D, et al. Comparative genomic analysis of *Paenibacillus* sp. SSG-1 and its closely related strains reveals the effect of glycometabolism on environmental adaptation. *Scientific Reports* 2017 7:1 [Internet]. 2017 Jul 18 [cited 2024 Feb 20];7(1):1–11. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-017-06160-9>

166. Kandasamy V, Liu J, Dantoft SH, Solem C, Jensen PR. Synthesis of (3R)-acetoin and 2,3-butanediol isomers by metabolically engineered *Lactococcus lactis*. *Scientific Reports* 2016 6:1 [Internet]. 2016 Nov 18 [cited 2024 Feb 24];6(1):1–9. Available from: <https://www.nature.com/articles/srep36769>
167. Tinôco D, Pateraki C, Koutinas AA, Freire DMG. Bioprocess Development for 2,3-Butanediol Production by *Paenibacillus* Strains. *ChemBioEng Reviews*. 2021 Feb 1;8(1):44–62.
168. Cann AF, Liao JC. Production of 2-methyl-1-butanol in engineered *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* [Internet]. 2008 Nov [cited 2024 Feb 24];81(1):89–98. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18758769/>
169. Makarova KS, Wolf YI, Iranzo J, Shmakov SA, Alkhnbashi OS, Brouns SJJ, et al. Evolutionary classification of CRISPR–Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. *Nature Reviews Microbiology* 2019 18:2 [Internet]. 2019 Dec 19 [cited 2024 Feb 24];18(2):67–83. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41579-019-0299-x>
170. Pasari N, Gupta M, Eqbal D, Yazdani SS. Genome analysis of *Paenibacillus polymyxa* A18 gives insights into the features associated with its adaptation to the termite gut environment. *Scientific Reports* 2019 9:1 [Internet]. 2019 Apr 15 [cited 2024 Feb 24];9(1):1–14. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-019-42572-5>
171. Kajimura Y, Kaneda M. Fusaricidin A, a New Depsipeptide Antibiotic Produced by *Bacillus polymyxa* KT-8 Taxonomy, Fermentation, Isolation, Structure Elucidation and Biological Activity. *J Antibiot (Tokyo)*. 1996 Feb 25;49(2):129–35.
172. Li Y, Chen S. Fusaricidin Produced by *Paenibacillus polymyxa* WLY78 Induces Systemic Resistance against *Fusarium* Wilt of Cucumber. *International Journal of Molecular Sciences* 2019, Vol 20, Page 5240 [Internet]. 2019 Oct 22 [cited 2024 Feb 20];20(20):5240. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/20/5240/html>
173. Cochrane SA, Lohans CT, Brandelli JR, Mulvey G, Armstrong GD, Vederas JC. Synthesis and structure-activity relationship studies of N-terminal analogues of the antimicrobial peptide tridecaptin A1. *J Med Chem* [Internet]. 2014 Feb 13 [cited 2024 Feb 20];57(3):1127–31. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jm401779d>
174. Upert G, Luther A, Obrecht D, Ermert P. Emerging peptide antibiotics with therapeutic potential. *Med Drug Discov*. 2021 Mar 1;9:100078.
175. Aleti G, Sessitsch A, Brader G. Genome mining: Prediction of lipopeptides and polyketides from *Bacillus* and related Firmicutes. *Comput Struct Biotechnol J* [Internet]. 2015 Jan 1 [cited 2024 Feb 20];13:192–203. Available from: <http://www.csbj.org/article/S2001037015000124/fulltext>
176. Langendries S, Goormachtig S. *Paenibacillus polymyxa*, a Jack of all trades. *Environ Microbiol* [Internet]. 2021 Oct 1 [cited 2024 Feb 20];23(10):5659–69. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/1462-2920.15450>
177. Teta R, Marteinsson VT, Longeon A, Klonowski AM, Groben R, Bourguet-Kondracki ML, et al. Thermoactinoamide A, an Antibiotic Lipophilic Cyclopeptide from the Icelandic

- Thermophilic Bacterium *Thermoactinomyces vulgaris*. *J Nat Prod* [Internet]. 2017 Sep 22 [cited 2024 Jul 4];80(9):2530–5. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.jnatprod.7b00560>
178. Della Sala G, Mangoni A, Costantino V, Teta R. Identification of the Biosynthetic Gene Cluster of Thermoactinoamides and Discovery of New Congeners by Integrated Genome Mining and MS-Based Molecular Networking. *Front Chem* [Internet]. 2020 May 21 [cited 2024 Jul 4];8:397. Available from: [/pmc/articles/PMC7253712/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34512345/)
  179. Tran DM, Pham PT, Vu BT, Ngoc LNT. Data on annotation and analysis of genome sequence of *Paenibacillus elgii* YSY-1.2, a promising chitinase-producing, plant-growth-promoting, and biocontrol agent. *Data Brief*. 2024 Jun 1;54:110285.
  180. Tran DM, Do TO, Nguyen QV. Whole genome sequence data of *Paenibacillus tyrfis* YSS-72.2.G2, a chitinolytic bacterium newly isolated from a National Park of Vietnam. *Data Brief*. 2024 Apr 1;53:110087.
  181. Tamang JP, Kharnaor P, Pariyar P. Whole genome sequencing of the poly- $\gamma$ -glutamic acid-producing novel *Bacillus subtilis* Tamang strain, isolated from spontaneously fermented kinema. *Food Research International* [Internet]. 2024 [cited 2024 Jul 4];190:114655. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2024.114655>
  182. Zhu S, Hegemann JD, Fage CD, Zimmermann M, Xie X, Linne U, et al. Insights into the Unique Phosphorylation of the Lasso Peptide Paeninodin. *J Biol Chem* [Internet]. 2016 Jun 24 [cited 2024 Jun 25];291(26):13662–78. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27151214/>
  183. Zhu S, Hegemann JD, Fage CD, Zimmermann M, Xie X, Linne U, et al. Insights into the Unique Phosphorylation of the Lasso Peptide Paeninodin. *J Biol Chem* [Internet]. 2016 Jun 24 [cited 2024 Feb 24];291(26):13662–78. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27151214/>
  184. Cheng C, Hua ZC. Lasso Peptides: Heterologous Production and Potential Medical Application. *Front Bioeng Biotechnol* [Internet]. 2020 Sep 28 [cited 2024 Jun 25];8:571165. Available from: [www.frontiersin.org](https://www.frontiersin.org)
  185. Van Quyen D, Moore RJ, Minh Khánh C, Thu Hao Van T, Vuong H, Tho L, et al. Heterologously expressed SacP23, a novel bacteriocin from *Paenibacillus polymyxa* #23, is active against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *R Soc Open Sci* [Internet]. 2023 Dec 20 [cited 2024 Jul 4];10(12). Available from: <https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rsos.231119>
  186. Helfrich EJM, Lin GM, Voigt CA, Clardy J. Bacterial terpene biosynthesis: challenges and opportunities for pathway engineering. *Beilstein Journal of Organic Chemistry* 15:283 [Internet]. 2019 Nov 29 [cited 2024 Jul 4];15(1):2889–906. Available from: <https://www.beilstein-journals.org/bjoc/articles/15/283>
  187. Gallucci MN, Oliva M, Casero C, Dambolena J, Luna A, Zygadlo J, et al. Antimicrobial combined action of terpenes against the food-borne microorganisms *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*. *Flavour Fragr J* [Internet]. 2009 Nov 1 [cited 2024 Jul 4];24(6):348–54. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ffj.1948>

