

Diversidad de genes bacterianos relacionados con mecanismos de biocontrol en la rizosfera

Elena Zafón Chuliá

Máster en Bioinformática y Bioestadística
Microbiología, biotecnología y biología molecular

Paloma Pizarro Tobías

David Merino Arranz

25/06/18



Esta obra está sujeta a una licencia de Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada [3.0 España de Creative Commons](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/es/)

B) GNU Free Documentation License (GNU FDL)

Copyright © 2018 ELENA ZAFÓN CHULIÁ.

Permission is granted to copy, distribute and/or modify this document under the terms of the GNU Free Documentation License, Version 1.3 or any later version published by the Free Software Foundation; with no Invariant Sections, no Front-Cover Texts, and no Back-Cover Texts.

A copy of the license is included in the section entitled "GNU Free Documentation License".

C) Copyright

© Elena Zafón Chuliá

Reservados todos los derechos. Está prohibido la reproducción total o parcial de esta obra por cualquier medio o procedimiento, comprendidos la impresión, la reprografía, el microfilme, el tratamiento informático o cualquier otro sistema, así como la distribución de ejemplares mediante alquiler y préstamo, sin la autorización escrita del autor o de los límites que autorice la Ley de Propiedad Intelectual.

FICHA DEL TRABAJO FINAL

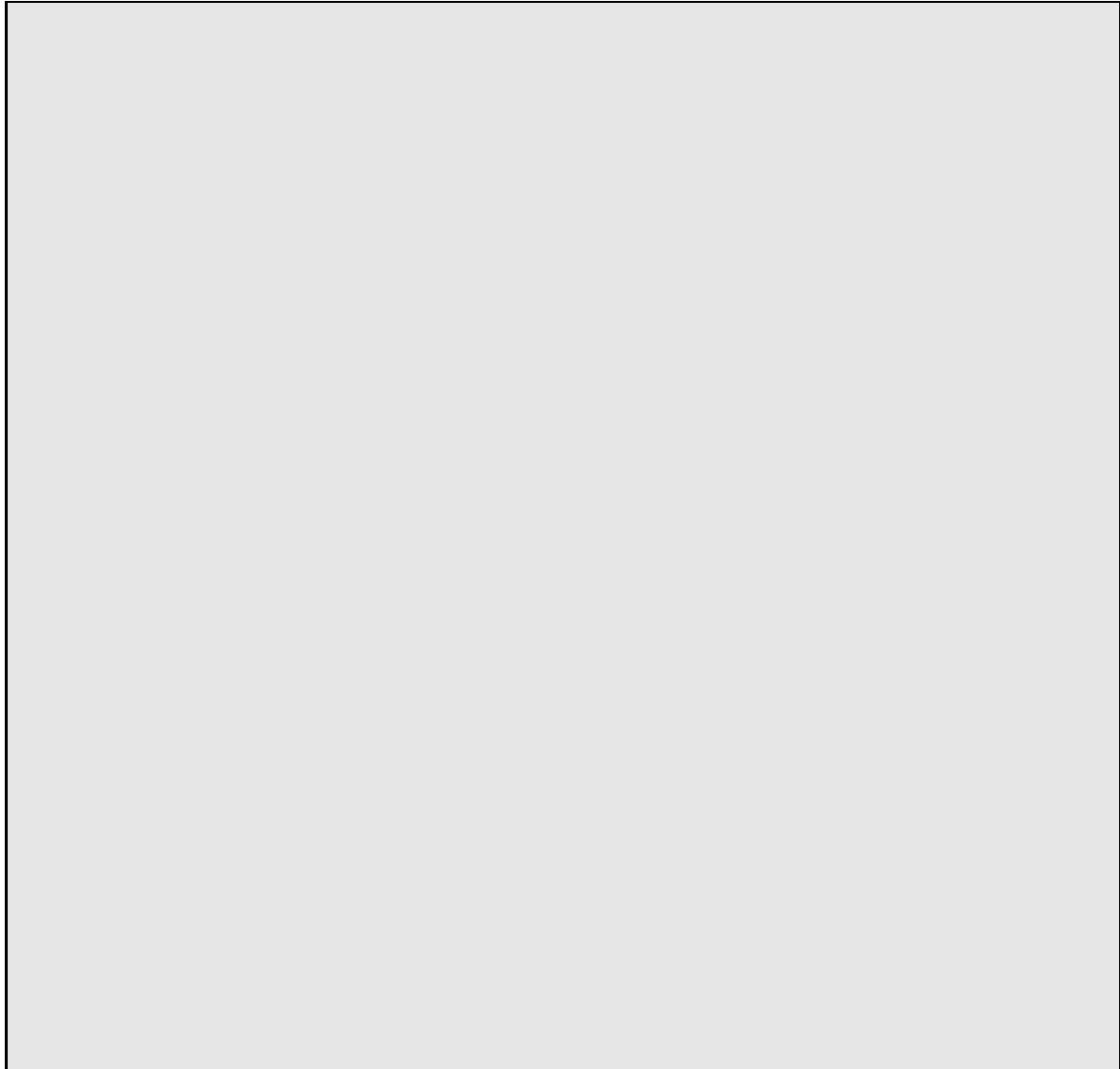
Título del trabajo:	Diversidad de genes bacterianos relacionados con mecanismos de biocontrol en la rizosfera
Nombre del autor:	<i>Elena Zafón Chuliá</i>
Nombre del consultor/a:	<i>Paloma Pizarro Tobías</i>
Nombre del PRA:	
Fecha de entrega (mm/aaaa):	06/2018
Titulación::	<i>Máster en Bioinformática y Bioestadística</i>
Área del Trabajo Final:	<i>TFM-Estadística i Bioinformàtica 33 aula 1</i>
Idioma del trabajo:	<i>Español</i>
Palabras clave	<i>Biocontrol, fitopatógenos, análisis filogenético</i>

Resumen del Trabajo (máximo 250 palabras): *Con la finalidad, contexto de aplicación, metodología, resultados i conclusiones del trabajo.*

En la zona de la rizosfera podemos aislar un gran número de microorganismos que mantienen diferentes relaciones con las plantas que colonizan. Éstos pueden actuar como patógenos, como agentes promotores del crecimiento vegetativo e, incluso, como agentes de biocontrol. El TFM se va a centrar en rizobacterias que son capaces de controlar e interferir en la colonización de la planta por medio de diferentes mecanismos, con el fin de ganar acceso a los recursos y al espacio. Algunas de las armas moleculares que utilizan para ello son, por ejemplo, antibióticos, sideróforos, bacteriocinas, enzimas, componentes orgánicos volátiles, formación de biofilms, etc. En este trabajo, se van a seleccionar genes representativos de cada modo de acción, así como géneros bacterianos representativos de los descritos como agentes de biocontrol contra fitopatógenos, con el objetivo de realizar un análisis de secuencias comparadas y un análisis filogenético. Con esto se pretende caracterizar este comportamiento, así como las relaciones filogenéticas entre estas bacterias para conseguir obtener agentes de biocontrol que sustituyan a los contaminantes pesticidas y plaguicidas que se usan en la actualidad, hallando así soluciones eco-friendly y favoreciendo la agricultura sostenible. Como resultados, se obtuvieron dos genes, el gen de las chitinasas y el de ACC desaminasa, que son posibles candidatos y presentan potencial para caracterizar a las bacterias descritas como agentes de biocontrol contra fitopatógenos.

Abstract (in English, 250 words or less):

In the area of the rhizosphere we can isolate a large number of microorganisms that maintain different relationships with the plants they colonize. These can act as pathogens, as agents that promote vegetative growth and, even, as biocontrol agents. The TFM will focus on rhizobacteria that are able to control and interfere with the colonization of the plant through different mechanisms, in order to gain access to resources and space. Some of the molecular weapons used for this are, for example, antibiotics, siderophores, bacteriocins, enzymes, volatile organic compounds, formation of biofilms, etc. In this work, we will select representative genes of each mode of action, as well as representative bacterial genera of those described as biocontrol agents against phytopathogens, in order to perform a comparative sequence analysis and a phylogenetic analysis. This is intended to characterize this behavior, as well as the phylogenetic relationships between these bacteria in order to obtain biocontrol agents that replace the pesticide and pesticide contaminants that are currently used, thus finding eco-friendly solutions and favoring sustainable agriculture. As results, two genes were obtained, the chitinase gene and the ACC deaminase gene, which are potential candidates to characterize the bacteria described as biocontrol agents against phytopathogens.



Índice

1. Introducción.....	1-2
1.1 Contexto y justificación del Trabajo.....	2
1.2 Objetivos del Trabajo.....	2
1.3 Enfoque y método seguido.....	2-3
1.4 Planificación del Trabajo.....	3-5
1.5 Breve resumen de productos obtenidos.....	5
1.6 Breve descripción de los otros capítulos de la memoria.....	5-6
2. Material y Métodos.....	7-37
2.1 Caracterización de las bacterias descritas como agentes de biocontrol.....	7-11
2.1.1 Propiedades y Mecanismos de acción.....	12-18
2.1.2 Genes implicados.....	18-22
2.2 Análisis comparado de las secuencias seleccionadas entre bacterias.....	22-32
2.3 Análisis filogenético.....	32-37
3. Discusión y Resultados.....	37-39
4. Conclusiones.....	39-40
5. Glosario.....	41
6. Bibliografía.....	42-47
7. Anexos.....	48-55

Lista de figuras

- Figura 1.** Representación esquemática de la vía de biosíntesis de fenazina.
- Figura 2.** Alineamiento local y global.
- Figura 3.** CLUSTAL de *Pseudomonas* vs. *Bacillus megaterium*
- Figura 4.** BLAST phz frente a *Serratia*.
- Figura 5.** Matriz de identidad *Serratia* vs. *Bacillus*.
- Figura 6.** MView de identidad *Serratia* vs. *Bacillus*.
- Figura 7.** CLUSTAL de *Serratia* vs. *Stenotrophomonas*.
- Figura 8.** Matriz de identidad *Mesorhizobium* vs. resto de géneros.
- Figura 9.** BLAST de *Mesorhizobium* vs. *Serratia*.
- Figura 10.** CLUSTAL de *Pseudomonas putida* sobre *Legionella pneumophila*.
- Figura 11.** BLAST de *Legionella* frente a *Serratia*.
- Figura 12.** BLAST de *Legionella* frente a *Stenotrophomonas*.
- Figura 13.** Relaciones evolutivas de las secuencias para el gen de la fenazina seleccionado dentro del cluster (phzF). La historia evolutiva se infirió utilizando el método de Neighbor Joining. Se muestra el árbol óptimo con la suma de la longitud de la rama = 53,60741030. El porcentaje de árboles replicados en el que los taxones asociados se agruparon en la prueba de bootstrap (500 réplicas) se muestran junto a las ramas. El árbol está dibujado a escala, con longitudes de rama en las mismas unidades que las distancias evolutivas utilizadas para inferir el árbol filogenético. Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de máxima verosimilitud compuesta y están en las unidades del número de sustituciones de bases por sitio. El análisis involucró 5 secuencias de nucleótidos. Se eliminaron todas las posiciones que contenían gaps y datos faltantes. Hubo un total de 251 posiciones en el conjunto de datos final. El análisis evolutivo se realizó con MEGA7.
- Figura 14.** Relaciones evolutivas de las secuencias para el gen de la chitinasa seleccionado (chiA). La historia evolutiva se infirió utilizando el método de Neighbor Joining. Se muestra el árbol óptimo con la suma de la longitud de la rama = 2,17859380. El porcentaje de árboles replicados en el que los taxones asociados se agruparon en la prueba de bootstrap (500 réplicas) se muestran junto a las ramas. El árbol está dibujado a escala, con longitudes de rama (al lado de las ramas) en las mismas unidades que las distancias evolutivas utilizadas para inferir el árbol filogenético. Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de máxima verosimilitud compuesta y están en las unidades del número de sustituciones de bases por sitio. El análisis involucró 6 secuencias de nucleótidos. Se eliminaron todas las posiciones que contenían gaps y datos faltantes. Hubo un total de 851 posiciones en el conjunto de datos final. El análisis evolutivo se realizó con MEGA7.
- Figura 15.** Relaciones evolutivas de las secuencias para el gen de la acc deaminasa seleccionado (acdS). La historia evolutiva se infirió utilizando el método de Neighbor Joining. El porcentaje de árboles replicados en el que los taxones asociados se agruparon en la prueba de bootstrap (500 réplicas) se muestran junto a las ramas. Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de máxima verosimilitud compuesta y están en las unidades del número de sustituciones de bases por sitio. El análisis involucró 5 secuencias de nucleótidos. Se eliminaron todas las posiciones que contenían gaps y datos faltantes. Hubo un total de 637 posiciones en el conjunto de datos final. El análisis evolutivo se realizó con MEGA7.
- Figura 16.** Relaciones evolutivas de las secuencias para el gen fur seleccionado. La historia evolutiva se infirió utilizando el método de Neighbor Joining. Se emplea el árbol de consenso

bootstrap con 500 réplicas para representar la historia evolutiva de los taxones analizados. El porcentaje de árboles replicados en el que los taxones asociados se agruparon en la prueba de bootstrap (500 réplicas) se muestran junto a las ramas. Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de corrección de Poisson y están en las unidades del número de sustituciones de aminoácidos por sitio. El análisis involucró 6 secuencias de aminoácidos. Se eliminaron todas las posiciones que contenían gaps y datos faltantes. Hubo un total de 74 posiciones en el conjunto de datos final. El análisis evolutivo se realizó con MEGA7.

