TESIS DE DOCTORADO
PEDECIBA
ÁREA BIOLOGÍA
SUB ÁREA MICROBIOLOGÍA

Caracterización de una cepa de *Pseudomonas fluorescens* promotora del crecimiento vegetal

MARIA LIS YANES LEÓN

Orientadora: Alicia Arias
Co-orientador: Raúl Platero

Laboratorio de Ecología Microbiana
IIBCE

Tribunal:

Dr. Jorge Monza
Ing.Agr. Omar Borsani
Dra. Silvia Batista
Dra. María Julia Pianzzola

I.I.B.C.E.

PEDECIBA

TESIS DE DOCTORADO
PEDECIBA
ÁREA BIOLOGÍA
SUB ÁREA MICROBIOLOGÍA

"Caracterización de una cepa de *Pseudomonas fluorescens* promotora del crecimiento vegetal"

María Lis Yanes

Orientadora: Alicia Arias
Co-orientador: Raúl Platero

Laboratorio de Ecología Microbiana
Departamento de Bioquímica y Genómica Microbianas
IIBCE

Tribunal:

Dr. Jorge Monza (Cátedra de Bioquímica, Facultad de Agronomía)

Ing.Agr. Omar Borsani (Cátedra de Bioquímica, Facultad de Agronomía)

Dra. Silvia Batista (Laboratorio de Microbiología Molecular, IIBCE)

Dra. María Julia Pianzzola (Cátedra de Microbiología, Facultad de Química)

Agradecimientos:

A Alicia por apoyarme hasta el final de esta etapa, mechando la tesis entre nietos y cerros. Aún sos “la jefa” aunque los cafecitos y las anécdotas sean más esporádicos.

A Rufo por ayudarme a dar forma a todo este trabajo y por sus consejos.

A Claudia por acercarme a los T-RFLP.

A Rosario Durán, Madelón Portela y Danilo Davyt por las horas dedicadas y el enorme aporte que hicieron a este trabajo. A Andrés Iriarte por aportar sus conocimientos de informática.

A la gente del laboratorio por dar siempre una mano cuando es necesario, en especial a Vane por la ayuda en biología molecular, Dani, Paula, Naty por estar siempre que necesité ayuda y a Ana por los momentos de catarsis. A Lucía por las interminables horas compartidas en los ensayos de campo y a todos los compañeros que de alguna manera aportaron para que este trabajo se realizara.

A PEDECIBA, ANII y Fondo Clemente Estable por financiar el trabajo.

A Pablo, Agus y Rocío por la enorme paciencia en los momentos más estresantes y por todo el apoyo y el amor que me dan.

ÍNDICE

CAPITULO 1 **1**

Introducción general **2**

1- Bacterias promotoras del crecimiento vegetal 3

1.1- Control Biológico de patógenos de plantas 5

1.2- Mecanismos de biocontrol 7

1.2-1 Parasitismo y depredación 7

1.2-2 Competencia por nicho y nutrientes 8

1.2-3 Metabolitos secundarios con acción antimicrobiana 9

1.2-4 Inducción de respuestas de defensa en las plantas 9

1.3- Mecanismos de promoción directa del crecimiento vegetal 10

1.3-1 Aporte de nutrientes hacia la planta hospedera 10

1.3-2 Síntesis de fitohormonas 12

1.4- *Pseudomonas* fluorescentes 14

Antecedentes **15**

Pseudomonas fluorescens C119 14

Objetivos **16**

Objetivo general 16

Objetivos específicos 16

CAPITULO 2 **17**

2.1 Introducción **18**

2.1-1 Alfalfa: requerimientos nutricionales y problemas de implantación 18

2.1-2 Introducción de un inoculante bacteriano en el suelo 20

2.1-3 Métodos de estudio de la diversidad microbiana. 25

2.2 Estrategia de trabajo **28**

2.3 Metodología **28**

2.3-1 Preparación del inoculante y viabilidad del mismo 28

2.3-2 Bacterización de las semillas de alfalfa 29

2.3-3 Recuentos bacterianos en semillas de alfalfa 29

2.3-4 Ensayo en condiciones de campo 29

2.3-5 Análisis estadístico 31

2.3-6 Colonización rizosférica 31

2.3-7 Análisis de la estructura de la comunidad bacteriana de la rizósfera de alfalfa 31

2.3-7.1 Análisis por DGGE 32

i) PCR 32

ii) DGGE 33

2.3-7.2 Análisis mediante T-RFLP 33

i) PCR 33

ii) Digestión enzimática y separación electroforética. 34

iii) Análisis informático de los perfiles de T-RFLP 34

2.4 Resultados **35**
2.4-1 Instalación del ensayo e implantación de la alfalfa 35
2.4-2 Colonización radicular 36
2.4-3 Promoción del crecimiento de la alfalfa 37
2.4-4 Contenido de Nitrógeno y Fósforo vegetal 38
2.4-5 Estructura de la comunidad microbiana de la rizósfera de alfalfa 39
2.4-6 Análisis de diversidad del dominio *Eubacteria* mediante PCR-DGGE 40
2.4-7 Análisis de diversidad del dominio *Eubacteria* mediante T-RFLP 44
2.5 Discusión **50**
2.5-1 Efectos benéficos de C119 sobre la implantación de la alfalfa 50
2.5-2 Colonización radicular 52
2.5-3 Impacto de la inoculación de C119 en la estructura de la comunidad bacteriana de la rizósfera de alfalfa. 54
2.6 Conclusiones y perspectivas **57**

CAPITULO 3 **58**
3.1 Introducción **59**
3.1-1 ANTIBIÓTICOS: diversidad de metabolitos antimicrobianos producidos por *Pseudomonas* spp. 59
Fenazinas 59
Diacetilfloroglucinol 60
Pirrolnitrina y pioluteorina 60
Ácido cianhídrico 61
Bacteriocinas 61
Biosurfactantes 62
3.1-2 Biosurfactantes microbianos: ramnolípidos y lipopéptidos 62
3.1-2.1 Biosíntesis de lipopéptidos cíclicos 65
3.1-3 Descubrimiento de nuevos antibióticos: abordaje bioinformático 68
3.1-5 Herramientas bioinformáticas aplicadas a la minería genómica 70
3.2 Estrategia de trabajo **72**
3.3 Metodología **72**
3.3-1 Secuenciación del genoma de *P. fluorescens* C119 72
3.3-2 Minería genómica: análisis de genes del metabolismo secundario 73
3.4 Resultados **74**
3.4-1 Características generales del genoma de *P. fluorescens* C119 74
3.4-2 Búsqueda de genes involucrados en el control biológico de patógenos 78
3.4-2.1- Sideróforos 78
3.4-2.2 Antibióticos 81
i) Lipopeptido 82
ii) Otras NRPS 88
iii) Compuestos volátiles 89
iv) Bacteriocinas 91
3.4-3.3 Enzimas hidrolíticas 92
3.4-3. Búsqueda de genes involucrados en la promoción directa del crecimiento vegetal. 94

3.4-3.1- Síntesis de fitohormonas 94
3.4-3.2- Solubilización de fósforo 97
3.4-4 Genes de resistencia a estreses bióticos y abióticos 98
3.4-5 Genes relacionados con patogenicidad y factores de virulencia 104
3.5 Discusión **105**
3.5-1 Generalidades del genoma de la cepa *P. fluorescens* C119 y confirmación de la especie 105
3.5-2 Genes relacionados con el control biológico de patógenos 106
3.5-2.1 Síntesis de sideróforos 106
3.5-2.1 Compuestos antimicrobianos 108
i) Lipopéptido cíclico 108
ii) Ácido cianhídrico 111
iii) Otros metabolitos antimicrobianos 112
3.5-3 Genes relacionados con características de promoción directa del crecimiento vegetal 113
3.5-3.1 Síntesis y degradación de fitohormonas 113
i) Acido indolacético 114
ii) ACC-desaminasa 114
3.5-3.2 Aumento de la disponibilidad de nutrientes en el suelo 115
i) Hierro 115
ii) Fósforo 115
3.5-3.3 Resistencia a estreses bióticos y abióticos 117
i) Resistencia a antibióticos 117
ii) Resistencia a estrés hídrico 117
iii) Resistencia a metales pesados 118
3.5-4 Genes relacionados con factores de virulencia 128
3.6 Conclusiones y perspectivas **119**

CAPITULO 4 **121**
4.1 introducción **122**
4.1-1 Rol natural de los lipopeptidos cíclicos 122
4.1-2 Diversidad estructural 123
4.2 Estrategia de trabajo **128**
4.3 Metodología **129**
4.3-1 Análisis de los metabolitos antifúngicos producidos por *P. fluorescens* C119 129
4.3-1.1 Extracción orgánica a pequeña escala de compuestos antifúngicos 129
4.3-2.2 Purificación a mayor escala 130
4.3-1.3 Cromatografía en capa fina 131
4.3-1.4 Bioensayos de actividad surfactante y antifúngica 131
4.3-1.5 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) 132
4.3-1.6 Espectrometría de masas 132
i) Caracterización de la cadena peptídica: derivatización de Ettan CAF 132
ii) Metilación de residuos ácidos 133
iii) Hidrólisis básica 133

4.3-1.7 Resonancia magnética nuclear 133
4.3-2 Obtención de mutantes incapaces de producir el lipopéptido 134
4.3-2.1 Mutagénesis generalizada 134
4.3-2.2 Identificación de mutantes 134
4.3-2.3 Verificación por Southern Blot 135
4.3-2.4 Caracterización de los clones mutantes 136
4.3-2.5 Identificación de genes interrumpidos 136
4.4 Resultados **137**
4.4-1 Actividad antifúngica del sobrenadante de cultivo 137
4.4-2 Análisis estructural mediante espectrometría de masas 138
4.4-3 Confirmación estructural mediante RMN 144
4.4-4 Confirmación de la actividad antifúngica del lipopéptido producido por la cepa C119. 148
4.5 Discusión **152**
4.5-1 Identificación del principal metabolito antifúngico de *P. fluorescens* C119 152
4.5-2 Implicancia del lipopeptido producido por la cepa C119 en el control biológico de patógenos 155
4.6 Conclusiones y perspectivas **159**

Consideraciones finales **161**

Referencias **162**

índice de figuras

Capitulo 1

Fig. 1.1- Mecanismos de promoción del crecimiento vegetal más importantes presentes en las PGPR 4

Capitulo 2

Figura 2.1- Diagrama del diseño experimental del ensayo de campo 30

Figura 2.2- Número de plantas de alfalfa determinado a los 21 y 121 días post siembra 36

Figura 2.3- Colonización radicular de la cepa αC119 en plantas de alfalfa. 37

Figura 2.4- Perfiles genómicos de obtenidos a partir de colonias aisladas de *Pseudomonas* generados mediante BOX-PCR. 37

Figura 2.5- Promoción del crecimiento de la alfalfa debido a la aplicación de C119. 38

Figura 2.6- Contenido de fósforo (A) y nitrógeno (B) de la parte aérea de plantas de alfalfa 39

Figura 2.7- Electroforesis en gel de agarosa de ADN total extraído a partir de muestras de rizósfera 40

Figura 2.8- Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR con cebadores específicos para un fragmento del gen del ARNr 16S de Eubacteria 40

Figura 2.9- DGGE del 16S ARNr de la comunidad bacteriana de la rizósfera de alfalfa 42

Figura 2.10- Análisis de agrupamiento de los perfiles de la comunidad de Bacteria obtenidos por DGGE 43

Figura 2.11- Fragmentos de del gen 16S ARNr amplificados por PCR 44

Figura 2.12- Perfiles de T-RFLP 46

Figura 2.13- Análisis de componentes principales 47

Figura 2.14- Contribución individual de cada OTU en el resultado del análisis de PCA 49

Capitulo 3

Figura 3.1- Efecto de la presencia de lipopeptidos sobre hifas y zoosporas de *Phytophthora infestans* 65

Figura 3.2- Esquema de la síntesis no ribosomal de la artrofactina 67

Figura 3.3- Organización de dominios dentro de un módulo de elongación de una NRPS 67

Figura 3.4- Análisis funcional de los ORFs identificados en el genoma de la cepa *P. fluorescens* C119 75

Figura 3.5- Arbol filogenético del gen *recA* para diferentes especies de *Pseudomonas* 75

Figura 3.6- Arbol filogenético del gen *gyrB* para diferentes especies de *Pseudomonas* 76

Figura 3.7- Arbol filogenético del gen *atpD* para diferentes especies de *Pseudomonas* 76

Figura 3.8- Arbol filogenético del gen c*arA* para diferentes especies de *Pseudomonas* 77

Figura 3.9- Arbol filogenético del gen *rpoB* para diferentes especies de *Pseudomonas* 77

Figura 3.10- Organización de módulos para las NRPSs responsables de la síntesis del cromóforo y del péptido de 6 aminoácidos de la pioverdina 78

Figura 3.11- Estructura de los péptidos sintetizados mediante NRPSs para el cromóforo (A) y el motivo peptídico (B) del sideróforo de la cepa αC119 80

Figura 3.12- Arbol filogenético para el gen *pvdL* de diversas especies de *Pseudomonas* 81

Figura 3.13- Esquema de las sintetasas de péptidos no ribosomales involucradas en la síntesis del lipopéptido de la cepa C119. 83

Figura 3.14- Comparación filogenética entre secuencias de aminoácidos de dominios de adenilación de diversos lipopéptidos cíclicos 84

Figura 3.15- Árbol filogenético de dominios de condensación de NRPS 85

Figura 3.16- Genes de biosíntesis del lipopéptido de la cepa C119 y el entorno genético del operón 86

Figura 3.17- Organización modular de los génes que codifican para una NRPS/PKS, involucradas en la síntesis de un metabolito 88

Figura 3.18- Genes de biosíntesis de metabolito secundario (identificado en el scaffold 23) 89

Figura 3.19- Genes de síntesis de ácido cianhídrico. 90

Figura 3.20- Esquema del operón de biosíntesis de colicina 91

Figura 3.21- Alineamiento de secuencias homólogas a la quitinasa ChiC 92

Figura 3.22- Alineamiento de secuencias homólogas a la metaloproteasa ArpA 93

Figura 3.23- Región del genoma que contiene genes posiblemente involucrados en la síntesis de AIA por una vía independiente de triptófano 95

Figura 3.24- Análisis filogenético de enzimas con posible actividad ACC desaminasa. 96

Figura 3.25- Predicción de la estructura tridimensional de enzimas ACC desaminasas a partir de la secuencia de aminoácidos. 96

Figura 3.26-Secuencia aminoacídica de enzimas ACC desaminasas las cepas de *Pseudomonas* C119 y UW4. 97

Figura 3.27- Diagrama de los genes necesarios para la síntesis de la enzima glucosa deshidrogenasa dependiente de PQQ (GD-PQQ) 98

Figura 3.28- Vías de biosíntesis de trehalosa presentes en la cepa *P. fluorescens* C119 100

Capitulo 4

Figura 4.1- Estructura de lipopeptidos cíclicos sintetizados por *Pseudomonas* spp. 126

Figura 4.2- Estructura de la amfisina 127

Figura 4.3- Análisis de la actividad antifúngica del sobrenadante de cultivo de C119. 139

Figura 4.4- HPLC analítica de la fracción del extracto orgánico con mayor actividad antifúngica 140

Figura 4.5- Espectrometría de masa del metabolito antifúngico. 141

Figura 4.6- Espectro de masas del péptido metilado 142

Figura 4.7- Espectro de masas del péptido hidrolizado 143

Figura 4.8- Espectro de ^{1}H-NMR del lipopeptido metilado 145

Figura 4.9- Espectro de ^{13}C-NMR del lipopeptido metilado 145

Figura 4.10- Analisis por NMR del lipopeptido cíclico. 2D- $^{1}H^{13}C$- HSQC 146

Figura 4.11- Análisis por NMR del lipopétido cíclico. 2D- COSY del compuesto metilado 146

Figura 4.12- Modelos estructuarales predictivos realizados en Chemdraw 147

Figura 4.13- Sitios de inserción del transposón Tn5-Lux en el genoma de la cepa C119 149

Figura 4.14- Alineamiento de la secuencia interrumpida en la mutante C119 2-3F 149

Figura 4.15- Alineamiento de secuencias nucleotídicas entre el fragmento adyacente al transposón Tn5-lux de la mutante C119 8-3B 150

Figura 4.16- fenotipo de las cepas mutantes en la producción del LPC 151

índice de tablas

Capitulo 1

Tabla 1.1- Agentes de control biológico y patosistemas sobre los que actúan a través de diversos mecanismos. 6

Capitulo 2

Tabla 2.1- Rango óptimo de macronutrientes y micronutrientes en plantas de alfalfa 19

Tabla 2.2- Impacto de la introducción de un inoculante microbiano en la estructura de la comunidad microbiana asociada a la planta hospedera 23

Tabla 2.3- Características fisicoquímicas y textura del suelo utilizado para el ensayo de alfalfa 35

Tabla 2.4- Número de OTUs que aportan más del 1% a la intensidad de la muestra y proporción de celdas con valor cero 47

Tabla 2.5- Lista de OTUs con mayor incidencia en la construcción del eje principal del PCA. 48

Capitulo 3

Tabla 3.1- Ejemplos de microorganismos productores de surfactantes y potenciales aplicaciones 63

Tabla 3.2. Datos generales de genomas secuenciados de cepas de *Pseudomonas* spp. referentes en el área del control biológico de fitopatógenos. 69

Tabla 3.3. Programas informáticos disponibles para la búsqueda de genes que codifican para metabolitos secundarios 71

Tabla 3.4- Genes involucrados en la síntesis, regulación y transporte de pioverdina (pvd) 79

Tabla 3.5- Predicción de la especificidad de los dominios de adenilación presentes en las sintetasa del lipopéptido de la cepa αC119 84

Tabla 3.6- Operón de biosíntesis del lipopeptido 87

Tabla 3.7- Genes de biosíntesis de colicina y otros genes ubicados en el entorno del operón 91

Tabla 3.8. Sistemas de resistencia a antibióticos presentes en la cepa αC119 99

Tabla 3.9. Esquema e información de los genes involucrados en la síntesis de glucanos periplasmáticos 101

Tabla 3.10. Operón conteniendo los genes necesarios para la síntesis de betaína y la internalización de colina y betaína 102

Tabla 3.11. Genes de tolerancia a metales 103

Capitulo 4

Tabla 4.1. Estructura primaria de la cadena peptídica de los principales LPC descriptos en *Pseudomonas* spp. 125

Tabla 4.2. Modificaciones estructurales realizadas sobre el lipopeptido 140

Tabla 4.3. Secuencia de aminoácidos predicha de acuerdo a las masas de los residuos 143

abreviaturas:

ACC	1-aminociclopropano-1-carboxilato
ACN	Acetonitrilo
AIA	Ácido indolacético
AMP	Adenosin monofosfato
ANOVA	Análisis de varianzas (del inglés: *Analysis of Variance*)
antiSMASH	*Antibiotics & Secondary Metabolite Analysis SHell*
ARNr	Ácido robonicléico ribosomal
ATP	Adenosín trifosfato
BasYs	Bacterial Annotation System
Blast	Basic Local Alignment Search Tool
CHCA	Acido α-ciano-4-hidroxicinamico
COG	Agrupamiento de genes ortólogos (del inglés: *Clusters of Orthologous Genes*)
COSY	Espectroscopía de correlación (del inglés: *Correlated spectroscopy*)
DAPG	Diacetil floroglucinol
DGGE	Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (del inglés: *Denaturing gradient gel electrophoresis*)
DIEA	Dirección de estadística agropecuaria
EDTA	Ácido etildiaminotetraacético
FAM	Fosforamidita fluorocromo 5-carboxifluoresceina
FAME	Metil éster de ácidos grasos (del inglés: *fatty acid methyl ester*)
FBN	Fijación biológica del nitrógeno
FISH:	Hibridación in situ con sonda fluorescente (del ingés: *fluorescent in situ hybridization*)
FUR	Proteína reguladora de la internalización del hierro (del inglés: *Ferric Uptake Regulation*)
GD	Glucosa deshidrogenasa
HCN	Ácido cianhídrico
HMM	Modelos oculto de Markov (del inglés: *Hidden Markov´s Model*)
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución (del inglés: *High Performance Liquid Chromatography*)
HSQC	Espectroscopía de coherencia cuántica heteronuclear (del inglés: *Heteronuclear single quantum coherence spectroscopy*)
ISR	Resistencia sistémica inducida
KB	Medio King`s B
LB	Luria Bertani
LPC	Lipopéptido cíclico
LSD	Menor diferencia significativa (*Least Significant Difference*)
Maldi-ToF	Desorción/Ionización mediante láser asistida por matríz acoplado a un lector de tiempo de vuelo (del inglés: *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time-Of-Flight*).
NBCI	*National Center for Biotechnology Information*
NGS	Secuenciación de nueva generación (del inglés: *Next Generation Sequencing*)
NRPS	Sintetasa de péptidos no ribosomales (del inglés: *Nonribosomal peptide synthetases*)
o. n.	Toda la noche (del inglés: *over night*)
ORF	Marco abierto de lectura (del ingles: open reading frame)
OTU	Unidad taxonómica operacional (del inglés: operational taxonomic unit)
PCA	Ácido fenazin-1-carboxílico (del inglés: *phenazine-1-carboxylic acid*)
PCA	Análisis de componentes principales (*Principal Components Analysis*)
PCP	Dominio de transportador del péptido (del inglés: *peptidyl carrier protein domain*)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés: *Polymerase chain reaction*)
PDA	Agar papa-dextrosa (del inglés: *Potato Dextrose Agar*)
PGPR	Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (del inglés: *Plant growth promoting rhizobacteria*)

Phz	Fenazina (del inglés: *phenazine*)
PKS	Sintasas de poliquétidos
Plt	Pioluteorina
PPL	Piridoxal fosfato (del inglés: *phosphate pyridoxal*)
Pqq	Pirroquinolina quinona
Prn	Pirrolnitrina
Pvd	Pioverdina
RAST	Anotación rápida de genomas microbianos usando la tecnología de subsistemas (del inglés: *Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology*)
RMN	Resonancia magnética nuclear
rpm	Revoluciones por minuto
SAS	Programa de análisis estadístico (del inglés: *Statistical Analysis Software*)
sp.	Especie
spp.	Especies
SSCP	Polimorfismo conformacional de la monohebra (del inglés: *Single-strand conformational polymorphism*)
TE	Dominio tioesterasa terminal
TET	Tetracloro-6-carboxifluoresceina
TFA	Ácido trifluoroacético (del inglés: *trifluoroacetic acid*)
TGGE	Electroforesis en gel con gradiente de temperatura (del inglés: *Temperature gradient gel electrophoresis*)
TLC	Cromatografía en capa fina (del inglés: *thin layer chromatography*)
T-RF	Fragmento de restricción terminal (del inglés: *terminal restriction fragment*)
T-RFLP	Polimorfismo del fragmento de restricción terminal (del inglés: *terminal restriction fragment length polymorphism*)
tRNA	ARN de tranferencia
U.V.	Ultravioleta
UFC	Unidades formadoras de colonia
v.f.	Volumen final

resumen

La utilización de bacterias nativas promotoras del crecimiento vegetal para mejorar el rendimiento de cultivos de interés agronómico es una estrategia ambientalmente amigable que apunta a promover prácticas de producción sustentable y disminuir la carga de agroquímicos agregados al suelo. La alfalfa (*Medicago sativa* L.), también conocida como "la reina de las forrajeras", se destaca por su valor nutricional, su persistencia y su excelente rendimiento. Una implantación exitosa del cultivo es fundamental para obtener los beneficios que brinda esta forrajera. La cepa *P. fluorescens* C119, aislada en el contexto de una prospección de bacterias nativas promotoras del crecimiento de la alfalfa, fue analizada desde diferentes enfoques para consolidar su perfil como biopesticida y biofertilizante de dicha forrajera.

Desde un enfoque agrobiotecnológico y medioambiental, se analizó la capacidad de la cepa C119 de colonizar plantas de alfalfa y promover su crecimiento en condiciones de campo. Para ello, la cepa C119 se introdujo junto a *Sinorhizobium meliloti* mediante la inoculación de semillas utilizando una tecnología ya instaurada entre productores agropecuarios. El efecto sobre la implantación y el rendimiento de la alfalfa se comparó con un control inoculado únicamente con el rizobio. También se analizó el impacto de la presencia de la *Pseudomonas* sobre la estructura de la comunidad bacteriana de la rizósfera de alfalfa a lo largo de todo el ensayo. Se pudo observar que la cepa C119 era capaz de colonizar eficientemente y mantenerse en altos recuentos en las raíces de alfalfa. Esto afectó transitoriamente la estructura de la comunidad bacteriana en las primeras etapas del desarrollo de la planta, luego de lo cual no se percibieron diferencias con el control. El rendimiento del cultivo se vio aumentado en un 40% cuando se inoculó con la cepa C119.

Desde un enfoque genómico se realizó la búsqueda de genes involucrados en posibles mecanismos de promoción del crecimiento vegetal. Para ello el genoma de la cepa C119 fue secuenciado y sus genes anotados. Se utilizaron diferentes herramientas bioinformáticas para identificar genes que codifican para vías de síntesis de metabolitos secundarios, enzimas hidrolíticas, fitohormonas, enzimas capaces de solubilizar fosfato, entre otros. El análisis concluyó que la cepa C119 posee los genes de síntesis de un lipopéptido cíclico no descripto en otras *Pseudomonas* spp. Además la cepa cuenta con los genes necesarios para la síntesis de ácido cianhídrico y genes que codifican para enzimas hidrolíticas con alta homología a enzimas de actividad antifúngica comprobada. El genoma contiene los genes para la síntesis de un sideróforo de tipo pseudobactina. Se identificaron genes que codifican para una 1-aminociclopropano-1-carboxilato desaminasa y para una glucosa dehidrogenasa. También genes que podrían estar involucrados en una vía de síntesis de ácido indolacético independiente de triptófano. El genoma presentó una batería de genes de resistencia a estreses bióticos y abióticos. Por otra parte, no se identificaron genes relacionados con la patogenicidad hacia plantas y animales, lo cual es una prueba de la inocuidad de la cepa en estudio.

Finalmente se realizaron ensayos *in vitro* para determinar los compuestos antifúngicos producidos por la cepa C119. Se observó que el lipopéptido cíclico era el principal metabolito antifúngico producido por C119. Dicho compuesto fue purificado y analizado para confirmar su estructura. Se realizó una mutagénesis al azar por inserción de un transposón con lo cual se obtuvieron mutantes incapaces de producir el lipopéptido cíclico. A diferencia de la cepa salvaje, las mutantes no eran capaces de antagonizar un aislamiento de *Pythium debaryanum* y carecían de movilidad tipo *swarming*. Las mutaciones se mapearon en el operón de síntesis del lipopéptido cílcico y en un gen involucrado en la producción del flagelo bacteriano, cuya relación con la producción de lipopéptidos cíclicos no ha sido reportada.

En conclusión, la cepa *P. fluorescens* C119 presenta un gran potencial para su aplicación como inoculante de alfalfa, dado que es capaz de colonizarla de forma eficiente, aumenta significativamente su rendimiento, no afecta a la microflora nativa, los metabolitos involucrados en el antagonismo hacia patógenos fúngicos fueron identificados y carece de factores de virulencia hacia plantas y animales.

capítulo 1

introducción general

La intensificación de la actividad agropecuaria debido a la creciente demanda del mercado internacional tiene un fuerte impacto a nivel social, económico y ambiental. Uruguay no escapa a esta realidad y desde el año 2002 viene experimentando dicha expansión e intensificación agrícola. Este aumento en la producción se ha visto favorecido por cambios tecnológicos como la adopción de siembra sin laboreo, el empleo de cultivos transgénicos, el cambio de una agricultura basada en cultivos de invierno a una basada en cultivos de verano, fundamentalmente soja, la disminución de pasturas dentro de la rotación, la implementación de sistemas de agricultura continua y el desarrollo de sistemas agrícolas en nuevas zonas de producción, tradicionalmente no agrícolas (García Préchac et al. 2010). Estos cambios en los sistemas de producción van acompañados de un mayor uso de fertilizantes y pesticidas de síntesis química (DIEA, Anuario 2013, MGAP). El agregado continuo de agroquímicos sobre los cultivos afecta la calidad de suelos, agua y medio ambiente en general, lo cual incide finalmente sobre la salud humana. Existe una preocupación real a nivel de la opinión pública y una demanda por parte de productores de alternativas que permitan mantener buenos niveles de rendimientos de los cultivos de manera más sustentable, evitando la erosión y empobrecimiento de los suelos y la contaminación de cursos de agua.

Existen diversas estrategias que permiten lograr una disminución en el impacto ambiental causado por la utilización de agroquímicos. La biotecnología vegetal ha contribuido al desarrollo de cultivares resistentes a diversos estreses bióticos y abióticos y de mejor valor nutricional (Moose & Mumm 2008). Por otra parte, ha habido un importante incremento en la aplicación de bacterias promotoras del crecimiento vegetal, principalmente en países desarrollados, donde la demanda del público por alimentos libres de agroquímicos es mayor (Berg 2009). Esta estrategia, basada en microorganismos benéficos para las plantas, se presenta como una alternativa para promover el crecimiento de los cultivos y protegerlos del ataque de fitopatógenos complementando o sustituyendo la aplicación de fertilizantes y pesticidas.

1. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal

En el suelo existe el mayor reservorio de biodiversidad conocido: las comunidades microbianas. En la rizósfera, que es la estrecha zona de suelo que rodea las raíces y está bajo la influencia de los exudados radiculares, pueden existir hasta 10^{11} células microbianas por gramo de suelo y más de 30.000 especies de procariotas (Mendes et al. 2011). En ese contexto, las plantas han evolucionado en estrecha relación con esas complejas comunidades de microorganismos de manera tal que el microbioma de las plantas, al igual que el de los animales, les permite adaptarse y sobrevivir en diversas condiciones ambientales. Tanto es así, que el genoma colectivo de las comunidades microbianas presentes en la rizósfera es referido como el "segundo genoma de las plantas"(Berendsen et al. 2012).

Existen muchas evidencias que indican que las plantas pueden moldear el microbioma de la rizósfera. Los microorganismos del suelo se encuentran con baja disponibilidad de nutrientes en comparación con la rizósfera donde las plantas depositan entre el 5 y el 21% de los fotosintatos (Lugtenberg & Kamilova 2009). Debido a esto, la densidad microbiana de la rizósfera es mucho mayor, determinando el fenómeno conocido como "efecto rizósfera". Generalmente las comunidades microbianas de la rizósfera son menos diversas que el suelo circundante y esto es debido a que las raíces generan un ambiente más propicio para el establecimiento de algunos microorganismos, mientras que otros no logran prosperar (Costa et al. 2006). Las plantas serían incluso capaces de reclutar microorganismos benéficos cuando están siendo atacadas por patógenos (Lee et al. 2012).

Las bacterias rizosféricas que ejercen efectos benéficos sobre la planta huésped se denominan "rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal" (*PGPR: plant growth promoting rhizobacteria*) (Kloepper, J W., Schroth 1978). Su efecto sobre las plantas puede ejercerse de forma directa mediante la síntesis de compuestos similares a fitohormonas o favoreciendo la disponibilidad de nutrientes o indirecta mediante el control biológico de patógenos del suelo y la protección frente a diversos tipos de estreses abióticos (figura 1.1). Es condición esencial para poder ejercer los efectos benéficos sobre la planta hospedero, que las PGPR sean competentes colonizadoras de raíz, o sea que puedan colonizar la

rizósfera y/o el rizoplano durante el tiempo necesario, lo cual logran mediante una fuerte competencia con otros microorganismos rizosféricos (Compant et al. 2010). La producción de diversos metabolitos

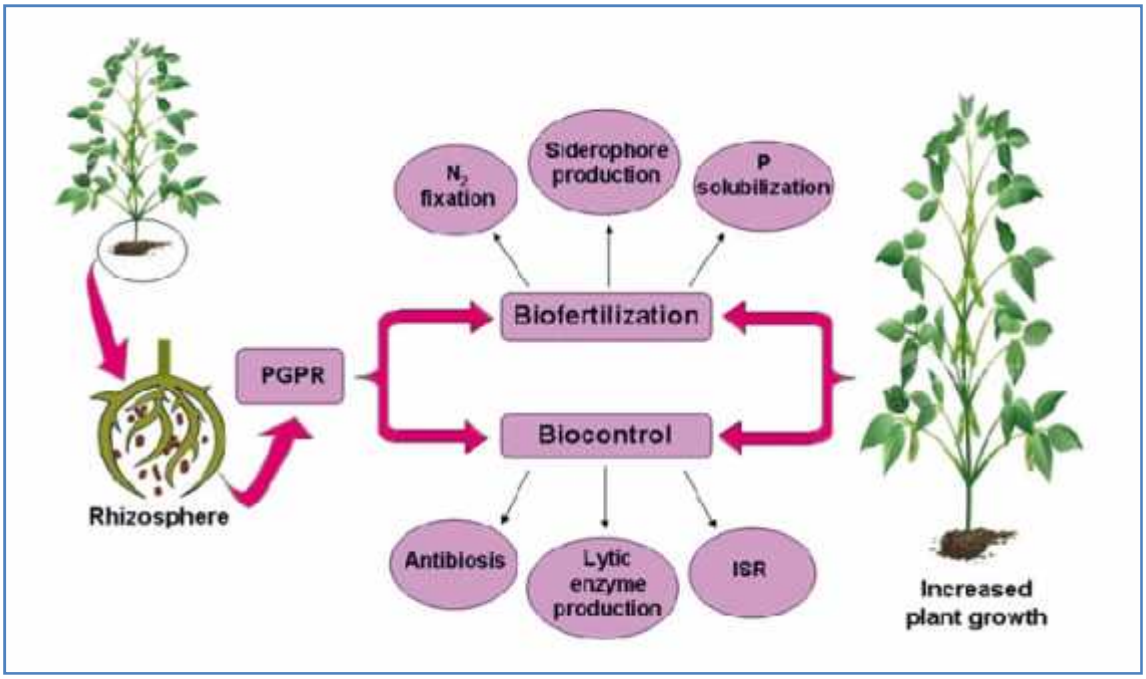


Figura 1.1- Mecanismos de promoción del crecimiento vegetal más importantes presentes en las PGPR Diagrama indicando los diferentes mecanismos clasificados según su aplicación en 1) biofertilización y 2) biocontrol de fitopatógenos. (tomado de Maheshwari, 2011)

secundarios con actividad antimicrobiana le confiere a la bacteria benéfica una ventaja selectiva frente a otros microorganismos favoreciendo una colonización radicular exitosa (Raaijmakers et al. 2008), además de mantener la salud de la planta hospedera. Varios metabolitos secundarios han sido ampliamente caracterizados y se ha comprobado su participación en la competencia por nichos en la raíz. Algunos ejemplos son los sideróforos, las enzimas líticas y los antibióticos tales como fenazinas, 2,4-diacetilfloroglucinol (DAPG), ácido cianhídrico (HCN), pioluteorina, pirrolnitrina, lipopeptidos cíclicos y ramnolipidos (Nielsen et al. 2002; Cazorla et al. 2006; Lugtenberg & Kamilova 2009; D'aes et al. 2010; Ghirardi et al. 2012).

Los microorganismos benéficos pueden ser aplicados en la promoción de plantas de interés agronómico a modo de biofertilizantes, fitoestimuladores, biopesticidas y/o como fitoremediadores dependiendo del tipo de mecanismo involucrado en la promoción (Glick et al. 2007; Berg 2009) (Figura 1.1). Los biofertilizantes generan un aumento de la biodisponibilidad de nutrientes esenciales para la planta tales

como nitrógeno, fósforo y hierro, mientras que los fitoestimuladores son capaces de sintetizar compuestos similares a fitohormonas y modular el desarrollo de la planta hospedera. Los biopesticidas presentan mecanismos de promoción indirectos, mediante el antagonismo de patógenos del suelo, lo cual favorece la salud de la planta. La promoción del crecimiento de plantas que acumulan metales pesados y otros contaminantes es realizada por microorganismos fitoremediadores, tolerantes a dichos contaminantes, y que facilitan su remoción del suelo (Glick 2010).

La aplicación de microorganismos benéficos tiene varias ventajas sobre los pesticidas y fertilizantes de síntesis química: 1) son más seguros, 2) el posible daño ambiental y el riesgo para la salud humana son mucho menores, 3) presentan actividad más específica contra el blanco, 4) son efectivos en pequeñas dosis, 5) pueden multiplicarse en el sitio de acción pero son controlados por la planta y por la microflora presente en la raíz, 6) se descomponen más rápidamente que los agroquímicos, 7) dada la diversidad de mecanismos, la aparición de resistencias se ve reducida y 8) pueden aplicarse en sistemas de manejo de enfermedades convencional e integrado (Berg 2009).

1.1 Control biológico de patógenos de plantas

El control biológico fue definido en 1987 por la Academia Nacional de Ciencias de Estados Unidos como el uso de organismos naturales o modificados, genes o sus productos, para reducir los efectos de organismos indeseables (pestes) y favorecer el desarrollo de organismos deseables tales como cultivos, árboles, animales, insectos y microorganismos benéficos.

Un ejemplo donde el antagonismo frente a patógenos vegetales se expresa notablemente son los suelos supresivos. Estos son suelos donde hongos fitopatógenos son incapaces de persistir, o estando presentes no alcanzan a inducir síntomas severos de enfermedad en el cultivo susceptible. Este inusual fenómeno ha sido bien caracterizado por métodos convencionales y métodos moleculares, llegándose a la conclusión de que la supresión es el resultado de la presencia de ciertas rizobacterias con actividad antifúngica (Mendes et al. 2011). Se ha demostrado que algunas cepas de *Pseudomonas* spp. productoras de antibióticos son frecuentemente aisladas de estos suelos (Mazzola et al. 2009). Algunos

ejemplos de ello son la supresión del *take-all* del trigo (Raaijmakers & Weller 1998), la podredumbre negra de raíz del tabaco (Keel et al. 1996) o el marchitamiento inducido por *Fusarium* spp. en tomate (Haas & Défago 2005).

Tabla 1.1. Agentes de control biológico (ACB) y patosistemas sobre los que actúan a través de diversos mecanismos.

ACB / Patógeno / Hospedero	Modo de acción	Mecanismo específico	Referencia
*Paenibacillus sp./Fusarium oxysporum/*Sorgo	Hiperparasitismo /predación	Desorganización de pared celular y contenido	(Budi et al. 2000)
*Lysobacter enzymogenes/ Fusarium graminearum/*trigo	Enzimas líticas	Quitinasas, β-1,3-Glucanasas	(Li et al. 2008)
*Serratia plumuthica/Botrytis cinerea/*varios hospederos	Enzimas líticas	Quitinasas	(Frankowski et al. 2001)
*Stenotrophomonas maltophilia/ Pythium ultimum/*Caña de azúcar	Enzimas líticas	Proteasas	(Dunne et al. 2000)
Bacillus amyloliquefaciens/ Fusarium oxysporum/maíz	Antibioticos	Bacillomicina, fengicina	(Koumoutsi et al. 2004)
Agrobacterium radiobacter/ Agrobacterium tumefaciens/varios hospederos	Antibioticos	Agrocina 84	(Vicedo et al. 1993)
Pseudomonas fluorescens/Pythium spp./Caña de azúcar	Antibioticos	2,4-diacetilfluoroglucinol	(Shanahan et al. 1992)
Pseudomonas fluorescens/Pythium ultimum/caña de azúcar	Antibioticos	Pioluteorina, pirrolnitrina	(Howell & Stipanovic 1980)
Pseudomonas fluorescens/ Rosellinia necatrix/palta	Antibioticos	2-hexil, 5-propil resorcinol	(Cazorla et al. 2006)
Pseudomonas chlororaphis/ Fusarium oxysporum/tomate	Antibioticos	Fenazinas	(Chin-A-Woeng et al. 2001)
Streptomyces violaceusniger/Pythium ultimum/caña de azúcar	Antibioticos	Polienos	(Trejo-Estrada et al. 1998)
Pseudomonas sp./Phytophthora infestans/tomate	Antibioticos	Lipopeptidos cíclicos	(Raaijmakers et al. 2006)
Enterobacter cloacae/Pythium spp./ caña de azúcar	Desechos metabólicos	Amoníaco	(Howell et al. 1988)
Pseudomonas fluorescens/ Phytophthora infestans/tomate	Desechos metabólicos	Ácido cianhídrico	(Voisard et al. 1989)
Pseudomonas fluorescens/ Fusarium oxysporum/trigo	Interferencia química y física	Desorden del diálogo molecular	(Duffy et al. 2003)
*Collimonas fungivorans/Fusarium oxysporum/*tomate	Competencia	Consumo de exudados y lixiviados	(Kamilova et al. 2007)
Pseudomonas pseudoalcaligenes/ Rosellinia necatrix/palta	Competencia	Ocupación de nicho	(Pliego et al. 2008)
*Pseudomonas putida/diferentes patógenos/*pepino	Competencia	Captura de sideróforos y hierro	(Loper & Henkels 1999)
Varias combinaciones	IRS	Detección de patrones moleculares asociados a patógenos	(Nürnberger & Lipka 2005)
*Pseudomonas putida/Phytophthora infestans/*papa	IRS	Inducción mediada por fitohormonas	(van Loon 2007)

adaptado de Pliego et al. 2010

El efecto biocontrolador puede ser directo o indirecto, aunque ambas acciones biocontroladoras pueden expresarse simultáneamente. El antagonismo directo requiere del contacto físico entre los microorganismos involucrados y utiliza mecanismos específicos de inhibición del patógeno tales como parasitismo y depredación, producción de antibióticos e interferencia de señales de comunicación. El antagonismo indirecto no involucra una agresión directa hacia el patógeno sino que se da mediante competencia por nutrientes y nicho, y mediante activación de la respuesta sistémica en la planta (Tabla 1.1). La mayoría de estos mecanismos de biocontrol han sido descriptos para *Pseudomonas* fluorescentes (Walsh et al. 2001; Lugtenberg et al. 2002). La presencia de varios de estos mecanismos en un mismo microorganismo hace factible el control de más de una enfermedad y dificulta la aparición de resistencia en el organismo blanco (Whipps 2001).

1.2 Mecanismos de biocontrol

1.2-1 Parasitismo y depredación

Diversas bacterias y hongos del suelo son capaces de sintetizar enzimas hidrolíticas extracelulares tales como quitinasas, ß-1-3 glucanasas, lipasas, celulasas y proteasas, las cuales hidrolizan una gran variedad de polímeros. La degradación enzimática de quitina, celulosa, glucanos y proteínas presentes en las paredes celulares de hongos y oomicetes, con la finalidad de obtener nutrientes, es un mecanismo de biocontrol dado que inhibe el crecimiento o elimina completamente al patógeno (Markovich & Kononova 2003). Dentro de las bacterias, los actinomicetes son quienes presentan más frecuentemente la capacidad de parasitar y degradar patógenos fúngicos (Crawford 1995; Fróes et al. 2012). La participación de las enzimas hidrolíticas en el biocontrol de patógenos en la rizósfera ha sido difícil de comprobar ya que generalmente las bacterias biocontroladoras son capaces de sintetizar diferentes antibióticos de forma simultánea. Las enzimas hidrolíticas y los antibióticos pueden actuar sinérgicamente como en el caso de la cepa *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B359. Dicha cepa es capaz de sintetizar varios antibióticos lipopeptídicos y cuatro tipos de enzimas hidrolíticas, los cuales

actuando en conjunto tienen un efecto sinérgico en la inhibición de diversos hongos patógenos (Fogliano et al. 2002).

1.2–2 Competencia por nicho y nutrientes

Una colonización radicular exitosa depende de la capacidad de competir por nutrientes en la raíz. La competencia entre microorganismos benéficos y patógenos por nichos en la raíz puede resultar en una disminución en la severidad de enfermedades de los cultivos (Kamilova et al. 2005). Un microorganismo altamente competitivo puede desplazar a los patógenos del sitio de infección, logrando así una menor incidencia de la enfermedad. Es importante que el microorganismo benéfico sea capaz de colonizar las mismas zonas de la raíz por donde el patógeno se introduce en la planta (Pliego et al. 2010). En un trabajo reportado por Pliego y colaboradores (2008), se seleccionaron dos cepas de *Pseudomonas pseudoalcaligenes* AVO110 y *P. alcaligenes* AVO73 por su excelente capacidad colonizadora de raíz de palta y por su antagonismo frente a *Rosellinia necatrix*. Sin embargo, sólo una de las cepas fue capaz de proteger a la planta del ataque del patógeno. Se observó que las cepas colonizaban diferentes sitios de la raíz y que la cepa biocontroladora se ubicaba en el mismo sitio que el patógeno utilizaba para introducirse en la planta.

La competencia por hierro, un nutriente esencial para todos los seres vivos, ha sido ampliamente documentada. En el suelo, la disponibilidad de hierro en su forma soluble, Fe^{3+}, generalmente es limitada. Para acceder al nutriente, muchos microorganismos producen compuestos quelantes de alta afinidad por el hierro denominados sideróforos. La competencia por hierro como mecanismo de control biológico fue inicialmente reportada por Kloepper y colaboradores (1980). Los sideróforos son estructuralmente diversos y se clasifican de acuerdo al grupo funcional en catecoles (enterobactina, vibriobactina, yersiniabactina y pioquelina), hidroxamatos (alcaligina y desferroxamina B) y carboxilatos (stafiloferrina A y acromobactina) (Miethke & Marahiel 2007). Las *Pseudomonas* fluorescentes secretan un tipo de sideróforo denominado pioverdina que es de tipo hidroxamato-catecolato (Botelho & Mendonça-Hagler 2006) y es el responsable de la fluorescencia de las cepas bajo luz UV. Las pioverdinas son los principales sideróforos utilizados por las *Pseudomonas* spp. debido su mayor afinidad por el ion

férrico (Youard et al. 2011). Un ejemplo de competencia por hierro como mecanismo de control biológico es el de *P. putida* WCS358 la cual es capaz de controlar enfermedades causadas por *Fusarium* en clavel y rábano (Botelho & Mendonça-Hagler 2006). Algunas *Pseudomonas* son capaces de internalizar el ion férrico utilizando sideróforos heterólogos, sintetizados por microorganismos que cohabitan la rizósfera, lo cual aumenta la carencia del nutriente en los microorganismos competidores (Loper & Henkels 1999; Saharan & Nehra 2011).

1.2-3 Metabolitos secundarios con acción antimicrobiana

Varios antibióticos producidos por microorganismos han demostrado ser muy efectivos en la supresión de patógenos de plantas. Algunos ejemplos que han sido bien caracterizados son los derivados fenazínicos (Phz), fluoroglucinol (Phl), pioluteorina (Plt), pirrolnitrina (Prn), ácido cianhídrico (HCN), y lipopeptidos cíclicos (LPC), zwitermicina A y kanosamina (Milner et al. 1996; Haas & Keel 2003; Emmert et al. 2004; Raaijmakers et al. 2006; Perneel et al. 2008). También se han descripto otros metabolitos involucrados en el biocontrol como por ejemplo 2-hexil-5-propil resorcinol (HPR) (Cazorla et al. 2006). En general la síntesis de metabolitos secundarios antimicrobianos es muy sensible a las condiciones ambientales de la rizosfera tales como contenido de minerales del suelo, tensión de oxígeno, condiciones osmóticas, contenido de carbono orgánico y la presencia de metabolitos provenientes de otras bacterias, hongos y plantas que pueden interferir con la síntesis de los mismos (Pliego et al. 2011).

1.2-4 Inducción de respuestas de defensa en las plantas

Algunos rizobacterias no patógenas interactúan con las plantas hospederas estimulando un estado de alerta que las protege frente a un posterior ataque de patógenos, fenómeno conocido como respuesta sistémica inducida (ISR de: *Induced Systemic Response*). Este estado de preparación para un posible ataque hace que las respuestas de defensa se activen aceleradamente y se extiendan a todos los órganos de la planta en presencia de un patógeno. Si bien se conocen varias moléculas sintetizadas por la bacteria inductora capaces de estimular la ISR, existe muy poca información disponible acerca de los

mecanismos moleculares que regulan el reconocimiento de dichos elicitores por parte de las células vegetales. Los determinantes bacterianos involucrados en la ISR son lipopolisacáridos (Leeman et al. 1995), sideróforos (Maurhofer et al. 1994), flagelos (Meziane et al. 2005), 2,4-diacetilfloroglucinol (Weller et al. 2012), piocianina (Audenaert et al. 2002), biosurfactantes (Ongena & Jacques 2008) y compuestos orgánicos volátiles (Ryu et al. 2004). Ante esta enorme variedad de elicitores y la enorme diversidad de microorganismos que habitan la rizósfera, cabría esperar que todas las plantas estuvieran en estado de defensa inducido. Sin embargo los estudios en campo han determinado que para obtener una ISR efectiva se requiere de una densidad poblacional de al menos 10^7 UFC/g de raíz de la bacteria inductora. Los estudios de dosis respuesta han determinado que un agente de control biológico debe estar presente en al menos 10^5 UFC/g raíz para *Pseudomonas* ya sean productoras de antibióticos o inductoras de ISR (Raaijmakers et al., 1995). Dado que es muy poco probable que exista una densidad poblacional de ese tamaño para un genotipo bacteriano específico, es muy difícil encontrar un fenómeno de ISR naturalmente, salvo en suelos supresivos (Bakker et al. 2013).

1.3 Mecanismos de promoción directa del crecimiento vegetal

1.3-1 Aporte de nutrientes hacia la planta hospedera

Muchas bacterias incluyendo a las *Pseudomonas* fluorescentes pueden promover el crecimiento de las plantas directamente mediante el aporte de nutrientes o de hormonas del crecimiento. Las bacterias que facilitan la adquisición de nutrientes por la planta se denominas biofertilizantes. Un ejemplo ampliamente estudiado es el aporte de nitrógeno por bacterias fijadoras de N_2 atmosférico, las cuales pueden vivir colonizando diversos tejidos de la planta o formando nódulos en la raíz. Estas bacterias sintetizan un complejo enzimático denominado nitrogenasa el cual cataliza, mediante un proceso energéticamente muy costoso, la reducción del N_2 a amonio. Ambas partes, planta y microorganismo, se benefician ya que a su vez la planta aporta al simbionte compuestos carbonados (Pliego et al. 2011). La interacción rizobio–planta es, en la mayoría de los casos, altamente selectiva. *Azospirillum* es un ejemplo de fijadora libre y se ha aplicado como fertilizante de trigo, sorgo y maíz (Berg 2009). Hasta

hace unos años se pensaba que el género *Pseudomonas* no estaba involucrado en la fijación de nitrógeno atmosférico. Sin embargo, luego de la secuenciación del genoma entero de la cepa *Pseudomonas stutzeri* A1501, se pudo comprobar que poseía los genes necesarios para fijar N_2, organizados dentro de una isla genómica y por ende posiblemente obtenidos por transferencia horizontal (Yan et al. 2008). Dicha región del genoma de *P. stutzeri* A1501 fue utilizada para transformar la cepa de *P. protegens* Pf-5, la cual es una excelente biocontroladora de enfermedades de plantas. La cepa transformada fue capaz de promover el crecimiento de *Arabidopsis thaliana*, y plantas de interés agronómico como alfalfa, festuca y maíz en condiciones de deficiencia de nitrógeno, abriendo una nueva perspectiva para la producción de inoculantes modificados genéticamente (Setten et al. 2013).

Otro ejemplo de biofertilizantes son las bacterias solubilizadoras de fosfato, las cuales están tomando gran relevancia debido a la gran demanda de este nutriente. El fósforo es el segundo elemento limitante del crecimiento vegetal, después del nitrógeno (Gyaneshwar et al. 2002). La mayoría de los suelos agrícolas poseen grandes reservas de fosforo debido a la repetida aplicación de fertilizantes químicos. Sin embargo, los iones fosfatos reaccionan con numerosos componentes del suelo siendo rápidamente inmovilizados en formas orgánicas mediante reacciones metabólicas o en partículas del suelo por adsorción y precipitación. Estas formas de fosfato son inaccesibles para las plantas y sólo una pequeña fracción del fosfato agregado al suelo se encuentra disponible para su absorción por las raíces (Gyaneshwar et al. 2002). Entre el 30 y 70 % del fósforo presente en el suelo puede encontrarse en forma orgánica (Shang et al. 1996). Los microorganismos del suelo juegan una importante función en el ciclo del fósforo ya que son capaces de convertirlo en formas asimilables para las plantas (Richardson & Simpson 2011). La movilización de fosfatos por los microorganismos del suelo involucra dos procesos: la solubilización del fósforo a partir de fuentes inorgánicas y la mineralización de fósforo orgánico. Varias enzimas tales como fosfatasas no específicas, fitasas, fosfonatasas y C-P liasas pueden liberar el fósforo contenido en la fracción orgánica, mientras que el fósforo inorgánico es liberado principalmente por ácidos orgánicos como el ácido glucónico (Berg 2009; de Werra et al. 2009). Las bacterias solubilizadoras de fosfato (PSB: *phosphate solubilizing bacteria*) pueden aumentar el contenido de fósforo en los tejidos vegetales (Awasthi et al. 2011). Entre las más conocidas PSB, se encuentran especies pertenecientes a

los géneros *Pseudomonas, Bacillus, Paenibacillus, Escherichia, Acinetobacter, Enterobacter y Burkholderia* (Collavino et al. 2010).

1.3-2 Síntesis de fitohormonas

Las hormonas vegetales gobiernan el crecimiento de las plantas mediante el control espacial y temporal de la división, crecimiento y diferenciación celular. Las fitohormonas juegan un papel esencial en las respuestas a estreses bióticos y abióticos (Peleg & Blumwald 2011). Los microorganismos productores de compuestos similares a fitohormonas pueden aportarlos al *pool* de hormonas de la planta hospedera, interviniendo en la fisiología de la planta y favoreciendo su supervivencia (Dodd et al. 2010). Las fitohormonas actúan a bajas concentraciones y pueden ser de tres tipos: auxinas, citoquininas y giberelinas. Dentro de las auxinas, el ácido indolacético (AIA) es el más encontrado entre las rizobacterias. Existen varias vías de síntesis de AIA, las cuales en su mayoría utilizan triptófano (Trp) como precursor. Las plantas cuyos exudados radiculares son ricos en triptófano son más propensas a la promoción del crecimiento por bacterias productoras de AIA que las que no excretan el aminoácido precursor. Por ejemplo, en plantas de rábano, que excretan grandes cantidades de Trp, se pudo observar el efecto promotor de la cepa productora de AIA *P. fluorescens* WCS365, mientras que no se observó en plantas que excretan 10 veces menos Trp como tomate, pepino y pimiento (Kamilova et al. 2006). La presencia de AIA en la rizósfera estimula la formación de raíces laterales y pelos radiculares, lo cual aumenta enormemente la superficie de absorción de las raíces.

Las citoquininas intervienen en la división celular y actúan a nivel de raíces, hojas, flores, frutos y semillas. El ápice de las raíces y las semillas en germinación son sitios de alta concentración de esta hormona (Pliego et al. 2011). Dentro de las bacterias productoras de citoquininas se encuentran los géneros *Agrobacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Paenobacillus*, *Azotobacter, Azospirillum, Bacillus,* y *Rhizobium,* los cuales son capaces de promover el crecimiento de las plantas (García de Salamone et al. 2001).

Las giberelinas intervienen en diversos procesos fisiológicos de las plantas superiores, favoreciendo en especial la elongación de las raíces (Pliego et al. 2011). Estas hormonas, de las cuales se conocen más de 130 tipos, son diterpenoides y pueden ser sintetizadas también por hongos y bacterias (Dodd et al. 2010). El primer reporte de una vía biosintetica bacteriana para giberelinas fue en una cepa de *B. japonicum* (Morrone et al. 2009).

Algunas bacterias son capaces de disminuir la formación de etileno por las plantas mediante la producción de la enzima la 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminasa. Esta enzima hidroliza el ACC, un intermediario en la síntesis de etileno, con la formación de α-cetobutirato y amonio y está presente en una gran diversidad de organismos tales como levaduras, hongos y bacterias. Las PGPR son capaces de disminuir los niveles de etileno producidos por la planta frente a un estrés ambiental (Penrose et al. 2001). En estas situaciones las plantas producen dos picos de etileno: un pequeño aumento inicial a pocas horas de sufrido el estrés, que posiblemente active genes de defensa y un segundo incremento más intenso unos pocos días más tarde, que genera efectos negativos sobre la planta tales como senescencia, clorosis y abscisión (Glick et al. 2007). Se ha propuesto un modelo que explica el efecto promotor de las bacterias productoras de ACC desaminasa (Glick et al. 2007). Las bacterias productoras de AIA estimulan en las plantas la síntesis de ACC sintasa, la cual convierte S-adenosil metionina (SAM) en ACC. El ACC es en parte exudado por las raíces donde es hidrolizado por las bacterias productoras de ACC desaminasas. Para mantener el equilibrio entre la concentración de ACC dentro y fuera de las raíces, la planta secreta más ACC, disminuyendo el ACC disponible para producir etileno, y de esta forma disminuyendo el efecto inhibidor del etileno producido frente a un estrés. También disminuye la represión del etileno sobre la síntesis de AIA, lo cual resulta en un aumento de esta hormona y por ende en un efecto promotor. Los genes para la síntesis de ACC desaminasa han sido caracterizados en varias cepas de *Pseudomonas* spp. (Klee et al. 1991; Cheng et al. 2007).

1.4 *Pseudomonas* fluorescentes

Varios géneros bacterianos han sido ampliamente estudiados debido a que suelen presentar características promotoras del crecimiento vegetal. Bacterias del género *Azospirillum* y *Rhizobium* son clásicos ejemplos de promotores directos del crecimiento vegetal, mientras que bacterias de los géneros *Bacillus, Pseudomonas, Serratia, Stenotrophomonas* y *Streptomyces* y hongos del género *Ampelomyces, Coniothyrium* y *Trichoderma* están asociados al control biológico de patógenos (Berg 2009).

Dentro de estos género, las *Pseudomonas* spp. se caracterizan por ser excelentes colonizadoras de raíz y se han reportado frecuentemente como excelentes agentes de control biológico. Las *Pseudomonas* fluorescentes presentan una amplia batería de mecanismos de promoción directa e indirecta del crecimiento vegetal. Este grupo constituye una colección heterogénea de cepas no entéricas, Gram negativas, quimioheterótrofas, generalmente aerobias, no fermentativas y móviles, las cuales presentan un flagelo polar (Dwivedi & Johri 2003). Comprende las especies *P. aeruginosa*, *P. aureofaciens*, *P. chlororaphis*, *P. fluorescens*, *P. putida* y las especies fitopatógenas *P. cichorii* y *P. syringae*. Se diferencian del resto de las *Pseudomonas* por su característico pigmento soluble de color amarillo-verdoso, el cual fluoresce cuando es observado bajo luz ultravioleta (Meyer & Abdallah 1978) y que corresponde a los sideróforos de tipo pioverdina.

Las *Pseudomonas* fluorescentes presentan características que las hacen muy adecuadas para su aplicación como inoculantes, por ejemplo pueden utilizar una amplia variedad de fuentes de carbono, genéticamente son fáciles de manipular, abundan en suelos y raíces debido a que son buenas colonizadoras, presentan una alta tasa de crecimiento, y pueden ser introducidas en la rizósfera por bacterización de semillas (Whipps 2001).

Las *Pseudomonas* fluorescentes se han aplicado exitosamente para el control de patógenos vegetales en diversos patosistemas. Los principales mecanismos de biocontrol se basan en la síntesis de metabolitos secundarios y en la inducción de resistencia sistémica de la planta (Tabla 1.1).

antecedentes

Pseudomonas fluorescens C119

El laboratorio de Ecología Microbiana del IIBCE desarrolla una extensa línea de investigación dedicada a la caracterización de *Pseudomonas* fluorescentes nativas que favorecen el crecimiento de cultivos forrajeros. En este marco se han aislado y caracterizado cepas capaces de promover el crecimiento de lotus (*Lotus corniculatus*) y alfalfa (*Medicago Sativa* L.) (Bagnasco et al. 1998; De La Fuente et al. 2002; De La Fuente et al. 2004; Quagliotto et al. 2009; Höfte & Altier 2010). La cepa *P. fluorescens* C119 fue aislada de la rizósfera de alfalfa en una prospección de microorganismos promotores del crecimiento de esta forrajera (Yanes et al. 2012). Mediante ensayos *in vitro* se analizó la capacidad de antagonizar distintos hongos fitopatógenos y la presencia de diversos mecanismos de promoción directos e indirectos. Se pudo comprobar que la cepa C119 era capaz de inhibir el crecimiento de *Pythium debaryanum*, *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani.* Se detectó la producción de ácido cianhídrico (HCN), enzimas proteolíticas y un compuesto con actividad surfactante como posibles mecanismos de protección contra patógenos (Yanes 2007). En cuanto a los mecanismos directos de promoción del crecimiento vegetal, la cepa mostró capacidad para solubilizar fosfato tricálcico.

Ensayos *in vivo* bajo condiciones controladas, donde se inocularon plantas de alfalfa con la cepa C119, mostraron que ésta era capaz de controlar el *damping-off* causado por un aislamiento fuertemente patogénico de *P. debaryanum* agregado al suelo. La presencia de la cepa disminuyó un 43% la incidencia de la enfermedad (Yanes et al. 2004). Por otra parte, se analizó el efecto de la coinoculación de C119 con el rizobio comercial utilizado para alfalfa y se determinó que la presencia de la cepa no afectó los parámetros estudiados relacionados a la simbiosis (Arias et al. 2009). La capacidad promotora de la alfalfa mostró resultados significativos cuando fue probada en distintos tipos de suelos, tanto en condiciones controladas y como en ensayos de campo (Yanes & Arias 2009; Arias et al. 2009). No sólo fue capaz de antagonizar patógenos del suelo sino que además generó un importante incremento de la biomasa vegetal. Paralelamente se realizó el escalado y formulación de un inoculante en base a esta cepa utilizando turba estéril como soporte. Se elaboró un medio de cultivo utilizando insumos de bajo costo, con productos de descarte industrial, y se determinó la relación óptima carbono:nitrógeno,

temperatura y pH óptimas para el crecimiento de la cepa. Esto representó una primera aproximación hacia la producción de un inoculante adaptado a las condiciones de nuestro país, de aplicación en la etapa de implantación de la alfalfa y que tiene en cuenta las prácticas agrícolas ya adoptadas por los productores nacionales (Arias et al. 2009).

objetivos

objetivo general

Caracterizar la cepa nativa *P. fluorescens* C119 promotora del crecimiento vegetal.

objetivos específicos

- Evaluar el efecto promotor del crecimiento vegetal en alfalfa y el impacto en la diversidad de la comunidad microbiana asociada a la raíz debido a la inoculación con la cepa *P. fluorescens* C119.
- Identificar genes asociados a las características promotoras del crecimiento vegetal, en el genoma de la cepa *P. fluorescens* C119.
- Identificar y determinar la estructura del principal metabolito antifúngico producido por *P. fluorescens* C119.

capítulo 2

2.1 introducción

2.1-1 Alfalfa: requerimientos nutricionales y problemas de implantación

Las leguminosas forrajeras aportan grandes beneficios a los sistemas de producción agropecuarios ya que por un lado son una fuente de alimento de alta calidad para el ganado, pero además suministran nitrógeno a los suelos mediante la asociación simbiótica con rizobios. El nitrógeno depositado en el suelo, en raíces y rastrojos, puede ser aprovechado por otras especies vegetales en las pasturas mixtas o por cultivos agrícolas en rotación. Dentro de las leguminosas forrajeras, la alfalfa presenta cualidades que se destacan frente a otras leguminosas. Posee un alto contenido nutricional y mantiene elevados valores de calidad durante todo su ciclo. Es un cultivo de crecimiento estival, muy persistente y tolerante a la sequía, lo que le permite alcanzar excelentes rendimientos productivos (Rebuffo et al. 2000)

La alfalfa presenta importantes requerimientos edáficos y nutricionales para una exitosa implantación. La calidad del suelo es muy importante ya que requiere pH neutro, texturas medias a livianas, buen drenaje y profundidad, con alta disponibilidad de fósforo, donde puede expresar todo su potencial productivo (Berg et al. 2007). En cuanto a los nutrientes necesarios, por un lado, el nitrógeno (N) puede ser obtenido a través de la relación simbiótica con *Sinorhizobium meliloti,* el cual realiza el proceso de fijación biológica del nitrógeno (FBN) atmosférico (Huić Babić et al. 2008). En los suelos de nuestro país existen naturalmente algunas poblaciones nativas que nodulan alfalfa, sin embargo es recomendable la inoculación con cepas específicas de mayor eficiencia fijadora para asegurar la nodulación. Por otra parte, el fósforo (P) es un macronutriente con alto impacto en la productividad, calidad y persistencia de la alfalfa (Berg et al. 2007). Estudios de respuesta al agregado de fertilizante fosfatado (superfosfato) realizados en INIA La Estanzuela cuantificaron importantes incrementos de producción cuando se partió de niveles bajos de disponibilidad de fósforo en el suelo (Rebuffo et al. 2000). Existe una relación directa entre la concentración de fósforo en la planta de alfalfa y el contenido de nitrógeno, ya que los mayores niveles de N en planta lo obtienen las alfalfas que presentan las mayores concentraciones de P. Esto

puede explicarse en parte por el hecho de que una baja disponibilidad de P afecta el proceso de FBN y afecta el número y tamaño de los nódulos (Schulze & Drevon 2005). Otros nutrientes importantes para la alfalfa son el potasio, el magnesio y el azufre (tabla 2.1) y en suelos deficientes deberían ser enmendados.

Tabla 2.1- Rango óptimo de macronutrientes y micronutrientes en plantas de alfalfa en estado vegetativo. Corresponde a los primeros 15 cm de la parte aérea.

Macronutriente	Rango óptimo (%)	Micronutriente	Rango óptimo (mg/Kg)
N	4.5-5.0	**Mn**	31-100
S	0.26-0.50	**Zn**	21-70
P	0.26-0.70	**Cu**	jul-30
Mg	0.30-1.0	**B**	30-80
Ca	1.8-3.0	**Mo**	1.0-5.0
K	2.0-3.5	**Fe**	30-250

Fuente: M. Rebuffo 2000

Debido al precio de la semilla, las densidades de siembra utilizadas y los requerimientos de herbicidas y fertilizantes, la instalación del cultivo de alfalfa requiere una inversión alta. Es por ello que un correcto manejo durante la etapa del establecimiento del cultivo es crítico para amortizar el costo de implantación y lograr capitalizar las ventajas que ofrece esta leguminosa (Formoso, 2000).

Durante la implantación de la alfalfa, cuando la plántula es más susceptible, existe el riesgo de la aparición de enfermedades. Estas causan fallas en la emergencia y muerte de la plántula emergida y están asociadas a infecciones causadas por oomicetos del género *Pythium*, responsables del "*damping-off*" (Martin & Loper 2010). En la etapa de pre-emergencia la infección produce la pudrición de la semilla, impidiendo su germinación. La infección de post-emergencia se caracteriza por la necrosis de la radícula e hipocótilo y la pérdida de turgencia, lo cual provoca el colapso de la planta (Larkin et al. 1995). Estas enfermedades ocurren cuando las condiciones ambientales son desfavorables para una rápida

emergencia y establecimiento de las plantas, como por ejemplo exceso de lluvias, humedad y bajas temperaturas del suelo (Ghorbani et al. 2008)

Las enfermedades pueden ser controladas mediante el tratamiento directo de la semilla con agroquímicos como el metalaxil (formulación comercial Apron, Novartis), el cual es un fungicida de acción sistémica que no presenta efectos adversos sobre el rizobio (Muthomi et al. 2007). Sin embargo, se han reportado aislamientos de *Pythium* resistentes a dicho fungicida (Brantner et al. 1998; Taylor et al. 2002) por lo cual su eficacia se puede ver comprometida. A esto hay que sumarle los efectos nocivos sobre el medio ambiente y la salud animal. En general, el uso de curasemillas no es una práctica comúnmente utilizada en el cultivo de alfalfa (González 2013).

Las posibles alternativas para el manejo de enfermedades son el uso de cultivares genéticamente resistentes y el control biológico de los patógenos. La obtención de germoplasma resistente a enfermedades se ha logrado para diversos patógenos de la alfalfa pero no para *Pythium* spp. (Lamb et al. 2006; Li & Brummer 2012). El control biológico resulta, entonces, una alternativa viable y menos agresiva para el medio ambiente que el uso de agroquímicos. Algunos ejemplos de bacterias rizosféricas antagónicas que mostraron una mejora en la implantación de la alfalfa luego de su inoculación son *Bacillus* spp. (Jo Handelsman et al. 1990), *Streptomyces* spp. (Xiao et al. 2002) y *Pseudomonas* spp. (Villacieros et al. 2003; Guiñazú et al. 2009).

2.1–2 Introducción de un inoculante bacteriano en el suelo

Los microorganismos del suelo, a pesar de ocupar un pequeño volumen, poseen funciones vitales en varios ciclos geoquímicos como el ciclado de nitrógeno, azufre y fósforo y la descomposición de residuos orgánicos (Torsvik & Øvreås 2002). Estas funciones bacterianas se encuentran distribuidas entre diferentes grupos tróficos y se llevan a cabo mediante la descomposición de exudados y restos vegetales, la síntesis de nuevos compuestos, la liberación de nutrientes a partir de formas inorgánicas insolubles y la transformación del N_2 atmosférico a N disponible para los seres vivos. Los microorganismos contribuyen a la formación y el mantenimiento de la estructura edáfica del suelo

mejorando la agregación, aireación e infiltración de agua en el suelo (Kirk et al. 2004). Por otra parte también pueden tener acción antagónica contra insectos, patógenos de plantas y malezas (Kennedy 1999).

El funcionamiento de los ecosistemas es gobernado ampliamente por la dinámica de las bacterias del suelo, siendo la diversidad de microorganismos fundamental para sostenerlo (Mori et al. 2013). Las perturbaciones humanas asociadas con la agricultura generan impactos sobre la diversidad, estructura y productividad de los ecosistemas (Vitousek et al. 1997). A medida que aumenta la conciencia sobre la importancia de los organismos del suelo en la regulación de los procesos ecosistémicos, aumentan los estudios de cómo los microorganismos responden a perturbaciones, especialmente a aquellas relacionados a la agricultura (van der Heijden et al. 2008). La estabilidad de los ecosistemas después de una perturbación depende de la resistencia (la capacidad del sistema para resistir la perturbación) y la resiliencia (la capacidad del sistema para recuperarse después de la perturbación) (Shade et al. 2012). Cuanto mayor es la diversidad de microorganismos, menor es la distorsión en el funcionamiento del ecosistema, ya que aumenta el número de especies que pueden responder de manera diferente a la perturbación (Trabelsi & Mhamdi 2013).

La introducción de un inoculante bacteriano para el control biológico de patógenos vegetales, biofertilización o biorremediación, implica la liberación al ambiente de altas densidades de bacterias eficientes y buenas colonizadoras. Esto genera perturbaciones, aunque posiblemente transitorias, a nivel de las comunidades microbianas del suelo y/o la rizósfera (Trabelsi & Mhamdi 2013). El análisis de la persistencia, diseminación y actividad del microorganismo introducido es fundamental para evaluar su eficacia y el impacto que tendrá en las comunidades microbianas residentes (Jäderlund et al. 2008; Troxler et al. 2012). Usualmente, la población de un microorganismo introducido en un ecosistema disminuye gradualmente debido a estreses abióticos e interacciones con la microflora residente (Ryder 1994; Fischer et al. 2010). Sin embargo el suelo es muy heterogéneo y está compuesto por micro hábitats contrastantes que pueden influir en la sobrevivencia del inoculante. Por su parte, el microorganismo exógeno puede entablar complejas interacciones con los microorganismos residentes, existiendo la posibilidad de que produzca metabolitos secundarios antimicrobianos que los inhiba o

elimine. Algunos estudios demostraron que a mayor diversidad bacteriana en el suelo, menor es la supervivencia de una cepa de *Escherichia coli* patógena, debido a que su habilidad para competir se veía disminuida (van Elsas et al. 2012). En un ambiente más diverso aumentan las posibilidades de encontrar microorganismos competitivos, con bajos requerimientos y capaces de consumir rápidamente los recursos existentes de manera que los microorganismos menos competitivos difícilmente prosperen.

Existen reportes de los efectos que tiene la introducción de un inoculante rizosférico en la estructura de la comunidad microbiana nativa asociada a una planta (tabla 2.2), pero más estudios son necesarios. Hoy en día existe la tecnología necesaria para medir y evaluar modificaciones de las comunidades microbianas a nivel filogenético y funcional gracias al desarrollo de métodos moleculares que permiten analizar toda la comunidad microbiana y no sólo las bacterias cultivables. De esta forma es posible conocer posibles riesgos sobre los microorganismos rizosféricos cuando se proyecta aplicar una bacteria promotora del crecimiento vegetal a grandes superficies de suelo.

Tabla 2.2- Impacto de la introducción de un inoculante microbiano en la estructura de la comunidad microbiana asociada a la planta hospedera. Recopilación de artículos.

Tipo de inóculo	Especie	Técnica	Principales resultados	Referencia
Rizobio	*S. meliloti* L33	SSCP	La diversidad bacteriana en la rizósfera de Medicago sativa fue afectada. La cantidad de miembros de las γ-proteobacterias disminuyó y el de α-proteobacterias aumentó	(Schwieger & Tebbe 2000)
	Mezcla de *Ensifer*	DGGE	Se observó un aumento en la diversidad debido a cambio de estación y no debido a la inoculación . DGGE brindó poca información sobre la comunidad bacteriana.	(Herrmann et al. 2012)
	S. meliloti M401/M403	TGGE	La persistencia de ciertas γ-proteobacteria se vió afectada en la rizósfera de alfalfa. TGGE resultó bueno para identificar cambios dependientes de M403.	(Dillewijn et al. 2002)
	R. gallicum 8a3 *E. meliloti* 4H41	T-RFLP	Cambios significativos en la estructura y diversidad bacteriana en el suelo del poroto común. Aumento de α- y γ-proteobacteria, Firmicutes y Actinobacteria. La inoculación dual fue menos efectiva que la individual.	(Trabelsi et al. 2012; Trabelsi et al. 2011)
	S. meliloti S26/OS6	qPCR	Se vieron afectadas las bacterias involucradas en la ciclación del nitrógeno de acuerdo a la abundancia de genes *nifH* en fase de floración tardía. Se observó un aumento de copias del gen *amoA* durante la floración.	(Huić Babić et al. 2008)
Azospirillum	*A. brasilense* Cd/Sp245	DGGE, RISA	No se observaron efectos importantes sobre las comunidades bacterianas del maíz en dos suelos y sistemas productivos diferentes	(Lerner et al. 2006)
	A. lipoferum CRT1	RISA	La inoculación de maíz aumentó la variabilidad entre muestras de las comunidades bacterianas para plantas individuales. No se modificó el número total de bacterias rizosféricas	(Baudoin et al. 2009)
	A. brasilense 40M/42M	CLPPs	Se observaron cambios en los perfiles fisiológicos de las comunidades microbianas asociadas con las raíces del arroz.	(García de Salamone et al. 2010)
AMF	*G. intraradices*	DGGE	La inoculación afectó la comunidad bacteriana rizosférica de la arveja. Cuatro de cinco bandas específicas fueron suprimidas. Previo a la floración, los AMF disminuyeron la tasa respiratoria de la rizósfera y el nº de protozoarios, pero no afectaron el nº de bacterias. Durante la floración los AFM estimularon la tasa respiratoria y disminuyeron el efecto sobre protozoarios.	(Wamberg et al. 2003)
	G. mosseae *G. intraradices*	DGGE	La inoculación modificó significativamente la composición bacteriana de la rizósfera de tomate. Las dos AFM mostraron comunidades bacterianas similares, pero se vieron	(Lioussanne et al. 2010)

			efectos específicos dependientes de especies.	
Biocontrol agents	*P. fluorescens* 2P24	T-RFLP DGGE	La inoculación generó un efecto transitorio en la comunidad fúngica de rizósfera de pepino. Tanto por DGGE como por T-RFLP los resultados fueron similares.	(Gao et al. 2012)
	P. chlororaphis IDV1 *P. putida* RA2	FAME	La inoculación indujo cambios en los perfiles de FAME de la fracción cultivable, y en la comunidad microbiana total del maíz. La comunidad rizosférica pasó de ser predominantemente Gram (+) a ser mayormente Gram (-).	(Kozdrój et al. 2004)
Coinoculation de microorganismos	*Pseudomonas* spp. AMF	DGGE	La inoculación generó un cambio significativo en la comunidad bacteriana. El consorcio PGPM generó un impacto mayor que los AMF. Un efecto sinérgico de la coinoculación fue observado.	(Roesti et al. 2006)
	B. subtilis 101 *A. brasilense* Sp245	DGGE	La inoculación del agente biocontrolador no mostró efecto signficativos en las comunidades fíngicas y bacterianas de la rizósfera de tomate. La combinación de ambas rizobacterias no mostró efectos sinérgicos en la biomasa de las plantas respecto a la aplicación por separado.	(Felici et al. 2008)
	A. brasilense *P. fluorescens*	T-RFLP CLPPs	La inoculación no mostró efectos significativos en las comunidades cultivables ni en los perfiles nifH T-RFLP de las bacterias diazotrópicas asociadas a la raíz del arroz. Si se observe un efecto sinérgico en la coinoculación.	(García de Salamone et al. 2012)

Extraído de (Trabelsi & Mhamdi 2013)

2.1-3 Métodos de estudio de la diversidad microbiana.

El método tradicional para determinar la diversidad microbiana ha sido identificar los organismos cultivables de un sistema a nivel de especies y usar diferencias taxonómicas para medir la diversidad. Más recientemente, se han utilizado atributos de funcionamiento o procesos microbianos (ej. utilización de sustratos) o el análisis de componentes estructurales (ej. análisis de ácidos grasos) para distinguir especies y diversidad. Aunque estas medidas pueden usarse para monitorear cambios en la estructura global de la comunidad, no proveen información taxonómica detallada. Hoy en día es posible recuperar ácidos nucleicos totales presentes en el suelo para analizar la información genética y determinar el número y la diversidad de microorganismos presentes en una muestra o incluso describir nuevas especies (Kirk et al. 2004). De esta forma los métodos para medir la diversidad microbiana en el suelo pueden clasificarse en dos grupos: bioquímicos y moleculares.

Dentro de las técnicas bioquímicas se incluye el recuento en placas, el perfil fisiológico de la comunidad por utilización de sustratos y el análisis de metilésteres de los ácidos grasos (FAME: *fatty acid methyl ester*). Este último tiene la ventaja de que puede prescindir del cultivo de los microorganismos. Las limitaciones de las metodologías que requieren el cultivo de los microorganismos son la selección de los medios y las condiciones de crecimiento apropiados (temperatura, pH, luz), la incapacidad para cultivar un gran número de bacterias, posibles efectos inhibitorios del crecimiento entre colonias y el potencial esparcimiento de las mismas (Kirk et al. 2004). La incapacidad de imitar los parámetros ambientales en el cultivo *in vitro* introduce sesgos que alteran la estructura de la comunidad al imponer condiciones de crecimiento selectivas (Hunter-Cevera 1998).