188. Kontnik R, Bosak T, Butcher RA, Brocks JJ, Losick R, Clardy J, et al. Sporulenes, heptaprenyl metabolites from *Bacillus subtilis* spores. *Org Lett* [Internet]. 2008 [cited 2024 Jul 4];10(16):3551–4. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/ol801314k>
189. Cao Y, Peng Q, Li S, Deng Z, Gao J. The intriguing biology and chemistry of fosfomycin: the only marketed phosphonate antibiotic. *RSC Adv* [Internet]. 2019 Dec 19 [cited 2024 Jul 4];9(72):42204–18. Available from: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2019/ra/c9ra08299a>
190. Borisova SA, Circello BT, Zhang JK, van der Donk WA, Metcalf WW. Biosynthesis of rhizocticins, antifungal phosphonate oligopeptides produced by *Bacillus subtilis* ATCC6633. *Chem Biol* [Internet]. 2010 Jan 1 [cited 2024 Jul 4];17(1):28. Available from: [/pmc/articles/PMC2819989/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19989/)
191. Powell PE, Szaniszló PJ, Cline GR, Reid CPP. Hydroxamate siderophores in the iron nutrition of plants. *J Plant Nutr* [Internet]. 1982 Jan 1 [cited 2024 Feb 20];5(4–7):653–73. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01904168209362994>
192. Gu S, Yang T, Shao Z, Wang T, Cao K, Jousset A, et al. Siderophore-Mediated Interactions Determine the Disease Suppressiveness of Microbial Consortia. *mSystems* [Internet]. 2020 Jun 30 [cited 2024 Feb 20];5(3). Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/msystems.00811-19>
193. Franza T, Mahé B, Expert D. *Erwinia chrysanthemi* requires a second iron transport route dependent of the siderophore achromobactin for extracellular growth and plant infection. *Mol Microbiol* [Internet]. 2005 Jan 1 [cited 2024 Feb 20];55(1):261–75. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-2958.2004.04383.x>
194. Khalaf EM, Raizada MN. Bacterial seed endophytes of domesticated cucurbits antagonize fungal and oomycete pathogens including powdery mildew. *Front Microbiol* [Internet]. 2018 Feb 5 [cited 2024 Feb 20];9(FEB):295117. Available from: [www.frontiersin.org](http://www.frontiersin.org)
195. Wu Y, Zhou J, Li C, Ma Y. Antifungal and plant growth promotion activity of volatile organic compounds produced by *Bacillus amyloliquefaciens*. *Microbiologyopen* [Internet]. 2019 Aug 1 [cited 2024 Feb 20];8(8):e00813. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/mbo3.813>
196. Raza W, Yuan J, Ling N, Huang Q, Shen Q. Production of volatile organic compounds by an antagonistic strain *Paenibacillus polymyxa* WR-2 in the presence of root exudates and organic fertilizer and their antifungal activity against *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*. *Biological Control*. 2015 Jan 1;80:89–95.
197. Toffano L, Fialho MB, Pascholati SF. Potential of fumigation of orange fruits with volatile organic compounds produced by *Saccharomyces cerevisiae* to control citrus black spot disease at postharvest. *Biological Control*. 2017 May 1;108:77–82.
198. Han Q, Ma Q, Chen Y, Tian B, Xu L, Bai Y, et al. Variation in rhizosphere microbial communities and its association with the symbiotic efficiency of rhizobia in soybean.

- ISME J [Internet]. 2020 Aug 1 [cited 2024 Feb 24];14(8):1915–28. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32336748/>
199. Agaras BC, Scandiani M, Luque A, Fernández L, Farina F, Carmona M, et al. Quantification of the potential biocontrol and direct plant growth promotion abilities based on multiple biological traits distinguish different groups of *Pseudomonas* spp. isolates. *Biological Control*. 2015 Nov 1;90:173–86.
  200. Amri M, Rjeibi MR, Gatrouni M, Mateus DMR, Asses N, Pinho HJO, et al. Isolation, Identification, and Characterization of Phosphate-Solubilizing Bacteria from Tunisian Soils. *Microorganisms* [Internet]. 2023 Mar 1 [cited 2024 May 27];11(3). Available from: </pmc/articles/PMC10052640/>
  201. De Las M, López N, Adolfo P, Sierra N. DETERMINACIÓN DE FOSFATO MEDIANTE ANÁLISIS POR INYECCIÓN EN FLUJO. 2019;
  202. Mallik MAB, Tesfai K. Pesticidal effect on soybean-rhizobia symbiosis. *Plant Soil* [Internet]. 1985 Feb [cited 2024 Feb 23];85(1):33–41. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF02197798>
  203. Moorman TB. A Review of Pesticide Effects on Microorganisms and Microbial Processes Related to Soil Fertility. *Journal of Production Agriculture* [Internet]. 1989 Jan 1 [cited 2024 Feb 23];2(1):14–23. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.2134/jpa1989.0014>

## Anexo

### Medios de cultivo

#### PDA (Difco™)

Componente	Cantidad (g/L)
Almidón de papa (por infusión),	4
Dextrosa	20
Agar	15

#### PDB (Difco™)

Componente	Cantidad (g/L)
Almidón de papa (por infusión),	4
Dextrosa	20

#### TSA (Difco™)

Componente	Cantidad (g/L)
Digestión pancreática de caseína	15
Digestión de papaína de soja	5
Cloruro de sodio	5
Agar	15