Lista de tablas

Tabla 1. Supresores de enfermedades de cultivos agrícolas causados por otras bacterias y hongos.

Tabla 2. Genes seleccionados.

1. Introducción

En la zona de la rizosfera podemos aislar un gran número de microorganismos que mantienen diferentes relaciones con las plantas que colonizan. Éstos pueden actuar como patógenos, como agentes promotores del crecimiento vegetativo e, incluso, como agentes de biocontrol. El TFM se va a centrar en rizobacterias que son capaces de controlar e interferir en la colonización de la planta por otros microorganismos patógenos mediante dos tipos de competición, la competición por los recursos del medio y la competición de interferencia. En este segundo tipo de competición, unos microorganismos inhiben activamente a otros, por medio de diferentes mecanismos, con el fin de ganar acceso a los recursos y al espacio [1]. Algunas de las armas moleculares que utilizan para ello son, por ejemplo, antibióticos, sideróforos, bacteriocinas, enzimas, componentes orgánicos volátiles, formación de biofilms, etc.

El desarrollo de microorganismos como agentes de biocontrol contra fitopatógenos es muy importante y puede tener gran impacto en la sociedad, debido a que su uso podría disminuir la dependencia global de los peligrosos químicos agrícolas que desestabilizan los agroecosistemas [2]. Lo mismo sucede con los fungicidas y los pesticidas y otras prácticas agrícolas como la rotación de cultivos, el acondicionamiento con productos orgánicos, los fertilizantes químicos y la mejora genética de cultivos resistentes. Todos estos tratamientos están relacionados con la creciente preocupación por el efecto de estos químicos sobre el medioambiente y sobre nuestra salud y la del resto de seres vivos. Además, el uso generalizado de los pesticidas, ha permitido que se desarrollaran nuevas cepas patógenas resistentes. De este modo, todos estos factores resaltan la necesidad de nuevas alternativas eco-friendly para el desarrollo de una agricultura sostenible.

A pesar del gran potencial que tiene el empleo de microorganismos como agentes de biocontrol, hay algunos problemas que impiden que se expanda su uso. Por ejemplo, aunque varios microorganismos controlan eficientemente al patógeno diana bajo condiciones de invernadero o in vitro, la mayoría fracasan en condiciones de campo. Esto se atribuye a una insuficiente habilidad para sobrevivir y colonizar la rizosfera o de expresar sus características protectoras en condiciones de campo en el momento y lugar adecuados [3]. Por lo que debe recurrirse a la aplicación de comunidades sintéticas compuestas de diferentes microorganismos con diferentes modos de acción como alternativa para mejorar el

Por otro lado, también hay una cuestión de costes y de medidas legislativas, ya que es muy difícil a este nivel introducir un microorganismo en el medioambiente - la UE no permite la liberación al medio de microorganismos modificados genéticamente, aunque otros países fuera de la UE, sí - y su coste no es asumible para muchas compañías. Además, deben realizarse evaluaciones acerca de si los microorganismos introducidos tienen efectos nocivos sobre la salud humana o sobre organismos no diana, así como valorar su posible impacto sobre el medioambiente.

Por lo tanto, en este trabajo se van a caracterizar aquellas bacterias que son capaces de actuar como agentes de biocontrol, basándonos en las más representativas según bibliografía. También se van a identificar los genes que presentan en común, así como su relación filogenética mediante diferentes bases de datos, herramientas de genómica comparada y el lenguaje bioestadístico R. Con esto, se pretende sumar más información y más datos concretos sobre este tema. La caracterización de estos genes puede contribuir a su posterior uso como secuencias de inserción para desarrollar bacterias recombinantes efectivas contra

fitopatógenos y entender mejor la filogenia de este colectivo de bacterias. También puede ser fundamental para conseguir aplicar su uso en la industria biotecnológica como alternativa a los agroquímicos contaminantes que actualmente se utilizan. No obstante, esto debe ir de la mano de un cambio en la legislación de estos productos para que pueda ser empleado en el territorio europeo.

1.1 Contexto y justificación del Trabajo

1.1.1 Descripción general

El TFM consiste en la selección y clasificación filogenética de los genes bacterianos que están involucrados en mecanismos de biocontrol contra fitopatógenos. Tras realizar una revisión bibliográfica de las bacterias que presenten estas características, se procederá a la búsqueda de las secuencias de dichos genes en las diferentes bases de datos y a su posterior análisis filogenético mediante el lenguaje estadístico R.

1.1.2 Justificación del TFG

El desarrollo de microorganismos como agentes de biocontrol contra fitopatógenos es muy importante y puede tener gran impacto en la sociedad, debido a que su uso podría disminuir la dependencia global de los peligrosos químicos agrícolas que desestabilizan los agroecosistemas y que pueden ser perjudiciales para el resto de seres vivos. Por lo tanto, se ha elegido esta área por su repercusión positiva en el campo de la ecología y porque se trataría de una oportunidad para resaltar las aplicaciones de la biotecnología, disciplina muy controvertida en otros ámbitos profesionales.

1.2 Objetivos del Trabajo

1.2.1 Objetivos generales:

1. Realizar un estudio de las bacterias descritas como agentes de biocontrol, sus propiedades asociadas a dichos efectos y los genes descritos como implicados en estos procesos.
2. Establecer la relación filogenética entre dichas cepas y la distribución de los genes seleccionados en las mismas.

1.2.2. Objetivos específicos:

1. Caracterizar las propiedades y los mecanismos de acción de las bacterias descritas como agentes de biocontrol.
2. Describir los genes responsables de dichas propiedades y mecanismos de acción.
3. Localizar la secuencia de los genes en las diferentes bases de datos.
4. Localizar la posición en el genoma de los genes seleccionados.
5. Establecer la relación filogenética entre los genes seleccionados.

1.3 Enfoque y método seguido

En primer lugar, se realizará una revisión bibliográfica para conocer cuáles son las bacterias que se han descrito como agentes de biocontrol y cuáles son las propiedades y mecanismos que les permiten ejercer su acción contra fitopatógenos. Posteriormente, se caracterizarán los genes implicados en dichos mecanismos y se realizará un análisis filogenético.

El análisis filogenético se puede llevar a cabo mediante diferentes estrategias. Por ejemplo, podría utilizarse el software MrBayes [4], un programa de inferencia Bayesiana que emplea el método Monte Carlo para estimar la posterior distribución de los parámetros del modelo. Otra opción para analizar las relaciones filogenéticas es mediante el software MEGA [5] desarrollado para realizar análisis comparativos de ADN y secuencias de proteínas que permite construir árboles evolutivos moleculares escalados en el tiempo.

En cambio, en este caso, el análisis filogenético se va a realizar con el lenguaje bioestadístico R. Actualmente, el software R dispone de más de 20 paquetes dedicados a la filogenética, por lo que promete tener un gran potencial para realizar dichos análisis. Hasta la fecha, no se ha encontrado mucha bibliografía en la que se haya escogido este lenguaje de programación para los estudios filogenéticos, por lo que vamos a tratar de obtener el máximo rendimiento de los paquetes y poner a prueba este método de análisis para poder compararlo con otros softwares como los anteriormente citados. Además, se ha optado por esta estrategia, ya que se trata de un lenguaje de programación de código abierto, en el que también se podrán realizar los estudios bioestadísticos posteriores, si se precisan.

Por lo tanto, se va a poner a prueba el lenguaje de programación R para realizar el estudio filogenético frente a MEGA o MrBayes, los cuales están muy extendidos como software de elección para este tipo de análisis, debido a su fácil e intuitivo uso.

1.4 Planificación del Trabajo

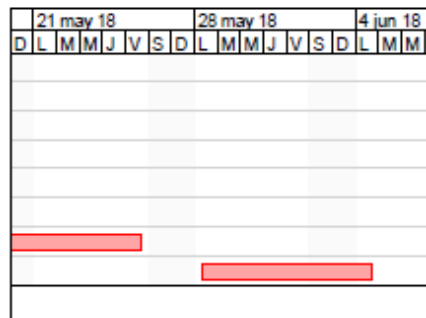
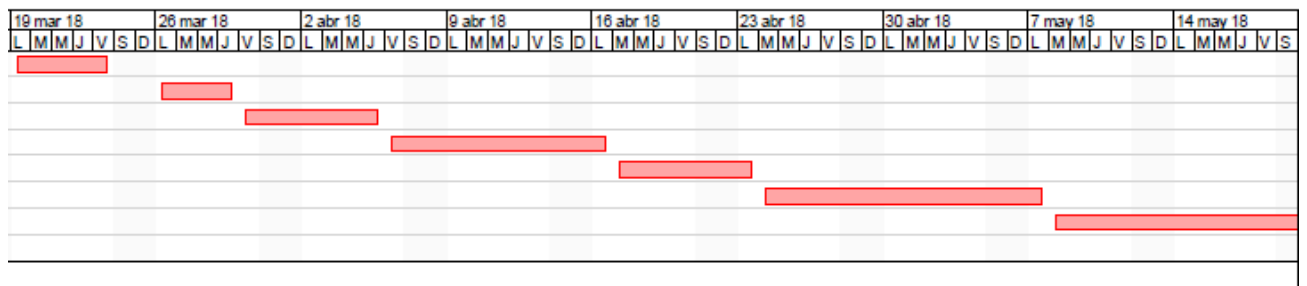
1.4.1. Tareas

1. Búsqueda y selección de bacterias descritas como agentes de biocontrol en la bibliografía.
2. Caracterización de sus propiedades.
3. Determinación y descripción de los mecanismos de acción que les permiten actuar como agentes de biocontrol.
4. Asociación de gen o genes a dichos mecanismos de acción y propiedades de interés.
5. Búsqueda de los genes seleccionados en bases de datos y obtención de las secuencias.
6. Análisis comparativo de las secuencias o genes seleccionados entre las bacterias seleccionadas.
7. Análisis filogenético con R entre dichas bacterias y la distribución de los genes seleccionados en las mismas.
 - 7.1. Búsqueda de paquetes para análisis filogenético.
 - 7.2. Revisión bibliográfica y aprendizaje sobre el uso de los paquetes seleccionados.
 - 7.3. Replanteamiento del enfoque del análisis filogenético en función de los datos generados en las tareas anteriores.
 - 7.4. Realización del análisis.
8. Análisis bioestadístico con R si se requiere.
 - 8.1. Visualización de los resultados obtenidos y discusión.
 - 8.2. Estudiar posibles análisis bioestadísticos en base a los resultados obtenidos.
 - 8.3. Realización de los análisis si proceden.

1.4.2. Calendario

El programa de planificación empleado es Project Libre.

	🕒	Nombre	Duración	Inicio	Terminado
1	🕒	Tarea 1	5 days	19/03/18 8:00	23/03/18 17:00
2	🕒	Tarea 2	4 days	24/03/18 8:00	29/03/18 17:00
3	🕒	Tarea 3	5 days?	30/03/18 8:00	5/04/18 17:00
4	🕒	Tarea 4	7 days?	6/04/18 8:00	16/04/18 17:00
5	🕒	Tarea 5	5 days?	17/04/18 7:00	23/04/18 17:00
6	🕒	Tarea 6	10 days?	24/04/18 7:00	7/05/18 17:00
7	🕒	Tarea 7. Análisis filogenético	14 days?	8/05/18 7:00	25/05/18 17:00
8	🕒	Tarea 8. Análisis bioestadístico	6 days?	26/05/18 7:00	4/06/18 17:00



1.4.3. Análisis de riesgos

Los factores que pueden repercutir negativamente en el seguimiento del plan de trabajo y en la consecución del proyecto, aparecen numerados a continuación. En todo caso, el factor tiempo y el alcance del mismo, no deberían ser un problema, puesto que dispongo de buena capacidad de organización y de gestión de las fechas límite de entrega y del volumen del trabajo.