Por su parte, las técnicas basadas en ADN pueden proporcionar una medida amplia de la diversidad y de la composición de las comunidades bacterianas del suelo, dado que contemplan tanto a los miembros cultivables de la comunidad como a los no cultivables, los cuales son los predominantes (Kuske et al. 2002). Dentro de la amplia variedad de métodos moleculares se encuentran la hibridación con sondas fluorescentes (FISH: *fluorescent in situ hybridization*), contenido de guanina y citosina, polimorfismo en el largo del fragmento de restricción terminal (T-RFLP: *terminal restriction fragment length polymorphism*), polimorfismo conformacional de la monohebra (SSCP: *Single-strand conformational*

polymorphism), la electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante o de temperatura (DGGE y TGGE: *Denaturing gradient gel electrophoresis* y *Temperature gradient gel electrophoresis*), amplificación y secuenciación de los genes que codifican para las subunidades 16S y 18S del ARN ribosomal y la secuenciación masiva del ADN del suelo.

Muchas de estas metodologías se basan en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR: *Polymerase Chain Reaction*) para poder amplificar pequeñas cantidades de ADN y detectar microorganismos presentes en bajo número en el ambiente (Hunter-Cevera, 1998). La mayoría de los métodos para investigar la diversidad microbiana están basados en el análisis de la secuencia del gen que codifica para el componente de la subunidad pequeña del ribosoma 16S o 18S ARNr, para procariotas o eucariotas respectivamente, ya que permite a la vez la identificación de los microorganismos y la predicción de relaciones filogenéticas entre ellos. Generalmente, se aísla el ADN de muestras ambientales y se amplifica por PCR el ADN blanco (por ej. parte del gen del 16S ARNr) utilizando cebadores universales o específicos. Posteriormente, los productos resultantes se separan de varias formas, obteniéndose una "huella digital" (*fingerprinting*) de la comunidad (Rondon et al. 1999; Dahllöf 2002; Kirk et al. 2004).

Dos métodos de *fingerprinting* de comunidades frecuentemente usados son la DGGE y el T-RFLP. El primero permite separar moléculas con distinta secuencia de bases gracias a diferencias en sus propiedades de desnaturalización, que resultan en variaciones en la distancia de migración en un gradiente químico (McCaig et al. 2001). Teóricamente, es posible separar por DGGE moléculas de ADN con tan sólo un par de bases de diferencia. Las bandas específicas de DGGE pueden ser escindidas del gel, re-amplificadas y secuenciadas, para aportar más información sobre microorganismos específicos y grupos taxonómicos de la comunidad (Kirk et al. 2004). Este método permite comparaciones rápidas, reproducibles y en cierto modo baratas, ya que varias muestras pueden ser analizadas simultáneamente. Además permite la cuantificación, comparando la presencia e intensidad relativa de bandas individuales en los geles para calcular índices de diversidad y realizar análisis de agrupamiento de los patrones de bandas (McCaig et al. 2001; Kirk et al. 2004). Típicamente, los estudios de diversidad microbiana incluyen el análisis de la diversidad relativa de comunidades a lo largo de un gradiente de estrés, una perturbación u otra diferencia biótica o abiótica (Kirk et al., 2004).

La técnica de T-RFLP, por su lado, permite obtener el perfil de la estructura de una comunidad microbiana de forma sencilla y reproducible. Para ello se realiza una PCR utilizando un cebador marcado con una molécula fluorescente como el TET (4,7,2V,7V-tetracloro-6-carboxifluoresceina) o el 6-FAM (fosforamidita fluorocromo 5-carboxifluoresceina) para amplificar una región seleccionada del gen 16S ARNr u otro gen de interés a partir del ADN total de la comunidad. La mezcla de amplicones se digiere con una enzima de restricción y los fragmentos obtenidos son entonces separados mediante electroforesis capilar. Dado que únicamente son detectados los fragmentos de restricción terminales marcados, el patrón de bandas es simple y cada banda representa una unidad taxonómica operacional (OTU: *operational taxonomic unit*) o ribotipo (Liu et al. 1997). Los cambios o diferencias en la estructura de la comunidad microbiana pueden detectarse mediante la ganancia o pérdida de fragmentos específicos de los perfiles (Engebretson & Moyer 2003; Schütte et al. 2008). El análisis estadístico de agrupamientos de los datos T-RFLP puede determinar si las comunidades cuentan con poblaciones de abundancias numéricas similares. Es una excelente herramienta para comparar poblaciones, medir cambios espaciales y temporales de las comunidades microbianas o monitorear comunidades complejas. Esta técnica posibilita la adjudicación de identidades taxonómicas a los fragmentos de restricción si se realizan al menos tres perfiles de T-RFLP a la misma muestra mediante la aplicación de enzimas diferentes y luego se comparan los fragmentos resultantes con bases de datos (Osborne 2014).

Tiedje y colaboradores (1999) compararon la identificación y monitoreo de un conjunto de ribotipos específicos mediante T-RFLP y DGGE, encontrando mejores resultados para la primera de las metodologías. Sin embargo, ambas metodologías tienen ciertas limitaciones como el sesgo generado durante el PCR y la selección de los cebadores. Ninguno de los cebadores más utilizados pueden amplificar todas las secuencias de eucariotas, bacterias y arqueas, ya que se basan en secuencias conocidas de microorganismos cultivables (Liu et al. 1997)

El mejor método a utilizar para determinar la estructura de la comunidad microbiana del suelo depende de las preguntas a contestar y de los recursos disponibles. Una posibilidad es la de usar múltiples métodos para analizar una muestra dada en la mayor cantidad de niveles posible, aportando una imagen más completa de la diversidad microbiana y una evaluación más global de los cambios en su estructura y función (Kirk et al., 2004).

2.2 estrategia de trabajo

La aplicación de inoculantes bacterianos con la finalidad de promover el crecimiento de un cultivo y protegerlo de enfermedades causadas por patógenos del suelo es una posible estrategia para disminuir el uso de agroquímicos. Esta estrategia debe ser evaluada en profundidad para disminuir las tasas de fracasos y mejorar la reproducibilidad y aplicabilidad en diferentes ambientes. En el presente trabajo se analizó la capacidad de la cepa C119 para promover el crecimiento de la alfalfa en condiciones de campo. La cepa se introdujo en el ensayo mediante bacterización de las semillas previo a la siembra. Para ello se utilizó una formulación a base de turba, que es comúnmente utilizada para la inoculación de rizobios en leguminosas. Se aplicaron dos tratamientos: uno consistió en recubrir las semillas con una mezcla de la cepa C119 y el rizobio comercial de alfalfa (*S. meliloti* U45) y otro tratamiento consistió en recubrir las semillas únicamente con el rizobio comercial. Este último fue utilizado como control. Los parámetros medidos para evaluar la efectividad de la cepa promotora fueron colonización y persistencia en las raíces, número de plantas sanas y biomasa aérea vegetal. También se evaluó, mediante métodos moleculares, la estructura de la comunidad microbiana presente en la rizósfera de alfalfa sometida a los dos tratamientos, para establecer posibles impactos de la presencia de la cepa C119.

2.3 metodología

2.3-1. Preparación del inoculante y viabilidad del mismo

Se preparó un inoculante en base a turba y la cepa *P. fluorescens* C119 de acuerdo al protocolo desarrollado previamente en nuestro laboratorio (Arias et al. 2009). Se realizaron cultivos de la cepa en 100ml de medio KB, el cual se incubó por 48 hrs a 30°C y agitación (200rpm). Se inyectaron 100ml de cultivo, en forma aséptica, dentro de una bolsa de polipropileno conteniendo 130g de turba estéril. Se prepararon dos bolsas de inoculantes las cuales fueron selladas y mantenidas a temperatura ambiente

durante 30 días. Se realizaron recuentos de UFC por gramo de turba a los 15 y 60 días (un día antes de la bacterización de las semillas) de preparado el inoculante. Para el recuento se tomó asépticamente 1g de turba inoculada y se mezcló con 100ml de pirofosfato de sodio ($Na_4P_2O_7$) 0.1% estéril. Luego de 1h de agitación a 30°C y 200rpm, se realizaron diluciones seriadas y se sembraron, por triplicado, gotas de 10µL en placas de KB. Las placas se incubaron por 24h a 30°C luego de lo cual se contaron las colonias presentes.

2.3-2 Bacterización de las semillas de alfalfa

Un día antes del establecimiento del ensayo de campo se realizó la bacterización de las semillas de alfalfa con dos tratamientos. Un tratamiento consistió en una mezcla (1:1) del inoculante con la cepa *P. fluorescens* C119 y el inoculante comercial *S. meliloti* U45 proporcionado por Lage & Cia. El otro tratamiento, utilizado como control, se generó mezclando en partes iguales el inoculante comercial en base a rizobio con turba estéril para obtener la misma densidad de inóculo que en el tratamiento anterior. A cada uno de las preparaciones se les agregó una solución adherente de metilcelulosa al 1.5% de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Finalmente las diferentes mezclas se utilizaron para bacterizar semillas de alfalfa cultivar Chaná en una dosis de 50g de inoculante/kg de semilla.

2.3-3. Recuentos bacterianos en semillas de alfalfa

Para determinar el número de bacterias provenientes de la turba que efectivamente fueron adheridas a las semillas de alfalfa se realizaron recuentos de UFC/semilla. Se colocaron 10 semillas bacterizadas en 10ml de pirofosfato de sodio 0.1% estéril y se agitaron vigorosamente en vortex durante 10min para desprender las bacterias adheridas. Se realizaron diluciones seriadas y se sembraron, por triplicado, gotas de 10µL en placas de KB. Las placas fueron incubadas por 24h a 30°C luego de lo cual se contaron las UFC, fluorescentes bajo luz UV, de cada dilución.

2.3-4. Ensayo en condiciones de campo

El ensayo en condiciones de campo se realizó durante el otoño-invierno del 2012, en un predio con historia previa de alfalfa proporcionado por un productor agropecuario. Se tomó una muestra compuesta del suelo, extrayendo suelo superficial (5cm) en diez puntos distribuidos a lo largo del área

de siembra, el cual se envió a analizar en el Laboratorio de Análisis de Suelos, Plantas y Aguas de INIA-La Estanzuela.

Para el ensayo de campo se utilizó un diseño experimental de parcelas completamente al azar con 4 repeticiones para cada uno de los dos tratamientos. La unidad experimental consistió en 7 hileras de 2m de largo cada una conteniendo 100 semillas por metro lineal, a una distancia de 30 cm entre hileras. Cada parcela se ubicó dejando una separación de 2m entre ellas (figura 2.1). La disposición de las parcelas se estableció por sorteo. El porcentaje de implantación se determinó mediante recuento de las plantas emergidas a lo largo de las tres hileras centrales a los 21 días post siembra. Finalmente, a los 121 días post siembra se volvieron a contar las plantas de alfalfa y se cosecharon las tres hileras centrales para evaluar el peso seco de la biomasa aérea de las plantas de los dos tratamientos. Las plantas cosechadas se secaron en estufa a 60°C hasta alcanzar un peso constante (unas 96h aproximadamente) luego de lo cual fueron pesadas. El resto de las hileras sembradas (dos de cada lado) se utilizaron para el seguimiento de la colonización radicular de la cepa introducida y para obtener suelo rizosférico a lo largo del ensayo y finalmente se cosecharon a los 121 días para determinar el contenido de nitrógeno y fósforo de las plantas para lo cual se contrataron los servicios del Laboratorio de Análisis de Suelos, Plantas y Aguas de INIA-La Estanzuela.

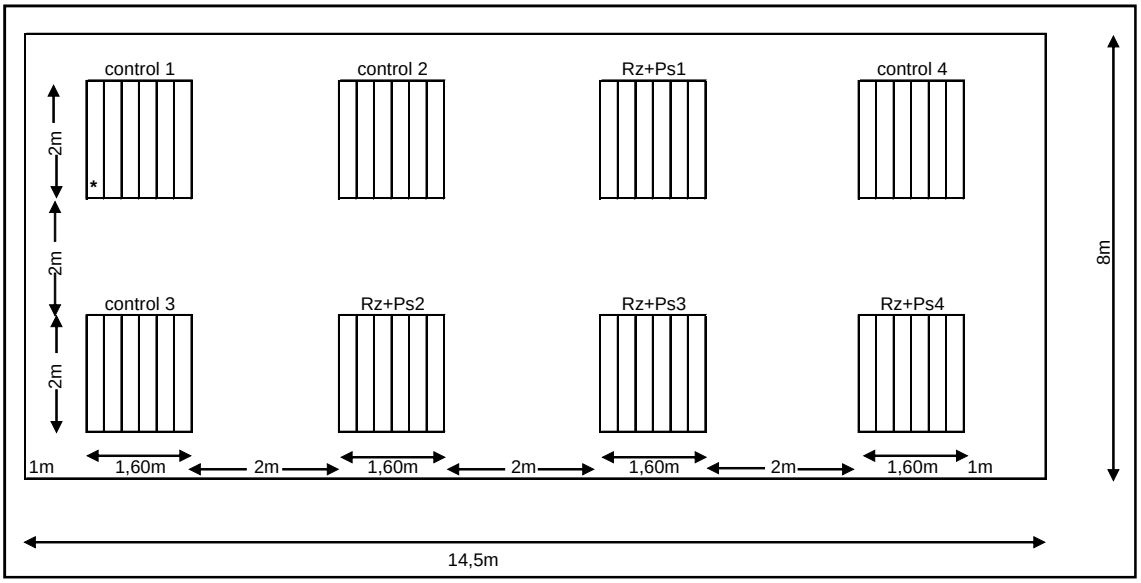


Figura 2.1- Diagrama del diseño experimental del ensayo de campo.

2.3–5. Análisis estadístico

Los datos obtenidos para el número de plantas, el peso seco y el contenido de N y P de las mismas se analizaron mediante el programa Statistica 5.0. Se examinó la normalidad de los datos por el test de Shapiro-Wilk y la homogeneidad de varianzas mediante el test de Bartlett. En los casos en que la distribución de los datos era normal y las varianzas homogéneas, se evaluaron las diferencias entre los tratamientos mediante ANOVA de una vía (con tratamiento como factor) y el test LSD (*Fisher's Least Significant Difference*). De lo contrario, se realizó el análisis de varianza no paramétrico de Kruskal-Wallis y el test de Mann-Whitney.

2.3–6. Colonización rizosférica

Se determinó la presencia de la cepa *P. fluorescens* C119 en la rizósfera de las plantas de alfalfa cuyas semillas habían sido coinoculadas con dicha cepa y el rizobio comercial. Para ello se tomó una muestra compuesta por cada repetición, cada una conteniendo 10 plantas enteras de alfalfa seleccionadas al azar. Las plantas se extrajeron cuidadosamente del suelo, manteniendo la raíz intacta y el suelo rizosférico. Los muestreos se realizaron a los 21, 42, 82 y 121 días post siembra. Se escindieron las raíces de las plantas de cada muestra, se colocaron en 10ml de pirofosfato de sodio 0,1% y se agitaron vigorosamente en vortex durante 10min para separar las bacterias presentes en la rizósfera. Luego se realizaron diluciones seriadas y se sembraron gotas de 10µL en placas de KB conteniendo 30 µg/ml de ácido nalidíxico, 50 µg/ml de ampicilina (para los cuales C119 presenta resistencia natural) y 100 µg/ml de cicloheximida para evitar que crezcan otros microorganismos rizosféricos. Las placas fueron incubadas durante 24hrs a 30°C, luego de lo cual se contabilizaron las colonias fluorescentes. Las raíces frescas se pesaron para obtener el número de UFC/g de raíz. La identidad de las colonias se confirmó mediante BOX-PCR (Versalovic et al. 1994) comparando el perfil de bandas con el obtenido de la cepa pura.

2.3–7. Análisis de la estructura de la comunidad bacteriana de la rizósfera de alfalfa

Se analizó la estructura de la comunidad bacteriana presente en la rizósfera de las plantas de alfalfa inoculadas con los dos tratamientos para determinar posibles alteraciones generadas por la introducción del inoculante. Se utilizaron dos métodos moleculares para el análisis: DGGE y T-RFLP.

Para ello se tomaron muestras compuestas de las cuatro repeticiones de cada parcela 21, 42, 82 y 121 días post siembra. Cada muestra consistió en 10 plantas colectadas al azar en las hileras destinadas a ese fin. Se extrajo el suelo rizosférico siguiendo una metodología similar a la propuesta por Smalla y colaboradores (2001). Brevemente, las raíces conteniendo suelo rizosférico se colocaron en un tubo Falcon con 9ml de pirofosfato de sodio y se agitaron durante 5min a máxima velocidad en vortex. Se centrifugó a baja velocidad (500g) durante 5min luego de lo cual se colectó el sobrenadante. Se repitió el procedimiento anterior dos veces más sobre el pellet conteniendo las raíces y el suelo rizosférico. Los sobrenadantes colectados se combinaron y se centrifugaron a 10000g durante 30min para obtener un pellet de células provenientes del suelo rizosférico, las cuales se guardaron a -80°C para su posterior procesamiento. El ADN total presente en las muestras se extrajo utilizando el sistema PowerSoil DNA Isolation Kit (MoBio), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La calidad del ADN obtenido se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa 1% (p/v). La concentración del ADN y su pureza se determinó mediante espectrofotometría en un equipo nanodrop (*Thermo Scientific Nanodrop* 1000 *Spectrophotometer*) a partir de 1µl de muestra.

2.3-7.1 Análisis por DGGE

i) PCR

A partir del ADN total obtenido de la rizósfera de las plantas de alfalfa se amplificó por PCR un fragmento del gen 16S ARNr utilizando cebadores universales para el dominio Bacteria (cebadores F968-GC y R1378), uno de los cuales contiene un extremo rico en GC (Heuer et al. 1997), (Anexo 2.1). Las condiciones de la reacción de PCR se ajustaron a partir de las utilizadas previamente por otros autores (Peixoto et al. 2002).

La reacción se llevó a cabo en un volumen total de 50µl conteniendo 1X de buffer de reacción, $MgCl_2$ 2,5mM, dNTPs 0,2mM, 0,2µM de cada cebador, 0,1mg/ml de seroalbúmina bovina, formamida 1%, 2,5U de Taq polimerasa, y 1µl de una dilución 1/10 de cada muestra.

Para la reacción de PCR se utilizó el siguiente programa: temperatura de desnaturalización inicial de 94°C durante 2min; un ciclo de desnaturalización a 94°C durante 1min, un ciclo de hibridación a 55°C durante 1min y un ciclo de extensión a 72°C durante 2min. Los ciclos se repitieron 35 veces y se llevó a

cabo una extensión final a 72°C durante 10min. Los productos de PCR se analizaron en primera instancia por electroforesis en gel de agarosa 1% (p/v) en TAE 1X (100V, 45 min), y luego por DGGE.

ii) DGGE

Los productos de PCR se analizaron por DGGE en un equipo C.B.S. Scientific, en TAE (Tris-acetato, EDTA; pH 7.5) 1X a 60°C. Los geles de poliacrilamida contenían un 6% de acrilamida y un gradiente de agentes desnaturalizantes de 40-65% (100% de agentes desnaturalizantes: urea 7M y formamida 40% (v/v), previamente desionizada con la resina AG® 501-X8 de Bio-Rad (Anexo 2.2). La corrida electroforética se llevó a cabo a 70V durante 16h de acuerdo a Peixoto y colaboradores (2002). El marcador de peso molecular usado fue el Gene Ruler 1Kb plus DNA Ladder (de 75 a 20000 pares de bases, Thermo Scientific). Los geles se revelaron con SYBR green durante 1h y se visualizaron bajo luz UV utilizando el equipo Multi-purpose image scanner Fuji Film Fla-9000.

El análisis de los perfiles de bandas de ADN se realizó mediante el programa Gel Compar II Versión 6.5 de Applied Maths (http://www.applied-maths.com/gelcompar-ii). Se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson's para determinar la distancia métrica y el algoritmo UPGMA para construir los dendogramas.

2.3-7.2 Análisis mediante T-RFLP

i) PCR

Partiendo del mismo ADN genómico utilizado para el análisis por DGGE, se amplificó por PCR un fragmento del gen 16S ARNr utilizando cebadores universales para el dominio Bacteria (cebadores 27F-FAM y R1378) (Anexo 2.1). La reacción se llevó a cabo en un volumen total de 50µl conteniendo 1X de buffer de reacción, $MgCl_2$ 3mM, dNTPs 0,2mM, 0,4µM de cada cebador, 0,1mg/ml de seroalbúmina bovina, 5U de Taq polimerasa, y 1µl de una dilución 1/10 de ADN genómico.

El programa para la reacción de PCR fue el siguiente: temperatura de desnaturalización inicial de 94°C durante 5min; luego 30 ciclos de de desnaturalización a 94°C durante 1min, hibridación a 55°C durante 1min y extensión a 72°C durante 3min. Finalmente se llevó a cabo una extensión final a 72°C durante

7min. Los productos de PCR se analizaron en primera instancia en geles de agarosa 1% (p/v) en TAE 1X (100V, 45 min), y luego fueron digeridos para su análisis por T-RFLP.

ii) Digestión enzimática y separación electroforética.

Para obtener suficiente muestra se combinaron 2 productos de PCR (100µl en total) y se purificaron utilizando el sistema *PCR purification kit* (Qiagene). Los amplicones se eluyeron en 30µl de agua ultra pura. Para la digestión enzimática se tomaron 15µl de la muestra y se mezclaron con 6U de la enzima de restricción MspI y con 2µl de Buffer Tango 10X. La mezcla se dejó reaccionar toda la noche luego de lo cual se inactivó la enzima calentando a 65°C durante 10min. Los fragmentos digeridos se precipitaron con etanol 95% a 4°C durante 30min, y se centrifugaron a 14000rpm durante 30min. El pellet obtenido se lavó con 100µl de etanol 70%, se volvió a centrifugar a la misma velocidad por 10min y finalmente se secó a temperatura ambiente. Los fragmentos precipitados se enviaron a analizar mediante electroforesis capilar, en la Unidad de Biología Molecular del Instituto Pasteur. Para el análisis se aplicó a cada corrida el estándar interno *GeneScan 1200 Liz Standard* (Applied Biosystems) Los cromatogramas obtenidos se visualizaron en el programa *Peak Scanner* (Applied Biosystem).

iii) Análisis informático de los perfiles de T-RFLP

Para el análisis de los perfiles de T-RFLP se estableció un umbral de 50 unidades de fluorescencia por debajo del cual las señales se consideraron como ruido de fondo. Se tomaron en cuenta los fragmentos comprendidos entre 50 y 600pb, ya que los inferiores a 50pb podían corresponder a los cebadores y los superiores a 600 quedaban fuera del rango lineal del estándar utilizado. Los datos fueron procesados en el programa analítico T-REX (*T-rflp Analyses EXpedited*), de acceso libre en la web, para evitar introducir variabilidad debido al complejo procesamiento manual de los mismos. Con este programa se obtuvo una matriz de datos donde cada fila correspondía a las repeticiones de los dos tratamientos (control ó Rizobio + *Pseudomonas*) y los cuatro momentos de muestreo y cada columna correspondía a la abundancia relativa de cada fragmento de restricción terminal (T-RF). Los datos de la matriz se normalizaron dividiendo la altura de cada pico entre la suma de las alturas de todos los picos para cada muestra. De esta forma se logró un balance ente las muestras a pesar de posibles diferencias en el contenido de ADN. Todos aquellos picos que aportaron menos de un 1% a la intensidad relativa de cada

muestra fueron eliminados. Se realizó un análisis multivariado de componentes principales (PCA: *principal components analysis*) para determinar diferencias entre muestras y la diversidad utilizando el programa PAST (Hammer et al., 2001).

2.4 resultados

2.4-1. Instalación del ensayo e implantación de la alfalfa

El ensayo de campo se estableció en un predio de un productor rural del departamento de Canelones. El área de siembra fue desmalezada y tratada con herbicida previo a la instalación del ensayo. Las características físico químicas del suelo se resumen en la tabla 2.3.

El inoculante formulado en base a la cepa *P. fluorescens* C119 y turba estéril como soporte presentó una densidad poblacional de $7{,}07x10^{8}$UFC/ gramo de turba el día previo a la siembra (60 días de preparado), la cual fue adecuada para su aplicación sobre semillas de alfalfa. Por otra parte, el número de bacterias que se mantuvieron adheridas a las semillas luego de la bacterización (al momento de la siembra) fue de $2{,}4x10^{3}$UFC/semilla, la cual está dentro del rango que permite este sistema de inoculación.

Tabla 2.3- Características fisicoquímicas y textura del suelo utilizado para el ensayo de alfalfa

P (Brayl) µg P/g	pH (H_2O)	C.Org %	N %	Fe mg/kg	Textura (familia textural) %Arena	%Limmo	%arcilla	Clasificación
28,0	5,0	2,17	0,2	101,0	27	41	32	*franca*

CE mmhos/cm 25°C	Ca (meq/100g)	Mg (meq/100g)	K (meq/100g)	Na (meq/100g)	A. tit (meq/100g)	$ClCpH_7$ (meq/100g)	Bases T. (meq/100g)	% Sat bases
0,5	10,1	3,6	0,38	0,25	4,9	19,2	14,3	74,5

P (Brayl): fósforo por método de Brayl; C. Org: Carbono orgánico; CE: conductividad eléctrica; A. tit: acidez titulable; $ClCpH_7$: bases + acidez titulable; % Sat: % de saturación.

Se determinó el número de plantas emergidas en dos momentos: a los 21 días post siembra con la finalidad de establecer posibles efectos en la implantación de la alfalfa debido a la presencia de la cepa promotora y a los 121 días, al momento de la cosecha. No se observaron diferencias significativas para el número de plantas entre el control y el tratamiento con *Pseudomonas* tanto a los 21 días como a los

121 días. Sin embargo, el número de plantas de alfalfa para el tratamiento con C119 se mantuvo estable, mientras que en el control inoculado únicamente con el rizobio mostró un descenso significativo (LSD, P<0,05) (figura 2.2).

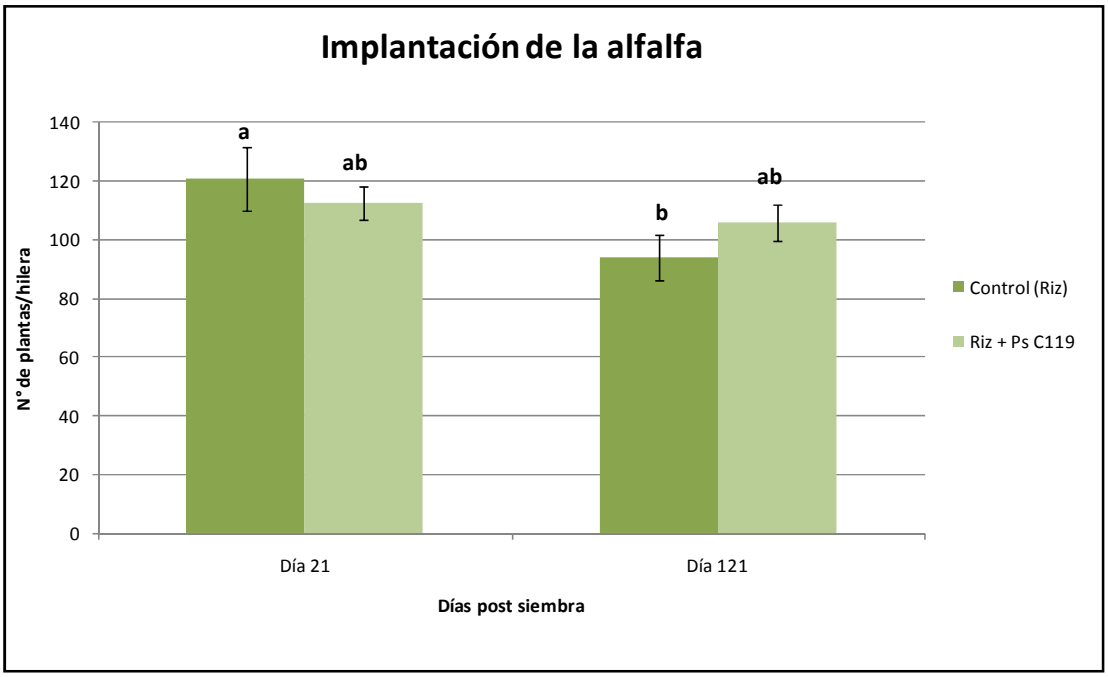


Figura 2.2- Número de plantas sanas de alfalfa a los 21 y 121 días post siembra. Promedio del número de plantas de alfalfa presentes en a lo largo de las tres hileras centrales de cada repetición para los dos tratamiento: control (inoculado únicamente *S. meliloti* U45) y tratamiento coinoculado con el rizobio y la cepa *P. fluorescens* C119 (Rz+Ps C119). Las barras de error corresponden al error estándar.

2.4–2. Colonización radicular

Se analizó la capacidad de la cepa *P. fluorescens* C119 para colonizar la rizósfera de alfalfa, originalmente introducida mediante bacterización de las semillas. Para ello se determinó la presencia de la misma por recuentos de UFC por gramo de raíz a lo largo de todo el ensayo. Los resultados obtenidos indican que la cepa se mantuvo en el orden de 10^6UFC/g de raíz durante todo el ensayo (figura 2.3).

Para confirmar la identidad de la cepa introducida entre las colonias observadas en las placas de recuento, se realizó un perfil de tipo *fingerprinting* mediante BOX-PCR. El análisis se realizó tanto para colonias fluorescentes aisladas de plantas tratadas con la cepa C119 como para colonias aisladas de plantas control tratadas únicamente con el rizobio (figura 2.4). En estas últimas se pudieron observar algunas colonias fluorescentes bajo luz UV cuando eran crecidas en placas de KB.

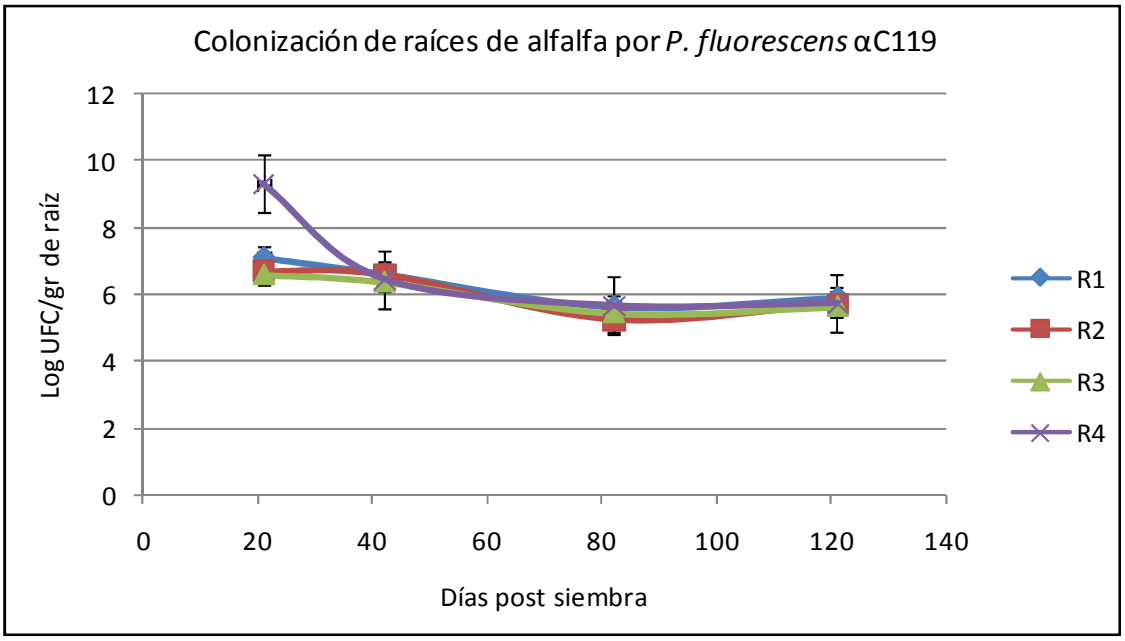


Figura 2.3- Colonización radicular de la cepa C119 en plantas de alfalfa. Se indica el log de UFC por gramo de raíz para las cuatro repeticiones del tratamiento con *Pseudomonas* y rizobio a los 21, 42, 82 y 121 días post siembra (se indican los valores para las cuatro repeticiones (R).

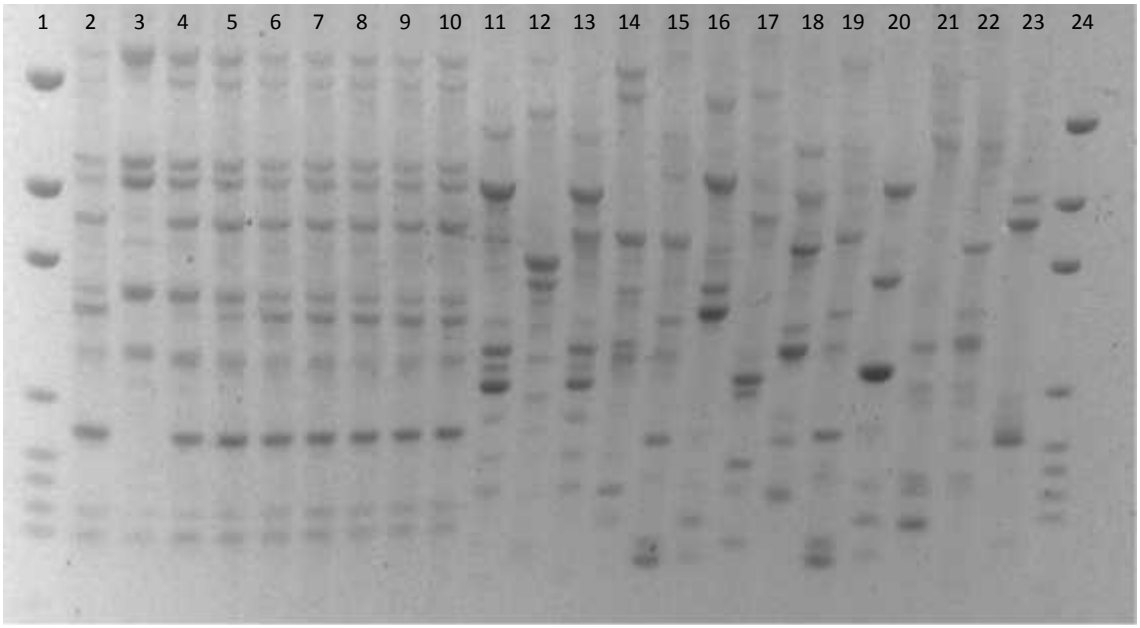


Figura 2.4- Perfiles genómicos obtenidos a partir de colonias aisladas de *Pseudomonas* generados mediante BOX-PCR. Carriles 1 y 24: marcador de peso molecular pGem®(Promega); carril 2: C119; carriles 3 al 13 colonias aisladas de raíces de plantas tratadas con C119 (carriles 11, 12 y 13: colonias con morfología diferencial); carriles 14 al 23 colonias aisladas de raíces de plantas no tratadas.

2.4-3. Promoción del crecimiento de la alfalfa

El efecto de la inoculación con la cepa C119 sobre el crecimiento de las plantas de alfalfa se evaluó comparando el peso de la parte aérea de las plantas control y las plantas inoculadas con la combinación de rizobio y *Pseudomonas*. Como puede observarse en la figura 2.5, la biomasa aérea de la alfalfa tratada con C119 mostró un aumento significativo del 40% respecto a la alfalfa no tratada con la *Pseudomonas*.

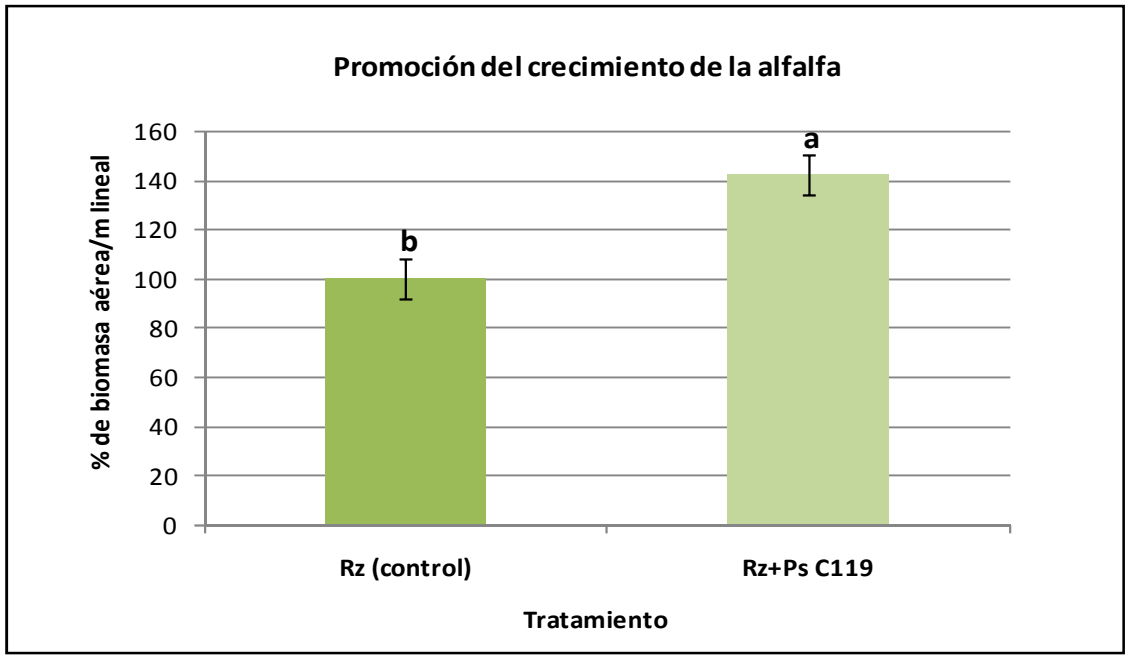


Figura 2.5- Promoción del crecimiento de la alfalfa debido a la aplicación de C119. Promedio del peso seco de las cuatro repeticiones para el tratamiento con rizobio comercial y para el tratamiento con Rizobio + *Pseudomonas* expresado en porcentaje por metro lineal (tomando como base 100 el promedio del peso de las plantas del control) a los 121 días post siembra, (LSD, P>0,05). Se indica el error estándar de los datos.

2.4-4. Contenido de Nitrógeno y Fósforo vegetal

Se analizó el contenido de nitrógeno y fósforo foliar para determinar si la presencia del inoculante incidía en la proporción de estos nutrientes en las plantas de alfalfa. Los resultados muestran que estos dos nutrientes se mantuvieron constantes entre los distintos tratamientos (figura 2.6, A y B)

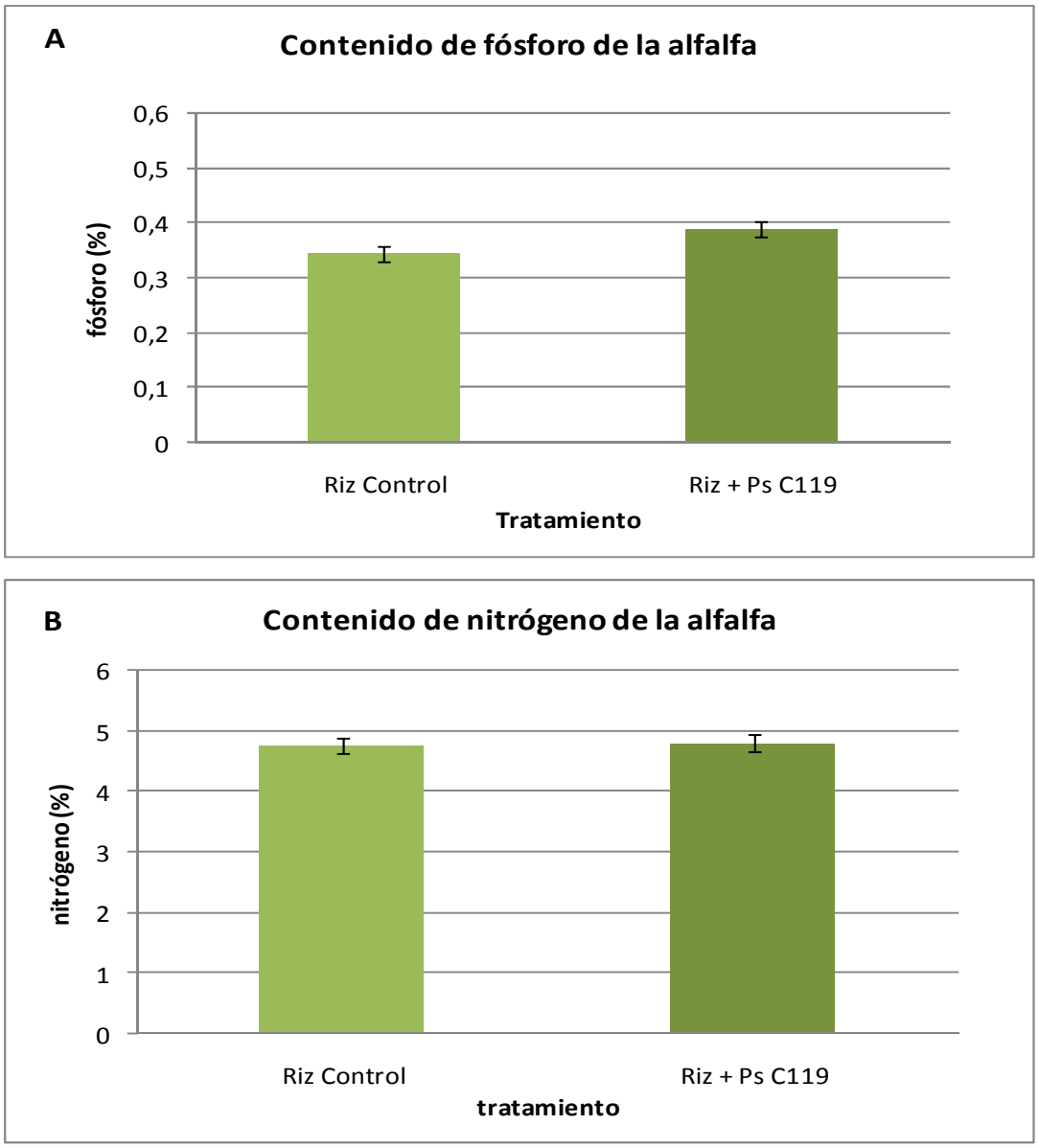


Figura 2.6- Contenido de fósforo (A) y nitrógeno (B) de la parte aérea de plantas de alfalfa inoculadas con *S. melliloti* U45 (Riz control) e inoculadas con el rizobio y la cepa *P. fluorescens* C119 (Riz + C119). Datos presentados como porcentaje respecto al peso seco de la planta.

2.4–5. Estructura de la comunidad microbiana de la rizósfera de alfalfa

El efecto de la inoculación de la alfalfa con la cepa C119 sobre la estructura de la comunidad microbiana de la rizósfera se analizó por dos métodos moleculares: DGGE y T-RFLP. A partir de un total de 32 muestras de rizósfera se extrajo ADN de alto peso molecular (figura 2.7), de concentración y pureza apropiadas para ser utilizado en las reacciones de PCR requeridas por ambas metodologías.

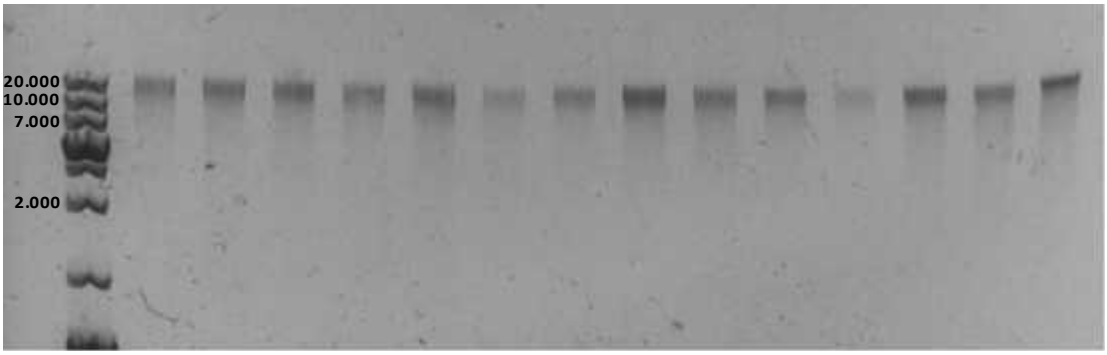


Figura 2.7- Electroforesis en gel de agarosa de ADN total extraído a partir de muestras de rizósfera. En el primer carril se colocó el marcador de peso molecular 1Kb plus DNA Ladder -Thermo Scientific- (75-20000 pb).

2.4-6 Análisis de diversidad del dominio *Eubacteria* mediante PCR-DGGE

A partir del ADN extraído se realizaron reacciones de PCR utilizando cebadores específicos (F968-GC y R1378) (Anexo 2.1) para la región V6 del gen 16S ARNr, que es la región de mayor variabilidad dentro del mismo, permitiendo de esta forma optimizar el análisis de la comunidad bacteriana (Brons & van Elsas 2008). Estos cebadores se unen a las bases 968-984 y 1378-1401 del gen (posiciones correspondientes al gen 16S ARNr de *Escherichia coli*). La única banda obtenida a partir de esta reacción fue de 450 pares de bases (Araújo et al. 2002), de los cuales 410 pb corresponden al amplicón de interés y 40 pb a la grampa GC (figura 2.8).

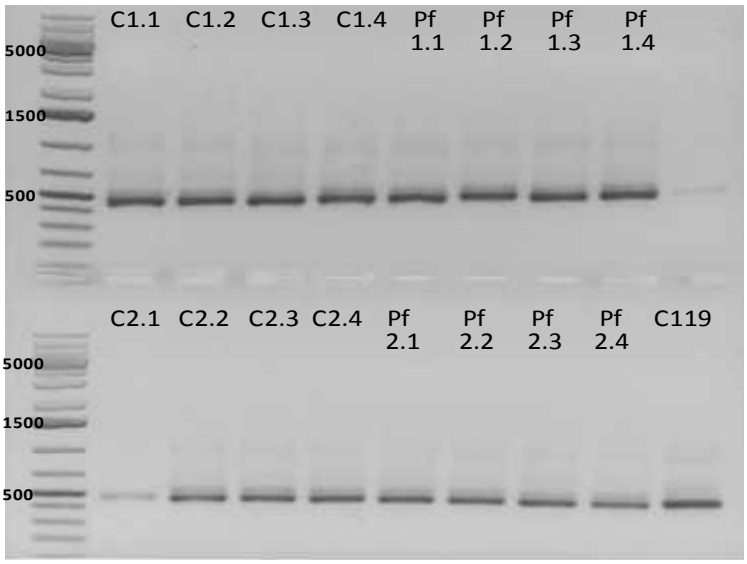


Figura 2.8- Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR con cebadores específicos para un fragmento del gen del ARNr 16S de *Eubacteria* obtenido del ADN total de suelo rizosférico de los muestreos 1 y 2. Se indican los amplificados provenientes de muestras inoculadas con la cepa C119 y de muestras del control. (Arriba: carriles 2 al 9: primer muestreo; Abajo: carriles 2 al 8: segundo muestreo; carril 10 amplificación a partir de ADNg de C119). C: contro; Pf: coinoculación rizobio + *Pseudomonas*

Los productos de PCR se separaron por DGGE sembrándose 10µl de cada muestra, excepto para la muestra R+P1 del segundo muestreo, de la cual se sembró el doble debido a que presentó menor concentración de ADN.

Los patrones visualizados en los geles de DGGE (Figura 2.9) mostraron un gran número de bandas para todas las muestras excepto para el control 1 del segundo muestreo (C2.1), que presentó pocas bandas tenues. Los geles se analizaron con el programa GelCompar II tomando en cuenta las zonas donde se presentaron las bandas más nítidas y abundantes. Se realizó un análisis de agrupamiento de las muestras en forma de dendogramas con el patrón de bandas obtenido (figura 2.10). Se observaron dos grandes grupos de perfiles bien diferenciados. Un grupo estaba compuesto por las muestras obtenidas el día 21 (M1: muestreo 1) y el otro grupo por las restantes muestras, habiendo entre ambos menos de un 40% de similitud. Los dos tratamientos del M1 presentaron un 88% de similitud entre ellos. Los perfiles de las muestras tratadas con la cepa C119 fueron muy similares ente sí (95%) y se agruparon en una sub rama (junto al C1). El otro grupo conformado por el resto de las muestras también presentó patrones de bandas muy similares entre sí para los tratamientos con la cepa C119, las cuales se agruparon de acuerdo al momento del muestreo. El tercer muestreo (M3) fue el que presentó mayor distancia entre las comunidades de las plantas sometidas a los dos tratamientos (control y C119+ rizobio, 65% similitud). El control 1 del M2 que presentó pocas bandas en su perfil, fue excluido del grupo. El muestreo final (M4) no permite concluir claramente si existen diferencias entre las estructuras de las comunidades de los dos tratamientos dado que dos controles (C1 y C2) se agruparon estrechamente junto a las muestras tratadas con C119 (93% similitud) mientras que los otros dos (C3 y C4) se ubican a un 75% de similitud.

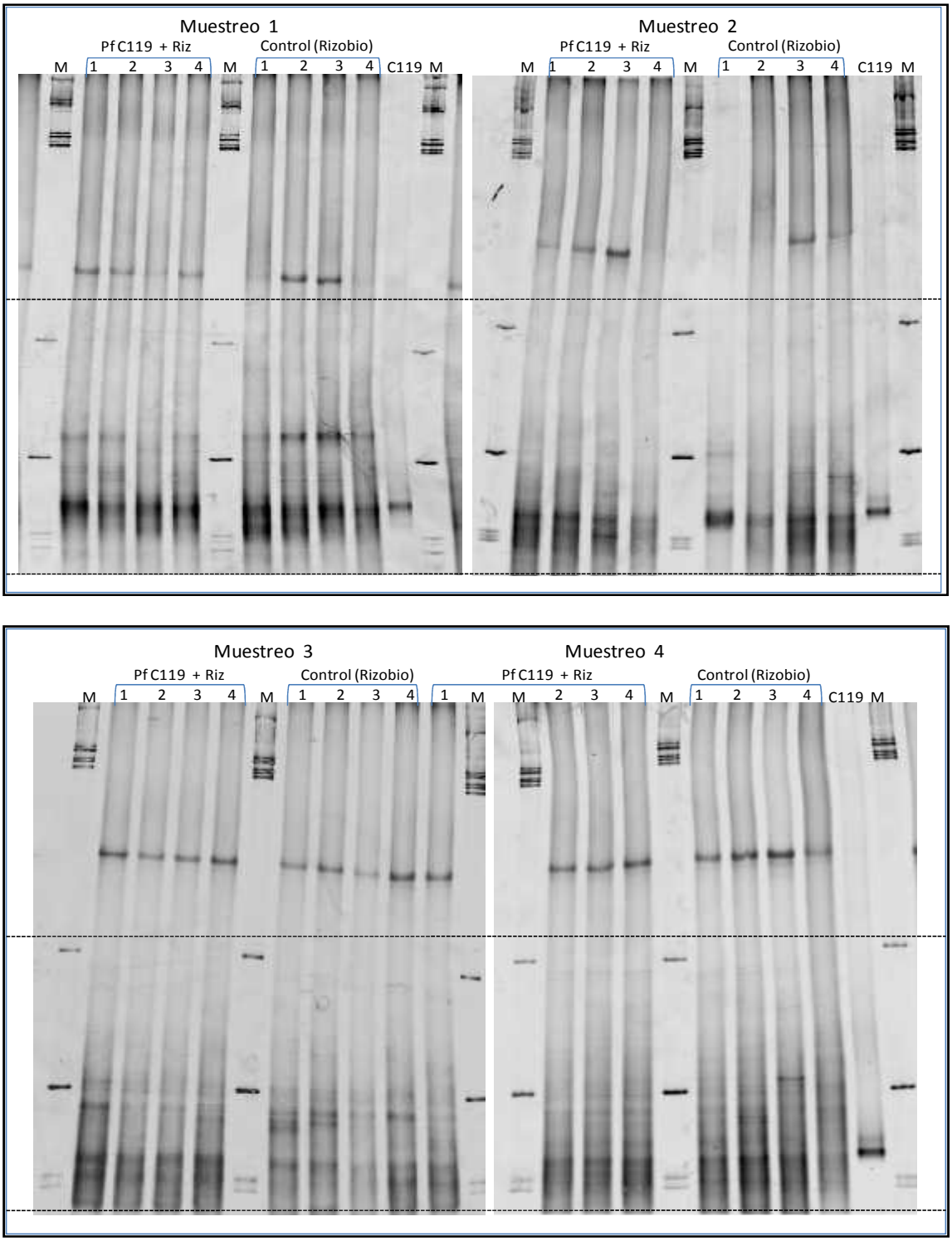


Figura 2.9- DGGE del 16S ARNr de la comunidad bacteriana de la rizósfera de alfalfa. Perfiles de bandas obtenidos por PCR a partir del ADN presente en la rizósfera de alfalfa para los dos tratamientos: control (inoculado únicamente con rizobio) y la inoculación con la cepa C119 + el rizobio. Se muestran resultados para las cuatro repeticiones de los dos tratamientos. Muestreo 1: 21 días post siembra; Muestreo 2: 42 días post siembra; Muestreo 3:82 días post siembra; Muestreo 4: 121 días post siembra. M: marcador de migración; C119: banda obtenida de la amplificación del 16SrDNA a partir de ADN genómico de la cepa C119. Con dos líneas de trazos se indica el área que se tuvo en cuenta para el análisis.

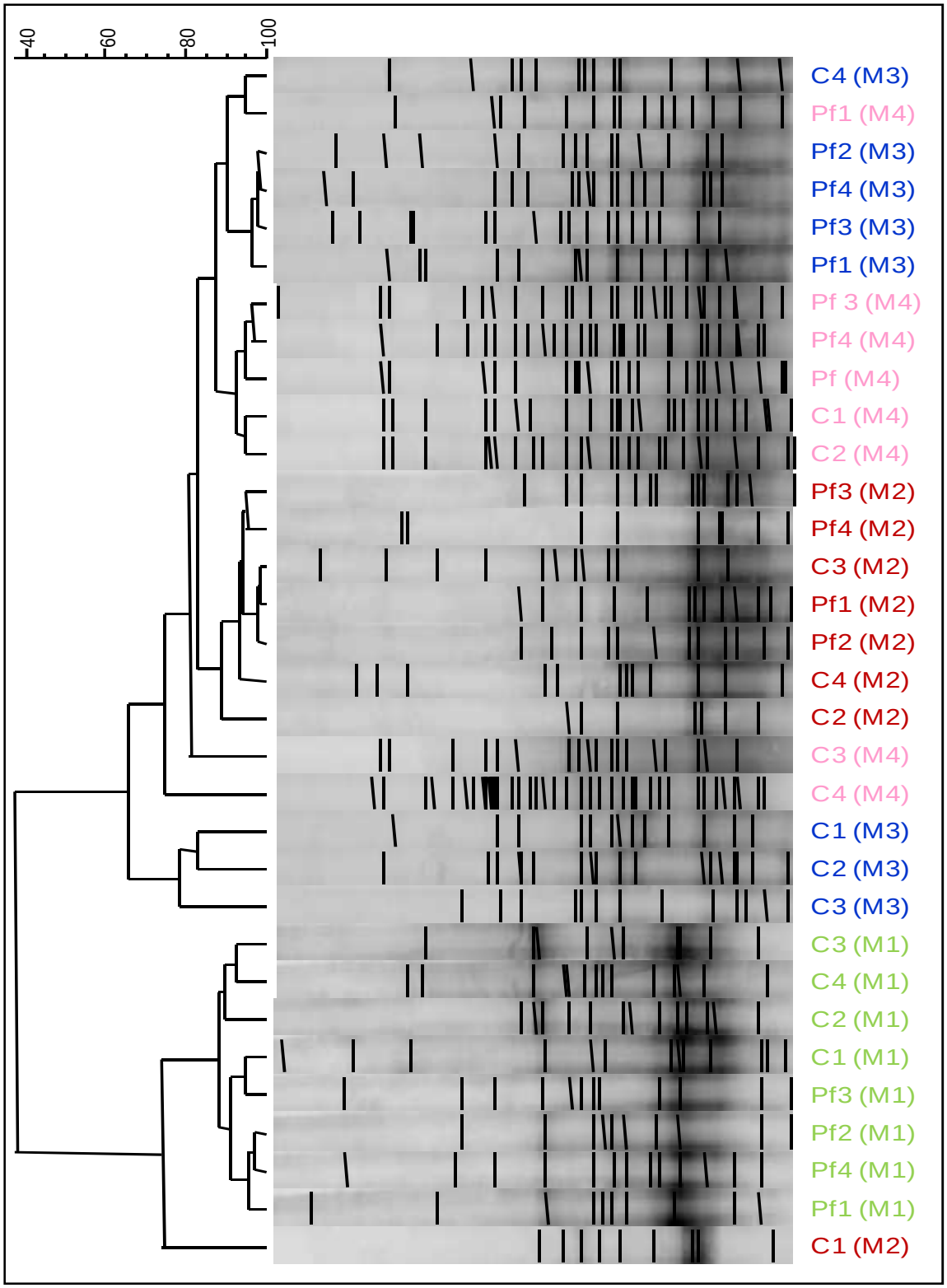


Figura 2.10- Análisis de agrupamiento de los perfiles de la comunidad de *Bacteria* obtenidos por DGGE realizado mediante software GelCompare. Perfiles de las cuatro repeticiones de los dos tratamientos en cuatro momentos de muestreo. Para el análisis se aplicó el algoritmo UPGMA a la matriz generada del análisis mediante el coeficiente de Pearson. Identificación de las muestras: C: tratamiento control y Pf: tratamiento con cepa C119, ambos seguidos por el número de repetición; M1, M2, M3 y M4: muestreo a los 21, 42, 82 y 121 días post siembra respectivamente.

2.4-7 Análisis de diversidad del dominio *Eubacteria* mediante T-RFLP

Para el análisis por T-RFLP se realizaron amplificaciones por PCR utilizando un cebador *forward* marcado, 27F-FAM, y el mismo cebador *reverse* que para el DGGE (R1378). Con ellos se amplificó un fragmento de 1370pb del gen 16S ARNr (figura 2.11), más extenso que el obtenido para DGGE. Se repitió el PCR para las muestras que presentaron poca amplificación y los productos se juntaron antes de la purificación.

Los fragmentos digeridos (T-RFs) se analizaron por electroforesis capilar y los resultados se observaron mediante el programa *Peak Scanner*. De esta forma se pudo visualizar la diversidad de fragmentos en un cromatograma de longitud de los T-RFs *vs* intensidad de fluorescencia (figura 2.12). Los cromatogramas revelaron una gran diversidad de tamaños de T-RFs en todas las muestras. La muestra correspondiente a la repetición 1 del control en el segundo muestreo (C2.1) no pudo utilizarse en el análisis por su bajo contenido de ADN. Tomando en cuenta solamente los fragmentos que se encontraban dentro del rango establecido entre 50 y 600 pb se observaron 448 OTUS diferentes entre todas las muestras, con una riqueza promedio de 135,55 T-RFs. El mayor número de T-RFs se observó en una muestra tratada con la cepa C119 (P+R 3.1) con 215 T-RFs, mientras que una muestra del control (C1.4) con 30 T-RFs fue la de menor cantidad. Esta muestra fue descartada debido al bajo número de OTUs y a la débil intensidad de fluorescencia.

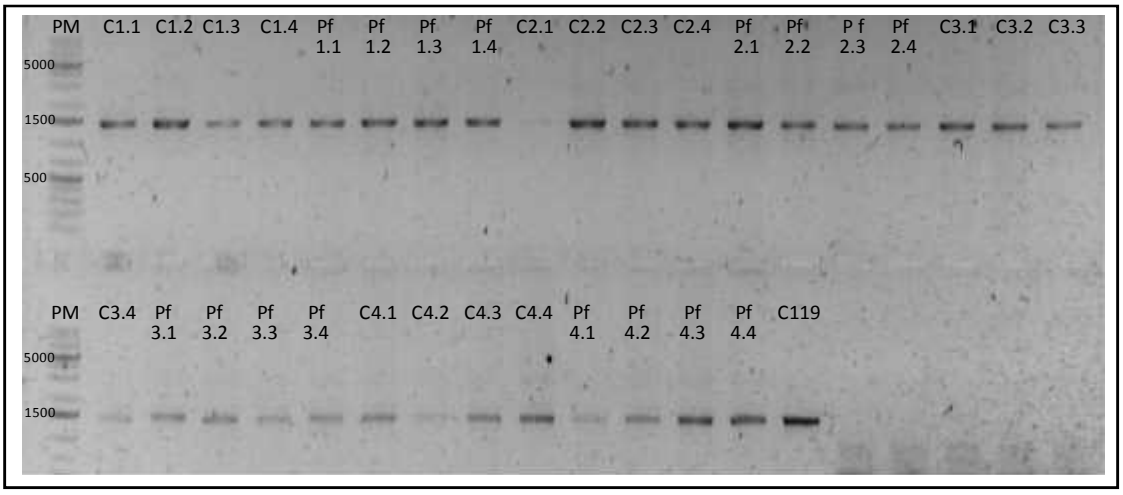


Figura 2.11- Fragmentos de del gen 16S ARNr amplificados por PCR (1370 pb). Electroforesis en gel de agarosa de los amplicones obtenidos a partir de muestras de ADN rizosférico. C: muestras provenientes del tratamiento control(sólo rizobio); Pf: coinoculación rizobio + *Pseudomonas*. Se indica con números el muestreo y la repetición. (Arriba: carriles 1 al 8: primer muestreo; carriles 9 al 16: segundo muestreo; carriles 17 al 19: tercer muestreo. Abajo: carriles 1 al 5: tercer muestreo y carriles 6 al 13: cuarto muestreo). PM: marcador de peso molecular GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific).

La heterogeneidad de las muestras, también conocida como beta diversidad, calculada como el número total de T-RFs dividido por la riqueza promedio de un ambiente fue de 2,31. La heterogeneidad también se desprende del número de celdas con valor "0" en la matriz de datos, ya que a mayor número de celdas cero menor es el número de OTUs compartidos entre las muestras. Para la matriz obtenida mediante el programa T-rex el porcentaje de celdas con valor cero fue del 69,74%.

Se realizó un análisis de componentes principales el cual permitió reducir la cantidad de variables y representar las diferencias entre los tratamientos en un gráfico comprensible. Previamente todos los fragmentos que tuvieron un aporte inferior al 1% de la intensidad total de la muestra (suma de todos los picos) fueron eliminados. De esa forma se redujo de manera importante el número de T-RFs, persistiendo 124 T-RFs diferentes de los 448 originales (tabla 2.4). El análisis de componentes principales sobre los T-RFs de los dos tratamientos generó un gráfico de ordenación que se muestra en la figura 2.13. Los ejes graficados explican el 49,7% de la varianza observada, donde el 39,13% está explicada en el primer eje (representado en la figura por el eje horizontal) y el segundo eje (vertical) representa el 10,57%. De acuerdo a este análisis la estructura de la comunidad bacteriana es modificada por la presencia de la cepa C119 en la rizósfera de alfalfa, pero su efecto es temporal. Se observa en el primer muestreo cómo ambos tratamientos quedan separados por el eje del componente 1, los tratamientos con la cepa C119 con valores positivos y los tratamientos control con valores negativos. Las diferencias se van perdiendo en las siguientes etapas del ensayo.

Para el segundo muestreo no se observaron diferencias entre tratamientos pero sí se vio un efecto del momento del muestreo que agrupa a esas muestras separadas en el cuadrante superior izquierdo. Los siguientes muestreos a los 82 y 121 días post siembra no presentaron diferencias entre tratamientos.

Utilizando el programa T-Rex, donde se tuvieron en cuenta los 448 T-RFs originales, se obtuvieron resultados muy similares (Anexo 2.4)

Algunas OTUs tuvieron mayor incidencia en los resultados observados. El peso de cada OTU en el primer componente principal se representa en la figura 2.14. Se utilizó la herramienta informática *Virtual Digest* (ISPaR) del MiCA (*Microbial Comunity Analysis* III), la cual realiza la digestión teórica de genes 16S ARNr obtenidos de bases de datos y asocia los tamaños de fragmentos con géneros bacterianos teniendo en cuenta los cebadores utilizados para la amplificación y la enzima de restricción usada para la digestión.

Los posibles géneros bacterianos asociados con cada OTU fueron muy variados, lo cual hizo imposible identificarlos. Para ello sería necesario utilizar otras enzimas de restricción que aporten más datos sobre los genes 16Sr ARNr de las muestras. Sin embargo se destacan algunos rizobios representados por los T-RFs 92, y 144 y las *Pseudomonas* representadas por el T-RF 483 (tabla 2.5)

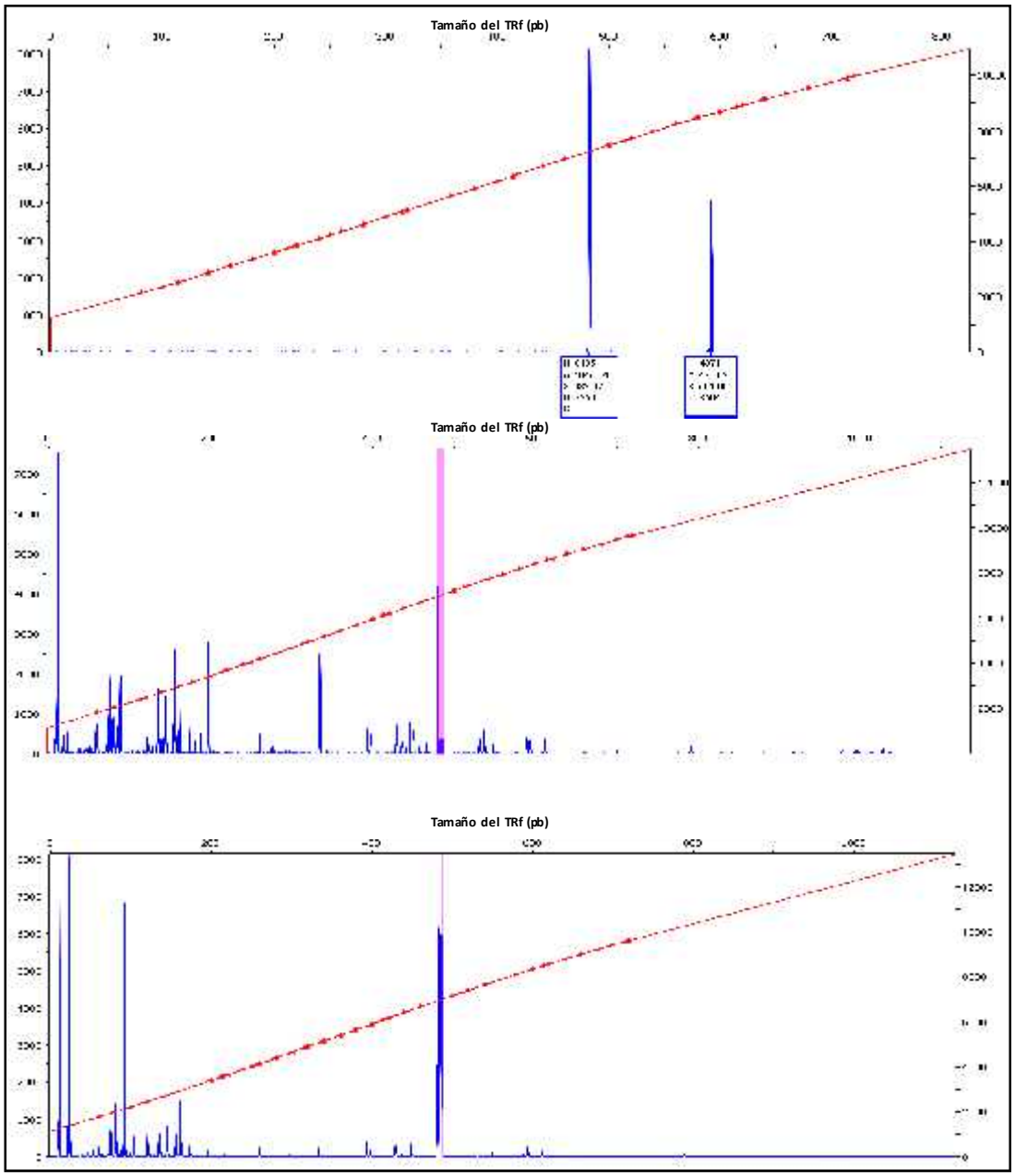


Figura 2.12- Perfiles de T-RFLP. Se grafican la intensidad de fluorescencia relativa versus el largo de los T-RFs en pb. (A) TRF del 16S rDNA del a cepa *P. fluorescens* C119; (B) Perfil de T-RFLP para la muestra control 2 del primer muestreo; (C) Perfil de T-RFLP para la primer repetición de la muestra inoculada con C119 del primer muestreo. Los perfiles de 16S ARNr T-RFLP representan la composición de especies bacterianas de la rizósfera para los dos tratamientos

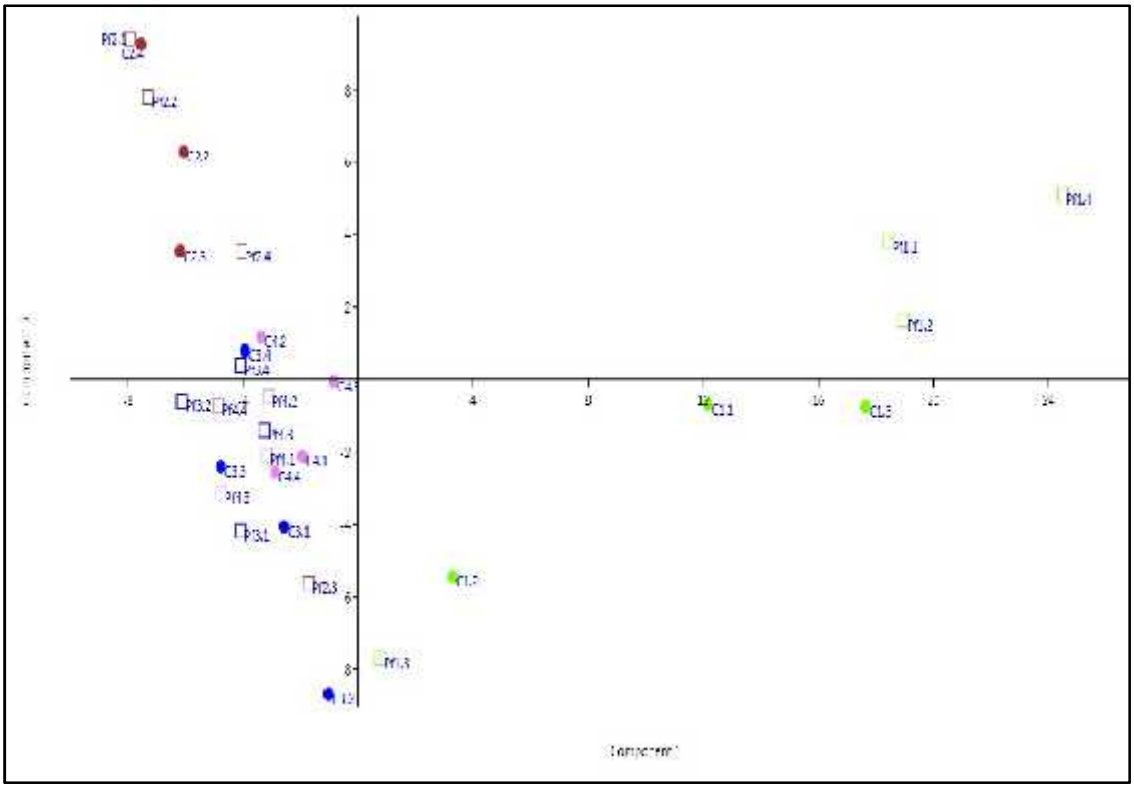


Figura 2.13- Análisis de componentes principales. Gráfico de ordenación representando los dos ejes principales calculados mediante PCA. El primer componente es representado por el eje horizontal, y el segundo por el vertical. Las muestras control se indican con círculos y las muestras inoculadas con C119 con cuadrados. Los cuatro muestreos se diferencian por el color de los puntos: 1er muestreo: verde; 2do muestreo: marrón; 3er muestreo: azul y 4to muestreo: rosa.

Tabla 2.4- Número de OTUs que aportan más del 1% a la intensidad de la muestra y proporción de celdas con valor cero

Tratamiento	Muestreo	promedio T-RFs	% de celdas vacías
Control	1	24,66	80,1
riz+C119	1	22	82,3
Control	2	25	79,8
riz+C119	2	26,75	78,4
Control	3	26	79,0
riz+C119	3	25,5	79,4
Control	4	25,75	79,2
riz+C119	4	26,5	78,6

Tabla 2.5- Lista de OTUs con mayor incidencia en la construcción del eje principal del PCA.

T-RF (pb)	Géneros bacterianos asociados
86	bacterias no cultivables, bacterias del rumen no cultivables, *Paludibacter*
89	bacterias no cultivables, *Bacteroides* sp. *Porphyromonas*, *Prebotela* y bacterias del rumen
92	bacterias no cultivables del compost, *Mesorhizobium*, *Halothermothrix*
144	*Bradyrhizobium*, *Rhodopseudomonas*, *Methylobacterium*, *Nostoc*, no cultivable
156	bacterias no cultivables
162	bacterias no cultivables
260	bacterias no cultivables del rúmen, *Deinococcus*, *Helicobacter*
397	*Bartonella*, *Candidatus Liberibacter*
480	bacterias no cultivables, *Acidoborax*, *Alicycliphilus denitrificans*, *Delftia*, *Comamonas*, *Thiomonas*, *Acidithiobacillus*, *Pseudoalteromonas*, *Halomonas*
483	bacterias no cultivables, *Clostridium*, *Pseudomonas*
486	bacterias no cultivables, *Colwellia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Pantoea*, *Halomonas*, *Marinomonas*
488	*Alcaligenes*, *Methylophilaceae* no cultivable, *Idiomarina*, *Pseudoalteromonas*, *Shewanella*, *Pantoea*, *Xylella*
532	Bacterias del rumen no cultivable, *Mucilaginibacter* no cultivable, *Pedobacter*, *Micoplasma*

El análisis de la diversidad microbiana de las muestras provenientes de los dos tratamientos, aplicando el índice de Shannon, mostró que en el primer muestreo la estructura de la comunidad bacteriana del tratamiento con C119 fue menos diversa que la del control. En los siguientes muestreos las diferencias entre los tratamientos fueron disminuyendo. Por otra parte la distribución de individuos por especie (*Evenness*) fue menos equitativa en el primer muestreo para ambos tratamientos. A lo largo del ensayo se observó un aumento de este índice para todas las muestras (Anexo 2.4 material suplementario).

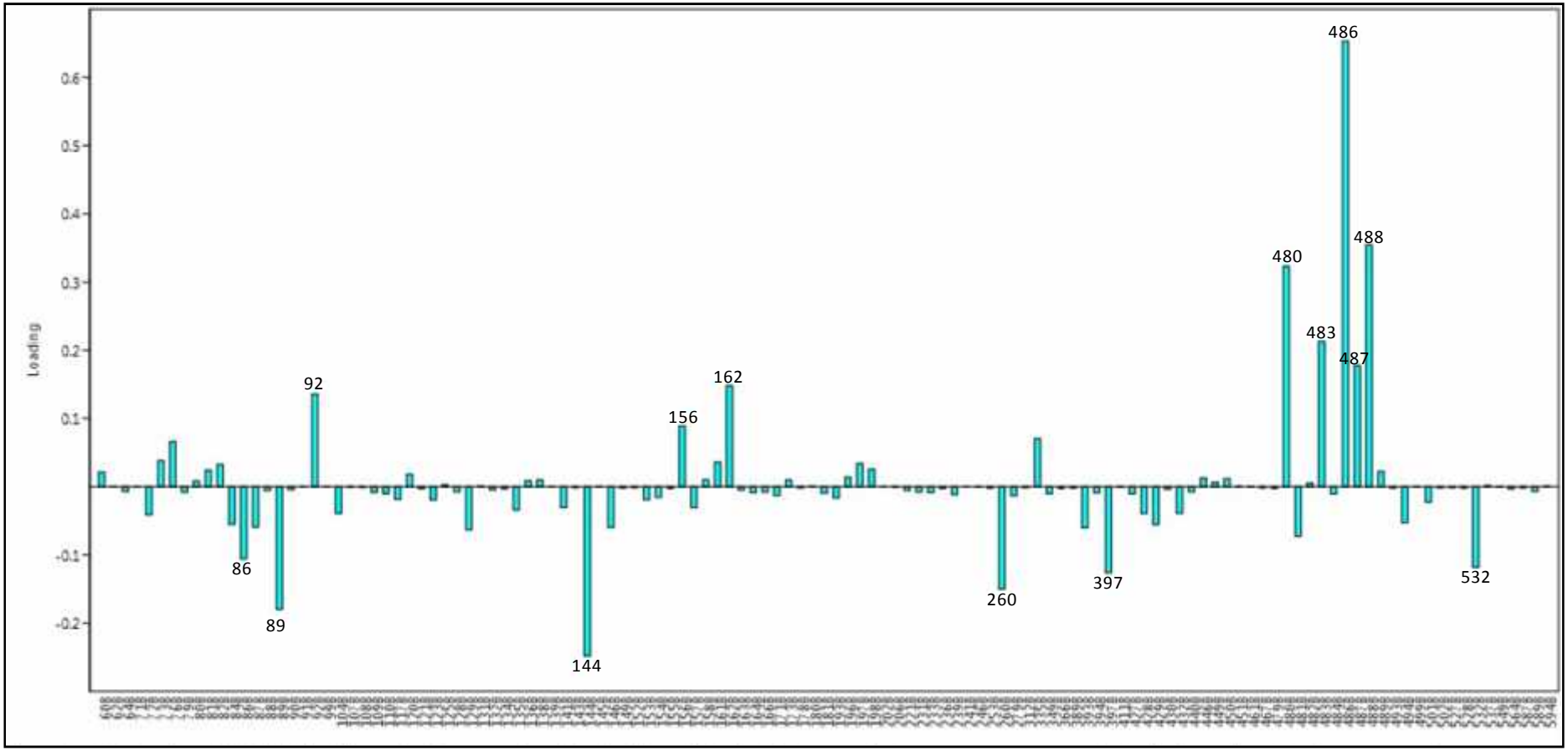


Figura 2.14- Contribución individual de cada OTU en el resultado del análisis de PCA para el primer componente principal. Se resaltan los fragmentos de mayor peso indicando el largo en pares de bases.

2.5 discusión

2.5-1. Efectos benéficos de C119 sobre la implantación de la alfalfa

La alfalfa posee excelentes características como forraje debido a su rendimiento, persistencia y calidad. Para poder aprovechar su potencial es necesario una buena implantación del cultivo. En este trabajo se realizó un ensayo con la finalidad de analizar el efecto de la inoculación con la cepa promotora *P. fluorescens* C119 sobre el crecimiento de la alfalfa en condiciones de campo. Los trabajos sobre aplicación de PGPR en alfalfa han sido realizados mayoritariamente en condiciones controladas, mientras que los ensayos de campo han sido más relegados, debido a la complejidad de los factores que interfieren con el estudio (Xiao et al. 2002; Guiñazú et al. 2009; Villacieros et al. 2003; Younesi et al. 2013; J Handelsman et al. 1990; Setten et al. 2013).