#### TSB (Difco™)

Componente	Cantidad (g/L)
Digestión pancreática de caseína	15
Digestión de papaína de soja	5
Cloruro de sodio	5

#### NBRIP

Componente	Cantidad (g/L de H <sub>2</sub> O)
Glucosa	1
(PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> Ca <sub>3</sub>	5 (o 2 de fosfato de roca)
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	5
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,25
KCl	0,2
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,1

PVK

Componente	Cantidad (g/L de H <sub>2</sub> O)
Glucosa	10
Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	5 (o 2 de fosfato de roca)
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,5
NaCl	0,2
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,01
KCl	0,2
Extracto levadura	0,5
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,002
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,002

CAS

Preparación de medio base

Componente	Cantidad
Solución salina*	100 mL
PIPES	30,24 g
Extracto de levadura desferrado	1 g (sol 5% -> 20 mL)
MgCl 1M	1 mL
CaCl <sub>2</sub> 0,1M	1 mL
Manitol	1 g
H <sub>2</sub> O	748 mL
Agar	15 g

Ajustar pH a 6,8 con NaOH 50%

Preparación de solución colorante

CAS	60,48 mg
H <sub>2</sub> O	59 mL

\*Preparación de la solución salina

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,3 g
NaCl	0,5 g
NH <sub>4</sub> Cl	1,0 g
H <sub>2</sub> O	100 mL

Agregar al medio base 10 mL de Glucosa 20% previamente esterilizada, 6,25 mL de Glutamato 10%, 6,25 mL de Biotina 0,01%. Mezclar la solución colorante con 1 mL de FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O (135 mg / 50 mL en HCl 0,01N) y bajo agitación agregarla gota a gota sobre una solución de 72,88mg de HDTMA en 40 mL de H<sub>2</sub>O (poner unos segundos en el micro para que se disuelva). Agregar la solución final al medio base justo antes de armar las placas

## Reactivos

### Reactivo de Salkowski

Se prepara agregando 1 mL de  $F_3Cl_3 \cdot 6H_2O$  0,5 M a 50 mL de  $HClO_4$  35%.

El  $HClO_4$  (ácido perclórico) es muy tóxico, se debe realizar en campana de gases.

## Condiciones y mix utilizados para las PCR

### *nifH*

Componentes para 1 reacción	Volumen( $\mu$ L)
H <sub>2</sub> O	34,1
Buffer 10x	5
MgCl <sub>2</sub> 50mM	1,5
dNTPs 5mM	2
Cebador R 20uM (PoIR)	2
Cebador F 20uM (PoIF)	2
BSA 0,1%	2
Taq Polimerasa (5U/ $\mu$ L)	0,4
ADN molde (56 ng/ $\mu$ L)	1

Para la reacción de amplificación se utilizó el siguiente programa: un ciclo de desnaturalización inicial de 3 min a 95°C, seguido de 30 ciclos de 45 segundos a 95°C, 30 segundos a 57°C, 30 segundos a 72°C. Por último, se realizó un ciclo de extensión final de 5 min a 72°C.

### *ARNr 16S*

Componentes para 1 reacción	Volumen( $\mu$ L)
H <sub>2</sub> O	16
Buffer 10x	2,5
MgCl <sub>2</sub> 50mM	0,5
dNTPs 5mM	1,25
Cebador R 10uM (1492R)	1,25
Cebador R 10uM (27F)	1,25
BSA 0,5%	1
Taq Polimerasa (5U/ $\mu$ L)	0,1
ADNg (56 ng/ $\mu$ L)	1

Para la reacción de amplificación se utilizó el siguiente programa: un ciclo de desnaturalización inicial de 3 min a 95°C, seguido de 30 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 59°C, 90 segundos a 72°C. Por último, se realizó un ciclo de extensión final de 7 min a 72°C.

# Secuencias

## ARNr 16S

TCCCGTATCTACCCACCTTCGCGGGCTGGCTCCTTGCGGTTACCCACCCCGGATTACTAGCAATCCGACTTCATGCAGCGAGTTGCAGCTGCAATCCGAAGTCA  
GACCGGCTTTCTAGGATTGGCTCCACCTCGCGGCTTCGCTCCCGTTGACCGCCATTGTAGTACGTGTGTAGCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCA  
TCCCCACCTTCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCTGCCTAGAGTGCAGCTTACCTGCTGCAACTAAGCATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAAATC  
TCACGACACGAGCTGACGACAACATGCACCACTGTCTCCTGTCCCGAAGGAAAGGCCTATCTACAGCGGTGACAGGGATGTAAGACCTGGTAAGGTTCTTC  
GCGTTGCTTGAATTAACCCACATACTCCACTGCTTGTGCGGGTCCCGCTCAATTCCTTTGAGTTTCAGTCTTGCAGCCGTAACCCAGCGGAAATGCTTAATGTGTTA  
ACTTCGGCCACCAAGGGTATCGAAACCCCTAACCACTAGCATTATCATGTTTACGGCGTGACTACCAGGGTATCTAATCTGTTTCTCCACGCTTCGCGCTCAGCG  
TCAGTTACAGCCAGAGAGTGCCTTCGCCACTGTTCTCCACATCTCTACGATTTCACCGTACACGTGAAATCCACTCTCCTTCTGCACTCAAGCTCCTCAG  
TTCCAGTGCACCCGAAGTTGAGCCTCGGGATTAACACCAGACTTAAAGAGCCGCTGCGCGCTTACGCCAATAATCCGGACAACGCTTCCCTTACGTAT  
TACCGCGGTGCTGGCAGTATAGCCGGGGCTTCTTCTCAGGTACCGTCACTTATAGCAGTACTCTATAAGACGTTCTCCTGGCAACAGAGCTTACGATCC  
GAAAACCTTCACTACTCACGCGGCTGTCTCCGTAGGCTTTCGCCATTGCGGAAAGATTCCCTACTGCTCCTCCGTAGGAGTCTGGGGCGGTGTCTCAGTCCAG  
TGTGGCCGATCACCTCTCAGTCCGCTACGATCGTCCGCTTGTAGGCTTACCCCACTAGCTAATGCGCGCAGGCCATCCACAAGTACAGATTGCTCC  
GTCTTCTCCTTCTCCATGCAAGGAAAGGATATATCGGGTATTAGCTACCGTTTCCGGTATTATCCCTGCTTGTGGCGAGGTTGCCTACGTGTTACTACCCGCTC  
CGCGTAGTGATGTAGAAGCAAGCTTCTACATCATCCGCTGACTGATGTATAGCACCCGCACTCC