1. Las secuencias de los genes asociadas a los mecanismos de acción y a las propiedades de las bacterias descritas como agentes de biocontrol, no se encuentran en las bases de datos o no están completas. Si se diera esta situación, debería volver a la tarea 1 y rehacer una revisión bibliográfica más exhaustiva con el fin de encontrar nuevos genes candidatos para el TFM.
2. Manejo de los datos. Es muy importante entender qué se pretende conseguir de los datos obtenidos (secuencias) y cómo se pueden utilizar. Por lo tanto, podría llevarme más tiempo del esperado realizar un correcto enfoque de los análisis a llevar a cabo

sobre los datos. Para ello, debo hacer una intensa revisión bibliográfica de los materiales y métodos puestos en práctica en artículos similares.

3. Problemas con el código R. Dado que mi experiencia con el software es la adquirida a lo largo del máster, esta podría ser la parte más complicada para mí, la falta de dominio del lenguaje. En cualquier caso, a base de prueba-error, confío en que puedo desarrollar los análisis filogenéticos y bioestadísticos.
4. Análisis bioestadísticos si se requieren. De nuevo, en función de los resultados obtenidos, realizar una correcta interpretación de los resultados y aplicar los tests estadísticos más apropiados podría llevarme más tiempo del esperado. En este caso, por comparación con otros casos prácticos similares y comprensión de los resultados, podría solucionarlo.

1.5 Breve resumen de productos obtenidos

En mi caso particular, principalmente, espero obtener manejo de los recursos utilizados, como son las herramientas de análisis comparado de secuencias, las bases de datos de secuencias, el software R e interpretación de resultados. Me gustaría poder ganar independencia y autonomía para llevar a cabo un proyecto bioinformático y bioestadístico con el fin de sentirme más segura trabajando en estas disciplinas.

Por otro lado, también me gustaría poder redactar un artículo, ya que nunca lo he hecho. Esto dependería de los resultados obtenidos y de cómo me he sentido de cómoda con el proyecto a lo largo de estos meses. A medida que vaya recogiendo bibliografía, podré observar con más detalle si podría desarrollar un artículo a partir de este tema. En principio, parece que se ha trabajado poco con los paquetes filogenéticos de R, por lo que podría enfocarlo hacia esa dirección. Otra línea de investigación podría surgir si, tras analizar los resultados de las relaciones filogenéticas entre las bacterias seleccionadas, se viera que las bacterias seleccionadas comparten un ancestro común y forman parte de una clase o clasificación diferente en sí mismas.

1.6 Breve descripción de los otros capítulos de la memoria

1. Introducción.

1.1. Contexto y justificación del Trabajo

1.2. Objetivos del trabajo

1.3. Enfoque y método seguido

1.4. Planificación del Trabajo

1.5. Breve descripción de los otros capítulos de la memoria

2. Material y Métodos

2.1. Caracterización de las bacterias descritas como agentes de biocontrol

En este apartado se especificaría cuáles han sido las bacterias seleccionadas tras realizar la revisión bibliográfica, a qué géneros pertenecen, contra qué enfermedades actúan en las plantas y por qué son la mejor opción para combatirlas.

2.1.1. Propiedades y Mecanismos de acción

En este apartado se especificaría qué mecanismos de acción emplean dichas bacterias para ejercer su acción contra los fitopatógenos como, por ejemplo, biofilms, enzimas hidrolíticas, proteasas, componentes orgánicos

volátiles, etc. Se describirá su funcionamiento a nivel molecular y fisiológico para comprender como interactúan unos organismos con otros y se analizará en qué rutas metabólicas están incluidos.

2.1.2. Genes implicados

En este caso, se pasará a saber cómo están regulados estos mecanismos de acción a nivel genético. Se tratará de conocer y anotar las secuencias de estos genes, gracias a las diferentes bases de datos, que también serán descritas. Por lo tanto, se realizará la caracterización molecular de los genes seleccionados.

2.2. Análisis comparado de las secuencias seleccionadas entre bacterias

Se procederá con el análisis de genómica comparada, mediante herramientas de bioinformáticas como comparaciones múltiples, blast, etc.

2.3. Análisis filogenético

En este punto, una vez realizado todo lo anterior, se procederá con el estudio filogenético empleando el software R, que nos permitirá ver cómo están relacionadas las bacterias seleccionadas y obtener conclusiones.

2.4. Análisis bioestadístico

En función de las características de los datos obtenidos, se realizará un análisis bioestadístico, si se precisa, para hacer nuevas relaciones y asociaciones que puedan aportarnos más información.

3. Discusión y Resultados

4. Conclusiones

5. Glosario

6. Bibliografía

7. Anexos

2. Material y Métodos

2.1 Caracterización de las bacterias descritas como agentes de biocontrol

Muchos microorganismos incluyendo bacterias, virus, hongos, protozoos y nematodos, los cuales habitan los suelos o la región de la rizosfera de la planta, se han identificado como supresores de enfermedades de cultivos agrícolas causados por otras bacterias y hongos (Tabla 1). Las bacterias de la rizosfera poseen diferentes características que las hacen adecuadas para su uso como agentes de biocontrol. Estas características incluyen una eficiente colonización de las raíces, la habilidad para emplear una gran variedad de sustratos orgánicos que se encuentran habitualmente en las raíces y en los exudados de semillas, su facilidad para ser cultivadas bajo condiciones de laboratorio, la producción de un elevado número de metabolitos secundarios y su compatibilidad con el uso común de pesticidas y otros agentes de biocontrol [6].

Tabla 1. Supresores de enfermedades de cultivos agrícolas causados por otras bacterias y hongos.

Biocontrol organism	Suppressed pathogen	Disease on crops
<i>P. fluorescens</i> strain CHA0	<i>Thievaloviopsis basicola</i> , <i>Pythium ultimum</i>	Tobacco, Cucumber
<i>P. fluorescens</i> strain MDU2	<i>Rhizoctonia solani</i>	Rice
<i>P. fluorescens</i> strain Pf-5	<i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Pythium ultimum</i>	Cotton
<i>P. fluorescens</i> strain 3521 and B224	<i>Pythium ultimum</i>	Cotton
<i>P. fluorescens</i> strain 2-79	<i>G. graminis</i> var. <i>tritici</i>	Wheat
<i>P. fluorescens</i> strains Q29z-80	<i>Pythium ultimum</i>	Chickpea
<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	Wheat
<i>P. putida</i> strain 98B-27, <i>Serratia marcescens</i> strain 90-166	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cucumerinum</i>	Cucumber
<i>P. putida</i> WCS358	<i>Ralstonia solanacearum</i>	<i>Eucalyptus urophylla</i>
<i>P. aureofaciens</i> 30-84	<i>G. graminis</i> var. <i>tritici</i>	Wheat
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 7NSK2	<i>Pythium ultimum</i>	Tomato
<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Erwinia carotovora</i>	Potato
<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pythium ultimum</i> , <i>Rhizoctonia solani</i>	Cotton
<i>Bacillus pumilus</i>	<i>G. graminis</i> var. <i>tritici</i>	Wheat
<i>Serratia plymuthica</i> strain IC14	<i>Botrytis cinerea</i> , <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Cucumber
<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Phytophthora cactum</i>	Apple
<i>Bacillus subtilis</i> AU195	<i>Aspergillus flavus</i>	Cotton
<i>B. amyloliquefaciens</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	Tomato
<i>B. subtilis</i> QST713	<i>R. solani</i>	Tomato
<i>B. subtilis</i> CA32, <i>Trichoderma harzianum</i> R40I	<i>R. solani</i>	<i>S. melongena</i> , <i>Capsicum annum</i>
<i>Bacillus</i> sp. BPR7	<i>Macrophomina phaseolina</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>R. solani</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>B. subtilis</i> , <i>Paenibacillus polymyxa</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>P. putida</i> , <i>Sinorhizobium meliloti</i>	<i>F. oxysporum</i> , <i>F. solani</i> , <i>R. solani</i>	Alfalfa
<i>Bacillus subtilis</i> B006	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cucumerinum</i>	Cucumber
<i>Bacillus</i> sp. HCS43, <i>Pseudomonas</i> sp. HCS36	<i>R. solani</i>	Clusterbean

A continuación, se van a caracterizar aquellas bacterias que son capaces de actuar como agentes de biocontrol. Según bibliografía, algunas de las más representativas o con mayor potencial como agentes de biocontrol son: *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Bulkholderia multivorans*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*, *Paenibacillus polymyxa*, *Bacillus subtilis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *B. mycoides*, *B. cepacia* 89, *Mucilagibacter sp.*, *Pedobacter sp.*, *Serratia marcescens*, *Streptomyces griseoverdis* o *Trichoderma sp.*

Pseudomonas fluorescens es una de las más estudiadas como agente de biocontrol y posee diferentes cepas capaces de suprimir diferentes enfermedades en los cultivos. Se trata de un bacilo Gram-negativo, recto o ligeramente curvado pero no vibrioide, es saprófito y se puede encontrar en suelo y agua. Abundan en la superficie de las raíces, ya que son versátiles en su metabolismo y pueden utilizar varios sustratos producidos por las mismas, pero no establecen una relación simbiótica con la planta. Es incapaz de formar esporas y crece aeróbicamente. La temperatura óptima para su funcionamiento es de 25 a 30 °C, aunque puede crecer desde los 5 hasta los 42 °C aproximadamente y necesita preferentemente pH neutro. Tiene movimiento activo en líquido por sus flagelos polares. Además, pertenecen a un grupo llamado “estimuladores del crecimiento vegetal (MECV)” que poseen la propiedad de producir sustancias, cuyas principales ventajas son las de estimular la germinación de las semillas, acelerar el crecimiento de las plantas especialmente en sus primeros estadios, inducir la iniciación radicular e incrementar la formación de raíces y pelos radiculares. Por último, en relación a nuestro estudio, debe destacarse por poseer la propiedad de producir ciertas sustancias -antibióticos y sideróforos- que actúan limitando el crecimiento y desarrollo de los patógenos fúngicos que pueden afectar a diferentes cultivos.

Por ejemplo, la rabia del garbanzo es una enfermedad producida por el hongo *Ascochyta rabiei*, y posee cepas altamente resistentes bajo diferentes condiciones ambientales. Esta enfermedad reduce significativamente la calidad y el rendimiento de las semillas de garbanzo a lo largo de toda la geografía del planeta y causa graves pérdidas económicas. Se ha comprobado que *Pseudomonas fluorescens* es capaz de antagonizar esta enfermedad fúngica, así como *Pseudomonas putida* y *Bulkholderia multivorans* [7] mediante la acción enzimática de proteasas, celulasas y chitinasas, que degradan la pared celular del hongo. Su uso constituye una poderosa alternativa a los agroquímicos para el control de fitopatologías.

Otros ejemplos del uso del género *Pseudomonas* son Rajappan K y Ramarej B (1999), que comprobaron la eficacia in vitro de *Pseudomonas fluorescens* para antagonizar contra el marchitamiento de la coliflor por *F. moniliforme*, o bien, contra *Fusarium verticillioides* en el cultivo del maíz [8]. Hay muchos más ejemplos del potencial de *Pseudomonas* como agente de biocontrol: *Colletotrichum gloeosporoides* en mango, *P. solanacearum* en plátano, *A. avenae* subsp. *Citrulli* en melón, *Venturian equalis* en manzano, etc [9]. También se ha realizado ingeniería genética en cepas de *Pseudomonas fluorescens* con el objetivo de mejorar su actividad como agente de biocontrol. En este caso, la mayor preocupación era que los genes introducidos se expandieran a otros organismos del ecosistema por medio de transferencia horizontal. Finalmente, se observó que no se dio este intercambio genético, siendo así exitoso el experimento.

El género ***Bacillus*** también ha sido ampliamente estudiado debido a su elevada abundancia y diversidad en los agro-sistemas (suelo, agua y planta), además de por sus diversas capacidades

metabólicas, destacando su capacidad para producir antibióticos y otros metabolitos antimicrobianos y antifúngicos [10]. Por ejemplo, diversos estudios moleculares han revelado que un porcentaje significativo del genoma de cepas del género *Bacillus* está relacionado con la producción de metabolitos secundarios asociados al control de fitopatógenos, i.e. el 8.5 y 4% del genoma de las cepas *B. amyloliquefaciens* FZB42 y *B. subtilis* 168, respectivamente [11]. Esto justifica el amplio uso de cepas de este género bacteriano como agente de biocontrol contra enfermedades que afectan a los cultivos agrícolas.