Las semillas de alfalfa fueron inoculadas utilizando una formulación a base de turba de acuerdo trabajos previos (Arias et al. 2009). Los inoculantes a base de turba representan una tecnología conocida en el sector agropecuario, el cual ha adoptado la inoculación de leguminosas con bacterias fijadoras de nitrógeno desde hace varias décadas. A nivel mundial la turba es uno de los soportes más utilizados para las formulaciones de inoculantes, ya que se adecúa a la mayoría de las PGPR (Bashan et al. 2013). La formulación de la cepa C119 en base a turba presenta características esenciales que debe tener un inoculante: i) sostiene el crecimiento del microorganismo, ii) mantiene un número de células viables en buenas condiciones fisiológicas y durante un período de tiempo prolongado y iii) proporciona un número adecuado de células al momento de la bacterización de las semillas (Bashan et al. 2013). Tanto la turba como las semillas inoculadas con la cepa C119 presentaron una densidad de bacterias similar a la reportada por otros autores que también utilizaron inoculantes a base de turba en semillas de alfalfa (Guiñazú et al. 2009).

El efecto biocontrolador sobre patógenos oportunistas que afectan los primeros estadios del desarrollo de la alfalfa no se observó en este ensayo dado que al día 21 no existieron diferencias significativas entre el número de plantas entre los tratamientos. Sin embargo, el número de plantas que germinaron fue bajo para los dos tratamientos. Dado que las condiciones climáticas, con temperaturas moderadas y bajo contenido de humedad, posiblemente no favorecieron el desarrollo de enfermedades, el bajo

porcentaje de germinación pudo estar más vinculado a otros factores ambientales como el pH ácido del suelo y la falta de agua. Posteriormente se observó que el número de plantas del tratamiento con la cepa C119 se mantuvo estable, mientras que en el tratamiento control disminuyó significativamente. Las plantas inoculadas con C119 mostraron, además, un incremento del 40% en la biomasa aérea. Existen varias posibilidades para explicar este efecto benéfico sobre la alfalfa. Por un lado la cepa C119 puede haber aliviado el estrés sufrido por la planta debido a las condiciones ambientales desfavorables, permitiendo que las plantas que lograron germinar, persistieran en mejor estado fisiológico. La mejor persistencia de las plantas inoculadas también pudo deberse a la protección contra patógenos del suelo que afectaron a las plantas debilitadas por otros estreses ambientales. Los factores ambientales a los que estuvo expuesto el ensayo pueden haber incidido en el rendimiento final del cultivo. El ensayo se instaló a fines del mes de marzo de 2012, durante un período de escasas precipitaciones, con un promedio mensual de 62,5mm, para ese período, el cual estuvo por debajo de la media histórica para esa época del año (mediana calculada en el período 1961-1990; fuente INIA-GRAS, ver Anexo 2.4). Por otra parte, el suelo donde se realizó el ensayo presentó un pH de 5, el cual es crítico para el cultivo, y genera una reducción del rendimiento final de aproximadamente 40% (Casanova & Cerveñansky 2004). A pesar de estos factores, el efecto promotor de la cepa C119 sobre la alfalfa fue significativo.

Las PGPRs pueden ofrecer a las plantas hospederas cierta tolerancia frente a diferentes estreses como sequía, heladas, heridas, salinidad, metales tóxicos, ente otros (Grover et al. 2010). Por ejemplo la coinoculación de una cepa de *P. fluorescens* y *R. meliloti* en plantas de alfalfa sometidas a estrés salino severo, aumentó la biomasa vegetal y mejoró la nodulación que había sido completamente inhibida por la concentración de sodio del suelo (Younesi et al. 2013). Otro ejemplo son dos cepas de las especies *P. fluorescens* y *P. putida,* productoras de ACC desaminasa, las cuales pudieron revertir los efectos negativos del estrés hídrico sobre plantas de arveja (Arshad et al. 2008). Las plantas inoculadas presentaban mayor número de chauchas y mejor rendimiento de granos. Un estudio reciente demostró que una cepa de *Phyllobacterium brassicacearum* originalmente aislada de rizósfera de canola, no sólo aliviaba significativamente el estrés hídrico al cual fueron sometidas plantas de *Arabidopsis,* sino que además mejoraba el desarrollo posterior de las plantas, luego que el estatus hídrico era reinstaurado (Bresson et al. 2014). Los autores proponen que la presencia de la cepa *P. brassicacearum* podría estar

modulando de alguna forma los niveles de ácido abscisico en la planta, una hormona involucrada en la regulación de la pérdida de agua por los estomas.

Un ejemplo que involucra a una cepa biocontroladora fue la inoculación de *P. fluorescens* B5 en plantas de remolacha azucarera. Esta cepa fue capaz de proteger a las plantas de los daños causados por *Pythium ultimum* en diferentes tipos de suelos (Schmidt et al. 2004). La textura y el pH del suelo no afectaron la capacidad biocontroladora de la cepa ni siquiera a pH5. La transformación de la cepa salvaje con un transposón conteniendo los genes luxAB y resistencia a tetraciclina permitió monitorear la colonización radicular, la cual alcanzó niveles de 10^7 UFC/g peso fresco luego de 12 días de iniciado el ensayo.

La cepa C119 ha demostrado consistentemente un efecto promotor de la alfalfa en trabajos previos (Yanes et al. 2012; Arias et al. 2009) y en el presente trabajo, ya sea en condiciones controladas como en condiciones de campo. Sin embargo, los mecanismos mediante los cuales ejerce su efecto promotor no son claros. Las pruebas *in vitro* demostraron que la cepa es capaz de solubilizar fósforo inorgánico, y colonizar plantas de alfalfa sin modificar la cinética de nodulación de *S. meliloti.* Los ensayos también mostraron que la cepa no produce acido indolacético en presencia de su precursor Trp (Yanes 2007). En el ensayo de campo del presente trabajo no se observaron diferencias significativas en el contenido de fósforo y nitrógeno entre las plantas inoculadas con C119 y las plantas control luego de cosechadas a los 121 días. Por ende, la solubilización de fósforo precipitado en formas inorgánicas no parece ser el mecanismo involucrado en la promoción del crecimiento de las plantas. Tampoco parece serlo un posible efecto sinérgico entre el rizobio y la *Pseudomonas* que determine una mayor eficiencia de fijación de nitrógeno, al menos en el período evaluado.

2.5–2 Colonización radicular

La capacidad de colonizar agresivamente la rizósfera de la planta hospedera es un requisito fundamental para que una PGPR sea efectiva (Babu 2011). La presencia anticipada en la rizósfera previene del ataque de patógenos oportunistas durante las primeras etapas del desarrollo de la plántula, cuando es más vulnerable (Bagnasco et al. 1998). Las fallas en las estrategias de control biológico de patógenos del suelo muchas veces se correlacionan con una baja colonización radicular del agente antagonista. La cepa

P. fluorescens C119 demostró ser una excelente colonizadora de raíces de alfalfa dado que logró permanecer en las raíces en poblaciones de 10^6-10^7 UFC/g de raíz durante todo el ensayo. Esta densidad está por encima de la cantidad mínima necesaria para que un ACB tenga efecto sobre los fitopatógenos (Raaijmakers et al. 1995).

El monitoreo de las bacterias introducidas artificialmente suele realizarse mediante marcaje por resistencia a antibióticos, aunque existen otras metodologías moleculares y de observación directa (Ahmad et al. 2011; Paulitz 2000). Las metodologías moleculares que incluyen hibridación con sondas de ADN, incorporación de genes reporteros y PCR cuantitativo específicos para el microorganismo a seguir, son de aplicación más reciente (Paulitz 2000). Chapon y colegas (2003) desarrollaron y validaron una técnica para el monitorear la colonización del rizoplano de maíz por la cepa *P. fluorescens* Pf29A. Utilizando un fragmento de RAPD (Amplificación aleatoria de ADN polimórfico) específico para la cepa, desarrollaron cebadores con los cuales cuantificaban las bacterias mediante qPCR. Esta técnica fue más sensible que el recuento de células transformadas con un plásmido conteniendo la proteína verde fluorescente (Gfp) y resistencia a tetraciclina. La cepa C119 se monitoreó por su resistencia intrínseca al ácido nalidíxico y a la ampicilina y su identidad fue confirmada mediante BOX-PCR. Existe la posibilidad de que esta forma de seguimiento haya subestimado el número de bacterias en la raíz, pero tiene la ventaja de que no fue necesario generar mutaciones ni construcciones que agreguen resistencias a antibióticos.

Existen ejemplos de PGPRs exitosas donde la capacidad de promover el crecimiento vegetal en condiciones de campo se correlacionó con una buena persistencia en las raíces de la planta hospedera. La cepa *P. fluorescens* NBRI2650R (mutante resistente a rifampicina) fue capaz de colonizar exitosamente la rizósfera de plantas de garbanzo, promover su crecimiento y el rendimiento en granos. Además fue capaz de persistir hasta la cosecha, 5 meses después de la siembra, en densidades de 10^3-10^5 UFC/g raíz (Nautiyal et al. 2002). El análisis de la dispersión de la bacteria demostró que ésta colonizó plantas ubicadas en surcos de las parcelas control, adyacentes a las parcelas tratadas con la cepa. Siete meses después de la cosecha no se detectó a la bacteria en el suelo cuando se colocaron plantas "trampa" de garbanzo en el mismo sitio donde se había sembrado la primera vez. Otro ejemplo son las cepas solubilizadoras de fósforo *Serratia marcescens* EB 67 y *Pseudomonas* sp. CDB 35 (Hameeda et al. 2008). Dichas cepas se aplicaron sobre semillas de maíz mediante una formulación a base de turba.

Ambas cepas demostraron, en condiciones de campo, que eran capaces de promover el crecimiento del maíz y mejorar el contenido de fósforo y nitrógeno de las plantas a los 96 días post siembra. En este ensayo la densidad poblacional para cada una de las cepas se monitoreó gracias a la resistencia intrínseca a varios antibióticos. Las poblaciones de ambas se mantuvieron entre 10^7 y 10^6 UFC/g suelo rizosférico durante el ensayo, mientras que la población nativa de bacterias solubilizadoras de fóforo en las plantas control no superó las 10^3 UFC/g suelo rizosférico.

El seguimiento de la dinámica poblacional de las PGPRs introducidas en el ambiente es necesario para asegurar que la bacteria benéfica coloniza las raíces de la planta hospedera de manera efectiva y se dispersa lo menos posible hacia otras plantas que no son su blanco de acción principal para evitar efectos indeseados. *P. fluorescens* C119 no sólo fue capaz de colonizar las raíces de alfalfa y perdurar en la rizósfera sino que además no presentó una dispersión apreciable ya que no fue detectada en las plantas control.

2.5–3 Impacto de la inoculación de C119 en la estructura de la comunidad bacteriana de la rizósfera de alfalfa.

El impacto de la inoculación de las PGPR en cultivos de interés agronómico ha sido generalmente analizado en términos del aumento de biomasa vegetal o del efecto biocontrolador sobre patógenos de suelo. Sin embargo, la liberación al ambiente de microorganismos altamente eficientes y capaces de colonizar agresivamente la rizósfera de las plantas podría generar perturbaciones en el equilibrio de las comunidades microbianas del suelo (Trabelsi & Mhamdi 2013). La inoculación masiva con PGPRs podría tener efectos indeseables como la pérdida de microorganismos funcionalmente importantes para sucesivos cultivos. Es de esperar que los cambios en la estructura de la comunidad microbiana debido a la introducción de un microorganismo exógeno sean transitorios y desaparezcan debido a la capacidad de resiliencia de un ecosistema altamente diverso como lo es la rizósfera.

El impacto de la inoculación de la cepa *P. fluorescens* C119 sobre la estructura de la comunidad bacteriana de la rizósfera de alfalfa fue analizado mediante dos estrategias independientes de cultivo DGGE y T-RFLP. Ambas metodología mostraron un efecto marcado en el primer muestreo donde la estructura de la comunidad bacteriana a los 21 días de sembrada la alfalfa fue muy diferente de la observada en etapas posteriores del desarrollo de la planta.

En el primer muestreo, el análisis por T-RFLP mostró diferencias entre la estructura de la comunidad microbiana presente en las plantas tratadas con la cepa C119 y la de las plantas control. Estas diferencias fueron desapareciendo en los muestreos posteriores. En el segundo muestreo los patrones de las comunidades bacterianas de los dos tratamientos fueron similares. Los muestreos 2, 3 y 4 mostraron un corrimiento en los patrones de la comunidad bacteriana, que afectó a ambos tratamientos por igual. Se puede concluir de este análisis que la inoculación de la cepa C119 tiene un efecto transitorio sobre la estructura de la comunidad bacteriana en las primeras etapas del desarrollo de la planta, a pesar de mantenerse en altos recuentos durante todo el ensayo. Los cambios observados a partir del segundo muestreo afectaron por igual a las comunidades de los dos tratamientos y pueden adjudicarse a modificaciones introducidas por las plantas y/o factores ambientales. Por ejemplo, en *A. thaliana* pudo comprobarse que la composición de los exudados radiculares sufre modificaciones a lo largo del desarrollo de la planta y afectan directamente en la capacidad funcional de los microorganismos asociados a las raíz (Chaparro et al. 2013).

Los resultados observados por la técnica de DGGE fueron distintos a los observados por T-RFLP. En este caso no se observaron diferencias entre las comunidades microbianas de las plantas tratadas con C119 y las plantas control. La estructura de la comunidad bacteriana fue modificándose a lo largo del ensayo en igual medida para ambos tratamientos. En el tercer muestreo se observó puntualmente cierta diferencia entre los patrones de bandas que ya no fue observado en el siguiente muestreo.

Los efectos de la inoculación de PGPR sobre la estructura de la comunidad microbiana de la rizósfera de diferentes cultivos han mostrado ser transitorios al igual que se observó para la cepa C119. La inoculación de plantas de cebada con la cepa *Pseudomonas* sp. DSMZ 13134 o con el producto comercial Proradix®, que contiene esta cepa como principio activo, generaba un cambio temporal en la estructura de la comunidad microbiana de la rizósfera (Buddrus-Schiemann et al. 2010). Mediante T-RFLP se pudieron observar diferencias en la estructura de la comunidad bacteriana de las plantas tratadas respecto a las no tratadas durante las primeras tres semanas del ensayo. La colonización radicular del inoculante se monitoreó mediante el marcaje con la proteína verde fluorescente. De esa forma se pudieron observar micro colonias sobre las raíces de las plantas inoculadas, las cuales disminuyeron a partir de la tercera semana y no fueron detectables luego de la semana 4. En un ensayo en condiciones de campo Gao y colaboradores (2012) analizaron el efecto de la introducción de la cepa *P. fluorescens*

2P24 en la rizósfera de plantas de pepino sobre la comunidad de hongos del suelo. Para ello utilizaron dos metodologías T-RFLP y DGGE. Los resultados del T-RFLP fueron variables según la enzima usada para la restricción de las ITS (de: *internal transcribed spacer*) amplificadas. Los resultados del DGGE mostraron que la diversidad de especies fúngicas era alterada al principio del ensayo y que la comunidad de hongos del suelo se recuperaba de a poco hasta que el efecto del inoculante desaparecía en la tercer semana. La presencia de la cepa inoculada en la rizósfera de pepino se monitoreó mediante la introducción de la proteína verde fluorescente. Los recuentos disminuyeron a lo largo del ensayo de 10^8 (densidad del inoculo agregado al suelo) a 10^5 UFC/g de suelo rizosférico, a los 42 días de establecido el ensayo. Por otra parte, los recuentos de hongos cultivables, presentes en el suelo del ensayo, disminuyeron durante tres semanas ante la presencia del inoculante luego de las cuales no se observaron diferencias con la densidad de hongos en el control. Los autores concluyen que el período de validez del inoculante podría ser menor a un mes, sin embargo el efecto se observó sobre toda la comunidad de hongos del suelo, por lo cual no se pueden descartar posibles efectos sobre algunas especies de hongos.

Las metodologías para el análisis de comunidades microbinanas T-RFLP y DGGE, están basadas en una reacción de PCR lo cual puede introducir sesgos en los resultados si se amplifican las especies más dominantes de la muestra. Estudios mediante pirosecuenciación de amplicones del gen 16S ARNr han demostrado que los productos de menor tamaño brindan una mejor estimación de la riqueza en especies. Por otra parte, la selección de los cebadores afecta la estimación de la homogeneidad de especies (Engelbrektson et al. 2010). Para el análisis por DGGE se utilizaron cebadores que amplifican un fragmento de 430pb e incluyen las regiones V6 a V8, mientras que el PCR para el análisis de T-RFLP se amplificó un fragmento más extenso de 1350pb. La diferencia de cebadores entre las dos técnicas puede dificultar la comparación entre los resultados obtenidos con ambas. Otros factores que introducen desvíos en los resultados son el método de extracción del ADN, la temperatura de desnaturalización, la taq polimerasa y la enzima de restricción utilizada (éste último en el T-RFLP). Sin embargo, ambas técnicas son excelentes herramientas para la comparación entre poblaciones microbianas (Kirk et al. 2004).

2.6 conclusiones y perspectivas

La cepa *P. fluorescens* C119 se perfila como una excelente candidata para la formulación de un inoculante con propiedades promotoras del crecimiento vegetal. La cepa fue capaz de promover el crecimiento de la alfalfa aún cuando las condiciones ambientales no fueron las más apropiadas para el cultivo. La formulación a base de turba parece ser una buena estrategia para introducir a la cepa C119 en la rizósfera de la alfalfa. Los recuentos en la turba fueron altos y persistentes. La densidad de bacterias adheridas a las semillas inoculadas permitió que la cepa colonizara exitosamente la rizósfera de alfalfa y se mantuviera en altos recuentos. En comparación con las plantas control, inoculadas únicamente con el rizobio comercial, las plantas tratadas con la cepa C119 presentaron un aumento del 40 % en la biomasa aérea. Por otra parte, a pesar de persistir en las raíces de alfalfa en recuentos de 10^6 UFC/g raíz, el impacto que tuvo la presencia de la cepa sobre la estructura de la comunidad bacteriana de la raíz fue transitorio, generando una distorsión en las primeras semanas del cultivo. La cepa C119 no afecta a largo plazo la comunidad bacteriana del suelo y no se dispersó afectando a plantas no inoculadas.

El presente trabajo se enfocó en el estudio del efecto promotor de la cepa C119 durante la implantación de la alfalfa. Sin embargo, sería interesante analizar el efecto promotor sobre esta leguminosa de gran persistencia durante un período más prolongado. De esta forma sería posible determinar el rendimiento del cultivo en las condiciones en que es utilizada en el sector agropecuario, comparando los rendimientos en forraje con cada corte. También sería interesante analizar la persistencia de la cepa en las raíces de alfalfa a largo plazo y el efecto sobre la comunidad de hongos del suelo rizosférico.

capítulo 3

3.1 introducción

3.1-1 ANTIBIÓTICOS: diversidad de metabolitos antimicrobianos producidos por *Pseudomonas* spp.

Los primeros estudios de supresión de patógenos vegetales por bacterias antagonistas estaban enfocados en la capacidad de éstas de producir sideróforos que competían eficientemente por el hierro de manera que el patógeno quedara desprovisto de este nutriente (Kloepper et al. 1980). Sin embargo, en los últimos 30 años se ha demostrado inequívocamente que otros metabolitos secundarios tales como antibióticos, enzimas y compuestos volátiles, tienen un rol importante en el control de patógenos (Weller 2007). Hoy en día se sabe, además, que en los distintos nichos ecológicos, la presencia de antibióticos en concentraciones sub inhibitorias cumple una función importante en la comunicación entre células, actuando como moléculas señal (Romero et al. 2012).

Dentro de las bacterias antagonistas capaces de inhibir el crecimiento de patógenos vegetales, las *Pseudomonas* fluorescentes han sido ampliamente caracterizadas, observándose que la mayoría de ellas son capaces de sintetizar uno o más antibióticos (Weller 2007). Los principales antibióticos producidos por *Pseudomonas* spp. han sido completamente caracterizados en su estructura como también en sus vías de biosíntesis y regulación. Entre ellos se destacan las fenazinas y sus derivados, 2,4-diacetilfloroglucinol, pirrolnitrina, pioluteorina y lipopéptidos cíclicos.

Fenazinas

Las fenazinas son compuestos heterocíclicos nitrogenados pigmentados, producidos por varios géneros microbianos como *Pseudomonas, Brevibacterium, Burkholderia y Streptomyces*, entre otros (Mavrodi et al. 2006). Se han descrito más de 80 compuestos fenazínicos naturales, pudiendo un mismo microorganismo producir hasta 10 de ellos (Dwivedi & Johri 2003). Los compuestos fenazínicos presentan un gran espectro de actividad contra bacterias, hongos y parásitos. Su modo de acción se basa en su capacidad redox ya que pueden aceptar electrones a partir de agentes reductores y

traspasarlos generando especies reactivas del oxígeno en el organismo blanco. Se requieren 5 enzimas para transformar al corismato en piocianina (PCA) o ácido fenazin-1,6-dicarboxílico(PDC), las cuales se encuentran codificadas en un operón junto a genes implicados en la regulación de su expresión, transporte y resistencia (Mavrodi et al. 2013). Las fenazinas descriptas en *Pseudomonas* spp. son capaces de inhibir patógenos como *F. oxysporum*, *Pythium* spp., *Rhizoctonia solani*, *Giberella avenacea*, *Alternaria* spp. y *Drechslera gramínea* (Mavrodi et al. 2006).

Diacetilfloroglucinol

Otro de los antibióticos más estudiados en *Pseudomonas* fluorescentes es el 2-4-Diacetilfluoroglucinol (Phl). La producción de este compuesto poliquétido por *Pseudomonas* rizosféricas es la responsable de la supresividad de diversas enfermedades tales como la podredumbre negra de raíz del tabaco (Keel et al. 1996) y el *take-all* del trigo (Raaijmakers & Weller 1998). Su espectro de acción inhibitoria es muy amplio y abarca bacterias, hongos, oomicetes y nematodos. Estudios recientes en *Saccharomyces cerevisiae* aportaron evidencias del modo de acción del Phl, el cual actuaría como ionóforo de protones interrumpiendo el gradiente de protones en la membrana mitocondrial, lo cual explica su amplio espectro de acción en diversos eucariotas (Gleeson et al. 2010; Troppens et al. 2013). Este antibiótico también es capaz de causar daño en la membrana externa de *Pythium spp*. y en las zoosporas del oomicete (de Souza et al. 2003).

Pirrolnitrina y pioluteorina

Los antibióticos pirrolnitrina y pioluteorina también han sido caracterizados en *Pseudomonas spp*. El primero es un fenilpirrol clorinado que se sintetiza a partir de L-triptófano y cuyo modo de acción involucra la inhibición de la cadena respiratoria en hongos. Dada su fuerte actividad antifúngica se ha utilizado tanto para desarrollar antimicóticos de uso humano como fungicidas de aplicación agronómica (Gross & Loper 2009). El operón de síntesis está conformado por cuatro genes que codifican para enzimas responsables de la transformación de L-triptófano en pirrolnitrina y están muy conservados en *P. fluorescens.* Por su parte la pioluteorina, cuya composición química consiste en un anillo resorcinol unido a un motivo pirrol diclorinado, tiene actividad tóxica principalmente contra oomicetes y algunos hongos y bacterias, pero su modo de acción no ha sido esclarecido aún. Es de síntesis mixta, por un lado

el anillo resorcinol es sitetizado mediante una poliquétido sintasa, mientras el dicloropirrol es sintetizado a partir de L-prolina reconocida por una enzima de tipo sintetasa de péptidos no ribosomales. El operón biosintético contiene un total de 17 genes e incluye genes de trasporte y regulación (Kirner et al. 1998).

Ácido cianhídrico

Las *Pseudomonas* fluorescentes son capaces de sintetizar compuestos antimicrobianos volátiles. Su radio de acción es mayor al de los antibióticos difusibles. El ácido cianhídrico (HCN) ha sido el más estudiado y está comúnmente presente en *Pseudomonas* del suelo (Gross & Loper 2009). Es un fuerte inhibidor de metaloenzimas tales como la citocromo oxidasa, por lo cual resulta tóxico para la mayoría de los organismos (Blumer & Haas 2000). Su producción en el entorno de la rizósfera contribuye al control de patógenos. El compuesto es sintetizado mediante un complejo HCN sintasa, codificado en tres genes estructurales *hcnABC*, a partir de glicina. El operón está muy conservado entre las *Pseudomonas* cianogénicas (Loper & Gross 2007), no así su contexto génico el cual difiere entre las distintas especies. Los genes de síntesis de HCN también se han reportado en *Chromobacterium violaceum* y varias especies de *Burkholderia.* Un ejemplo de control biológico mediante este mecanismo es el de la cepa *P. fluorescens* CHA0 cuya capacidad de producir HCN ayuda en el control de la podredumbre negra de raíz de tabaco causada por *Thielaviopsis.* Existen reportes de *Pseudomonas* capaces de inhibir el crecimiento de hongos patógenos mediante compuestos volátiles diferentes al HCN. En muchos casos dichos compuestos no fueron identificados (Fernando et al. 2005; Trivedi et al. 2008; Weisskopf, 2013). En otros casos pudo detectarse la presencia de undeceno, undecadieno y benzil-oxi-benzonitrilo (Kai et al. 2007), nonanal, benzotiazol y 2-etil-1-hexanol (Athukorala et al. 2010).

Bacteriocinas

Las *Pseudomonas*, al igual que otros géneros bacterianos, son capaces de producir bacteriocinas. Estas son péptidos antimicrobianos heterogéneos, de síntesis ribosomal, con efecto sobre especies relacionadas con la cepa productora (Montesinos 2007). Esta última generalmente presenta inmunidad específica contra la bacteriocina. Las bacteriocinas de bacterias Gram negativas pueden ser péptidos pequeños, como por ejemplo las microcinas, o proteínas más grandes como la colicina. Existen ejemplos

de bacteriocinas grandes producidas por bacterias asociadas a plantas, capaces de inhibir bacterias patógenas vegetales (Pham et al., 2004; Parret et al., 2005), mientras que las bacteriocinas más pequeñas no han sido probadas.

Biosurfactantes

Otro grupo de metabolitos secundarios muy distribuidos entre las *Pseudomonas* fluorescentes son los biosurfactantes. Estos compuestos son de naturaleza anfipática, lo cual les permite adsorberse sobre una interfase y modificar las condiciones de la misma. Se clasifican en surfactantes de alto y bajo peso molecular. Dentro de los surfactantes de alto peso molecular encontramos polisacáridos, proteínas, lipopolisacáridos, y lipoproteínas, los cuales son capaces de unirse fuertemente a superficies. Los surfactantes de bajo peso molecular son los lipopéptidos y glicolípidos, los cuales disminuyen la tensión superficial entre dos fases (Rosenberg & Ron 1999). Dada la enorme variedad estructural de los biosurfactantes, la gama de funciones naturales en la interacción microorganismo-planta es muy amplia y van desde la patogénesis hasta el control biológico de patógenos, como se verá a continuación.

3.1-2 Biosurfactantes microbianos: ramnolípidos y lipopéptidos

Los biosurfactantes son producidos por diversos microorganismos incluyendo bacterias, hongos y levaduras (Ron & Rosenberg 2001). Las bacterias productoras de biosurfactantes están presentes en una gran variedad de ambientes que incluyen suelo (Bodour et al., 2003), ambientes marinos (Satpute et al., 2010), aguas residuales (Yin et al. 2009), sistemas hidropónicos (Hultberg et al., 2009), tejido pulmonar humano y superficies vegetales (Souza et al., 2003; Yanes et al., 2012). Esto pone en evidencia la gran importancia que tienen estos compuestos en el funcionamiento y la sobrevivencia del microorganismo productor. Los ramnolípidos son muy diversos y básicamente están compuestos por ácidos grasos unidos a mono o di ramnosas mediante un enlace β- glicosídico (Vatsa et al. 2010). Los lipopéptidos están compuestos por una cadena lipídica unida a un oligopéptido corto que puede ser lineal o cíclico (Raaijmakers et al. 2006).

Los surfactantes microbianos han sido ampliamente investigados por su potencial aplicación industrial y medioambiental. Se han utilizado con diversas finalidades tales como biorremediación de

contaminantes orgánicos e inorgánicos en suelos y agua y en la industria petrolera para favorecer la recuperación de crudo de los reservorios. Otras aplicaciones industriales incluyen su uso como aditivos de comidas, cosméticos y detergentes (Tabla 3.1). También han tenido importantes aplicaciones médicas debido a sus propiedades antimicrobianas, citotóxicas, antitumorales, inmunosupresoras e inhibidoras de la adhesión de patógenos (Banat et al. 2010).

Tabla 3.1. Ejemplos de microorganismos productores de surfactantes y potenciales aplicaciones

Organismo	Tipo de biosurfactante	Aplicaciones potenciales	Referencia
Rhodococcus erythropolis 3C-9	Glucolípido y trehalosa-lípido	Limpieza de derrame de crudo	(Peng et al. 2007)
Pseudozyma siamensis CBS 9960	lípidos de manosil-eritritol	Biosurfactante de levadura con diversos usos	(Morita et al. 2008)
Pseudomonas libanensis M9-3	Lipopéptido	Aplicaciones ambientales y médicas	(Saini et al. 2008)
Rhodococcus sp. TW53	Lipopéptido	Biorremediación	(Peng et al. 2008)
Pseudozyma hubeiensis	Glicolípido	Biorremediación	(Fukuoka et al. 2008)
R. wratislaviensis BN38	Glicolípido	Biorremediación	(Tuleva et al. 2008)
Bacillus subtilis BS5	Lipopéptido	Biorremediación	(Abdel-Mawgoud et al. 2008)
Azotobacter chroococcum	Lipopéptido	Aplicaciones ambientales	(Thavasi et al. 2009)
Pseudomonas aeruginosa BS20	Ramnolípido	Biorremediación	(Abdel-Mawgoud et al. 2009)
Micrococcus luteus BN56	Trehalosa tetraéster	Biorremediación	(Tuleva et al. 2009)
Bacillus subtilis HOB2	Lipopéptido	Recuperación de crudo, biorremediación e industria alimentaria	(Haddad et al. 2009)
Pseudomonas aeruginosa UFPEDA 614	Ramnolípido	Biorremediación.	(Camilios Neto et al. 2009)
Nocardiopsis alba MSA10	Lipopéptido	Biorremediación	(Gandhimathi et al. 2009)
Pseudoxanthomonas sp. PNK-04	Ramnolípido	Aplicaciones ambientales	(Nayak et al. 2009)
Pseudozyma parantarctica	Manosil manitol lípido	Emulsionante/ detergente	(Morita et al. 2009)
Pseudomonas alcaligenes	Ramnolípido	Aplicaciones ambientales	(Oliveira et al. 2009)
Pseudomonas koreensis	Lipopéptido	Agente de biocontrol	(Hultberg et al. 2009)
Pseudomonas fluorescens BD5	Lipopéptido	Biorremediación ybiomedicina	(Janek et al. 2010)
Candida bombicola	Soforolípidos	Aplicaciones ambientales	(Daverey & Pakshirajan 2010)
Brevibacterium aureumMSA13	Lipopéptido	Biorremediación en ambientes acuáticos	(Seghal Kiran et al. 2010)
Nocardiopsis lucentensis MSA04	Glicolípido	Biorremediación	(Kiran et al. 2010)
Bacillus velezensis H3	Lipopéptido	Producción industrial de Lipopéptido	(Liu et al. 2010)
Calyptogena soyoae	Manosil eritritol lípido	Biorremediación	(Konishi et al. 2010)

Adaptado de Makkar et al. 2011

La función natural de los surfactantes es difícil de determinar dada la gran diversidad en la estructura química, en las propiedades de adhesión, y en los microorganismos productores. Esto hace suponer que dichos compuestos cumplen en el organismo productor funciones muy diversas.

Los ramnolípidos podrían tener una importante función como factores de virulencia durante la patogénesis de *Pseudomonas aeruginosa*, un patógeno oportunista humano. Su síntesis está regulada por mecanismos de sensado poblacional o *quorum sensing*, que también participan en la regulación de la mayoría de los factores de virulencia producidos por esta bacteria (Soberón-Chávez et al. 2005). El mecanismo de sensado poblacional permite que los microorganismos patógenos productores de surfactantes lo sinteticen cuando se encuentran en densidades poblacionales suficientemente altas como para causar daño en el organismo blanco (Sullivan 1998).

Los lipopéptidos producidos principalmente por *Pseudomonas* y *Bacillus* poseen una fuerte actividad lítica e inhibitoria del crecimiento de una gran variedad de microorganismos incluyendo virus, micoplasmas, bacterias, hongos y oomicetes, por lo cual los microorganismos productores presentarían una fuerte ventaja en la competencia por un nicho ecológico (Raaijmakers et al. 2010). El efecto antimicrobiano también se ha reportado para algunos ramnolípidos (Vatsa et al. 2010).

Existen muchos reportes de lipopéptidos antimicrobianos, pero se conoce poco acerca de sus efectos sobre el organismo blanco. Se han observado efectos sobre la morfología y fisiología de células fúngicas, por ejemplo la presencia de surfactina, producida por *B. licheniformis* en una concentración de 1mM causa el hinchamiento de las hifas y la inhibición del crecimiento de *Magnaporte grisea* (Tendulkar et al. 2007). En *Rhizoctonia solani* se vieron modificaciones similares cuando el hongo era enfrentado al lipopéptido tensina obtenido de la cepa *P. fluorescens* 96.578. Además se observó un aumento en las ramificaciones de las hifas y crecimiento en forma de roseta, acompañado de disminución de la actividad esterasa y actividad mitocondrial, cambios organizacionales en la mitocondria y disminución del pH intracelular y de la hidrofobicidad de las hifas (Nielsen et al. 2000; Thrane et al. 2000)

En oomicetes de los géneros *Phytium* y *Phytophtora* se ha observado además del aumento en la ramificación y volumen de las hifas, un rápido efecto lítico sobre las zoosporas (Figura 3.1) (van de Mortel et al. 2009)

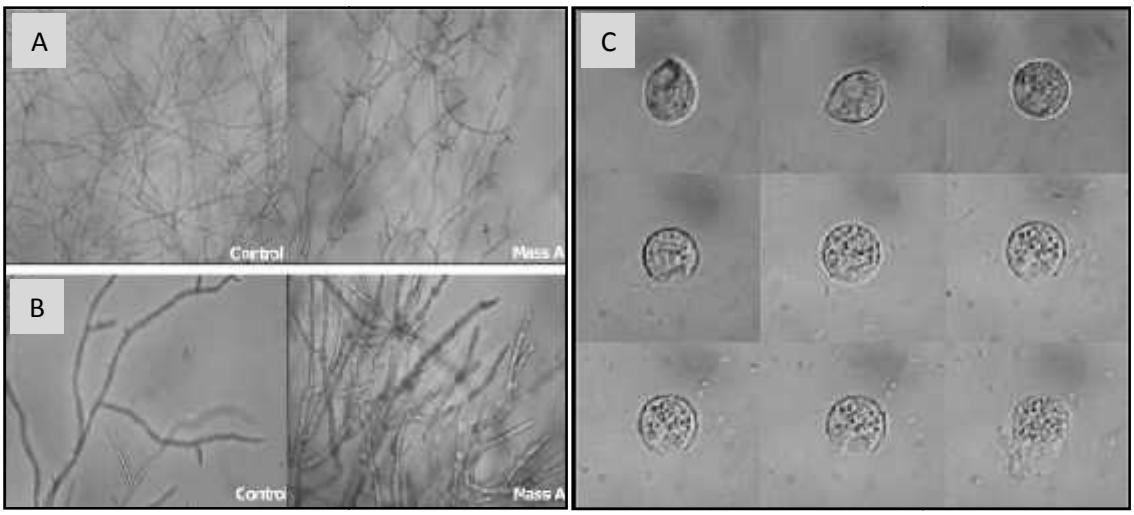


Figura 3.1- Efecto de la presencia de lipopéptidos sobre hifas y zoosporas de *Phytophthora infestans.* Imagen al microscopio del hifas de *P. infestans* crecidos en ausencia (control) y presencia de 500µg/ml (A) y 100µg/ml (B) de masetolide A (Mass A). En la foto B se puede apreciar hinchazón de las hifas. El aumento aplicado fue de 100X (A) y 200X (B). Instantáneas obtenidas de microfilmación de zoosporas de *P. infestans* expuestas a viscosina. La secuencia de imágenes va de arriba a la izquierda hasta abajo a la derecha con una magnificación de 400X. Fotografías tomadas de van de Mortel et al., 2009a y de Bruijn & Raaijmakers, 2009.

3.1–2.1 Biosíntesis de lipopéptidos cíclicos

Los lipopéptidos cíclicos son un ejemplo de compuestos sintetizados por complejos multi-enzimáticos llamados sintetasas de péptidos no ribosomales (NRPS del inglés *nonribosomal peptide synthetases*) las cuales son independientes del ARN mensajero. En contraste con la síntesis ribosomal de péptidos, que se limitan a utilizar como sustrato a los 21 aminoácidos proteinogénicos, las NRPS son capaces de incorporar también aminoácidos no proteinogénicos como por ejemplo aminoácidos hidroxilados y N –metilados (Mootz et al. 2002). Existe la hipótesis de que los compuestos sintetizados de esta forma adquieren protección frente a la acción de proteasas dependientes de ubiquitina (Hashizume & Nishimura 2008).

Las NRPSs presentan una organización modular y generalmente existe coincidencia entre el número y orden de los módulos con el número y la secuencia de aminoácidos en el péptido resultante, lo cual se denomina "regla de colinealidad" (Figura 3.2). Cada módulo de una NRPS contiene al menos tres dominios necesarios para un ciclo de elongación completo de un aminoácido: el dominio de adenilación (dominio A), el dominio de tiolación (dominio T ó PCP: *peptidyl carrier protein domain*) y el de condensación (dominio C). El dominio A es responsable de seleccionar un aminoácido específico y activarlo por formación de un intermediario adenilado, lo cual requiere consumo de ATP. Posteriormente, el aminoacil-AMP se transfiere al dominio tiol de un cofactor 4'-fosfopanteteína ligado a la PCP. Como resultado se forma un enlace tioéster rico en energía que puede ser aprovechado luego por el dominio C para dirigir el ataque nucleofílico sobre el grupo amino alfa libre y elongar la cadena naciente. La PCP y su cofactor sirven de "brazo articulado" que permite el transporte de los intermediarios hacia los centros catalíticos adyacentes de la multienzima (Figura 3.3) (Mootz et al. 2002).

Además de los tres dominios básicos mencionados, pueden existir dominios adicionales que generan modificaciones en los residuos incorporados tales como dominios metiltransferasa (MT), dominios responsables de la N-metilación, dominios de ciclación (CY) que catalizan la formación de anillos heterocíclicos, dominios reductasas (R) que cambian el estado de oxidación de los átomos y dominios de epimerización (E), que permiten convertir el L-aminoácido en su correspondiente configuración D. Los dominios de epimerización no están presentes en las NRPS de lipopéptidos cíclicos de *Pseudomonas,* sin embargo dichos compuestos se caracterizan por presentar aminoácidos en su configuración D. La generación de los estereoisómeros se realizaría mediante la acción de dominios de condensación con actividad dual (condensación/epimerización), los cuales actuarían sobre el aminoácido que le antecede en la cadena peptídica.

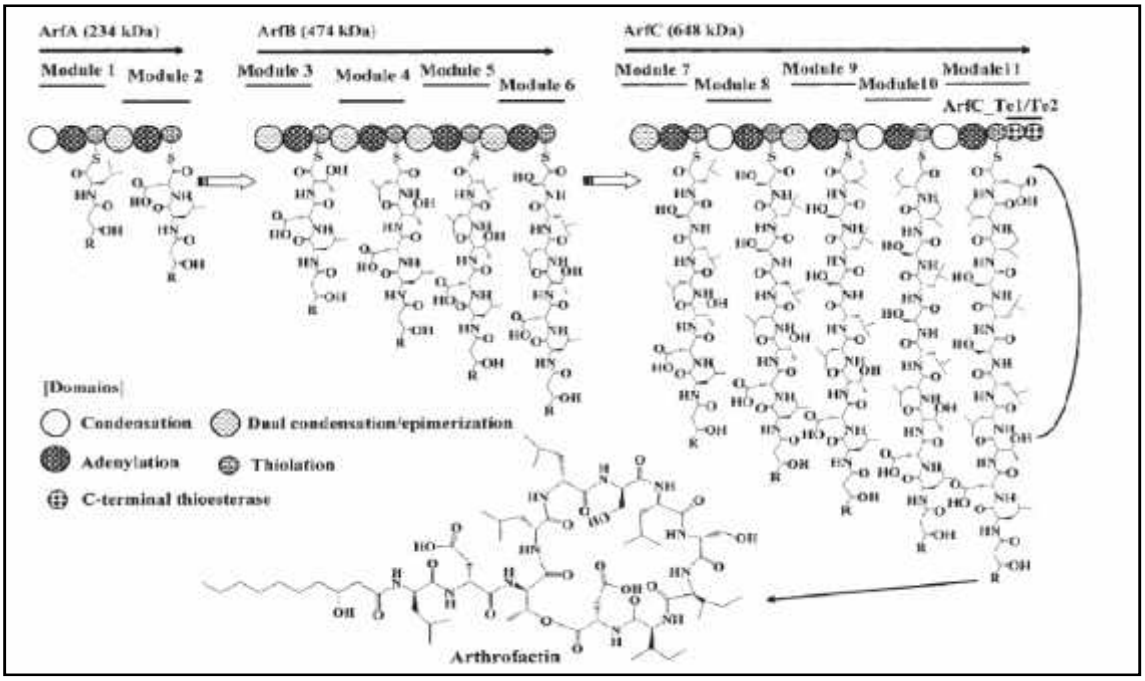


Figura 3.2- Esquema de la síntesis no ribosomal de la artrofactina. El complejo multienzimático consiste en once módulos los cuales incorporan once aminoácidos específicos que componen el motivo peptídico. Se requiere de la participación de 33 módulos (11 de cada tipo C, A y PCP) y dos dominios TE al final de la línea de ensamblaje necesarios para la liberación del péptido y su ciclación (Roongsawang et al. 2007).

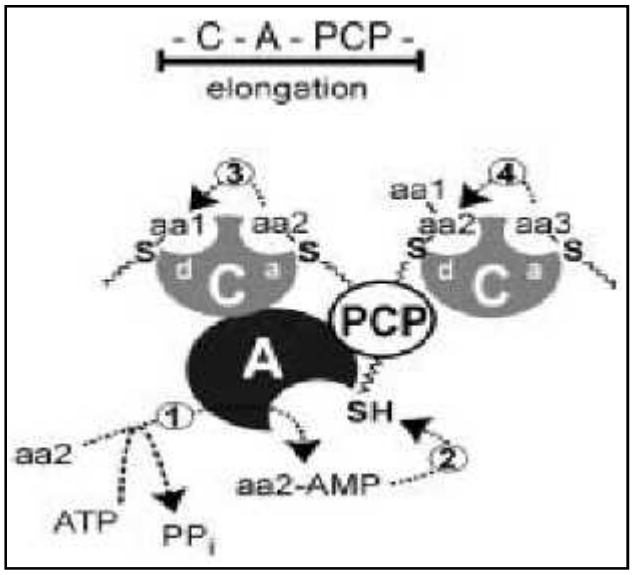


Figura 3.3- Organización de dominios dentro de un módulo de elongación de una NRPS. El módulo está compuesto por dominios C, A, y PCP. 1) El dominio A selecciona un aminoácido específico de la mezcla de aminoácidos disponibles y cataliza la formación del intermediario adenilado (con el consumo de una molécula de ATP). 2) El intermediario activado es transferido a un grupo tiol del grupo prostético de la PCP. 3) Este enlace facilita el movimiento del intermediario hacia la posición (a) aceptora del siguiente dominio C, donde se genera un enlace peptídico con un aminoacil ó un grupo peptidil del PCP anterior. 4) El ciclo termina en la posición dadora (d) del dominio C del siguiente módulo, donde PCP es desacilado y la cadena en crecimiento traslocada al siguiente módulo. El grupo prostético es representado con líneas en zigzag. (tomado de Mootz et al., 2010).

Luego de alcanzada la longitud específica de la cadena peptídica, es necesario romper la última unión tioéster ente el péptido y la PCP, lo cual es realizado por un dominio tioesterasa terminal (TE) que finaliza la cadena de montaje. Este dominio cataliza la liberación del producto mediante hidrólisis y muchas veces realiza la ciclación del producto. Las NRPS responsables de la síntesis de LPC en *Pseudomonas* spp. se caracterizan por presentar dos dominios TE en tándem que se clasifican en tipo I y tipo II. Los TE-I son responsable de escisión del péptido terminado, mientras que los TE-II podrían estar involucrados en la remoción de péptidos truncos unidos a la 4'-fosfopantetenína para regenerar la PCP y dejarla disponible. Los TE-II interactúan con los TE-I y poseen un fuerte impacto en la eficacia de la maquinaria biosintética. Los mutantes nulos para TE-II de artrofactina mostraron una disminución del 95% en la síntesis del LPC mientras que los mutantes en TE-I no eran capaces de producirlos (Roongsawang et al. 2007).

3.1-3 Descubrimiento de nuevos antibióticos: abordaje bioinformático

En la actualidad existe una disponibilidad sin precedentes de secuencias completas de genomas de una amplia variedad de microorganismos, lo cual ha proporcionado un avance significativo en la comprensión de la evolución, la ecología, la patogenicidad y la fisiología microbiana (de Bruijn et al. 2007). Este fenómeno se debe a importantes avances en las herramientas de secuenciación masiva, las cuales son muy exactas, rápidas y accesibles. Existen más de 4400 secuencias de genomas bacterianos disponibles, cubriendo cientos de especies y múltiples cepas de la misma especie (NBCI: *National Center for Biotechnology Information:* http://www.ncbi.nlm.nih.gov). Se han secuenciado un gran número de genomas de bacterias patógenas debido a intereses médicos y agronómicos, mientras que la proporción de genomas provenientes de bacterias benéficas es bastante menor.

Las *Pseudomonas* spp. fueron introducidas en la era genómica con la secuenciación del genoma completo de la cepa *P. aeruginosa* PA01 (Stover et al. 2000). Desde ese entonces ha habido una aceleración en todos los aspectos relacionados con la investigación de la biología de este género microbiano, incluyendo el metabolismo secundario. Para el género *Pseudomonas*, existen actualmente

unos 168 genomas completos secuenciados que se hallan disponibles en bases de datos públicas (NCBI y *Pseudomonas Genome Database:* http://pseudomonas.com) de las cuales 28 pertenecen a la especie *P. fluorescens* y dos a *P. protegens*.

Tabla 3.2. Datos generales de genomas secuenciados de cepas de *Pseudomonas* spp. referentes en el área del control biológico de fitopatógenos.

Organismo	Plásmidos	Tamaño(Mb)	GC%	Genes	Proteínas	Referencia
Pseudomonas fluorescens Pf0-1	-	6,44	60,5	5829	5722	(Silby et al. 2009)
Pseudomonas fluorescens A506	1	6,02	59,9	5495	5334	(Loper et al. 2012)
Pseudomonas fluorescens F113	-	6,85	60,8	5962	5862	(Redondo-Nieto et al. 2012)
Pseudomonas fluorescens SBW25	1	7,15	60,1	6584	6395	(Silby et al. 2009)
Pseudomonas protegens Pf-5	-	7,07	63,4	6273	6108	(Paulsen et al. 2005)
Pseudomonas protegens CHA0	-	6,87	63,4	6199	6115	(Schuldes, et al 2013)

El desarrollo de herramientas informáticas poderosas simultáneamente con la generación de enorme cantidades de información genómica, dio lugar a una fructífera interacción entre tecnología computacional y biología molecular, con lo cual posteriormente han podido analizarse genomas completos. Esto fue de gran ayuda en la búsqueda de nuevas drogas como también blancos terapéuticos. Esta minería de los genomas dirigida a encontrar metabolitos secundarios, permite encontrar nuevos genes responsables de la síntesis de péptidos no ribosomales (NRP), poliquétidos (PK) y terpenoides (Van Lanen & Shen 2006). De esta forma se pudo observar que muchos de los microorganismos analizados presentaban en sus genomas un número mayor de genes que codifican para rutas biosintéticas de metabolitos secundarios, que los metabolitos conocidos para ese microorganismo (Challis, 2008).

Un ejemplo es el análisis del genoma de la cepa biocontroladora *P. protegens* Pf-5 (ex *P. fluorescens*) (Paulsen et al. 2005). Mediante herramientas bioinformáticas se determinó que el 5,7% del genoma de la cepa estaba dedicado al metabolismo secundario. Se pudieron identificar cuatro operones

involucrados en la síntesis de antibióticos anteriormente caracterizados en dicha cepa: dos poliquétidos, pioluteorina y 2,4-diacetilfloroglucinol, pirrolnitrina y HCN. Además se encontró un gran operón de 102Kb que codificaba para un producto no descripto aún en la cepa y que contenía sintasas de poliquétidos (PKS) y NRPS entre otros. También se identificó un operón de 42Kb, que codificaría para tres NRPSs, las cuales estaban involucradas en la síntesis de un lipopéptido cíclico que denominaron orfamida (Gross et al. 2007).

El proceso de purificación, análisis estructural y funcional de los metabolitos antifúngicos ha sido por años la forma convencional de analizar estos compuestos. Hoy en día, la secuenciación masiva y la bioinformática permiten acceder rápidamente a nuevos compuestos. Sin embargo, el enfoque clásico sigue siendo necesario para confirmar y ensayar las propiedades de los nuevos metabolitos.

3.1-4 Herramientas informáticas aplicadas a la minería genómica

Los metabolitos secundarios bacterianos del tipo poliquetidos (PKs) y péptidos no ribosomales (NRPs) son de gran complejidad y diversidad estructural, por lo cual resultan una fuente de nuevas drogas y productos que pueden ser aplicados en todas las áreas terapéuticas y en la industria. Debido al gran interés que generan estos compuestos, se han desarrollado excelentes herramientas informáticas para la minería *in silico* de datos de secuencias tanto genómicas como metagenómicas. Estas herramientas son capaces de identificar las vías biosintéticas codificadas en una secuencia de ADN y predecir el correspondiente producto natural (Boddy 2014). Muchas de estas herramientas son de acceso libre y pueden encontrarse en la red. Para la identificación de los genes biosintéticos de PKs y NRPs existen diferentes estrategias. Una es comparar las secuencias traducidas *in silico* con proteínas ortólogas que uno esperaría encontrar en la vía biosintética. Para ello se utilizan dominios quetosintasas (para Pks) y de adenilación o condensación (para NRPs). Una forma más eficiente es utilizar “modelos escondidos de Markov” (HMM), que son modelos generados estadísticamente a partir de múltiples secuencias y han sido incorporados en muchas herramientas de búsqueda (Tabla 3.3). Mediante el análisis informático es posible predecir con certeza la función de un dominio catalítico en las vías biosintéticas de las PKs o

NRPs. A medida que se han ido caracterizando los dominios, la exactitud del análisis ha mejorado. Por ejemplo, los dominios de adenilación de las NRPSs presentan selectividad de sustratos, con lo cual seleccionan el aminoácido correcto a incorporar en el péptido durante el ensamblaje.

Tabla 3.3. Programas informáticos disponibles para la búsqueda de genes que codifican para metabolitos secundarios en secuencias de ADN

Herramienta	sec. Identificada	dirección web	acceso libre	Referencia
antiSMASH	NRPS/PKS	http://antismash.secondarymetabolites.org	Si	(Medema et al. 2011)
NP.searcher	NRPS/PKS	http://dna.sherman.lsi.umich.edu	Si	(Li et al.,2009)
NRPSpredictor2	NRPS	http://nrps.informatik.uni-tuebingen.de	Si	(Röttig et al. 2011)
NaP- DoS	NRPS/PKS	http://napdos.ucsd.edu	Si	(Ziemert et al. 2012)
PKMiner	PKs tipo II	http://pks.kaist.ac.kr/pkminer	Si	(Kim & Yi 2012)
SBSPKS	NRPS/PKS	http://www.nii.ac.in/~pksdb/sbspks/master.html	Si	(Ansari, et al., 2004)
SMURF	NRPS/PKS (hongos)	http://jcvi.org/smurf/index.php	No	(Khaldi et al. 2011)
CLUSEAN	NRPS/PKS	Descargable en https://bitbucket.org/antismash/clusean	Si	(Weber et al. 2009)
ClustScan	NRPS/PKS	http://bioserv.pbf.hr/cms/index.php?page=clustscan	No	(Starcevic et al. 2008)

La caracterización estructural de los dominios de adenilación, permitió determinar aquellos aminoácidos claves, ubicados en el bolsillo de unión al sustrato e involucrados en la selectividad. En base a eso se han construido modelos predictivos capaces de determinar con un gran nivel de confianza la secuencia aminoacídica que sintetizaría una NRPS (Challis et al., 2000). La predicción de la secuencia de aminoácidos se basa en la "regla de colinealidad" mencionada anteriormente, la cual es válida para la gran mayoría de los casos. La configuración estereoquímica de los aminoácidos también es predecible con gran exactitud en los casos donde las NRPS presentan dominios de epimerización. Sin embargo el análisis bioinformático tiene limitaciones a la hora de predecir las estructuras con detalle. Por ejemplo,

la formación de heterociclos aún no ha podido determinarse a partir de las secuencias de ADN. (Boddy 2014).

3.2 estrategia de trabajo

La cepa *P. fluorescens* C119 presentó un excelente efecto promotor del crecimiento vegetal en los ensayos de campo realizados. Sin embargo, lo mecanismos involucrados en la promoción no han sido claramente identificados en la cepa C119. Para conocer los posibles mecanismos presentes se siguió una estrategia de análisis genómico. Para ello se secuenció el genoma completo de la cepa C119 y se realizó una búsqueda de genes relacionados con la promoción del crecimiento vegetal. Se utilizaron diversas herramientas bioinformáticas para identificar genes involucrados en la síntesis de metabolitos secundarios, como por ejemplo genes que codifican para NRPS y PKS. En los casos donde fue posible se realizó la predicción de los productos sintetizados por dichas enzimas. También se realizó una búsqueda de genes involucrados en la síntesis de HCN, fitohormonas, fitasas, ácido glucónico, trehalosa y otros osmoreguladores, y resistencia a metales pesados y antibióticos. Se realizó un análisis filogenético de varios genes conservados para confirmar la especie bacteriana a la cual pertenece C119. Finalmente se analizó la posible presencia genes que codifican para factores de virulencia.

3.3 metodología

3.3-1 Secuenciación del genoma de *P. fluorescens* C119

Para extraer y purificar el ADN genómico de *Pseudomonas* spp C119 se inoculó con una única colonia un tubo conteniendo 5ml de medio KB, el cual se incubó o.n. a 30°C con agitación. Las bacterias se colectaron por centrifugación y el ADN genómico fue extraído mediante el sistema comercial PureLink® Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) de acuerdo a las indicaciones del fabricante. La calidad del ADN extraído se verificó por electroforesis en gel de agarosa 1% (p/v) y se cuantificó en nanodrop. La secuenciación y ensamblado de secuencias se realizó mediante la contratación de los

servicios de NGS (*Next Generation Sequencing*) y bioinformática de Macrogen (Corea). El proceso constó de la elaboración de una biblioteca genómica de extremos apareados (*paired end*), la cual facilita el ensamblado de los fragmentos obtenidos, y la secuenciación utilizando la plataforma Illumina Hiseq2000. Previo al ensamblado de las secuencias en largos fragmentos (*contigs*), las mismas fueron filtradas de acuerdo a la calidad (Q20). El ensamblado se realizó mediante el software SOAPdenovo y la detección de marcos abiertos de lectura (*ORF*: *open reading frame*) mediante GLIMMER. La anotación funcional de los ORFs fue realizada por similitud de secuencias con la base de datos de proteínas no redundantes del GenBank utilizando Blast (*Basic Local Alignment Search Tool*) con lo cual se asignaron posibles funciones a genes con un E-value menores a $1.0E^{-10}$. Para encontrar proteínas homólogas y comparar secuencias proteicas entre especies se aplicaron los programas Pfam (pfam.sanger.ac.uk) y COG (*Clusters of Orthologous Genes*). La anotación de genes se realizó también mediante BasYs (*Bacterial Annotation System*) y RAST (*Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology*). Para asignar funciones RAST utiliza una estrategia basada en subsistemas curados manualmente y en familias de proteínas lo cual garantiza un alto grado de consistencia. Se generaron modelos metabólicos mediante SEED (*The seed model*) (Overbeek et al., 2004). Los RNA ribosomales y de transferencia fueron predichos mediante RNAmmer versión 1.2 (Lagesen et al. 2007) y tRNAScan-SE (Lowe & Eddy 1997) respectivamente.

3.3–2 Minería genómica: análisis de genes del metabolismo secundario

Para determinar la presencia de genes involucrados en la biosíntesis de metabolitos secundarios en el genoma de la cepa C119, éste se sometió al análisis mediante el software AntiSMASH (Antibiotics & Secondary Metabolite Analysis SHell) (Medema et al., 2011; Blin et al., 2013). La comparación de las secuencias identificadas con especies relacionadas se realizó mediante Blast utilizando la base de datos de secuencias de *Pseudomonas Genome Database* (pseudomonas.com). Los análisis filogenéticos se realizaron mediante el software Mega 6.0 (Tamura et al. 2013).

3.4 resultados

3.4-1 Características generales del genoma de *P. fluorescens* C119

El genoma de la cepa *P. fluorescens* C119 se secuenció en forma parcial, por lo cual se obtuvieron varios fragmentos extensos de ADN (*scaffolds*) de 83.404 pares de bases (pb) en promedio. Los *scaffolds*, contenían en su totalidad 6.338.754pb, con un contenido de GC de 60.87. Entre todos los *sacaffolds* se identificaron 5762 secuencias codificantes. El análisis de genes ortólogos mostró que el 35% de los genes estaba involucrado en procesos biológicos, el 34% en funciones moleculares, el 11% codificaba para componentes celulares y el 20% no presentó homología con otros genes (Figura 3.4: A, B, C y D).

Se identificaron 53 ARNs de transferencia y tres ARNr correspondientes a las subunidad 5S. Los genes que codifican para el 16S ARNr no estaban presentes en ninguno de los *scaffolds* obtenidos.

Se realizó un análisis filogenético de diversos genes de tipo "*housekeeping",* altamente conservados entre bacterias, y que pueden ser utilizados para confirmar la clasificación de una especie bacteriana complementando el análisis del gen 16S ARNr. Estos genes codifican para la recombinasa A (*recA*) (Figura 3.5), la subunidad beta de la girasa del ADN (*gyrB*) (figura 3.6), la cadena beta de la ATP sintasa (*atpD*) (Figura 3.7), la carbamoil fosfato sintasa (*carA*) (Figura 3.8) y la subunidad beta de la ARN polimerasa (*rpoB*) (Figura 3.9).

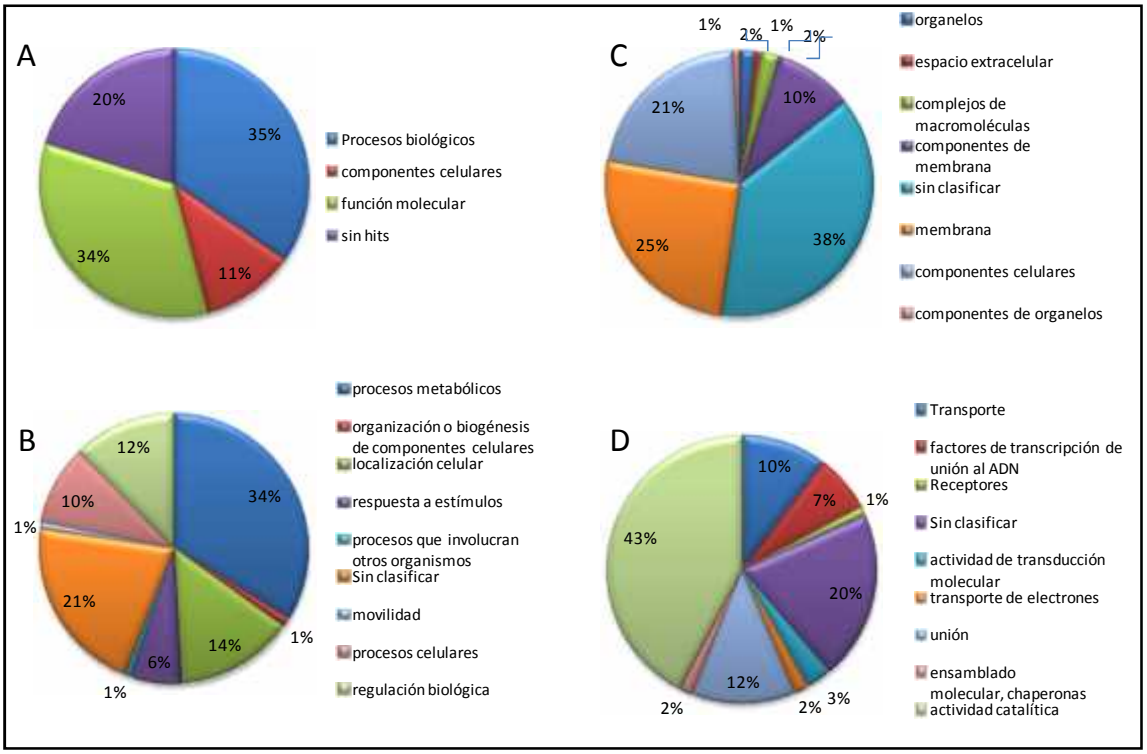


Figura 3.4- Análisis funcional de los ORFs identificados en el genoma de la cepa *P. fluorescens* C119 de acuerdo a homología con genes conocidos. Los genes se agruparon en procesos biológicos (B), componentes celulares (C) y función molecular (D).

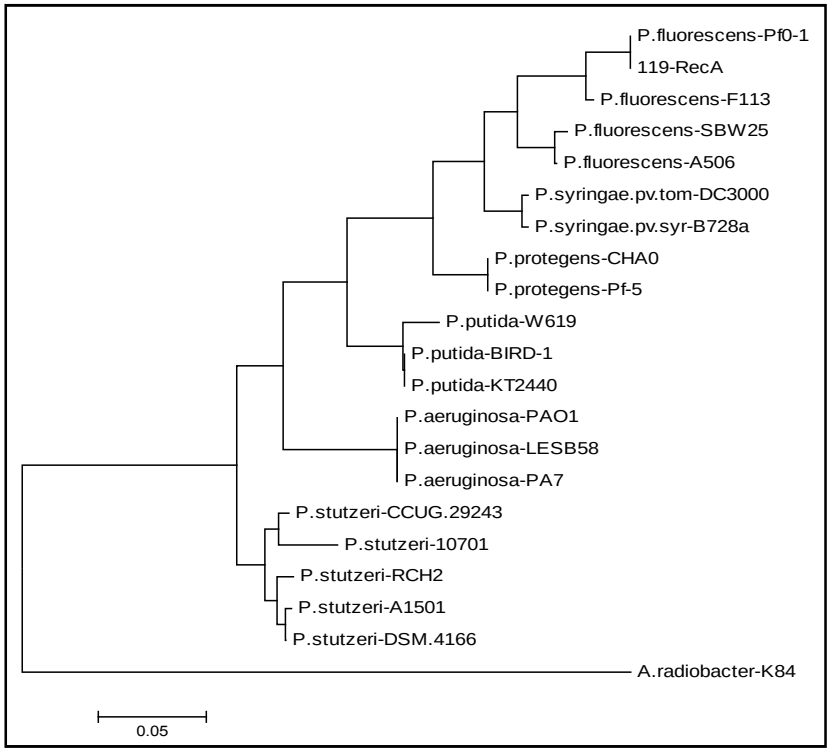


Figura 3.5- Arbol filogenético del gen *recA* para diferentes especies de *Pseudomonas* obtenido mediante Maximun-likelyhood. Como grupo externo se utilizó el gen recA de *Agrobacterium radiobacter* K84

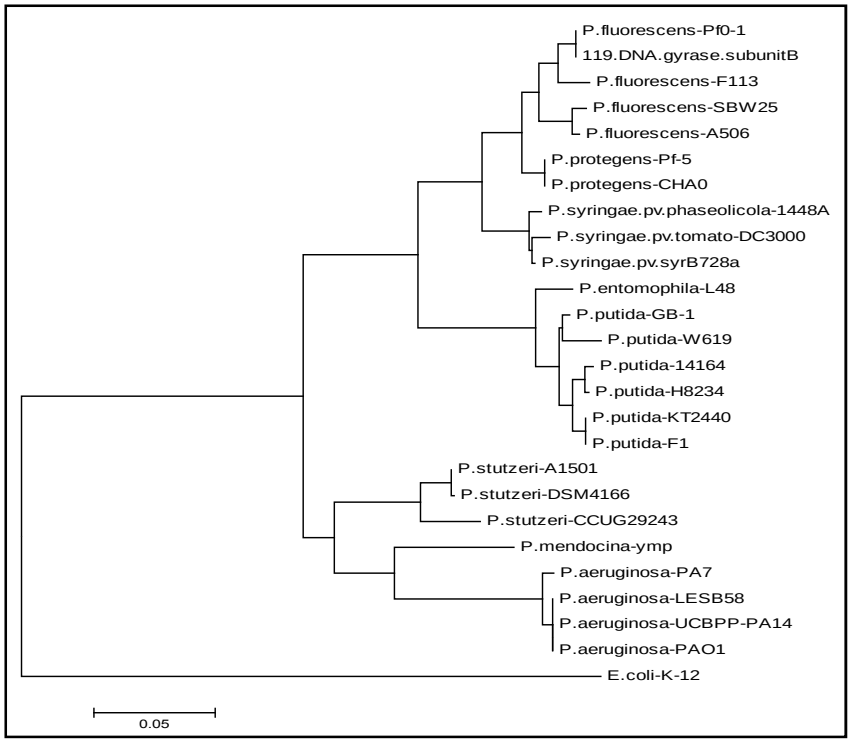


Figura 3.6 Arbol filogenético del gen *gyrB* para diferentes especies de *Pseudomonas* obtenido mediante Maximun-likelyhood. Como grupo externo se utilizó el gen *gyrB* de *Escherichia coli* K-12

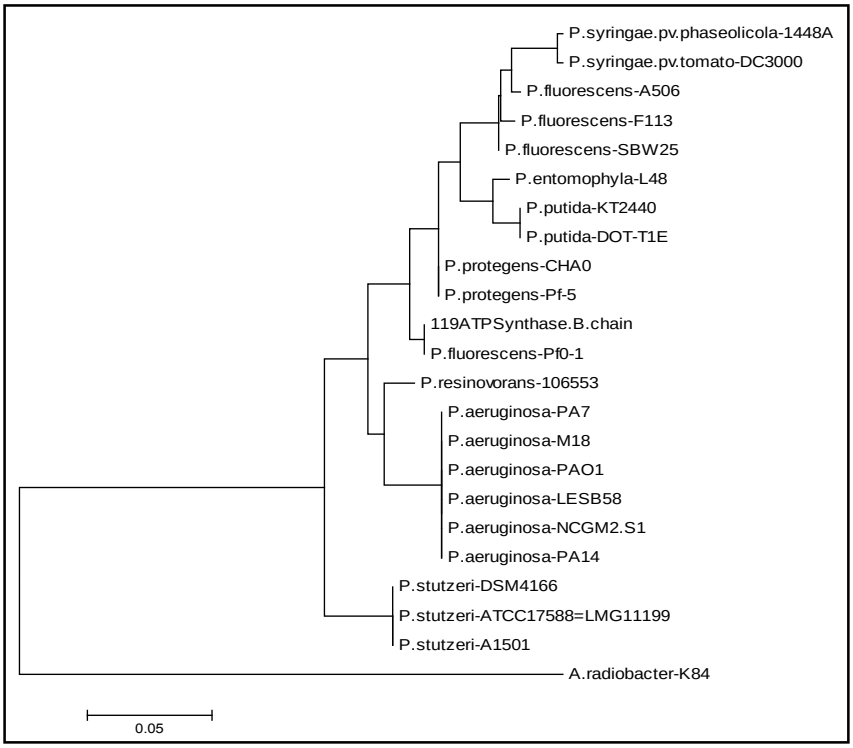


Figura 3.7- Arbol filogenético del gen *atpD* para diferentes especies de *Pseudomonas* obtenido mediante Maximun-likelyhood. Como grupo externo se utilizó el gen *atpD* de *A. radiobacter* K84

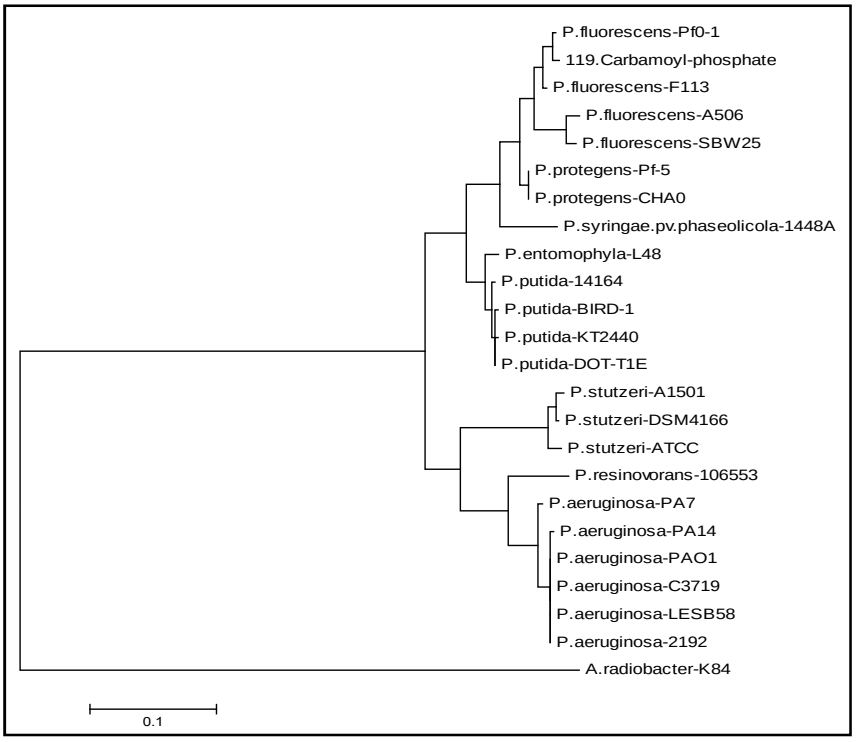


Figura 3.8- Arbol filogenético del gen *carA* para diferentes especies de Pseudomonas obtenido mediante Maximun-likelyhood. Como grupo externo se utilizó el gen *carA* de *A. radiobacter* K84

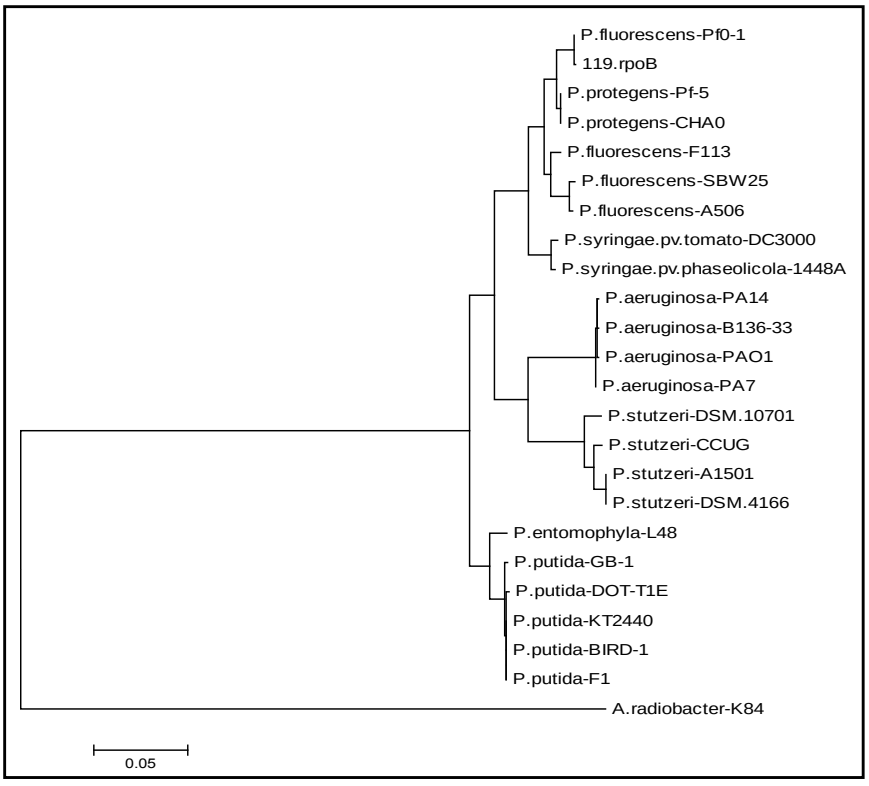


Figura 3.9- Arbol filogenético del gen *rpoB* para diferentes especies de *Pseudomonas* obtenido mediante Maximun-likelyhood. Como grupo externo se utilizó el gen *rpoB* de *A. radiobacter* K84

3.4-2 Búsqueda de genes involucrados en el control biológico de patógenos

3.4-2.1 *Sideróforos*

La cepa *P. fluorescens* C119 presenta genes involucrados en el sistema de captación de hierro tales como genes de síntesis de sideróforos, receptores de membrana, sistema de transporte y reguladores. Los genes se encontraron agrupados en dos operones ubicados en dos *scaffolds* separados. Por un lado se identificó en el *scaffold* 38 el operón de síntesis del cromóforo, que además involucra un factor sigma regulador (Tabla 3.4). Por otra parte, en el *scaffold* 25 se identificó un operón conteniendo al menos 17 genes, de los cuales tres codificarían para NRPS responsables de la síntesis de la cadena peptídica del sideróforo.

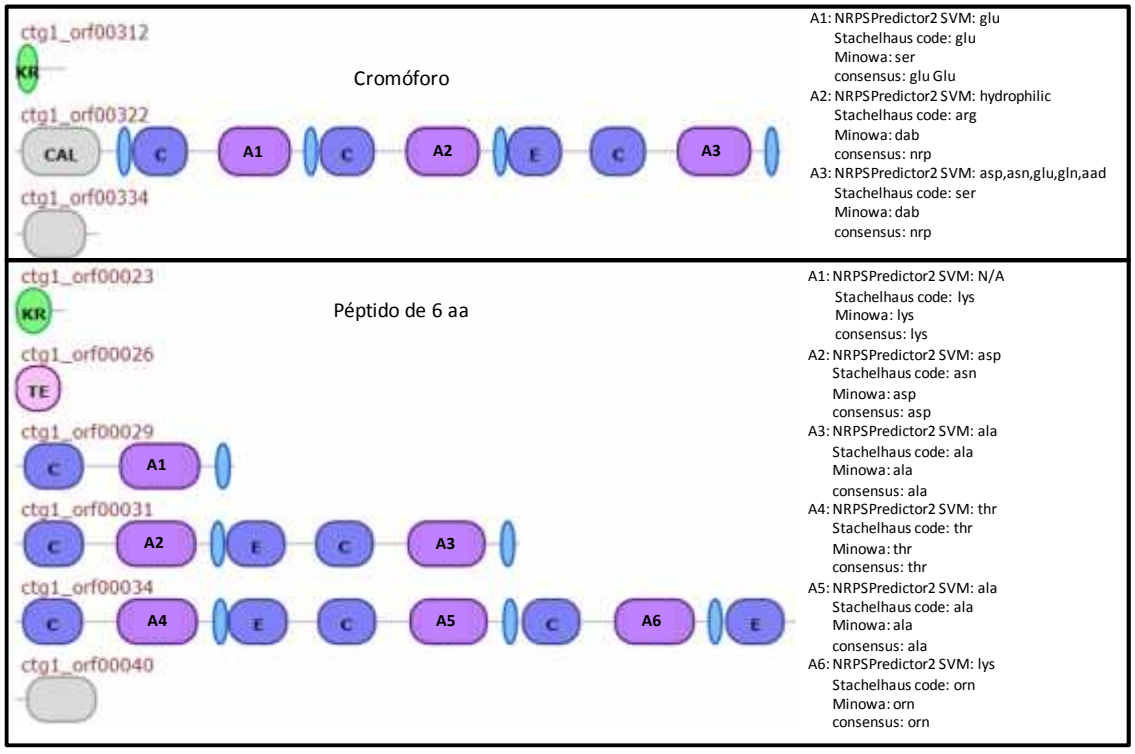
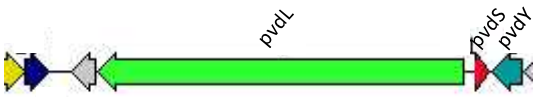


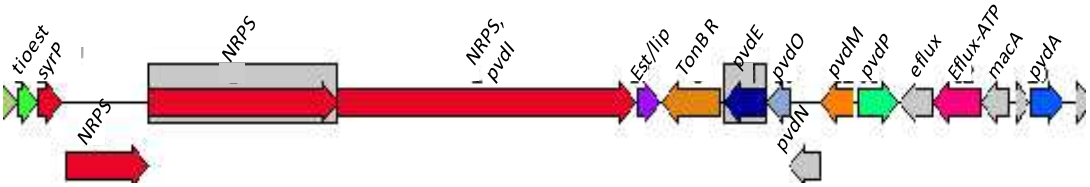
Figura 3.10- Organización de módulos para las NRPSs responsables de la síntesis del cromóforo y del péptido de 6 aminoácidos de la pioverdina codificada en el genoma de la cepa C119. Se listan los aminoácidos predichos de acuerdo a la selectividad de los dominios de adenilación, de acuerdo a diferentes programas bioinformáticos.

El resto de los genes corresponden a sistemas de transporte del sideróforo, proteínas reguladoras y algunas enzimas como la L-ornitina 5-monooxigenasa que introducen modificaciones en los aminoácidos del sideróforo (Tabla 3.4).

Tabla 3.4-. Genes involucrados en la síntesis, regulación y transporte de pioverdina (pvd).