## gyrB

ATGTCATGAATCAACCGTCTTATGATGCGGGCAGATTAGTCTGGAGGCTGGAAGCGGTTGGAAGCGTCCCGGATGATATTGGCTCTACAAGTGTCAA  
AGGTCTCCATCATTTGGTCTGGAAGTAGTGGAACAACAGTATTGACGAAGCGCTGGCGGGTATTGTAACAGCATTAGGTTATCGTTACAGGATAACAGTATTAC  
CGTTACAGATAATGGCCGTGTTATCCGGTAAGTGAACACGCCAAATGAAAAATCAGCATTGGAAGTCGTTATGACGGTACTTCATGACGGCGTAAATTCGGAG  
GTGGAGGATACAAGGTATCCGGCGTGTGACGGGGTGGTGTATCCGTAGTAAATGCTCTATCCAGCAAAGTATGATGTTGTCGTAACCGGACGACATGTTAC  
GAACAGGAATATCATCTGTTGATACCGCAGTATGATGTGAGAATCATCGGTGAGACAGACGAGACGGGACCCAGACGACATTTATCCGGATGAGCAGATTTTAC  
TGAAACAACCATATATGACTATAATACGCTTCAAACGCGGATTCTGAGTGGCTTTCTGAACAAGGGATTGCGATCAGCTTGAAGGATGAGCGGACAGGTGCCAG  
CGATACCTTTCACTACGAGGGGGAATCAGTGAATACGTGCAGTTTTGAATCAACAAGAGAAAGTCTCATGAGCAGCCGATTTATGTCGAAGGCTCCCGCATAT  
GATTCAAGTCGAAGTTGCGTGAATAAAGACAGCTACACGAAAAATTTATTCTTCCGCAACAATCAACACACATGAAGCGGAAACACAGAAATCCGGCTTC  
AAGAGCGCATTAAACCGGATTTAAGCATTATGACGCAAAAATGGCATGATTAAAGATAACAACGCCAACTGACCGGTGATGATGCGTGAAGGGCTGACAGC  
GATCATCTGTCAAATCCCGAAACCGCAATTTGAAGTCAAACGAAAAACAGCTGGGCAACAGTGAAGTTGAGGAAATGTCGAAATCTGTTCCGACAGAAAGCT  
GCAGGAGTTCTGGAGAAAAATCCAGCTGTTCTCGCCGCTGTTGATAAATCCTTACAAGCAGCGCGTCCCGTGAAGTCCCGTAAAGCAGTGAACCTGACTCG  
TCGTA AAAAGTGCCTGGAAATCAGCTCTTCTCGCAAGCTGGCTGACTGCTCTAAGGATGCTTCGATCAGTGAAGTGTACATCGTTGAAGGCTTTCAGCGGG  
CGGTTCCGTAAGCAGGGCCGTGATCGCCACTTTAGGCTATTTTCCAAATCGCGTAAAATCCTGAACGTTGAGAAGGCAGCTTTCAGCGTATTTGTCAGTATG  
GAAATCAGGTCGATGGTAACAGCAATGGGTACAGGGATCGGAGACGATTTTACATCTCCAAGCGCTTATCACAAGGTCATTATATGACGGATCCGATGCGA  
CGCGCTCATATTCGACGCTGCTGACGTTCTTACCCTGATCGTAAAATATAGATGCAGGCTATGTTTATTTGCTCAGCGCCGCTATTCAGGTTAGAG  
CGCAACAAGGTCGTACGCTATGCAACTCAGAGGCTGAACGGGATGCAATCATTGAGAGTTTGAAGAAAAACGCAAAAGTACAACATACAGCATAAAGGTTTGGG  
CGAAATGGATGCGACACAGCTGTGGGAGACGACAATGGACCCAGAGAGCCGACCATGCTGCAGGTAACCGTTAATGACGCGATGCTGGCAGATAATTTGTTCAACA  
CCTAATGGGAGACGATGTTGAGCCTCGCCGCGACTTTATCCAGGAACATGTAAGTATGTAAAAATCTCGATTTTAA

## recA

TTGTCAGATCGTCTGCTGCGTGGATATGGCGCTCCGTCAAATAGAAAAGCAATCCGGTAAAGGTTCTATCATGAAGCTGGGTGAGTCTACACATATGCAGGTGGAA  
ACAATTCAGTGGTTCAATTCCTTGGATATTGCATTAGGAACCGGGCGCTTTCCAAAGGCGCGATTGTTGAAGTTATGACCGGAAATCATCCGGTAAACGACA  
GTAGCTTCTCATGCTATCGCAGAGGTGCAAAAAACAGGGCAGACGGCTGCCTTATCGATGCCGAGCATGCACTTATGATCCATCGTATGCGAGCAAGCTGGGTGCAAT  
ATCGATGAGTTGTTGCTATCGCAACCAGATACAGGAGAACAGGCACTTGAAGTTGCTGAAGCTCTGATCGTATGAGGAGCAGTAGACATTTATCGTACTGACTCTGTC  
GCAGCACTTGTACCGAAGGCAGAGATTGAAGTGAATGGGGGATCCCATGTCGGCTTCAAGCGCTTTGATGTACAGGCATTGCGCAAGCTGCTGTTGTCGAT  
TAATAAATCGAAAATCTCGTATCTTTAATACAGTTGCGTAAAAGTGGTGTATGTTCCGGAAACCCGAAACAACAGGTTGGCGTGCATTGAAGTTTTAC  
TCTACAGTACGCTTGGATGTTCCGGTGTGAAAAGTTGAAAATGGGGAACGACATTTGAGGAAACCGTACCCGCTAAAGTCTGTAAGAAATAAAGTGGCTCCTCT  
TTCCGTCAAGCTGAAGTGGATATTATGACGGTGGGCAATTTCAAAGAAGGCAGCTTATGACATCGGTACGGAGCATGACATTGTCGACAAGAGTGGAGCGCTG  
GATTTCTACGAAAGTGAAGCGCTTGGTACGGGACGGGAAACCGGAAAGCAATTTTTAAAGGAAAAATCCGAACATTTGCTGTTACAATCGAGCAGAAAAATTCGATTGG  
CCAGCAATTTAATACGACAGTAGTCCACCGACAGAAGAAGCAGTTGGCTCAGGAAGCAAGGAAAGACAGGAATTGCTGGAGCTCGAATAA