Entre las características del género *Bacillus* destaca su crecimiento aerobio o anaerobio facultativo, Gram positivas, morfología bacilar, movilidad flagelar, y tamaño variable (0.5 a 10 µm). Su crecimiento óptimo ocurre a pH neutro y la mayoría de las especies son mesófilas (temperatura entre 30 y 45 °C); además destaca su capacidad de producir endosporas (ovales o cilíndricas) como mecanismo de resistencia a diversos tipos de estrés [10]. Actualmente, el género incluye más de 336 especies.

El suelo es considerado el principal reservorio de este género bacteriano, debido a que la mayoría de especies de *Bacillus* son saprófitas pudiendo utilizar la gran diversidad de sustratos orgánicos presentes en el suelo, siendo ésta una matriz compleja para el establecimiento de una gran diversidad genética y funcional de especies microbianas.

Por ejemplo, *Verticillium dahliae* y *Verticillium longisporum* son hongos fitopatógenos que causan grandes pérdidas de rendimiento en diferentes cultivos por todo el mundo. *Verticillium longisporum* posee un abanico más estrecho de huéspedes que *V. dahliae* e infecta principalmente a *Brassicaceae*. En cambio, *V. dahliae* posee un abanico mucho más amplio que engloba árboles, legumbres, cultivos ornamentales y vegetales como el tomate. Este hongo forma estructuras extremadamente duraderas que le permiten sobrevivir por muchos años en los suelos, por lo que su control se realiza mediante pesticidas que no son ecológicamente sostenibles y que provocan un gran impacto ecológico. Por esta razón, se están buscando alternativas sostenibles y se ha comprobado que diferentes cepas de *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus weihenstephanensis* tienen un efecto antagonista contra estas especies de hongos [12].

Encontramos otro ejemplo en la enfermedad de Panamá causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense*, la cual es devastadora en el cultivo del plátano. Tras recoger muestras del microbioma del suelo donde se producía la enfermedad, se aislaron cepas de *B. amyloliquefaciens* NJN-6 que se seleccionó como un potencial agente de biocontrol del hongo [13]. Fermentaciones líquidas de *B. amyloliquefaciens* NJN-6 fueron utilizadas junto a otros complementos químicos para realizar un tratamiento sobre plantas infectadas con la enfermedad de Panamá y comprobar si se producía el efecto antagonista. El experimento se pudo realizar en campo y fue exitoso, aumentando el rendimiento de las plantas tratadas.

Se llevó a cabo otro estudio con *Bacillus subtilis* que mostró una fuerte actividad antibacteriana contra *Acidovorax citrulli*, en condiciones in vitro, contra la enfermedad de las manchas bacterianas en semillas de melón y sandía. Para identificar el componente antibacteriano responsable de la actividad de biocontrol, se desarrolló un mutante deficiente en la producción de surfactina [14]. Estas cepas no eran capaces de inhibir el crecimiento de *A. citrulli*, además disminuyeron su capacidad para formar biofilms y su desplazamiento swarming y, con ello, su capacidad de colonización de las raíces y hojas.

Otro género importante para nuestro estudio es el género *Serratia*, bacilos gramnegativos de la familia Enterobacteriaceae. Se caracterizan por ser móviles y pueden crecer a una

temperatura que oscila entre 3.5-40 °C, en niveles de pH que varían entre 5 y 9. El ambiente en el cual predomina es en condiciones húmedas, por esa razón es posible encontrarla creciendo en la región de la rizosfera en muchas plantas. *Serratia marcescens* es la que más se ha estudiado como agente de biocontrol. A continuación se presentan algunos casos en los que se comporta como antagonista contra otros microorganismos patógenos de plantas.

Por ejemplo, muestra gran potencial para inhibir el crecimiento micelial de *Aspergillus parasiticus* y la subsiguiente producción de aflatoxinas [15] en condiciones in vitro, por medio de chitinasas, que son enzimas que digieran la pared celular fúngica. *Serratia marcescens* también se ha comportado como agente de biocontrol contra nueve enfermedades en hojas y raíz en el cultivo de la planta del té. Se han realizado experimentos in vivo bajo condiciones de invernadero en las que, tras aplicar un tratamiento con esta cepa de *Serratia marcescens*, se revelaba una reducción de la pudrición de las raíces [16]. Del mismo modo, *Serratia marcescens* es capaz de suprimir en gran medida al patógeno de plantas *Rhizoctonia solani*, que es un hongo que se transmite por las semillas y se encuentra comúnmente como persistente en muchos suelos. Este hongo causa una serie de síntomas en patatas, incluyendo retraso en la emergencia, reducción de la cosecha debido a podredumbre y pérdidas de calidad cuando la costra negra se desarrolla sobre los tubérculos [17].

El género *Paenibacillus* se caracteriza por ser anaerobio facultativo, bacterias formadoras de endosporas, incluido originalmente dentro del género *Bacillus* y luego reclasificado como un género separado en 1993. Las bacterias que pertenecen a este género se han detectado en gran variedad de entornos, tales como: suelo, agua, rizosfera, materia vegetal, forraje y larvas de insectos, así como muestras clínicas. El género incluye a *P. polymyxa*, que es capaz de fijar nitrógeno, por lo que se usa en agricultura como potenciador del crecimiento y como fuente de agentes químicos para aplicaciones de biotecnología. Recientemente, se ha podido aplicar su uso como agente de biocontrol de *A. citrulli* en el cultivo de la sandía [2]. En los últimos años se ha comprobado que las enfermedades bacterianas en plantas están aumentando debido a las anormales lluvias y a las temperaturas fluctuantes, lo cual constituye serias restricciones en el cultivo de la sandía. La mancha bacteriana en sandía es una gran amenaza para este cultivo en muchas regiones del mundo y ocasiona un gran número de pérdidas. Como hemos citado anteriormente, varias especies de *Bacillus* y *Pseudomonas* también son capaces de antagonizar contra *A. citrulli*.

Dentro del género *Paenibacillus*, también se han descubierto diferentes cepas de *P. illinoisensis*, *P. pabuli*, *P. taichungensis*, *P. tundrae*, *P. tylopili*, *P. xylanexedens*, and *P. xylanilyticus*, que presentan un potencial antagonista contra *Rhizogenic Agrobacterium biovar 1*, que se trata del agente causal de la enfermedad de las raíces peludas en el cultivo hidropónico de tomate y pepino. Para prevenir y controlar esta enfermedad se emplean desinfectantes químicos como el peróxido de hidrógeno o el hipoclorito que, al emplearse en elevadas dosis, puede provocar efectos fitotóxicos [18]. Además, *Rhizogenic Agrobacterium biovar 1*, se caracteriza por ser capaz de formar biofilms que lo protegen de los desinfectantes químicos, incluso a elevadas concentraciones, así como de la acción de muchos antibióticos, por eso es necesaria una alternativa más eficiente y ecológica.

Por último, vamos a referirnos a los nemátodos parásitos de plantas, éstos son una gran amenaza para los cultivos en todo el mundo y causan grandes pérdidas y disminución del

rendimiento en muchas cosechas. Aunque los químicos nematicidas son efectivos, fáciles de usar y de rápida acción, se han empezado a retirar del mercado en algunos países debido a las posibles consecuencias de su uso para la salud y para el medioambiente. Por ello, se está investigando sobre qué géneros bacterianos puede ser útiles para su biocontrol. Algunos de los géneros potenciales son *Pasteuria*, *Pseudomonas* y *Bacillus*.

Los miembros del grupo ***Pasteuria*** son bacterias formadoras de micelio y endosporas, parásitas obligadas de nemátodos y pulgas acuáticas. Las especies del género están ampliamente distribuidas a nivel mundial. Son capaces de infectar un amplio número de especies de nemátodos incluyendo fitoparásitos y de vida libre. La mayoría de los fitoparásitos de importancia económica se han observado parasitados por estas bacterias. De todas las especies de *Pasteuria* la más estudiada hasta el momento por sus potencialidades como agente de control biológico ha sido *P. penetrans*. Sin embargo, su incapacidad para ser reproducida masivamente in vitro ha frenado su desarrollo como producto comercial. No obstante, para su introducción al ambiente del suelo en los estudios de campo, se emplea el polvo de raíces secas infestadas con la bacteria [19].

Actualmente, también se está investigando en otras bacterias que pueden actuar como agentes de biocontrol de fitopatógenos, por ejemplo, el género ***Stenotrophomonas***. Estas bacterias son una fuente de infecciones oportunistas en humanos, de hecho, este tipo de infecciones están aumentando dramáticamente. Los patógenos oportunistas suelen crecer en la región de la rizosfera, una zona realmente rica en nutrientes y que permite el desarrollo de muchos microorganismos. Sin embargo, disponen de excelentes características para su uso aplicado a la biotecnología, en forma de pesticidas agronómicamente sostenibles. Por esta razón, paralelamente a las investigaciones que se desarrollan para obtener estas herramientas de biocontrol de fitopatógenos, deben realizarse estudios de la posible patogenicidad de éstos para los seres humanos u otros seres vivos.

Un ejemplo de ello es el trabajo de Alavi et al. en 2014, donde se comparaban mediante genómica comparada las diferentes cepas de *Stenotrophomonas* (*S. maltophilia* y *S. rhizophila*) que tenían potencial como agentes de control biológico, con el fin de conocer qué genes diferenciaban la especie patogénica para el ser humano (*S. maltophilia*) de la beneficiosa y aplicable en la industria (*S. rhizophila*). Se confirmó que, a pesar de presentar una gran similitud, los mecanismos de adaptación al hábitat y estilo de vida para garantizar la supervivencia de cada una de las cepas, son muy específicas, lo cual hace de *S. rhizophila* una especie segura para los seres humanos y con gran potencial como agente de biocontrol.

2.1.1 Propiedades y Mecanismos de acción

Se ha descubierto que las rizobacterias son capaces de suprimir, en muchos casos, las enfermedades causadas por varias bacterias y hongos patógenos de plantas. Gracias a este efecto antagonista las rizobacterias tienen el potencial de ser usadas como agentes de biocontrol. El control biológico se puede definir como "El control o la supresión de una enfermedad de la planta debido a la reducción en el número y la actividad de un agente fitopatógeno mediante el uso de uno o más organismos, o bien, el producto de un proceso biológico natural". La supresión de enfermedades por agentes de biocontrol se produce debido a las interacciones entre el agente de control biológico con otros miembros de la rizosfera o filosfera. Ya han podido identificarse muchos microorganismos que están

involucrados en la supresión específica de fitopatógenos [20]. A continuación se especifica cuáles son los mecanismos de acción que permiten la interacción de los agentes de biocontrol con los diferentes patógenos [6].

Producción de antibióticos

La producción de antibióticos por las rizobacterias es una de los principales mecanismos postulados para el ejercicio de la actividad antifúngica y antibacteriana. Se ha demostrado que los antibióticos desempeñan un papel muy importante en la supresión de enfermedades en muchos sistemas de control biológico, para ello se han realizado análisis con mutantes generados mediante ingeniería genética que son deficientes en la producción de dicho metabolito, así como estudios bioquímicos utilizando antibióticos purificados. Estos compuestos antimicrobianos pueden actuar sobre hongos patógenos de plantas induciendo fungistasis, inhibición de germinación de esporas, lisis de micelios fúngicos o ejerciendo efectos fungicidas. Las rizobacterias producen una gran cantidad de antibióticos, algunos ejemplos son el diacetilfloroglucinol, la oomicina A, las fenazinas, piocianina, pirroles, pirolonitrina y pirrolnitrina, etc. Por lo tanto, la antibiosis es uno de los mecanismos altamente efectivos para suprimir patógenos en la rizosfera.

Gurusiddaiah et al. demostraron que la cepa 2-79 de *Pseudomonas fluorescens* obtenida de la rizosfera de trigo suprimía la enfermedad de la raíz del trigo causada por *Gaeumannomyces graminis var. tritici*. Esta cepa fue capaz de actuar como agente de control biológico mediante la producción del antibiótico ácido fenazina-1-carboxílico. Este antibiótico se encontró activo contra varios hongos, incluyendo *G. graminis var. tritici*, *Rhizoctonia solani* y *P. aristesporum*. Se observó que había una relación inversa entre el tamaño poblacional de la cepa 2-79 de *P. fluorescens* productora de fenazina y el número de lesiones formadas por *G. graminis var. tritici*. Este antibiótico provoca un incremento en las especies ROS, las especies reactivas del oxígeno, aumentando así la toxicidad para fitopatógeno [21]. Los genes codificantes de la fenazina se encuentran en un cluster de genes donde el más importante es el *phz* [22]. En este mismo estudio, se reportó que la pirrolnitrina, gen *prnC*, también era un antibiótico muy importante sintetizado por *P. fluorescens* y que presentaba efecto inhibitorio contra fitopatógenos. En relación a este estudio, Hammer, y col. clonaron la región de ADN de 6,2 kb que codificaba la ruta biosintética de la pirrolnitrina que contenía los 4 genes, *prnABCD*, y confería la capacidad de producir pirrolnitrina heterológicamente en *E. coli*.