Ubicación	Comienza	Termina	Hebra	Nombre	Función*
Scaffold 38	78445	79458	+	PvdY	Componente menor de sintetasa del sideróforo, acetiltransferasa
Scaffold 38	80086	79532	-	PvdS	Factor σ regulador de la síntesis de pvd
Scaffold 38	80467	93468	+	PvdL	Sintetasa del precursor del cromóforo de la pvd



Ubicación	Comienza	Termina	Hebra	Nombre	Función*
Scaffold 25	1420	83	-	PvdA	L-ornitina 5-monooxigenasa (EC 1.13.12.-)
Scaffold 25	2013	1534	-	fpvI	Factor σ-70 (ECF subfamilia), regulador de la síntesis de pvd
Scaffold 25	2338	3501	+		Proteína tipo macA (eflujo específico de pvd)
Scaffold 25	3502	5475	+		Proteína transpotadora (eflujo de pvd) y de union al ATP
Scaffold 25	5483	6877	+		Proteína de membrana externa (eflujo de pvd)
Scaffold 25	8560	6935	-	pvdP	Proteína relacionada con la síntesis de pvd
Scaffold 25	8779	10149	+	pvdM	Posible dipeptidasa, biosíntesis de pvd
Scaffold 25	10146	11423	+	PvdN	Proteína de biosíntesis de pvd. Posible aminotransferasa, clase V
Scaffold 25	11463	12350	+	pvdO	Quinasa Pyoverdine sensible a Ser/Thr
Scaffold 25	12460	14109	+	PvdE	Sistema de transporte ABC para pvd. Fusionado con componentes ATPasa y permeasa
Scaffold 25	14271	16703	+		Precursor del receptor de sideróforos dep. TonB
Scaffold 25	17725	16769	-		Esterasa/lipasa
Scaffold 25	30127	17801	-		NRPS (EC 6.2.1.3)
Scaffold 25	37976	30141	-	pvdI	Pvd NRPS
Scaffold 25	41374	37973	-		Pvd NRPS
Scaffold 25	42546	41563	-	SyrP	Proteína hipotética
Scaffold 25	43326	42586	-		Posible tioesterasa de la NRPS, PA2411 homologa

*Se indica el número EC (*Enzyme Commission number*) de las enzimas, cuando corresponde

El análisis bioinformáticio de las secuencias permitió predecir que el sideróforo es una pioverdina. El gen *pvdL*, responsable de la síntesis del cromóforo, codifica para una NRPS que sería capaz de sintetizar un péptido de tres aminoácidos (Figura 3.10) los cuales no pudieron predecirse completamente partiendo de la secuencia nucleotídica. El primer aminoácido sería un glutamato, el segundo un aminoácido hidrofílico, posiblemente arginina o ácido diaminobutírico, y el tercero presenta varias posibilidades (Asp, Asn, Glu, Gln, Aad). El gen *pvdL* se analizó filogenéticamente comparándolo con homólogos dentro del género *Pseudomonas* (Figura 3.12). El análisis de las tres NRPS codificadas en el *Scaffold* 25, mediante el software AntiSMASH, demostró que el componente peptídico del sideróforo está compuesto por seis aminoácidos. (Figura 3.10). Siguiendo la regla de colinealidad de los módulos, la secuencia del péptido sería: Lys-Asp-Ala-Thr-Ala-Orn.

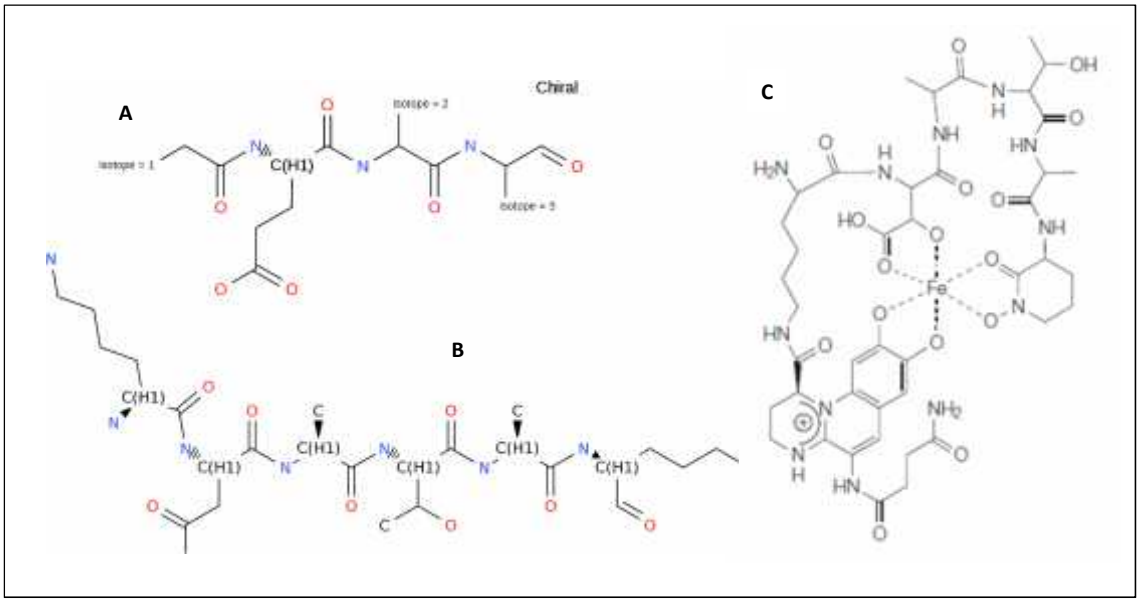


Figura 3.11- Estructura de los péptidos sintetizados mediante NRPSs para el cromóforo (A) y el motivo peptídico (B) del sideróforo de la cepa C119. Para el cromóforo, el ácido dicarboxílico se indica como isotopo=1, y los aminoácidos no identificados como isótopo =2 y 3. La figura C corresponde al sideróforo pseudobactina aislado de *Pseudomonas* sp. B10, cuya estructura primaria del motivo peptídico asemeja mucho a la del sideróforo producido por la cepa C119.

El péptido presenta la particularidad de poseer un aminoácido no usual como la ornitina y tres aminoácidos en su configuración D lo cual se deduce de los dominios de epimerización intercalados entre los módulos, que estarían realizando la conversión de los isómeros L en D para los aminoácidos en las posiciones 2, 4 y 6 (figura 3.10). La L-ornitina-N^5-monooxigenasa codificada por el gen *pvdA* sería

responsable de la conversión de L-ornitina en L-N^5-hidroxiornitina (Putignani et al., 2004; Ambrosi et al., 2000). La comparación de la cadena peptídica del sideróforo de la cepa C119 con otros sideróforos conocidos mostró cierta similitud con la pseudobactina producida por la cepa *Pseudomonas* sp. B10. El motivo peptídico de la pseudobactina presenta la siguiente secuencia aminoacídica: εLys-OHAsp-Ala-alloThr-Ala-cOHOrn donde εLys significa que la lisina se encuentra unida por su εNH_2, OHAsp es hidroxiaspártico y cOHOrn, ciclo-hidroxi-ornitina (figura 11-C).

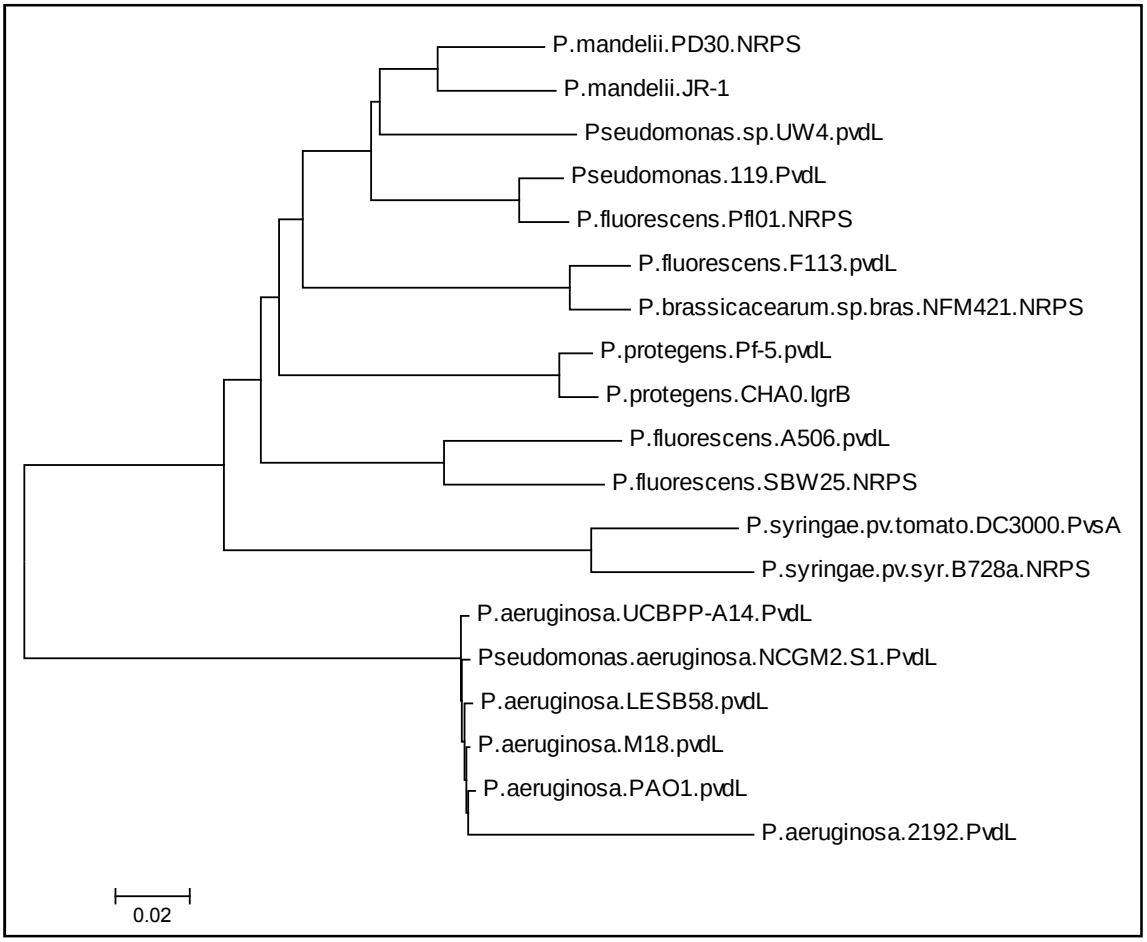


Figura 3.12- Arbol filogenético para el gen *pvdL* de diversas especies de *Pseudomonas* obtenido por el método de Neighbor-Joining.

3.4–3.2 Antibióticos

A lo largo del genoma de la cepa *P. fluorescens* C119 se identificaron otros operones que codifican para NRPS, diferentes a los involucrados en la síntesis del sideróforo, y que probablemente estén involucrados en la síntesis de metabolitos secundarios antimicrobianos.

i) Lipopéptido

Uno de los operones identificados contenía tres genes que codificaban para NRPS. Los módulos de las tres NRPS corresponderían a la síntesis de un péptido no ribosomal de 8 aminoácidos (Figura 3.13). Este operón biosintético presentó características habitualmente encontradas en genes que codifican para NRPS de lipopéptidos en *Pseudomonas* sp. Una de ellas es la presencia de un dominio de condensación inicial (C1), involucrado en la acilación del primer aminoácido, cuya secuencia es diferente del resto de los dominios de condensación de la NRPS (Figura 3.15). Otra característica es que no se observaron dominios de epimerización intercalados entre los módulos (dado que la transformación de L aminoácidos a D está a cargo de los dominios C duales de condensación/epimerización). La tercera característica es que al final de la línea de ensamblaje se observaron dos dominios tioesterasas terminales.

El análisis de los módulos de las NRPS mediante diversos programas informáticos permitió predecir la secuencia del péptido (Tabla 3.5). De acuerdo al análisis y siguiendo la regla de colinealidad, la secuencia consenso del péptido sería: (leu-asp) + (thr-leu-leu-gln) + (leu-ile). Los aminoácidos en las posiciones 2, 6 y 8 fueron predichos con menor precisión ya que existieron diferencias entre los resultados de los distintos programas utilizados. Para confirmar identidad de los aminoácidos incorporados al péptido, se realizó una comparación filogenética de los dominios de adenilación con otros dominios de adenilación de NRPSs responsables de la síntesis de lipopéptidos cíclicos de varias cepas de *Pesudomonas* (Figura 3.14).

La configuración de los aminoácidos en el péptido se predijo mediante el análisis de los dominios de condensación de manera de determinar si éstos poseían función dual condensación/epimerización o no (Figura 3.15). Todos los dominios de condensación mostraron similitud con dominios de actividad dual excepto el C8 por lo cual se deduce que los aminoácidos en las posiciones 7 y 8 permanecerían en su configuración L.

Por otra parte, no fue posible determinar por métodos bioinformáticos la naturaleza del motivo lipídico que forma parte de la estructura del lipopéptido ya que este proviene del metabolismo primario y los genes biosintéticos no se ubican en el mismo operón de la NRPS.

El entorno genético del operón de biosíntesis fue analizado, encontrándose algunas similitudes con otros operones para lipopéptidos cíclicos (Figura 3.16). Se observaron similitudes en genes involucrados en la regulación de la síntesis del compuesto surfactante y en el transporte del mismo fuera de la célula (Tabla 3.6).

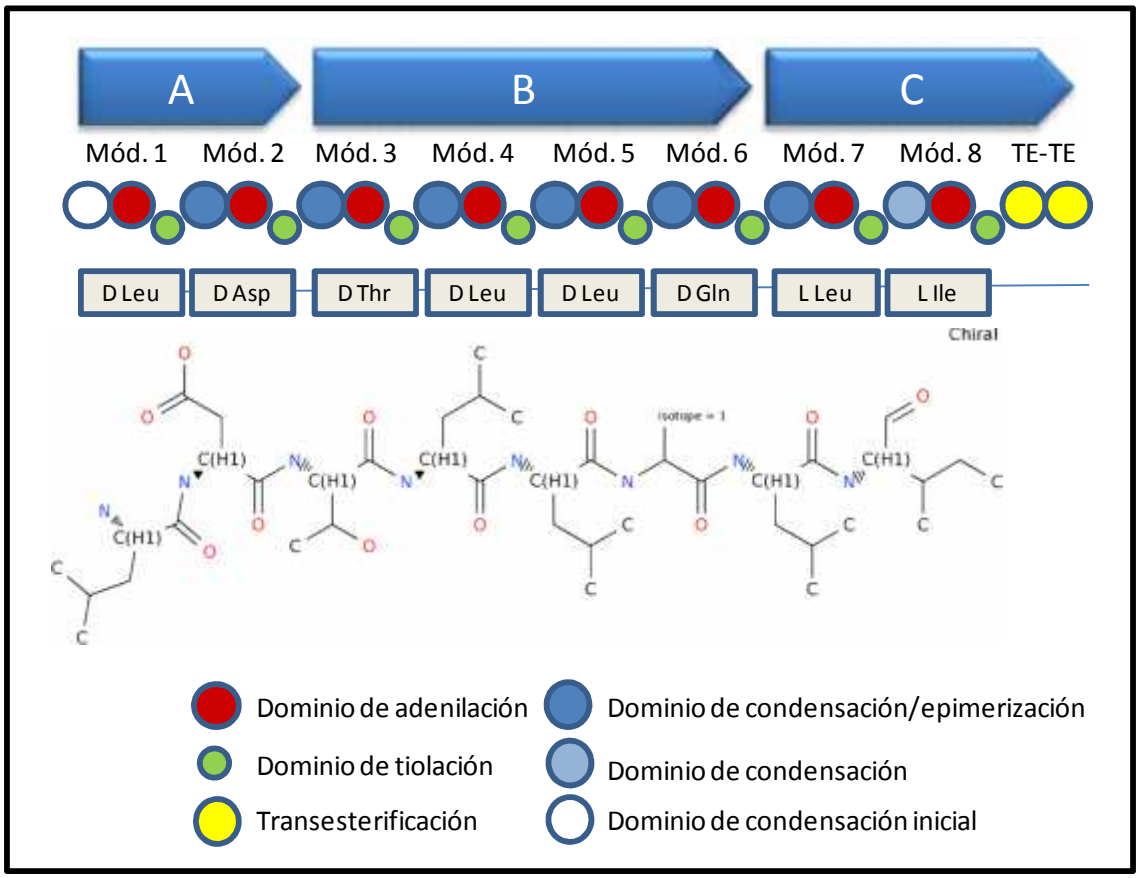


Figura 3.13- Esquema de las sintetasas de péptidos no ribosomales involucradas en la síntesis del lipopéptido de la cepa C119. Desde la parte superior a la inferior se esquematizan los tres genes para NRPS, los módulos presentes en cada gen, los aminoácidos que reconoce cada dominio de adenilación y en la parte inferior el péptido predicho a partir del análisis bioinformático. Se indica como isotope=1 al residuo que no pudo determinarse *in sílico*.

Tabla 3.5-. Predicción de la especificidad de los dominios de adenilación presentes en las sintetasa del lipopéptido de la cepa C119.

Programa	Aden. 1	Aden.2	Aden.3	Aden.4	Aden.5	Aden.6	Aden.7	Aden.8
NRPSpred.[1,2]	Leu	Asp	Thr	Leu	Leu	Gln	Leu	Ile
Stachelhaus code[2]	Leu	Asp	Thr	Leu	Leu	Gln	Leu	Ile
Minowa[2]	Leu	Asp	Thr	Leu	Leu	Ser	Leu	Ile
PKS/NRPS[3]	Leu	Thr	Thr	Leu	Leu	Gln	Leu	no hit
NP. searcher[4]	Leu	Asp	Thr	Leu	Leu	Gln	Leu	Ile
SBSPKS[4]	Leu	Gln	Thr	Leu	Leu	Gln	Leu	Leu
CONSENSO	**Leu**	**Asp**	**Thr**	**Leu**	**Leu**	**Gln**	**Leu**	**Ile**

[1]http://nrps.informatik.uni-tuebingen.de, [2]http://antismash.secondarymetabolites.org
[3]http://nrps.igs.umaryland.edu/nrps, [4]http://dna.sherman.lsi.umich.edu,
[5]http://www.nii.ac.in/~pksdb/sbspks

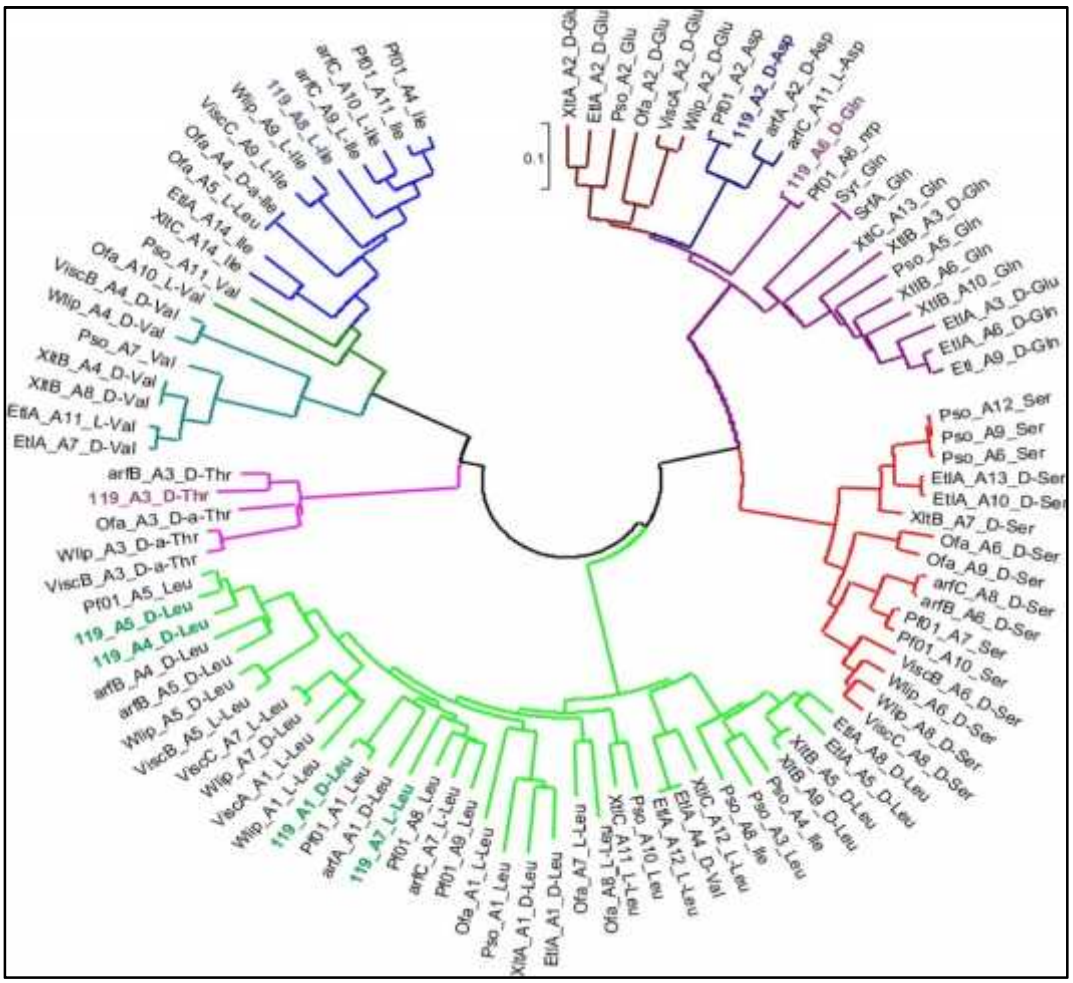


Figura 3.14- Comparación filogenética entre secuencias de aminoácidos de dominios de adenilación de diversos lipopéptidos cíclicos obtenidas mediante el método Neighbor-Joining. Se indican con diferentes colores los grupos conformados por dominios de adenilación similares. Se resaltan con color los dominios pertenecientes a la NRPS de la cepa C119.

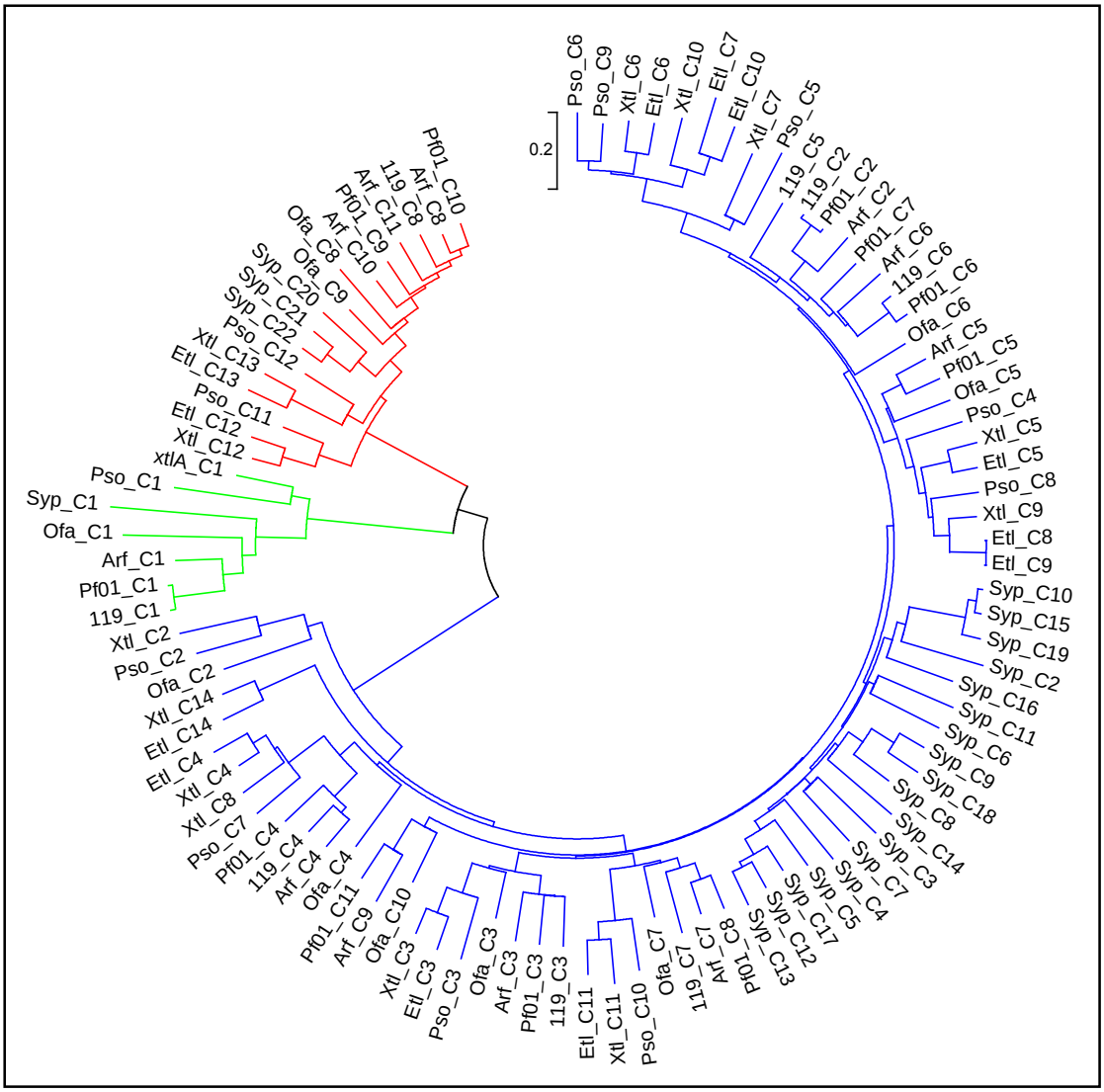


Figura 3.15- Árbol filogenético de dominios de condensación de NRPS. Análisis mediante el método Neighbor-Joining de las secuencias de aminoácidos de los dominios de condensación de diferentes sintetasas de lipopéptidos cíclicos de *Pseudomonas* spp. Se indican los diferentes tipos de dominios de condensación con líneas de diferente color: verde: dominios inicial N-acilante, rojo: dominios de condensación convencionales y azul: dominios duales condensación/epimerización. Pf01: LPC de la cepa *P.fluorescens* Pf0-1; Arf: arthrofactina, 119: LPC de la cepa C119, Ofa: orfamida A; Syp: Syringafactina; Xlt: Xantholisina; Pso: putisolvina;

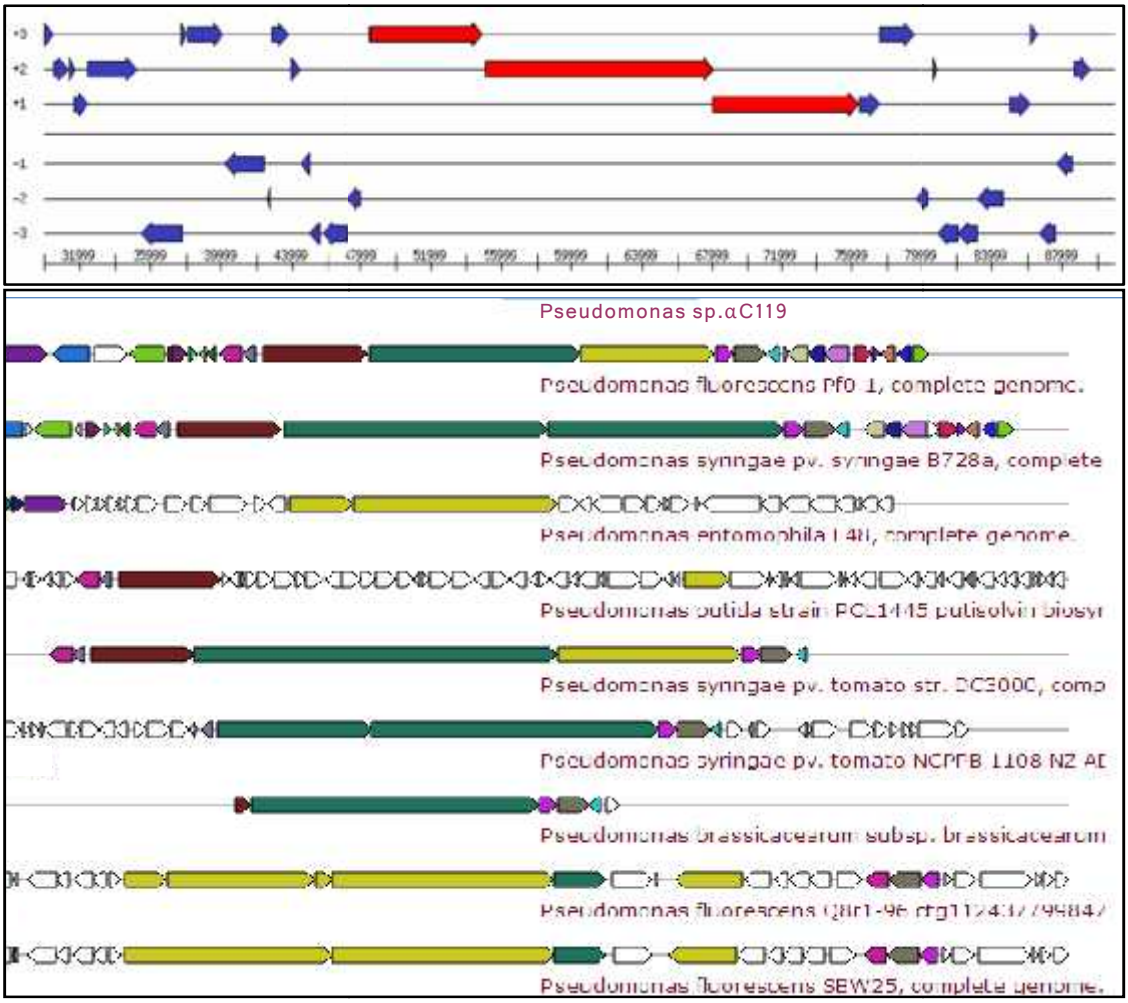


Figura 3.16- Genes de biosíntesis del lipopéptido de la cepa C119 y el entorno genético del operón. En el cuadro superior (A) se muestran un esquema de los genes involucrados en los marcos de lectura en que se encuentran codificados. En rojo se indican los tres genes correspondientes a las NRPSs. En el cuadro inferior (B) se muestra un esquema comparativo de los genes involucrados en la síntesis de lipopéptidos para distintas cepas de *Pseudomonas* y el entorno genético del operón. Los genes con características similares se indican del mismo color (ver funciones de cada gen en la tabla 3.5).

Tabla 3.6- Operón de biosíntesis del lipopéptido (genes indicados en la figura 3.16-B)

Gen ID	Comienza	Termina	Hebra	Nombre	Función*
	32519	35176	+		Alanina aminopeptidasa de membrana N (EC 3.4.11.2)
	37766	35499	-		Catalasa (EC 1.11.1.6) / Peroxidasa (EC 1.11.1.7)
	38091	40127	+	TonB	Receptor de membrana TonB dependiente
	42387	40177	-		Posible prot. con dominio sulfatasa
	42825	43838	+		Sist. De transporte ABC nitrato/sulfonato/bicarbonate. Componentesperiplasmáticos
	43961	44413	+		Prot tipo OsmC (resist. hidroperóxido)
	44973	44497	-		Prot. hipopética metalochaperona (Cu)
	45539	44973	-		Prot. de sintesis de citocromo oxidasaSco1/SenC/PrrC,(posible metalochaperon)
	47147	45729	-	CmeC	Lipoprot. externa CmeC del sistema de eflujo RND
	48004	47210	-		Regulador transcripcional, familia LuxR
	48495	54905	+	nrpsA	Sintetasa de peptido no ribosomal (EC 6.2.1.3)
	55091	68089	+	nrpsB	Sintetasa de peptido no ribosomal (EC 6.2.1.3)
	68086	76386	+	nrpsC	Sintetasa de peptido no ribosomal (EC 6.2.1.3)
	76453	77601	+	MacA	Port. de eflujo de macrólidos MacA
	77598	79559	+	MacB	Permeasa MacB /port de unión al ATLP de eflujo de macrólidos (EC 3.6.3.-)
	80395	79625	-		Regulador transcripcional, familia LuxR
	80651	80878	+		Proteína hipotética
	82112	80895	-	GlcF	Subunidad GlcF hierro/azufre de la glicolato deshidrogenasa (EC 1.1.99.14)
	83180	82116	-	GlcE	Subunidad GlcE de unión a FAD de la glicolato deshidrogenasa (EC 1.1.99.14)
	84679	83180	-	GlcD	Subunidad GlcD de la glicolato deshidrogenasa(EC 1.1.99.14),
	85030	86157	+		Posible prot. transmembrana (deshidrogenasa)
	86160	86651	+		Prot. hipotetica
	87545	86706	-		Glutatión S-transferasa (EC 2.5.1.18)
	88548	87712	-		Regulador transcripcional de la familia AraC
	88655	89611	+		Threonina deshidratasa(EC 4.3.1.19)

*Se indica el número EC (*Enzyme Commission number*) de las enzimas, cuando corresponde

ii) Otras NRPS

Se identificaron genes pertenecientes a vías de síntesis de NRPS y PKS posiblemente involucrados en la producción de metabolitos secundarios. Uno de estos operones, ubicado en el *contig* 1027, estaba compuesto por genes que codifican para una enzima mixta NRPS/PKS (Figura 3.17-A). Este operón parece estar muy conservado entre cepas de *Pseudomonas* spp. (Figura 3.17-B). El producto resultante de estas enzimas no pudo predecirse y no ha sido descripto en otras *Pseudomonas* spp.

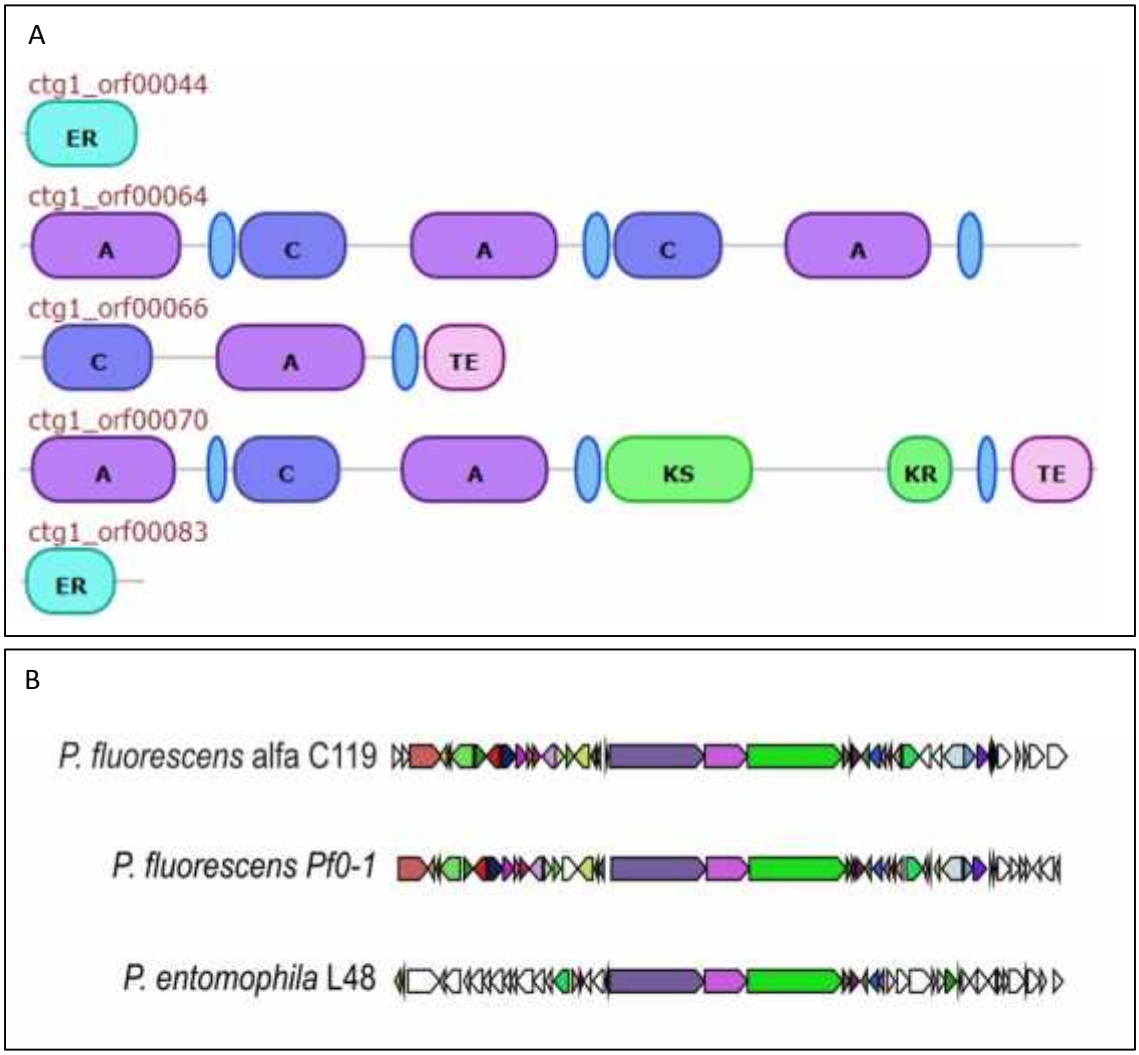


Figura 3.17- A) Organización modular de los génes que codifican para una NRPS/PKS, involucradas en la síntesis de un metabolito. ER: dominio enolil-reductasa; A: dominio de adenilación; C: dominio de condensación; KS: dominio queto-sintasa; KR: dominio queto-reductasa; TE: dominio de transesterificación. B) Esquema comparativo del operón de síntesis de una metabolito compuesto por una NRPS y PKS en la cepa C119 y otras dos cepas de *Pseudomonas.*

Otro operón, ubicado en el *scaffold* 23, presentó una NRPS con un solo dominio de adenilación junto a un dominio tioester reductasa. Este operón también está presente en varias cepas de *Pseudomonas* (Figura 3.18) donde presenta una muy alta conservación entre diversas especies. En general se encuentra acompañado por genes que codifican para un regulador transcripcional tipo GntR, un factor sigma 70, una proteína receptora de sideróforos dependiente de TonB y una diguanilato ciclasa/fosfodiesterasa. En este caso tampoco pudo predecirse el metabolito resultante de la acción de estas sintetasa.

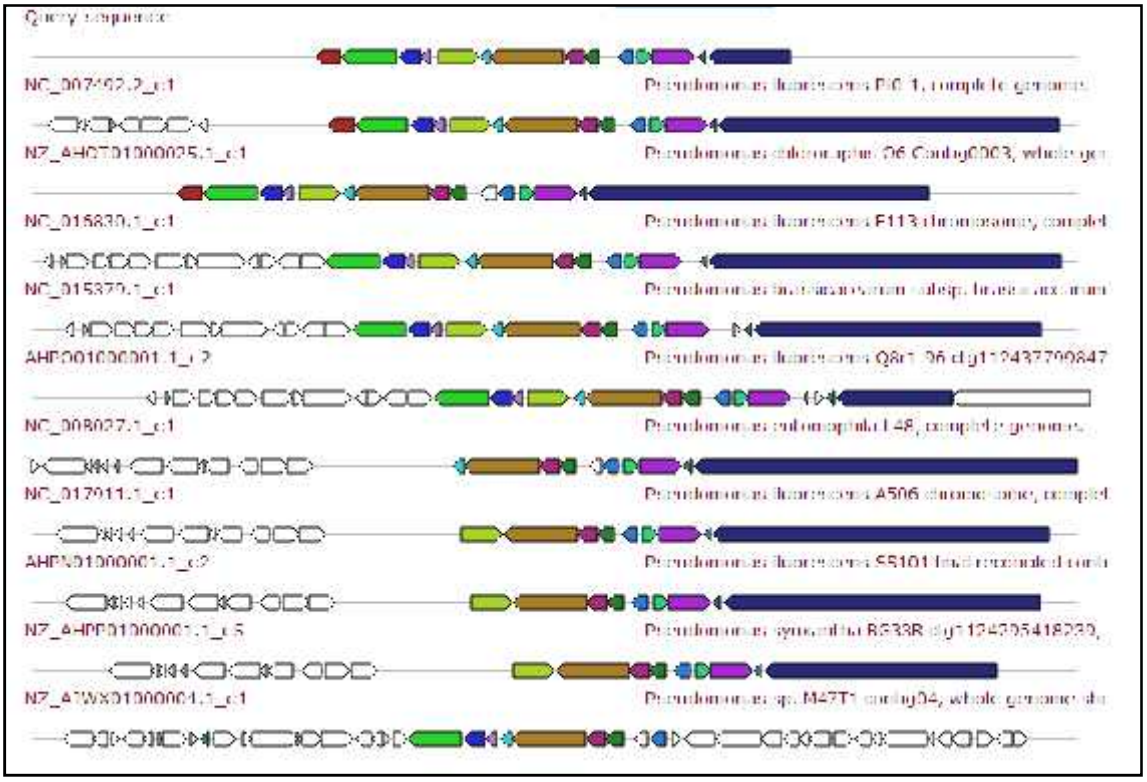


Figura 3.18- Genes de biosíntesis de metabolito secundario (identificado en el *scaffold* 23). En marrón se indica el gen de síntesis, en verde genes de tranporte, en celeste genes de regulación y en azul una diguanilato ciclasa/fosfodiesterasa. La secuencia de genes correspondiente a *P. fluorescens* C-119 es la primera (Query sequence)

iii) Compuestos volátiles

Se identificaron los genes *hcnABC,* necesarios para la síntesis del ácido cianhídrico. Se comparó la secuencia de las tres enzimas para determinar el grado de conservación de las mismas (Figura 3.19).

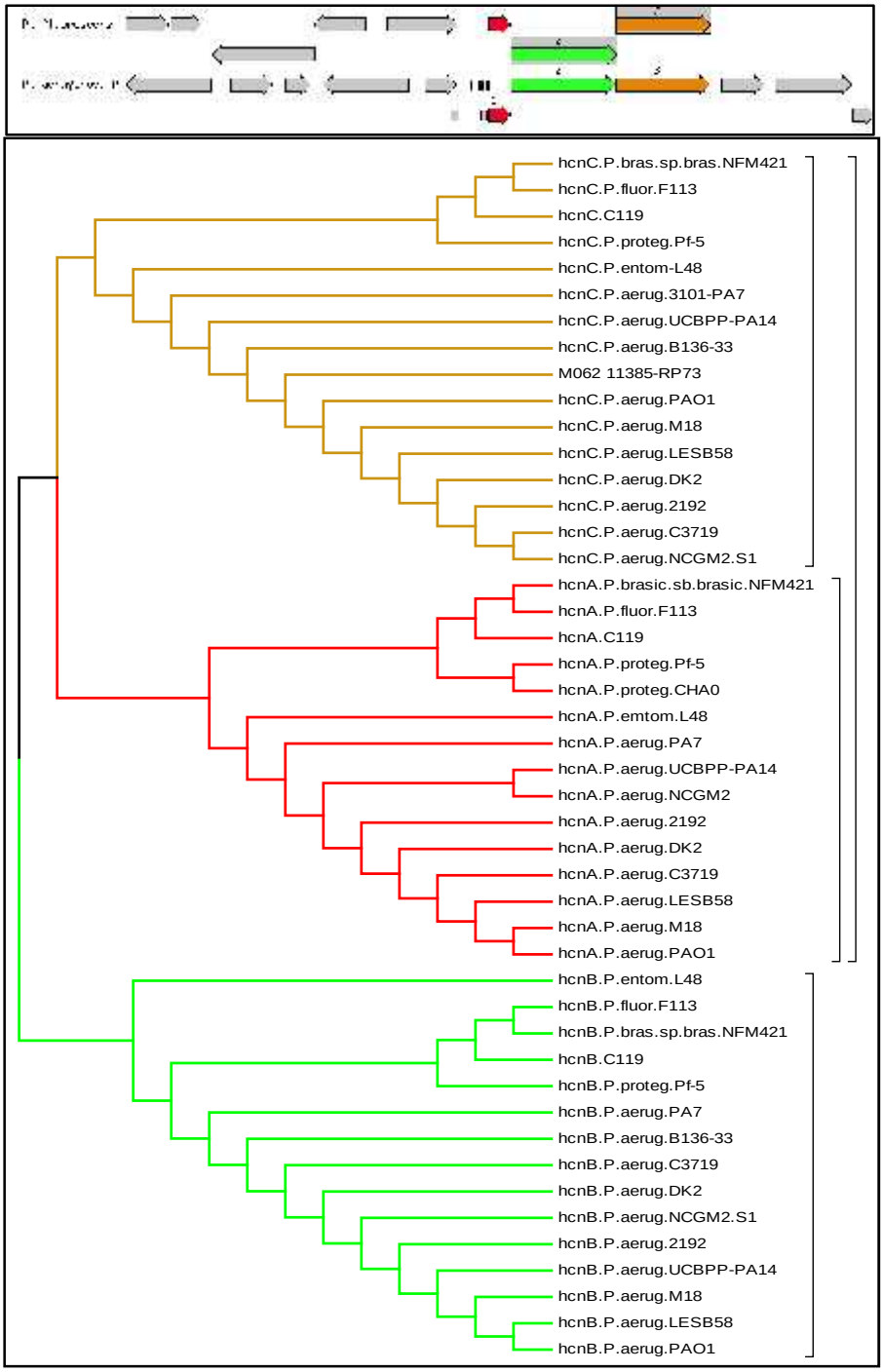


Figura 3.19- Genes de síntesis de ácido cianhídrico. En el esquema superior se indican los genes *hcnABC* involucrados en la síntesis del compuesto volátil para la cepa C119 y para *P. aeruginosa* PAO1 [**(1)**: *hcnA*, **(2)**: *hcnB* y **(3)**: *hcnC*]. Debajo se muestra el árbol filogenético obtenido por *Maximun Likelihood* de los tres genes de síntesis para diversas cepas de *Pseudomonas.*

iv) Bacteriocinas

El genoma de C119 presentó genes involucrados en la síntesis de la bacteriocina colicina V. El operón biosintético está ubicado en el *scaffold 25 y* presenta una organización similar en *Pseudomonas* de diversas especies (Figura 3.20). El entorno genético del operón presenta diversos genes involucrados en la biosíntesis de antibióticos (Tabla 3.7).

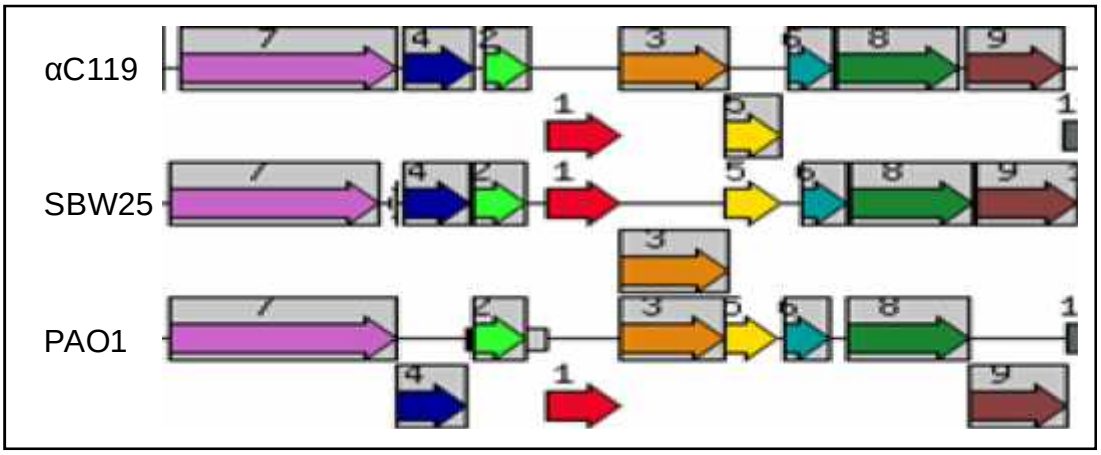


Figura 3.20- Esquema del operón de biosíntesis de colicina y el entorno genético del mismo para tres cepas de *Pseudomonas, P. fluorescen* C119, *P. fluorescens* SBW25 y *P. aeruginosa* PAO1. La descripción de los genes se detalla en la Tabla 3.7.

Tabla 3.7. Genes de biosíntesis de colicina y otros genes ubicados en el entorno del operón

ID	COMIENZA	TERMINA	TAMAÑO (NT)	HEBRA	FUNCIÓN	SUBSISTEMA
7	108625	111261	2637	+	Proteína hipotética	Nd
3	112340	112915	576	+	Fosforibosil antranilato isomerasa (EC 5.3.1.24)	Biosíntesis de triptófano
4	111382	112236	855	+	Sintasa de tRNA pseudouridina(EC 4.2.1.70)	Biosíntesis de ColicinaV
1	113108	114028	921	+	Cadena beta de la acetilcoenzima A carboxil transferasa (EC 6.4.1.2)	
2	114025	115332	1308	+	Dihidrofolato sintasa(EC 6.3.2.12) / Folilpoliglutamato sintasa(EC 6.3.2.17)	
9	115316	115978	663	+	Proteína DedD	
5	116077	116637	561	+	Proteína de síntesis de Colicin V	
6	116679	118184	1506	+	Amidofosforibosil transferasa(EC 2.4.2.14)	
8	118265	119476	1212	+	O-acetil homoserina sulfhidrilasa(EC 2.5.1.49) / O-succinil homoserina sulfhidrilasa(EC 2.5.1.48)	Biosíntesis de metionina

3.4–3.3 Enzimas hidrolíticas

Se realizó un análisis de BLAST sobre el genoma de C119 para determinar la posible presencia de genes homólogos de otros que codifican para proteasas extracelulares y quitinasas. Para ello se utilizó como secuencia de referencia el gen *arpA* de *P.protegens* CHA0 y el gen *chiC* de *P. protegens Pf-5*. Se identificaron dos genes que codificarían para una metaloproteasa extracelular y una quitinasa con alta homología en el genoma de C119 (Figuras 3.26 y 3.27). Los genes que codifican para quitinasas en las cepas *P.protegens* eran más grandes.

Figura 3.21. Alineamiento de secuencias homólogas a la quitinasa ChiC de *P. protegens* Pf-5 mediante Clustal X. Las secuencias de aminoácidos fueron deducidas a partir de las secuencias de nucleótidos.

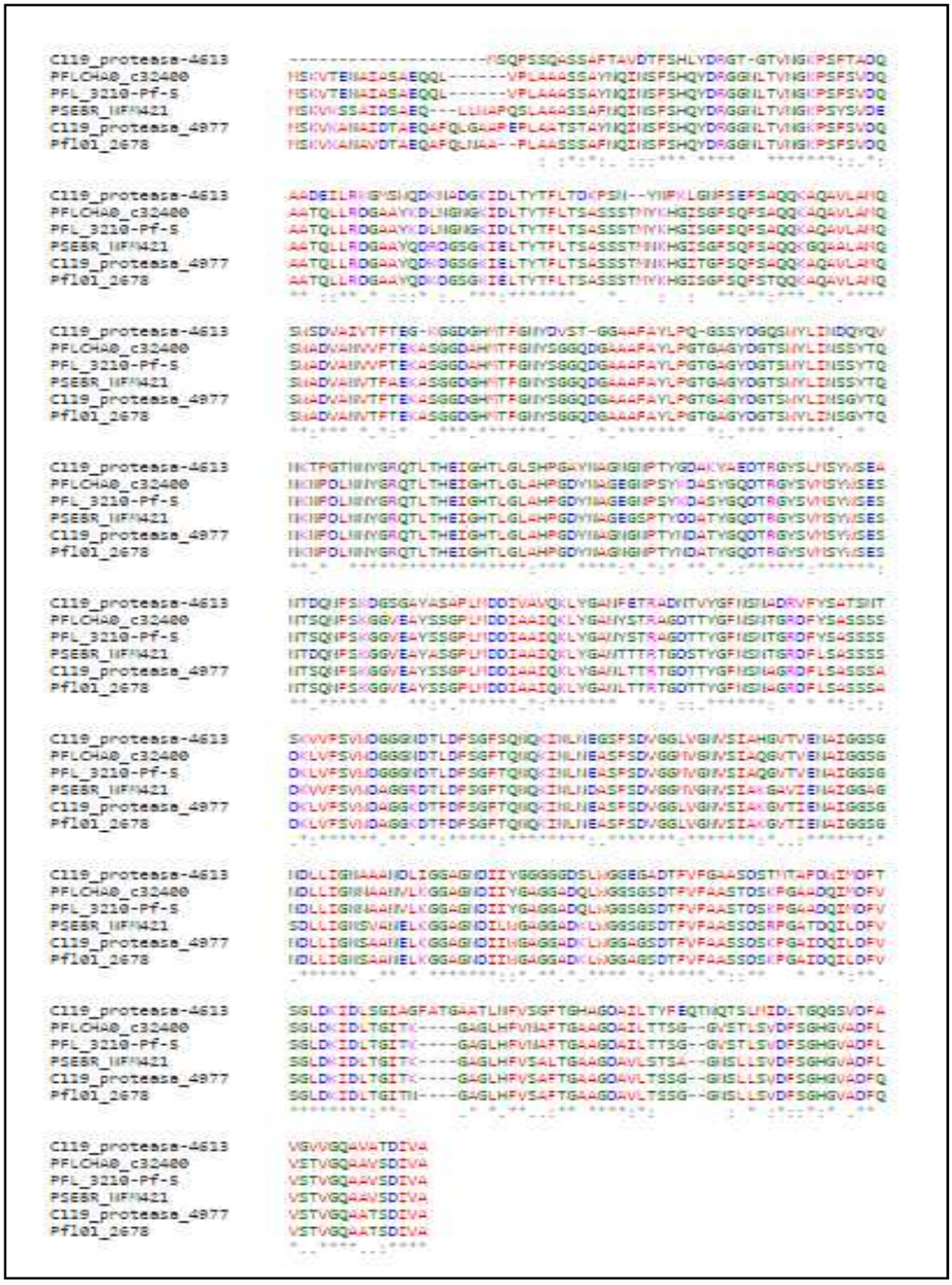


Figura 3.22. Alineamiento de secuencias homólogas a la metaloproteasa ArpA de *P. protegens* CHA0 mediante Clustal X. Las secuencias de aminoácidos fueron deducidas a partir de las secuencias de nucleótidos.

3.4-3. Búsqueda de genes involucrados en la promoción directa del crecimiento vegetal.

Se analizó el genoma de la cepa C119 en busca de genes involucrados en las características promotoras del crecimiento vegetal de la cepa tales como genes de síntesis de fitohormonas, ACC desaminasa, fitasas y enzimas productoras de ácido glucónico.

3.4-3.1- Síntesis de fitohormonas

Las vías de síntesis del ácido indolacético (AIA) descriptas para *Pseudomonas* spp., tienen en común el uso de triptófano como precursor inicial. Los genes involucrados en estas rutas no se encontraron en el genoma de C119. Sin embargo, cuatro genes fueron clasificados por el programa RAST como parte de un subsistema involucrado en la síntesis de AIA de forma independiente del Trp. El grupo de genes codifica para el complejo Trp-sintasa (cadenas alfa y beta), la indol-3-fosfato sintetasa y la antranilato-fosforibosil transferasa. También presenta un gen que codificaría para una posible proteína de unión a la auxina, cuya ubicación está alejada en el genoma. Esta vía independiente de Trp utilizaría el indol-3-glicerol fosfato o el indol como precursor para obtener AIA (Figura 3.23). La existencia de esta vía ha sido demostrada en *Azospirillum brasilense* y algunas plantas como principal vía de síntesis de AIA.

De acuerdo a la anotación realizada en el RAST no existirían vías de síntesis de otras fitohormonas como por ejemplo giberelinas y citoquininas.

La cepa C119 presenta en su genoma un gen que codificaría para una proteína de 302 aminoácidos, la cual presenta una gran homología con enzimas del tipo 1-aminociclopropano-1-carboxilato desaminasa (ACC desaminasa). Cuando se comparó la secuencia aminoacídica con otras ACC desaminasas encontradas en PGPR y cuya actividad de clivado del precursor del etileno ha sido confirmada, se observó una baja homología (23%) (Figura 3.24). Estas enzimas están codificadas por el gen *acdS,* el cual se ha utilizado como blanco de *screening* mediante PCR, en la búsqueda de bacterias capaces de expresar dicha actividad. Un ejemplo es la ACC desaminasa encontrada en la cepa promotora *Pseudomonas* sp. UW4. Esta cepa presenta el gen *acdS* y un regulador *acdR* característico ubicado

corriente arriba del anterior en la cadena de ADN. La cepa C119 carece de los genes que codifican para dicho regulador. El análisis de dominios conservados (COG) mostró que ambas enzimas pertenecen a la familia de sintasas de la subunidad β del triptófano, compuesto por enzimas dependientes del cofactor piridoxal fosfato. El análisis *in sílico* de la estructura proteica predicha a partir de la secuencia de aminoácidos mediante Raptor-X (http://raptorx.uchicago.edu/) mostró que la enzima codificada en el genoma de la cepa C119 presenta un sitio de unión al sustrato con especificidad para el ácido N-piridoxil-1-aminociclopropanocarboxílico-5-monofosfato. El mismo análisis sobre la proteína AcdS (de *Pseudomonas* sp. UW4) presentó especificidad al piridoxal fosfato (Figuras 3.25 y 3.26).

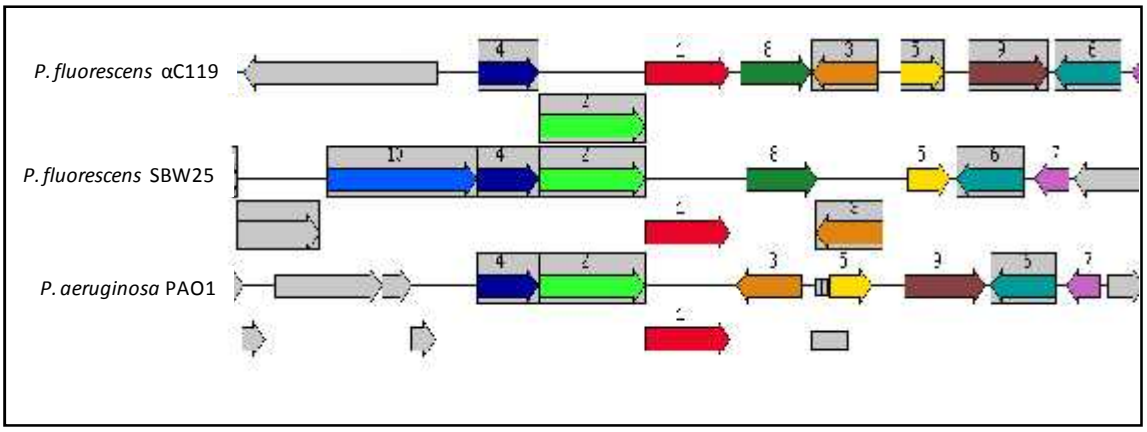


Figura 3.23- Región del genoma que contiene genes posiblemente involucrados en la síntesis de AIA por una vía independiente de triptófano. Comparación con genomas de *P. fluorescens* SBW25 y *P. aeruginosa* PAO1. Los genes con secuencias similares entre las tres cepas se agrupan con el mismo color y número. Los genes cuyas posiciones relativas son conservadas en al menos cuatro especies diferentes se encuentran funcionalmente conectados y se resaltan con un recuadro gris. Identidad de los genes: **(1)**Indol-3-glicerol fosfato sintasa; **(2)**Antranilato fosforibosil transferasa; **(3)** Vfr regulador transcripcional/Proteína receptora de AMP cíclico;**(4)**Para-aminobenzoato sintasa (componente amidotransferasa); **(5)** Proteína de la familia OsmC/Ohr, **(6)**hidroxilasa no caracterizada; **(7)**Hidrolasa de la familia HIT; **(8)**Lipoato-proteina ligasa A;**(9)** pro enzima S-adenosilmetionina descarboxilasa.

La actividad ACC desaminasa puede evidenciarse mediante ensayos *in vitro*, haciendo crecer al microorganismo en un medio con ACC como única fuente de nitrógeno, con los controles adecuados.

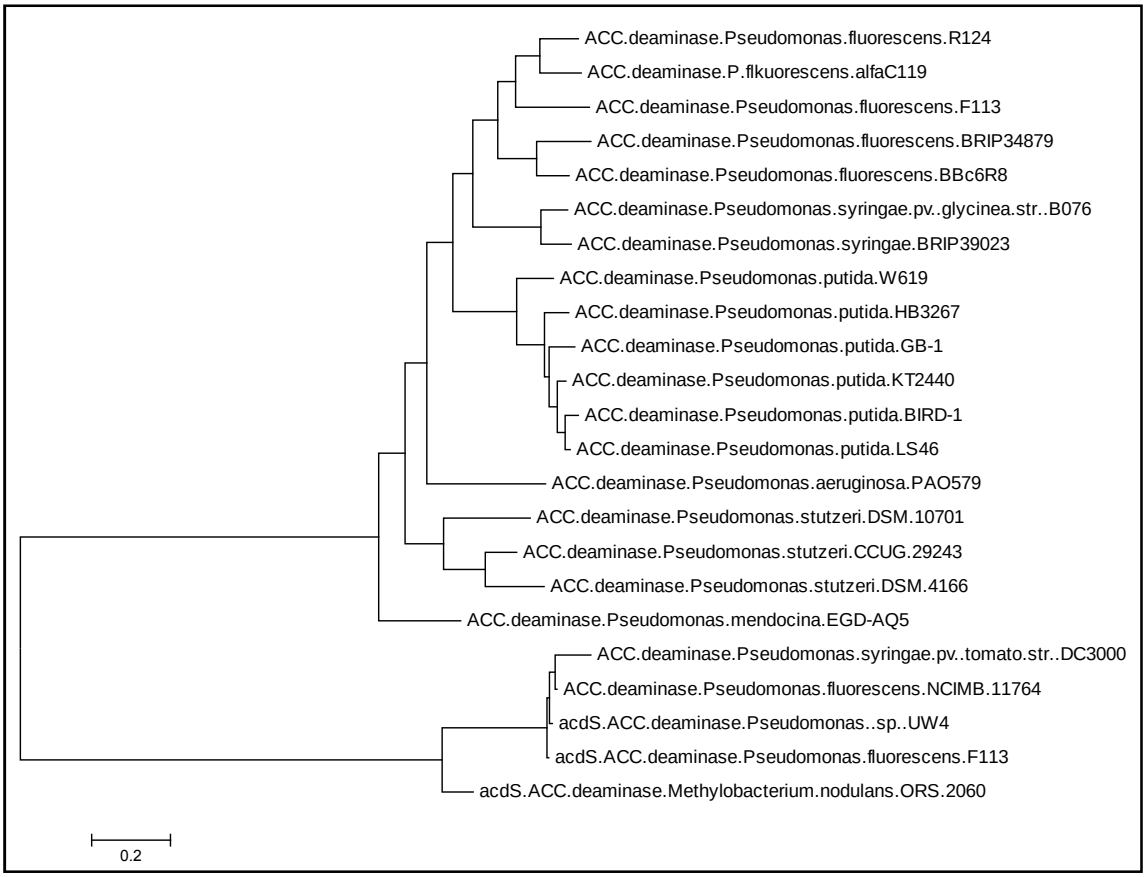


Figura 3.24- Análisis filogenético de enzimas con posible actividad ACC desaminasa. Las enzimas caracterizadas que presentan dicha actividad se indican como acdS.

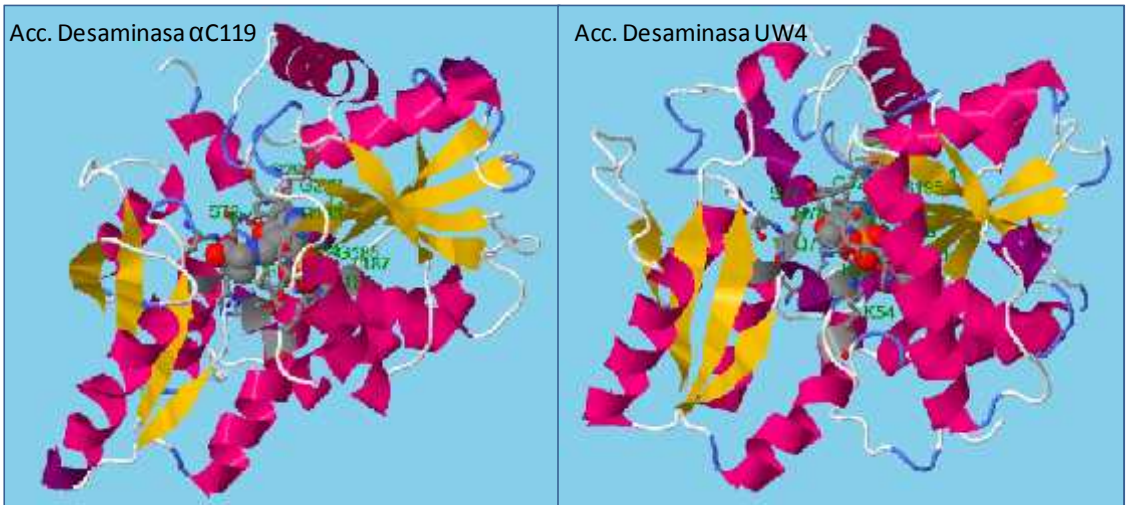


Figura 3.25- Predicción de la estructura tridimensional de enzimas ACC desaminasas a partir de la secuencia de aminoácidos. Cada una de las enzimas presenta su ligando en el sitio activo:N-piridoxil-1-aminociclopropano-5-monofosfato para la ACC desaminasa de la cepa C119 y piridoxal fosfato para la ACC desaminasa de la cepa *Pseudomonas* sp.UW4.

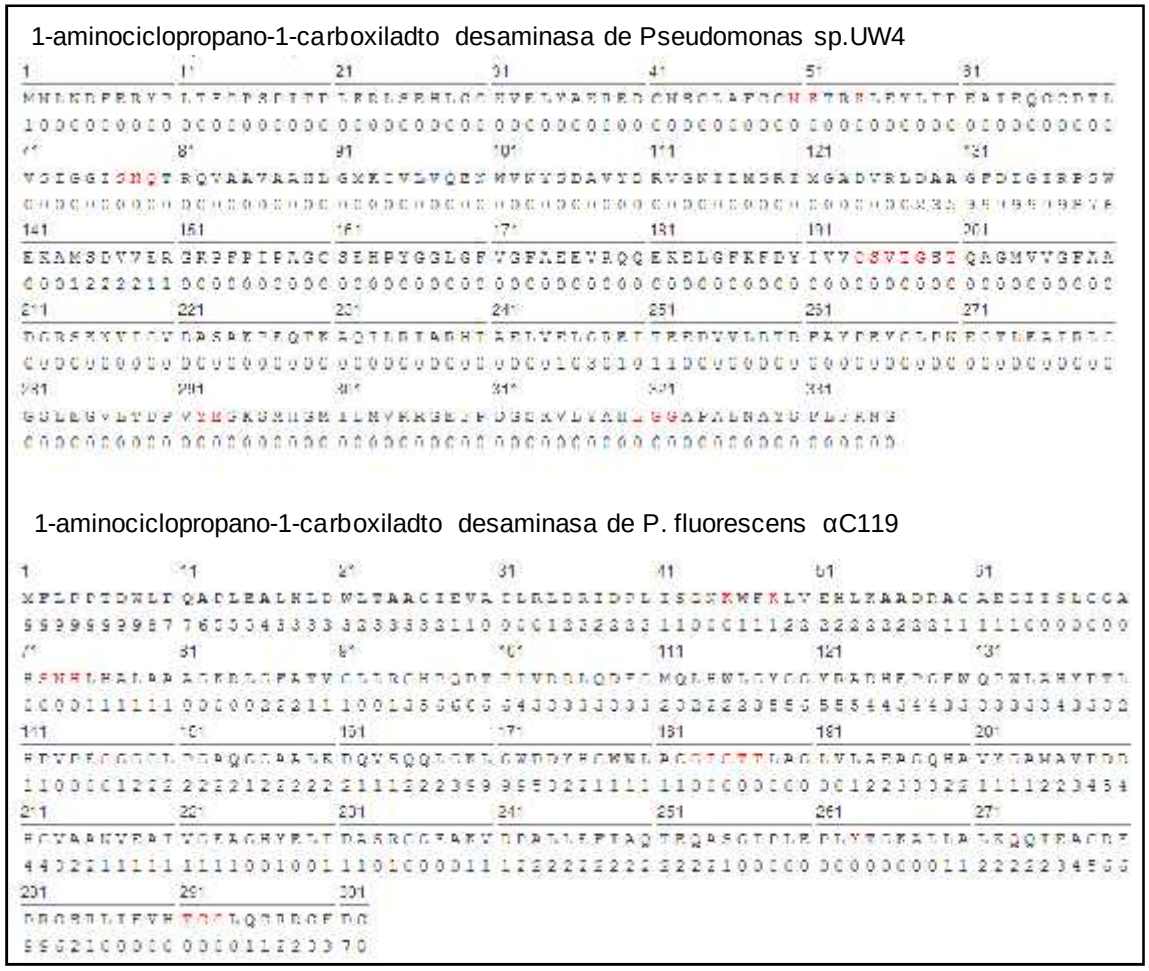


Figura 3.26-Secuencia aminoacídica de enzimas ACC desaminasas las cepas de *Pseudomonas* C119 y UW4. En la primera línea se indica la posición de los residuos, en la segunda línea la secuencia, en la tercera línea se indica el error estimado (en Å) para el modelo 3D y en rojo se indican los aminoácidos clave del sitio de unión al sustrato de acuerdo al análisis mediante el programa RaptorX.

3.4–2.2 Solubilización de fósforo

Existen diversos mecanismos por medio de los cuales un microorganismo puede solubilizar formas orgánicas e inorgánicas de fosfato. En el genoma de la cepa C119 se pudo determinar la presencia del gen que codifica para una glucosa deshidrogenasa dependiente del cofactor pirroquinolina quinona (pqq) y de los genes necesarios para la síntesis de este cofactor (figura 3.27). Esta enzima es responsable de la producción de ácido glucónico, el principal ácido orgánico involucrado en la solubilización de fosfato inorgánico. Este podría ser el mecanismo mediante el cual la cepa C119 es capaz de solubilizar fosfato tricálcico, como fue observado en ensayos *in vitro*. El gen *pqqC,* presente en

la vía de síntesis del cofactor, ha sido exitosamente utilizado como marcador para estudios filogenéticos de *Pseudomonas* solubilizadoras de fosfato. Por otra parte, la búsqueda de genes homólogos a *phyC*, que codifica para una fitasa involucrada en la mineralización de fosfato orgánico, no dio resultados positivos.

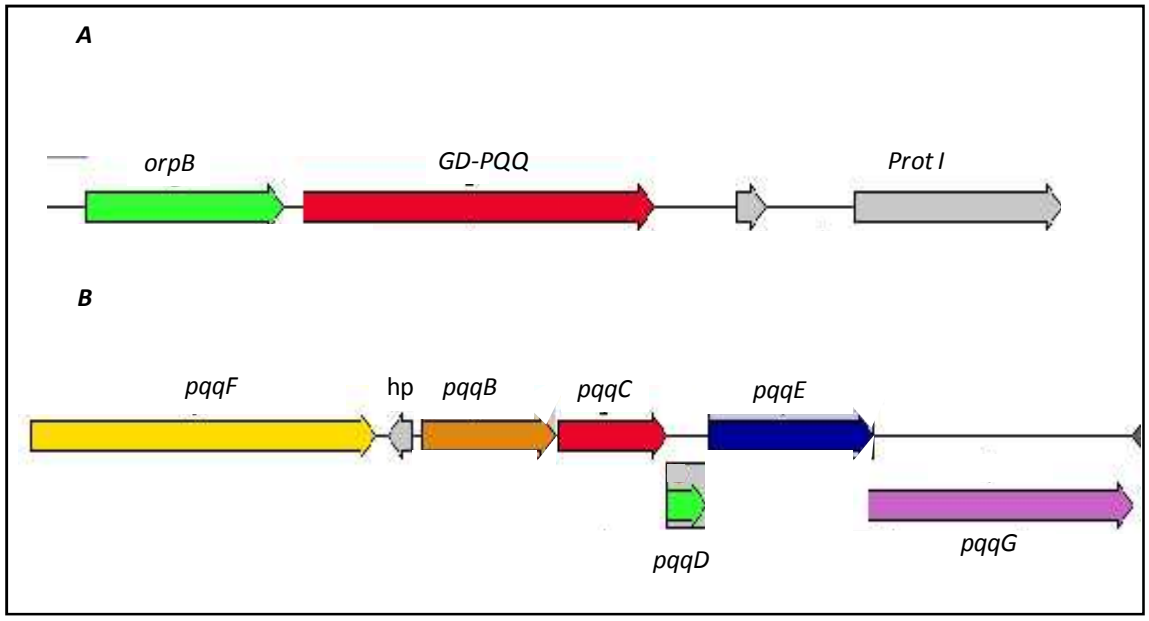


Figura 3.27- Diagrama de los genes necesarios para la síntesis de la enzima glucosa deshidrogenasa dependiente de PQQ (GD-PQQ). (A) Gen para la GD-PQQ (rojo), una porina con selectividad para glucosa, *orpB* (verde). (B) Operón de síntesis de la coenzima PQQ: *pqqFBCDEG* junto a dos proteínas hipotéticas (hp).

3.4–4 Genes de resistencia a estreses bióticos y abióticos

Además de producir compuestos antimicrobianos esta cepa sería capaz de tolerar diversos antibióticos para los cuales presentó genes de resistencia. Se identificaron genes que codificaban para enzimas que inactivan antibióticos, para diversos sistemas de exportación activa de multidrogas y regiones determinantes de resistencia que hacen que el blanco del antibiótico no pueda ser atacado (Tabla 3.8)

También se identificaron genes que podrían estar involucrados en la tolerancia a diversos tipos de estrés abióticos tales como estrés hídrico y presencia de metales pesados. En este sentido se encontraron genes que codifican para dos vías de síntesis de trehalosa, un disacárido de glucosa que puede actuar

Tabla 3.8. Sistemas de resistencia a antibióticos presentes en la cepa C119

Gen	Resistencia	Rol funcional	Descripción
ivY	Lisozima	Inhibidor del precursor de la lisozima de vertebrados	Uno de varios genes responsable de la síntesis de inhibidores de lisozima de proteobacterias
vanW	Vancomicina	Proteína de Resistencia a vancomicina tipo B	Forma parte del operón de resistencia a vancomicina. El resto de los genes del operón están ausentes
Fosa	Fosfomicina	Proteína de resistencia a fosfomicina	Esta enzima cataliza la adición de glutation al C1 del oxirano de la fosfomicina
parC *pare*	Fluoroquino-lonas	subunidades A y B de la topoisomerasa IV	Enzimas conteniendo regiones determinantes de la resistencia a fluoroquinolonas.
gyrA *gyrB*		Subunidades A y B de la girasa de ADN	
BL	Betalactámi-cos	β- lactamas	Hidrólisis del anillo β-lactámico en antibióticos betalactámicos
BLc		β-lactamasa clase C	
BLI		hidrolasa dependiente de metales de la superfamilia 1 de β-lactamasas	
MFP/IM/ OM	Multi-drogas	IM: componente integral de membrana; OM: comp. exterior de membrana y MFP: proteína periplasmática accesoria.	Bomba de eflujo que confiere resistencia a diversas drogas Sistema tripartita de eflujo a través de dos membranas en bacterias Gram (-) Se detectaron 6 sistemas en todo el genoma
cmeA *cmeB* *cmeC*	Multi-drogas	cmeA: Prot. integral de membrana; cmeB prot. interior de membrana; lipoprot. Exterior de membrana	Sistema de eflujo RND, bomba dependiente del gradiente electroquímico de protones
mexD *mexC* *nodT* *nfxB* *mexT*	Multi-drogas	mexD: prot. transportadora; mexC: prot. de membrana; nodT: lipoproteína exterior de membrana; tetR y mexT: reguladores transcripcional	Sistema de eflujo RND, bomba dependiente del gradiente electroquímico de protones. Se identificaron 2 sistemas en el genoma uno regulado ptetR y otro por mexT
macA *macB*	Macrólidos	maca: prot. específica de eflujo de macrólidos; macB: permeasa/prot. exportadora de macrólidos de unión al ATP	Sistema de eflujo específico para macrólidos
ydhE *norM*	Multi-drogas y toxinas	Bomba de extrusión de antimicrobianos y toxinas	Sistema antiporte que utiliza Na^+ para eliminar compuestos tóxicos (familia MATE). Se encontraron tres sistemas en el genoma
acrB	Acriflavina	Prot. de resistencia a acriflavina	Transportador tipo NRD

como osmoprotector, manteniendo las estructuras de las enzimas, proteínas y lípidos, frente a estreses hídrico, salino y bajas temperatura. Las vías de síntesis presentes en el genoma de C119 son la vía trehalosa sintasa (Tres) y la vía TreY-TreZ (Figura 3.28). La vía Tres involucra la conversión de maltosa en trehalosa mediante la trehalosa sintasa (TreS), mientras que la vía TreY-TreZ involucra la conversión de maltodextrina en malto-oligosiltrehalosa por la malto-oligosiltrehalosa sintasa (TreY) y ésta en trehalosa por la malto-oligosiltrehalosa hidrolasa (TreZ).

La cepa poseía genes de síntesis de glucanos del periplasma (Tabla 3.9) y de síntesis e internalización de colina y betaína (Tabla 3.10), todos ellos compuestos osmoprotectores sintetizados en condiciones de estrés. También presenta el gen de la enzima ácido L-2,4-diaminobutírico transaminasa presente en la vía de síntesis de ectoína pero no se identificaron otros genes necesarios para completar la vía biosintética.

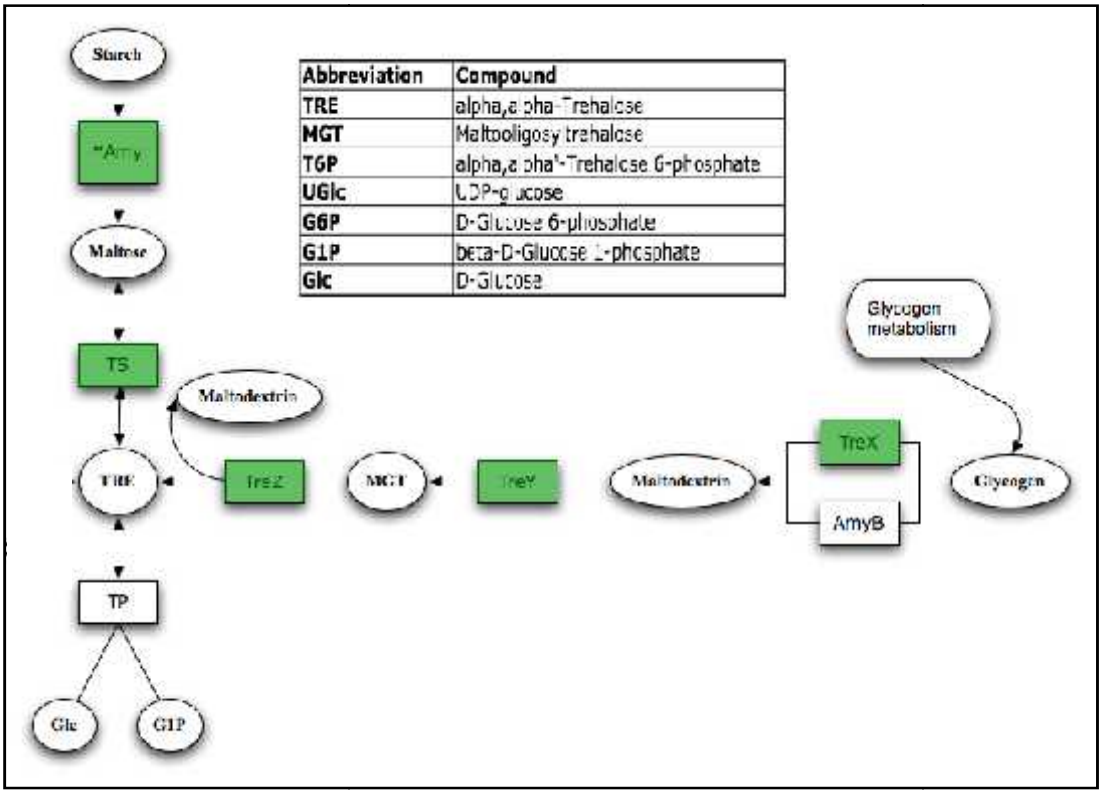
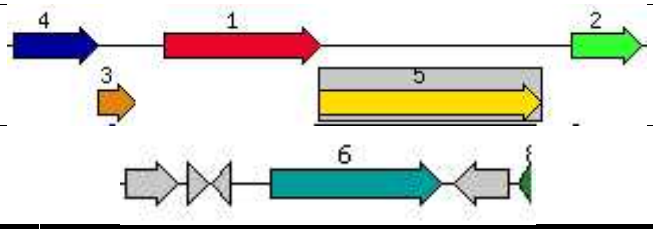


Figura 3.28- Vías de biosíntesis de trehalosa presentes en la cepa *P. fluorescens* C119. Las enzimas cuyos genes codificantes están presentes en el genoma se resaltan en verde.