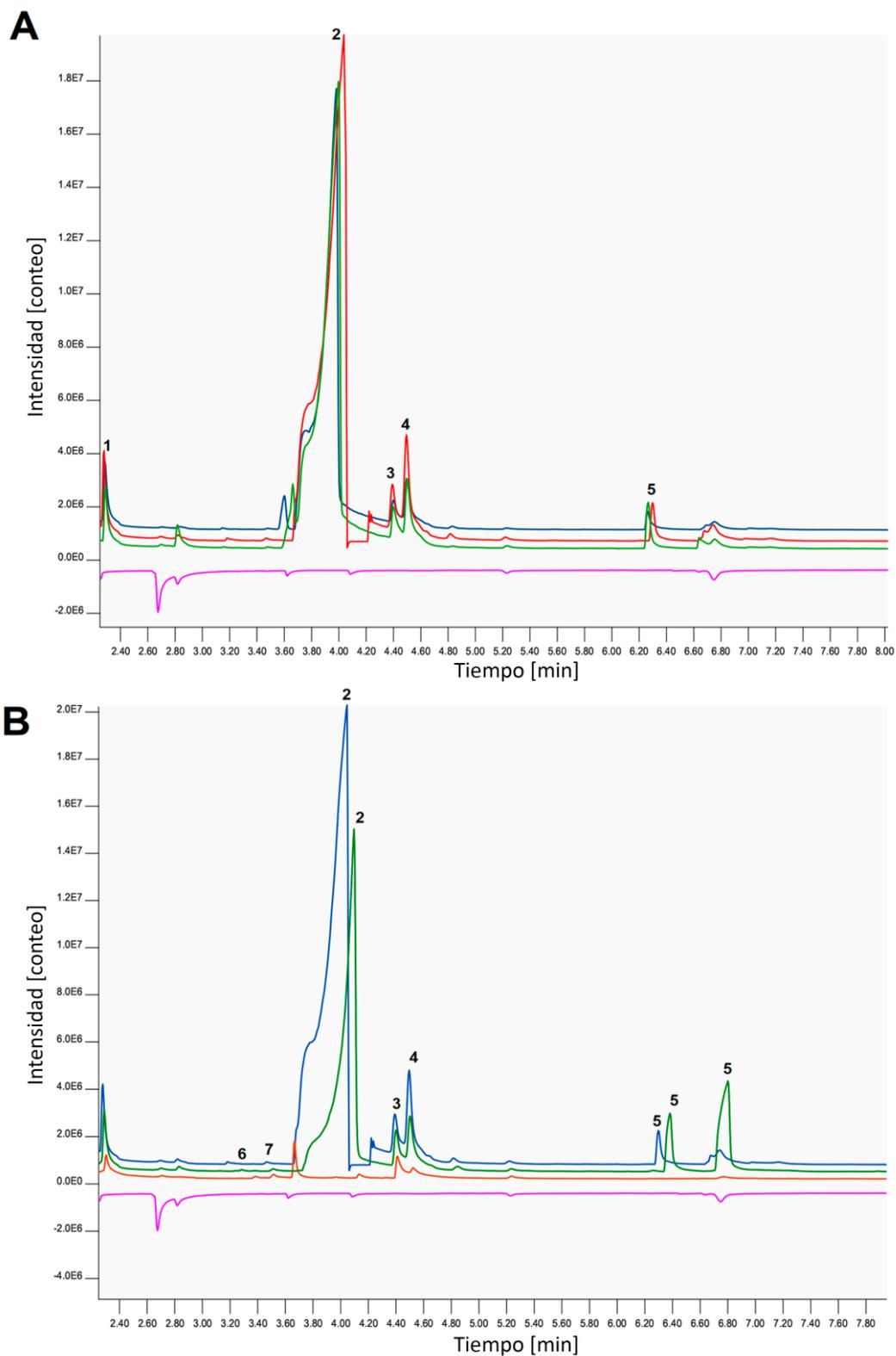
## recN

ATGCTGGTCACTTTATCTATACGGAATCTGCGAGTTGAGAGGCTGCGATGTTCAATTTTATAAAGGCTTTCACGTATTAAGTGGGAAACAGGCGCGGTAATCTA  
TCATATCGATGCGTAGGGCTGATTGCAGGAGGAAGAGGATCTGCCGATCTGATGCTACGCTACGGATGTGATAAAGCAGAGATGGAAGCCTTATTTGAACTGCCGACA  
AAACATCCGGTTTGGAGCACACTGGAGCAACAAGGCATTAAGCCAATACGGAAGAGCATTGCTGATTGCGGGAACTTACAGCCAAAGGAAAGCTCTCGCG  
AATTAACGGTCAAGTCAATTAACGATGTTGCGTGGGTAGGCGAGCAATGGTTAATATCCAGGACAGCATGAGCATCAAAGTCTGCTGCGCGCAGAGCGCC  
ATCTGGCACTGCTGGATACGTTTGGAGATTGCGTTATTGGACCGGTAAGCACTAATCCGAGCGCTATAATGCTTTTCAAAGCGGAAAAAGAAAGTCCGGGAAAT  
TGCAAGCTCCAGCAAAAGGCTTATCAGTATTGGATATGTACCGATTCCAGTTGGAAGAGATCGCTGCAGCGGAGCTAAAGGTTGGGGAAAGTGAATATTGACA  
GAAGAACGGTCAAGCTATCCCATAGTGAAGAAATGATGGATGGGTATCCGGAGCTTACGAATTGCTGAATGGCAGAGGTGGGCTGAACACGATCAATGATGAT  
TGTACAGACTGAACGATGTTCAAACCTACGACAGCAAAATTTACGCCCCGCTGAGCAAAATCCAGTCCGCTTTTATCAGCTGGAGGATGCCGATTTCAATTCG  
TTCGTACCGTGAAGATATCGATTTAATCCAGCAAGCTGCATGAAGTGAACAACGATTGAATCAGATTACCGGGTTACAACGAAAAATGTTGATGATATCGAGCA  
GATTTTGGAAATACTATAGTCGATTGAGCAGGAAACCGACTGCTGAAAAATAAGGATGAACGACTGGAGCAATTAATGCAAGCGGGATGAGTTGCTTTCTGATTT  
GCTAAAGATTGCGGAAGAGCTTACGGAAGCGGTGAAATTTGCGGAAAGAACTTCCGAGCAAGTAGAGCAGGAGTTAAAGGACCTGCAATGGAAGGACATCA  
CTCAAGGTCGGGATGATCCGATTGAAGATCCGAGGGGATGATGAAATAAGGGACTGCGCGTAAGACCTACCAAGCAGGGGATGATAATGCGGAATTTCTCATTTT  
TCCAAACCCCGGCAACCGCTTCTCCCTTGGCAAAATCGCTTACGGCGGTGAGTTGTACGATATCATGCTGGCAATGAAAAGTATTTTCCAGGCTGATCAAAAT  
CCGGTACTTATTTTGCAGAGGTGGATACCCGGGTAAGCGGGCGGGCTGCTCAGTCCATTGCCGAGAAAGTGTACCTTCTGCTGCTCAGGTTGTTCCATTA  
CTCATTACCACAGGTTGATCATGCGGATCATCAGTATCTAATTGAGAAAAATGTTTATGATGAGCAGGACCATGACGCAAGTTCCAGGATTAACGGAAGAGGACG  
TGTAAGGAATTTGGCAGCTATGTTGGCGGTGTTGAAATCACGAAAAAATCATTGATCAGCGCAGGAAATGCTGAATTTGGCGGAAGGAAAGGCTGA