La cepa F113 de *Pseudomonas* aislada de la rizosfera de la remolacha azucarera inhibió una gama de hongos patógenos de plantas y se identificó el antibiótico 2,4-diacetilfloroglucinol (DAPG). También se descubrió que la cepa CHA0 produce una gran variedad de metabolitos secundarios aparte de DAPG, por ejemplo, pyoluteorina, cianuro de hidrógeno (HCN), ácido salicílico, piachelina y pyoverdina, y que era capaz de proteger a varias plantas de enfermedades causadas por hongos patógenos transmitidos por el suelo. En cambio, la cepa mutante CHA625, que carece de la producción de antibiótico DAPG, mostró efectos supresores reducidos. Para el gen del DAPG se identificaron seis marcos de lectura abiertos, cuatro de los cuales (*phlACBD*) comprenden un operón que incluye un conjunto de tres genes (*phlACB*) conservados entre eubacterias y arqueobacterias y un gen (*phlD*) que codifica una poliketido sintasa con homología con chalcona y estilbenas sintasas de [23].

Se han aislado los genes de *Pseudomonas fluorescens* para la biosíntesis de muchos de estos metabolitos implicados en la supresión de la enfermedad y se ha estudiado su regulación. Por

ejemplo, se obtuvo la mutación en el gen regulador global *gacA* (GacA-) de *P. fluorescens* CHA0 y el derivado mutante no produjo floroglucinol, pyoluteorin y HCN, mientras que sobreprodujo piachelina y pyoverdina. Este mutante se observó que fue eficaz como agente de biocontrol en los cultivos de trigo y maíz frente a la erosión mediada por *P. ultimum* y trigo contra *G. graminis var. tritici*.

Por otro lado, las especies de *Bacillus* son particularmente atractivas como posibles agentes de control biológico porque producen endosporas estables, que pueden sobrevivir a las condiciones de calor y desecación que, por el contrario, no pueden soportar muchos fitopatógenos. Por ejemplo, el análisis de mutantes obtenidos de la cepa UW85B de *Bacillus cereus* mostró una relación cuantitativa significativa entre la supresión de la enfermedad y la producción de dos antibióticos, zwittermicina A y kanosamina. Los antibióticos purificados suprimieron la enfermedad e inhibieron el desarrollo de oomicetos al atrofiar y deformar los tubos germinales de los quistes en germinación.

Otro caso es el de la cepa RB14 de *Bacillus subtilis*, que producía los antibióticos iturina A y surfactina, y que suprimía la enfermedad en tomate causada por *Rhizoctonia solani*. Otra clase importante de antibióticos producidos por muchas bacterias Gram-negativas y Gram-positivas son las bacteriocinas. Estas son, generalmente, proteínas y son inhibitoras de otras cepas relacionadas de la misma especie debido a su alto grado de especificidad. La cepa BC8 de *P. fluorescens* produce una bacteriocina fluoricina-BC8 que provoca la inhibición del crecimiento de cepas virulentas de *P. solanacearum* en condiciones in vitro. Además, la cepa avirulenta de *P. solanacearum* también tiene la capacidad de producir bacteriocinas que suprimen la colonización de la raíz por la cepa virulenta de la misma especie, lo que da como resultado una reducción de la incidencia de bacterias que causan la marchitez en el tomate y en un mejor crecimiento de la planta. Una de las primeras aplicaciones comerciales de control biológico para las enfermedades en las raíces fue el uso de *Agrobacterium radiobacter* K84, que se empleó para controlar la enfermedad de la agallas o tumores, en plantas dicotiledóneas causadas por *Agrobacterium tumefaciens*.

Producción de sideróforos

Los agentes de control biológico pueden disminuir la disponibilidad de sustancias / nutrientes particulares a los patógenos debido a su capacidad de absorción o utilización eficiente de éstos. Este fenómeno de competencia por los nutrientes puede limitar el crecimiento de los patógenos. El hierro es un elemento de crecimiento esencial para todos los organismos vivos y la escasez de su biodisponibilidad en los hábitats del suelo y en las superficies de las plantas crea una gran competencia entre microorganismos [24].

Un sideróforo es un compuesto quelante de hierro secretado por algunos microorganismos. El ion hierro Fe^{3+} tiene muy poca solubilidad a pH neutro y, por tanto, no puede ser utilizado por los organismos. Los sideróforos disuelven estos iones a complejos de Fe^{2+} , que pueden ser asimilados por mecanismos de transporte activo. Muchos sideróforos son péptidos no ribosomales. Los sideróforos (pseudobactina) son muy útiles en el control biológico de patógenos de las plantas, esto se comprobó por primera vez mediante la cepa B10 de *Pseudomonas*, que también es una rizobacteria promotora del crecimiento (PGPR). Se realizaron unos experimentos en los que se añadió cloruro férrico $10 \mu M$ ($FeCl_3$) a un medio deficiente en hierro y se observó que no se producía el comportamiento antagonista in vitro y la fluorescencia característica de esta rizobacteria. Posteriormente, se construyó un banco de genes de la cepa B10 de *Pseudomonas sp.* y se realizó un análisis de complementación de

varios mutantes que mostró que se requerían un mínimo de 12 genes dispuestos en cuatro clusters para la biosíntesis de la pseudobactina.

En el caso del género *Bacillus*, se observó que siete cepas aisladas de *B. megaterium* producían sideróforos, IAA, amoníaco y HCN. Se llevaron a cabo experimentos para los siete aislados, que mostraron antagonismo contra *F. oxysporum* mediante efectos inhibidores significativos sobre el crecimiento radial micelial. Otro ejemplo, es el de la rizobacteria indígena *Paenibacillus polymyxa* CTS-B19 y la cepa CTS-G24 de *Bacillus subtilis*, las cuales exhibieron actividad antagonista contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* y *Rhizoctonia bataticola* [25]. La detección in vitro de las enzimas que degradan la pared de los hongos reveló que ambos aislados produjeron quitinasas, β -1,3-glucanasas, proteasas y celulasas. Se observaron actividades de sideróforos y catalasas solo en la cepa CTS-G24 de *Bacillus subtilis*.

Producción de enzimas hidrolíticas

Varias enzimas hidrolíticas extracelulares producidas por microbios juegan un papel importante en la supresión de patógenos de plantas. La quitinasa y la 1, 3-glucanasa atacan la quitina y el -1, 3-glucano, componentes principales de muchas paredes de células fúngicas, lo que resulta en su degradación y en la destrucción de los patógenos de naturaleza fúngica. La quitinasa producida por *S. plymuthica*, *Serratia marcescens*, *Paenibacillus* sp. y *Streptomyces* sp. mostró que presentaba actividad inhibitoria contra *Botrytis cinerea*, *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* [26]. Del mismo modo, la laminarinasa producida por *Pseudomonas stutzeri* es capaz de digerir y lisar el micelio de *F. solani*. La enzima -1, 3-glucanasa sintetizada por *Paenibacillus*, *B. cepacia* también destruye a *F. oxysporum*, *R. solani*, *S. rolfsii*, y las paredes celulares de *Pythium ultimum*. En 1989, Shapira et al, obtuvieron evidencia genética sobre el papel de estas enzimas en el control biológico mediante la inserción del gen ChiA, el gen de la quitinasa, de *S. marcescens* en la bacteria *Escherichia coli*, que no es un agente de biocontrol. La bacteria transgénica resultante redujo la incidencia de la enfermedad del tizón del sur del frijol causada por *Sclerotium rolfsii*. Posteriormente, Chet et al. en 1993, consiguieron aislar tres genes diferentes de la quitinasa de *Serratia*, *Aeromonas* y *Trichoderma*. Los genes clonados se expresaron en *E. coli* y posteriormente se introdujeron en cepas de *R. meliloti*, *P. putida* y *Trichoderma*. Los transformantes dieron como resultado un aumento de la actividad quitinolítica contra *Sclerotium rolfsii* y *Rhizoctonia solani* en algodón bajo condiciones de invernadero. Más recientemente, se estableció una marca registrada en la historia del control biológico generando plantas transgénicas que contienen el gen de endochitinase de *T. harzianum* con una resistencia incrementada contra hongos patógenos de plantas [27]. Estos resultados indican que estas enzimas juegan un papel importante en el control biológico y que la capacidad de biocontrol de algunos microbios puede mejorarse por transformación con enzimas quitinolíticas.

Más adelante, Singh et al. (1999) observaron la producción de quitinasa y β -1,3-glucanasa a partir de dos cepas bacterianas quitinolíticas, *Paenibacillus* sp. 300 y *Streptomyces* sp. 385, cuando se cultiva en presencia de quitina coloidal como única fuente de carbono. La supresión del marchitamiento por *Fusarium* del pepino por una combinación de estas dos bacterias podría deberse a la producción de estas enzimas hidrolíticas. Downing et al. (2000) transfirieron los genes *chiA* clonados de *Serratia marcescens* y *cry1Ac7* de *Bacillus thuringiensis* en la bacteria endofítica asociada a la caña de azúcar *Herbaspirillum seropodicae*. La expresión de los genes en la bacteria endofítica dio como resultado el control biológico del barrenador de la caña de azúcar *Eldana saccharina*. De forma similar, las cepas recombinantes

de *Rhizobium meliloti* se construyeron por transferencia de genes que codifican quitinasa y se observó la expresión de quitinasa durante la simbiosis en las raíces de alfalfa.

Por otro lado, se descubrió que *Serratia plymuthica* IC14, aislada del suelo alrededor de raíces de melón [28], posee actividades quitinolíticas y proteolíticas, y también produjo antibióticos como la pirrolnitrina, así como sideróforos. La aplicación foliar de esta cepa proporcionó protección contra el moho gris de *Botrytis cinerea* en pepino y contra la enfermedad del moho blanco de *S. sclerotiorum* en condiciones de invernadero reduciendo la incidencia de la enfermedad en un 76 y 84 por ciento, respectivamente. Kohli et al. (2006) obtuvieron cuarenta aislados bacterianos de la rizosfera de girasol, de donde se obtuvo *Pseudomonas maltophilia* que se identificó como un agente de control biológico contra los dos patógenos de la pudrición de la raíz *Rhizoctonia solani* y *Sclerotinia sclerotiorum*. Se descubrió que producía quitinasa, que era responsable de la lisis de la biomasa micelial. Recientemente, el gen de la β -1, 3-1, 4-glucanasa (Bglu1) se clonó a partir de la cepa ZJ2086 de *Bacillus velezensis*. Esta proteína purificada fue capaz de destruir la morfología micelial de tres hongos patógenos. El gen de glucanasa de *B. velezensis* ZJ20 también se sobreexpresó en la cepa BL21 de *E. coli* y se descubrió que la proteína recombinante inhibía el crecimiento de hongos patógenos.

En los últimos ensayos descritos y realizados para determinar el comportamiento como agentes de biocontrol de diferentes rizobacterias, se sigue observando que la producción de chitinazas, celulasas y otras enzimas hidrolíticas, son la clave de la eficacia de dicho comportamiento. Por ejemplo, tanto Adhikari et al., (2017) como Azizpour & Rouhrazi (2016), observaron la producción de estas enzimas en las rizobacterias de su estudio, *P. polymyxa* en el primer caso, que es activa contra el hongo *A. citrulli* y *P. fluorescens* en el segundo caso, que es antagonista a *A. rabiei*.

Producción de metabolitos secundarios y compuestos orgánicos volátiles

El cianuro de hidrógeno (HCN) es producido por muchas bacterias de la rizosfera y se ha determinado que juega un papel importante en el control biológico de los patógenos. Este ácido afecta la respiración, inhibiendo la citocromo oxidasa. Los efectos inmediatos son una reducción de las actividades metabólicas de los microorganismos patógenos. Voisard et al. (1989), sugieren que este metabolito puede actuar de dos maneras en el control biológico: 1) por antagonismo directo con el patógeno; esto estaría limitado a la superficie de la raíz que es donde habitan y 2) que alternativamente el HCN podría actuar induciendo mecanismos de defensa en la planta.