Tabla 3.9. Esquema e información de los genes involucrados en la síntesis de glucanos periplasmáticos (los genes dentro de un recuadro gris indican posiciones relativas conservadas entre varias especies).

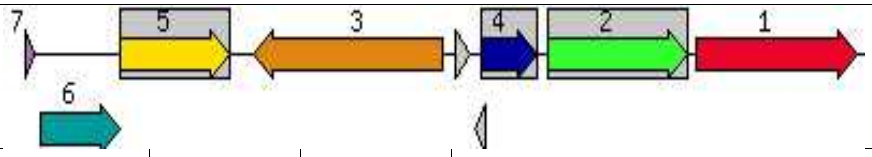


Nº	Tamaño (nt)	Hebra	Proteína*	Función**
1	2571	-	MdoH	Glucosil transferasa H de la síntesis de glucanos (EC 2.4.1.-)
2	1785	-	MdoG	Precursor de la proteína G de biosíntesis de glucanos
3	804	-		Transportador ABC de aminoácidos, proteína periplasmática de unión a aa
4	438	-		D-tirosil-tRNA(Tyr) deacilasa
5	972	-		Prolina iminopeptidasa (EC 3.4.11.5)
6	1629	+	MdoD	Precursor de la proteína D de biosíntesis de glucanos

* Las proteínas conocidas se indica su nombre más usual
**Se indica el número EC (Enzyme Commission numbers) de las enzimas, cuando corresponde

Finalmente, se encontraron genes que confieren tolerancia frente a diversos compuestos tóxicos, entre ellos metales pesados tales como cromo, cadmio, cobre, zinc, cobalto y arsénico (Tabla 3.11). La resistencia a altos niveles de estos metales podría permitir la promoción del crecimiento de plantas destinadas a la biorremediación de suelos contaminados con estos metales, facilitando su absorción por las raíces.

Tabla 3.10. Operón conteniendo los genes necesarios para la síntesis de betaína y la internalización de colina y betaína (los genes dentro de un recuadro gris indican posiciones relativas conservadas entre varias especies).



Nº	Tamaño (nt)	Hebra en que está codificado	Proteína*	Función**
1	1704	+		Colina deshidrogenasa (EC 1.1.99.1)
2	1473	+		Betaína aldehido deshidrogenasa (EC 1.2.1.8)
3	1998	-	BetT	Proteína BetT, de uptake de colina de alta afinidad
4	594	+	BetI	Regulador transcripcional tipo HTH, BetI
5	1179	+	ProV	Sistema de transporte ABC de L-prolina, glicina betaína; permeasa ProV (TC 3.A.1.12.1)
6	846	+	ProW	Sistema de transporte ABC de L-prolina, glicina betaína; permeasa ProW (TC 3.A.1.12.1)
7	948	+	ProX	Proteína ProX de unión al transportador ABC de L-prolina glicina betaína
8	156	+		Proteína hipotética
9	114	-		Proteína hipotética

* Las proteínas conocidas se indica su nombre más usual
**Seindica el número EC (Enzyme Commission numbers) de las enzimas, cuando corresponde
*** Subsistemas al que pertenece el gen según lo identifica el programa RAST

Tabla 3.11. Genes de tolerancia a metales pesados encontrados en el genoma de la cepa *P. fluorescens* C119. Se indican con el mismo color los genes que posiblemente estén formando un operón.

Metal	***Genes de tolerancia***	***Proteína***
CROMO	*chrA*	Proteína transportadora de cromo
COBRE	*cute*	Proteína de homeostasis del cobre
	corC	Bomba de cobalto y magnesio
	CRTR	Regulador transcripcional
	CIA	Translocador de cobre ATP dep.
	copZ	Chaperona de cobre
	cflA	Transportador multidroga
	CSA	Bomba de cobre y plata dependiente de ATP
	MO	Oxidasa multicobre
	CRD	Proteína C de resistencia al cobre
	CRB	Proteína B de resistencia al cobre
	copCp	Precursor de la proteína C de resistencia al cobre
	CT	Proteína de tolerancia al cobre
	ccmL/H/F	Subunidades L, H y F de la citocromo liasa
ARSENICO	*arsR*	Represor del operón de resistencia al arsénico
	ArsB	Bomba de eflujo de arsénico
	ArsC	Arsenato reductasa
	ArsH	Proteína de resistencia al arsénico
COBALTO, ZINC Y CADMIO	*CzcD*	Proteína CzcD de resistencia a cobalto Zinc y cadmio
	CzcA	Proteína CzcA de resistencia a cobalto Zinc/Nikel y cadmio
	cusB/czcB	Posible sistema de eflujo de Co, Zn y Cd
	CzcC	Bomba NRD de eflujo de metales pesados
	Cusa	Bomba de eflujo de cationes

3.4-5. Genes relacionados con patogenicidad y factores de virulencia

Se analizó la presencia de genes que potencialmente codificarían para factores de virulencia presentes en especies de *Pseudomonas* patógenas de animales y plantas. Los genes *plcS* y *toxA,* que codifican para el precursor de la fosfolipasa C hemolítica y para el precursor de la exotoxina A respectivamente, están presentes en la cepa patógena *P. aeruginosa* PAO1. Se ha demostrado que estos genes están involucrados en la patogenicidad tanto hacia animales como hacia plantas (Rahme et al. 1995). No se identificaron genes homólogos en el genoma de la cepa C119. Tampoco se encontraron genes homólogos a *las*B*,* que codifica para la elastasa LasB, una potente metaloproteasa presente en varias cepas patógenas de *P. aeruginosa* (Rahme et al. 2000). El sistema de secreción de proteínas de tipo III tiene la función de introducir proteínas desde la bacteria patógena hacia el citosol de la célula huésped. Este sistema altamente especializado está presente en muchas bacterias patógenas Gram negativas (Galán 1999). La cepa C119 no presentó genes homólogos a aquellos que codifican para ese sistema de secreción. Sí presentó genes para los sistemas de secreción del tipo II y IV, posiblemente vinculados con el ensamblado del pili, dado el entorno genético en el cual se hallan.

3.5 discusión

3.5-1 Generalidades del genoma de la cepa *P. fluorescens* C119 y confirmación de la especie

El genoma de la cepa *P. fluorescens* C119 se secuenció con la finalidad de analizar la presencia de genes involucrados en las características promotoras del crecimiento vegetal observadas en ensayos previos sobre plantas de alfalfa (Capítulo 2). Dado que posee un gran potencial para su aplicación como biofertilizante y biofungicida, resulta de gran interés conocer en profundidad los mecanismos por los cuales ejerce su efecto benéfico, a efectos de mejorar su eficiencia e identificar posibles riesgos e incluso descubrir nuevas aplicaciones.

Actualmente existen 28 genomas de cepas de *Pseudomonas fluorescens* completamente secuenciados, que en su mayoría corresponden a cepas que han sido estudiadas por sus características promotoras del crecimiento vegetal. El genoma de la cepa C119 presenta un tamaño y contenido en GC similares a dichos genomas. Por otra parte, el número de tRNAs identificados es inferior a los reportados para otras *P. fluorescens* (Loper et al. 2012). Esto probablemente sea debido al alto número de *contigs* en los cuales está subdividido el genoma de C119. De las 5762 secuencias codificantes identificadas el 20% no pudo ser adjudicada a una función conocida (Figura 3.4) y por lo cual 1143 entradas fueron descriptas como proteínas hipotéticas. Este número es comparable a los encontrados en otros genomas de *Pseudomonas* spp. En dichos genomas se ha determinado, además, que entre 850 y 1000 de dichas secuencias constituyen genes conservados (Loper et al. 2012). Estos genes aún no identificados dejan un gran margen para el descubrimiento de actividades aún no caracterizadas en esta especie.

Desde la década del 70 los métodos de hibridación ADN-ADN y la secuencia del gen 16SrRNA han sido los mecanismos para delinear las especies bacterianas. Se consideran como grupos las especies bacterianas que presentan un grado de hibridación ADN-ADN del 50-70% y una identidad de secuencia del gen 16S ARNr superior al 97% (Coenye et al. 2005). En el caso del género *Pseudomonas*, uno de los más diversos, el análisis del gen que codifica para el 16S ARNr muchas veces no alcanza la resolución suficiente como para diferenciar entre dos especies cercanas (Yamamoto et al. 2000). Dado que una

misma cepa bacteriana puede presentar varios genes para el 16S ARNr, es necesario conocer la secuencia de cada uno de ellos para confirmar la identidad de la bacteria por ese método (Rajendhran & Gunasekaran 2011). A medida que aumente el número de secuencias de genomas completos, el análisis taxonómico basado en el 16S ARNr será más preciso. Diversos estudios han demostrado que el análisis de las secuencias de otros genes, de tipo *housekeeping*, como por ejemplo *recA, atpD, carA, gyrB, rpoB,*y *trpB* puede utilizarse en forma complementaria para clasificar una especie bacteriana (Hilario et al. 2004). Estos genes fueron seleccionados debido a que cumplían con ciertos criterios: i) tenían una amplia distribución entre los genomas, ii) estaban presentes en única copia, iii) presentaban un largo que permitía obtener suficiente información y se secuenciaban de manera sencilla (900-2250pb) y iv) podían predecir con precisión y exactitud la relación del genoma entero (Zeigler 2003). El análisis multilocus utilizando estos genes demostró ser una buena herramienta para estudiar la filogenia del género *Pseudomonas* (Mulet et al. 2010). El análisis filogenético de dichos genes confirmó que la cepa C119 pertenece a la especie *P. fluorescens* ya que en todos los casos los genes estudiados se agruparon con genes provenientes de cepas de esa especie (Figuras 3.5 a 3.9). Sumado a esto, un análisis de mapeo completo comparando todo contra todo entre el genoma de la cepa C119 y el genoma de la cepa *P. fluorescens* Pf0-1 mostró un 70% de similitud entre los genomas (datos no mostrados).

3.5-2 Genes relacionados con el control biológico de patógenos

3.5-2.1 Síntesis de sideróforos

El hierro es un nutriente esencial para las plantas y los microorganismos, sin embargo la mayoría del hierro presente en el suelo se encuentra precipitado en forma de óxidos, no asimilables por estos organismos. La producción de sideróforos, en bacterias, hongos y plantas, permite quelar el ión Fe^{3+} con gran afinidad, e internalizar la molécula mediante receptores específicos para los complejos hierro-sideróforos (Lemanceau et al. 2009). La competencia por el nutriente a nivel de los microorganismos rizosféricos fue uno de los primeros mecanismos de control biológico descriptos (Kloepper et al. 1980). El control se basa en el hecho de que en general los sideróforos bacterianos presentan una mayor

afinidad por el hierro que sus contrapartes de origen fúngico (Compant et al. 2005; Saharan & Nehra 2011).

La cepa C119 posee dos operones para la síntesis completa de una pioverdina, sus receptores y transportadores (Tabla 3.4). Uno de los operones, ubicado en el *Scaffold* 38, presentó el gen (*pvdL*) que codifica para una NRPS involucrada en la síntesis del cromóforo. El otro operón presentó genes que codifican para NRPS involucradas en la síntesis de la cadena peptídica y se ubicó en el *Scaffold* 25. La organización modular de las NRPS permitió predecir el número, la configuración y en muchos casos la identidad de los aminoácidos que conforman la estructura. Para el dominio peptídico, la secuencia de aminoácidos predicha se asemejó a la presente en la pseudobactina, un sideróforo producido por *Pseudomonas* sp. B10 (Ambrosi et al. 2000) (Figura 3.11). Para determinar si el sideróforo de la cepa C119 es una pseudobactina debería confirmarse la estructura del cromóforo. Los tres aminoácidos que conforman el cromóforo no pudieron identificarse con precisión. El gen *pvdL* es muy conservado en la especie *P. aeruginosa*, pero no así en *P. fluorescens* (Figura 3.12). El gen *pvdL* más cercano al de la cepa C119 pertenece a la cepa *P. fluorescens* Pf0-1. El sideróforo de esta cepa no ha sido caracterizado aún, pero de acuerdo a los genes presentes en su genoma no se trataría de una pseudobactina, ya que el motivo peptídico presenta 9 aminoácidos.

Además de los genes de síntesis para los distintos dominios que componen el sideróforo, se identificaron genes reguladores dentro del entorno genómico. Por ejemplo, adyacente al gene de síntesis del cromóforo se encontró el gen *pvdS* que codifica para un factor sigma. Este pertenece a la familia de factores de función extracitoplasmática, observado en otros genes de síntesis de sideróforos de *Pseudomonas* sp. (Mossialos et al. 2002; Moon et al. 2008). El análisis transcriptómico de la cepa *P. protegens* Pf-5 demostró que este gen es uno de los más expresados en condiciones de deficiencia de hierro (Lim et al. 2012). Por su parte, el operón de síntesis de la cadena peptídica también presentó un gen adyacente que codifica para un factor sigma, el gen *fpvI*. Este regulador también es activado en ausencia de hierro en la cepa Pf-5. Por otra parte, en presencia de hierro, tanto la síntesis de sideróforos como la de sus receptores son reprimidas por la proteína represora FUR (*ferric uptake regulation protein*). El genoma de C119 presentó un gen que codifica para una proteína de la familia FUR (Anexo 3),

por lo cual el principal sistema de regulación de la síntesis de sideróforos estaría completo en la bacteria.

La cepa C119 podría ser capaz de internalizar el ión ferrico a través de sideróforos heterólogos, producidos por bacterias que cohabitan el mismo nicho ecológico dado que presentó en su genoma genes que codifican para receptores de Fe-ferricromo y hemina (datos no mostrados). La capacidad de utilizar sideróforos de otros microorganismos aumenta la competitividad por dicho nutriente en la rizósfera (Loper & Henkels 1999)

Estudios previos demostraron que la cepa C119 es capaz de antagonizar *in vitro* al *oomicete P. debaryanum* y a los hongos fitopatógenos *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum.* La competencia por hierro tiene gran incidencia en el antagonismo observado en los ensayos *in vitro* dado que en presencia de metal el efecto inhibidor se veía reducido (Yanes 2007).

3.5-2.1 Compuestos antimicrobianos

El genoma de *P. fluorescens* C119 posee genes que codifican para la síntesis de metabolitos secundarios antifúngicos descriptos en varias cepas de *Pseudomonas* spp. biocontroladoras (Weller 2007). Se identificaron genes para varias NRPS, una de las cuales estaba involucrada en la síntesis de un lipopéptido. También se identificaron los genes para la síntesis de HCN, bacteriocinas, proteasas y quitinasas que podrían participar en la inhibición de microorganismos competidores a nivel de la rizósfera.

i) Lipopéptido cíclico

Se identificó un operón conteniendo genes para NRPS y cuyas características corresponden a los operones de NRPS descriptos para la síntesis de lipopéptidos cíclicos en *Pseudomonas* spp. Estas características son la presencia de un dominio de condensación en el módulo inicial, cuya función sería la acilación del primer aminoácido de la molécula, la presencia de dos dominios tioesterasas terminales ubicados en tándem y la presencia de dominios duales de condensación/epimerización (de Bruijn et al. 2007) (Figura 3.13).

El análisis informático permitió predecir la secuencia de aminoácidos que conforma parte de la estructura del lipopéptido (Tabla 3.5). De esta manera se determinó que el compuesto es un nuevo lipopéptido cíclico diferente a los descriptos hasta el momento en *Pseudomonas* spp. La secuencia de aminoácidos predicha es la siguiente: Leu-Asp-Thr-Leu-Leu-Gln-Leu-Ile. El análisis filogenético de los dominios de adenilación permitió confirmar la selectividad de cada dominio y por ende la identidad de los aminoácidos de la cadena peptídica (Figura 3.14). La configuración de los aminoácidos también pudo predecirse en base al análisis filogenético de los dominios con función dual condensación/epimerización (Figura 3.15). Estos dominios actúan sobre el aminoácido ingresado en el módulo previo (Rokni-Zadeh et al. 2012). Por lo tanto, se determinó que solamente los residuos en las posiciones 7 y 8 estarían en su configuración L, mientras que el resto serían transformados en sus epímeros D luego de ingresados en la línea de ensamblaje.

Al final de la tercera NRPS se identificaron los dos dominios tioesterasas (TE). Estos dominios son los responsables de liberar el lipopéptido de la sintetasa y de la ciclación del producto final. El análisis de los dominios TE, involucrados en la síntesis de artrofactina, mostraron que ambos son funcionales y necesarios para la síntesis del compuesto (Roongsawang et al. 2007). Las NRPS del lipopéptido de C119 presentó ambos dominio TE por lo cual posiblemente el producto forme un anillo lactónico característico de los lipopéptidos cíclicos de *Pseudomonas.* .

El entorno genético de los genes de las NRPSs presentó una organización similar a los operones de síntesis de lipopéptidos descriptos en otras *Pseudomonas* (Figura 3.16 y Tabla 3.6). Por ejemplo se identificaron dos genes que codifican para reguladores transcripcionales de tipo LuxR, dos transportadores de tipo RND (de *resistance-nodulation-cell division*) homólogos a sistemas de eflujo RND de *Ralstonia solanacearum*, dos genes homólogos a *mac*A y *mac*B de *E. coli* y un transportador tipo ABC. Los genes que codifican para reguladores de tipo *luxR* se ubican adyacentes a ambos lados de los genes biosintéticos. Un análisis de los genes implicados en la síntesis de xantolisina, en *P. putida* BW11M1, demostró que una mutación el gen regulador del tipo *luxR* ubicado corriente arriba de los genes de biosíntesis, impedía la producción del compuesto. Por otra parte, numerosas investigaciones han demostrado que el principal sistema que regula la transcripción de los lipopéptidos en

Pseudomonas spp. es el sistema de dos componentes GacS/GacA (Koch et al. 2002; Dubern et al. 2008; Raaijmakers et al. 2006; Roongsawang et al. 2010). Este sistema consiste en una proteína kinasa sensora (GacS) y de una proteína de respuesta reguladora (GacA) y funcionaría en un nivel superior a LuxR. El mecanismo propuesto para este sistema es que la proteína sensora GacS se autofosforilaría frente a un estímulo ambiental, que no ha sido bien definido aún y luego activaría a la proteína de respuesta GacA mediante transfosforilación. Esta proteína fosforilada a su vez activaría genes reguladores ubicados por debajo en la cascada de respuestas, como por ejemplo los genes *luxR* (Roongsawang et al. 2010). Una búsqueda mediante BLAST en el genoma de la cepa C119 permitió identificar genes con una alta homología para este sistema de dos componentes (Anexo 3).

Mediante estudios de mutagénesis se han identificado otros genes que regulan de alguna manera la síntesis de los lipopéptidos de *Pseudomonas,* como por ejemplo proteínas de choque térmico y una serin proteasa (Washio et al. 2010; Dubern et al. 2008; de Bruijn & Raaijmakers 2009). Existen homólogos a estos genes en el genoma de la cepa C119, pero para determinar si tienen alguna implicancia en la síntesis del lipopéptido deben ser inactivados por mutagénesis y luego analizar el fenotipo de las mutantes.

Los sistemas de transporte de tipo ABC, RND y MacA/MacB encontrados en el operón junto con los genes de síntesis del lipopéptido de C119, también se han descripto en otras *Pseudomonas*. Varias investigaciones indican que todos estos sistemas aportarían en distinta medida al transporte de los lipopéptidos hacia afuera de la célula productora. Una mutación en el gen del transportador ABC eliminaba casi completamente la presencia de sirigomicina y siringopeptina en *P. syringae pv syringae* (Grgurina et al. 1996), mientras que mutaciones en los transportadores de tipo RND disminuían entre un 40 y 60% la presencia de los compuestos (Kang & Gross 2005). Por otra parte, la mutación en el transportador ABC, presente en el operón de síntesis de artrofactina de la cepa de *Pseudomonas* MIS38, generaba una disminución transitoria del compuesto, que luego de 12 h alcanzaba niveles similares a la cepa salvaje. Sin embargo, el tratamiento con inhibidores de transportadores ABC eliminaba casi totalmente la exportación del compuesto (Lim et al. 2009). Esto indicaría que múltiples transportadores ABC podrían estar implicados en la exportación de artrofactina. Las proteínas MacA y MacB también

aportan al transporte de lipopéptidos como pudo comprobarse en la cepa *P. putida* PCL1445 productora de putisolvina (Dubern et al. 2008). Ambas proteínas junto a la proteína de membrana externa TolC forman un sistema de eflujo específico para macrólidos. En este sentido, se identificó un gen que codificaría para una proteína homóloga a TolC en el genoma de C119 ubicado en un *contig* distinto del que presentó el operón de síntesis del lipopéptido (Anexo 3).

ii) Ácido cianhídrico

La cepa C119 presentó los genes *hcnABC* que codifican para la HCN sintasa responsable de la síntesis de ácido cianhídrico. Los genes presentaron similitud respecto a los encontrados en otras especies de *Pseudomonas* en especial con cepas de la especie *P. fluorescens* y *P. protegens* biocontroladoras (Figura 3.19) .La producción de HCN es uno de los principales mecanismos con el cual la cepa *P. protegens* CHA0 ejerce el biocontrol sobre patógenos causantes de la podredumbre negra de raíz del tabaco y del *take-all* del trigo (Keel et al. 1992). Las mutantes en los genes de biosíntesis del HCN veían reducida su capacidad biocontroladora. Aunque el efecto biocontrolador de este compuesto volátil ha sido comprobado, su función fisiológica en la bacteria productora aún es incierta. Aparentemente no tiene ninguna función en el metabolismo primario. Además, presenta varias características propias de un metabolito secundario, como la producción máxima en condiciones limitantes para el crecimiento, el organismo productor presenta tolerancia y le adjudica cierta ventaja selectiva (Blumer & Haas 2000). La producción de HCN en *P. fluorescens* y *P. aeruginosa* se da principalmente en condiciones de microaerofilia y depende de la proteína ANR (regulador anaeróbico de la arginina desaminasa y la nitrato reductasa) que pertenece a la familia de reguladores de fumarato y nitrato reductasas (FNR) (Blumer & Haas 2000). Las mutantes en el gen que codifica para esta proteína presentan una diminución de la producción de HCN (Laville et al. 1998). Un gen de la familia FNR con una alta homología con la proteína ANR de la cepa cianogénica *P. protegens* CHA0 se identificó en el genoma de C119 (Anexo 3). En ambos organismos el gen para ANR se ubicó alejado del operón de síntesis de HCN.

En trabajos previos, la cepa C119 fue enfrentada a un aislamiento de *P. debaryanum* en cultivos duales *in vitro,* utilizando placas tabicadas de manera que los metabolitos difusibles no podían entrar en

contacto con el oomicete. De esta forma se pudo observar un crecimiento más lento de *P. debaryanum* respecto a la placa control, inoculada únicamente con el oomicete, debido a compuestos volátiles inhibidores producidos por C119, posiblemente HCN (Yanes 2007).

iii) Otros metabolitos antimicrobianos

Además de los metabolitos secundarios descriptos, el genoma de C119 presentó genes que codifican para la síntesis de enzimas hidrolíticas (exoproteasa y quitinasa), la bacteriocina colicina V y para metabolitos de función desconocida. La implicancia que pueda tener cada uno de estos metabolitos en la inhibición de otros microorganismos competidores dependerá de quienes sean esos microorganismos competidores y de las condiciones ambientales en las cuales se enfrenten. La secuencia de un gen que codifica para una metaloproteasa de secreción presente en el genoma de C119 posee alta homología con la secuencia de la proteasa extracelular ArpA , presente en la cepa *P. protegens* CHA0. En esta cepa, la proteasa es controlada por el sistema de transducción de señales GacS/GacA y contribuye con el control biológico del nematodo *Meloidogyne incognita* (Siddiqui et al. 2005). Las enzimas quitinolíticas y proteolíticas tienen mayor relevancia como mecanismo de control biológico en los géneros *Trichoderma* o *Bacillus* (Benítez et al. 2004; Huang et al. 2005). Sin embargo el hecho de que esté presente en el genoma de C119 amplía la gama de patógenos potenciales ante los cuales podría ejercer su efecto biocontrolador.

El genoma de C119 presentó genes para la síntesis de colicina V (Figura 3.20 y tabla 3.7), una bacteriocina que se caracteriza por no presentar modificaciones post traduccionales (Vassiliadis et al. 2011). La producción de esta bacteriocina ha sido descripta en *Enterobacteriaceae* y presenta un espectro de actividad reducido, dirigido hacia bacterias Gam-negativas filogenéticamente relacionadas (Cascales et al. 2007). A pesar de que los genes de producción de la colicina mostraron una gran conservación entre *P. fluorescens* (datos no mostrados), no existe mucha información sobre su posible función ecológica. Otras bacteriocinas producidas por *Pseudomonas* spp. como la colicina M se han propuesto como antibióticos con posibles aplicaciones en el control biológico de bacteria patógenas de plantas (Grinter et al. 2012).

El genoma de *P. fluorescens* C119 presentó operones de síntesis de metabolitos secundarios que aún no han sido descriptos. Uno de los operones codificaría para una enzima mixta de tipo NRPS/PKS (Figura 3.17). Estos genes están presentes en otras cepas de *Pseudomonas*. Un análisis del genoma de Pf0-1 permitió identificar un operón muy similar a éste, sin embargo, a la fecha, no se ha determinado el producto que sintetiza ni su posible función (Silby et al. 2009). Una mutante en un gen altamente homólogo presente en la cepa entomopatógena *P. entomophila* no afectó la virulencia hacia *Drosophila melanogaster* (Vallet-Gely et al. 2010). El otro operón de función desconocida en C119 codifica para una NRPS que también está presente en *P. fluorescens* Pf0-1. Sin embargo, estos genes no han sido caracterizados (Figura 3.18).

3.5-3 Genes relacionados con características de promoción directa del crecimiento vegetal

3.5-3.1 Síntesis y degradación de fitohormonas

Las PGPR promueven el crecimiento de las plantas por diversos mecanismos que incluyen la producción o degradación de las principales hormonas vegetales y el aumento de la disponibilidad de nutrientes. Las hormonas vegetales, ácido abscísico, auxinas (AIA), citoquininas, etileno, giberelinas, ácido jasmónico y ácido salicílico, regulan múltiples procesos fisiológicos como por ejemplo la elongación y formación de pelos radiculares. Estas hormonas interaccionan entre sí de forma compleja mediante *cross-talk* y retroalimentación (Swarup et al. 2007). Existe cada vez más evidencia de que las rizobacterias pueden modificar el estatus hormonal de las plantas (Joo et al. 2005; Ljung 2013; Ali et al. 2009; Patten & Glick 2002) y por ende afectar el desarrollo radicular de las mismas.

i) Acido indolacético

La síntesis de AIA, la auxina más importante, está muy distribuida entre *Pseudomonas* spp. fluorescentes. El AIA de origen microbiano estimula la formación de pelos radiculares y la elongación de raíces laterales. Sin embargo a altas concentraciones pueden inhibir la elongación de la raíz primaria (Duca et al. 2014). Las vías de síntesis de AIA descriptas en bacterias pueden ser dependientes o

independientes de triptófano como precursor. De acuerdo al análisis de RAST que agrupa los genes en subsistemas, existe la posibilidad de que C119 presente una vía de síntesis de AIA independiente de Trp (Figura 3.23). Esta vía estaría utilizando como precursor un intermediario de la síntesis del Trp, posiblemente indol-3-fosfato. En algunas plantas, la vía independiente de Trp parece ser la principal forma de síntesis de auxinas (Ouyang et al. 2000; Mano & Nemoto 2012). En bacterias esta vía fue reportada por primera vez en una cepa de *Azospirillum brasilense* (Prinsen et al. 1993). La cepa presentaba además dos vías de síntesis dependientes de Trp, sin embargo la vía independiente mostró ser la responsable del 90% de la auxina producida en un medio sin Trp adicionado. La vía independiente de Trp ha sido muy poco caracterizada en cuanto a las enzimas involucradas y sus intermediarios (Baca & Elmerich 2007). La confirmación de la presencia de esta vía alternativa en la cepa C119 requerirá de ensayos de determinación de AIA en medios de cultivo sin agregado de Trp. Los genes involucrados en las rutas de síntesis de AIA dependientes de Trp no se identificaron en el genoma de C119.

ii) ACC-desaminasa

El etileno es otra importante hormona vegetal que influye en procesos como la maduración de los frutos, la senescencia y la respuesta frente a condiciones de estrés. El etileno también juega un papel crucial en el desarrollo de las raíces. Tanto el etileno como su molécula precursora, el ACC, generan el aumento de los pelos radiculares, el ensanchamiento de las raíces y la inhibición del alargamiento de la células de la raíz (Swarup et al. 2007). Las rizobacterias productoras de la enzima ACC desaminasa pueden modular la concentración de etileno mediante la degradación del ACC y de esa forma disminuir el efecto inhibitorio del etileno sobre la elongación de las raíces. Este efecto promotor pudo comprobarse para diversas rizobacterias en cultivos como canola, arveja, tomate, entre otros (Penrose et al. 2001; Belimov et al. 2009; Jalili et al. 2009; Arshad et al. 2008; Cheng et al. 2007; Chen et al. 2013). La cepa C119 posee en su genoma un gen que codifica para una enzima ACC desaminasa. La proteína predicha a partir de la secuencia del gen se comparó con otras ACC desaminasas cuya actividad fue confirmada (Cheng et al. 2007). De acuerdo a su estructura estas proteínas pertenecen a la familia de la sintasas de la subunidad β del triptófano (TSβS) y son dependientes del cofactor piridoxal fosfato (PPL). A nivel de la secuencia de aminoácidos, la ACC desaminasa de C119 es distinta de las ACC desaminasas

reportadas (Figura 3.24). Sin embargo, el análisis *in silico* determinó que el sitio de unión al sustrato para esta enzima podría acomodar una molécula de PPL-ACC (Figura 3.26), por lo cual existe la posibilidad de que esta enzima sea capaz de degradar este compuesto. La enzima encontrada en la cepa C119 está muy conservada entre bacterias del género *Pseudomonas* de acuerdo al análisis de BLAST, pero su actividad deberá ser confirmada mediante ensayos *in vitro*.

3.5-3.2 Aumento de la disponibilidad de nutrientes en el suelo

La cepa C119 podría mejorar el estatus nutricional de la planta hospedera facilitando la adquisición de hierro y fósforo. Esto podría ser realizado mediante la producción de sideróforos y la solubilización de fosfato inorgánico dado que presentó genes involucrados en dichos procesos.

i) Hierro

La Cepa *P. fluorescens* C119 presentó dos operones involucrados en la biosíntesis del sideróforo pioverdina, discutido en la sección anterior. Existen evidencias de que la presencia de sideróforos eficientes en la rizósfera de las plantas no afecta negativamente el estado nutricional de la planta respecto al hierro. Por el contrario, se ha demostrado que las plantas pueden incorporar sideróforos bacterianos unidos al ion Fe^{3+}. Por ejemplo, plantas de *A. thaliana* tratadas con hierro-pioverdina mejoraron su estatus nutricional en un medio pobre en hierro. Además, el complejo Fe-pioverdina pudo detectarse mediante técnicas inmunológicas dentro de los tejidos vegetales (Vansuyt et al. 2007). Incluso se ha demostrado que las plantas serían capaces de reclutar rizobacterias productoras de sideróforos cuando se encuentran en situaciones de estrés causadas por la falta de hierro (Jin et al. 2010).

ii) Fósforo

Al igual que el hierro, el fósforo se encuentra en el suelo en formas poco asimilables por las plantas por lo cual requiere de mecanismos que permitan su solubilización para poder internalizar el nutriente. La cepa C119 presentó los genes necesarios para la síntesis de una glucosa deshidrogenasa (GD) y para el cofactor pirroquinolina quinona (pqq) requerido por la enzima para su funcionamiento. Esta enzima

actúa extracelularmente convirtiendo glucosa en ácido glucónico. La presencia del ácido orgánico disminuye el pH del medio extracelular liberando el fósforo inmovilizado en formas inorgánicas (de Werra et al. 2009). Estos genes están presentes en diversas *Pseudomonas* spp. solubilizadoras de fosfato. Mutantes en el gen de la GD y en los genes *pqqB* y *pqqE* de la cepa *P. fluorescens* F113 perdían la capacidad de solubilizar fosfato tricálcico (Miller et al. 2010). El operón de síntesis del cofactor PQQ presenta una organización diversa en diferentes cepas de *P. fluorescens*. Las cepas Pf-5, Pf0-1 y F113 poseen un operón compuesto por los genes *pqqFABCDEG.* La cepa Pf-5 posee una segunda copia para *pqqAB* mientras que F113 posee una segunda copia para *pqqA.* Por otra parte la cepa SBW25 carece de gen *pqqG*. El genoma de C119 presenta los genes *pqqFBCDEG* y carece del gen *pqqA* que codifica para una pequeña proteína 24 aminoácidos. En su lugar C119 presentó un gen ubicado en la hebra inversa, que codificaría para una proteína de 59 aminoácidos cuya función es desconocida. La comparación de este gen mediante la herramienta BLAST no aportó similitud significativa con ningún gen conocido. La participación de PqqA en la síntesis de PQQ es discutida. La introducción de un plásmido multicopia conteniendo los genes *pqqA* y *pqqB* en una mutante *pqqB*$^-$ de la cepa F113 generó un aumento en la producción de ácido glucónico respecto a la cepa salvaje (Miller et al. 2010). Por otra parte, en una cepa de *Methylobacterium extorquens,* el gen *pqqA* no fue necesario para la síntesis de PQQ (Toyama & Lidstrom 1998).

La cepa C119 no presentó genes homólogos a enzimas de tipo fitasas por lo cual no sería capaz de mineralizar formas de fósforo orgánico.

3.5-3.3 Resistencia a estreses bióticos y abióticos

Se identificó una amplia variedad de genes que posiblemente le confieran a C119 resistencia a antibióticos, tolerancia a metales pesados y le permitan sobrevivir en situaciones de estrés hídrico. La funcionalidad de todos estos genes y la incidencia que tienen en la resistencia frente a los distintos factores de estrés deberá confirmarse mediante ensayos *in vitro*.

i) Resistencia a antibióticos

Los genes de resitencia a antibióticos presentes en C119 son en algunos casos específicos para la detoxificación de un tipo de antibiótico en particular (como por ejemplo vancomicina, fluoromicina, quinolonas, lisozima y β-lactámicos) y en otros casos se tratan de sistemas transportadores multi drogas que podrían aportar cierta tolerancia a antibióticos propios y exógenos (Tabla 3.8). En el caso de los genes de resistencia específicos hacia lisozima y vancomicina, los operones no están completos por lo que es posible que no cuente con la capacidad de contrarrestar la acción de los antibióticos. Por otra parte la resistencia natural a quinolonas y a ampicilina sí es funcional en la cepa y fue utilizada como marcador para identificar la presencia de C119 entre las bacterias rizosféricas de la alfalfa en el ensayo de colonización descripto en el Capítulo 2. Los sistemas de transporte multidrogas posiblemente participen en el eflujo del lipopéptido y otros metabolitos producidos por C119, que de otra forma serían tóxicos para la bacteria.

ii) Resistencia a estrés hídrico

Diversos metabolitos osmoreguladores y osmoprotectores son producidos por las bacterias en condiciones de estrés hídrico o salino. La trehalosa es uno de ellos. Este disacárido no reductor funciona como osmoprotector estabilizando proteínas y lípidos frente a dichas situaciones de estrés (Dodd & Perez-Alfocea 2012). Se han descripto al menos cinco vías de síntesis de trehalosa en bacterias. La cepa C119 presentó los genes de síntesis correspondientes a dos vías la Tres y la TreY-TreZ (Figura 3.28). Existen reportes de que la inoculación con cepas productoras de trehalosa promueven el crecimiento de plantas bajo estrés hídrico. Por ejemplo la inoculación de *Rhizobium tropici* y la cepa PGPR *Paenibacillus polymyxa* (que sobre expresaba el gen de la trehalosa-6-fosfato sintasa) mejoraron el crecimiento, el contenido de nitrógeno y la nodulación de plantas de *Phaseolus vulgaris* L. (poroto) sometidas a estrés hídrico (Figueiredo et al. 2008). En este caso se observó en las plantas un aumento de la expresión de proteínas de tolerancia al estrés por lo que podría haber un mecanismo de señalización en las plantas, que responde a la trehalosa de origen bacteriano. Un efecto promotor significativo también se observó cuando se inocularon plantas de maíz con una cepa de *A. brasilense* transformada con un plásmido conteniendo genes de síntesis de trehalosa de *Saccharomyces cerevisiae* (Rodriguez-Salazar et al. 2009)

A nivel celular, las rizobacterias pueden modular la osmolaridad del citoplasma. El genoma de *P. fluorecens* C119 presentó genes para proteínas de transporte y/o biosíntesis de solutos compatibles como colina y betaína las cuales pueden acumularse en el citoplasma en situaciones de deshidratación (Tabla 3.10). Estos osmolitos permiten la sobrevivencia de las bacterias en ambientes muy cambiantes (Grover et al. 2010). Por otra parte, el genoma de la cepa C119 presentó genes para la producción de glucanos periplasmáticos osmoregulados (Tabla 3.9). Estos son producidos por diversas proteobacterias y tienen una función importante en la interacción entre la bacteria y el hospedero. La producción de glucanos osmoregulados es fundamental para la formación de biofilms en condiciones de baja osmolaridad (Lequette et al. 2007).

iii) Resistencia a metales pesados

El genoma de C119 presenta genes que codifican para bombas de eflujo de metales pesados y que podrían conferirle resistencia a Cr, Cu, As, Cd, Zn y Co (Tabla 3.11). De ser así, la cepa podría sobrevivir en ambientes contaminados. Esto la vuelve una excelente candidata para asistir en el proceso de biorremediación mediante plantas acumuladoras de metales pesados. Las plantas utilizadas en los procesos de biorremediación de suelos contaminados producen grandes cantidades de biomasa y toleran altos niveles de contaminantes. Sin embargo, la presencia de éstos contaminantes genera limitaciones en el desarrollo de la planta (Dimkpa et al. 2009). La introducción de PGPR tolerantes a los contaminantes del suelo pueden mejorar el proceso de biorremediación realizado por las plantas acumuladoras (Zhuang et al. 2007). Existen varios ejemplos de PGPR que facilitaron procesos de biorremediación. Por ejemplo dos *Pseudomonas* spp. permitieron mejorar la absorción de Zn, Ni y Cu por *Ricinus communis* (ricino) en suelos contaminados con dichos metales (Rajkumar & Freitas 2008). Otro ejemplo fue la aplicación de cepas de *Azotobacter chroococcum*, *Bacillus megaterium*y *B. mucilaginosus* seleccionadas por sus características PGPR y tolerancia a metales pesados. Estas cepas permitieron un aumento de la biomasa de plantas de *Brassica juncea* (mostaza) en suelos contaminados con Zn y Pb (Wu et al. 2006).

3.5-4 Genes relacionados con factores de virulencia

Se buscaron a lo largo del genoma de la cepa C119 genes que codificaran para posibles factores de virulencia que puedan tener algún rol patogénico ya sea hacia animales o plantas. Se realizó un análisis de BLAST sobre el genoma de C119 utilizando genes de patogenicidad ampliamente caracterizados como la fosfolipasa C hemolítica (*plcS*), el precursor de la exotoxina A (*toxA*) y la elastasa (*LasB*). No se encontró ninguno de estos factores, por lo que no se evidencia una posible patogenicidad de la cepa en estudio. Además, la cepa carece de sistema de secreción de tipo III relacionado con la introducción de proteínas efectoras dentro del hospedero por parte de cepas patógenas (Nürnberger & Lipka 2005). A medida que aumenta el número de genomas completamente secuenciados de los principales patógenos de plantas y animales, aumenta el número de genes candidatos a ser factores de virulencia (Fouts et al. 2002; Salanoubat et al. 2002). Estos nuevos factores pueden ser fácilmente revisados dentro del genoma de C119 para determinar su presencia.

3.6 conclusiones y perspectivas

El genoma de la cepa *P. fluorescens* C119 presentó diversas rutas biosintéticas que pueden estar involucradas en las características promotoras del crecimiento vegetal observadas en ensayos con plantas de alfalfa. El genoma contiene genes que codifican para diversos metabolitos antimicrobianos: HCN, lipopéptido cíclico (LPC), proteasa, quitinasa y bacteriocinas. La estructura de la cadena peptídica del LPC pudo ser predicha partiendo de la secuencia de nucleótidos de los genes de síntesis. Se trata de un LPC nuevo no descripto en *Pseudomonas* spp. La cepa C119 presenta, además, rutas biosintéticas de metabolitos secundarios no descriptos. Se identificaron genes que podrían estar involucrados en la promoción directa del crecimiento vegetal. Es posible que la cepa C119 pueda sintetizar AIA mediante una ruta independiente de triptófano. Además presenta genes que codifican para una glucosa deshidrogenasa dependiente de pqq con la cual podría sintetizar ácido glucónico y disolver fosfatos inorgánicos mediante la disminución del pH del medio. La ACC codificada en el genoma de C119 tiene un sitio de unión al sustrato que le permitiría unirse al ACC. La estructura primaria de la proteína es

diferente de las descriptas en *Pseudomonas* spp. capaces de disminuir los niveles de etileno, por lo que su actividad deberá ser confirmada. La cepa C119 presenta genes de resistencia a diversos estreses abióticos como metales pesados y estrés hídrico. Los mecanismos de promoción deberán ser probados en el laboratorio, para determinar si C119 es capaz de expresarlos y favorecer el crecimiento de las plantas.

El genoma de *P. fluorescens* C119 presenta genes involucrados en varios mecanismos que pueden tener un impacto directo o indirecto sobre la salud de las plantas hospederas. Además carece de genes relacionados con factores la patogenicidad hacia plantas y animales. Esta diversidad de mecanismos y la ausencia de genes vinculados a factores de virulencia, brindan una mayor robustez a su aplicación como agente de control biológico y biofertilizante. La diversidad de patógenos que puede controlar podría ser amplia y las posibilidades de que éstos generen resistencias se minimizan. Su aplicación como biofertilizante podría ampliarse a plantas sometidas a diversos tipos de estrés y a la biorremediación de suelos contaminados.

capítulo 4

4.1 introducción

4.1-1 Rol natural de los lipopeptidos cíclicos

En el capítulo anterior se expusieron algunas de las funciones que cumplen los surfactantes en el estilo de vida de los microorganismos, donde pueden ser factores de virulencia de microorganismos patógenos o metabolitos antifúngicos en bacterias antagonistas (Sección 3.1-2). Sin embargo, la enorme variedad de estructuras de los LPC sugiere que estos compuestos cumplen diversos roles naturales, algunos de las cuales pueden ser únicos para la bacteria productora (Raaijmakers et al. 2010).

Los LPC tienen la capacidad de modificar la viscosidad de una superficie, humedeciéndolas, con lo cual puede incidir en la movilidad bacteriana y en la solubilización y difusión de sustratos. Las mutantes en genes de síntesis de LPC generalmente muestran un fenotipo de movilidad reducida o nula, la cual puede recuperarse por el agregado exógeno del LPC (de Bruijn et al. 2007). Esta función es importante para la dispersión y la colonización de nichos ecológicos. Diversas cepas de *Pseudomonas* spp. han demostrado ser mucho más efectivas en la colonización de raíces que sus mutantes incapaces de producir LPC (Braun et al. 2001; Nielsen et al. 2005; Tran et al. 2007). Los LPC facilitarían el traslado de las bacterias desde la fuente del inoculo hacia sitios en la planta ricos en nutrientes (Nielsen et al. 2005).

Los LPC también tienen una importante función en la adhesión a superficies y formación de biofilms que depende de la estructura del LPC. Algunos ejemplos de cepas mutantes de *Pseudomonas* sp. incapaces de producir LPC generaban un biofilm más voluminoso e inestable que la cepa salvaje (Roongsawang et al. 2003; Kuiper et al. 2004). En otros casos la ausencia del LPC causaba una importante disminución de la formación del biofilm (de Bruijn et al. 2007; de Bruijn et al. 2008). Estas diferencias podrían deberse a las capacidad del LPC de afectar la hidrofobicidad de la superficie celular. Los LPC serían capaces de orientarse sobre la superficie celular exponiendo la región hidrofóbica hacia el exterior permitiendo que se adhiera a superficies hidrofóbicas o por el contrario exponiendo el dominio hidrofílico para unirse a

sustratos hidrofílicos (Neu 1996). Se piensa que el rol en la formación del biofilm dependería de la carga de la superficie celular y del sustrato y de la carga e hidrofobicidad del LPC (de Bruijn et al. 2008).

Los LPC también pueden tener un rol en la inducción de la respuesta sistémica (RSI) en plantas. Por ejemplo, la inoculación de plantas de tomate con una cepa productora de masetolide o con el compuesto puro generó un aumento en la resistencia frente a la infección de *Phytophthora infestans* en las hojas (Tran et al. 2007). En este sentido existen más avances en el estudio del rol de los LPC producidos por cepas de *Bacillus* spp. sobre la inducción de la RSI. Se ha observado un aumento en las enzimas de defensa y modificaciones en el patrón de compuestos fenólicos. Se desconoce si son necesarios receptores específicos en las plantas y se piensa que los LPC pueden generar distorsiones o canales transitorios en las membranas vegetales que inician una cascada de respuestas que llevan al aumento de la expresión de los sistemas de defensa de la planta (Jourdan et al. 2009).

4.1–2 Diversidad estructural

Los LPC han sido descriptos en diferentes especies de *Pseudomonas* asociadas a plantas como por ejemplo *P. tolaasii*, *P. fuscovaginae*, *P. corrugata*, *P. fluorescens*, *P. putida* y la especie patogénica *P. syringae* (Raaijmakers et al. 2006). Los LPC se clasifican según su estructura, la cual varía de acuerdo a la composición y largo del ácido graso y el número, tipo y configuración de los aminoácidos de la cadena peptídica. Originalmente los LPC se clasificaron en cuatro grupos principales donde un LPC caracterizado es referencia en cada clase. Los cuatro grupos son: viscosina, la amfisina, la tolaasina, y la siringomicina. Sin embargo, posteriormente a dicha clasificación se han descripto nuevos LPC con una gran diversidad estructural, tales como plusbacina, pseudofomina, orfamida y putisolvina. Estos no entran en ninguna de las cuatro categorías anteriores, por lo que se han agregado nuevos grupos a la clasificación original (Roongsawang et al. 2010) (Tabla 4.1 y Figura 4.1).

Los LPC del grupo de la viscosina están compuestos por un péptido de 9 aminoácidos, de los cuales al menos 3 son leucinas, unidos a un ácido 3-hidroxi-decanoico. Han sido purificados de *Pseudomonas* spp. provenientes de diversos ambientes (suelo, rizósfera, agua). Se han descripto tanto en una cepa de *P.*

fluorescens patógena de brócoli (Braun et al., 2001) como en aislamientos a partir de suelos supresivos para el *take-all* del trigo (Souza et al. 2003).

Los LPC del grupo amfisina, al igual que los del tipo viscosina, son ricos en leucina. Constan de 11 aminoácidos acoplados a un 3-hidroxiácido. Varios LPC de este grupo presentan la estructura completamente resuelta por cristalografía (Sorensen & Nielsen, 2001). Dos compuestos de este grupo, la tensina y la amfisina, poseen una estructura helicoidal donde el dominio peptídico se encuentra envolviendo una molécula de agua y el ácido graso sobresale de la región hidrofílica de la molécula (Figura 4.2).

El grupo de las tolaasinas presenta variaciones en la composición y el largo de la cadena peptídica que va de 19 a 25 aminoácidos. Generalmente contiene aminoácidos inusuales como 2,3-dihidro-aminobutirato (Dhb), homoserina (HSe) y *alo*-treonina, éste último involucrado en la formación del anillo lactónico de 8 aminoácidos mediante un enlace éster con el C-terminal. El motivo lipídico puede ser 3-hidroxidecanoico o 3- hidroxioctanoico. Muchos de estos LPC son producidos como factores de virulencia en cepas patógenas de plantas (D'aes et al. 2010).

El grupo de las siringomicinas también está compuesto por péptidos de 9 aminoácidos, pero a diferencia de los del tipo viscosina presentan aminoácidos inusuales como 2,3-dihidro-aminobutirato, 2,4-dihidro-aminobutirato, y un 4 cloro-treonina en el C- terminal, los cuales son fundamentales para la actividad antifúngica (Hutchison et al. 1995). En este grupo el ciclado se forma entre el residuo N-terminal y el C-terminal incluyendo a los 9 aminoácidos en el anillo lactónico. El motivo lipídico puede estar formado por 3-hidroxi o 3,4-dihidroxiácidos de 10 a 14 átomos de carbonos, lo cual puede dar origen a variantes del mismo LPC (Segre et al. 1989).

Las plusbacinas fueron originalmente purificadas a partir de una cepa de *Pseudomonas* aislada del suelo. Estos LPCs están compuestos por 8 aminoácidos unidos a un hidroxiácido. Se caracterizan por presentar un motivo guanidina en su estructura, al igual que la siringomicina (Hashizume & Nishimura 2008). Las variantes dentro del grupo se dan por diferencias en el largo de la cadena carbonada del ácido graso y diferencias en el segundo residuo de hidroxiprolina. El ciclado se realiza entre el ácido graso y el

aminoácido terminal (Wohlrab et al. 2007). Esta característica es observada únicamente en plusbacinas y artrofactina.

Tabla 4.1. Estructura primaria de de la cadena peptídica los principales lipopeptidos cíclicos descriptos en *Pseudomonas* spp.

Nombre	AG	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
Grupo Plusbacina																										
Plusbacina A1	$C_{14}OH$	D-α-Thr	D-Ala	L-Pro(3-OH)	L-Arg	L-Asp (3-OH)	D-Ser	L-Pro(3-OH)	L-Asp (3-OH)																	
Plusbacina A2	$C_{15}OH$	D-α-Thr	D-Ala	L-Pro(3-OH)	L-Arg	L-Asp (3-OH)	D-Ser	L-Pro(3-OH)	L-Asp (3-OH)																	
Plusbacina A3	$C_{16}OH$	D-α-Thr	D-Ala	L-Pro(3-OH)	L-Arg	L-Asp (3-OH)	D-Ser	L-Pro(3-OH)	L-Asp (3-OH)																	
Plusbacina B1	$C_{14}OH$	D-α-Thr	D-Ala	L-Pro	L-Arg	L-Asp (3-OH)	D-Ser	L-Pro(3-OH)	L-Asp (3-OH)																	
Plusbacina B2	$C_{15}OH$	D-α-Thr	D-Ala	L-Pro	L-Arg	L-Asp (3-OH)	D-Ser	L-Pro(3-OH)	L-Asp (3-OH)																	
Plusbacina B3	$C_{16}OH$	D-α-Thr	D-Ala	L-Pro	L-Arg	L-Asp (3-OH)	D-Ser	L-Pro(3-OH)	L-Asp (3-OH)																	
Grupo Viscosina																										
Viscosina	$C_{10}OH$	L-Leu	D-Glu	D-α-Thr	D-Val	L-Leu	D-Ser	L-Leu	D-Ser	L-Ile																
Viscosinamida	$C_{10}OH$	L-Leu	D-Gln	D-α-Thr	D-Val	L-Leu	D-Ser	L-Leu	D-Ser	L-Ile																
WLIP	$C_{10}OH$	L-Leu	D-Glu	D-α-Thr	D-Val	D-Leu	D-Ser	L-Leu	D-Ser	L-Ile																
Masetolida A	$C_{10}OH$	L-Leu	D-Glu	D-α-Thr	D-α-Ile	L-Leu	D-Ser	L-Leu	D-Ser	L-Ile																
Masetolida D	$C_{10}OH$	L-Leu	D-Glu	D-α-Thr	D-α-Ile	L-Leu	D-Ser	L-Leu	D-Ser	L-Leu																
Pseudofomina A	$C_{10}OH$	L-Leu	D-Glu	D-α-Thr	D-Ile	D-Leu	D-Ser	L-Leu	D-Ser	L-Ile																
Pseudofomina B	$C_{12}OH$	L-Leu	D-Glu	D-α-Thr	D-Ile	D-Leu	D-Ser	L-Leu	D-Ser	L-Ile																
Pseudodesmina A	$C_{10}OH$	L-Leu	D-Gln	D-α-Thr	D-Val	D-Leu	D-Ser	L-Leu	D-Ser	L-Ile																
Pseudodesmina B	$C_{10}OH$	L-Leu	D-Gln	D-α-Thr	D-Val	D-Leu	D-Ser	L-Leu	D-Ser	L-Val																
Grupo Siringomicina																										
Siringomicina SRA1	$C_{10}OH$	L-Ser	D-Ser	D-Dab	L-Dab	L-Arg	L-Phe	Z-Dhb	L-Asp (3OH)	4-Cl-L-Thr																
Siringomicina SER	$C_{12}OH$	L-Ser	D-Ser	D-Dab	L-Dab	L-Arg	L-Phe	Z-Dhb	L-Asp (3OH)	4-Cl-L-Thr																
Siringostatina A	$C_{14}OH$	L-Ser	D-Dab	L-Dab	D-Hse	L-Orn	L-α-Thr	Z-Dhb	L-Asp (3OH)	4-Cl-L-Thr																
Siringotoxina B	$C_{14}OH$	L-Ser	D-Dab	Gly	D-Hse	L-Orn	L-α-Thr	Z-Dhb	L-Asp (3OH)	4-Cl-L-Thr																
Pseudomicina A	$C_{14}diOH$	L-Ser	D-Dab	L-Asp	L-Lys	L-Dab	L-α-Thr	Z-Dhb	L-Asp (3OH)	4-Cl-L-Thr																
Cormicina A	$C_{10}diOH$	L-Ser	D-Orn	L-Asn	D-Hse	L-His	L-α-Thr	Z-Dhb	L-Asp (3OH)	4-Cl-L-Thr																
Grupo orfamida																										
Orfamida A	$C_{14}OH$	L-Leu	D-Glu	D-α-Thr	D-α-Ile	L-Leu	D-Ser	L-Leu	L-Leu	D-Ser	L-Val															
Orfamida B	$C_{14}OH$	Leu	Glu	Thr	Val	Leu	Ser	Leu	Leu	Ser	Val															
Orfamida C	$C_{12}OH$	Leu	Glu	Thr	Ile	Leu	Ser	Leu	Leu	Ser	Val															
Grupo amfisina																										
Amfisina	$C_{10}OH$	D-Leu	D-Asp	D-α-Thr	D-Leu	D-Leu	D-Ser	L-Leu	D-Gln	L-Leu	L-Ile	L-Asp														
Tensina	$C_{10}OH$	D-Leu	D-Asp	D-α-Thr	D-Leu	D-Leu	D-Ser	L-Leu	D-Gln	L-Leu	L-Ile	L-Glu														
Folipeptina	$C_{10}OH$	D-Leu	L-Asp	L-Thr	D-Leu	D-Leu	D-Ser	D-Leu	D-Ser	D-Leu	L-Ile	D-Asp														
Lokisina	$C_{10}OH$	Leu	Asp	D-α-Thr	Leu	Leu	D-Ser	Leu	D-Ser	Leu	L-Ile	Asp														
Artrofactina	$C_{10}OH$	D-Leu	D-Asp	D-Thr	D-Leu	D-Leu	D-Ser	L-Leu	D-Ser	L-Ile	L-Ile	L-Asp														
Grupo putisolvina																										
Putisolvina I	C_6	Leu	Glu	Leu	Ile	Gln	Ser	Val	Ile	Ser	Leu	Val	Ser													
Putisolvina II	C_6	Leu	Glu	Leu	Ile	Gln	Ser	Val	Ile	Ser	Leu	Leu/Ile	Ser													
Grupo entolisina																										
Entolisina A	$C_{10}OH$	D-Leu	D-Glu	D-Glu	D-Val	D-Leu	D-Gln	D-Val	D-Leu	D-Gln	D-Ser	L-Val	L-Leu	D-Ser	Ile											
grupo Tolaasina																										
Tolaasina I	C_8OH	Dhb	Pro	Ser	Leu	Val	Ser	Leu	Val	Val	Gln	Leu	-	-	-	-	Val	Dhb	α-Thr	Ile	Hse	Dab	Lys			
Tolaasina II	C_8OH	Dhb	Pro	Ser	Leu	Val	Ser	Leu	Val	Val	Gln	Leu	-	-	-	-	Val	Dhb	α-Thr	Ile	Gly	Dab	Lys			
Tolaasina A	C_9OH	Dhb	Pro	Ser	Leu	Val	Ser	Leu	Val	Val	Gln	Leu	-	-	-	-	Val	Dhb	α-Thr	Ile	Hse	Dab	Lys			
Tolaasina B	C_8OH	Dhb	Pro	Ser	Leu	Val	Ser	Leu	Val	Val	Gln	Leu	-	-	-	-	Val	Dhb	α-Thr	Val	Hse	Dab	Lys			
FP-B	C_8OH	Dhb	Pro	Leu	Ala	Ala	Ala	Ala	Val	Gly	Ala	Val	Ala	-	-	-	Val	Dhb	α-Thr	Ala	Dab	Dab	Phe			
Corpetina A	$C_{10}OH$	Dhb	Pro	Ala	Ala	Ala	Val	Val	Dhb	Hse	Val	α-Ile	Dhb	Ala	Ala	Ala	Val	Dhb	α-Thr	Ala	Dab	Ser	Ile			
Grupo Siringopeptina																										
SP22	$C_{10}OH$	Dhb	Pro	Val	Val	Ala	Ala	Val	-	-	-	Val	Dhb	Ala	Val	Ala	Ala	Dhb	α-Thr	Ser	Ala	Dhb	Ala	Dab	Dab	Tyr
SP25A	$C_{10}OH$	Dhb	Pro	Val	Ala	Ala	Val	Leu	Ala	Ala	Dhb	Val	Dhb	Ala	Val	Ala	Ala	Dhb	α-Thr	Ser	Ala	Val	Ala	Dab	Dab	Tyr
Phe25-SP25A	$C_{10}OH$	Dhb	Pro	Val	Ala	Ala	Val	Leu	Ala	Ala	Dhb	Val	Dhb	Ala	Val	Ala	Ala	Dhb	α-Thr	Ser	Ala	Val	Ala	Dab	Dab	Phe

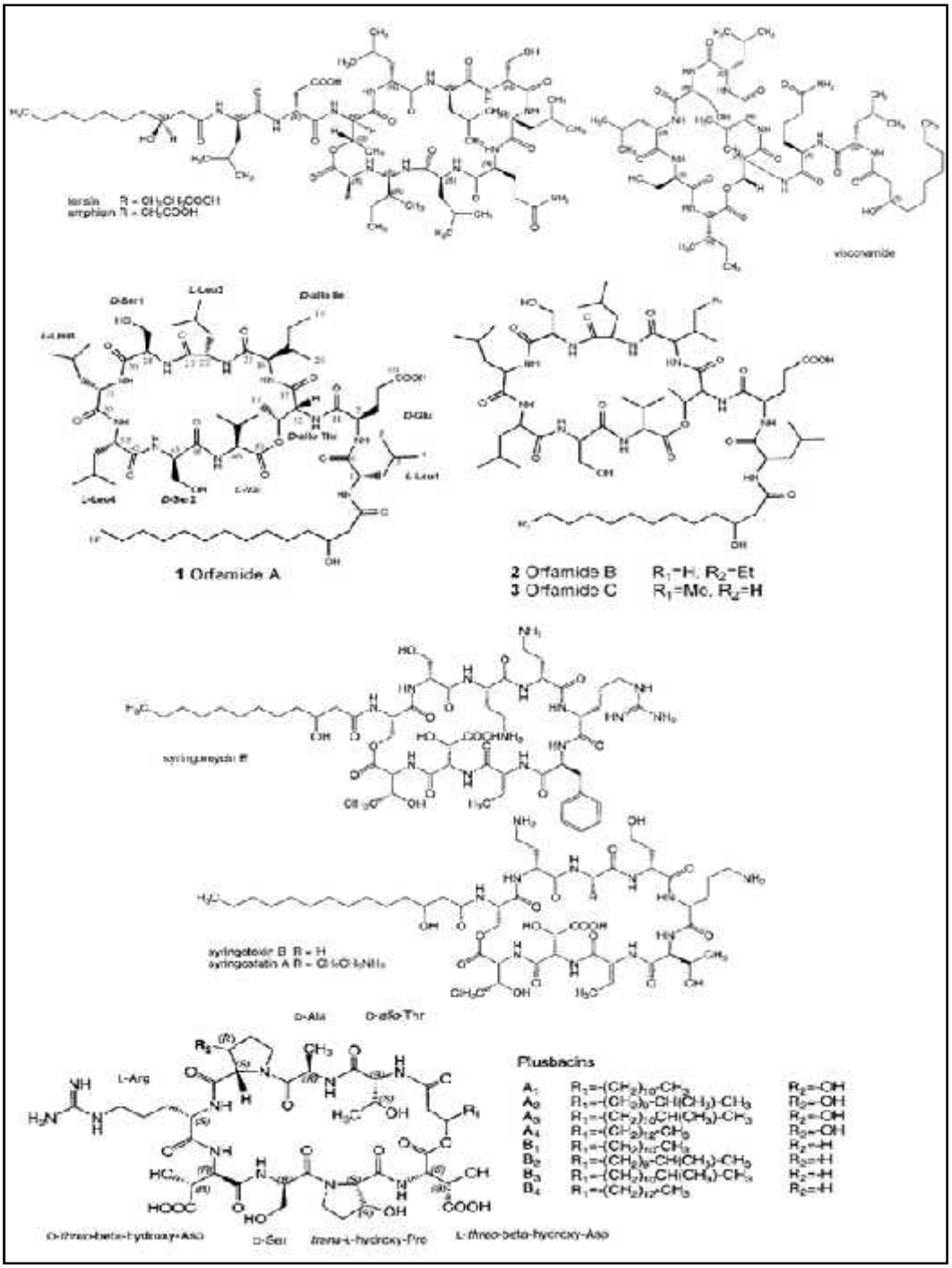


Figura 4.1- Estructura de lipopeptidos cíclicos sintetizados por *Pseudomonas* spp.

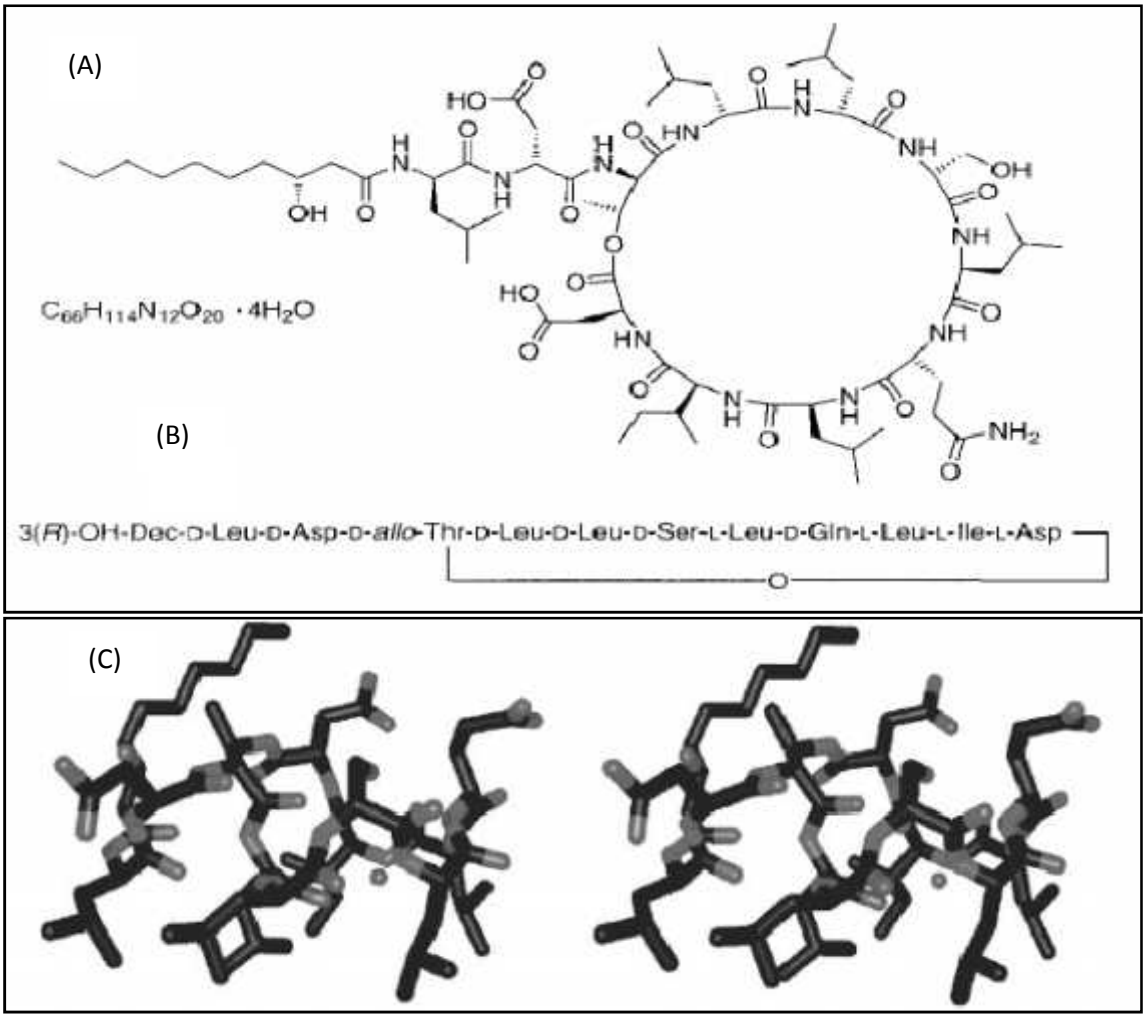


Figura 4.2- Estructura de la amfisina. A) Esquema de la molécula de amfisina compuesta por 11 aminoácidos, de los cuales 9 participan en la formación de un anillo lactónico, unidos a un 3-hidroxiácido de 10 carbonos. B) Secuencia aminoacídica de la molécula de amfisina, el enlace ester se forma ente el residuo de D-allo-treonina y el aspártico en la posición C- terminal. C) Representación tridimensional de la molécula de amfisina. Vista lateral de la molécula mostrando el arreglo anfifílico de las cadenas laterales. Tomado de Sørensen & Nielsen, 2001.

El análisis bioinformático del genoma de la cepa biocontroladora *P. fluorescens* Pf-5 demostró la presencia de los genes de síntesis de un lipopeptido cíclico al cual denominaron orfamida (Paulsen et al. 2005). Un análisis informático detallado permitió predecir la secuencia aminoacídica del polipéptido, el cual estaba conformado por 10 aminoácidos, con una alta proporción de leucinas (Loper & Gross 2007). Posteriormente, mediante un enfoque genómico-isotópico se pudo caracterizar el compuesto surfactante del cual existen tres variantes de acuerdo al largo del ácido graso y a la composición aminoacídica en la posición 4 del polipéptido (Gross et al. 2007). Hasta la fecha no se ha reportado otro LPC conteniendo una cadena peptídica de 10 aminoácidos.

Las putisolvinas, de las cuales existen 2 tipos, I y II, fueron reportadas por primera vez por Kuiper y colaboradores (2003). Ambas constan de un motivo peptídico de 12 aminoácidos unidos a un corto ácido graso de 6 carbonos. Estos compuestos fueron purificados a partir de una cepa de *P. putida* aislada de suelos contaminados. El anillo lactónico, en el cual solamente participan 4 aminoácidos, se forma ente dos residuos de serina (Dubern et al. 2008).

Las entolisinas A y B provenientes de la cepa *P. entomophila* L 48, fueron descriptas por Vallet-Gely y colaboradores (2010) como un importante factor de virulencia involucrado en la patogénesis de *Drosophila*. Este lipopeptido tiene actividad hemolítica y consta de 14 aminoácidos unidos a un hidroxiácido de 10 carbonos. El anillo lactónico se forma ente los residuos en la posiciones 10 y 14.

Las pseudofactinas fueron descriptas en una cepa de *P. fluorescens* aislada de agua de mar y caracterizadas parcialmente (Janek et al. 2010). Consisten en un péptido de 8 aminoácidos unidos a un ácido palmítico y se clasifican en tipo I y tipo II según el aminoácido en el extremo C-terminal el cual es valina para la pseudofactina I y leucina para la pseudofactina II.

4.2 estrategia de trabajo

El análisis genómico de la cepa *P. fluorescens* C119 demostró que dicha cepa posiblemente posee vías de síntesis de diversos metabolitos secundarios. Entre ellos se destaca la presencia de un operón de síntesis para un lipopéptido cíclico. Por otro lado, estudios previos demostraron que los cultivos de la cepa C119 presentaban actividad antifúngica y actividad surfactante. Para caracterizar el principal metabolito con actividad antagónica producido por C119, se analizaron los compuestos que son liberados al medio durante la fase estacionaria. Para ello se realizó una extracción con solventes orgánicos y un análisis de los componentes presentes en el extracto. Mediante TLC se separaron los componentes presentes en el extracto. Las fracciones que presentaron actividad antifúngica se purificaron por HPLC y se analizaron mediante espectrometría de masa Maldi-ToF. La actividad antifúngica de las fracciones se determinaron por bioensayos frente al oomicete *P. debaryanum*. Para

una mejor resolución estructural se realizó una purificación del metabolito antifúngico a mayor escala y se analizó por NMR.

Para confirmar la participación del metabolito analizado en el antagonismo frente a *P. debaryanum* se realizó una mutagénesis generalizada de la cepa C119. Para ello se utilizó el transposón Tn5-Lux. Las mutantes incapaces de producir el metabolito fueron seleccionadas y caracterizadas. Finalmente, los genes interrumpidos por el transposón fueron secuenciados e identificados.

metodología

4.3-1 Análisis de los metabolitos antifúngicos producidos por P. fluorescens C119

4.3-1.1 Extracción orgánica a pequeña escala de compuestos antifúngicos

Los compuestos antimicrobianos secretados por *P. fluorescens* C119 fueron purificados a partir del sobrenadante de cultivo. Para ello se realizó un cultivo líquido de la cepa en matraces de 250ml conteniendo 50ml de medio KB, incubando durante 48h a 30°C con agitación. Luego, los cultivos se centrifugaron a 10000g durante 20 min y se filtraron para descartar las células. Para la extracción de los compuestos presentes en el cultivo, el sobrenadante fue previamente acidificado con ácido trifluoroacético (TFA) 10% hasta pH 2-3. Se realizaron extracciones a partir de 5 o 10ml de cultivo con 1.5 volúmenes de acetato de etilo. Se conservó la fase orgánica y se realizó una segunda extracción de la fase acuosa en las mismas condiciones. Las fases orgánicas se combinaron y se evaporaron en un evaporador rotatorio calentando a 30°C bajo vacío. El residuo obtenido se conservó a –20°C hasta ser analizado por cromatografía en capa fina (TLC: *thin layer chromatography*), Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC: *High Performance Liquid Chromatography*) y mediante espectrometría de masas (MS) utilizando el sistema de desorción/ionización mediante láser asistida por matríz acoplado a un lector de tiempo de vuelo (Maldi-ToF: *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time-Of-Flight*).

La tensión superficial del sobrenadante libre de células de un cultivo o.n. se analizó mediante el método del anillo de Du Nouy en el Área de Masa, Masa Específica y Viscosidad del LATU.

4.3-1.2 Purificación a mayor escala

La cepa C119 se cultivó en 50ml de medio KB durante 24h a 30°C y agitación. Con este cultivo se inocularon dos matraces conteniendo 1L de caldo KB los cuales se incubaron 72h en las mismas condiciones. Se utilizaron dos procedimientos para la extracción de los compuestos presentes en el medio de cultivo. Para ambos se partió de 2l de cultivo los cuales fueron centrifugados a 10000rpm durante 30 min y filtrados. Uno de los procedimientos de purificación se basó en la extracción clásica mediante solventes orgánicos descripta anteriormente. Por otro lado se puso a punto una metodología para purificar los compuestos antimicrobianos por adsorción en amberlita. Para ello, el sobrenadante libre de células fue sometido a cromatografía de adsorción en una columna (3x25cm) conteniendo la resina amberlita XAD-2, previamente lavada con metanol 20% y equilibrada con TFA 0,05%. La muestra se pasó por la columna y se lavó con TFA 0,05%. Se realizaron eluciones consecutivas con metanol 20%, 40% y 100%. También se colectó la fracción que no se retuvo inicialmente en la resina. La fracción con actividad se mezcló con una suspensión de amberlita XAD-7, previamente equilibrada, en una relación 1:4 (v/v) amberlita:muestra. Se dejó interaccionar en *batch* durante 15 min con agitación y se procedió a retirar el líquido con los compuestos no adsorbidos. La resina se lavó dos veces con TFA 0,05% y finalmente los compuestos adsorbidos se eluyeron con metanol 100%. El procedimiento se repitió hasta procesar 2000ml de sobrenadante. Durante la purificación la actividad surfactante se determinó por ensayo de colapso de la gota (Bodour & Miller-Maier 1998). El test consiste en observar la disminución de la tensión superficial de una gota de agua cuando es mezclada con el compuesto tensoactivo. Brevemente, se mezclaron 40µl de agua mQ con 10µl de extracto colocados sobre Parafilm y se observaron cambios en la forma de la gota por la presencia de tensoactivos. Una gota esférica determinaba la ausencia de surfactantes en el medio mientras que una gota aplanada y de mayor diámetro indicaba la presencia del agente tensoactivo.

Los extractos obtenidos por ambas metodologías fueron disueltos en metanol y sometidos a sucesivos pasos de precipitación con TFA 0,05%. Para ello se mezclaron 10ml del extracto, con 30ml de TFA 0,05%, dejando precipitar durante 60min a 4°C. La mezcla fue centrifugada a 12000rpm durante 30 min y se descartó el sobrenadante. EL precipitado se disolvió nuevamente en metanol para el siguiente paso de precipitación. Finalmente el precipitado se disolvió en acetato de etilo y se lavó tres veces con ½ vol de agua miliQ para eliminar contaminantes. Se eliminó el acetato de etilo por evaporación y se procedió a liofilizar el precipitado obtenido para su análisis por resonancia magnética nuclear (RMN).

4.3-1.3 Cromatografía en capa fina

Se realizaron cromatografías preparativas en placas de 10 x 5cm de sílica gel 60 F254 de 0.25mm de espesor con soporte de aluminio (con indicador fluorescente), previamente activadas durante 1h a 110°C. El extracto disuelto en metanol se sembró formando una línea a 1.5cm del borde inferior de la placa y a 0.5cm de los bordes laterales. Se probaron distintas fases móviles: acetato de etilo, acetato de etilo:metanol (9:1 y 7:3), acetato de etilo:hexano (7:3), Isopropanol: amoníaco:agua (8:1:1, 4:1:2 y 4:1:1) y cloroformo:metanol:agua (65:25:4). Las bandas obtenidas se observaron por exposición a luz ultravioleta, se recortaron y se eluyeron en metanol durante 2h. Luego de retirar los trozos de soporte de aluminio, las muestras fueron centrifugadas a 10000g durante 5min para descartar los restos de sílica. El metanol contenido en cada fracción se secó en evaporador rotatorio, a 30°C.

4.3-1.4 Bioensayos de actividad surfactante y antifúngica

Las fracciones obtenidas por TLC se disolvieron en 500µl de metanol y se determinó su actividad surfactante mediante el test de colapso de la gota. Para determinar la actividad antifúngica se realizaron bioensayos en placas de cultivo celular de 6 pocillos. Cada pocillo, conteniendo 1ml de agar papa-dextrosa (PDA), se inoculó con 100µl de una fracción obtenida de la TLC. Se dejó evaporar el metanol y se colocó en el centro de la placa un disco de 3mm de micelio fresco de *P. debaryanum*. Como control, uno de los pocillos fue inoculado únicamente con 100µl de metanol. Las placas se incubaron a 28°C hasta que el oomicete en el control cubrió todo el pocillo.

4.3-1.5 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Las fracciones provenientes de la separación por TLC que mostraron actividad se analizaron por HPLC (Bonsall et al. 1997), utilizando una columna de fase reversa C18 (Phenomenex) y un equipo de HPLC marca Waters (MA, USA), con detector de arreglo de diodos 210-600nm (canal derivado 210nm) del Laboratorio de Bioquímica Analítica del IIBCE. La fase móvil consistió en un gradiente lineal del eluyente A (agua, 0,1% TFA) 85% a tiempo 0, incrementando el eluyente B (Acetonitrilo, 0,1% TFA) de 15% hasta 100% en un tiempo de corrida de 40min con un flujo de 1ml por min. Luego de establecidas las condiciones de elución del metabolito de interés se realizó una cromatografía preparativa isocrática. Como fase móvil se utilizó ácido fórmico 0,1% pH=2,65: ACN (70:30) filtrado y desgaseado. Se utilizó una columna Luna de 10µ C18 100 A (AXIA Packed) y un detector de arreglo de diodos. El tiempo de corrida fue de 40 min con un flujo de 10ml por min. Se inyectaron 2ml de muestra. La temperatura del horno se estableció a 30°C y la del inyector a 10°C, con una presión de 2000psi. Las fracciones se analizaron para determinar actividad surfactante mediante el test de colapso de la gota.

4.3-1.6 Espectrometría de masas

La fracción con actividad, purificada mediante HPLC, se analizó mediante espectrometría de masas Maldi-ToF, en la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas del Instituto Pasteur. Para el análisis se tomaron 2µl de muestra y se diluyeron en 10µl de agua ultrapura. La dilución se pasó por un puntero de micropipepta conteniendo una microcolumna de fase reversa Omix C18 en el cual la muestra quedó retenida. Luego se eluyó con 2,5µl de matríz acido α-ciano-4-hidroxicinamico (CHCA) en Acetonitrilo 60%/ TFA0.1%. Se realizó la lectura del espectro de masas en modo lineal positivo. Los picos de interés se fragmentaron y volvieron a analizarse mediante MS/MS.

i) Caracterización de la cadena peptídica: derivatización de Ettan CAF

Para mejorar la eficiencia de la fragmentación y simplificar la interpretación del espectro de masas, se utilizó la técnica de derivatización de Ettan CAF. Esta modificación incorpora un grupo sulfonato en el N-terminal del péptido. Para esto se partió de 1µl de la muestra, la cual se disolvió en 10µl de TFA 0.1% y se pasó por una microcolumna Omix C18 donde se realizó la reacción. La columna con los compuestos

retenidos se lavó con agua ultrapura. Luego se agregó el reactivo de CAF (NHS-ester conteniendo un grupo ácido sulfónico) (Amersham Bioscience) en bicarbonato de sodio 0,25M pH9,4. Se dejó actuar durante 3min y se eluyó deteniendo la reacción con 1µl de solución *stop* (50% hidroxilamina). La muestra se mezcló con 2,5µl de matríz CHCA 60%ACN-0,1%TFA y se analizó su espectro de masas en modo reflector positivo. Se tomó como positivo un corrimiento de +136 en la masa del péptido. Como control se realizó paralelamente la misma reacción para un estándar generado en base a fragmentos de inmunoglobulina G.

ii) Metilación de residuos ácidos

Para confirmar la presencia de aminoácidos conteniendo carboxilatos en sus cadenas laterales (Asp, Glu), la muestra se sometió a una metilación. Se partió de 1µl de la muestra a la cual se le agregó 50µl de una mezcla de metanol:cloruro de acilo (5:1) y se dejó reaccionar 30min a temperatura ambiente, en oscuridad. Se secó en vacío y se lavó con metanol. Finalmente se agregó 0.5µl de 0.1%TFA, y se sembró en la placa con matriz CHCA 50%ACN/0.1%TFA. Cada metilo agregado al compuesto generaba una diferencia de +14 en su masa. En caso de un péptido lineal el C-terminal libre también es metilado.

iii) Hidrólisis básica

Para determinar si el péptido era lineal o cíclico se procedió a realizar una reacción de hidrólisis básica. Una diferencia de +17 en la masa del péptido evidenciaba la apertura de un anillo por la unión del amoníaco al enlace ester. Para ello se partió de 3µl de muestra a la cual se le agregó 50µl de una mezcla de metanol:amoníaco (1:1) y se dejó 18h a temperatura ambiente. Se secó al vacío, se lavó con metanol y se disolvió con 6µl de 0.1%TFA. Se tomó 1µl, se mezcló con matríz y se analizó el espectro de masas.