*rpoB*

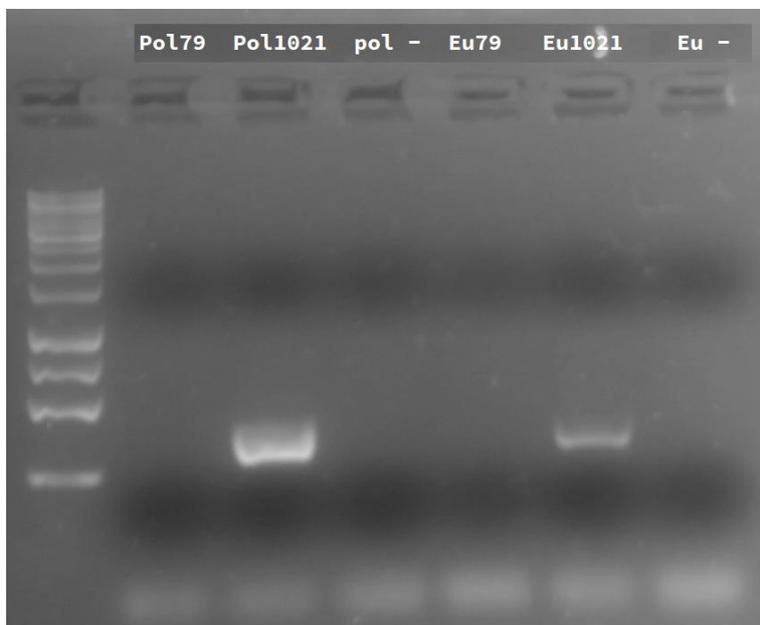
ATGAGGGGTGAGTTAAGTTGGCAGGACATCTTGTTCATATGGTGCAGCACTCGGGCAGTTATGCACGCATCAATGAGGTACTCGAGGTTCCGAACCTGATTGAA  
ATCCAACAAAACTCTACGACTGGTTTTGGAGGAAGGATTACGGGAGATGTTTCGGGATATTTCTCCAATTCAGGATTCACAGGAAACCTGATTCTGGAGTTATTG  
ATTACTCTCTCGGAGAACCTAAATATACCGTTGACGACGCAAAAGAACGCGACTAACGATGCAGCACCCTCGGGTAAAAAGTCCGGCTTATTAATAAGAAACCG  
GGGAAGTAAAGAGCAGGAAGTTCATGGGAGACTCCCGCTGATGACTGAAACGGGTACGTTTATTAAACGGTGGCAACGGGTTATTGTCAGCCAGTTGGTT  
CGCTCTCCAGCGTCTATTTAGCACAAGTGCACAAGAAATGCGAAAAACAATACACCGCAACGGTAATTCCTAACCGGGGAGCTTGGCTTGAGCTGGAGATGGAT  
GCGAAGGATATTATCTATGTCGGATTGACCGTACTCGTAAAATCCGGTTACGGTGTGCTGCGTGGCTTGGTTTTGGCACTGATGCTGAGATTCTGGATTGCTCG  
GCAATGACGAATATATCCGCAACACGCTTGATAAAGACAATACCGACTTACCGAAAAAGCGCTGATCGAAATTTATGAGCGCTTCTCGGGTGGAGCGCTACAC  
TGGAAAATGCAAAGAGCTTGTGCTGACGCTTCTTGTATCCAAACGTTATGATCTGGCCAACGTAGGCCGTTACAAAATCAACAAAAAGCTCACATAAAAACCG  
TCTATTCAATCTACGTTCTGCTGAGACTCTGATTGATACAACAACCGGTGAAATCATCGCTGAAGCAGGGCAAAATGGTAGATCGGCGCTTGTGGACGAGATTTGCT  
CAACTGGAGCGTGGTAGGACACCGTACGTATCATGTTGCCAGCGCGTACTGAAAGCAATGATATTCGGCTTCAAACGATTGACGTATTCTCGCCGATTGAGGAT  
GGCAAGGTGTAATACTGATTGCTAACGGAAATATTGATAAATCGGTGAAACATATCACGCTGCCGATATTAATTCCTCCATCAGTTATTTAATACTTGCCTCACG  
AATCGGCAGCACAGACGATATTGATCACTTGGGCAACCGTCTTTCGTTCTGTAGGTGAGCTGCTCAGAACAGTTTCGTATCGGGTGTCCCGTATGGAACGCGT  
GGTACGCGAAAGAAATGTCGATTACGAGTGCATGTAATTACGCCACAGCGCTGATTAAACATCCGTCGGTATCGCTTCGATAAAAGAGTTTTTGGCAGCTCCCAA  
TTGTCCAGTTTATGGACAGCAACCGCTTGTGAACTAACGCACAAGCGTCTGTCTCCGACTCGTCTGGCGTTTTGACACGCGAACGCGGGGATGGAA  
GTACGTGACGTCCATCCGAGTCACTACGGCGTATGTGCTATCGAGACGCGGAGGGACCAAAACATCGGTTTTGATTAACCTCTGTCTACGTTTGCAGTATCAATG  
AATACGGTTTTATCGAAGCCCATATCGTTGGGTAGATCCGAAGACCGGAAAAAGTTACAGACCAGATTGATTACCTGACTGCCGATGAGGAAGATAACTACATCGTAG  
CTCAGGCAAAATGCGGAATTGACGGAGGAAAACCTTCAAGGATGAAATCGTATCGTCCGCTATAACAAGCAGTCTGATAACATTATTCCAATGGCTAGTAGCCGTG  
TTGATTACATGGACGTATCGCTAAACAGGTCGTATCGGTGGCGACTGCACTGATTCCGTTCTCGGAGAACGATGACTCTAACCGCGCATTGATGGTTCCAACATGC  
AACGGCAGGCTGCCGCTTCTGATTTCAAAGGCACCTTTGGTTGGAACAGGAATGGAACATAAGTCTGCAAAAGATTCCGGTGTGTTGTGTTGTCCAAATACAACG  
GGGTTATCGAACGTTCTCGGCCAACGAAATTTGGCTGCGTGGATTGAAACTGTGGATGGCGCTGAAGTAAAAGGGCAGATTGTTAAGTAAAATTACAAAAATTTA  
TGCGTTCTAACCAAGGAACATGCATCAACCAGGTCCTAATCGTGAACAGAGGCGATATTGTCAAAGTTGGCGATATTTTGCAGATGGTCTTCCACGGAGATGGGCG  
AGCTGGCATTGGGACGTAAACGTTGCTGAGCCTTATGACTTGGGAAGGTTACAACACGAGGATGCGATCTTGTAGCGAGAAGCTGGTTAAAGAGGACGTATAT  
ACCTCGATCCATATCGAGGAATACGAATCCGAAGCCCGGATACGAAGCTCGGACCGGAGGAAATCACGCGTATATTCGAATGTCGGTGAAGAAGCGCTTCGCAA  
TCTGGATGAGCGCGGAATCATTGCAATGGTGTGAGATTGCCGAGGTGACATTTCTGTTGGTAAAGTAAACACCTAAGGGTGTGACTGAATTGACGGCTGAAGAGC  
GTCTTGTGATGCAATCTTTGGTAAAAAGCACGCGAGGTTCCGCGACACTTCTTGTAGAGTTCCCGGAACTGACGGGATCGTTGTAGATGTTAAAGTGTAAACCG  
TGAAAATGGCGATGAGCTGCCACCGGGCGTAAACCAGCTGGTGCCTGTGTACATTGCTCAAAAACGTAAAATTTCCGAAGCGATAAAAATGGCTGGACGTACCGGTA  
ACAAGGGTGTCTTGGCCAGGATCTTGCCTGAGGAAGATATGCCATTTCTGCCGATGGTACGCCGTTACAGGTCGTTCTGAACCCACTGGGCGTCTTCCACGGATGA  
ATATCGGACAGGTGCTCGAAGTCCATCTGGGTATGGCCGCAATGCGTCTTGTATTATGTTGGCTACGCCAGTATTTCGATGGTCCCAAGGAATATACGATTTTGTATA  
CGATGGAAGAAGCAGGATGCAGCGCAATGGTAAACTGTGTTGTATGACGGACGTACAGGGGATCGTTTTGAACGTGAAGTTACTGTGGGTGTCATGCACATGATC  
AAACTGGCGCACATGGTTGACGATAAAAATCCATGCCGTTCCACGGGTCCTTACTCTTGTACTCAGCAGCCATTGGGCGGTAAGGCTCAATTCGGTGGTACGCGTT  
TCGGGGAGATGGAAGTATGGGCGCTGGAAGCTATGGCGCAGCGTACACGCTTCAAGAAATTTGACTGTGAAATCCGATGATGTGGTGGCCGTTAAAACTTAT  
GAATCCATCGTCAAAGGTGAAAAATGTGCTGAACCGGGTGTGCTGAACTTCAAGCTTGTATCAAAGAGCTGCAAAGCTTGGGGATGGACGTGAAGATTCTGTCC  
GAAGACGAACAAGAGATTGAAATGAGAGAGCTTGATGACGAAGATGACTCAACCGCGATAAGCTGAGTTTGAATCTGGAAGGCTCTGAGGTTGGTGTAGAGTAG