Algunos ejemplos del empleo de dichos metabolitos como mecanismos de acción, son los siguientes. Por ejemplo, en el cultivo del trigo se observó un aumento estadísticamente significativo en la supresión de los síntomas causados por *Mycopharella graminicola* y *Puccinia recondita f. sp. tritici* tras aplicar un tratamiento con cepas bacterianas que sobreproducían HCN. Otro ejemplo lo hallamos en la planta de tabaco, donde se utilizó la cepa mutante CHA5 derivada de Tn5 que carecía de producción de HCN junto con la cepa original CHA0, para evaluar el papel de la producción de HCN en el control de *Thielaviopsis basicola*. El CHA5 mutante mostró un control significativamente menor de la podredumbre de la raíz del tabaco y no redujo el porcentaje de superficie de la raíz infectada. La complementación del CHA5 mutante con genes HCN + restauró la actividad de control biológico completo.

Los patógenos bacterianos y de las plantas también provocan que la planta sintetice etileno y el etileno exógeno a menudo aumenta con la gravedad de una infección por hongos, mientras que algunos inhibidores de la síntesis de etileno disminuyen significativamente la gravedad de

una infección por hongos. La concentración de etileno de la planta se reduce mediante la inoculación de muchas bacterias promotoras del crecimiento de plantas a través de la acción de la enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) deaminasa [29]. Por lo tanto, al reducir el nivel de ACC dentro de una planta, también se reduce la cantidad de etileno que puede formarse posteriormente en la planta. De este modo, se transformaron dos cepas bacterianas de biocontrol con el gen de la enzima de adenosina UW4 ACC de *Enterobacter cloacae* y se evaluó el efecto de las bacterias transformadas y no transformadas sobre el daño a los pepinos causado por *Pythium ultimum* [30]. Las cepas bacterianas de biocontrol conteniendo ACC-desaminasa se encontraron más efectivas que las cepas de control biológico que carecían de esta enzima. Además, una cepa de biocontrol transformada con deaminasa ACC redujo significativamente la extensión de la pudrición blanda de las rodajas de patata causada por el patógeno bacteriano *Erwinia carotovora* en bolsas de plástico selladas.

Otro ejemplo del empleo de metabolitos secundarios es el de cuatro cepas de *P. fluorescens* UM16, UM240, UM256 y UM270 que mostraron un alto grado de antagonismo contra el fitopatógeno *Botrytis cinerea* y protegieron las plantas de *M. truncatula* de la infección de *B. cinerea* al reducir los síntomas de la enfermedad del tallo y el pardeamiento de las raíces [31]. Se descubrió que las cepas de *P. fluorescens* producen fenazinas, HCN y ACC (1-aminociclopropano-1-carboxilato) desaminasa, así como la producción de biofilm, sideróforos, proteasas y ácido indol-3-acético en la mayoría de las cepas. Los compuestos que contienen azufre, incluido el disulfuro de dimetilo, se encuentran entre los compuestos orgánicos volátiles (COV) más abundantes emitidos por las cuatro cepas de *Pseudomonas*. Se encontró que solo una cepa UM270 produce dimetilhexadecilamina, un compuesto con actividades antifúngicas y de PGP.

Los compuestos orgánicos volátiles producidos por la cepa antagonista *Paenibacillus polymyxa* WR-2 se identificaron en presencia de exudados de raíz y fertilizante orgánico. El crecimiento de *F. oxysporum f. sp. niveum* fue inhibido mediante la acción de dichos compuestos que impidieron la germinación de sus esporas. De los 42 compuestos orgánicos volátiles identificados, siete compuestos orgánicos volátiles (VOC), es decir, benzotiazol, benzaldehído, undecanal, dodecanal, hexadecanal, 2-tridecanona y fenol redujeron el crecimiento del hongo.

Producción de fitoalexinas e inducción de la resistencia sistémica

Las fitoalexinas son un grupo de compuestos heterogéneo clasificado dentro de los metabolitos secundarios por ser sintetizados en el metabolismo secundario de la planta, los cuales fueron descritos desde hace más de 70 años. Son moléculas de bajo peso molecular con propiedades antimicrobianas ante un amplio espectro de hongos y bacterias patógenas. Las fitoalexinas son sintetizadas de manera endógena y pueden o no ser sintetizadas en bajas concentraciones cuando la planta está sana, pero se acumulan en grandes concentraciones en las plantas como respuesta a daños mecánicos o a la exposición a patógenos. Incluso algunos investigadores sugieren que son producto del estrés térmico y lumínico, así como por la aplicación de fungicidas. Estos compuestos se acumulan de sobre manera en el sitio de infección y en los lugares adyacentes. La resistencia de la planta ocurre cuando una o más fitoalexinas alcanzan una concentración suficiente para inhibir el desarrollo del patógeno.

La producción de fitoalexinas se ha asociado con un grupo de genes que codifican para enzimas específicas, encargadas de su síntesis y que a su vez se han correlacionado con la resistencia a patógenos, ya que plantas más resistentes a cualquier patógeno presentan mayores concentraciones de fitoalexinas que una planta susceptible. La resistencia atribuida a

estos compuestos depende de la capacidad de la planta para reconocer al patógeno rápidamente e inducir la respuesta de defensa para limitar su propagación. Las fitoalexinas son específicas de cada planta, pero no específicas para los patógenos.

En hongos, las fitoalexinas inhiben la elongación y crecimiento del tubo germinativo, crecimiento micelial y el aumento en su peso seco, así como la absorción de glucosa. Muy pocos estudios señalan su actividad antiviral. El mecanismo por el cual las fitoalexinas tienen su efecto aún es poco claro, ya que su actividad puede variar de un compuesto a otro. Lo que sí es claro es la toxicidad que tienen estos compuestos ante un gran espectro de patógenos. Es improbable pensar en un solo modo de acción, si se tiene en cuenta la diversidad de compuestos, pero se cree que interactúan en distintos sitios provocando una disfunción en la integridad de la membrana de los patógenos. La mayoría de las fitoalexinas estudiadas derivan de la ruta de los fenilpropanoides que tienen como base el aminoácido fenilalanina, el último paso de esta ruta de biosíntesis es catalizada por la estilbeno sintasa. La STS está codificado por una familia multigen: 8 genes STS formadores de resveratrol de la vid (pSV21, pSV25, pSV696 y pSV368 y Vst1, Vst2 y Vst3) y 5 genes STS formadores de pinosilvin del pino (PST-1, PST2, PST-3, PST-4 y PST-5) [32].

Algunas rizobacterias no patogénicas, son capaces de inducir resistencia en plantas mediante la producción de fitoalexinas. A continuación, se plantean algunos ejemplos, como el de Vann Peer et al. (1991) que mostraron que se producía resistencia inducida a partir de la acumulación de fitoalexinas en el control biológico de *Fusarium oxysporum f. sp. dianthi*, en clavel, tras aplicar un tratamiento con *Pseudomonas sp. cepa WCS417r*. De forma similar, se observó la inducción y acumulación de fitoalexinas en raíces de caupí cuando las plantas estaban infestadas con hongo micorrízico *Glomus fasciculatum* y causó resistencia a la enfermedad de marchitez por *Fusarium*. Goel et al., en 2001, reportaron que la inoculación de la cepa fluorescente *Pseudomonas* MRS13 en garbanzo causó un 61,1% y un 35,1% de acumulación aumentada de compuestos similares a los flavonoides en los cultivares C235 y H8618, respectivamente, en comparación con el control no inoculado.

Algunas cepas de control biológico inducen un cambio sostenido en la planta y aumentan la capacidad de tolerancia de la planta a la infección por un patógeno, y este fenómeno se denomina resistencia sistémica inducida (ISR). Sin embargo, la resistencia sistémica adquirida (SAR) se manifiesta al proporcionar una resistencia posterior a una amplia gama de otros patógenos, y esta resistencia se adquiere típicamente como respuesta a una infección localizada o un patógeno atenuado. Se ha demostrado que diversas cepas no patógenas de *Pseudomonas* inducen resistencia sistémica en las plantas, lo que proporciona protección contra un amplio espectro de organismos fitopatógenos. La resistencia sistémica inducida en la planta contra un amplio espectro de patógenos se ha demostrado en más de 25 cultivos, incluidos cereales, legumbres, cucurbitáceas, plantas solanáceas y árboles.

Otros mecanismos de acción están relacionados con la capacidad que tienen algunas bacterias sobre otras para colonizar a las plantas. De este modo, por ejemplo, la capacidad de sintetizar biofilms, aporta una característica competitiva a dichas bacterias, haciéndolas más eficientes para colonizar la región de la rizosfera, excluyendo o inhibiendo así el desarrollo o la colonización por parte de otros fitopatógenos que no son capaces. Esto se observó en el estudio de Rudrappa et al. (2008), donde reportaron que la producción de biopelículas de *B. subtilis* FB17 fue empleado como mecanismo de colonización rizosférica, debido a su atracción por el ácido L-málico secretado por las raíces de *Arabidopsis thaliana* e inducido por el patógeno foliar *Pseudomonas syringae* pv tomato. Por otra parte, Kumar et al. (2011), López-

Fernández et al. (2016) y Selim et al. (2016) señalan que diversas especies de *Bacillus* pueden ser residentes de tejidos internos en plantas de uva (*Vitis vinífera*) y algodón (*Gossypium barbadense* L). Estas características tienen un papel determinante en el desarrollo, colonización y función de *Bacillus* estimulando su asociación con la planta hospedera, cuyas características de control biológico son potenciadas.

2.1.2 Caracterización de los genes seleccionados

A continuación, vamos a seleccionar un gen para cada modo de acción, de modo que todos los mecanismos queden representados en nuestro estudio. Se procederá a localizar su secuencia mediante la base de datos del NCBI, donde seleccionaremos dicha secuencia a partir de una bacteria modelo en la que se haya logrado secuenciar el gen. De esta forma, podremos empezar a realizar los análisis de comparaciones múltiples de cada gen frente a diversos organismos para ver si se encuentra en aquellas bacterias que son capaces de actuar como agentes de biocontrol contra a fitopatógenos. Los genes seleccionados se encuentran resaltados (Tabla 2).

Tabla 2. Genes seleccionados.

BIOMOLÉCULA	MODO DE ACCIÓN	GEN	ORGANISMO MODELO
Fenazina	antibiótico	phz	<i>Pseudomonas fluorescens strain FP7</i>
pirrolnitrina	antibiótico	prn	
DAPG	antibiótico	phlACBD	
Piochelina y pioverdina	antibiótico	gacA	
Sideróforos	captación de hierro	fur	<i>Legionella pneumophila 130b</i>
chitinasa	enzimas hidrolíticas	ChiA	<i>Serratia marcescens Bn10</i>
β -1, 3-1, 4-glucanasa	enzimas hidrolíticas	Bglu1	
HCN	Metabolitos 2º y VOC	hcnABC	
ACC	Metabolitos 2º y VOC	acdS	<i>Mesorhizobium sp. MM5343</i>
STS	fitoalexinas	PST, pSV y Vst	

Fenazinas - Antibióticos

Ciertos miembros del género *Pseudomonas* producen diversos metabolitos de bajo peso molecular ("secundarios") que incluyen pigmentos heterocíclicos que contienen nitrógeno conocidos como compuestos de fenazina. Las fenazinas son sintetizadas por un número limitado de géneros bacterianos que incluyen *Pseudomonas*, *Bulkholderia*, *Brevibacterium* y

Streptomyces. Casi todas las fenazinas exhiben actividad de amplio espectro contra diversas especies de bacterias y hongos. Esta actividad está relacionada con la capacidad de los compuestos de fenazina para experimentar transformaciones de oxidación-reducción y así causar la acumulación de radicales superóxido tóxicos en las células diana. Algunos compuestos de fenazina pueden actuar como factores de virulencia bacteriana. Los antibióticos de fenazina producidos por las cepas de control biológico *P. fluorescens* 2-79 y *P. aureofaciens* 30-84 son los principales factores en la capacidad de estas cepas para inhibir el crecimiento de hongos patógenos de la raíz. Además, los estudios que implican mutantes deficientes en fenazina han demostrado claramente que la producción de antibióticos en hábitats naturales desempeña un papel importante en la competencia ecológica y la supervivencia a largo plazo de estas cepas en el medio ambiente. Se han descrito más de 50 compuestos de fenazina de origen natural, y ciertos productores de bacterias pueden sintetizar mezclas de hasta 10 derivados diferentes de fenazina a la vez. Las condiciones de crecimiento también pueden influir en el número y los tipos de fenazinas sintetizadas por una cepa individual [33].