4.3-1.7 Resonancia magnética nuclear

El análisis del espectro de resonancia magnética nuclear del compuesto se realizó en la Cátedra de Química Farmacéutica de Facultad de Química, UdelaR. Previo al análisis se realizaron dos pasos adicionales de purificación. El compuesto se metiló con diazometano en eter etílico y se aplicó en una columna de sílica gel con acetato de etilo:metanol 90:10. Luego se eluyó con metanol 100% y se aplicó en una columna de Sephadex LH20. Para el análisis por NMR la muestra fue disuelta en DMSO deuterado. El análisis se realizó en un equipo Bruker Avance 400 a 22°C para obtener los espectros de

1H-NMR, 13C-NMR, HSQC (de: *Heteronuclear single quantum coherence spectroscopy*) y COSY (de: *correlated spectroscopy*).

4.3-2 Obtención de mutantes incapaces de producir el lipopéptido

4.3-2.1 Mutagénesis generalizada

Se realizó una mutagénesis generalizada de la cepa C119 con la finalidad de obtener mutantes deficientes en la producción del compuesto antifúngico, mediante inserción del transposón Tn5-lux. Para ello se realizó el apareamiento triparental entre: 1) la cepa receptora C119, resistente a ampicilina, 2) la cepa donadora *Escherichia coli* DH5α, conteniendo el plásmido pRL1063a, con genes de resistencia a neomicina y genes que codifican para el TN5 lux y 3) la cepa *helper Escherichia coli* DH5α, conteniendo el plásmido pRK2013, que provee de los genes *tra* y *mob* necesarios para la transferencia del ADN y presenta resistencia a Kanamicina (Milcamps et al. 1998). Las tres cepas se cultivaron durante una noche en medio LB (Luria Bertani medium) suplementado con 50µg/ml de los respectivos antibióticos a 30°C y agitación a 200rpm. Luego se realizaron cultivos secundarios en LB sin antibióticos y cultivaron en las mismas condiciones durante 4h. Se tomaron alícuotas de 200µl de cada cultivo y se filtraron a través de un mismo filtro de nitrocelulosa de 45µm de tamaño de poro. El filtro se colocó en una placa con medio LB sin antibióticos y se incubó o.n. a 30°C. Luego las células crecidas sobre el filtro fueron despegadas del mismo, y resuspendidas en NaCl 0,9%. Diluciones de dicha suspensión fueron sembradas en LB conteniendo 50µg/ml ampicilina y 50µg/ml de neomicina. Como control se realizó el mismo procedimiento con cada una de las tres cepas y combinadas de a dos.

4.3-2.2 Identificación de mutantes

Los transconjugantes se seleccionaron por resistencia a neomicina (presente en el plásmido) y ampicilina y se discriminaron de acuerdo a la presencia de compuestos tensoactivos en el sobrenadante de cultivo mediante el test de colapso de la gota. Para ello, aproximadamente unas 1000 transconjugantes se cultivaron por separado en placas de microtitulación conteniendo caldo King B. Se incubaron durante 48h a 30°C y agitación a 200rpm. Se tomaron alícuotas de 20µl de sobrenadante de cultivo de cada transconjugante para analizar la presencia de surfactantes en el cultivo. Las gotas se colocaron sobre parafilm y se observó la forma de las gotas luego de 30 seg.

4.3-2.3 Verificación por *Southern Blot*

Se verificó la existencia de una única inserción del transposón dentro del genoma bacteriano de las transconjugantes seleccionadas, deficientes en la producción del agente tensoactivo, mediante *Southern blot* utilizando como sonda un al transposón Tn5 marcado con biotina. Para generar la sonda se utilizó el kit NEBlot® Phototope® (New England BioLabs®). Este kit incorpora biotina en la sonda de hibridación mediante una reacción de amplificación con cebadores aleatorios. La detección del ADN blanco con la sonda se efectúa mediante una simple reacción enzimática donde el agente quimioluminiscente es desestabilizado al ser fosforilado por la enzima fosfatasa alcalina emitiendo luz en el proceso. Para la detección se utilizó el kit Phototope® - Star Detection (New England BioLabs®).

El ADN genómico de las mutantes y de la cepa salvaje se purificó mediante el sistema comercial PureLink® Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Los ADNs fueron digeridos con las enzimas EcoRI utilizando la siguiente mezcla de digestión: 4µl de buffer D 10X (Promega), 2µl de EcoRI 1U/µl (Promega), 20µl de ADN genómico (200ng/µl) y H2O mQ c.s.p 40µl. El ADN digerido se separó por electroforesis en gel de agarosa donde se empleó un marcador de peso molecular prebiotinilado como estándar. El ADN contenido en el gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa humedecida con buffer de transferencia. La transferencia se realizó utilizando un equipo de vacío el cual facilita el pasaje del ADN desde el gel hacia la membrana. Se cubrió el gel con solución depurinizante y se utilizó una presión de 30mbar durante 3 minutos para promover el ingreso de la solución al gel. Se retiró el exceso de la solución anterior y se agregó la solución desnaturalizante dejándola actuar durante 7 minutos a 30mbar. Posteriormente se retiró el exceso de solución desnaturalizante y se neutralizó durante otros 7 minutos a la misma presión. Se realizó la transferencia durante una hora a 50mbar aplicando buffer de transferencia. Luego la membrana se secó en estufa a 70°C por 15 minutos y se expuso 2 minutos en luz U.V. para entrecruzar el ADN. La hibridación se realizó de acuerdo a las indicaciones del protocolo utilizando la sonda previamente construida. La detección se realizó por revelado mediante autoradiografía como se detalla en el kit de detección.

4.3–2.4 Caracterización de los clones mutantes

Las mutantes seleccionadas, incapaces de producir el compuesto tensoactivo, fueron caracterizadas fenotípicamente. Se analizó la actividad inhibitoria de los sobrenadantes de cultivo frente a *P. debaryanum*, así como la movilidad y la capacidad de formar biofilms. Para el ensayo de inhibición se incubaron las mutantes en tubos conteniendo 5ml de KB durante 48h a 30°C y agitación. Para cada mutante se filtró el sobrenadante y se incorporó en partes iguales con agar-agua al 3%. La mezcla se colocó en placas de cultivo celular de 2,5cm de diámetro. En el centro de cada pocillo se colocó un disco de micelio de *P. debaryanum* y se incubó a 25°C. Como controles se incluyó sobrenadante de cultivo de la cepa salvaje y un pocillo con agar-agua 1%. Se observó el crecimiento del oomicete en los distintos pocillos hasta que el control en agar-agua alcanzó a cubrir toda la placa con micelio. Para analizar capacidad de movimiento tipo *swarming*, se sembraron 5µl de una suspensión de 10^{10} células/ml de las cepas mutantes y la cepa salvaje en el centro de placas de medio KB conteniendo 0,6% de agar (de Bruijn & Raaijmakers 2009). La capacidad de formar biofilms se analizó en placas de microtitulación de fondo plano. Las cepas mutantes y la salvaje se inocularon en 200µl de caldo KB y se incubaron con agitación a 30°C durante 48h. La presencia de biofilms recubriendo el interior de los pocillos se evidenció por tinción de los mismos con cristal violeta luego de quitar cuidadosamente los cultivos (O`Toole et al. 2000).

4.3–2.5 Identificación de genes interrumpidos

Para determinar la identidad de los genes interrumpidos en las mutantes se procedió a secuenciar los fragmentos adyacentes a ambos lados del transposón. Dado que el transposón Tn5-lux contiene un origen de replicación es posible recuperarlo en forma de plásmido luego de su escisión del genoma. Por lo tanto se procedió a digerir el ADN y ligar los fragmentos generados generar plásmidos a partir del genoma de las mutantes con los cuales luego se transformaron células competentes de la cepa DH5-α. Para ello se extrajo el ADN genómico de las mutantes y se digirió con la enzima EcoRI. Los fragmentos obtenidos fueron ligados mediante la enzima Ligasa T4 y purificados para ser utilizados en la transformación de las células competentes. Los fragmentos ligados se precipitaron con etanol y acetato de amonio 0,3M o.n. a -20°C. Luego se centrifugaron a 12000g, se lavaron con etanol 70% y se

suspendieron en solución tampón $T_{10}E_1$. Se tomaron alícuotas de 10µl de cada suspensión de plásmidos para transformar 200µl de células competentes resuspendidas en $CaCl_2$ 0,1M (0,1 DO). Las células se transformaron incubando en hielo 10 min, luego a 42°C por 90 seg, y nuevamente en hielo 2min. Se agregó 1ml de medio líquido LB y se incubó con agitación durante 1h a 37°C. Las transformantes conteniendo el Tn5-lux se seleccionaron por resistencia a neomicina en placa de LB conteniendo 50µg/ml del antibiótico. Estas fueron crecidas en medio LB a 30°C y agitación o.n. para extraer los plásmidos mediante minipreparaciones de ADN con el sistema Purelink Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Los plásmidos purificados se secuenciaron mediante el servicio de secuenciación de Macrogen (Corea) utilizando cebadores que hibridan en los extremos del transposón. Las secuencias se analizaron por comparación mediante BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/).

4.4 resultados

4.4-1 Actividad antifúngica del sobrenadante de cultivo

El sobrenadante de cultivo de la cepa C119 mostró como característica una tensión superficial inferior a la del medio de cultivo sin inocular. Utilizando un tensiómetro DeNouy, se midió la tensión superficial del sobrenadante libre de células de un cultivo líquido en KB, incubado durante 24h a 30°C. Se observó que la tensión superficial del medio de cultivo disminuía notoriamente llegando a 26,33 ± 1,15 dinas/cm, en comparación con la del medio de cultivo sin inocular el cual presentó una tensión superficial en el entorno de 58 dinas/cm.

El extracto orgánico del sobrenadante de cultivo de la cepa C119 presentó una fuerte actividad inhibitoria de *P. debaryanum* cuando se enfrentaron en los bioensayos. El extracto fue fraccionado para identificar los componentes responsables de dicha actividad. Inicialmente se separaron cinco fracciones mediante TLC, utilizando como fase móvil Cloroformo: Metanol: Agua 65:25:4. Esta fase móvil fue la que mejor resolvió la mezcla de compuestos. Las cinco fracciones se sometieron al test de colapso de la gota

y a bioensayos de actividad antagónica y se observó que aquellas fracciones que presentaron actividad surfactante también eran capaces de inhibir el crecimiento de *P. debaryanum* (Figura 4.3).

Las fracciones 2 y 3, con actividad antifúngica, se analizaron mediante HPLC. De esta manera se pudo observar que la fracción 2, de mayor actividad antifúngica, estaba compuesta por varios componentes minoritarios y un pico principal, colectado a los 34min de corrida. Todos los compuestos fueron colectados para determinar si presentaban actividad surfactante. Como resultado se observó que el pico principal presentó una fuerte actividad surfactante y un espectro de absorción característico de los lipopéptidos con un máximo de absorción a una longitud de onda ubicado en 206nm (Figura 4.4).

4.4-2 Análisis estructural mediante espectrometría de masas.

El compuesto purificado mediante HPLC, con un tiempo de retención de 34 min, se analizó mediante espectrometría de masa MALDI-ToF. Se observó un pico predominante que correspondía a una m/z de 1079,7±0,1Da (1080,7Da para el ion protonado) (Figura 4.5-A). Dicho peso molecular estaba dentro de lo esperado para un lipopéptido cíclico. En el espectro de masas también se observaron los aductos con sodio (1102,7Da) y potasio (1118,69Da). El pico principal se seleccionó para su fragmentación y análisis de masas de los fragmentos. Se observaron picos cuyos tamaños eran característicos de aminoácidos, lo cual confirmaría la naturaleza peptídica del compuesto en estudio (Figura 4.5-B). A partir del espectro de fragmentación fue posible dilucidar el orden de los aminoácidos en la secuencia peptídica. Se realizaron diversas modificaciones químicas sobre el compuesto para obtener más información de su composición (Tabla 4.2). La reacción de sulfonación del N-terminal dio resultado negativo por lo cual se asumió que el extremo N-terminal no estaba libre. También se descartó la presencia de lisinas en la cadena peptídica. Por otra parte, luego de una reacción de metilación dirigida hacia los grupos ácidos que pudieran estar presentes, se observó un aumento de 14Da en la masa del péptido, correspondiente a una metilación (Figura 4.6-A). La fragmentación del péptido metilado mostró que no todos los picos fueron afectados por lo cual se concluyó que la reacción ocurrió en un aminoácido distinto del C-terminal (Figura 4.5-B). Teniendo en cuenta la masa del pico correspondiente al aminoácido metilado se pudo determinar que se trataba de un ácido aspártico.

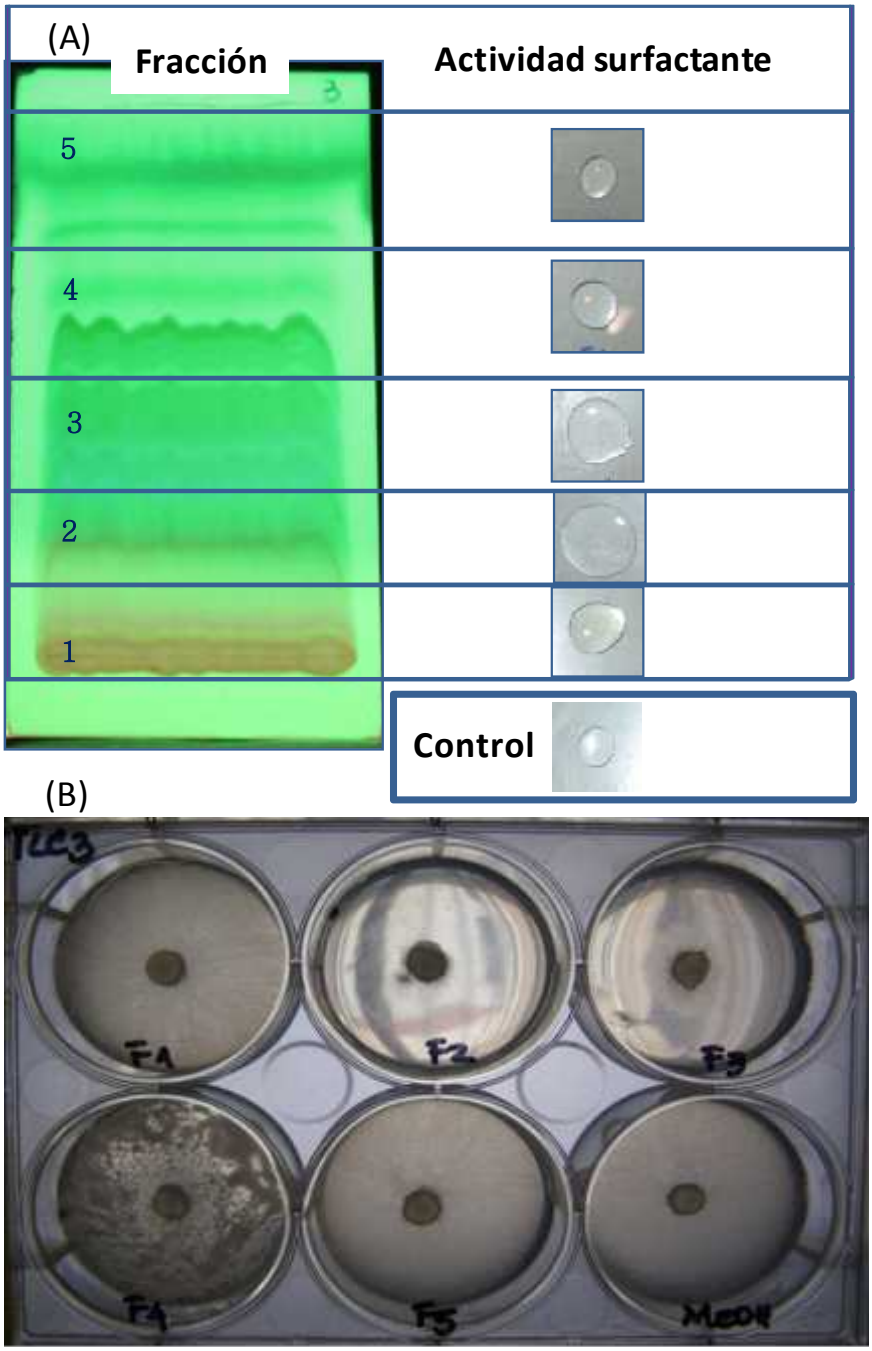


Figura 4.3- Análisis de la actividad antifúngica del sobrenadante de cultivo de C119. A) Separación mediante TLC preparativa de los compuestos extraídos del sobrenadante de cultivo de la cepa C119 utilizando como fase móvil cloroformo:metanol:agua (65:25:4). B) Ensayo de colapso de la gota realizado a cada fracción de la TLC eluída separadamente. C) Bioensayo de inhibición de *P. debaryanum* en agar PDA mezclado con cada fracción. Como control se utilizó metanol (la fracción 4 presentó contaminación, sin embargo esto no evitó que el oomicete creciera abarcando todo el pocillo).

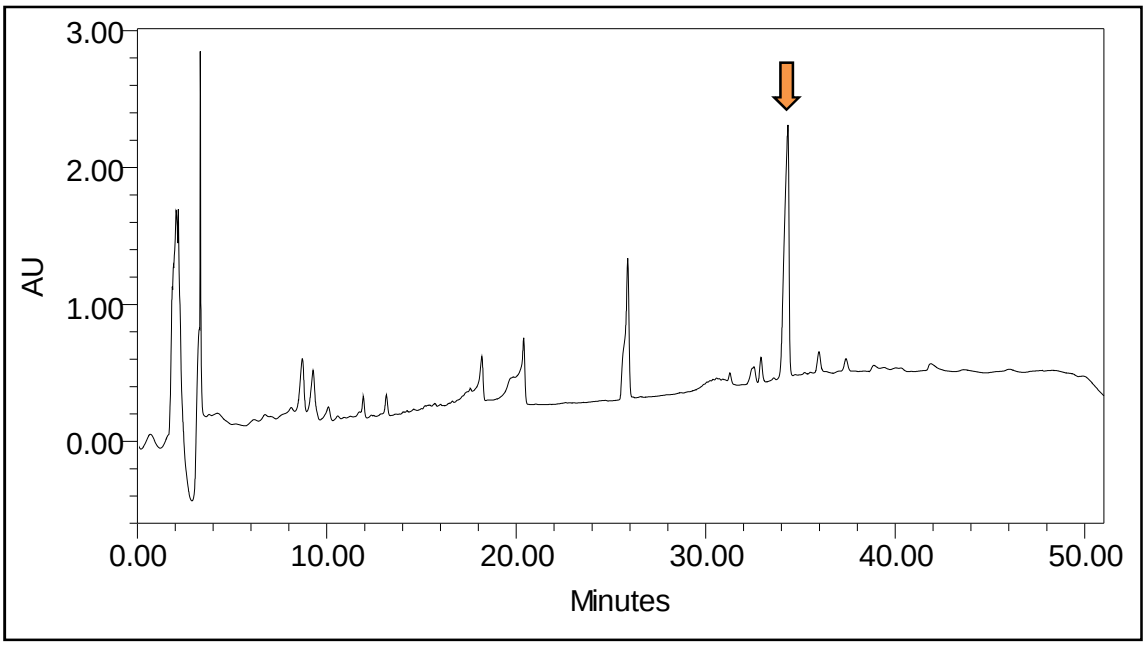


Figura 4.4- HPLC analítica de la fracción del extracto orgánico con mayor actividad antifúngica. En el cromatograma se observan los compuesto eluídos a distintos tiempos de retención. Con una flecha se indica un pico que eluyó a 34min y presentó actividad surfactante.

Tabla 4.2. Modificaciones estructurales realizadas sobre el lipopeptido

Modificación química	Objetivo	Resultado esperado	m/z observado	Conclusión
Etan CAF:	Agregado de ác. Sulfónico en N-t para mejorar espectro de fragmentación	Corrimiento +136 en la masa	**1102,65** (aducto de sodio, no hay reacción de sulfonación)	No hay N-t libre ni Lys
Metilación de grupos ácidos	Metilación de Asp, Glt y C-terminal	Corrimiento +14 por cada metilación	**1116,67** (una metilación en el aducto de sodio)	Se confirma Asp
Hidrólisis básica	Apertura del anillo lactónico,	Corrimiento +17 por unión de amoníaco al enlace ester	**1097,73** (anillo hidrolizado	Péptido cíclico

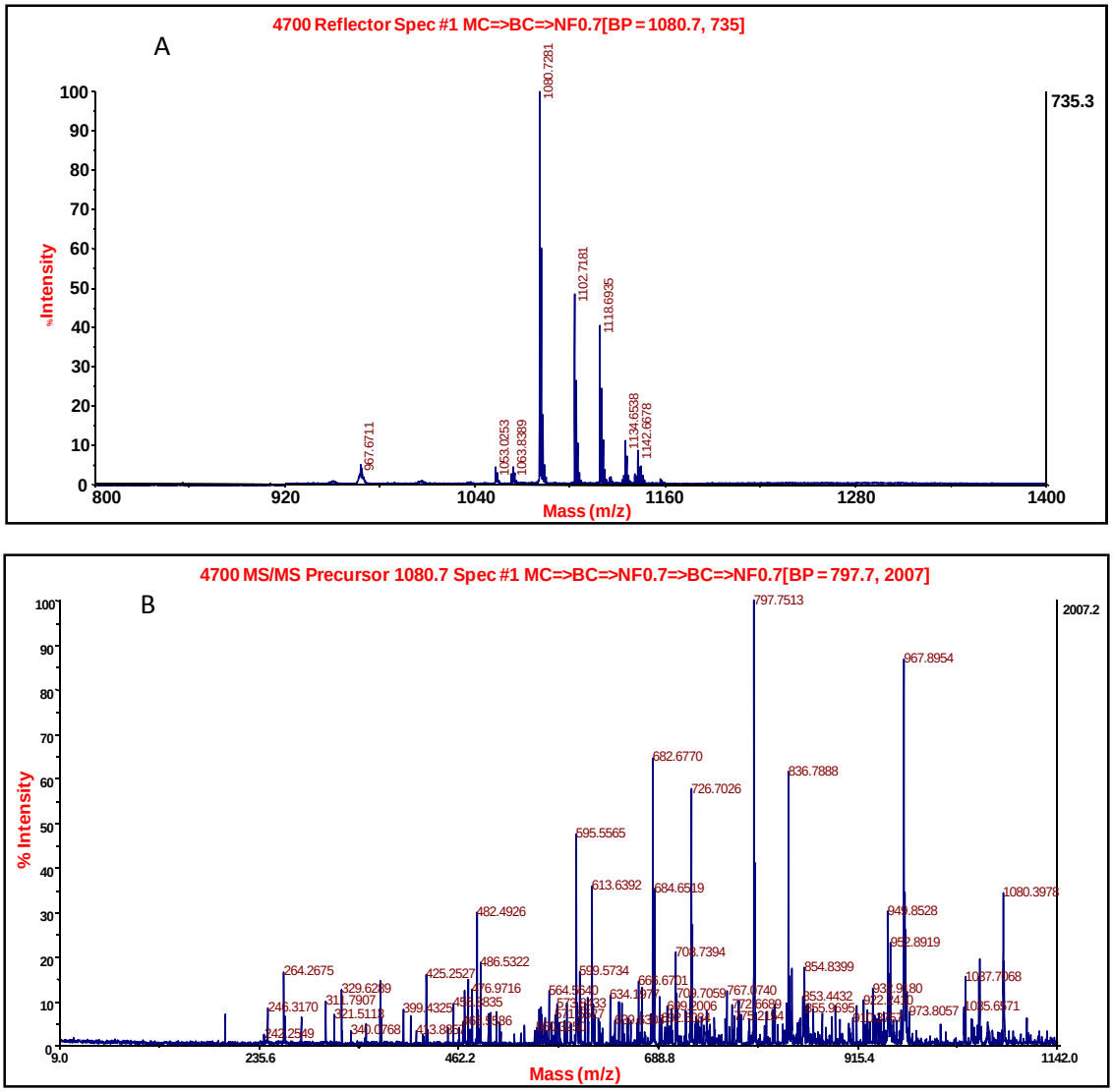


Figura 4.5- Espectrometría de masa del metabolito antifúngico. A) Espectro de masas del compuesto con actividad surfactante obtenido en modo lineal positivo. Se observa el compuesto principal protonado de 1080,7m/z y aductos de sodio y potasio 1102,7 y 1118,7 m/z respectivamente. B) Espectro de fragmentación del pico 1080,7m/z.

Finalmente el compuesto se sometió a un proceso de hidrólisis básica con lo cual se pudo observar un aumento de 17Da en la masa correspondiente a la apertura del anillo lactónico y la unión de un amoníaco mediante enlace éster. De esta forma se confirmó que el péptido se hallaba ciclado (Figura 4.7).

Teniendo en cuenta todos los datos recabados mediante espectrometría de masas y comparando las masas de los picos con bases de datos proteómicas, se pudo inferir una secuencia de aminoácidos del péptido analizado (Tabla 4.3).

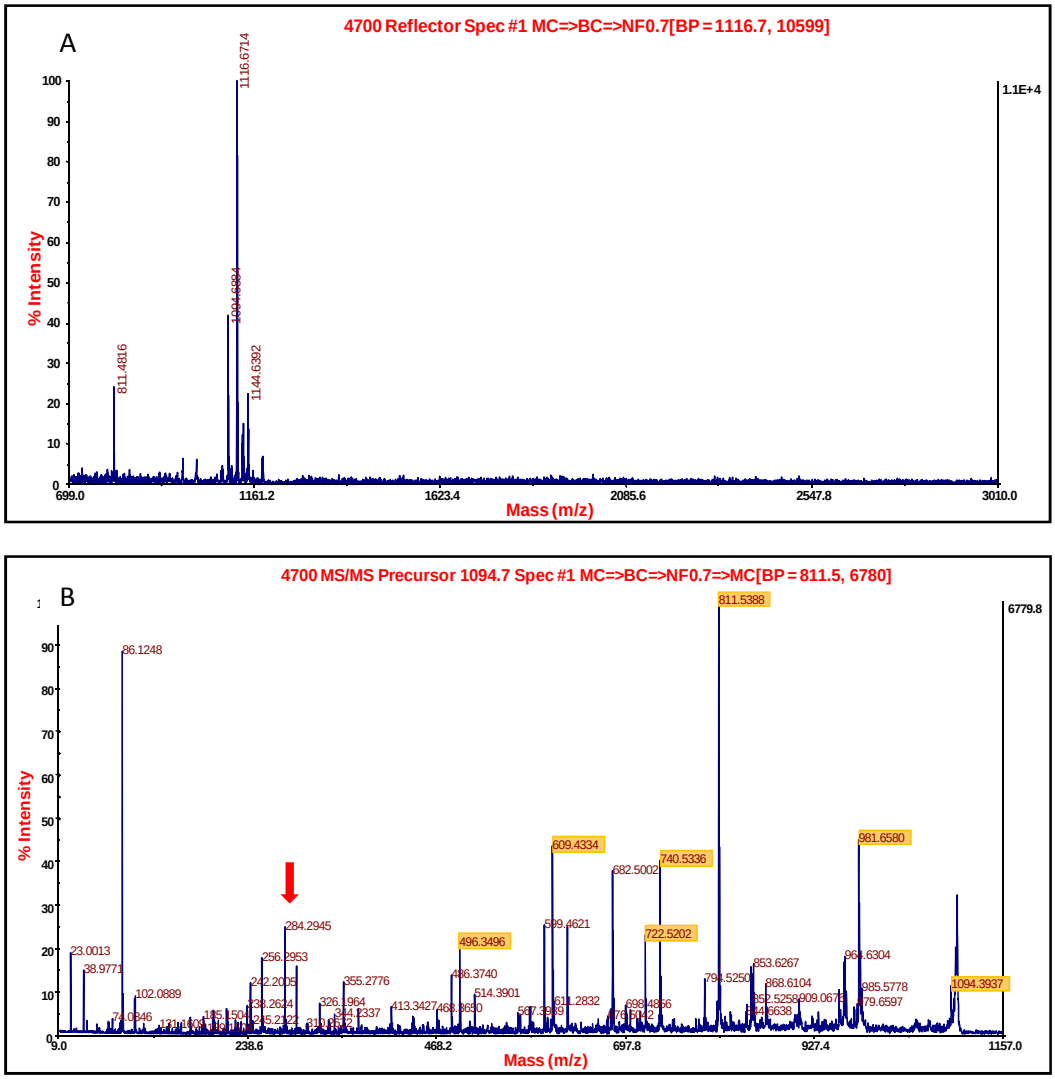


Figura 4.6- A) Espectro de masas del péptido metilado. Se observa un pico mayor correspondiente al aducto de sodio. B) espectro de fragmentación del péptido metilado. Se resaltan con un recuadro anaranjado los picos cuyas masas se modificaron por la presencia del grupo metilo. Se indica con una flecha roja el pico que posiblemente corresponda a una Leucina unida a un ácido graso hidroxilado de 10 carbonos.

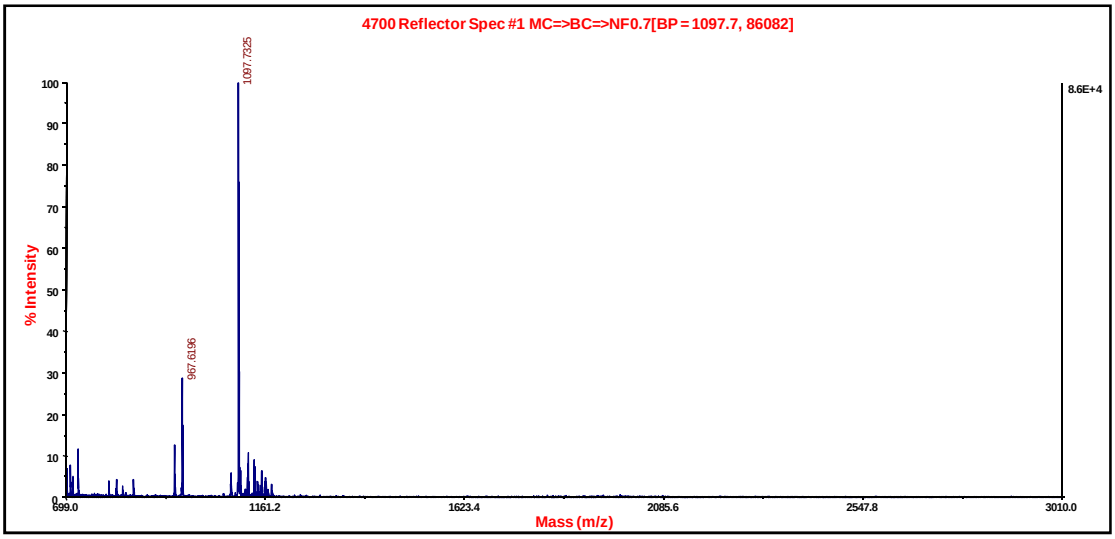


Figura 4.7- Espectro de masas del péptido hidrolizado

Tabla 4.3. Secuencia de aminoácidos predicha de acuerdo a las masas de los residuos (calculados por diferencia de masas entre picos), series "y" y "b" de las masas de los fragmentos, del producto hidratado y deshidratado (±18) y fragmentos "a" que perdieron un CO (b – 28)

SECUENCIA	RESIDUO	SERIE b	SERIE y	b-18	y+18	a	SECUENCIA
I/L	113.04*	981.66	113.04*	-	-	-	**I/L**
I/L	113.05	868.61	227.2	-	-	-	**I/L**
Q	128.08	740.53	355.28	722.52	245.21	-	**Q**
I/L	113.06	627.47	468.35	609.43	-	599.47	**I/L**
I/L	113.08	514.39	581.5	496.34	486.37	486.39	**I/L**
T	101.05	413.34	682.5	-	599.46	-	**T**
D-met	129.05	284.29	811.54	-	-	256.29	**D-met**
I/L + lipid	283.29	-	1094.7	-	-	-	**I/L + lipid**

* Masa teórica de la leucina e isoleucina.

El pico de masa 284,29Da posiblemente correspondía a una leucina unida a un ácido graso hidroxilado de 10 carbonos, con lo cual la estructura completa del lipopéptido estaría compuesta por 8 aminoácidos formando un anillo lactónico, unidos a un ácido graso hidroxilado:

ac graso-(Ile/Leu)- Asp-Thr- (Ile/Leu)- (Ile/Leu)-Gln-(Ile/Leu)-(Ile/Leu).

La Leucina y la Isoleucina poseen las misma relación m/z por lo cual no es posible diferenciarlas a través de ésta tecnología.

4.4-3 Confirmación estructural mediante RMN

Se obtuvieron varios miligramos del LPC partiendo de 2 litros de cultivo. Se siguieron dos protocolos de purificación, en uno se utilizó un solvente orgánico para extraer el compuesto y en el otro se utilizó una resina de adsorción. Ambas estrategias fueron exitosas pues se pudieron obtener en total 63mg del LPC. La pureza del lipopéptido purificado con un solvente orgánico fue mayor.

Se obtuvieron espectros monodimensionales para los distintos ^{1}H y ^{13}C que componen la molécula (Figuras 4.8 y 4.9). También se realizaron espectros bidimensionales HSQC para determinar la relación de los carbonos con los protones (Figura 4.10). Se pudo identificar la presencia de los 8 grupos -NH- correspondiente a cada aminoácido, más un -NH2 de la glutamina. Las señales correspondientes a carbonos unidos a átomos de oxígeno (no carbonilos) confirmaron por un lado el grupo hidroxilo del ácido graso y por otra parte el éster involucrado en la formación del anillo lactónico. La ciclación involucraba a una treonina de acuerdo a los acoplamientos observados entre protones cercanos del espectro COSY (Figura 4.11).

La estructura molecular modelizada mediante el programa Chemdraw se ajustó a los espectros observados y presentó un peso molecular teórico para el compuesto protonado, el aducto de sodio y el metilado de acuerdo a lo esperado (Figura 4.12).

El paso de purificación mediante una columna de Sephadex LH20 para eliminar pequeñas impurezas presentes en la muestra generó cambios en el compuesto que interfirieron con la interpretación del espectro. El compuesto sufrió una transesterificación entre el OH del hidroxiácido y el grupo metoxilado, con pérdida de un metilo y una molécula de agua. La mezcla del compuesto modificado y sin modificar generó la aparición de señales adicionales en el espectro de NMR, lo cual dificultó un análisis más profundo del compuesto.

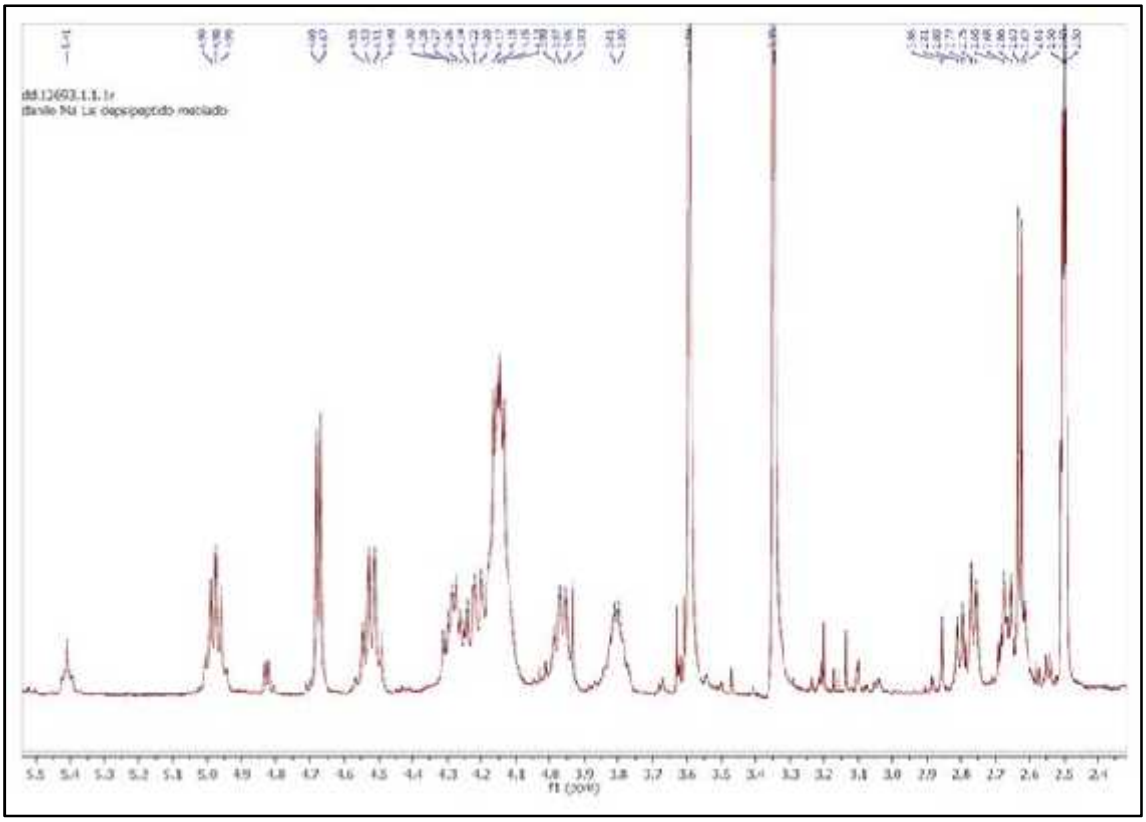


Figura 4.8- Espectro de ^{1}H-NMR del lipopeptido metilado.

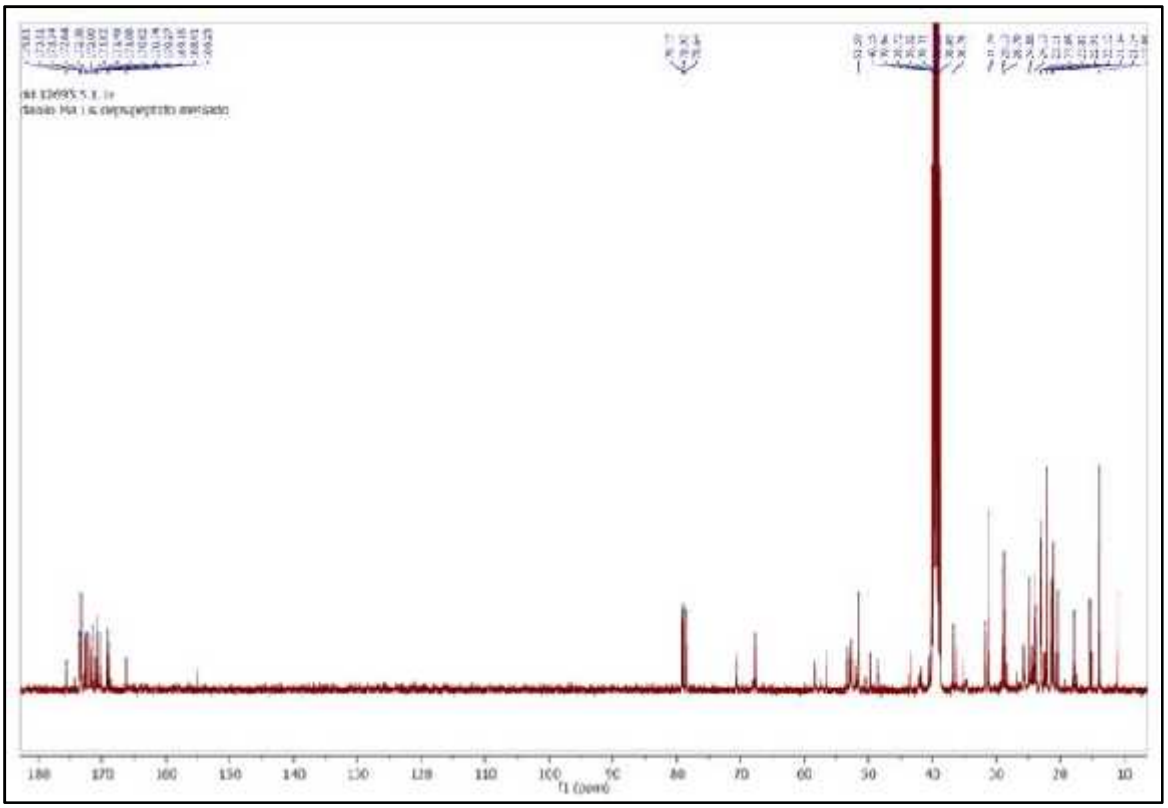


Figura 4.9- Espectro de ^{13}C-NMR del lipopeptido metilado.

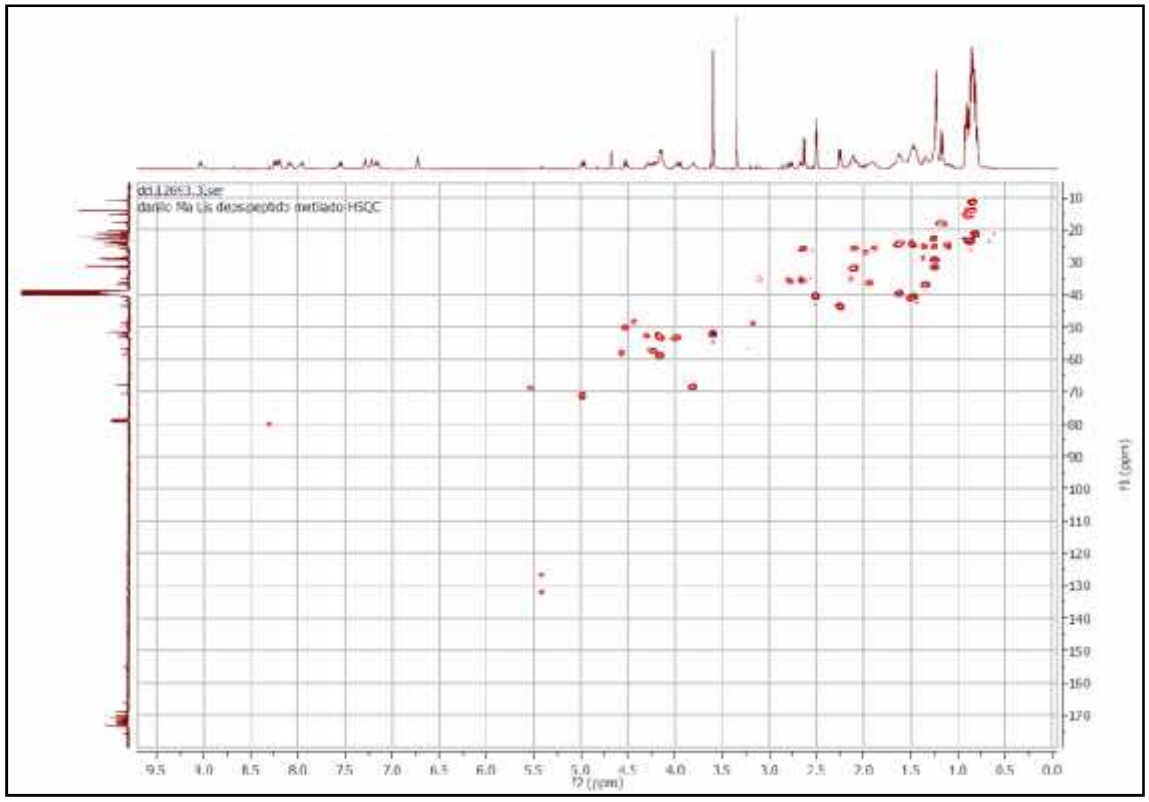


Figura 4.10- Analisis por NMR del lipopeptido cíclico. 2D- $^{1}H^{13}C$- HSQC obtenido del compuesto metilado en DMSO deuterado.

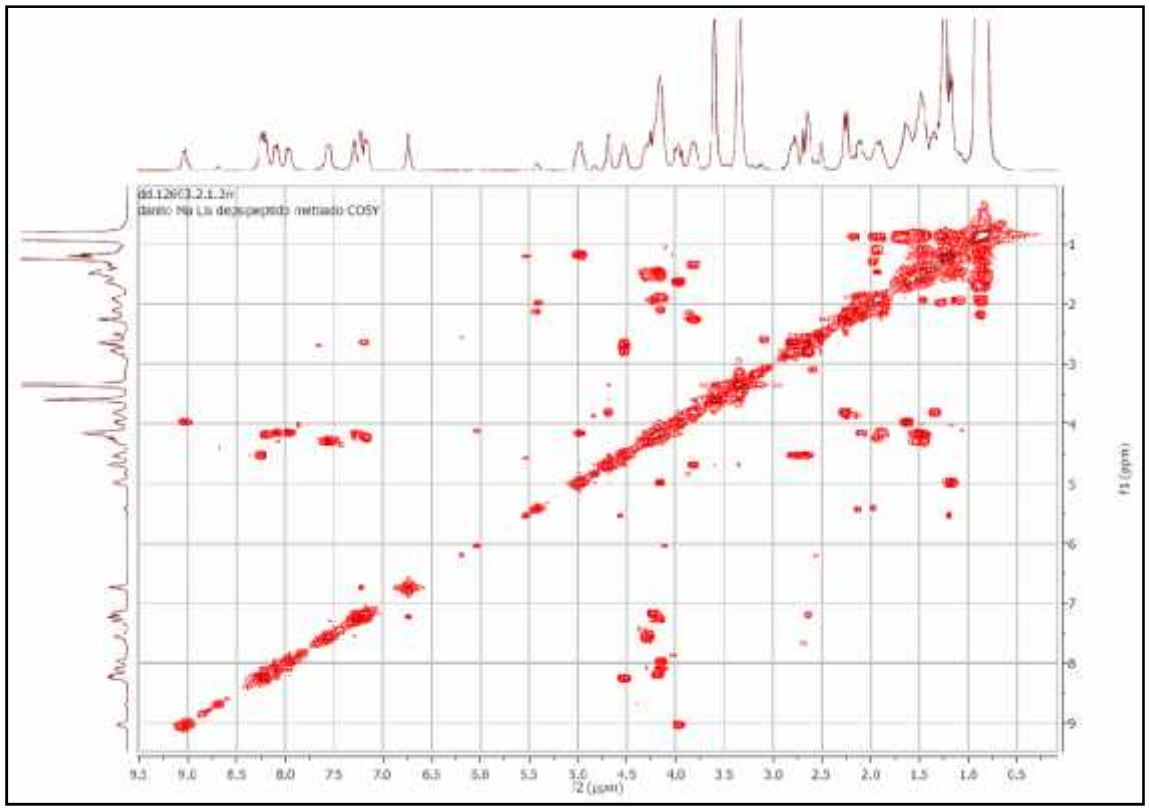


Figura 4.11- Análisis por NMR del lipopétido cíclico. 2D- COSY del compuesto metilado.

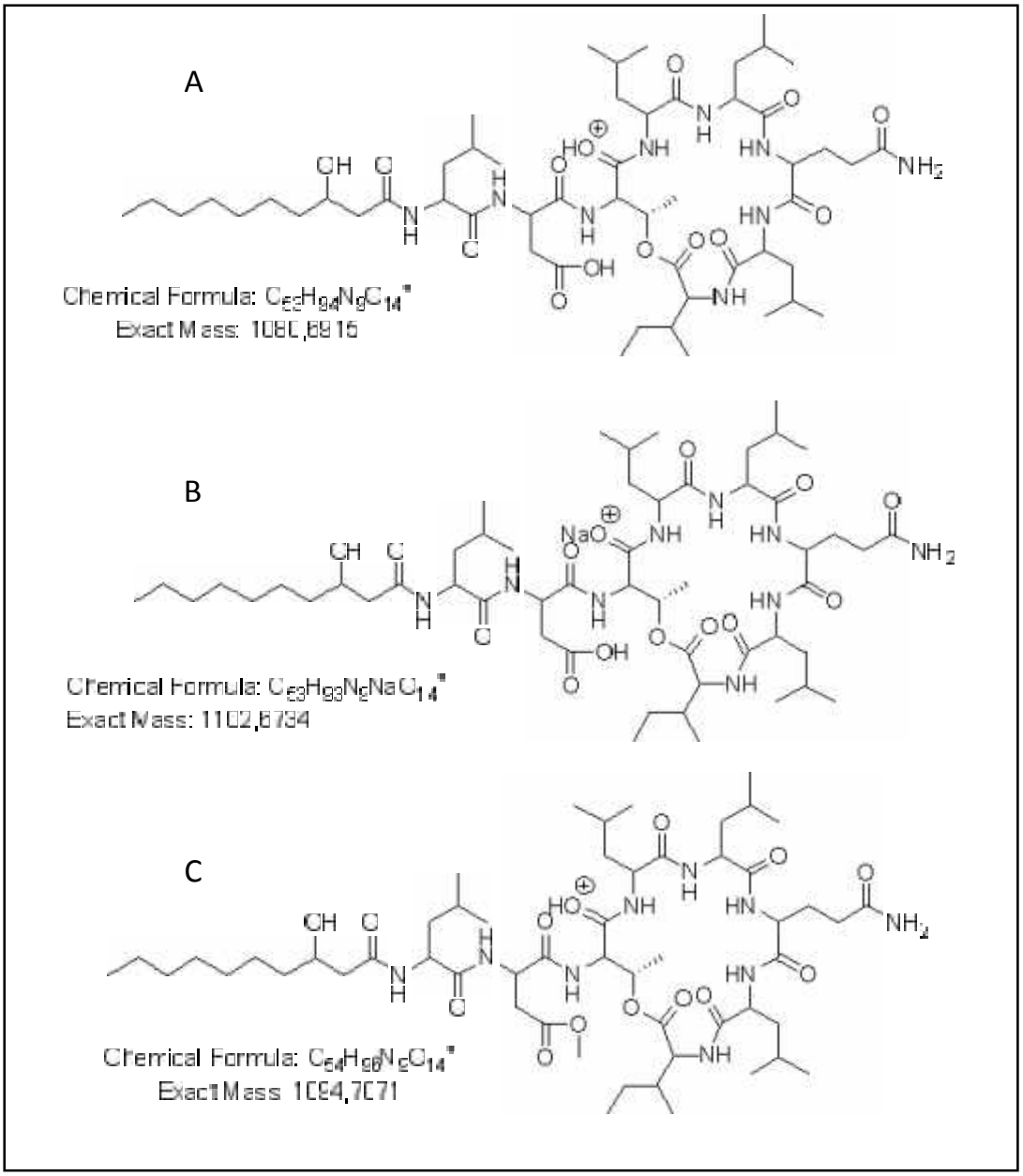


Figura 4.12- Modelos estructuarales predictivos realizados en Chemdraw. Se indican las fórmulas químicas y el peso molecular de cada estructura. A) lipopéptido cíclcico protonado, B) aducto de sodio y C) compuesto metilado.

4.4-4 Confirmación de la actividad antifúngica del lipopéptido producido por la cepa C119.

Para determinar si la producción del lipopétido surfactante era responsable de la actividad antagónica frente al oomicete *P. debaryanum*, se realizó una mutagénesis generalizada utilizando el transposón Tn5-lux y se identificaron aquellos transformantes que eran incapaces de disminuir la tensión superficial del medio de cultivo. De esta forma se obtuvieron cuatro mutantes que se denominaron C119 2-3F, C119 2-10G, C119 5-10G y C119 8-3B. Se verificó por Souther Blot que el transposón tuviera una única inserción en el genoma de las mutantes. Se observó una única banda luego de la hibridación con la sonda marcada para las cuatro mutantes (datos no mostrados). La mutante C119 5-10G presentó una banda más ancha posiblemente debido a dos fragmento de tamaño similar hibridando con la sonda.

Para determinar la identidad de los genes interrumpidos por la inserción del transposón se secuenciaron los fragmento de ADN flanqueantes y se mapearon en el genoma de la cepa (Figura 4.13). Las mutantes C119 2-3F, C119 2-10G y C119 5-10G presentaron una inserción en un dominio de adenilación de una NRPS, lo cual concuerda con la hipótesis de que la actividad surfactante se debía únicamente a la presencia de un lipopéptido. La identidad del gen se confirmó por comparación con genes homólogos mediante BLAST (Figura 4.14). La mutante C119 5-10G también mostró una inserción en un gen de tipo quinasa de serinas y treoninas, por lo cual el transposón debió insertarse dos veces en el genoma. Finalmente, el gen interrumpido para la mutante C119 8-3B presentó homología con el gen *flgN*, ubicado dentro del operón responsable de la síntesis del flagelo, en la cepa *P. fluorescens* Pf0-1 (figura 4.15).

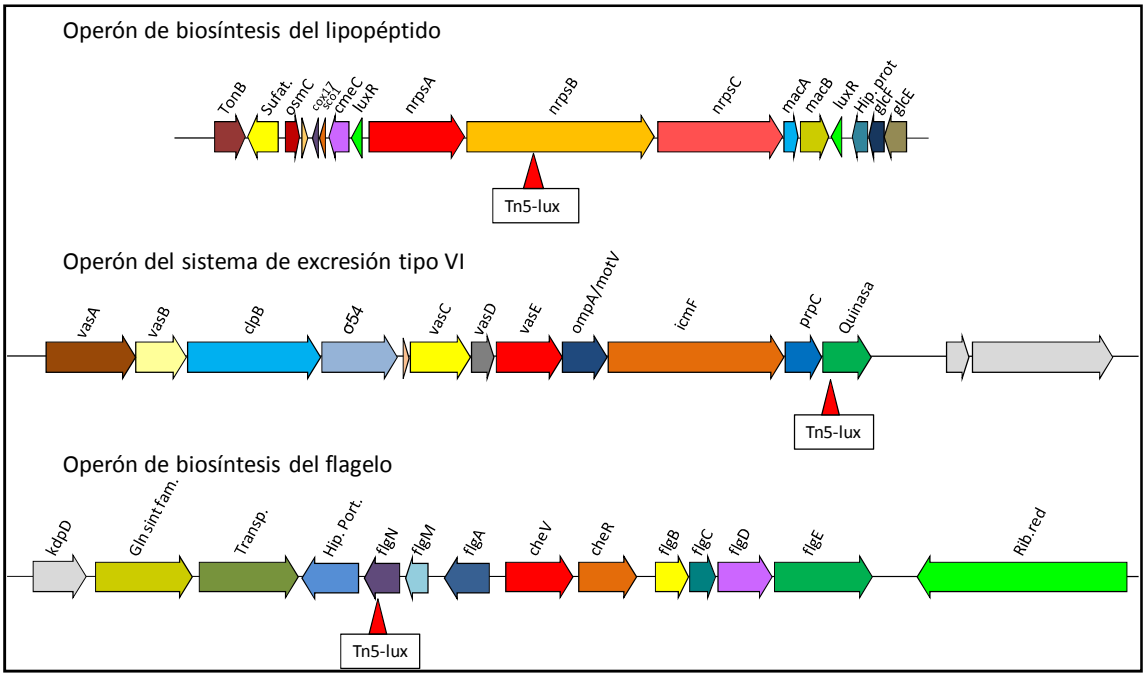


Figura 4.13- Sitios de inserción del transposón Tn5-Lux en el genoma de la cepa C119. Las mutantes C119 2-3F, C119 2-10G y C119 5-10G presentaron una interrupción en los genes de biosíntesis del lipopéptido cíclico. La mutante C119 5-10G también presentó una inserción en una serina/treonina quinasa muy cercana a un operón de síntesis de proteínas involucradas en el sistema de sercreción del tipo VI. La mutante C119 8-3B presentó una única inserción en el gen *flgN*, ubicado dentro del operón de síntesis del flagelo.

```
tolaasin.biosynthesis       -------GCCGTCGGCCTGATCGGACGCATGCGCCAGGCTGGCCTCAACGCCGACGTACG
  C119.2-3F                 AGAGTCAGCCGTGAGCCTGATCGAACGCTTGCGCCAGATCGGCCTCAACACCGACGTGCG
arthrofactin.synthetase     ----------GTGACCCTGATCGAGCGCATGCGTCAGCTCGGCCTGAGCACCGATGTGCG
WLIP                        -------------AGCCTGATCGAGCGTATGCGCCAGGTCGGCCTGAGCTGCGATGTGCG
                                        ********  **  **** ***   ***** * *  *** ** **

tolaasin.biosynthesis       CGTGCTGTTCAACCAACCGACCTTGGCGGCGCTCGCCGCTGCCGTGGGCAGCGGGCGCGA
  C119.2-3F                 CGTGCTGTTCAGCCAGCCGACTCTGGCTGCATTGGCTGCGGCAGTAGGGAGCGGTCGCGA
arthrofactin.synthetase     CGTGCTGTTCAGCCAGCCAACCCTCGCCGCACTGGCCGCCGCCGTCGGCAGTGGTCGCGA
WLIP                        TGTGTTGTTCAGCCAGCCAAGCCTGGCGGCGCTGGCCGCCGCCGTGGGCAGTGGCCGGGA
                             *** ****** *** ** *   * ** **  * ** ** ** ** ** ** ** ** **

tolaasin.biosynthesis       GATTCAGGTGCCGGCCAACGCCATCCCGGCAGGTTGCACGCACATCACGCCGGACCTGCT
  C119.2-3F                 AATCGAAGTGCCGGCCAATCGCATTCCTGCCGACTGCACCCGCATCACTCCGGAGTTGCT
arthrofactin.synthetase     AGTCGCGGTGCCGGCCAATCTGATTCCAATCGGTTGCACGCATATCACTCCAGACATGCT
WLIP                        AGTCGTGGTGCCGGCCAATGGCATTCCAGTGGGTTGCACGCAGATCACGCCGTTGATGCT
                              *    ***********    ** **    *  ***** *  ***** **     ****

tolaasin.biosynthesis       GCCGCTGCTGACACTCGACCAGCCCAGCATCGATCGCATCGTCGCCACTGTCGCAGGCGG
  C119.2-3F                 GAGCCTGACCGAGCTGGATCAGCCGAGCATCGACCGGACCGTTGCCACGGTGCCCGGCGG
arthrofactin.synthetase     GACCCTGGTGCAACTGGATCAGCAGAGCATCGAGCGTATCGTTGCCACGGTGCCTGGCGG
WLIP                        GACCCTGGTGCAGCTCGACCCGACGGCGATCGCGCGTATCGTCGCGAACGTGCCGGGCGG
                            *   ***      ** ** * *      ****  ** * *** ** *  **  * *****

tolaasin.biosynthesis       TGCGGCCAACGTGCAGGATATCTACCCGCTGGCGCCGTTGCAGGAAGGCATTCTTTACCA
  C119.2-3F                 CGCCGCCAACGTGCAGGACATTTATCCGCTGGCGCCGTTGCAGGAAGGCATTCTTTACCA
arthrofactin.synthetase     TGCCGCCAACGTGCAGGACATTTATCCGCTGGCGCCGTTGCAGGAAGGCATTCTTTATCA
WLIP                        TGCGGCGAACGTGCAGGATATTTATCCGTTGGCGCCGTTGCAGGAAGGCATTCTTTACCA
                             ** ** *********** ** ** *** ************************** **

tolaasin.biosynthesis       CCACATCAGTGCCGAACAGGGCGA-----------------------------------
  C119.2-3F                 TCACCTGAGCGCCGCCGAGGGCGATCCCTACTTATTACAGTCATGTCTGGCCTTTGCCAG
arthrofactin.synthetase     TCACTTGAGCGCCGCGCACGGCGATCCATACCTGCTGCAATCGCGCCTGGCATTCGACAG
WLIP                        CCACATCAGTGCCGAACAGGGCGATCCGTACCTGCTGCAATCGCGCATGGCATTCGACAG
                             *** * ** **** * *****
```

Figura 4.14- Alineamiento de la secuencia interrumpida en la mutante C119 2-3F con secuencias similares obtenidas del BLAST

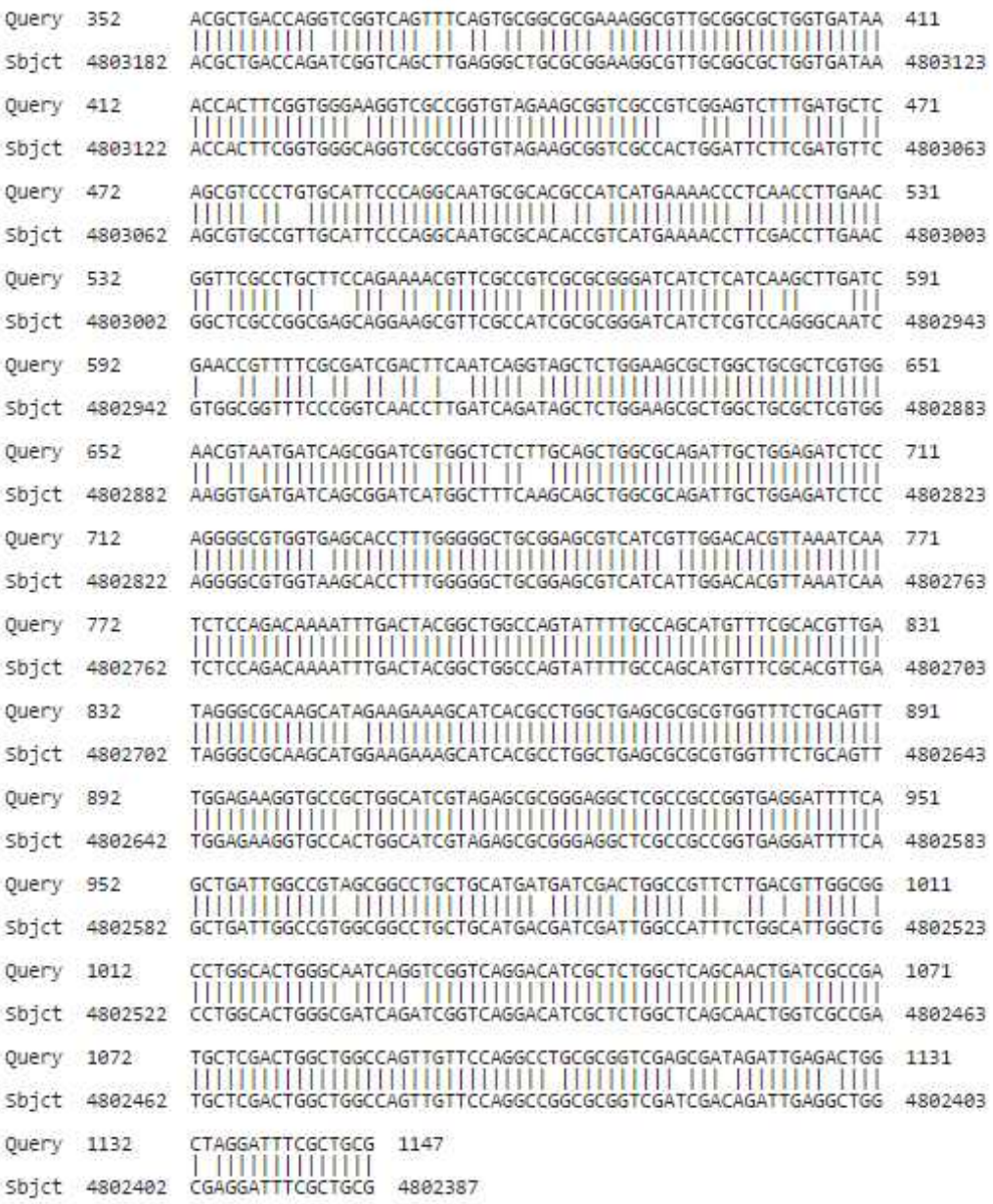
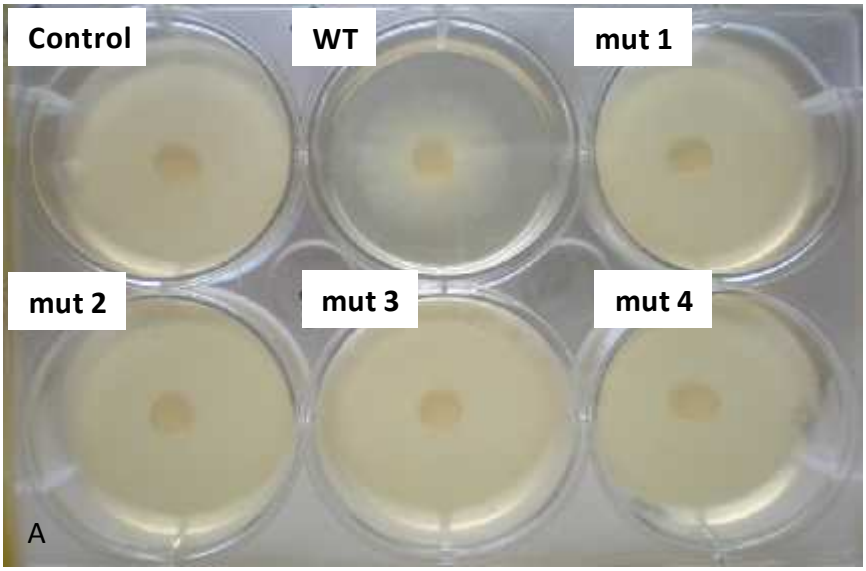


Figura 4.15- Alineamiento de secuencias nucleotídicas entre el fragmento adyacente al transposón Tn5-lux de la mutante C119 8-3B (Query) y el gen *flgN* presente en el genoma de la cepa P. fluorescens Pf0-1 (Sbjct) mediante BLAST. Las secuencias presentaron un 91% de similitud (724/796 nucleótidos).

La caracterización fenotípica mostró que todas las mutantes eran incapaces de antagonizar a *P. debaryanum* en bioensayos de actividad del sobrenadante de cultivo. La movilidad celular también se vio afectada, ya que las mutantes perdieron la capacidad de *swarming* (figura 4.16). Sin embargo las mutantes retuvieron la capacidad de formar biofilms y de producir sideróforos (datos no mostrados).



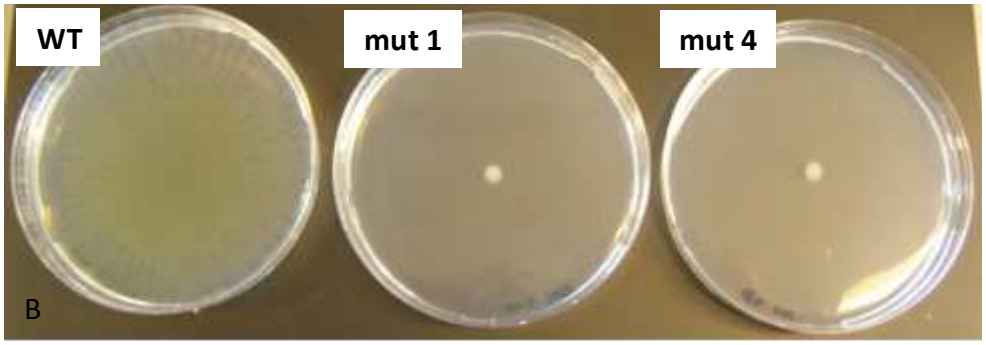


Figura 4.16- fenotipo de las cepas mutantes en la producción del LPC. A) Ensayo de antagonismo frente a *P. ebaryanum* utilizando sobrenadante de cultivos de la cepa salvaje y las mutantes incorporados en el agar. (B) Ensayo de *swarming* en medio conteniendo 0,6% de agar.

4.5 discusión

La cepa *P. fluorescens* C119 presenta varias características que la hacen una buena candidata para su aplicación como agente de control biológico (ACB) de patógenos de plantas. Una de ellas es la capacidad de antagonizar diversos patógenos mediante la producción de metabolitos secundarios antimicrobianos. Determinar la naturaleza de dichos metabolitos en fundamental para avanzar en el conocimiento de las complejas interacciones presentes en los sistemas patógeno-ACB-planta.

4.5-1 Identificación del principal metabolito antifúngico de *P. fluorescens* C119

Para determinar los posibles compuestos antimicrobianos producidos por la cepa C119, se comenzó estudiando la actividad antifúngica de sobrenadantes de cultivos líquidos. Se comprobó que luego de alcanzada la fase estacionaria, la tensión superficial del cultivo líquido disminuía notoriamente. Esto era debido a la presencia de un compuesto tensoactivo producido por la cepa, posiblemente el LPC. En una primera etapa se logró recuperar la actividad antifúngica mediante la extracción con un solvente orgánico. En los siguientes pasos de purificación (TLC y HPLC) se pudo observar que las actividades surfactante y antifúngica coincidían en la misma fracción. El análisis por HPLC de fase reversa se monitoreó a una longitud de onda de 210nm (dentro del rango de absorbancia del enlace peptídico) como se ha reportado en las purificaciones de otros lipopéptidos cíclicos (Washio et al. 2010; de Bruijn et al. 2008). De esta forma se detectó un pico importante que, luego de concentrado, presentó actividad surfactante (Figura 4.4). Algunas *Pseudomonas* spp. fluorescentes son capaces de producir varios biosurfactantes, evidenciados por la presencia de varios compuestos en el análisis por HPLC. Estos compuestos demostraron ser variantes del mismo LPC producidos a partir de una misma NRPS (Gross et al. 2007; Kuiper et al. 2004). Los mecanismos de síntesis de estas variantes pueden ser dos. En uno de los mecanismos, la NRPS que sintetiza el compuesto presenta algún dominio de adenilación con especificidad más laxa y puede incorporar diferentes aminoácidos a la cadena peptídica en formación. Otro motivo es que se incorporen ácidos grasos de diferente largo y saturación, debido a un dominio de condensación inicial más laxo. Ambos eventos generan variantes del LPC producido por la misma

bacteria. Estas situaciones se observan, por ejemplo, en la síntesis de orfamidas por la cepa *P. protegens* Pf-5. La orfamida A es la forma predominante, la orfamida B se diferencia de la A por la sustitución de una valina por una D-allo-isoleucina en la posición 4 de la cadena peptídica. La orfamida C se diferencia de la A en que presenta un ácido tetradecanoico en lugar del dodecanoico (Loper & Gross 2007). Las tres orfamidas son producidas por la misma NRPS ya que una mutación en un gen de síntesis elimina la producción de todas (Gross et al. 2007). Si la cepa C119 produce más variantes del LPC, éstas no estaban presentes en niveles detectables para las condiciones en que se realizó la purificación.

La fracción con actividad se analizó por Maldi-ToF con lo cual se pudo confirmar que se trataba del LPC cuyos genes se identificaron previamente en el análisis genómico (Figura 4.5). Diversas modificaciones químicas realizadas sobre el compuesto permitieron confirmar que el LPC estaba compuesto por 8 aminoácidos. La secuencia pudo ser parcialmente confirmada, con excepción de los residuos de leucinas/isoleucinas ya que presentan la misma masa y no fue posible diferenciarlas. La secuencia de aminoácidos coincidió con la predicha a partir del análisis informático de los genes siguiendo la regla de colinealidad (Tabla 4.3). También se confirmó la presencia de un anillo lactónico, dado que el compuesto reaccionó positivamente a su apertura con un aumento en la masa del compuesto hidrolizado. La mayoría de los lipopéptidos de *Pseudomonas* fluorescentes son cíclicos con excepción de la syringafactina descripta en *P. syryngae pv. syringae* de la cual se identificaron seis variantes similares, todas ellas lineales. A pesar de que las NRPS que los sintetizan presentan los dos dominios tioesterasas terminales, el péptido carece de la treonina que forma el enlace éster involucrado en la cilcación de la molécula (Berti et al. 2007).

Para finalizar la caracterización estructural del LPC se realizó un análisis de RMN, sobre el compuesto purificado. Dado que la técnica requiere de varios miligramos del compuesto puro se puso a punto un protocolo de extracción del LPC a partir de dos litros de sobrenadante libre de células. En general los protocolos seguidos para la purificación de varios miligramos de lipopeptidos cíclicos requieren de una extracción con solvente orgánico como el acetato de etilo (Yin et al. 2009; Saini et al. 2008; Koch et al. 2002; Kuiper et al. 2004). También se han descripto estrategias de purificación donde simplemente el sobrenadante libre de células es acidificado y mantenido en frio para que precipite el LPC (Rokni-Zadeh

et al. 2012; Saini et al. 2008). Esto es posible por las característica anfipáticas del compuesto. La diversidad estructural de los LPC hace difícil que un mismo protocolo pueda ser aplicado a todos los compuestos. La precipitación a partir del medio de cultivo acidificado no dio buenos rendimientos para el LPC producido por la cepa C119. Para evitar el uso de grandes volúmenes de solventes orgánicos se puso a punto una purificación por adsorción en amberlita. De esta manera fue posible separar el LPC de la mayor parte de los componentes del medio de cultivo y concentrarlo. La purificación por amberlita fue muy eficiente ya que no se detectó actividad surfactante entre los compuestos no adsorbidos por la resina y se obtuvieron varios miligramos del producto. Sin embargo, debe mejorarse el nivel de pureza del compuesto obtenido mediante este procedimiento ya que el análisis por RMN mostró trazas de otros compuestos contaminantes que entorpecían la interpretación de los espectros. El análisis por RMN permitió ratificar varias características de la estructura del LPC. Se confirmó la presencia de la glutamina, el aminoácido que presentó una mayor dificultad para su predicción a partir del análisis de los genes de síntesis. También se confirmó la formación del anillo lactónico que involucra a la treonina y la presencia de un hidroxilo en el ácido graso. No es posible confirmar por esta metodología la quiralidad de los aminoácidos.

El lipopéptido producido por la cepa *P. fluorescens* C119 no ha sido descripto anteriormente en otra bacteria y no forma parte de ninguna de las categorías en las cuales se han clasificado los LPC de *Pseudomonas* fluorescentes. Muy pocos LPC con motivos peptídicos compuestos por ocho aminoácidos se han descripto en *Pseudomonas* fluorescentes. Hasta la fecha solamente se han reportado las plusbacinas y la pseudofactina.

Las plusbacinas fueron aisladas de una *Pseudomonas* sp. Poseen una composición aminoacídica muy diferente del LPC de C119. Las plusbacinas poseen arginina, prolina, serina, hidroxiprolina y ácido hidroxiaspártico entre los aminoácidos de la cadena peptídica (Hashizume & Nishimura 2008). Presentan actividad inhibitoria ante bacterias Gram positivas, pero no actúan sobre bacterias Gram negativas. Las plusbacinas de la serie A son más potentes que las de la serie B.

La pseudofactina fue purificada a partir de una cepa de *P. fluorescens* aislada de agua de mar. Presenta un péptido rico en leucinas al igual que el LPC de C119. La cadena peptídica posee la siguiente secuencia

de aminoácidos: Gly-Ser-Thr-Leu-Leu-Ser-Leu-Leu, para la pseudofactina II (la mayoritaria) y Gly-Ser-Thr-Leu-Leu-Ser-Leu-Val para la pseudofactina I (Janek et al. 2010). Al igual que el LPC de C119, el anillo lactónico involucra a seis aminoácidos. Quedan fuera del anillo dos residuos, Gly y Ser, el primero unido a un ácido graso de 14 carbonos. Las pseudofactinas demostraron tener una capacidad para emulsionar hidrocarburos alifáticos y aromáticos y aceites vegetales superior a los surfactantes comerciales Tween20 y Tritón X100 (Janek et al. 2010). Estudios posteriores demostraron que este compuesto posee un gran potencial en el área médica. Por un lado la pseudobactina II es capaz de disminuir notablemente la adhesión de las bacterias patógenas: *Escherichia coli, Enterococcus faecalis, Enterococcus hirae, Staphylococcus epidermidis, Proteus mirabilis y Candida albicans* sobre tres tipos de superficies (vidrio, poliestireno y silicona). Esto evita la formación de biofilms por lo cual el LPC podría ser utilizado para impedir la colonización de bacterias patógenas sobre catéteres, prótesis e implantes (Janek et al. 2012). La pseudobactina II también es capaz de inducir la apoptosis de células de melanoma A375 en forma selectiva, sin generar un efecto tan marcado en los fibroblastos de la dermis. Aparentemente el LPC afecta la integridad de las membranas de las células cancerígenas sin embargo no se conoce el motivo de la selectividad hacia esas células (Janek et al. 2013). Las posibles aplicaciones del LPC producido por la cepa C119 en medicina, industria alimentaria o biorremediación no han sido determinadas aún.

4.5-2 Implicancia del lipopeptido producido por la cepa C119 en el control biológico de patógenos

La producción del LPC podría ser uno de los principales mecanismos responsables del efecto biocontrolador observados en la cepa C119. Esto se debe a que el compuesto demostró tener un fuerte efecto inhibidor sobre oomicetes, uno de los principales fitopatógenos oportunistas encontrados en el suelo.

Frente a estas evidencias, se procedió a confirmar su implicancia en antagonismo hacia los oomicetes. Se utilizó como estrategia una mutagénesis generalizada, mediante la inserción al azar del transposón Tn5-lux, para obtener información adicional sobre posibles genes de regulación o transporte del metabolito implicado. De esta forma se obtuvieron cuatro mutantes incapaces de producir el

compuesto tensoactivo. Las mutantes tampoco eran capaces de inhibir el crecimiento del oomicete *P. debaryanum.* Por otra parte, las mutantes eran capaces de formar biofilms pero carecían de movimiento tipo *swarming*. El análisis de los genes interrumpidos demostró que tres de las mutantes presentaron una inserción del transposón en los genes de biosíntesis del LPC. Una cuarta mutante presentó una interrupción en un gen homólogo a *flgN* involucrado en el ensamblado del flagelo (Figura 4.12).