## Figuras suplementarias

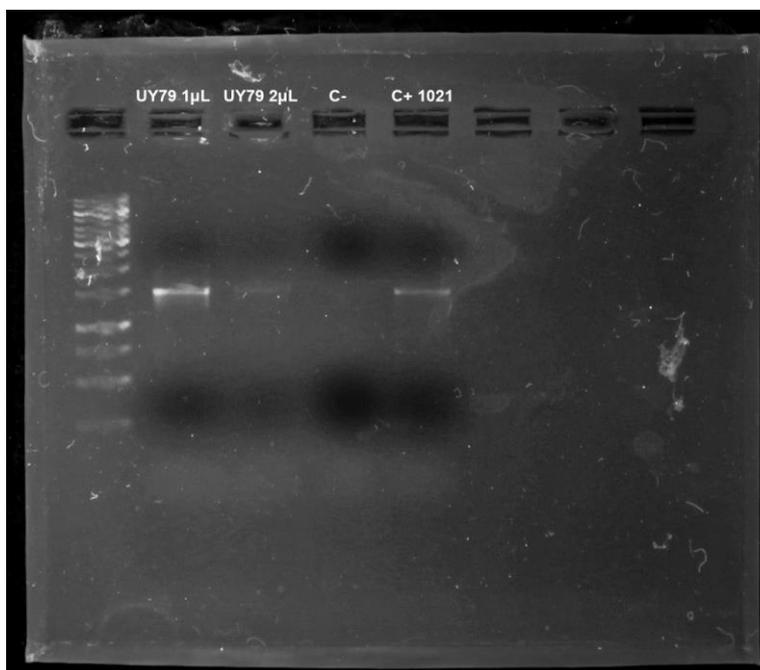


**Figura S1. Cromatogramas de SPME-GC-MS. (A)** Cromatogramas de compuestos volátiles (VCs) producidos por un cultivo de 7 días de la cepa UY79, extraídos mediante exposición de 30 minutos a la fibra de SPME (rojo) o 10 minutos (azul); por un cultivo de 36 horas de la cepa UY79 y exposición de 30 minutos a la fibra de -SPME (verde); y por el

medio PDA después de 7 días de incubación y exposición de 30 minutos a la fibra de SPME (fucsia). **(B)** Cromatogramas de VCs producidos a los 7 días de incubación y exposición de 30 minutos a la fibra de SPME por la cepa UY79 (azul), *S. rolfsii* 1948 (rojo), la cepa UY79 enfrentada a *S. rolfsii* 1948 (verde) y el medio PDA (fucsia). La identificación de los picos representados en la figura corresponde a: (1) 2-metil-1-propanol, (2) 3-hidroxi-2-butanona, (3) 3-metil-1-butanol, (4) 2-metil-1-butanol, (5) 2,3-butanodiol, (6) 2-etilfurano y (7) 2,5-dimetilfurano.