Aunque las partes principales de la biosíntesis de fenazina (Figura 1) y su genética son conocidas, todavía hay lagunas en nuestro conocimiento y la vía de la fenazina sigue siendo hipotética. La fenazina está codificada por un cluster de 7 genes (phzABCDEFG). La función y los productos génicos de phzC, phzE y phzD han sido probados experimentalmente. Estas enzimas catalizan la conversión en ácido 3-desoxi-d-arabino-heptulosónico 7-fosfato (DAHP), ácido 2-amino-2-desoxiisorísmico (ADIC) y ácido trans-2,3-dihidro-3-hidroxiantranílico (DHHA). La estructura del núcleo de fenazina se sintetiza posteriormente por condensación de dos moléculas de ácido 6-amino-5-oxociclohex-2-eno-1-carboxílico. Presumiblemente, PhzF es responsable de la isomerización de DHHA. Hasta ahora, la función de las enzimas PhzA, PhzB y PhzG está casi aclarada y su función está relacionada con las reacciones de condensación y reordenamiento para formar PCA. La transformación del corismato al ácido 2-amino-2-desoxiisorísmico (ADIC) es necesaria para la formación de la estructura central de las fenazinas y está catalizada por la enzima PhzE. Por lo tanto, PhzE es una enzima clave en la biosíntesis de fenazina y el gen correspondiente phzE es adecuado para el diseño de cebadores. De acuerdo con esta información, fue posible el diseño de sondas y de primers de oligonucleótidos apropiados. Mavrodi et al. (2010) recientemente diseñaron cuatro pares diferentes de oligonucleótidos sobre la base del gen phzF de la biosíntesis de fenazina e investigaron la diversidad de productores de fenazina, principalmente, en bacterias que habitan en el suelo y asociadas a plantas [34].

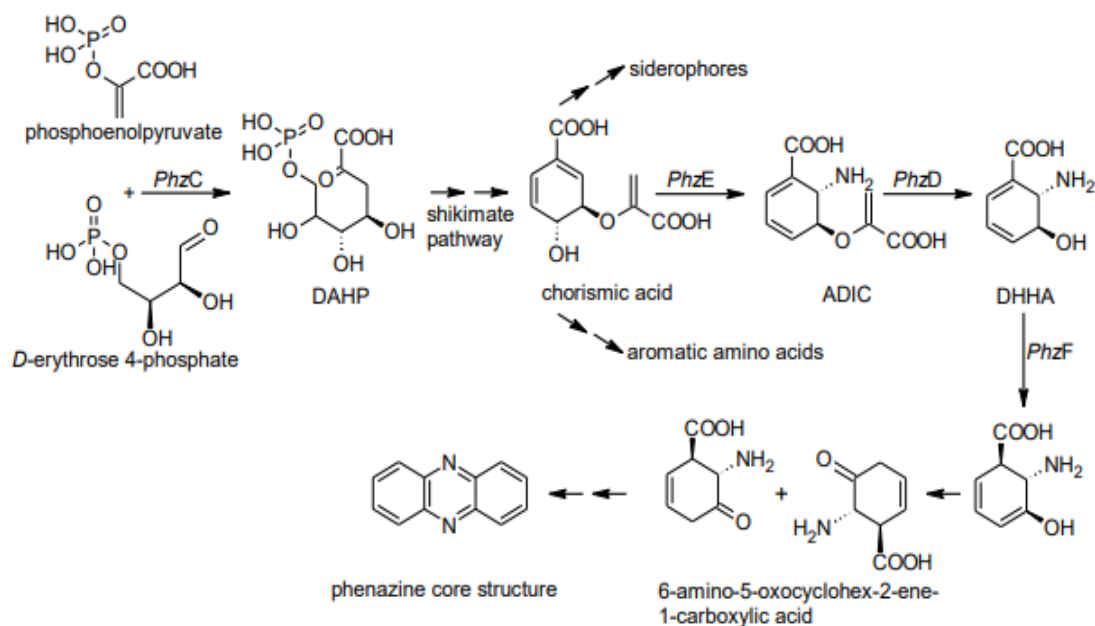


Figura 1. Representación esquemática de la vía de biosíntesis de fenazina.

A continuación, obtuvimos la secuencia del gen de la fenazina, que está disponible en el NCBI, para la bacteria control *Pseudomonas fluorescens strain FP7*. Se encuentra en formato fasta en el anexo 1.

Chitinasa – Enzima hidrolítica

Algunas bacterias quitinolíticas se comportan como agentes potenciales para el control biológico de las enfermedades de las plantas causadas por diversos hongos fitopatógenos y plagas de insectos, ya que las paredes celulares fúngicas y exoesqueletos de insectos contienen quitina, un homopolímero de β (1,4) unido a residuos de N-acetil-glucosamina (GlcNAc) como componente estructural principal. *Serratia marcescens*, gram-negativo y anaerobio facultativo es una de las bacterias del suelo más eficientes para la degradación de la quitina. Cuando esta bacteria se cultiva en presencia de quitina, se pueden detectar una variedad de enzimas quitinolíticas y proteínas de unión a quitina. La más conocida es la quitinasa A (ChiA), que es una endocitinasa. La introducción del gen ChiA en bacterias o plantas ofrece un gran potencial para aumentar la actividad insecticida en sistemas transgénicos [35].

La secuencia del gen chiA se ha obtenido a partir de la bacteria modelo *Serratia marcescens Bn10*, en la base de datos del NCBI. La secuencia se encuentra descrita en el anexo I.

1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminasa – Metabolito secundarios y VOC

La disminución del etileno en la planta por desaminación de su precursor inmediato 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) es un rasgo clave que se encuentra en muchas rizobacterias. Se ha descubierto que ciertas bacterias del suelo contienen la enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminasa que hidroliza el precursor de etileno ACC

en amoníaco y α -cetobutirato. Glick et al., en 1998, postularon que una proporción significativa de ACC producido por las plantas podía ser exudado de las raíces de las plantas o semillas e hidrolizado por bacterias que contienen ACC deaminasa en la superficie de la raíz. Una concentración disminuida de ACC da como resultado niveles más bajos de etileno endógeno, que elimina el efecto inhibitorio de concentraciones de etileno más altas en las plantas. Los genes responsables de la enzima ACC deaminasa se han aislado, secuenciado y caracterizado a partir de unas pocas bacterias del suelo. Concretamente, el gen ACC deaminasa (*acdS*) de dos aislados bacterianos pudo ser clonado y secuenciado mediante amplificación por PCR a partir de bacterias de la rizosfera de trigo [36]. Algunas de las secuencias del gen bacteriano no mostraron homología con los genes de la ACC deaminasa en la base de datos GenBank de NCBI. Esto proporciona evidencia de apoyo para la existencia de diferentes genes ACC deaminasa en bacterias aisladas de los diversos ecosistemas.

La secuencia seleccionada para este gen, proviene del organismo modelo *Mesorhizobium sp. MM5343* *AcdS*. La secuencia se ha obtenido a partir de la base de datos del NCBI, y se encuentra descrita en el anexo I.

Sideróforos – Captación de hierro

El hierro es un nutriente esencial para la mayoría de las bacterias y sirve como un cofactor en procesos metabólicos clave. La adquisición de hierro se reconoce como uno de los pasos clave para la supervivencia de una serie de patógenos bacterianos dentro de sus huéspedes y contribuye significativamente a la virulencia. Por lo tanto, los patógenos bacterianos han desarrollado una serie de mecanismos diferentes para obtener hierro de sus huéspedes. Una de las principales estrategias para obtener hierro es la síntesis y secreción de quelantes de Fe (III) de bajo peso molecular, llamados sideróforos, que pueden eliminar el hierro de las proteínas de unión al hierro del huésped y luego ingresar en la célula a través de las proteínas del receptor de la membrana externa.

La estructura de estos compuestos es bastante variable. Muchos sideróforos son péptidos pequeños sintetizados por péptidos sintetasas no ribosomales (NRPS), que son enzimas multimodulares que producen péptidos con una secuencia particular y sin un molde de ARN. Hay tres tipos principales de grupos funcionales coordinadores de hierro en sideróforos [37]. En primer lugar, están las cadenas laterales de N-hidroxiácidos como en la anguibactina, con el átomo de oxígeno como uno de los ligandos para Fe³⁺. En segundo lugar, están los hidroxilos adyacentes de los anillos de catecol, casi siempre derivados de 2,3-dihidroxibenzoato (DHB), como se representa en la enterobactina, anguibactina y acinetobactina. En tercer lugar, los átomos de nitrógeno de los anillos de tiazolina y oxazolina de cinco miembros, resultantes de la ciclación enzimática de las cadenas laterales de cisteinilo, serilo o treonilo, respectivamente, también pueden coordinar Fe³⁺. Este tipo de coordinación es una característica común en la piachelina, yersiniabactina, vibriobactina, anguibactina, y acinetobactina.

De este modo, una de las clases principales y más importantes de sideróforos son los que poseen naturaleza catecolata, estos fueron aislados a partir de una variedad de especies bacterianas, incluida *Escherichia coli*, que produce enterobactina, el prototipo de sideróforo catecolato. La enterobactina se biosintetiza a partir del ácido 2,3-dihidroxibenzoico (DHBA) que, a su vez, se sintetiza a partir de corismato a través de las acciones consecutivas de tres enzimas, a saber, isocorismato sintasa (EntC), isocorismatasa (EntB) y 2,3-dihidro-2,3-dihidroxibenzoato deshidrogenasa (EntA). Aunque las enzimas implicadas en la vía de la biosíntesis de DHBA son comunes a todos los organismos que producen sideróforos de catecol,

la organización de los genes biosintéticos dentro del operón y las secuencias de los genes son diferentes [38].

En cualquier caso, parece que la expresión de la mayoría de las proteínas requeridas para la biosíntesis de sideróforos está regulada por una proteína represora de unión a hierro global llamada Fur (regulador de captación férrico) [39]. Es decir, el represor Fur es el denominador común en la regulación de estos sistemas de captación de hierro. En condiciones ricas en hierro, los complejos Fe²⁺-Fur se unen a promotores que contienen una caja Fur (secuencia de unión Fur) y reprimen la transcripción. Aunque se requiere Fur para la activación transcripcional de algunos genes, este efecto puede ser indirecto. Por esta razón, el gen seleccionado dentro de nuestro estudio y en lo que se refiere a este mecanismo de acción, es del represor Fur, ya que parece un factor común en las innumerables y complejas rutas de biosíntesis de sideróforos. En este caso, hemos seleccionado el gen Fur de *Legionella pneumophila* 130b, a partir del cual haremos las comparaciones múltiples, ya que este gen presenta muchas variantes.

No obstante, el concepto de regulación de los sistemas de captación de hierro se está volviendo más complejo con los recientes hallazgos de regulación positiva del transporte de hierro y genes biosintéticos de sideróforos, en lugar de solo la activación mediada por la disminución de la disponibilidad de hierro en el citosol celular. Además, también se ha demostrado en *V. anguillarum* que el control negativo de la expresión del gen de captación de hierro no se debe solo a la represión del inicio de la transcripción por un complejo de Fur con hierro, sino también a la regulación postranscripcional por ARN antisentido que actúa como mecanismo de control de ajuste.

La secuencia del gen fur se ha obtenido a partir del organismo modelo *Legionella pneumophila* 130b, mediante la base de datos del NCBI. Se encuentra descrita en el anexo I.

2.2. Análisis comparado de las secuencias de los genes seleccionados

La comparación de secuencias es una excelente herramienta para descubrir parecidos causados posiblemente por la existencia de una función común. Una similitud alta entre dos secuencias puede ser indicativa de un rol biológico compartido. En ese caso, podríamos utilizar las propiedades conocidas sobre una secuencia para documentar otras menos estudiadas. El alineamiento puede ser útil para señalar aquellas regiones implicadas en el desempeño de la función conservada (por ejemplo, dominios de proteínas). Cuando evaluamos la similitud entre secuencias de diferentes especies, estamos investigando la existencia de una posible secuencia ancestral común a partir de la cual podrían haber derivado éstas en el pasado. Es a partir de la especiación de dicho ancestro cuando podríamos explicar biológicamente la similitud observada entre dos especies estudiadas. Esta constatación permitiría definir nuevas relaciones de homología. El alineamiento resultante representa, por tanto, un punto de partida adecuado para descubrir la sucesión de cambios ocurridos entre dos secuencias a lo largo de la evolución.

Fundamentalmente, disponemos de dos clases de alineamientos, globales y locales, para efectuar la comparación de nuestras secuencias. Según la opción escogida, los resultados pueden ser diametralmente distintos, proporcionando puntos de partida diferentes para la elaboración de posteriores hipótesis científicas (figura 2).