Se han reportado fenotipos muy variados asociados a mutaciones en genes involucrados en la producción de LPC. Por ejemplo, la cepa *Pseudmonas sp*. MIS38 aislada de un derrame de petróleo produce artrofactina. La mutación del gen de síntesis *arfB* eliminaba por completo la producción del LPC. Las mutantes eran capaces de formar mayor cantidad de biolfilm que la cepa salvaje, pero el biofilm de las mutantes era más inestable. Por otra parte, las mutantes perdían el movimiento de *swarming,* y el agregado exógeno del LPC recuperaba levemente la movilidad en relación a la cepa salvaje. La observación al microscopio electrónico mostró que, a diferencia de la cepa salvaje, las mutantes presentaban elementos fibrosos interconectando las células. La participación del LPC en la formación de estas fibras no ha sido elucidada, pero posiblemente estén interfiriendo con el movimiento de *swarming* (Roongsawang et al. 2003). Una mutagénesis generalizada sobre ésta misma cepa, utilizando el transposón miniTn5, generó un gran número de mutantes incapaces de producir el LPC, la mayoría de ellas en los genes de biosíntesis. También se obtuvieron mutantes para el gen que codifica para ArfF, para una proteína de choque térmico (HtpG*)* y para una ppGpp sintetasa/hidrolasa (*spoT)* (Washio et al. 2010). La producción del LPC pudo ser restaurada mediante complementación de las mutantes. ArfF es una proteína reguladora de tipo LuxR y dirige la síntesis del LPC. Por otra parte, la mutante para *htpG* no eliminaba la transcripción de los genes de biosíntesis del LPC. Para explicar la ausencia de LPC los autores propusieron que esta proteína podría actuar como chaperona para el correcto plegado de factores de transcripción o del complejo multienzimático de síntesis. Finalmente, trabajos recientes demostraron que la producción de artrofactina está fuertemente ligada a la función de SpoT (Washio et al. 2011). SpoT regula la "respuesta estricta" ante la falta de aminoácidos, lo cual afecta la síntesis de todas las macromoléculas de la célula. La artrofactina, entonces, cumpliría múltiples funciones en la cepa MIS38 que le permitirían su adaptación fisiológica al medio circundante.

Al igual que en el ejemplo anterior, las mutantes obtenidas a partir de la cepa *P. protegens* Pf-5, incapaces de producir orfamida, podían adherirse a una superficie de poliestireno y formar biofilms, pero no presentaban movimiento de *swarming* (Gross et al. 2007). Por el contrario, la mutante de la cepa *P. brassicacearum* DF41, incapaz de producir sclerocina, un LPC recientemente descripto (Berry et al. 2012), retenía el movimiento de *swarming*. El LPC de esta cepa es necesario para el control biológico del patógeno *Sclerotinia sclerotiorum.* La mutante en GacS sí perdía la capacidad de movilizarse por *swarming* (Berry et al. 2010; Berry et al. 2012). Para la cepa *P. fluorescens* SS101, la producción de masetolide es necesaria para el movimiento de *swarming* y para la formación de biolfilms ya que las mutantes en los genes de biosíntesis eran incapaces de expresar ambas actividades (de Bruijn et al. 2008).

Si bien no se ha reportado ninguna relación entre la expresión de FlgN y la producción de LPCs, existen trabajos recientes que indican la estrecha relación entre la síntesis de surfactantes y de flagelos. En las gamma-proteobacterias el ensamblado de los flagelos es un proceso de varios niveles donde es necesario que cada nivel se complete antes de pasar al siguiente (McCarter 2006). Los genes involucrados se clasifican por nivel. En el nivel I está el regulador principal FleQ, que controla los genes de clase II. Dichos genes son responsables de la selección del sitio y del comienzo del ensamblaje del cuerpo basal. En el nivel II también se encuentra el sistema de dos componentes FleS/FleR. FleR regula la expresión de los genes de clase III que codifican para proteínas que completan el cuerpo basal. Cuando está completo, el factor anti sigma FlgM es exportado a través del cuerpo basal, liberando la expresión del factor sigma FliA que mantenía reprimida. FliA pertenece al nivel I y funciona como activador de los genes de clase IV que incluyen a la flagelina (FliC) y a genes de quimiotaxis.

Estudios realizados en una cepa de *P. syringae* productora de un surfactante de tipo rhamnolípido*,* mostraron que mutaciones en genes relacionados con el ensamblaje del flagelo disminuían la producción de este surfactante. Cuanto más avanzado era el nivel del gen mutado (desde *fleQ* hasta *fliC*) menor era la inhibición en la producción del rhamnolípido (Burch et al. 2012). La eliminación de *fleQ* generaba la ausencia total del surfactante mientras que una mutación en fliA reducía 3 veces su producción. Una mutación en *fliC* generaba un aumento en la producción del surfactante. El mecanismo

de regulación que coordina la producción del surfactante y el flagelo no se conoce, sin embargo es claro que ambos procesos están íntimamente relacionados.

La relación entre movilidad y producción de LPC fue analizada recientemente en la cepa *P. fluorescens* SBW25 productora del LPC viscocina (Alsohim et al. 2014). Se observó que la eliminación del gen *fleQ* afectaba la movilidad de tipo *swimming* sobre agar semisólido. Sin embargo la mutante mantenía un tipo de movilidad que los autores llaman *spidery* (de aspecto dendrítico). Los autores observaron en este punto que el ensayo de movilidad utilizando 0,6% de agar no daba resultados positivos sin embargo, disminuyendo el porcentaje de agar al 0,25% permitía apreciar el movimiento tipo *spidery*. Cuando se analizó una doble mutante FleQ$^-$ Visc$^-$, ésta perdía todo tipo de movilidad, por lo cual concluyeron que el movimiento de *spidery* dependía del LPC. El análisis de la capacidad de colonizar raíces de remolacha azucarera demostró que las mutantes FleQ$^-$ y FleQ$^-$ Visc$^-$ no podían colonizar la raíz mientras que la mutante Visc$^-$, con el flagelo intacto, las colonizaban más lentamente. Los autores concluyen que si bien la viscocina no es esencial para la colonización radicular, su función sería facilitar el movimiento de las bacterias.

A partir de estos trabajos surgen teorías de por qué las bacterias coordinan tan íntimamente la función del flagelo con la producción del surfactante. Algunos autores coinciden en que el surfactante cumpliría una función de lubricación de la superficie sobre la cual se desplazaría la célula mediante la propulsión del flagelo. La regulación positiva y negativa de la producción del surfactante permitiría asegurar que éste se produzca en suficiente cantidad para permitir funcionar el flagelo e impediría que se sobre produzca para evitar desperdiciar recursos (Burch et al. 2012; Xu et al. 2012). Otra alternativa es que el flagelo funcione como sensor de la superficie, fenómeno observado en *Proteus mirabilis* (Belas & Suvanasuthi 2005). Si la síntesis de flagelina fuera indicativo de una condición externa donde la producción de biosurfactante es beneficiosa, entonces coordinar la producción de biosurfactante sería una respuesta eficaz a esta condición (Burch et al. 2012).

La mutación en el gen *flgN* en la cepa *P. fluorescens* C119 dio como resultado un fenotipo que se caracterizaba por el impedimento en la movilidad bacteriana y ausencia del LPC en cantidades detectables. Los estudios sobre la proteína FlgN han demostrado que posee dos funciones, como

chaperona y como regulador transcripcional. Como chaperona protege de la degradación a las proteínas FlgK y FlgL asociadas al gancho del flagelo (Aldridge et al. 2003), aunque no es necesaria para la secreción de dichas proteínas (McCarter 2006). Por otra parte regula la expresión de factor antisigma *flgM.* FlgN puede estar en dos estados: unida a FlgK/L ó libre. Cuando se encuentra libre promueve la transcripción de *flgM* pero cuando está unida a FlgK/L se impide la promoción. La mutación en *flgN* genera la ausencia del regulador positivo para FlgM, por lo cual el factor antisigma no sería transcripto y FliA podría expresarse activando los genes de tipo IV, como la flagelina. Por otra parte la ausencia de FlgN podría favorecer la degradación de las proteínas del gancho. La cepa mutante en el gen flgN$^-$ deberá analizarse por microscopía para determinar si el flagelo está presente y posee una estructura normal y si las células presentan movilidad. También se deberá determinar si la inserción del transposón no afectó la expresión de algún otro gen cercano, como por ejemplo *flgM,* que pueda estar explicando el fenotipo observado. A diferencia de lo observado para el rhamnolípido de *P. syringae*, donde aparentemente mutaciones en proteínas del nivel II, III y IV tenían un efecto paulatinamente menor sobre la producción del surfactante, la mutación de la proteína reguladora FlgN en C119 tiene un efecto inhibidor importante sobre la producción del LPC. La participación del gen *flgN* en la producción del LPC se presenta como un posible mecanismo de coordinación de dos procesos que están involucrados directamente en la movilidad bacteriana, lo cual deberá analizarse en profundidad para su confirmación.

4.6 conclusiones y perspectivas

La cepa *P. fluorescens* C119 produce un nuevo lipopéptido cíclico (LPC), que no ha sido descripto en otras *Pseudomonas* spp. Su estructura fue determinada mediante técnicas de espectrometría y se corresponde correctamente con la predicha en base a los genes de síntesis identificados en el genoma de la cepa. El LPC caracterizado es uno de los principales mecanismos involucrados en la inhibición del oomicete *P. debaryanum*, y podría estar implicado en el control biológico de enfermedades de implantación de la alfalfa observado en trabajos previos. Sin embargo, la producción del LPC en la rizósfera de la alfalfa deberá ser confirmada.

Si bien la cepa C119 se presenta como un promisorio agente de control biológico de enfermedades de la alfalfa, es posible que el LPC producido por esta cepa tenga otras aplicaciones. La capacidad emulsionante de hidrocarburos, la citotoxicidad, inmunosupresión, entre otras, son posibles aplicaciones que deberán ser analizadas.

Estudios recientes apuntan a una estrecha relación ente la formación del flagelo y la producción de surfactantes. La mutante en el gen *flgN* deberá ser caracterizada en profundidad dado que en este trabajo se observó una relación entre la producción del biosurfactante y dicho gen. Este resultado aporta nuevas evidencias sobre la coordinación de dos procesos que están relacionados con la movilidad bacteriana.

consideraciones finales

En este trabajo se han confirmado las excelentes cualidades de la cepa *P. fluorecens* C119 para su aplicación como biopesticida y biofertilizante de alfalfa. Presenta características promotoras del crecimiento vegetal tales como la capacidad de producir metabolitos antifúngicos, colonizar eficientemente las raíces de alfalfa y promover un aumento significativo en el rendimiento del cultivo. Los mecanismos posiblemente involucrados en el biocontrol de patógenos son la competencia por hierro mediante sideróforos y la producción de metabolitos antifúngicos, tales como un lipopéptido cílcico, HCN y enzimas hidrolíticas de paredes de hongos. El lipopéptido cíclico, identificado y caracterizado estructuralmente en este trabajo, es novedoso y podría tener aplicaciones en otras áreas. Los mecanismos de promoción directa del crecimiento vegetal son menos claros y podrían involucrar la síntesis de AIA por una vía independiente de Trp, la actividad de una enzima ACC desaminasa diferente a las descriptas y la solubilización de fósforo precipitado en formas inorgánicas. La cepa C119 logró persistir en las raíces de la alfalfa en altas densidades poblacionales sin afectar a largo plazo la estructura de la comunidad microbiana de la rizósfera. Su manipulación y aplicación sobre superficies extensas no supondría riesgos para la salud de las personas expuestas ni para el ambiente, dado que no se identificaron genes relacionados a la patogenicidad de plantas y animales.

Los mecanismos de promoción presentes en C119 deberán ser confirmados mediante ensayos en plantas de alfalfa. También sería interesante determinar cambios en la estructura de la comunidad de hongos y oomicetes de la rizósfera de alfalfa debido a la inoculación de la cepa C119 y la persistencia de la cepa durante un período mayor de tiempo.

Quedan algunas interrogantes por resolver como por ejemplo la presencia de genes para la biosíntesis de metabolitos secundarios de función desconocida y de qué manera está relacionada la producción del LPC con la formación del flagelo a través del gen *flgN*.

La cepa *P. fluorescens* originalmente aislada en una prospección de bacterias promotoras del crecimiento de la alfalfa, se consolida actualmente como una buena alternativa para la promoción de esta forrajera, de manera eficiente y amigable con el medio ambiente.

referencias

Abdel-Mawgoud, a M., Aboulwafa, M. M., & Hassouna, N. A.-H. (2008). Optimization of surfactin production by *Bacillus subtilis* isolate BS5. Applied Biochemistry and Biotechnology, 150(3), 305–25.

Abdel-Mawgoud, A. M., Aboulwafa, M. M., & Hassouna, N. A.-H. (2009). Characterization of rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* isolate Bs20. Applied Biochemistry and Biotechnology, 157(2), 329–45.

Ahmad, F., Husain, F. M., & Ahmad, I. (2011). Rhizosphere and root colonization by bacterial inoculants and their monitoring methods: a critical area in PGPR research. In I. Ahmad, F. Ahmad, & J. Pichtel (Eds.), Microbes and Microbial Technology (pp. 363–391). New York, NY: Springer New York.

Aldridge, P., Karlinsey, J., & Hughes, K. T. (2003). The type III secretion chaperone FlgN regulates flagellar assembly via a negative feedback loop containing its chaperone substrates FlgK and FlgL. Molecular Microbiology, 49(5), 1333–1345.

Ali, B., Sabri, a N., Ljung, K., & Hasnain, S. (2009). Auxin production by plant associated bacteria: impact on endogenous IAA content and growth of *Triticum aestivum* L. Letters in Applied Microbiology, 48(5), 542–7.

Alsohim, A. S., Taylor, T. B., Barrett, G. a, Gallie, J., Zhang, X.-X., Altamirano-Junqueira, A. E., … Jackson, R. W. (2014). The biosurfactant viscosin produced by *Pseudomonas fluorescens* SBW25 aids spreading motility and plant growth promotion. Environmental Microbiology, 16(7), 2267–81.

Ambrosi, C., Leoni, L., Putignani, L., Orsi, N., & Visca, P. (2000). Pseudobactin Biogenesis in the Plant Growth-Promoting Rhizobacterium *Pseudomonas* Strain B10 : Identification and Functional Analysis of the l-Ornithine N 5 -Oxygenase (psbA) Gene Pseudobactin Biogenesis. Plant Journal of Bacteriology, 182(21), 6233–6238.

Ansari, M. Z., Yadav, G., Gokhale, R. S., & Mohanty, D. (2004). NRPS-PKS : a knowledge-based resource for analysis of NRPS / PKS megasynthases, *Nucleic Acids Research*, *32*(Web Server issue), W405–413.

Araújo, W. L., Marcon, J., Jr, W. M., Elsas, J. D. Van, Vuurde, J. W. L. Van, Lúcio, J., & Maccheroni, W. (2002). Diversity of Endophytic Bacterial Populations and Their Interaction with *Xylella fastidiosa* in Citrus Plants. Applied and Environmental Microbiology, 68(10), 4906–4914.

Arias, A., Yanes, M. L., Bajsa, N., Altier, N., Varela, H., Quagliotto, L., & Vaz, P. (2009). Escalado, formulación y validación agronómica de un inoculante en base a *Pseudomonas fluorescens* para optimizar la implantación de alfalfa. Proyecto PDT 74/05, DICyT.

Arshad, M., Shaharoona, B., & Mahmood, T. (2008). Inoculation with pseudomonas spp. Containing acc-deaminase partially eliminates the effects of drought stress on growth, yield, and ripening of pea (*Pisum sativum* L.). Pedosphere, 18(5), 611–620.

Athukorala, S. N. P., Fernando, W. G. D., & Rashid, K. Y. (2010). The role of volatile and non-volatile antibiotics produced by *Pseudomonas chlororaphis* strain PA23 in its root colonization and control of *Sclerotinia sclerotiorum*. Biocontrol Science and Technology, 20(8), 875-890.

Audenaert, K., Pattery, T., Cornelis, P., & Höfte, M. (2002). Induction of systemic resistance to *Botrytis cinerea* in tomato by *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2: role of salicylic acid, pyochelin, and pyocyanin. Molecular Plant-Microbe Interactions : MPMI, 15(11), 1147–56.

Awasthi, R., Tewari, R., & Nayyar, H. (2011). Synergy between Plants and P-Solubilizing Microbes in soils: Effects on Growth and Physiology of Crops. International Research Journal of Microbiology (IRJM), 2(12), 484–503.

Babu, S. (2011). Pseudomonas fluorescens-mediated biocontrolin the post-genomic era: from lap to lab to land. Biotechnology Journal, 6(5), 488–91.

Baca, B. E., & Elmerich, C. (2007). Microbial production of plant hormones In: Associative and endophytic nitrogen-fixing bacteria and cyanobacterial associations (Springer N., pp. 113–143).

Bagnasco, P., De La Fuente, L., Gualtieri, G., Noya, F., & Arias, a. (1998). Fluorescent *Pseudomonas* spp. as biocontrol agents against forage legume root pathogenic fungi. Soil Biology and Biochemistry, 30(10-11), 1317–1322.

Bakker, P. A. H. M., Doornbos, R. F., Zamioudis, C., Berendsen, R. L., & Pieterse, C. M. J. (2013). Induced Systemic Resistance and the Rhizosphere Microbiome, 29(2), 136–143.

Banat, Ibrahim M, Andrea Franzetti, Isabella Gandolfi, Giuseppina Bestetti, Maria G Martinotti, Letizia Fracchia, Thomas J Smyth, and Roger Marchant. 2010. "Microbial Biosurfactants Production, Applications and Future Potential." *Applied Microbiology and Biotechnology* 87 (2), 427–44.

Bashan, Y., de-Bashan, L. E., Prabhu, S. R., & Hernandez, J.-P. (2013). Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). Plant and Soil, 378(1-2), 1–33.

Baudoin, E., Nazaret, S., Mougel, C., Ranjard, L., & Moënne-Loccoz, Y. (2009). Impact of inoculation with the phytostimulatory PGPR *Azospirillum lipoferum* CRT1 on the genetic structure of the rhizobacterial community of field-grown maize. Soil Biology and Biochemistry, 41(2), 409–413.

Belas, R., & Suvanasuthi, R. (2005). The ability of proteus mirabilis to sense surfaces and regulate virulence gene expression involves flil , a flagellar basal body protein the ability of *Proteus mirabilis* to sense surfaces and regulate virulence gene expression involves FliL , a flagellar body protein. Journal of Bacteriology, 187(19), 6789–6803.

Belimov, A. a, Dodd, I. C., Hontzeas, N., Theobald, J. C., Safronova, V. I., & Davies, W. J. (2009). Rhizosphere bacteria containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase increase yield of plants grown in drying soil via both local and systemic hormone signalling. The New Phytologist, 181(2), 413–23.

Benítez, T., Rincón, A. M., Limón, M. C., & Codón, A. C. (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. International Microbiology . 7(4), 249–60.

Berendsen, R. L., Pieterse, C. M. J., & Bakker, P. a H. M. (2012). The rhizosphere microbiome and plant health. Trends in Plant Science, 17(8), 478–86.

Berg, G. (2009). Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. Applied Microbiology and Biotechnology, 84(1), 11–8.

Berg, W. K., Cunningham, S. M., Brouder, S. M., Joern, B. C., Johnson, K. D., Santini, J. B., & Volenec, J. J. (2007). The long-term impact of phosphorus and potassium fertilization on alfalfa yield and yield components. Crop Science, 47(5), 2198.

Berry, C. L., Brassinga, A. K. C., Donald, L. J., Fernando, W. G. D., Loewen, P. C., & de Kievit, T. R. (2012). Chemical and biological characterization of sclerosin, an antifungal lipopeptide. Canadian Journal of Microbiology, 58(8), 1027–34.

Berry, C., Fernando, W. G. D., Loewen, P. C., & de Kievit, T. R. (2010). Lipopeptides are essential for *Pseudomonas* sp. DF41 biocontrol of Sclerotinia sclerotiorum. Biological Control, 55(3), 211–218.

Berti, A. D., Greve, N. J., Christensen, Q. H., & Thomas, M. G. (2007). Identification of a biosynthetic gene cluster and the six associated lipopeptides involved in swarming motility of Pseudomonas syringae pv. tomato DC3000. Journal of Bacteriology, 189(17), 6312–23.

Blin, K., Medema, M. H., Kazempour, D., Fischbach, M. a, Breitling, R., Takano, E., & Weber, T. (2013). antiSMASH 2.0-a versatile platform for genome mining of secondary metabolite producers. Nucleic Acids Research: gkt449.

Blumer, C., & Haas, D. (2000). Mechanism, regulation, and ecological role of bacterial cyanide biosynthesis. Archives of Microbiology, 173(3), 170–7.

Boddy, C. N. (2014). Bioinformatics tools for genome mining of polyketide and non-ribosomal peptides. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 41(2), 443–50.

Bodour, A. a, & Miller-Maier, R. M. (1998). Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms. Journal of Microbiological Methods, 32(3), 273–280.

Bodour, A. A., Drees, K. P., & Maier, R. M. (2003). Distribution of biosurfactant-producing bacteria in undisturbed and contaminated arid southwestern soils. Applied and Environmental Microbiology, 69(6), 3280–3287.

Bonsall, R. F., Weller, D. M., & Thomashow, L. S. (1997). Quantification of 2 , 4-diacetylphloroglucinol produced by fluorescent *Pseudomonas* spp . in vitro and in the rhizosphere of wheat. Applied and Environmental Microbiology, 63(3), 951–955.

Botelho, G. R., & Mendonça-hagler, L. C. (2006). Fluorescent pseudomonads associated with the rhizosphere of crops - an overview. Brazilian Journal of Microbiology, 37, 401–416.

Brantner, J. R., Windels, C. E., & Station, N. E. (1998). Variability in Sensitivity to Metalaxyl *in vitro* , Pathogenicity , and Control of *Pythium* spp. on Sugar Beet. Plant Disease, 82(8), 896–899.

Braun, P. G., Hildebrand, P. D., Ells, T. C., & Kobayashi, D. Y. (2001). Evidence and characterization of a gene cluster required for the production of viscosin, a lipopeptide biosurfactant, by a strain of *Pseudomonas fluorescens*. Canadian Journal of Microbiology, 47(4), 294–301.

Bresson, J., Vasseur, F., Dauzat, M., Labadie, M., Varoquaux, F., Touraine, B., & Vile, D. (2014). Interact to survive: *Phyllobacterium brassicacearum* Improves *Arabidopsis* tolerance to severe water deficit and growth recovery. PloS One, 9(9), e107607.

Brons, J. K., & van Elsas, J. D. (2008). Analysis of bacterial communities in soil by use of denaturing gradient gel electrophoresis and clone libraries, as influenced by different reverse primers. Applied and Environmental Microbiology, 74(9), 2717–2727.

Buddrus-Schiemann, K., Schmid, M., Schreiner, K., Welzl, G., & Hartmann, A. (2010). Root colonization by *Pseudomonas* sp. DSMZ 13134 and impact on the indigenous rhizosphere bacterial community of barley. Microbial Ecology, 60(2), 381–393.

Budi, S. W., van Tuinen, D., Arnould, C., Dumas-Gaudot, E., Gianinazzi-Pearson, V., & Gianinazzi, S. (2000). Hydrolytic enzyme activity of *Paenibacillus* sp. strain B2 and effects of the antagonistic bacterium on cell integrity of two soil-borne pathogenic fungi. Applied Soil Ecology, 15, 191–199.

Burch, A. Y., Shimada, B. K., Mullin, S. W. a, Dunlap, C. a, Bowman, M. J., & Lindow, S. E. (2012). *Pseudomonas syringae* coordinates production of a motility-enabling surfactant with flagellar assembly. Journal of Bacteriology, 194(6), 1287–1298.

Camilios Neto, D., Meira, J. A., Tiburtius, E., Zamora, P. P., Bugay, C., Mitchell, D. A., & Krieger, N. (2009). Production of rhamnolipids in solid-state cultivation: Characterization, downstream processing and application in the cleaning of contaminated soils. Biotechnology Journal, 4(5), 748–755.

Casanova, O., & Cerveñansky, A. (2004). Manejo de la fertilización fosfatada y azufre en la instalación y refertilización de alfalfa. In XIX Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo.

Cascales, E., Buchanan, S. K., Duché, D., Kleanthous, C., Lloubès, R., Postle, K., Cavard, D. (2007). Colicin biology. Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR, 71(1), 158–229.

Cazorla, Francisco M, Simon B Duckett, Ed T Bergström, Sadaf Noreen, Roeland Odijk, Ben J J Lugtenberg, Jane E Thomas-Oates, and Guido V Bloemberg. (2006). Biocontrol of avocado dematophora root rot by antagonistic *Pseudomonas fluorescens* PCL1606 correlates with the production of 2-hexyl 5-propyl resorcinol. Molecular Plant-Microbe Interactions : MPMI, 19(4), 418–28.

Challis, G. L. (2008). Mining microbial genomes for new natural products and biosynthetic pathways. Microbiology 154, (6), 1555-1569.

Challis, G. L., Ravel, J., & Townsend, C. a. (2000). Predictive, structure-based model of amino acid recognition by nonribosomal peptide synthetase adenylation domains. Chemistry & Biology, 7(3), 211–24.

Chaparro, J. M., Badri, D. V, Bakker, M. G., Sugiyama, A., Manter, D. K., & Vivanco, J. M. (2013). Root exudation of phytochemicals in *Arabidopsis* follows specific patterns that are developmentally programmed and correlate with soil microbial functions. PloS One, 8(2), e55731.

Chapon, A., Boutin, M., Rim, D., & Delalande, L. (2003). Direct and specific assessment of colonisation of wheat rhizoplane by *Pseudomonas fluorescens* Pf29A. European Journal of Plant Pathology. 109, 61–70.

Chen, L., Dodd, I. C., Theobald, J. C., Belimov, A. a, & Davies, W. J. (2013). The rhizobacterium *Variovorax paradoxus* 5C-2, containing ACC deaminase, promotes growth and development of *Arabidopsis thaliana* via an ethylene-dependent pathway. Journal of Experimental Botany, 64(6), 1565–73.

Cheng, Z., Park, E., & Glick, B. R. (2007). 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase from *Pseudomonas putida* UW4 facilitates the growth of canola in the presence of salt. Canadian Journal of Microbiology, 53(7), 912–8.

Chin-A-Woeng, T F, D van den Broek, G de Voer, K M van der Drift, S Tuinman, J E Thomas-Oates, B J Lugtenberg, and G V Bloemberg. (2001). Phenazine-1-carboxamide production in the biocontrol strain *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 is regulated by multiple factors secreted into the growth medium. Molecular Plant-Microbe Interactions, 14(8), 969–79.

Coenye, T., Gevers, D., Van de Peer, Y., Vandamme, P., & Swings, J. (2005). Towards a prokaryotic genomic taxonomy. FEMS Microbiology Reviews, 29(2), 147–67.

Collavino, M. M., Sansberro, P. a., Mroginski, L. a., & Aguilar, O. M. (2010). Comparison of in vitro solubilization activity of diverse phosphate-solubilizing bacteria native to acid soil and their ability to promote *Phaseolus vulgaris* growth. Biology and Fertility of Soils, 46(7), 727–738.

Compant, S., Clément, C., & Sessitsch, A. (2010). Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. Soil Biology and Biochemistry, 42(5), 669–678.

Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clément, C., & Barka, E. A. (2005). Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. Applied and environmental microbiology, 71(9), 4951-4959.

Costa, R., Gomes, N. C. M., Peixoto, R. S., Rumjanek, N., Berg, G., Mendonça-Hagler, L. C. S., & Smalla, K. (2006). Diversity and antagonistic potential of *Pseudomonas* spp. associated to the rhizosphere of maize grown in a subtropical organic farm. Soil Biology and Biochemistry, 38(8), 2434–2447.

Yuan, W. M., & Crawford, D. L. (1995). Characterization of *Streptomyces lydicus* WYEC108 as a potential biocontrol agent against fungal root and seed rots. Applied and Environmental Microbiology, 61(8), 3119-3128.

D'aes, J., De Maeyer, K., Pauwelyn, E., & Höfte, M. (2010). Biosurfactants in plant-*Pseudomonas* interactions and their importance to biocontrol. Environmental Microbiology Reports, 2(3), 359–72.

Dahllöf, I. (2002). Molecular community analysis of microbial diversity. Current Opinion in Biotechnology, 13(3), 213–217.

Daverey, A., & Pakshirajan, K. (2010). Kinetics of growth and enhanced sophorolipids production by *Candida bombicola* using a low-cost fermentative medium. Applied Biochemistry and Biotechnology, 160(7), 2090–2101.

De Bruijn, I., & Raaijmakers, J. M. (2009). Regulation of cyclic lipopeptide biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens* by the ClpP protease. Journal of Bacteriology, 191(6), 1910–23.

De Bruijn, I., de Kock, M. J. D., de Waard, P., van Beek, T. a, & Raaijmakers, J. M. (2008). Massetolide A biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens*. Journal of Bacteriology, 190(8), 2777–89.

De Bruijn, I., de Kock, M. J. D., Yang, M., de Waard, P., van Beek, T. a, & Raaijmakers, J. M. (2007). Genome-based discovery, structure prediction and functional analysis of cyclic lipopeptide antibiotics in *Pseudomonas* species. Molecular Microbiology, 63(2), 417–28.

De La Fuente, L., Quagliotto, L., Bajsa, N., Fabiano, E., & Altier, N. (2002). Inoculation with *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains does not affect the symbiosis between rhizobia and forage legumes. Soil Biology and Biochemistry, 34, 545–548.

De La Fuente, L., Thomashow, L., Weller, D., Bajsa, N., Quagliotto, L., Chernin, L., & Arias, A. (2004). *Pseudomonas fluorescens* UP61 isolated from birdsfoot trefoil rhizosphere produces multiple antibiotics and exerts a broad spectrum of biocontrol activity. European Journal of Plant Pathology, 110(7), 671–681.

De Souza, J. T., Arnould, C., Deulvot, C., Lemanceau, P., Gianinazzi-Pearson, V., & Raaijmakers, J. M. (2003). Effect of 2,4-diacetylphloroglucinol on *Pythium*: cellular responses and variation in sensitivity among propagules and species. Phytopathology, 93(8), 966–75.

De Werra, P., Péchy-Tarr, M., Keel, C., & Maurhofer, M. (2009). Role of gluconic acid production in the regulation of biocontrol traits of *Pseudomonas fluorescens* CHA0. Applied and Environmental Microbiology, 75(12), 4162–74.

Dillewijn, P. Van, Villadas, P. J., & Toro, N. (2002). Effect of a *Sinorhizobium meliloti* strain with a modified putA gene on the rhizosphere microbial community of alfalfa. Applied and Environmental Microbiology, 68(9), 4201–4208.

Dimkpa, C., Weinand, T., & Asch, F. (2009). Plant-rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions. Plant, Cell & Environment, 32(12), 1682–94.

Dodd, I. C., & Perez-Alfocea, F. (2012). Microbial amelioration of crop salinity stress. Journal of Experimental Botany, 63(9), 3415–3428.

Dodd, I. C., Zinovkina, N. Y., Safronova, V. I., & Belimov, a. a. (2010). Rhizobacterial mediation of plant hormone status. Annals of Applied Biology, 157(3), 361–379.

Dubern, J. F., Coppoolse, E. R., Stiekema, W. J., & Bloemberg, G. V. (2008). Genetic and functional characterization of the gene cluster directing the biosynthesis of putisolvin I and II in *Pseudomonas putida* strain PCL1445. Microbiology, 154(7), 2070-2083.

Duca, D., Lorv, J., Patten, C. L., Rose, D., & Glick, B. R. (2014). Indole-3-acetic acid in plant-microbe interactions. Antonie van Leeuwenhoek, 106(1), 85–125.

Duffy, B., Schouten, A., & Raaijmakers, J. M. (2003). Pathogen self-defense: mechanisms to counteract microbial antagonism. Annual Review of Phytopathology, 41, 501–38.

Dunne, C., Moënne-Loccoz, Y., de Bruijn, F. J., & O'Gara, F. (2000). Overproduction of an inducible extracellular serine protease improves biological control of *Pythium ultimum* by *Stenotrophomonas maltophilia* strain W81. Microbiology, 146(8), 2069-2078.

Dwivedi, D., & Johri, B. N. (2003). Antifungals from fluorescent pseudomonads: biosynthesis and regulation. Current Science, 85(12), 1693-1703.

Emmert, E. A., Klimowicz, A. K., Thomas, M. G., & Handelsman, J. (2004). Genetics of zwittermicin A production by *Bacillus cereus*. Applied and environmental microbiology, *70*(1), 104-113.

Engebretson, J. J., & Moyer, C. L. (2003). Fidelity of select restriction endonucleases in determining microbial diversity by terminal-restriction fragment length polymorphism. Applied and Environmental Microbiology, *69*(8), 4823-4829.

Engelbrektson, A., Kunin, V., Wrighton, K. C., Zvenigorodsky, N., Chen, F., Ochman, H., & Hugenholtz, P. (2010). Experimental factors affecting PCR-based estimates of microbial species richness and evenness. The ISME Journal, 4(5), 642–7.

Felici, C., Vettori, L., Giraldi, E., Forino, L. M. C., Toffanin, A., Tagliasacchi, A. M., & Nuti, M. (2008). Single and co-inoculation of *Bacillus subtilis* and *Azospirillum brasilense* on *Lycopersicon esculentum*: Effects on plant growth and rhizosphere microbial community. Applied Soil Ecology, 40(2), 260–270.

Fernando, W. G. D., Ramarathnam, R., Krishnamoorthy, A. S., & Savchuk, S. C. (2005). Identification and use of potential bacterial organic antifungal volatiles in biocontrol. Soil Biology and Biochemistry, 37(5), 955–964.

Figueiredo, M. V. B., Burity, H. a., Martínez, C. R., & Chanway, C. P. (2008). Alleviation of drought stress in the common bean (Phaseolus vulgaris L.) by co-inoculation with *Paenibacillus polymyxa* and *Rhizobium tropici*. Applied Soil Ecology, 40(1), 182–188.

Fischer, S. E., Jofré, E. C., Cordero, P. V, Gutiérrez Mañero, F. J., & Mori, G. B. (2010). Survival of native *Pseudomonas* in soil and wheat rhizosphere and antagonist activity against plant pathogenic fungi. Antonie van Leeuwenhoek, 97(3), 241–51.

Fogliano, Vincenzo, Alessandro Ballio, Monica Gallo, Sheridan Woo, Felice Scala, Matteo Lorito, Federico Ii, et al. 2002. *Pseudomonas* lipodepsipeptides and fungal cell wall – degrading enzymes act synergistically in biological control. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 15 (4): 323–333.

Fouts, Derrick E, Robert B Abramovitch, James R Alfano, Angela M Baldo, C Robin Buell, Samuel Cartinhour, Arun K Chatterjee, et al. 2002. Genomewide identification of *Pseudomonas Syringae* pv. tomato DC3000 promoters controlled by the HrpL alternative sigma factor. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 99 (4) : 2275–80

Frankowski, J., Lorito, M., Scala, F., Schmid, R., Berg, G., & Bahl, H. (2001). Purification and properties of two chitinolytic enzymes of *Serratia plymuthica* HRO-C48. Archives of Microbiology, 176(6), 421–6.

Fróes, A., Macrae, A., Rosa, J., Franco, M., Souza, R., Soares, R., & Coelho, R. (2012). Selection of a *Streptomyces* strain able to produce cell wall degrading enzymes and active against *Sclerotinia sclerotiorum*. Journal of Microbiology (Seoul, Korea), 50(5), 798–806.

Fukuoka, T., Morita, T., Konishi, M., Imura, T., & Kitamoto, D. (2008). A basidiomycetous yeast, *Pseudozyma tsukubaensis*, efficiently produces a novel glycolipid biosurfactant. The identification of a new diastereomer of mannosylerythritol lipid-B. Carbohydrate Research, 343(3), 555–60.

Galán, J. E. (1999). Type III Secretion Machines: Bacterial Devices for Protein Delivery into Host Cells. Science, 284(5418), 1322–1328.

Gandhimathi, R., Seghal Kiran, G., Hema, T. a, Selvin, J., Rajeetha Raviji, T., & Shanmughapriya, S. (2009). Production and characterization of lipopeptide biosurfactant by a sponge-associated marine

actinomycetes *Nocardiopsis alba* MSA10. Bioprocess and Biosystems Engineering, 32(6), 825–35.
Gao, G., Yin, D., Chen, S., Xia, F., Yang, J., Li, Q., & Wang, W. (2012). Effect of biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* 2P24 on soil fungal community in cucumber rhizosphere using T-RFLP and DGGE. PloS One, 7(2), e31806.
García de Salamone, I. E., Funes, J. M., Di Salvo, L. P., Escobar-Ortega, J. S., D'Auria, F., Ferrando, L., & Fernandez-Scavino, A. (2012). Inoculation of paddy rice with *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens*: Impact of plant genotypes on rhizosphere microbial communities and field crop production. Applied Soil Ecology, 61, 196–204.
García de Salamone, I. E., Hynes, R. K., & Nelson, L. M. (2001). Cytokinin production by plant growth promoting rhizobacteria and selected mutants. Canadian Journal of Microbiology, 47(5), 404–411.
García de Salamone, I. E., Salvo, L. P., Escobar Ortega, J. S., Boa Sorte, P. M. F., Urquiaga, S., & Teixeira, K. R. S. (2010). Field response of rice paddy crop to *Azospirillum* inoculation: physiology of rhizosphere bacterial communities and the genetic diversity of endophytic bacteria in different parts of the plants. Plant and Soil, 336(1-2), 351–362.
García Préchac, F., Ernst, O., Arbeletche, P., Pérez Bidegain, M., Pritsch, C., Ferenczi, A., & Rivas, M. (2010). Intensificación Agrícola: oportunidades y amenazas para un país productivo y natural (primera., p. 126). Colección CSIC.
Ghirardi, Sandrine, Fabrice Dessaint, Sylvie Mazurier, Thérèse Corberand, Jos M Raaijmakers, Jean-Marie Meyer, Yves Dessaux, and Philippe Lemanceau. (2012). Identification of traits shared by rhizosphere-competent strains of fluorescent pseudomonads. Microbial Ecology, 64(3), 725–37.
Ghorbani, R., Wilcockson, S., Koocheki, a., & Leifert, C. (2008). Soil management for sustainable crop disease control: a review. Environmental Chemistry Letters, 6(3), 149–162.
Gleeson, O., O'Gara, F., & Morrissey, J. P. (2010). The Pseudomonas fluorescens secondary metabolite 2,4 diacetylphloroglucinol impairs mitochondrial function in *Saccharomyces cerevisiae*. Antonie van Leeuwenhoek, 97(3), 261–73.
Glick, B. R. (2010). Using soil bacteria to facilitate phytoremediation. Biotechnology Advances, 28(3), 367–74.
Glick, B. R., Cheng, Z., Czarny, J., & Duan, J. (2007). Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. European Journal of Plant Pathology, 119(3), 329–339.
González, S. (2013). Uso de curasemillas en alfalfa. In Reunión Técnica: El éxito productivo de una pastura con leguminosas perennes comienza en su implantación (pp. 37–41). INIA - La Estanzuela, Colonia. Serie Actividades de Difusión no. 711.
Grgurina, I., Gross, D. C., Iacobellis, N. S., Lavermicocca, P., Takemoto, J. Y., & Benincasa, M. (1996). Phytotoxin production by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*: Syringopeptin production by syr mutants defective in biosynthesis or secretion of syringomycin. FEMS Microbiology Letters, 138(138), 35–39.
Grinter, R., Milner, J., & Walker, D. (2012). Bacteriocins active against plant pathogenic bacteria. Biochemical Society Transactions, 40(6), 1498–502.
Gross, H., & Loper, J. E. (2009). Genomics of secondary metabolite production by *Pseudomonas* spp. Natural Product Reports, 26(11), 1408–46.
Gross, H., Stockwell, V. O., Henkels, M. D., Nowak-Thompson, B., Loper, J. E., & Gerwick, W. H. (2007). The genomisotopic approach: a systematic method to isolate products of orphan biosynthetic gene clusters. Chemistry & Biology, 14(1), 53–63.
Grover, M., Ali, S. Z., Sandhya, V., Rasul, A., & Venkateswarlu, B. (2010). Role of microorganisms in adaptation of agriculture crops to abiotic stresses. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 27(5), 1231–1240.
Guiñazú, L. B., Andrés, J. A., Del Papa, M. F., Pistorio, M., & Rosas, S. B. (2009). Response of alfalfa (*Medicago sativa* L.) to single and mixed inoculation with phosphate-solubilizing bacteria and *Sinorhizobium meliloti*. Biology and Fertility of Soils, 46(2), 185–190.
Gyaneshwar, P., Kumar, G. N., Parekh, L. J., & Poole, P. S. (2002). Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. In: Food Security in Nutrient-Stressed Environments: Exploiting Plants' Genetic Capabilities (pp. 133-143). Springer Netherlands.

Haas, D., & Défago, G. (2005). Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. Nature Reviews. Microbiology, 3(4), 307–19.

Haas, D., & Keel, C. (2003). Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Peudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. Annual Review of Phytopathology, 41(63), 117–53.

Haddad, N. I. a, Wang, J., & Mu, B. (2009). Identification of a biosurfactant producing strain: *Bacillus subtilis* HOB2. Protein and Peptide Letters, 16(1), 7–13.

Hameeda, B., Harini, G., Rupela, O. P., Wani, S. P., & Reddy, G. (2008). Growth promotion of maize by phosphate-solubilizing bacteria isolated from composts and macrofauna. Microbiological Research, 163(2), 234–42.

Hammer, Ø., Harper, D. A. T., & Ryan, P. D. (2001). PAST: Paleontological Statistics Software Package for education and data analysis. Palaeontolia Electronica 4.

Handelsman, J., Raffel, S., Mester, E. H., Wunderlich, L., & Grau, C. R. (1990). Biological control of damping-off of alfalfa seedlings with *Bacillus cereus* UW85. Applied and Environmental Microbiology, *56*(3), 713-718.

Hashizume, H., & Nishimura, Y. (2008). Cyclic lipopeptide antibiotics. Studies in Natural Products Chemistry, 35(C), 693–751.

Herrmann, L., Sanon, K., Zoubeirou, A. M., Dianda, M., Sall, S., Thuita, M., & Lesueur, D. (2012). Seasonal changes of bacterial communities in the rhizosphere of Acacia senegal mature trees inoculated with *Ensifer* strains in Burkina Faso and Niger. Agriculture, Ecosystems & Environment, 157, 47–53.

Heuer, H., Krsek, M., Baker, P., & Smalla, K. (1997). Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients . Applied and Environmental Microbiology, 63(8), 3233–3241.

Hilario, E., Buckley, T. R., & Young, J. M. (2004). Improved resolution on the phylogenetic relationships among Pseudomonas by the combined analysis of atp D, car A, rec A and 16S rDNA. Antonie van Leeuwenhoek, 86(1), 51–64.

Höfte, M., & Altier, N. (2010). Fluorescent pseudomonads as biocontrol agents for sustainable agricultural systems. Research in Microbiology, 161(6), 464–71.

Howell, C. R., & Stipanovic, R. D. (1980). Suppression of *Pythium ultimium* induced damping off of cotton seedlings by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotic pyoluterin. Phytopathology, 70(8), 712–715.

Howell, C. R., Beier, R. C., & Stipanovic, R. D. (1988). Production of ammonia by *Enterobacter cloacae* and its possible role in the biological control of *Pythium* preemergence damping-off by the bacterium. Phytopathology, 78(8), 1075–1078.

Huang, C.-J., Wang, T.-K., Chung, S.-C., & Chen, C.-Y. (2005). Identification of an antifungal chitinase from a potential biocontrol agent, *Bacillus cereus* 28-9. Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 38(1), 82–8.

Huić Babić, K., Schauss, K., Hai, B., Sikora, S., Redzepović, S., Radl, V., & Schloter, M. (2008). Influence of different *Sinorhizobium meliloti* inocula on abundance of genes involved in nitrogen transformations in the rhizosphere of alfalfa (Medicago sativa L.). Environmental Microbiology, 10(11), 2922–30.

Hultberg, M., Alsberg, T., Khalil, S., & Alsanius, B. (2009). Suppression of disease in tomato infected by *Pythium ultimum* with a biosurfactant produced by *Pseudomonas koreensis*. BioControl, 55(3), 435–444.

Hunter-Cevera, J. C. (1998). The value of microbial diversity. Current Opinion in Microbiology, 1(3), 278–285.

Hutchison, M. L., Tester, M. A., & Gross, D. C. (1995). Role of biosurfactant and ion channel-forming activities of syringomycin in transmembrane ion flux: a model for the mechanism of action in the plant-pathogen interaction. Molecular Plant-Microbe Interactions, 8(4), 610–620.

Jäderlund, L., Hellman, M., Sundh, I., Bailey, M. J., & Jansson, J. K. (2008). Use of a novel nonantibiotic triple marker gene cassette to monitor high survival of *Pseudomonas fluorescens* SBW25 on winter wheat in the field. FEMS Microbiology Ecology, 63(2), 156–68.

Jalili, F., Khavazi, K., Pazira, E., Nejati, A., Rahmani, H. A., Sadaghiani, H. R., & Miransari, M. (2009). Isolation and characterization of ACC deaminase-producing fluorescent pseudomonads, to

alleviate salinity stress on canola (*Brassica napus* L.) growth. Journal of Plant Physiology, 166(6), 667–74.

Janek, T., Krasowska, A., Radwańska, A., & Łukaszewicz, M. (2013). Lipopeptide biosurfactant pseudofactin II induced apoptosis of melanoma A 375 cells by specific interaction with the plasma membrane. *PloS one*, *8*(3), e57991.

Janek, T., Łukaszewicz, M., & Krasowska, A. (2012). Antiadhesive activity of the biosurfactant pseudofactin II secreted by the Arctic bacterium *Pseudomonas fluorescens* BD5. BMC Microbiology, (12), 24.

Janek, T., Łukaszewicz, M., Rezanka, T., & Krasowska, A. (2010). Isolation and characterization of two new lipopeptide biosurfactants produced by *Pseudomonas fluorescens* BD5 isolated from water from the Arctic Archipelago of Svalbard. Bioresource Technology, 101(15), 6118–6123.

Jin, C. W., Li, G. X., Yu, X. H., Zheng, S. J., & Zheng, S. J. (2010). Plant Fe status affects the composition of siderophore-secreting microbes in the rhizosphere. Annals of Botany, 105(5), 835–41.

Joo, G.-J., Kim, Y.-M., Kim, J.-T., Rhee, I.-K., Kim, J.-H., & Lee, I.-J. (2005). Gibberellins-producing rhizobacteria increase endogenous gibberellins content and promote growth of red peppers. Journal of Microbiology (Seoul, Korea), 43(6), 510–515.

Jourdan, E., Henry, G., Duby, F., Dommes, J., Barthélemy, J. P., Thonart, P., & Ongena, M. (2009). Insights into the defense-related events occurring in plant cells following perception of surfactin-type lipopeptide from *Bacillus subtilis*. Molecular Plant-Microbe Interactions, 22(4), 456–468.

Kai, M., Effmert, U., Berg, G., & Piechulla, B. (2007). Volatiles of bacterial antagonists inhibit mycelial growth of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*. Archives of Microbiology, 187(5), 351–60.

Kamilova, F., Kravchenko, L. V, Shaposhnikov, A. I., Azarova, T., Makarova, N., & Lugtenberg, B. (2006). Organic acids, sugars, and L-tryptophane in exudates of vegetables growing on stonewool and their effects on activities of rhizosphere bacteria. Molecular Plant-Microbe Interactions : MPMI, 19(3), 250–6.

Kamilova, F., Leveau, J. H. J., & Lugtenberg, B. (2007). *Collimonas fungivorans*, an unpredicted in vitro but efficient in vivo biocontrol agent for the suppression of tomato foot and root rot. Environmental Microbiology, 9(6), 1597–603.

Kamilova, F., Validov, S., Azarova, T., Mulders, I., & Lugtenberg, B. (2005). Enrichment for enhanced competitive plant root tip colonizers selects for a new class of biocontrol bacteria. Environmental Microbiology, 7(11), 1809–17.

Kang, H., & Gross, D. C. (2005). Characterization of a resistance-nodulation-cell division transporter system associated with the syr-syp genomic island of *Pseudomonas syringae* pv . syringae. Applied and Environmental Microbiology, 71(9), 5056–5065.

Keel, C., Schnider, U., Maurhofer, M., Voisard, C., Laville, J., Burger, U., Défago, G. (1992). Suppression of root diseases by *Pseudomonas fluorescens* CHAO: importance of the bacterial secondary metabolite 2, 4-diacetylphloroglucinol. Molecular Plant-Microbe Interactions, 5(1), 4–13.

Keel Keel, C., Weller, D. M., Natsch, A., Défago, G., Cook, R. J., & Thomashow, L. S. (1996). Conservation of the 2, 4-diacetylphloroglucinol biosynthesis locus among fluorescent Pseudomonas strains from diverse geographic locations. Applied and Environmental Microbiology, *62*(2), 552-563.

Kennedy, a. C. (1999). Bacterial diversity in agroecosystems. Agriculture, Ecosystems & Environment, 74(1-3), 65–76.

Khaldi, N., Seifuddin, F. T., Turner, G., Haft, D., Nierman, W. C., Wolfe, K. H., & Fedorova, N. D. (2011). SMURF: genomic mapping of fungal secondary metabolite clusters. Fungal Genetics and Biology, 47(9), 736–741.

Kim, J., & Yi, G.-S. (2012). PKMiner: a database for exploring type II polyketide synthases. BMC Microbiology, 12(1), 169.

King, E.O., M.K. Ward y D.E. Raney. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. Journal of Laboratory and Clinical Medicine. 44: 301-307.

Kiran, G. S., Thomas, T. A., & Selvin, J. (2010). Production of a new glycolipid biosurfactant from marine *Nocardiopsis lucentensis* MSA04 in solid-state cultivation. Colloids and Surfaces. Biointerfaces, 78(1), 8–16.

Kirk, J. L., Beaudette, L. a, Hart, M., Moutoglis, P., Klironomos, J. N., Lee, H., & Trevors, J. T. (2004). Methods of studying soil microbial diversity. Journal of Microbiological Methods, 58(2), 169–88.

Kirner Kirner, Sabine, Philip E Hammer, D Steven Hill, Annett Altmann, Ilona Fischer, Laura J Weislo, Mike Lanahan, Karl-heinz Van Pée, and James M Ligon. (1998). Functions encoded by pyrrolnitrin biosynthetic genes from *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of bacteriology*, *180*(7), 1939-1943.

Klee, H. J., Hayford, M. B., Kretzmer, K. a, Barry, G. F., & Kishore, G. M. (1991). Control of ethylene synthesis by expression of a bacterial enzyme in transgenic tomato plants. The Plant Cell, 3(11), 1187–93.

Kloepper, J W., Schroth, M. N. (1978). Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. In 4th international conference on plant pathogenic bacteria (pp. 879–882).

Kloepper, J. W., Leong, J., Teintze, M., & Schrotht, M. N. (1980). Pseudomonas Siderophores : A Mechanism Explaining Disease-Suppressive Soils, 4, 317–320.

Koch, B., Nielsen, T. H., Andersen, J. B., Christophersen, C., Givskov, M., & Nybroe, O. (2002). Lipopeptide Production in *Pseudomonas* sp. Strain DSS73 Is Regulated by Components of Sugar Beet Seed Exudate via the Gac Two-Component Regulatory System. Applied and Environmental Microbiology, 68(9), 4509–4516.

Konishi, M., Fukuoka, T., Nagahama, T., Morita, T., Imura, T., Kitamoto, D., & Hatada, Y. (2010). Biosurfactant-producing yeast isolated from *Calyptogena soyoae* (deep-sea cold-seep clam) in the deep sea. Journal of Bioscience and Bioengineering, 110(2), 169–75.

Koumoutsi, Alexandra, Xiao-Hua Chen, Anke Henne, Heiko Liesegang, Gabriele Hitzeroth, Peter Franke, Joachim Vater, and Rainer Borriss. (2004).Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42. Journal of bacteriology 186, no. 4: 1084-1096.

Kozdrój, J., Trevors, J. T., & van Elsas, J. D. (2004). Influence of introduced potential biocontrol agents on maize seedling growth and bacterial community structure in the rhizosphere. Soil Biology and Biochemistry, 36(11), 1775–1784.

Kuiper, Irene, Ellen L. Lagendijk, Russell Pickford, Jeremy P. Derrick, Gerda E. M. Lamers, Jane E. Thomas-Oates, Ben J. J. Lugtenberg, and Guido V. Bloemberg. (2004). Characterization of two Pseudomonas putida lipopeptide biosurfactants, putisolvin I and II, which inhibit biofilm formation and break down existing biofilms. Molecular Microbiology, 51(1), 97–113.

Kuske, Cheryl R, Lawrence O Ticknor, Mark E Miller, M Dunbar, Jody A Davis, Susan M Barns, John M Dunbar, and Jayne Belnap. (2002). Comparison of soil bacterial communities in rhizospheres of three plant species and the interspaces in an arid grassland. Applied and Environmental Microbiology, 68(4), 1854–1863.

Lagesen, K., Hallin, P., Rødland, E. A., Staerfeldt, H.-H., Rognes, T., & Ussery, D. W. (2007). RNAmmer: consistent and rapid annotation of ribosomal RNA genes. Nucleic Acids Research, 35(9), 3100–3108.

Lamb, J. F., Sheaffer, C. C., Rhodes, L. H., Sulc, R. M., Undersander, D. J., & Brummer, E. C. (2006). Five decades of alfalfa cultivar improvement. Crop science, 46(2), 902-909.

Lane, D.J., 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt, E., Goodfellow, M. (Eds.), Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics. John Wiley & Sons, New York, NY, pp. 115–147.

Larkin, R. P., English, J. T., & Mihail, J. D. (1995). Identification , pathogenicity distribution and comparative of pythium spp associated with alfalfa seedlings. Soil Biology and Biochemistry, 27(3), 357–364.

Laville, J., Blumer, C., Von Schroetter, C., Gaia, V., Défago, G., Keel, C., & Haas, D. (1998). Characterization of the hcnABC gene cluster encoding hydrogen cyanide synthase and anaerobic regulation by ANR in the strictly aerobic biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Journal of bacteriology*, *180*(12), 3187-3196.

Lee, B., Lee, S., & Ryu, C.-M. (2012). Foliar aphid feeding recruits rhizosphere bacteria and primes plant immunity against pathogenic and non-pathogenic bacteria in pepper. Annals of Botany, 110(2), 281–90.

Leeman, M. Van Pelt, J A. Den Ouden, F M. Heinsbroek, M. Bakker, P.A.H.M. Schippers, B. (1995). Induction of systemic resistance against Fusarium wilt of radish by lipopolysaccharides of *Pseudomonas fluorescens*. Phytopathology, 85(9), 1021–1027.

Lemanceau, P., Bauer, P., Kraemer, S., & Briat, J.-F. (2009). Iron dynamics in the rhizosphere as a case study for analyzing interactions between soils, plants and microbes. Plant and Soil, 321(1-2), 513–535.

Lequette, Y., Rollet, E., Delangle, A., Greenberg, E. P., & Bohin, J.-P. (2007). Linear osmoregulated periplasmic glucans are encoded by the opgGH locus of *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiology (Reading, England), 153(Pt 10), 3255–63.

Lerner, A., Herschkovitz, Y., Baudoin, E., Nazaret, S., Moenne-Loccoz, Y., Okon, Y., & Jurkevitch, E. (2006). Effect of Azospirillum brasilense inoculation on rhizobacterial communities analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis and automated ribosomal intergenic spacer analysis. Soil Biology and Biochemistry, 38(6), 1212–1218.

Li, M. H. T., Ung, P. M. U., Zajkowski, J., Garneau-Tsodikova, S., & Sherman, D. H. (2009). Automated genome mining for natural products. BMC Bioinformatics, 10: 185.

Li, S., Jochum, C. C., Yu, F., Zaleta-Rivera, K., Du, L., Harris, S. D., & Yuen, G. Y. (2008). An antibiotic complex from *Lysobacter enzymogenes* strain C3: antimicrobial activity and role in plant disease control. Phytopathology, 98(6), 695–701.

Li, X., & Brummer, E. C. (2012). Applied Genetics and Genomics in Alfalfa Breeding. Agronomy, 2(4), 40–61.

Lim, C. K., Hassan, K. a, Tetu, S. G., Loper, J. E., & Paulsen, I. T. (2012). The effect of iron limitation on the transcriptome and proteome of *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. PloS One, 7(6), e39139.

Lim, S. P., Roongsawang, N., Washio, K., & Morikawa, M. (2009). Flexible exportation mechanisms of arthrofactin in *Pseudomonas* sp. MIS38. Journal of Applied Microbiology, 107(1), 157–66.

Lioussanne, L., Perreault, F., Jolicoeur, M., & St-Arnaud, M. (2010). The bacterial community of tomato rhizosphere is modified by inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi but unaffected by soil enrichment with mycorrhizal root exudates or inoculation with *Phytophthora nicotianae*. Soil Biology and Biochemistry, 42(3), 473–483.

Liu, W. T., Marsh, T. L., Cheng, H., & Forney, L. J. (1997). Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. Applied and environmental microbiology, *63*(11), 4516-4522.

Liu, X., Ren, B., Chen, M., Wang, H., Kokare, C. R., Zhou, X., Zhang, L. (2010). Production and characterization of a group of bioemulsifiers from the marine Bacillus velezensis strain H3. Applied Microbiology and Biotechnology, 87(5), 1881–93.

Ljung, K. (2013). Auxin metabolism and homeostasis during plant development. Development (Cambridge, England), 140(5), 943–50.

Loper, J. E., & Gross, H. (2007). Genomic analysis of antifungal metabolite production by *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. European Journal of Plant Pathology, 119(3), 265–278.

Loper, J. E., & Henkels, M. D. (1999). Utilization of Heterologous Siderophores Enhances Levels of Iron Available to *Pseudomonas putida* in the Rhizosphere. Applied and Environmental Microbiology, 65(12), 5357–5363.

Loper, J. E., Hassan, K. a, Mavrodi, D. V, Davis, E. W., Lim, C. K., Shaffer, B. T.,Paulsen, I. T. (2012). Comparative genomics of plant-associated *Pseudomonas* spp.: insights into diversity and inheritance of traits involved in multitrophic interactions. PLoS Genetics, 8(7), e1002784.

Lowe, T. M., & Eddy, S. R. (1997). tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. Nucleic Acids Research, 25(5), 955–64.

Lugtenberg, B. J. J., Chin-A-Woeng, T. F. C., & Bloemberg, G. V. (2002). Microbe-plant interactions: principles and mechanisms. Antonie van Leeuwenhoek, 81(1-4), 373–83.

Lugtenberg, B., & Kamilova, F. (2009). Plant-growth-promoting rhizobacteria. Annual review of microbiology, *63*, 541-556.

Maheshwari, D. K. (2011). Bacteria in agrobiology: crop ecosystems (p. 434). Heidelberg: Springer.

Makkar, R. S., Cameotra, S. S., & Banat, I. M. (2011). Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. *AMB Express*, *1*(5), 1-19.

Mano, Y., & Nemoto, K. (2012). The pathway of auxin biosynthesis in plants. Journal of Experimental Botany, 63(8), 2853–72.

Markovich, N. A., & Kononova, G. L. (2003). Lytic Enzymes of *Trichoderma* and Their Role in Plant Defense from Fungal Diseases : A Review, 39(4), 389–400.

Martin, F. N., & Loper, J. E. (2010). Soilborne Plant Diseases Caused by *Pythium* spp .: Ecology , Epidemiology , and Prospects for Biological Control. Critical Reviews in Plant Sciences, 18(2), 111–181.

Maurhofer, M. Hase, C. Meuwly, J. Métraux, P. Défago, G. (1994). Induction of systemic resistance of tobacco to tobacco necrosis virus by the root-colonizing *Pseudomonas fluorescens* strain CHA 0: Influence of the gacA gene and of pyoverdine production. Phytopathology, 84(2), 139–146.

Mavrodi, D. V, Blankenfeldt, W., & Thomashow, L. S. (2006). Phenazine compounds in fluorescent *Pseudomonas* spp. biosynthesis and regulation. Annual Review of Phytopathology, 44, 417–45.

Mavrodi, D. V, Parejko, J. a, Mavrodi, O. V, Kwak, Y.-S., Weller, D. M., Blankenfeldt, W., & Thomashow, L. S. (2013). Recent insights into the diversity, frequency and ecological roles of phenazines in fluorescent *Pseudomonas* spp. Environmental Microbiology, 15(3), 675–86.

Mazzola, M., de Bruijn, I., Cohen, M. F., & Raaijmakers, J. M. (2009). Protozoan-induced regulation of cyclic lipopeptide biosynthesis is an effective predation defense mechanism for *Pseudomonas fluorescens*. Applied and Environmental Microbiology, 75(21), 6804–11.

McCaig, A. E., Glover, L. A., & Prosser, J. I. (2001). Numerical analysis of grassland bacterial community structure under different land management regimens by using 16s ribosomal DNA sequence data and denaturing gradient gel electrophoresis banding patterns. Applied and Environmental Microbiology, 67(10), 4554–4559.

McCarter, L. L. (2006). Regulation of flagella. Current Opinion in Microbiology, 9(2), 180–6.

Medema, Marnix H., Kai Blin, Peter Cimermancic, Victor de Jager, Piotr Zakrzewski, Michael A. Fischbach, Tilmann Weber, Eriko Takano, and Rainer Breitling. (2011) antiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. Nucleic acids research 39, (2), 339-346.

Mendes, R., M. Kruijt, I. de Bruijn, E. Dekkers, M. van der Voort, J.H.M Schneider, Y. M. Piceno, T. Z. DeSantis, G. L. Andersen, P.H. M. Bakker, and J. M. Raaijmakers. (2011). Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria. Science (New York, N.Y.), 332(6033), 1097–100.

Meyer, J. A., & Abdallah, M. A. (1978). The fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens*: biosynthesis, purification and physicochemical properties. Journal of General Microbiology, *107*(2), 319-328.

Meziane, H. van der Sluis, I. van Loon, L C. Hofte, M. Bakker, P. A. H. M. (2005). Determinants of *Pseudomonas putida* WCS358 involved in inducing. Molecular Plant Pathology, 6(2), 177–185.

MGAP. DIEA, Estadísticas Agropecuarias, Anuario 2013. Montevideo, Uruguay

Miethke, M., & Marahiel, M. a. (2007). Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR, 71(3), 413–51.

Milcamps, a, Ragatz, D. M., Lim, P., Berger, K. a, & de Bruijn, F. J. (1998). Isolation of carbon- and nitrogen-deprivation-induced loci of Sinorhizobium meliloti 1021 by Tn5-luxAB mutagenesis. Microbiology, 144 (1), 3205–18.

Miller, S. H., Browne, P., Prigent-Combaret, C., Combes-Meynet, E., Morrissey, J. P., & O'Gara, F. (2010). Biochemical and genomic comparison of inorganic phosphate solubilization in *Pseudomonas* species. Environmental Microbiology Reports, 2(3), 403–11.

Milner, J. L., Silo-Suh, L. A. U. R. A., Lee, J. C., He, H., Clardy, J., & Handelsman, J. (1996). Production of kanosamine by *Bacillus cereus* UW85.Applied and environmental microbiology, *62*(8), 3061-3065.

Montesinos, E. (2007). Antimicrobial peptides and plant disease control. FEMS Microbiology Letters, 270(1), 1–11.

Moon, C. D., Zhang, X. X., Matthijs, S., Schäfer, M., Budzikiewicz, H., & Rainey, P. B. (2008). Genomic, genetic and structural analysis of pyoverdine-mediated iron acquisition in the plant growth-promoting bacterium *Pseudomonas fluorescens* SBW25. *BMC microbiology*, *8*(1), 7.

Moose, S. P., & Mumm, R. H. (2008). Molecular plant breeding as the foundation for 21st century crop improvement. Plant Physiology, 147(3), 969–77.

Mootz, H. D., Schwarzer, D., & Marahiel, M. A. (2002). Ways of assembling complex natural products on modular nonribosomal peptide synthetases.*Chembiochem*, *3*(6), 490-504.

Mori, A. S., Furukawa, T., & Sasaki, T. (2013). Response diversity determines the resilience of ecosystems to environmental change. Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society, 88(2), 349–64.

Morita, T, T. Fukuoka, M. Konishi, T. Imura, S. Yamamoto, M. Kitagawa, A. Sogabe, and D. Kitamoto (2009). Production of a novel glycolipid biosurfactant, mannosylmannitol lipid, by *Pseudozyma parantarctica* and its interfacial properties. Applied Microbiology and Biotechnology, 83(6), 1017–25.

Morita, T., Konishi, M., Fukuoka, T., Imura, T., & Kitamoto, D. (2008). Production of glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, by *Pseudozyma siamensis* CBS 9960 and their interfacial properties. Journal of Bioscience and Bioengineering, 105(5), 493–502.

Morrone, D., Chambers, J., Lowry, L., Kim, G., Anterola, A., Bender, K., & Peters, R. J. (2009). Gibberellin biosynthesis in bacteria: separate ent-copalyl diphosphate and ent-kaurene synthases in *Bradyrhizobium japonicum.* FEBS Letters, 583(2), 475–80.

Mossialos, D., Ochsner, U., Baysse, C., Chablain, P., Pirnay, J.-P., Koedam, N., Cornelis, P. (2002). Identification of new, conserved, non-ribosomal peptide synthetases from fluorescent pseudomonads involved in the biosynthesis of the siderophore pyoverdine. Molecular Microbiology, 45(6), 1673–85.

Mulet, M., Lalucat, J., & García-Valdés, E. (2010). DNA sequence-based analysis of the Pseudomonas species. Environmental Microbiology, 12(6), 1513–30.

Muthomi, J. W., Otieno, P. E., Chemining'wa, G. N., Nderitu, J. H., & Wagacha, J. M. (2007). Effect of legume root rot pathogens and fungicide seed treatment on nodulation and biomass accumulation. Journal of Biological Science, 7(7), 1163–1170.

Nautiyal, C. S., Johri, J. K., & Singh, H. B. (2002). Survival of the rhizosphere-competent biocontrol strain Pseudomonas fluorescens NBRI2650 in the soil and phytosphere. Canadian Journal of Microbiology, 48(7), 588–601.

Nayak, A. S., Vijaykumar, M. H., & Karegoudar, T. B. (2009). Characterization of biosurfactant produced by *Pseudoxanthomonas* sp. PNK-04 and its application in bioremediation. International Biodeterioration & Biodegradation, 63(1), 73–79.

Neu, T. R. (1996). Significance of bacterial surface-active compounds in interaction of bacteria with interfaces, 60(1), 151–166.

Nielsen, T. H., Nybroe, O., Koch, B., & Hansen, M. (2005). Genes involved in cyclic lipopeptide production are important for seed and straw colonization by *Pseudomonas* sp. Strain DSS73, 71(7), 4112–4116.

Nielsen, T. H., Sørensen, D., Tobiasen, C., Andersen, J. B., Christophersen, C., Givskov, M., & Sørensen, J. (2002). Antibiotic and biosurfactant properties of cyclic lipopeptides produced by fluorescent *Pseudomonas* spp . from the sugar beet rhizosphere, 68(7), 3416–3423.

Nielsen, T. H., Thrane, C., Christophersen, C., Anthoni, U., & Sørensen, J. (2000). Structure, production characteristics and fungal antagonism of tensin - a new antifungal cyclic lipopeptide from *Pseudomonas fluorescens* strain 96.578. Journal of Applied Microbiology, 89(6), 992–1001.

Nürnberger, T., & Lipka, V. (2005). Non-host resistance in plants: new insights into an old phenomenon. Molecular Plant Pathology, 6(3), 335–45.

Nürnberger, T., & Lipka, V. (2005). Non-host resistance in plants: new insights into an old phenomenon. Molecular Plant Pathology, 6(3), 335–45.

O'Toole, G., Kaplan, H. B., & Kolter, R. (2000). Biofilm formation as microbial development. Annual Reviews in Microbiology, *54*(1), 49-79.

Oliveira, F. J. S., Vazquez, L., de Campos, N. P., & de França, F. P. (2009). Production of rhamnolipids by a *Pseudomonas alcaligenes* strain. Process Biochemistry, 44(4), 383–389.

Ongena, M., & Jacques, P. (2008). *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. Trends in Microbiology, 16(3), 115–25.

Ouyang, J., Shao, X., & Li, J. (2000). Indole-3-glycerol phosphate, a branchpoint of indole-3-acetic acid biosynthesis from the tryptophan biosynthetic pathway in *Arabidopsis thaliana*. The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology, 24(3), 327–33.

Overbeek, R., Disz, T., & Stevens, R. (2004). The SEED: a peer-to-peer environment for genome annotation. Communications of the ACM, 47(11), 46-51.

Parret, A. H., Temmerman, K., & De Mot, R. (2005). Novel lectin-like bacteriocins of biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. Applied and environmental microbiology, *71*(9), 5197-5207.

Patten, C. L., & Glick, B. R. (2002). Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. Applied and environmental microbiology, *68*(8), 3795-3801.

Paulitz, T. C. (2000). Population dynamics of biocontrol agents and pathogens in soils and rhizospheres. European journal of plant pathology, *106*(5), 401-413.

Paulsen, I. T., Press, C. M., Ravel, J., Kobayashi, D. Y., Myers, G. S. a, Mavrodi, D. V, Loper, J. E. (2005). Complete genome sequence of the plant commensal *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. Nature Biotechnology, 23(7), 873–8.

Peixoto, R. S., Coutinho, H. L. C., Rumjanek, N. G., Macrae, A., & Rosado, A. S. (2002). Use of rpo B and 16S rRNA genes to analyse bacterial diversity of a tropical soil using PCR and DGGE. Letters in Applied Microbiology, 35, 316–320.

Peleg, Z., & Blumwald, E. (2011). Hormone balance and abiotic stress tolerance in crop plants. Current Opinion in Plant Biology, 14(3), 290–5.

Peng, F., Liu, Z., Wang, L., & Shao, Z. (2007). An oil-degrading bacterium: *Rhodococcus erythropolis* strain 3C-9 and its biosurfactants. Journal of Applied Microbiology, 102(6), 1603–11.

Peng, F., Wang, Y., Sun, F., Liu, Z., Lai, Q., & Shao, Z. (2008). A novel lipopeptide produced by a Pacific Ocean deep-sea bacterium, *Rhodococcus* sp. TW53. Journal of Applied Microbiology, 105(3), 698–705.

Penrose, D. M., Moffatt, B. a, & Glick, B. R. (2001). Determination of 1-aminocycopropane-1-carboxylic acid (ACC) to assess the effects of ACC deaminase-containing bacteria on roots of canola seedlings. Canadian Journal of Microbiology, 47(1), 77–80.

Perneel, M., D'hondt, L., De Maeyer, K., Adiobo, A., Rabaey, K., & Höfte, M. (2008). Phenazines and biosurfactants interact in the biological control of soil-borne diseases caused by *Pythium* spp. Environmental Microbiology, 10(3), 778–88.

Pham, H. T., Riu, K. Z., Jang, K. M., Cho, S. K., & Cho, M. (2004). Bactericidal activity of glycinecin A, a bacteriocin derived from *Xanthomonas campestris* pv. glycines, on phytopathogenic *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* cells. Applied and environmental microbiology, *70*(8), 4486-4490.

Pliego, C., de Weert, S., Lamers, G., de Vicente, A., Bloemberg, G., Cazorla, F. M., & Ramos, C. (2008). Two similar enhanced root-colonizing Pseudomonas strains differ largely in their colonization strategies of avocado roots and *Rosellinia necatrix* hyphae. Environmental Microbiology, 10(12), 3295–304.

Pliego, C., Kamilova, F., & Lugtenberg, B. (2011). Bacteria in Agrobiology: Crop Ecosystems. D. K. Maheshwari, Ed. (pp. 295–343). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

Pliego, C., Ramos, C., Vicente, A., & Cazorla, F. M. (2010). Screening for candidate bacterial biocontrol agents against soilborne fungal plant pathogens. Plant and Soil, 340(1-2), 505–520.

Prinsen, E., Costacurta, A., Michiels, K., Vanderleyden, J., & Van Onckelen, H. (1993). *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid biosynthesis: evidence for a non-tryptophan dependent pathway. Molecular Plant-Microbe Interactions, 6(5), 609–615.

Putignani, L., Ambrosi, C., Ascenzi, P., & Visca, P. (2004). Expression of l-ornithine Nδ-oxygenase (PvdA) in fluorescent *Pseudomonas* species: an immunochemical and in silico study. Biochemical and Biophysical Research Communications, 313(2), 245–257.

Quagliotto, L., Azziz, G., Bajsa, N., Vaz, P., Pérez, C., Ducamp, F., … Arias, A. (2009). Three native *Pseudomonas fluorescens* strains tested under growth chamber and field conditions as biocontrol agents against damping-off in alfalfa. Biological Control (51), 42–50.

Raaijmakers, J. M., & Weller, D. M. (1998). Natural Plant Protection by 2 , 4-Diacetylphloroglucinol – Producing *Pseudomonas* spp . in Take-All Decline Soils, 11(2), 144–152.

Raaijmakers, J. M., de Bruijn, I., & de Kock, M. J. D. (2006). Cyclic lipopeptide production by plant-associated Pseudomonas spp.: diversity, activity, biosynthesis, and regulation. Molecular Plant-Microbe Interactions : MPMI, 19(7), 699–710.

Raaijmakers, J. M., De Bruijn, I., Nybroe, O., & Ongena, M. (2010). Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics. FEMS Microbiology Reviews, 34(6), 1037–62.

Raaijmakers, J. M., Leeman, M., van Oorschot, M. M. P., van der Sluis, I., Schippers, B., & Bakker, P. (1995). Dose-response relationships in biological control of *Fusarium* wilt of radish by *Pseudomonas* spp. Biological Control, 85(10), 1075–1081.

Raaijmakers, J. M., Paulitz, T. C., Steinberg, C., Alabouvette, C., & Moënne-Loccoz, Y. (2008). The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. Plant and Soil, 321(1-2), 341–361.

Rahme, L. G., Ausubel, F. M., Cao, H., Drenkard, E., Goumnerov, B. C., Lau, G. W., Tompkins, R. G. (2000). Plants and animals share functionally common bacterial virulence factors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 97(16), 8815–21.

Rahme, L. G., Stevens, E. J., Wolfort, S. F., Shao, J., Tompkins, R. G., & Ausubel, F. M. (1995). Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. Science (New York, N.Y.), 268(5219), 1899–902.

Rajendhran, J., & Gunasekaran, P. (2011). Microbial phylogeny and diversity: small subunit ribosomal RNA sequence analysis and beyond. Microbiological Research, 166(2), 99–110.

Rajkumar, M., & Freitas, H. (2008). Influence of metal resistant-plant growth-promoting bacteria on the growth of *Ricinus* communis in soil contaminated with heavy metals. Chemosphere, 71(5), 834–42.

Rebuffo, M., Risso, F., & Restaino, E. (2000). Tecnología en alfalfa. M. Rebuffo, D. F. Risso, & E. Restaino, Eds. pp. 1–155. Montevideo: INIA.

Redondo-Nieto, M., Barret, M., Morrisey, J. P., Germaine, K., Martínez-Granero, F., Barahona, E., Navazo, A., Sánchez-Contreras, M., Moynihan, J., Giddens. S.R., Coppoolse., Muriel, C., Stiekema, W.J., Rainey P. B., Dowling, D., O'Gara. F., Martín, M. y R. Rivilla (2012). Genome sequence of the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens F113*. Journal of Bacteriology, 194(5), 1273–4.

Richardson, A. E., & Simpson, R. J. (2011). Soil microorganisms mediating phosphorus availability update on microbial phosphorus. Plant Physiology, 156(3), 989–96.

Rodriguez-Salazar, J., Suarez, R., Caballero-Mellado, J., & Iturriaga, G. (2009). Trehalose accumulation in *Azospirillum brasilense* improves drought tolerance and biomass in maize plants. FEMS Microbiology Letters, 296, 52–59.

Roesti, D., Gaur, R., Johri, B., Imfeld, G., Sharma, S., Kawaljeet, K., & Aragno, M. (2006). Plant growth stage, fertiliser management and bio-inoculation of arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth promoting rhizobacteria affect the rhizobacterial community structure in rain-fed wheat fields. Soil Biology and Biochemistry, 38(5), 1111–1120.

Rokni-Zadeh, H., Li, W., Sanchez-Rodriguez, A., Sinnaeve, D., Rozenski, J., Martins, J. C., & De Mot, R. (2012). Genetic and functional characterization of cyclic lipopeptide white-line-inducing principle (WLIP) production by rice rhizosphere isolate *Pseudomonas putida* RW10S2. Applied and Environmental Microbiology, 78(14), 4826–34.

Romero, D., Traxler, M. F., López, D., & Kolter, R. (2011). Antibiotics as signal molecules. Chemical reviews, *111*(9), 5492-5505.

Ron, E. Z., & Rosenberg, E. (2001). Natural roles of biosurfactants. Environmental microbiology, *3*(4), 229-236.

Rondon, M. R., Goodman, R. M., & Handelsman, J. (1999). The Earth ' s bounty : assessing and accessing soil microbial diversity. Trends in Biotechnology, 17(10), 403–409.

Roongsawang, N., Hase, K., Haruki, M., Imanaka, T., Morikawa, M., & Kanaya, S. (2003). Cloning and characterization of the gene cluster encoding arthrofactin synthetase from *Pseudomonas* sp . MIS38. Chemistry & Biology, 10, 869–880.

Roongsawang, N., Washio, K., & Morikawa, M. (2007). In vivo characterization of tandem C-terminal thioesterase domains in arthrofactin synthetase. Chembiochem : A European Journal of Chemical Biology, 8(5), 501–12.

Roongsawang, N., Washio, K., & Morikawa, M. (2010). Diversity of nonribosomal peptide synthetases involved in the biosynthesis of lipopeptide biosurfactants. International Journal of Molecular Sciences, 12(1), 141–72.

Rosenberg, E., & Ron, E. Z. (1999). High- and low-molecular-mass microbial surfactants. Applied Microbiology and Biotechnology, 52(2), 154–62.

Röttig, M., Medema, M. H., Blin, K., Weber, T., Rausch, C., & Kohlbacher, O. (2011). NRPSpredictor2--a web server for predicting NRPS adenylation domain specificity. Nucleic Acids Research, 39, W362–7.

Ryder, M. (1994). Key issues in the deliberate release of genetically-manipulated bacteria. FEMS Microbiology Ecology, 15(1-2), 139–145.

Ryu, C., Farag, M. A., Hu, C., Reddy, M. S., Kloepper, J. W., & Pare, P. W. (2004). Bacterial Volatiles Induce Systemic Resistance in, 134(March), 1017–1026.

Saharan, B. S., & Nehra, V. (2011). Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review. *Life Sci Med Res*, *21*, 1-30.

Saini, H. S., Barragán-Huerta, B. E., Lebrón-Paler, A., Pemberton, J. E., Vázquez, R. R., Burns, A. M., Maier, R. M. (2008). Efficient purification of the biosurfactant viscosin from *Pseudomonas libanensis* strain M9-3 and its physicochemical and biological properties. Journal of Natural Products, 71(6), 1011–5.

Salanoubat, M, S Genin, F Artiguenave, J Gouzy, S Mangenot, M Arlat, a Billault, P Brottier, J C Camus, L Cattolico, M Chandler, N Choisne, C Claudel-Renard, S Cunnac, N Demange, C Gaspin, M Lavie, a Moisan, C Robert, W Saurin, T Schiex, P Siguier, P Thébault, M Whalen, P Wincker, M Levy, J Weissenbach, and C a Bouche (2002). Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. Nature, 415(6871), 497–502.

Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, USA

Satpute, S. K., Banat, I. M., Dhakephalkar, P. K., Banpurkar, A. G., & Chopade, B. a. (2010). Biosurfactants, bioemulsifiers and exopolysaccharides from marine microorganisms. Biotechnology Advances, 28(4), 436–50.

Schmidt, C. S., Agostini, F., Simon, A., Whyte, J., Townend, J., Leifert, C., Mullins, C. (2004). Influence of soil type and pH on the colonisation of sugar beet seedlings by antagonistic *Pseudomonas* and *Bacillus* strains, and on their control of *Pythium* damping-off. European Journal of Plant Pathology, 110(10), 1025–1046.