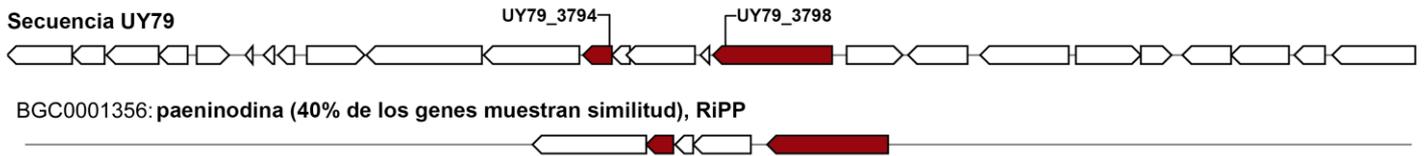


**Figura S2.** Electroforesis en gel de agarosa. Se muestran los productos de amplificación obtenidos por PCR para el gen *nifH* utilizando como cebadores PolF/PolR y EuF/EuR (Pol y Eu, respectivamente). Se utilizó como molde ADN genómico de la cepa UY79 (79) y como control positivo se utilizó ADN genómico de *E. meliloti* 1021 (1021). Como control negativo (-) no se incluyó ADN molde en la reacción.

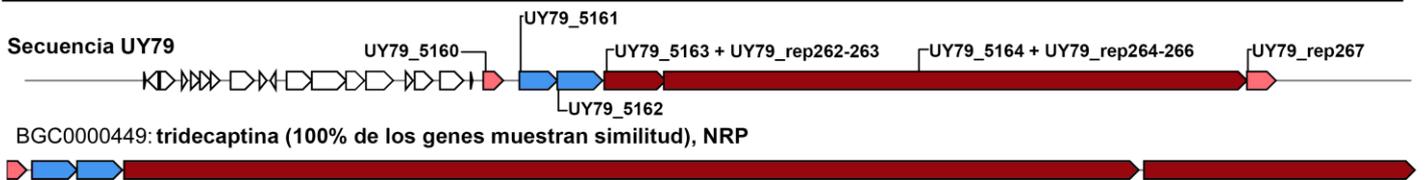


**Figura S3.** Electroforesis en gel de agarosa. Se muestran los productos de amplificación obtenidos por PCR para el gen *ARNr 16S* utilizando los cebadores universales 27F y 1492R. Se utilizó como molde ADN genómico de la cepa UY79 (UY79) y como control positivo se utilizó ADN genómico de *E. meliloti* 1021 (1021). Como control negativo (-) no se incluyó ADN molde en la reacción.

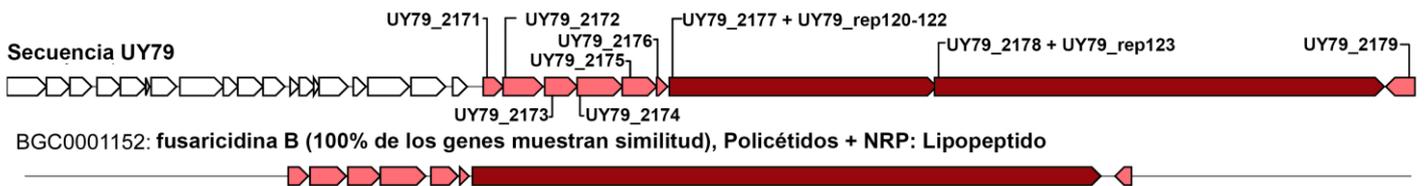
## A) Paeninodina



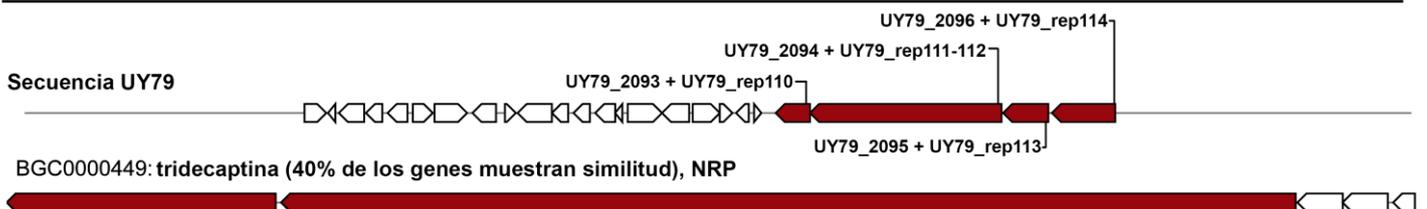
## B) Tridecaptina



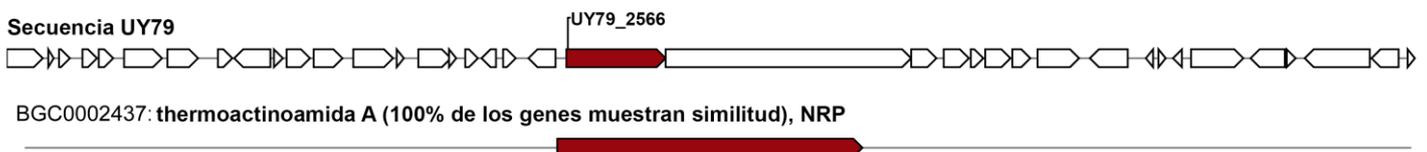
## C) Fusaricidina B



## D) Tridecaptina



## E) Termoactinoamida A



**Figura S4.** Clústeres biosintéticos asociados a compuestos con actividad antimicrobiana detectados en el genoma de la cepa UY79 mediante el uso de la herramienta bioinformática antiSMASH. (A) paeninodina, (B) tridecaptina, (C) fusaricidina B, (D) tridecaptina y (E) termoactinoamida A. Los genes de la cepa UY79 con similitud de secuencia respecto de los clústeres de referencia se muestran en color: en bordó genes biosintéticos centrales, en rosado genes biosintéticos adicionales y en azul genes relacionados con transporte.