Schulze, J., & Drevon, J.-J. (2005). P-deficiency increases the O2 uptake per N2 reduced in alfalfa. Journal of Experimental Botany, 56(417), 1779–84.

Schütte, U. M. E., Abdo, Z., Bent, S. J., Shyu, C., Williams, C. J., Pierson, J. D., & Forney, L. J. (2008). Advances in the use of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis of 16S rRNA genes to characterize microbial communities. Applied Microbiology and Biotechnology, 80(3), 365–80.

Schwieger, F., & Tebbe, C. C. (2000). Effect of field inoculation with *Sinorhizobium meliloti* L33 on the composition of bacterial communities in rhizospheres of a target plant (*Medicago sativa*) and a non-target plant (*Chenopodium album*) −linking of 16S rRNA gene-based single-strand conformation polymorphism community profiles to the diversity of cultivated bacteria. Applied and Environmental Microbiology, 66(8), 3556–3565.

Seghal Kiran, G., Anto Thomas, T., Selvin, J., Sabarathnam, B., & Lipton, a P. (2010). Optimization and characterization of a new lipopeptide biosurfactant produced by marine *Brevibacterium aureum* MSA13 in solid state culture. Bioresource Technology, 101(7), 2389–96.

Segre, A., Bachmann, R. C., Ballio, A., Bossa, F., Grgurina, I., Iacobellis, N. S., Takemoto, J. Y. (1989). The structure of syringomycins A1, E and G. FEBS Letters, 255(1), 27–31.

Setten, L., Soto, G., Mozzicafreddo, M., Fox, A. R., Lisi, C., Cuccioloni, M., ... & Ayub, N. D. (2013). Engineering *Pseudomonas protegens* Pf-5 for nitrogen fixation and its application to improve plant growth under nitrogen-deficient conditions. *PloS one*, *8*(5), e63666.

Shade, A., Peter, H., Allison, S. D., Baho, D. L., Berga, M., Bürgmann, H., ... & Handelsman, J. (2012). Fundamentals of microbial community resistance and resilience. *Frontiers in microbiology*, *3*.

Shanahan, P., O'sullivan, D. J., Simpson, P., Glennon, J. D., & O'gara, F. (1992). Isolation of 2,4-diacetylphloroglucinol from a fluorescent pseudomonad and investigation of physiological parameters influencing its production. Applied and Environmental Microbiology, 58(1), 353–8.

Shang, C., Caldwell, D. E., & Huang, P. M. (1996). Bioavailability of organic and inorganic phosphates adsorbed on short-range ordered aluminium precipitate. Microbial Ecology, 31(1), 29–39.

Siddiqui, I. A., Haas, D., & Heeb, S. (2005). Extracellular protease of *Pseudomonas fluorescens* CHA0, a biocontrol factor with activity against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. Applied and Environmental Microbiology, 71(9), 5646–5649.

Silby, M. W., Cerdeño-Tárraga, A. M., Vernikos, G. S., Giddens, S. R., Jackson, R. W., Preston, G. M., ... & Thomson, N. R. (2009). Genomic and genetic analyses of diversity and plant interactions of *Pseudomonas fluorescens*. *Genome biology*, *10*(5), R51.

Soberón-Chávez, G., Lépine, F., & Déziel, E. (2005). Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. Applied Microbiology and Biotechnology, 68(6), 718–25.

Souza, J. T. De, Boer, M. De, Waard, P. De, Beek, T. A. Van, & Raaijmakers, J. M. (2003). Biochemical , Genetic , and zoosporicidal properties of cyclic lipopeptide surfactants produced by *Pseudomonas fluorescens*, 69(12), 7161–7172.

Starcevic, A., Zucko, J., Simunkovic, J., Long, P. F., Cullum, J., & Hranueli, D. (2008). ClustScan: an integrated program package for the semi-automatic annotation of modular biosynthetic gene clusters and in silico prediction of novel chemical structures. Nucleic Acids Research, 36(21), 6882–92.

Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, a L., Mizoguchi, S. D., Warrener, P., Hickey, M. J., … Olson, M. V. (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. Nature, 406(6799), 959–64.

Sullivan, E. (1998). Molecular genetics of biosurfactant production. Current Opinion in Biotechnology, 9(3), 263–9.

Sorensen, D., Nielsen, T. H., Christophersen, C., Sorensen, J., & Gajhede, M. (2001). Cyclic lipoundecapeptide amphisin from *Pseudomonas* sp. strain DSS73. *Acta Crystallographica Section C:* Crystal Structure Communications,57(9), 1123-1124.

Swarup, R., Perry, P., Hagenbeek, D., Van Der Straeten, D., Beemster, G. T. S., Sandberg, G., … Bennett, M. J. (2007). Ethylene upregulates auxin biosynthesis in Arabidopsis seedlings to enhance inhibition of root cell elongation. The Plant Cell, 19(7), 2186–96.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution, 30(12), 2725–9.

Taylor, R. J., Salas, B., Secor, G. A., Rivera, V., Gudmestad, N. C., Pathology, P., & Da-, N. (2002). Sensitivity of North American Isolates of *Phytophthora erythroseptica* and *Pythium ultimum* to Mefenoxam (Metalaxyl). Plant Disease, 86(7), 797–802.

Tendulkar, S. R., Saikumari, Y. K., Patel, V., Raghotama, S., Munshi, T. K., Balaram, P., & Chattoo, B. B. (2007). Isolation, purification and characterization of an antifungal molecule produced by *Bacillus licheniformis* BC98, and its effect on phytopathogen *Magnaporthe grisea*. Journal of Applied Microbiology, 103(6), 2331–9.

Thavasi, R., Subramanyam Nambaru, V. R. M., Jayalakshmi, S., Balasubramanian, T., & Banat, I. M. (2009). Biosurfactant production by *Azotobacter chroococcum* isolated from the marine environment. Marine Biotechnology (New York, N.Y.), 11(5), 551–6.

Thrane, C., Harder Nielsen T, Neiendam Nielsen M, Sørensen, J., & Olsson, S. (2000). Viscosinamide-producing *Pseudomonas fluorescens* DR54 exerts a biocontrol effect on *Pythium ultimum* in sugar beet rhizosphere. FEMS Microbiology Ecology, 33(2), 139–146.

Tiedje, J. M., Asuming-Brempong, S., Nüsslein, K., Marsh, T. L., & Flynn, S. J. (1999). Opening the black box of soil microbial diversity. Applied Soil Ecology, 13(2), 109-122.

Torsvik, V., & Øvreås, L. (2002). Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. Current Opinion in Microbiology, 5(3), 240–245.

Toyama, H., & Lidstrom, M. E. (1998). pqqA is not required for biosynthesis of pyrroloquinoline quinone in *Methylobacterium extorquens* AM1. Microbiology (Reading, England), 144 (Pt 1(1 998), 183–91.

Trabelsi, D., & Mhamdi, R. (2013). Microbial inoculants and their impact on soil microbial communities: a review. BioMed research international, *2013*.

Trabelsi, D., Ben Ammar, H., Mengoni, A., & Mhamdi, R. (2012). Appraisal of the crop-rotation effect of rhizobial inoculation on potato cropping systems in relation to soil bacterial communities. Soil Biology and Biochemistry, 54, 1–6.

Trabelsi, D., Mengoni, A., Ben Ammar, H., & Mhamdi, R. (2011). Effect of on-field inoculation of *Phaseolus vulgaris* with rhizobia on soil bacterial communities. FEMS Microbiology Ecology, 77(1), 211–22.

Tran, H., Ficke, A., Asiimwe, T., & Raaijmakers, J. M. (2007). Role of the cyclic lipopeptide massetolide A in biological control of *Phytophthora infestans* and in colonization of tomato plants by *Pseudomonas fluorescens*. New Phytologist, 175, 731–742.

Trejo-Estrada, S. R., Paszczynski, A., & Crawford, D. L. (1998). Antibiotics and enzymes produced by the biocontrol agent *Streptomyces violaceusniger* YCED-9, 108(8), 81–90.

Trivedi, P., Pandey, A., & Palni, L. M. S. (2008). In vitro evaluation of antagonistic properties of *Pseudomonas corrugata*. Microbiological Research, 163(3), 329–36.

Troppens, D. M., Dmitriev, R. I., Papkovsky, D. B., O'Gara, F., & Morrissey, J. P. (2013). Genome-wide investigation of cellular targets and mode of action of the antifungal bacterial metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol in *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Yeast Research, 13(3), 322–34.

Troxler, J., Svercel, M., Natsch, A., Zala, M., Keel, C., Moënne-Loccoz, Y., & Défago, G. (2012). Persistence of a biocontrol *Pseudomonas* inoculant as high populations of culturable and non-culturable cells in 200-cm-deep soil profiles. Soil Biology and Biochemistry, 44(1), 122–129.

Tuleva, B., Christova, N., Cohen, R., Antonova, D., Todorov, T., & Stoineva, I. (2009). Isolation and characterization of trehalose tetraester biosurfactants from a soil strain *Micrococcus luteus* BN56. Process Biochemistry, 44(2), 135–141.

Tuleva, B., Christova, N., Cohen, R., Stoev, G., & Stoineva, I. (2008). Production and structural elucidation of trehalose tetraesters (biosurfactants) from a novel alkanothrophic *Rhodococcus wratislaviensis* strain. Journal of Applied Microbiology, 104(6), 1703–10.

Vallet-Gely, I., Novikov, A., Augusto, L., Liehl, P., Bolbach, G., Péchy-Tarr, M., Lemaitre, B. (2010). Association of hemolytic activity of Pseudomonas entomophila, a versatile soil bacterium, with cyclic lipopeptide production. Applied and Environmental Microbiology, 76(3), 910–21.

Vallet-Gely, I., Opota, O., Boniface, A., Novikov, A., & Lemaitre, B. (2010). A secondary metabolite acting as a signalling molecule controls *Pseudomonas entomophila* virulence. Cellular Microbiology, 12(11), 1666–1679.

Van de Mortel, J. E., Tran, H., Govers, F., & Raaijmakers, J. M. (2009). Cellular responses of the late blight pathogen *Phytophthora infestans* to cyclic lipopeptide surfactants and their dependence on G proteins. Applied and Environmental Microbiology, 75(15), 4950–4957.

Van der Heijden, M. G. a, Bardgett, R. D., & van Straalen, N. M. (2008). The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. Ecology Letters, 11(3), 296–310.

Van Elsas, J. D., Chiurazzi, M., Mallon, C. a, Elhottova, D., Kristufek, V., & Salles, J. F. (2012). Microbial diversity determines the invasion of soil by a bacterial pathogen. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 109(4), 1159–1164.

Van Lanen, S. G., & Shen, B. (2006). Microbial genomics for the improvement of natural product discovery. Current Opinion in Microbiology, 9(3), 252–260.

Van Loon, L. C. (2007). Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. European Journal of Plant Pathology, 119(3), 243–254.

Vansuyt, G., Robin, A., Briat, J.-F., Curie, C., & Lemanceau, P. (2007). Iron acquisition from Fe-pyoverdine by *Arabidopsis thaliana*. Molecular Plant-Microbe Interactions : MPMI, 20(4), 441–447.

Vassiliadis, G., PeduzziDestoumieux-Garzón, D., & Peduzzi, J. (2011). Class II Microcins. In Prokaryotic Antimicrobial Peptides (pp. 309–332). Springer New York.

Vatsa, P., Sanchez, L., Clement, C., Baillieul, F., & Dorey, S. (2010). Rhamnolipid biosurfactants as new players in animal and plant defense against microbes. International Journal of Molecular Sciences, 11(12), 5095–5108.

Versalovic, J., Schneider, M., De Bruijn, F. J., & Lupski, J. R. (1994). Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. Methods in Molecular and Cellular Biology, 5, 25–40.

Vicedo, B., Peñalver, R., Asins, M. J., & López, M. M. (1993). Biological control of Agrobacterium tumefaciens, colonization, and pAgK84 transfer with Agrobacterium radiobacter K84 and the Tra-mutant strain K1026. *Applied and environmental microbiology*, *59*(1), 309-315.

Villacieros, M., Power, B., Sánchez-Contreras, M., Lloret, J., Oruezabal, R. I., Martín, M., ... & Rivilla, R. (2003). Colonization behaviour of *Pseudomonas fluorescens* and *Sinorhizobium meliloti* in the alfalfa (Medicago sativa) rhizosphere. *Plant and Soil*, *251*(1), 47-54.

Vitousek, P. M., Mooney, H. A., Lubchenco, J., & Melillo, J. M. (1997). Human domination of Earth's ecosystems. *Science*, *277*(5325), 494-499.

Voisard, C., Keel, C., Haas, D., & Dèfago, G. (1989). Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* helps suppress black root rot of tobacco under gnotobiotic conditions. The EMBO Journal, 8(2), 351–8.

Walsh, U. F., Morrissey, J. P., & O'Gara, F. (2001). Pseudomonas for biocontrol of phytopathogens: from functional genomics to commercial exploitation. Current Opinion in Biotechnology, 12(3), 289–95.

Wamberg, C., Christensen, S., Jakobsen, I., Müller, a. K., & Sørensen, S. J. (2003). The mycorrhizal fungus (*Glomus intraradices*) affects microbial activity in the rhizosphere of pea plants (*Pisum sativum*). Soil Biology and Biochemistry, 35(10), 1349–1357.

Washio, K., Lim, S. P., Roongsawang, N., & Morikawa, M. (2010). Identification and characterization of the genes responsible for the production of the cyclic lipopeptide arthrofactin by *Pseudomonas* sp. MIS38. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 74(5), 992–999.

Washio, K., Lim, S. P., Roongsawang, N., & Morikawa, M. (2011). A truncated form of SpoT, including the ACT domain, inhibits the production of cyclic lipopeptide arthrofactin, and is associated with moderate elevation of guanosine 3',5'-bispyrophosphate level in *Pseudomonas* sp. MIS38. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 75(10), 1880–8.

Weber, T., Rausch, C., Lopez, P., Hoof, I., Gaykova, V., Huson, D. H., & Wohlleben, W. (2009). CLUSEAN: A computer-based framework for the automated analysis of bacterial secondary metabolite biosynthetic gene clusters. Journal of Biotechnology, 140(1-2), 13–17.

Weisskopf, Laure. 2013. The Potential of Bacterial Volatiles for Crop Protection against Phytophathogenic Fungi. In Microbial Pathogens and Strategies for Combating Them: Science, Technology and Education, ed. A. Méndez-Vilas. FORMATEX 2013, 1352–63.

Weller, D. M. (2007). Pseudomonas biocontrol agents of soilborne pathogens: looking back over 30 years. Phytopathology, 97(2), 250–6.

Weller, D. M., Mavrodi, D. V, Pelt, J. A. Van, Pieterse, C. M. J., Loon, L. C. Van, & Bakker, P. A. H. M. (2012). Induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* against *Pseudomonas syringae* pv . tomato by 2,4-Diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas fluorescens*. Biological Control, 102(4), 403–412.

Whipps, J. M. (2001). Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. Journal of Experimental Botany, 52(Spec Issue), 487–511.

Wohlrab, A., Lamer, R., & Vannieuwenhze, M. S. (2007). Total synthesis of plusbacin A3: a depsipeptide antibiotic active against vancomycin-resistant bacteria. Journal of the American Chemical Society, 129(14), 4175–4177.

Wu, S. C., Cheung, K. C., Luo, Y. M., & Wong, M. H. (2006). Effects of inoculation of plant growth-promoting rhizobacteria on metal uptake by Brassica juncea. Environmental Pollution (Barking, Essex : 1987), 140(1), 124–35.

Xiao, K., Kinkel, L. L., & Samac, D. a. (2002). Biological control of phytophthora root rots on alfalfa and soybean with *Streptomyces*. Biological Control, 23(3), 285–295.

Xu, J., Platt, T. G., & Fuqua, C. (2012). Regulatory linkages between flagella and surfactant during swarming behavior: lubricating the flagellar propeller? Journal of Bacteriology, 194(6), 1283–6.

Yamamoto, S., Kasai, H., Arnold, D. L., Jackson, R. W., Vivian, A., & Harayama, S. (2000). Phylogeny of the genus Pseudomonas: intrageneric structure reconstructed from the nucleotide sequences of *gyrB* and *rpoD* genes. Microbiology, *146*(10), 2385-2394.

Yan, Y., Yang, J., Dou, Y., Chen, M., Ping, S., Peng, J., … Jin, Q. (2008). Nitrogen fixation island and rhizosphere competence traits in the genome of root-associated Pseudomonas stutzeri A1501. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 105(21), 7564–9.

Yanes, M. L. (2007). Caracterización de una colección de *Pseudomonas fluorescentes* nativas como promotoras del crecimiento de la alfalfa. Tesis de maestría. PEDECIBA Biología. Universidad de la República.

Yanes, M. L., & Arias, A. (2009). Proyecto PDT 165. Capacidad promotora del crecimiento vegetal de *Pseudomonas* fluorescentes nativas (pp. 1–27). DICyT

Yanes, M. L., De La Fuente, L., Altier, N., & Arias, A. (2012). Characterization of native fluorescent Pseudomonas isolates associated with alfalfa roots in Uruguayan agroecosystems. Biological Control, 63, 287–295.

Yanes, M. L., Fernandez, A., Arias, A., & Altier, N. (2004). Método estándar para evaluar la capacidad de protección contra Pythium debaryanum y promoción del crecimiento en alfalfa de *Pseudomonas* fluorescentes. Agrociencia, 8(2), 23–32.

Yin, H., Qiang, J., Jia, Y., Ye, J., Peng, H., Qin, H., He, B. (2009). Characteristics of biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* S6 isolated from oil-containing wastewater. Process Biochemistry, 44(3), 302–308.

Youard, Z. a, Wenner, N., & Reimmann, C. (2011). Iron acquisition with the natural siderophore enantiomers pyochelin and enantio-pyochelin in Pseudomonas species. Biometals : An International Journal on the Role of Metal Ions in Biology, Biochemistry, and Medicine, 24(3), 513–22.

Younesi, O., Baghbani, A., & Namdari, A. (2013). The effects of *Pseudomonas fluorescence* and *Rhizobium meliloti* co-inoculation on nodulation and mineral nutrient contents in alfalfa (*Medicago sativa*) under salinity stress. International Journal of Agriculture and Crop Science, 5(14), 1500–2507.

Zeigler, D. R. (2003). Gene sequences useful for predicting relatedness of whole genomes in bacteria. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 53(6), 1893–1900.

Zhuang, X., Chen, J., Shim, H., & Bai, Z. (2007). New advances in plant growth-promoting rhizobacteria for bioremediation. Environment International, 33(3), 406–13.

Ziemert, N., Podell, S., Penn, K., Badger, J. H., Allen, E., & Jensen, P. R. (2012). The natural product domain seeker NaPDoS: a phylogeny based bioinformatic tool to classify secondary metabolite gene diversity. PloS One, 7(3), e34064.

anexo 2.1

Cebadores utilizados en el presente tarbajo:

BOX-PCR		**Referencia**
BOXA-1	5´- CTA CGG CAA GGC GAC GCT GACG - 3´	(Versalovic et al. 1994)
DGGE		
F968-GC	5´- CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAA CGC GAA GAA CCT TAC -3´	(Heuer et al. 1997)
R1378	5´- CGG TGT GTA CAA GGC CCG GGA ACG -3´	
T-RFLP		
27F-FAM	FAM - 5´ - AGA GTT TGA TCM TGG CTCAG -3´	(Lane, 1991)
R1378	5´- CGG TGT GTA CAA GGC CCG GGA ACG -3´	(Heuer et al. 1997)

anexo 2.2

SOLUCIONES

Pirofosfato de Sodio

Pirofosfato de Sodio decahidratado	1,68 g
Agua desionizada	1000 ml c.s.p

Se llevó el pH a 7 con HCl 10 N

Soluciones para DGGE

2.2–1 EDTA 0.5M pH 8.0

EDTA 2H2O	18.6g
NaOH	hasta pH 8
Agua ultra pura	100 ml c.s.p.

Se agregó EDTA a 70ml de H_2O ultra pura. Se agitó y agregó NaOH hasta alcanzar pH 8. Se completó el volumen a 100 ml. Se guardó a temperatura ambiente.

2.2 –2 Buffer TAE 50X

Tris-Base	60.5g
Ácido acético glacial	14.28ml
Sol. EDTA 0.5M pH8.0	25ml
Agua ultra pura	250 ml c.s.p.

Se agregó Tris-Base a 150 ml de agua ultra pura. Se agitó y agregó ácido acético glacial y EDTA. Después de solubilizar se completó el volumen a 250 ml. Se autoclavó 20 minutos. Se guardó a temperatura ambiente.

2.2–3 Formamida desionizada

Resina Ag-501-X8 (BIORAD)	5g
Formamida	100 ml

Se mezcló y agitó aproximadamente durante 1hora. Se filtró con papel Whatman (cualitativo Nº.4). Se guardó a temperatura ambiente.

2.2–4 Acrilamida 40%

Acrilamida	38.93g
Bisacrilamida	1.07g
Agua ultra pura	100 ml c.s.p.

Se disolvió la acrilamida en 30 ml de agua ultra pura. Se Agregó lentamente la bisacrilamida agitando. Se completó el volumen a 100 ml. Se filtró con membrana
Millipore 0.45µM. Se guardó a 4ºC (sin luz).

2.2-5 Solución 0% de desnaturalizante (6% acrilamida)

Acrilamida 40%	15ml
Buffer TAE 50X	2ml
Agua ultra pura	83 ml

Se mezcló acrilamida 40% con TAE 50X y el volumen se completó con agua ultra pura. Se filtró con membrana Millipore 0.45µM. Se guardó a 4ºC sin luz (hasta 1 mes).

2.2-6 Solución 70% desnaturalizante (6% acrilamida)

Acrilamida 40%	15 ml
Buffer TAE 50X	2 ml
Formamida desionizada	28 ml
Urea	29,4 g
Agua ultra pura	100 ml c.s.p.

Se mezcló urea, formamida, buffer TAE 50X y acrilamida. Se agitó aproximadamente durante 40 minutos hasta que se disolvió la urea. Se completó el volumen a 100 ml con agua ultra pura. Se filtró con membrana Millipore 0.45µM y se guardó a 4ºC por un mes.

2.2-7 Persulfato de Amonio (APS) 10%

Persulfato de amonio	0.1g
Agua ultra pura	1ml

Se homogeneizó y se guardó a -20ºC como máximo por 1 semana.

2.2-8 Colorante (D code DYE solution)

Azul de bromofenol	0.05g
Xilencianol	0.05g
Buffer TAE 1X	10ml

Los colorantes fueron disueltos en 10ml de TAE 1X. Se guardó a temperatura ambiente.

2.2-9 Colorante (2X gel loading DYE)

Azul de bromofenol	0.005g
Xilencianol	0.005g
Glicerol 100%	7 ml
Agua ultra pura	3 ml

Se agregaron los colorantes al agua y luego se agregó el glicerol. Se guardó a temperatura ambiente.

anexo 2.3

MEDIOS DE CULTIVO

3.1 Agar agua (AA):

Agar	15g
H_2O	c.s.p. 1litro

3.2 King´s B:

Proteosa peptone Nº3	20g
K_2HPO_4	1.5g
$MgSO_4$	1.5g
Glicerol	10ml
Agar	18g
H_2O	c.s.p. 1litro

3.3 Luria Bertoni:

Triptona	10g
Extracto de levadura	5g
NaCl	10g
Agar	18g
H_2O	c.s.p. 1litro

3.4 Potato dextrose Agar (PDA, Difco®) :

Infusión de papa	200g
Dextrosa	20g
Agar	15g
H_2O	c.s.p. 1litro

anexo 2.4

Resultados Capitulo 2: material suplementario

2.4-1 Registro de lluvias durante el ensayo de campo

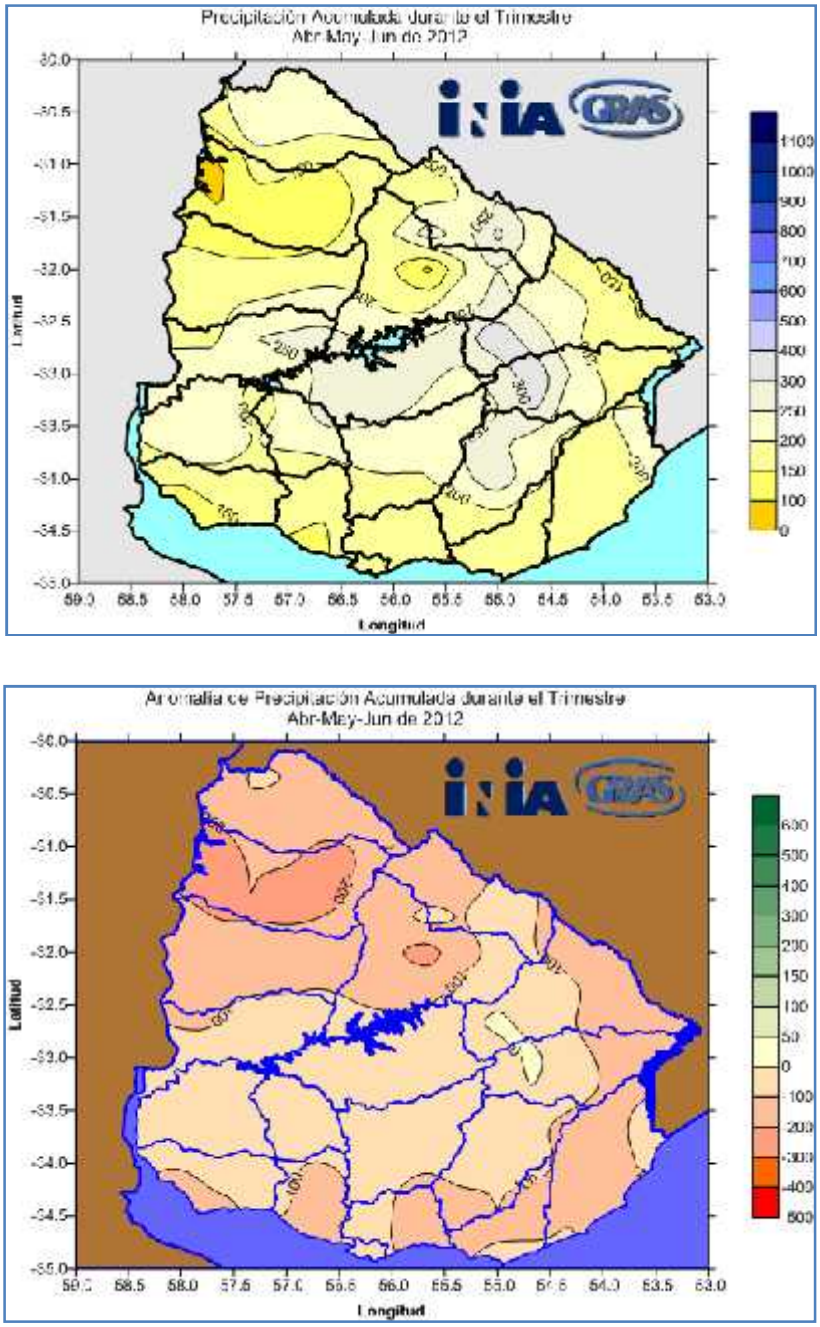


Figura S2.1 Los mapas de precipitación representan la distribución de lluvias en el país usando como información base los registros pluviométricos de 75 estaciones del Instituto Uruguayo de Metereología y 5 estaciones de INIA. Para cada mes/trimestre se presentan dos mapas, uno con la precipitación acumulada para el mes seleccionado (arriba) y otro con los desvios o anomalía de precipitación acumulada con respecto a la mediana calculada en el período 1961-1990 (abajo).

2.4-2 Resultados del análisis de componentes principales utilizando el programa T-rex

Diseño experimental para el cual se definieron ambientes de acuerdo al momento de muestreo y el tratamiento aplicado sobre las plantas de alfalfa.

Tabla 2.4-I - Lista de muestras ordenadas según el ambiente que definen

Ambiente E1 (tartamiento, muestreo)= (control 1)			
File	Tratamiento	muestreo	Replicas
1_002b.fsa	Control	1	1
2_003.fsa	Control	1	2
3_004.fsa	Control	1	3
4_001.fsa	Control	1	4
Ambiente E2 (tartamiento, muestreo)= (control,3)			
File	Tratamiento		Replicas
17_002.fsa	Control	3	1
18_003.fsa	Control	3	2
19_004.fsa	Control	3	3
20_001.fsa	Control	3	4
Ambiente E3 (tartamiento, muestreo)= (control,4)			
File	Tratamiento	Muestreo	Replicas
25_002.fsa	Control	4	1
26_003.fsa	Control	4	2
27_004.fsa	Control	4	3
28_001.fsa	Control	4	4
Ambiente E4 (tartamiento, muestreo)= (control,2)			
File	Tratamiento	Muestreo	Replicas
10_003.fsa	Control	2	2
11_004.fsa	Control	2	3
12_001.fsa	Control	2	4
Ambiente E5 (tartamiento, muestreo)= (C119,1)			
File	Tratamiento	Muestreo	Replicas
5_002.fsa	C119+Riz	1	1
6_003.fsa	C119+Riz	1	2
7_004.fsa	C119+Riz	1	3
8_001.fsa	C119+Riz	1	4
Ambiente E6 (tartamiento, muestreo)= (C119,2)			
File	Tratamiento	Muestreo	Replicas
13_002.fsa	C119+Riz	2	1
14_003.fsa	C119+Riz	2	2
15_004.fsa	C119+Riz	2	3
16_001.fsa	C119+Riz	2	4
Ambiente E7 (tartamiento, muestreo)= (C119,3)			
File	Tratamiento	Muestreo	Replicas
21_002.fsa	C119+Riz	3	1
22_003.fsa	C119+Riz	3	2
23_004.fsa	C119+Riz	3	3
24_001.fsa	C119+Riz	3	4
Ambiente E8 (tartamiento, muestreo)= (C119,4)			

File	Tratamiento	Muestreo	Replicas
29_002.fsa	C119+Riz	4	1
30_003.fsa	C119+Riz	4	2
31_004.fsa	C119+Riz	4	3
32_001.fsa	C119+Riz	4	4

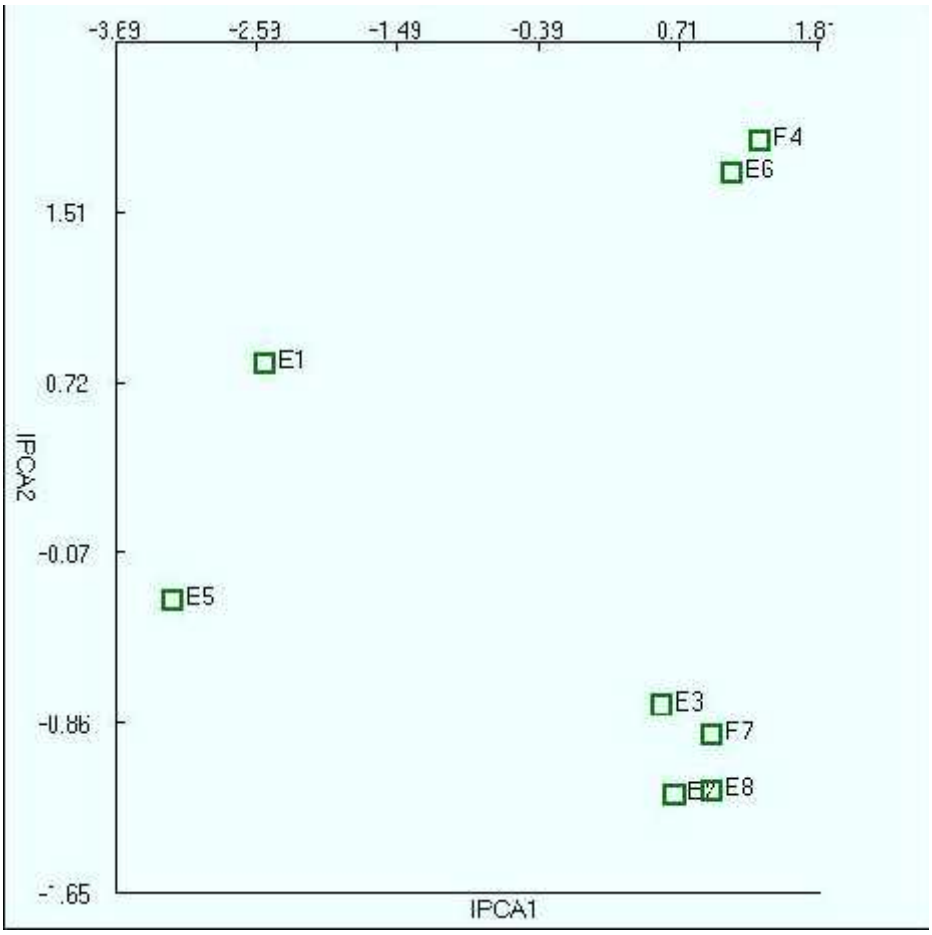


Figura S2.2- Gráfico de ordenación representando los dos ejes principales calculados mediante PCA. El primer componente es representado por el eje horizontal, y el segundo por el vertical. Las muestras se clasifican en ambiente de acuerdo al momento del muestreo y al tratamiento (ver Tabla 2.4-I de este anexo)

2.4-3 Indices de diversidad

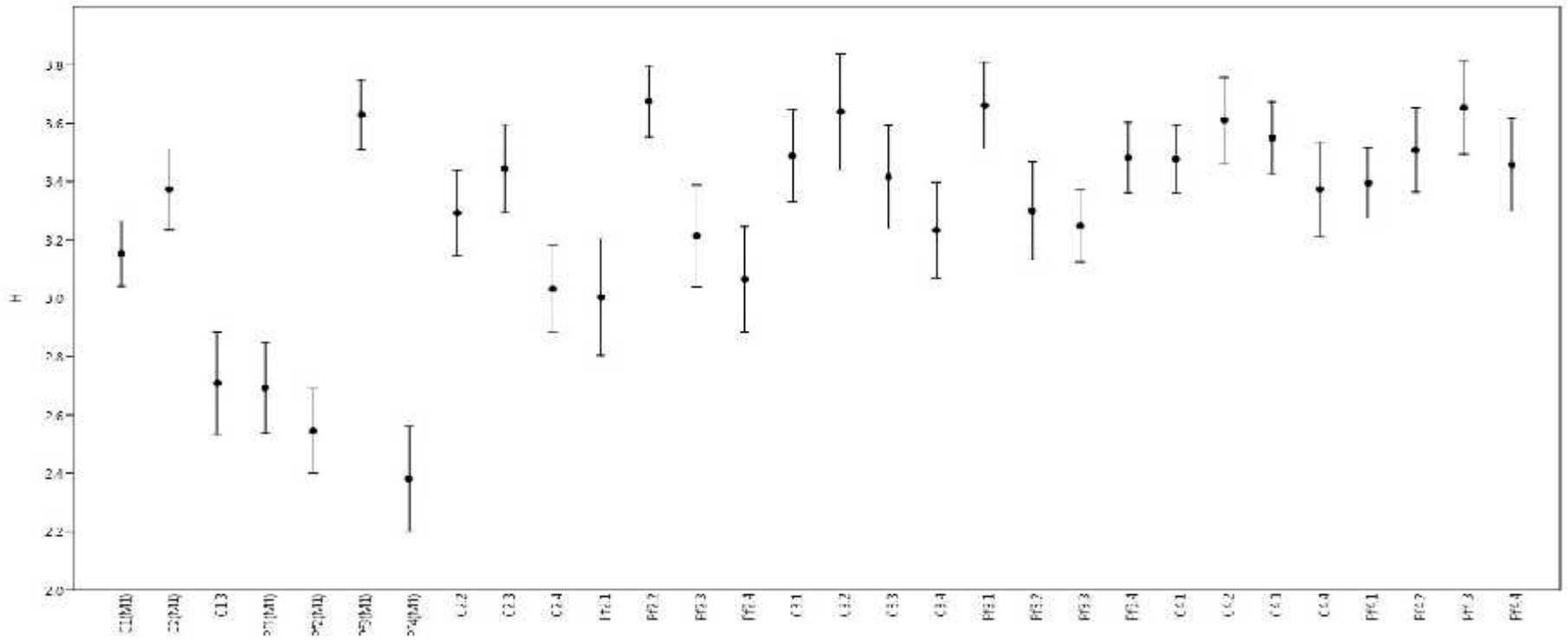


Figura S2.3- Indices de diversidad de Shannon (H) para los resultados por T-RFLP de cada tratamiento en los cuatro muestreos (calculados mediante el programa estadístico PAST).

$$H' = -\sum_{i=1}^{S} p_i \log_2 p_i$$

donde S: número de especies (la riqueza de especies) ; p_i: proporción de individuos de la especie *i* respecto al total de individuos (es decir la abundancia relativa de la especie *i*): ni/N; n_i – número de individuos de la especie *i;* N – número de todos los individuos de todas las especies

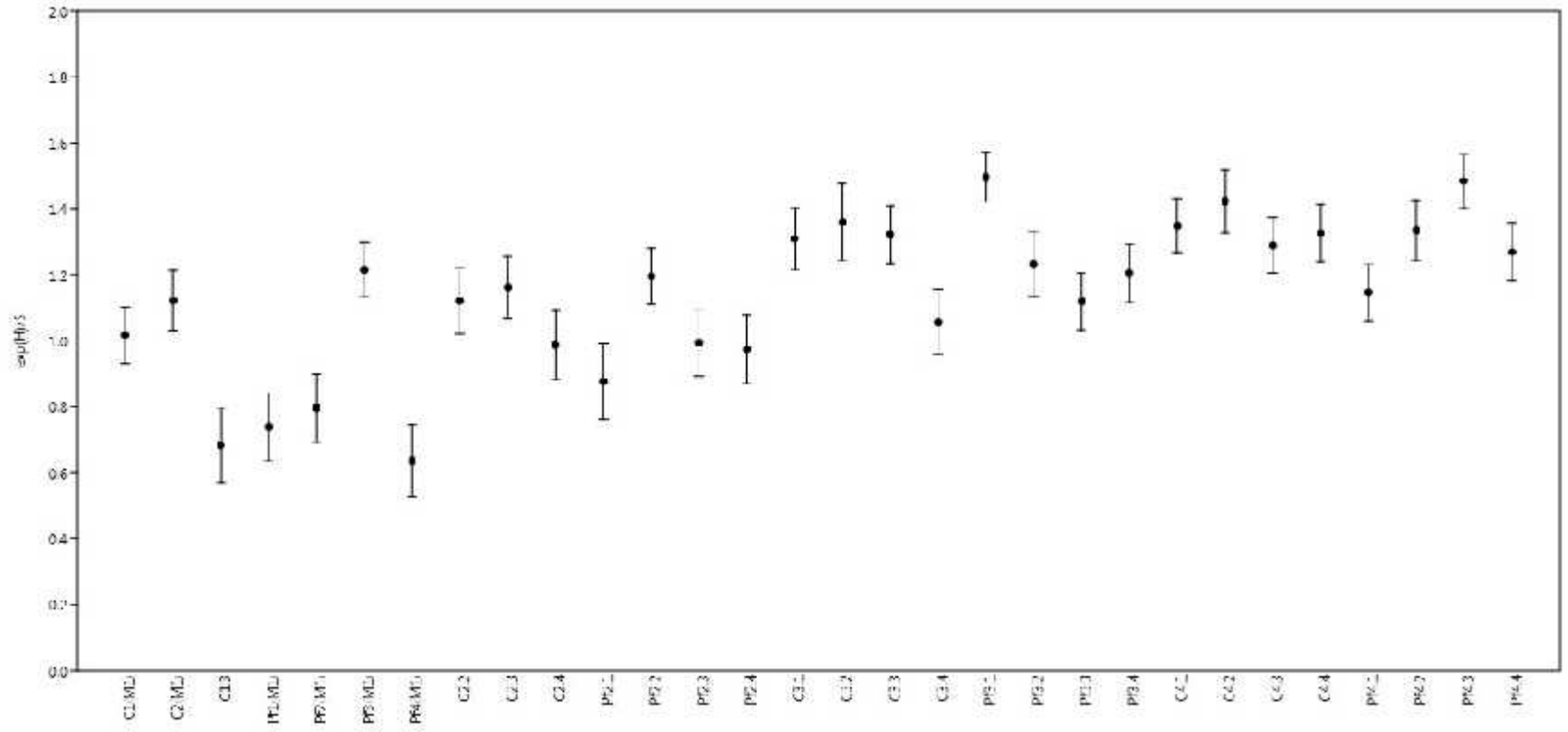


Figura S2.4- Indices de equitatividad de especies (Evenness) para los resultados por T-RFLP de cada tratamiento en los cuatro muestreos (calculados mediante el programa estadístico PAST).

Donde H´es el índice de Shannon, H'_{max} es el valor máximo de H y S es el número total de especies

$$J' = \frac{H'}{H'_{\max}} \qquad H'_{\max} = -\sum_{i=1}^{S} \frac{1}{S} \ln \frac{1}{S} = \ln S.$$

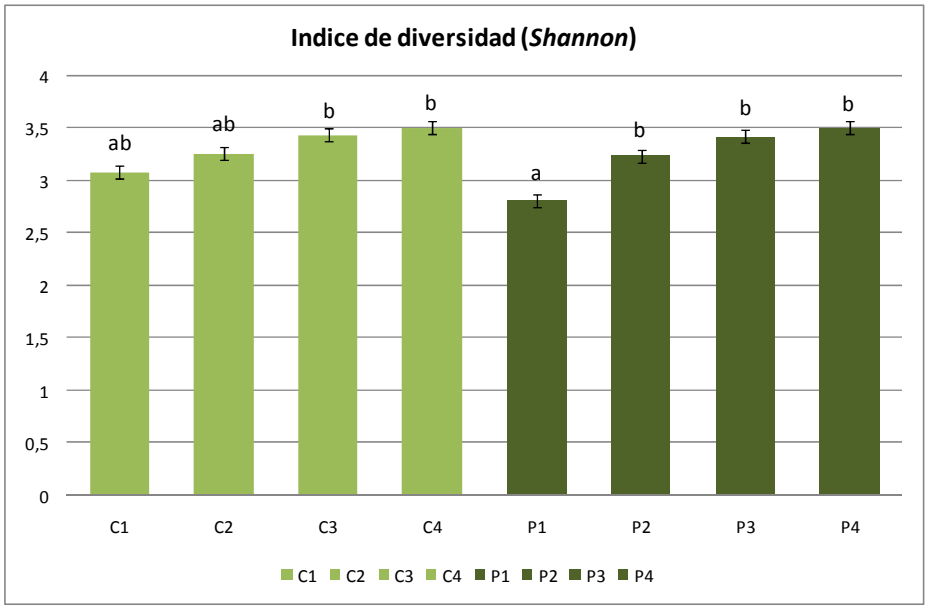


Figura S2.5 Análisis estadístico de los índices de diversidad de Shannon para los diferentes tratamientos en los cuatro momentos de muestreos. C: tratamiento control; P tratamiento *P. fluorescens* C119 + rizobio. Los muestreos se indican según los días post siembra: 1 (21dias), 2(42 días), 3(82 días) y 4 (121 días)

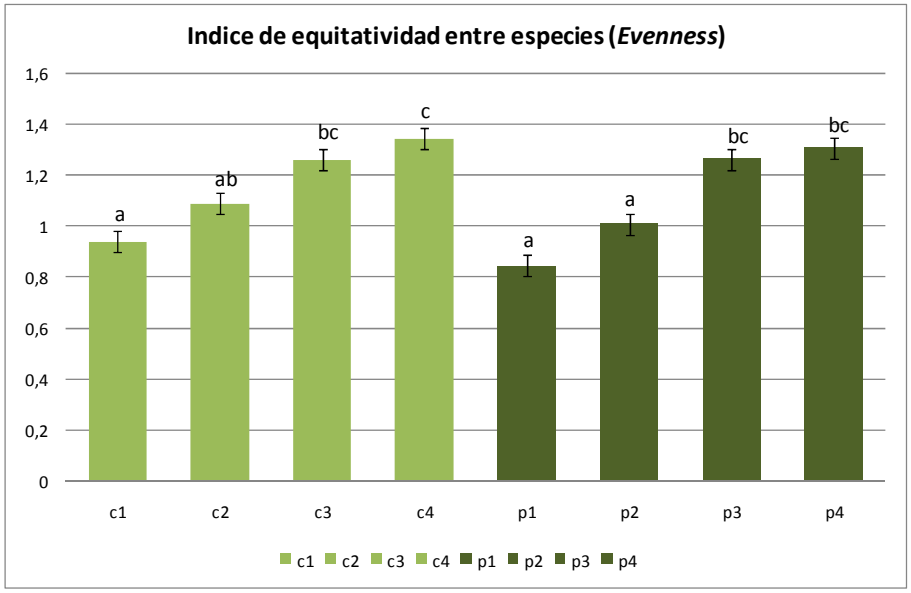


Figura S2.6 Análisis estadístico de los índices de equitatividad de las especies en las muestras (*Evenness*) para los diferentes tratamientos en los cuatro momentos de muestreos. C: tratamiento control; P tratamiento *P. fluorescens* C119 + rizobio. Los muestreos se indican según los días post siembra: 1 (21dias), 2(42 días), 3(82 días) y 4 (121 días)

anexo 3

1) Alineamiento de secuencias aminoacídicas de la proteína represora FUR de la cepa C119 y varias *Pseudomonas* fluorescentes (fuente pseudomonas.com) mediante el programa Clusta X.

```
PSEBR_FUR-subsp.       -----------MVENSELRKAGLKVTLPRVKILQMLDSAEQRHMSAEDVYKALMEAGEDV
PSF113_FUR-F113        -----------MVENSELRKAGLKVTLPRVKILQMLDSAEQRHMSAEDVYKALMEAGEDV
PputUW4_FUR-UW4        -----------MVENSELRKAGLKVTLPRVKILQMLDSAEQRHMSAEDVYKALMEAGEDV
PSEBR_a761-subsp.      -----------MVENSELRKAGLKVTLPRVKILQMLDSAEQRHMSAEDVYKALMEAGEDV
PSF113_0850-F113       -----------MVENSELRKAGLKVTLPRVKILQMLDSAEQRHMSAEDVYKALMEAGEDV
PputUW4_00687-UW4      -----------MVENSELRKAGLKVTLPRVKILQMLDSAEQRHMSAEDVYKALMEAGEDV
PSPTO_FUR-pv.          -----------MVENSELRKAGLKVTLPRVKILQMLDSAEQRHMSAEDVYKALMEASEDV
PSPTO_4508-pv.         -----------MVENSELRKAGLKVTLPRVKILQMLDSAEQRHMSAEDVYKALMEASEDV
Psyr_FUR-pv.           -----------MVENSELRKVGLKVTLPRVKILQMLDSAEQRHMSAEDVYKALMEASEDV
Psyr_4198-pv.          -----------MVENSELRKVGLKVTLPRVKILQMLDSAEQRHMSAEDVYKALMEASEDV
PFLCHA0_FUR            -----------MVENSELRKAGLKVTLPRVKILQMLDSTEQRHMSAEDVYKALMEAGEDV
PFL_FUR-Pf-5           -----------MVENSELRKAGLKVTLPRVKILQMLDSTEQRHMSAEDVYKALMEAGEDV
C119_                  -----------MVENSELRKAGLKVTLPRVKILQMLDSTEQRHMSAEDVYKALMEAGEDV
PFL_0824-Pf-5          -----------MVENSELRKAGLKVTLPRVKILQMLDSTEQRHMSAEDVYKALMEAGEDV
Pfl01_FUR-Pf0-1        -----------MVENSELRKAGLKVTLPRVKILQMLDSTEQRHMSAEDVYKALMEAGEDV
Pfl01_0760-Pf0-1       -----------MVENSELRKAGLKVTLPRVKILQMLDSTEQRHMSAEDVYKALMEAGEDV
                                  *   *********.*****************:*****************.***

PSEBR_FUR-subsp.       GLATVYRVLTQFEAAGLVVRHNFDGGHAVFELDDGKHHDHMVNVETSEVIEFFDEEIERL
PSF113_FUR-F113        GLATVYRVLTQFEAAGLVVRHNFDGGHAVFELDDGKHHDHMVNVETSEVIEFFDEEIERL
PputUW4_FUR-UW4        GLATVYRVLTQFEAAGLVVRHNFDGGHAVFELDDGKHHDHMVNVETSEVIEFFDEEIERL
PSEBR_a761-subsp.      GLATVYRVLTQFEAAGLVVRHNFDGGHAVFELDDGKHHDHMVNVETSEVIEFFDEEIERL
PSF113_0850-F113       GLATVYRVLTQFEAAGLVVRHNFDGGHAVFELDDGKHHDHMVNVETSEVIEFFDEEIERL
PputUW4_00687-UW4      GLATVYRVLTQFEAAGLVVRHNFDGGHAVFELDDGKHHDHMVNVETSEVIEFFDEEIERL
PSPTO_FUR-pv.          GLATVYRVLTQFEAAGLVVRHNFDGGHAVFELADGGHHDHMVNVESGEVIEFFDEEIEKL
PSPTO_4508-pv.         GLATVYRVLTQFEAAGLVVRHNFDGGHAVFELADGGHHDHMVNVESGEVIEFFDEEIEKL
Psyr_FUR-pv.           GLATVYRVLTQFESAGLVVRHNFDGGHAVFELADGGHHDHMVNVESGEVIEFFDEEIEKL
Psyr_4198-pv.          GLATVYRVLTQFESAGLVVRHNFDGGHAVFELADGGHHDHMVNVESGEVIEFFDEEIEKL
PFLCHA0_FUR            GLATVYRVLTQFEAAGLVVRHNFDGGHAVFELADGGHHDHMVNVESGEVIEFFDEEIEKL
PFL_FUR-Pf-5           GLATVYRVLTQFEAAGLVVRHNFDGGHAVFELADGGHHDHMVNVESGEVIEFFDEEIEKL
C119_                  GLATVYRVLTQFEAAGLVVRHNFDGGHAVFELADGGHHDHMVNVESGEVIEFFDEEIEKL
PFL_0824-Pf-5          GLATVYRVLTQFEAAGLVVRHNFDGGHAVFELADGGHHDHMVNVESGEVIEFFDEEIEKL
Pfl01_FUR-Pf0-1        GLATVYRVLTQFEAAGLVVRHNFDGGHAVFELADGGHHDHMVNVESGEVIEFFDEEIEKL
Pfl01_0760-Pf0-1       GLATVYRVLTQFEAAGLVVRHNFDGGHAVFELADGGHHDHMVNVESGEVIEFFDEEIEKL
                       *************:****************** ** *********:.***********:*

PSEBR_FUR-subsp.       QKAIVDKYGFEMVDHNLVLYVRKKK-
PSF113_FUR-F113        QKAIVDKYGFEMVDHNLVLYVRKKK-
PputUW4_FUR-UW4        QKAIVDKYGFEMVDHNLVLYVRKKK-
PSEBR_a761-subsp.      QKAIVDKYGFEMVDHNLVLYVRKKK-
PSF113_0850-F113       QKAIVDKYGFEMVDHNLVLYVRKKK-
PputUW4_00687-UW4      QKAIVDKYGFEMVDHNLVLYVRKKK-
PSPTO_FUR-pv.          QKAIVERHGFDLVDHNLVLYVRNKKA
PSPTO_4508-pv.         QKAIVERHGFDLVDHNLVLYVRNKKA
Psyr_FUR-pv.           QKAIVERHGFDLVDHNLVLYVRNKKA
Psyr_4198-pv.          QKAIVERHGFDLVDHNLVLYVRNKKA
PFLCHA0_FUR            QKAIVEKHGFELVDHNLVLYVRKKK-
PFL_FUR-Pf-5           QKAIVEKHGFELVDHNLVLYVRKKK-
C119_                  QKAIVEKHGFELVDHNLVLYVRKKK-
PFL_0824-Pf-5          QKAIVEKHGFELVDHNLVLYVRKKK-
Pfl01_FUR-Pf0-1        QKAIVEKHDYELVDHNLVLYVRKKK-
Pfl01_0760-Pf0-1       QKAIVEKHDYELVDHNLVLYVRKKK-
                       *****::: :::***********:**
```

2) Alineamiento de secuencias aminoacídicas de la proteína de respuesta reguladora GacA perteneciente al sistema de dos componentes de la cepa C119 y varias *Pseudomonas* fluorescentes (fuente pseudomonas.com) mediante el programa Clusta X.

```
H045_GacA-RE*1-1-14      MIRVLVVDDHDLVRTGITRMLADIDGLQVVGQAESGEESLIKARELKPDVVLMDVKMPGI
PflA506_GacA-A506        MIRVLVVDDHDLVRTGITRMLADIDGLQVVGQAESGEESLIKARELKPDVVLMDVKMPGI
PFLCHA0_GacA-CHA0        MIRVLVVDDHDLVRTGITRMLADIDGLQVVGQAESGEESLLKARELKPDVVLMDVKMPGI
PFL_GacA-Pf-5            MIRVLVVDDHDLVRTGITRMLADIDGLQVVGQAESGEESLLKARELKPDVVLMDVKMPGI
PSF113_GacA-F113         -------------------MLADIDGLQVVGQAESGEESLIKARELKPDVVLMDVKMPGI
PputUW4_GacA-UW4         MIRVLVVDDHDLVRTGITRMLADIDGLQVVGQAESGEESLLKARELKPDVVLMDVKMPGI
C119_GacA                -------------------MLADIDGLQVVGQAESGEESLIKARELKPDVVLMDVKMPGI
                                             **********************:******************

H045_GacA-RE*1-1-14      GGLGATTKLLRSHPDIKVVVVTVCEEDPFPTRLLQAGAAGYLTKGAGLAEMVQAIRLVFA
PflA506_GacA-A506        GGLGATTKLLRSHPDIKVVVVTVCEEDPFPTRLLQAGAAGYLTKGAGLAEMVQAIRLVFA
PFLCHA0_GacA-CHA0        GGLEATRKLLRSHPDIKVVAVTVCEEDPFPTRLLQAGAAGYLTKGAGLNEMVQAIRLVFA
PFL_GacA-Pf-5            GGLEATRKLLRSHPDIKVVAVTVCEEDPFPTRLLQAGAAGYLTKGAGLNEMVQAIRLVFA
PSF113_GacA-F113         GGLEATRKLLRSHPDIKVVAVTVCEEDPFPTRLLQAGAAGYLTKGAGLNEMVQAIRLVFA
PputUW4_GacA-UW4         GGLEATRKLLRSHPDIKVVAVTVCEEDPFPTRLLQAGAAGYLTKGAGLPEMVQAIRLVFA
C119_GacA                GGLEATRKLLRSHPDIKVVAVTVCEEDPFPTRLLQAGAAGYLTKGAGLPEMVQAIRLVFA
                         *** ** ************.*************************** ***********

H045_GacA-RE*1-1-14      GQRYISPQIAQQLAIKSFQPTSDSPFDALSEREIQIALMIVGCQKVQTISDKLCLSPKTV
PflA506_GacA-A506        GQRYISPQIAQQLAIKSFQPTSDSPFDALSEREIQIALMIVGCQKVQTISDKLCLSPKTV
PFLCHA0_GacA-CHA0        GQRYISPQIAQQLVFKSFQPSSDSPFDALSEREIQIALMIVGCQKVQIISDKLCLSPKTV
PFL_GacA-Pf-5            GQRYISPQIAQQLVFKSFQPSSDSPFDALSEREIQIALMIVGCQKVQIISDKLCLSPKTV
PSF113_GacA-F113         GQRYISPQIAQQLAIKSFQPTNDSPFDALSEREIQIALMIVGCQKVQIISDKLCLSPKTV
PputUW4_GacA-UW4         GQRYISPQIAQQLAIKSFQPTNDSPFDALSEREIQIALMIVGCQKVQIISDKLCLSPKTV
C119_GacA                GQRYISPQIAQQLAIKSFQPTNDSPFDALSEREIQIALMIVGCQKVQIISDKLCLSPKTV
                         *************.:*****:.************************ ************

H045_GacA-RE*1-1-14      NTYRYRIFEKLAISSDVELTLLAVRHGMVDASA
PflA506_GacA-A506        NTYRYRIFEKLAISSDVELTLLAVRHGMVDASA
PFLCHA0_GacA-CHA0        NTYRYRIFEKLSISSDVELTLLAVRHGMVDASL
PFL_GacA-Pf-5            NTYRYRIFEKLSISSDVELTLLAVRHGMVDASL
PSF113_GacA-F113         NTYRYRIFEKLSISSDVELTLLAVRHGMVDASA
PputUW4_GacA-UW4         NTYRYRIFEKLSISSDVELTLLAVRHGMVDASL
C119_GacA                NTYRYRIFEKLSISSDVELTLLAVRHGMVDASL
                         ***********:********************
```

3) Alineamiento de secuencias aminoacídicas de la proteína kinasa sensora GacS perteneciente al sistema de dos componentes de la cepa C119 y varias *Pseudomonas* fluorescentes (fuente pseudomonas.com) mediante el programa Clusta X.

```
C119_GacS              MQEKGVLKKLGIKGRVLLLTLLPTSLMALVLGGYFTWTQQSDLQAQLMQRGEMIAEQLAP
Pfl01_GacS-Pf0-1       MQEKGVLKKLGIKGRVLLLTLLPTSLMALVLGGYFTWTQQSDLQTQLMQRGEMIAEQLAP
PSF113_GacS-F113       -----MLKKLGIKGRVLLLTLLPTSLMALVLGGYFTWMQQSDLHAQLLQRGEMIAEQLAP
PputUW4_GacS-UW4       -----MLKKLGIKGRVLLLTLLPTSLMALVLGGYFTWMQQADLQTQLMQRGEMIAEQLAP
                            :******************************* **:**::**:************

C119_GacS              LVAPAMGHGDAELLERIATQSLEQPDVRAVTFLAPDRSPLAHAGPTMLNQAPSGDSAHLL
Pfl01_GacS-Pf0-1       LVAPAMGHGDAELLERIATQSLEQPDVRAVTFLAPDRSPLAHAGPTMLNQAPSGDSAHLL
PSF113_GacS-F113       LVAPAMSRQDTDLLERIATQSLEQADVRAVTFLAPDRLPLAHAGPTMLNRAPEGNSTQLL
PputUW4_GacS-UW4       LAAPAMGHQDNELLERIATQALEQTDVRAVTFLAPDRTLLAHAGPTMLNQVPSGSGMQML
                       *.****.: * :********:*** ************  **********:.*.*.. ::*

C119_GacS              RRSGNDATRYLLPVFGKHRNLAGELIPQESDRLLGWVELELSHNGMLLRGYRSLFASLLL
Pfl01_GacS-Pf0-1       RRSGNDATRYLLPVFGKHRNLAGELIPQESDRLLGWVELELSHNGMLLRGYRSLFASLLL
PSF113_GacS-F113       QRTGNDATRYLLPVFGKHRNLAGELIPEEADRLLGWVELELSHSGMLLRGYRSLFASLLL
PputUW4_GacS-UW4       RRSGNDATRYLLPVFGKHRNLAGDVISEEADRLLGWVELELSHNSMLLRGYRSLFASLML
                       :*:********************::* :*:*************..*************:*

C119_GacS              IGAGLAGAALLALRMGRTINRPLSQIKQAVAQLKDGHLETRLPPLGSQELDELASGINRM
Pfl01_GacS-Pf0-1       IGAGLAGAALLALRMGRTINRPLSQIKQAVAQLKDGHLETRLPPLGSQELDELASGINRM
PSF113_GacS-F113       IGAGLCLTALLALRMGRTINRPLSQIKQAVAQLKDGHLETRLPPLGSQELDELASGINRM
PputUW4_GacS-UW4       IAAGLTGAALLALRMGRTINRPLSQIKQAVAQLKDGHLETRLPPLGSQELDELASGINRM
                       *.***  :************************************************
```

```
C119_GacS             AGTLQNAREELQHSVDQATEDVRQNLETIEIQNIELDLARKEALEASRIKSEFLANMSHE
Pfl01_GacS-Pf0-1      AGTLQNAREELQHSVDQATEDVRQNLETIEIQNIELDLARKEALEASRIKSEFLANMSHE
PSF113_GacS-F113      ASTLQNAQEELQHSIDQATEDVRQNLETIEIQNIELDLARKEALEASRIKSEFLANMSHE
PputUW4_GacS-UW4      AGTLQNAQEELQHSIDQATEDVRQNLETIEIQNIELDLARKEALEASRIKSEFLANMSHE
                      *.*****:******:**********************************************

C119_GacS             IRTPLNGILGFTHLLQKSELTPRQLDYLGTIEKSADSLLGIINEILDFSKIEAGKLVLDH
Pfl01_GacS-Pf0-1      IRTPLNGILGFTHLLQKSELTPRQLDYLGTIEKSADSLLGIINEILDFSKIEAGKLVLDH
PSF113_GacS-F113      IRTPLNGILGFTHLLQKSELTPRQLDYLGTIEKSADSLLGIINEILDFSKIEAGKLVLDS
PputUW4_GacS-UW4      IRTPLNGILGFTHLLQKSELTPRQLDYLGTIEKSADSLLGIINEILDFSKIEAGKLVLDH
                      ************************************************************

C119_GacS             IPFNLRDLLQDTLTILAPAAHAKQLELVSLVYRDTPLSLVGDPLRLKQILTNLVSNAIKF
Pfl01_GacS-Pf0-1      IPFNLRDLLQDTLTILAPAAHAKQLELVSLVYRDTPLSLVGDPLRLKQILTNLVSNAIKF
PSF113_GacS-F113      IPFNLRDLLQDTLTILAPAAHAKQLELVSLVYRDTPLSLVGDPLRLKQILTNLVSNAIKF
PputUW4_GacS-UW4      IPFNLRDLLQDTLTILAPAAHAKQLELVSLVYRDTPLSLVGDPLRLKQILTNLVSNAIKF
                      ************************************************************

C119_GacS             TREGTIVARAMLEEENDDSVQLRISIQDTGIGLSNEDVRALFQAFSQADNSLSRQPGGTG
Pfl01_GacS-Pf0-1      TREGTIVARAMLEEENDDSVQLRISIQDTGIGLSNQDVRALFQAFSQADNSLSRQPGGTG
PSF113_GacS-F113      TREGTIVARAMLEDEHEDSVQLRISIQDTGIGLSNQDVRALFQAFSQADNSLSRQPGGTG
PputUW4_GacS-UW4      TREGTIVARAMLEEEHEDSVQLRISIQDTGIGLSNQDVRALFQAFSQADNSLSRQPGGTG
                      *************:*.:******************:************************

C119_GacS             LGLVISKRLIEQMGGEIGVDSTPGEGSEFWISLNLPKTRDDAEDLPCAPLLGRRVAVLEN
Pfl01_GacS-Pf0-1      LGLVISKRLIEQMGGEIGVDSTPGEGSEFWISLNLPKTRDDAEDLPAAPLLGRRVAVLEN
PSF113_GacS-F113      LGLVISKRLVEQMGGEIGVDSTPGEGSEFWISLRLPKTRDDAEDLPGPPLLGRRVAVLEN
PputUW4_GacS-UW4      LGLVISKRLIEQMGGEIGVDSTPGEGSEFWISLSLPKARDDAEDLPAAPLLGRRVAVLEN
                      *********:********************** ***:********  ************

C119_GacS             HELARQALQHQLEDCGLDVTPFNTLESLTNGVTGAHQTDQAIDLAVLGITSNDMPPERLN
Pfl01_GacS-Pf0-1      HELARQALQHQLEDCGLDVTPFNTLESLTNGVTGAHQTDQAIDLAVLGITSNDMPPERLN
PSF113_GacS-F113      HELARQALQHQLEDCGLQVTPFNTLESLTNGITIAHQTDQAIDLAVLGITSNDMPPERLN
PputUW4_GacS-UW4      HELARQALQHQLEDCGLSTTPFNTLESLTNGVTAAHQTDQAIDLAVLGITSNDMPPERLN
                      *****************..************:* *************************

C119_GacS             QHIWDLEHLGCRVLVLCPTTELTLYHLSVPNPHSQLQSKPACTRKLRRALSDMVNPRQPR
Pfl01_GacS-Pf0-1      QHIWDLEHLGCRVLVLCPTTELTLYHLSVPNPHSQLQSKPACTRKLRRALSDMVNPRQSR
PSF113_GacS-F113      QHIWDLEHLGCKVLVLCPTTEQTLYHLSVPNPHSQLQAKPACTRKLRRSLSDLVNPRPTR
PputUW4_GacS-UW4      QHIWDLEHLGCKVLVLCPTTEQTLFHLSVPNPHSQLQAKPACTRKLRRSLSDLVSPRPMR
                      ***********:********* **:************:**********:***:*.**  *

C119_GacS             SEPGEPLSSRAPKVLCVDDNPANLLLVQTLLEDMGAKVLAVESGYAAVKAVQNETFDLVL
Pfl01_GacS-Pf0-1      SEPGEPLSSRAPKVLCVDDNPANLLLVQTLLEDMGAKVLAVESGYAAVKAVQSESFDLVL
PSF113_GacS-F113      SEPHEPISSRAPKVLCVDDNPANLLLVQTLLEDMGAKVLAVESGYAAVKAVQKETFDLVL
PputUW4_GacS-UW4      SEPGEPVSSRAPKVLCVDDNPANLMLVQTLLEDMGAKVLAVESGYAAVKAVQNETFDLVL
                      *** **:*****************:***************************.*:*****

C119_GacS             MDVQMPGMDGRQSTETIRQWESERHCTPLPIVALTAHAMANEKRALLQSGMDDYLTKPIS
Pfl01_GacS-Pf0-1      MDVQMPGMDGRQSTETIRQWESERHCTPLPIVALTAHAMANEKRALLQSGMDDYLTKPIS
PSF113_GacS-F113      MDVQMPGMDGRQSTEAIRQWESERHCTPLPIVALTAHAMANEKRALLQSGMDDYLTKPIS
PputUW4_GacS-UW4      MDVQMPGMDGRQSTEAIRQWESERHCTPLPIVALTAHAMANEKRALLQSGMDDYLTKPIS
                      ***************:********************************************

C119_GacS             ERQLAQVVLKWTGLALRNQAPDRGGESVLGNQELPILDHEEGLRLAAGKADLAADMLAML
Pfl01_GacS-Pf0-1      ERQLAQVVLKWTGLALRNQAPDRGGESLLGNQELPILDHEEGLRLAAGKADLAADMLAML
PSF113_GacS-F113      ERQLAQVVLKWTGLALRNQSPERSGDTPGGS-ELLVLDHEEGLRLAAGKADLAADMLAML
PputUW4_GacS-UW4      ERQLAQVVLKWSGLALRNHSPERSGDGHGGAHDLLVLDHEEGLRLAAGKADLAADMLAML
                      ***********:******::*:*.*:   *  :* :************************

C119_GacS             LASLEADREAIRTARDSQDQNSLLERVHRLHGATRYCGVPQLRAACQRSETLLKQQDPKA
Pfl01_GacS-Pf0-1      LASLEADREAIRTARDHQDQNALLERVHRLHGATRYCGVPQLRAACQRSETLLKQDDPKA
PSF113_GacS-F113      LASLEADREAIRQASEANDHNALIERVHRLHGATRYCGVPQLRAACQRSETLLKQQDPKA
PputUW4_GacS-UW4      LASLEADREAIRLAQQSDDHNALIERVHRLHGATRYCGVPQLRAACQRSETLLKQQDPKA
                      ************ * : :*:*:*:*********************************:****

C119_GacS             STALDELERAINRLAAQAKISA
Pfl01_GacS-Pf0-1      SAALDELERAINRLAAQAKISA
PSF113_GacS-F113      AVALEELERAINRLASEARISA
PputUW4_GacS-UW4      SVALDELDRAINRLAAHARMNA
                      :.**:**:*******:.*::.*
```

4) Alineamiento de secuencias aminoacídicas del precursor de la proteína TolC (predicho a partir de la secuencia del gen) presente en la cepa C119 y varias *Pseudomonas* fluorescentes (fuente pseudomonas.com) mediante el programa Clusta X.

```
PFLCHA0_TolC-CHA0       MLRKLSLAVAVSCASNGMAWAAEAPLTTKTDLVSVYQEAVDNNADLAAARAQYGAQKEVV
PFL_TolC-Pf-5           MLRKLSLAVAVSCASNGMAWAAEAPLTTKTDLVSVYQEAVDNNADLAAARAQYGAQKEVV
PflA506_TolC-A506       MLRKLSLAVAVSCATNGLVWAAEAPLSANTDLVSVYQEAAHNNADLAAARAQYGAQKEVV
Pfl01_TolC-Pf0-1        MLRKLSLAVAVSCASTTTVWAAEAPLSTKTDLVSVYQEAVDNNADLAAARAQYGAQKEVV
C119_TolC               MLRKLSLAVAVSCASTATAWAAEAPLSTRTDLVSVYQEAVDNNADLAAARAQYGAQKEVV
                        **************:.  .*******::.**********..******************

PFLCHA0_TolC-CHA0       PQARAGLLPNLSAGADMNNTRTKFDEPSMTSTRSGNVYQATLAQPLFRADRWFQLQAAKD
PFL_TolC-Pf-5           PQARAGLLPNLSAGADMNNTRTKFDEPSMTSTRSGNVYQATLAQPLFRADRWFQLQAAKD
PflA506_TolC-A506       PQARAGLLPNLSAGADSNNVRTQIDQPAATANRDAHSWRATLSQPLFRADRWFQLQAAQA
Pfl01_TolC-Pf0-1        PQARAGLLPNLSGGAEVANVRTSIDQPSAIANRSAHSYQATLAQPLFRADRWFQYQAAKD
C119_TolC               PQARAGLLPNLSGGAEVANVRTSIDQPSAIANRSAHSYQATLAQPLFRADRWFQYQAAKD
                        ************.**:  *.**.:*:*:  :.*... ::***:*********** ***:

PFLCHA0_TolC-CHA0       INEQASLQLSATEQNLILQSAENYFAVLRAQDNLASTKAEEAAFKRQLDQSNERFDVGLS
PFL_TolC-Pf-5           INEQASLQLSATEQNLILQSAENYFAVLRAQDNLASTKAEEAAFKRQLDQSNERFDVGLS
PflA506_TolC-A506       VNEQASLQLSASEQNLILQSAESYFAVLRAQDNLASTKAEENAFKRQLDQSNERFDVGLS
Pfl01_TolC-Pf0-1        VNEQAALQLSATEQNLILQTAESYFNVLRSQDNLASTKAEEAAFKRQLDQSNERFDVGLS
C119_TolC               VNEQAALQLSATEQNLILQTAESYFNVLRSQDNLASTKAEEAAFKRQLDQSNERFDVGLS
                        :****:*****:*******:**.** ***:*********** ******************

PFLCHA0_TolC-CHA0       DKTDVLQSQASYDTARANRILAQRQVDDAFEALITLTNREYNSIQGIVHTLPVLAPTPND
PFL_TolC-Pf-5           DKTDVLQSQASYDTARANRILAQRQVDDAFEALITLTNREYNSIQGIVHTLPVLAPTPND
PflA506_TolC-A506       DKTDVLQSQASYDTARANRILAQRQVDDAFEALITLTNRQYNSIQGIVHTLPVLPPAPND
Pfl01_TolC-Pf0-1        DKTDVLQSQASYDTARANRIVAQRQVDDAFEALITLTNRQYNSIQGIVHTLPILPPAPND
C119_TolC               DKTDVLQSQASYDTARANRIVAQRQVDDAFEALITLTNRQYNSIQGIVHTLPILPPAPND
                        ********************:******************:************:* *:***

PFLCHA0_TolC-CHA0       AKAWVDTAAKQNLNLLASNYAVSAAEETLKQRKAGHAPTLDAVAQYKKGDNDALGFSNPN
PFL_TolC-Pf-5           AKAWVDTAAKQNLNLLASNYAVSAAEETLKQRKAGHAPTLDAVAQYKKGDNDALGFSNPN
PflA506_TolC-A506       AKAWVETAGRQNLNLLASNYAVTAAEETLRQRKAGHLPTLDAVAQYEKGDNDALGFSNPN
Pfl01_TolC-Pf0-1        AKAWVDTAAKQNLNLLASNYAVSSAEQTLKQRKAGHLPTLDAVAKYEKGDNDALGFSNPN
C119_TolC               AKAWVDTAAKQNLNLLASNYAVSSAEQTLKQRKAGHLPTLDAVAKYEKGDNDALGFSNPN
                        *****:**.:************::**:**:****** *******:*:**************

PFLCHA0_TolC-CHA0       PL-TRYGSDVEQRSIGLQLNIPIYSGGLTSSQVRESYSRLSQTEQQRESLRRQVVENTRN
PFL_TolC-Pf-5           PL-TRYGSDVEQRSIGLQLNIPIYSGGLTSSQVRESYSRLSQTEQQRESLRRQVVENTRN
PflA506_TolC-A506       QLPIPYGGDVSQRTVGLRLNIPIYSGGLTSSQVRESYSRLDQTEQQREGLRRQVVENTRN
Pfl01_TolC-Pf0-1        AFGTPYSGNVEQSTVGLQLNIPIYSGGLTSSQVRESYSRLDQTEQQREGLRRQVVENTRN
C119_TolC               AFGTPYSGNVEQSTVGLQLNIPIYSGGLTSSQVRESYSRLDQTEQQREGLRRQVVENTRN
                         :   *..:*.* ::**:**********************.*******.***********

PFLCHA0_TolC-CHA0       LHRAVNTDVEQVQARRQSIISNQSAVEATEIGYQVGTRNIVDVLDAQRQLYTSVRNYNNS
PFL_TolC-Pf-5           LHRAVNTDVEQVQARRQSIISNQSAVEATEIGYQVGTRNIVDVLDAQRQLYTSVRNYNNS
PflA506_TolC-A506       LHRAVNTDVEQVQARRQSIISNQSAVEATEIGYQVGTRNIVDVLDSQRQLYASVRNYNNS
Pfl01_TolC-Pf0-1        LHRAVNTDVEQVQARRQSIISNQSAVEATEIGYQVGTRNIVDVLDAQRQLYTSVRNYNNT
C119_TolC               LHRAVNTDVEQVQARRQSIISNQSAVEATEIGYQVGTRNIVDVLDAQRQLYTSVRNYNNT
                        ********************************************:*****:*******:

PFLCHA0_TolC-CHA0       RYDYILDNLRLKQAAGTLNPGDLQDLSRYLKADYNPDRDFLPPDLAKAAQEQLRARP--
PFL_TolC-Pf-5           RYDYILDNLRLKQAAGTLNPGDLQDLSRYLKADYNPDRDFLPPDLAKAAQEQLRARP--
PflA506_TolC-A506       RYDYILDNLRLKQAAGTLNPGDLQDLARYLKADYNPDKDFLPPDLAKAAAEQLKARPGY
Pfl01_TolC-Pf0-1        RYDYILDNLRLKQAAGTLNPGDLQDLTRYLKADYNPDKDFLPPDLAKAAEAQLKARP--
C119_TolC               RYDYILDNLRLKQAAGTLNPGDLQDLTRYLKADYNPDKDFLPPDLAKAAEAQLKARP--
                        *************************:**********:***********  **:***
```

5) Alineamiento de secuencias aminoacídicas de la proteína ANR perteneciente a la familia de reguladores de fumarato y nitrato reductasas (predicho a partir de la secuencia del gen) presente en la cepa C119 y varias *Pseudomonas* fluorescentes (fuente pseudomonas.com) mediante el programa Clusta X.

```
PFLCHA0_ANR-CHA0        MSEPVKLRAHNQAHCKDCSLAPLCLPLSLNLEDMDALDEIVKRGRPLKKGEFLFRQGDGF
PFL_ANR-Pf-5            MSEPVKLRAHNQAHCKDCSLAPLCLPLSLNLEDMDALDEIVKRGRPLKKGEFLFRQGDGF
Pfl01_Crp/FNR-Pf0-1     MSEPVKLRAHNQANCKDCSLAPLCLPLSLNLEDMDALDEIVKRGRPLKKGEFLFRQGDTF
C119_FNR                MSEPVKLRAHNQANCKDCSLAPLCLPLSLNLEDMDALDEIVKRGRPLKKGEFLFRQGDTF
PputUW4_Crp/FNR-UW4     MSEPVKQRAHNQAHCKDCSLAPLCLPLSLNLEDMDALDEIVKRGRPLKKGEFLFRQGDTF
                        ****** ******.****************************************** *

PFLCHA0_ANR-CHA0        DSVYAVRSGALKTFSLSDSGEEQITGFHLPSELVGLSGMDTESHPVSAQALETTSVCEIP
PFL_ANR-Pf-5            DSVYAVRSGALKTFSLSDSGEEQITGFHLPSELVGLSGMDTESHPVSAQALETTSVCEIP
Pfl01_Crp/FNR-Pf0-1     DSVYAVRSGALKTFSLSDTGEEQLTGFHLPSELVGLSGMDTEKHPVSAQALETTSVCEIP
C119_FNR                DSVYAVRSGALKTFSLSDTGEEQLTGFHLPSELVGLSGMDTEKHPVSAQALETTSVCEIP
PputUW4_Crp/FNR-UW4     DSVYAVRSGALKTFSLSDSGEEQLTGFHLPSELVGLSGMDTEKHPVSAQALETTSVCEIP
                        ******************:****:******************.*****************

PFLCHA0_ANR-CHA0        FERLDELALQLPQLRRQLMRVMSREIRDDQQMMLLLSKKTADERIATFLVNLSARFRARG
PFL_ANR-Pf-5            FERLDELALQLPQLRRQLMRVMSREIRDDQQMMLLLSKKTADERIATFLVNLSARFRARG
Pfl01_Crp/FNR-Pf0-1     FERLDELALQLPQLRRQLMRVMSREIRDDQQMMLLLSKKTADERIATFLVNLSARFRARG
C119_FNR                FERLDELALQLPQLRRQLMRVMSREIRDDQQMMLLLSKKTADERIATFLVNLSARFRARG
PputUW4_Crp/FNR-UW4     FERLDELALQLPQLRRQLMRVMSREIRDDQQMMLLLSKKTADERIATFLVNLSARFRARG
                        ************************************************************

PFLCHA0_ANR-CHA0        FSANQFRLSMSRNEIGNYLGLAVETVSRVFTRFQQNELIAAEGKEVHILDPIQLCALAGG
PFL_ANR-Pf-5            FSANQFRLSMSRNEIGNYLGLAVETVSRVFTRFQQNELIAAEGKEVHILDPIQLCALAGG
Pfl01_Crp/FNR-Pf0-1     FSANQFRLSMSRNEIGNYLGLAVETVSRVFTRFQQNELIAAEGKEIHILDPIQLCALAGG
C119_FNR                FSANQFRLSMSRNEIGNYLGLAVETVSRVFTRFQQNELIAAEGKEIHILDPIQLCALAGG
PputUW4_Crp/FNR-UW4     FSANQFRLSMSRNEIGNYLGLAVETVSRVFTRFQQNELIAAEGKEIRIIDPIQLCALAGG
                        ********************************************::*:***********

PFLCHA0_ANR-CHA0        SVEG
PFL_ANR-Pf-5            SVEG
Pfl01_Crp/FNR-Pf0-1     SLEV
C119_FNR                SLEV
PputUW4_Crp/FNR-UW4     SLEG
                        *:*
```