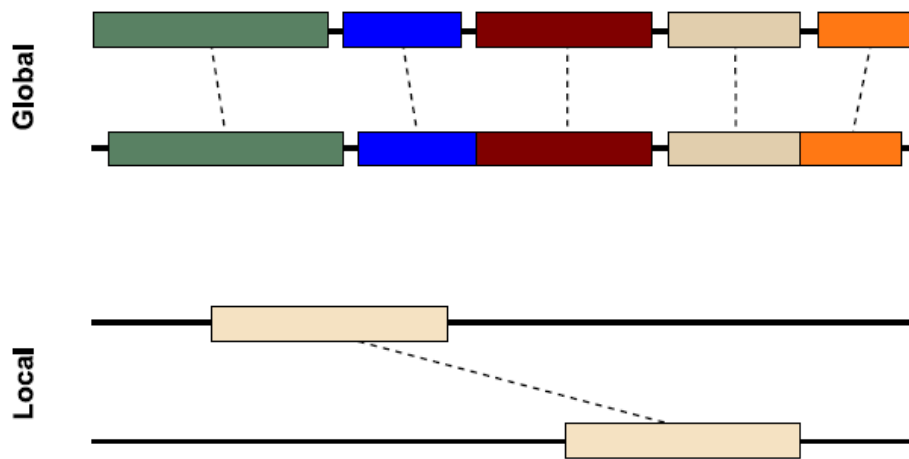


Figura 2. Alineamiento local y global.

Aquellas secuencias que codifican elementos con una función biológica parecida probablemente poseen un tamaño y una estructura similares. Por ejemplo, las regiones genómicas codificantes del mismo gen pertenecientes a dos especies diferentes o las secuencias de aminoácidos de dos proteínas homólogas, presentarán necesariamente un alto grado de similitud. En función de la distancia evolutiva entre las especies comparadas, el parecido final resultante será más o menos acentuado. Para efectuar estas comparaciones, es preciso calcular un alineamiento global que recubra la práctica totalidad de las secuencias. El alineamiento global de dos proteínas homólogas permite asociar en la práctica a cada residuo su equivalente en el otro organismo. Dada la alta homología entre las dos proteínas, la longitud de ambas es idéntica. En cambio, las regiones reguladoras de la transcripción de cada gen, por ejemplo, poseen una configuración única de sitios de unión para algunos factores de transcripción que permite que la célula gradúe la actividad de dicho gen. Todas estas regiones integran en su interior una mezcla diferencial de diversos elementos funcionales. La comparación global de esta clase de secuencias, sin embargo, no arroja nuevo conocimiento, dado que, en general, su contenido no está altamente conservado. Para distinguir aquellos fragmentos más similares del resto es preciso efectuar un alineamiento local.

Por lo tanto, en el global se intenta que el alineamiento cubra las dos secuencias completamente introduciendo los gaps que sean necesarios, mientras que en el local se alinean sólo las zonas más parecidas. El global sirve para alinear secuencias que empiecen y acaben en la misma región, por ejemplo genes homólogos de especies similares. El alineamiento local suele ser la mejor opción, a no ser que se esté seguro de que las secuencias deben de parecerse a lo largo de toda su extensión. En muchos casos las secuencias homólogas se parecen sólo en las regiones más conservadas. El límite para las secuencias de proteínas está alrededor del 25% de identidad.

En este apartado vamos a servirnos de las herramientas bioinformáticas BLAST y CLUSTAL para realizar las comparaciones múltiples pertinentes entre los genes seleccionados de los diferentes géneros bacterianos. Por lo tanto, el procedimiento va a ser el siguiente: en primer lugar, se buscará la secuencia de cada gen seleccionado en la base de datos del NCBI (phz, fur, chiA y acdS) para cada uno de los géneros bacterianos seleccionados que poseen características propias de agentes de biocontrol contra fitopatógenos (*Pseudomonas*, *Bacillus*, *Serratia*, *Pasteuria* y *Stenotrophomonas*). A continuación, se realizará un alineamiento frente a la secuencia que se ha tomado como referencia, mediante CLUSTAL. Si la secuencia del gen no ha sido anotada y secuenciada para alguna cepa de alguno de los géneros, se llevará

a cabo un BLAST de la secuencia de referencia frente al genoma de la cepa modelo del género. De este modo, podremos rastrear si hay alguna coincidencia.

La familia de programas BLAST (del inglés basic local alignment search tool, herramienta de búsqueda de alineamientos locales básicos) es el representante más popular de procedimientos heurísticos de alineamientos locales. La ganancia en términos de velocidad de ejecución lograda por las búsquedas implementadas con BLAST está causada por una aproximación diferente al problema del alineamiento. En lugar de realizar comparaciones con las secuencias completas, BLAST identifica primero aquellos fragmentos de nuestra secuencia de interés (denominada query o interrogación) que podrían generar alineamientos prometedores con ciertas secuencias de la bases de datos. Una vez localizadas estas semillas, BLAST hace crecer cada posible alineamiento en ambas direcciones evaluando simultáneamente la calidad del resultado.

CLUSTAL dispone de diferentes herramientas para realizar los alineamientos, pueden ser globales o locales y alineamientos por pares o múltiples, en función de ello se debe utilizar un programa u otro. Si realizamos alineamientos globales dos a dos, emplearemos la herramienta Needle EMBOSS que utiliza el algoritmo de alineamiento de Needleman-Wunsch para encontrar la alineación óptima (incluidos los gaps) de dos secuencias en toda su longitud. Si realizamos alineamientos locales, nos serviremos de EMBOSS Water que usa el algoritmo de Smith-Waterman (modificado para mejorar la velocidad) para calcular la alineación local de una secuencia con una o más secuencias diferentes.

Fenazinas – gen phz

En primer lugar, vamos a hacer un alineamiento de nuestra secuencia de referencia en *Pseudomonas* contra la cepa *Bacillus megaterium* strain BP17 para la cual hemos hallado la secuencia del gen phz7, que se encuentra dentro de la familia de genes de las fenazinas (anexo I). Como no sabemos si las secuencias se parecen en toda su extensión, se va a realizar un alineamiento local dos a dos mediante EMBOSS Water.

```

*
# Aligned_sequences: 2
# 1: KY678217.1
# 2: JX843733.1
# Matrix: EDNAFULL
# Gap_penalty: 10.0
# Extend_penalty: 0.5
#
# Length: 587
# Identity:      219/587 (37.3%)
# Similarity:   219/587 (37.3%)
# Gaps:         295/587 (50.3%)
# Score: 285.0
#
#
#=====
KY678217.1      5 TCGATGCGTTTTCCGCC-----GAACCA---TTCGGGGGCAACCCG---- 42
   ||..||  |||||..|  |||..|  |||...|.|.||..|
JX843733.1     19 TCCAT--GTTTTCTATCAGTTTGAATATTTTTCTTTGTCTACATGTATC 66

KY678217.1     43 -----GCGGC----AGTGATCCCGCTGCAAAGCTGGCTGCCGGAC---G 79
   ||..||  |.||||  |.|  ||||  ||||  .
JX843733.1     67 TCTTAGCAGCTTCTAATGAT---GTT--AAAG-----GGACAAGA 102

KY678217.1     80 ATGTGCTGCAGCGCATCGCCGAAGAGAACAACCTGTCGGAAACCGCTAC 129
   |||..|.||||  |||..||  |||  |||
JX843733.1    103 ATGACCGGCAG-----ACCGGT-GGA-----TAC 125

KY678217.1    130 TTCGTGCGCAACGGCGAAACC-----TTTGACCTGCGCTG 164
   |||..||  |||||  ||||..|  |||..|.  ..|
JX843733.1    126 TTCTTG---AACGG-GAAAACGCATATCAATATAAGTTTCATC----AAG 167

KY678217.1    165 GTTCACCCCGACCGTGAAGTCGACCTGTGCGGCCATGCCACCTTGGCCT 214
   |||..|.|.||..||  |||||
JX843733.1    168 GTTTAACACGTCC-----GCCACC----- 186

KY678217.1    215 CGGCCTATGTGCTGT---TCGAACAGCTGGGCGAGCAGGCGCAGGTACGG 261
   ||||..|  ||..||||
JX843733.1    187 -----TGCTTTTTATCTAACA----- 202

KY678217.1    262 CGTTTCAACACCCGCACT-GGC-GAGCTGCGCGTCAGCCGCAACGCCGAC 309
   |..||..|.||  ||  |||  ||..|  |..||||..||..||
JX843733.1    203 CTTTCCCAAAC-----GTCGGCTGACCT-TGTGTCATCCACA----- 238

KY678217.1    310 GGGCTGCTGGCCATGGACTTCCGGCCAAGCAGCCGGTCGCCGTGGATAT 359
   |..|||  ||||..|.||  |||  ||
JX843733.1    239 -----GTACAT---CTTTTGTTC-----TCG-----TA- 260

KY678217.1    360 GCTGCCGGGCTGTTGTCAGGCGCCGGGCTTGGCCAGGCACAGGCGCTGT 409
   |||..|.|||||..|.||..||  |||..|
JX843733.1    261 -----TGTAACAGGCGTAGGACCT-----GCTTT 284

KY678217.1    410 ACCGCAGTGACGACTACGTGGTGGTGATCGATGACGCCTTGTGCTCGAC 459
   |  |..|.|||..||..||  |..|||
JX843733.1    285 A---TAATGAAGAGTA-----AGCTC--- 302

KY678217.1    460 ACCCTGCAGCCGGACTTCGTTGCGCTATCGGCCTC--GATGTGCGCGG- 506
   |..|||..|.  ||..||  ||||  |..|.|.|||
JX843733.1    303 -CTCTGTATC-----TCTTT-----CTTCTAGTTCTTCTCGGA 334

KY678217.1    507 ---CATCGCCGTTACCGCGGCAGGGCGTGGCTTTGAT 540
   |||..|.||..|||  |..||||..|  |||
JX843733.1    335 TAACATAAGCGGTACC-----GAGCGTCG----GAT 361

```

Figura 3. CLUSTAL de *Pseudomonas* vs. *Bacillus megaterium*

Se observa que hay un 37% de similitud entre secuencias, por lo que se pueden concluir con que sí que hay homología de secuencia y que, por tanto, las proteínas codificadas por estos genes dan lugar a proteínas con función similar u homóloga. Además, encontramos las regiones con mayor alineamiento tanto al principio como al final de la secuencia, regiones que deben tener función reguladora y que suelen ser las más conservadas. Esto indica que sí hay una relación filogenética próxima para el gen de las fenazinas.

En el caso del resto de géneros bacterianos no se ha encontrado la anotación de los genes de la familia de las fenazinas (phz). Así que vamos a hacer un BLAST de nuestra secuencia de referencia de *Pseudomonas* contra el genoma de cada especie bacteriana en cuestión, de modo que vamos a interrogarlo en busca de una posible coincidencia. Vamos a aplicar la herramienta de Megablast discontinuo, esta herramienta utiliza una semilla inicial que permite que se produzcan algunos mismatches y está destinada a comparaciones entre especies.

El BLAST frente al género *Serratia* dio como resultado 4 coincidencias con la secuencia del gen phz de referencia, se trataba de cepas de *S. fonticola* y *S. plymuthica*. Todas las coincidencias presentaban más de un 25% de identidad. Se observa que donde más coincidencias hay es el núcleo central, de la base 1 a la 230 de la secuencia de *Pseudomonas*.

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident
Serratia fonticola strain GS2, complete genome	73.4	73.4	24%	1e-11	71%
Serratia fonticola strain DSM 4576, complete genome	73.4	73.4	39%	1e-11	67%
Serratia fonticola strain FDAARGOS_411 chromosome, complete genome	68.0	68.0	39%	6e-10	67%
Serratia plymuthica strain 3Rp8, complete genome	44.6	44.6	21%	0.007	68%

Serratia fonticola strain DSM 4576, complete genome
Sequence ID: [CP011254.1](#) Length: 6000511 Number of Matches: 1

Range 1: 1349040 to 1349269 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
73.4 bits(80)	1e-11	154/230(67%)	0/230(0%)	Plus/Minus

Features: [PhzF family phenazine biosynthesis protein](#)

Query	1	CAGGTCGATGCGTTTTCCGCGGAACCAATCGGGGGCAACCCGGCGGCACTGATCCCCTG	60
Sbjct	1349269	CATGTGGATGCTTTATCGGCGAGGGACTGCGGGCAACCCGGCGGTGTCTGCTGCTG	1349210
Query	61	CAAAGCTGGCTGCCGGACGATGTGCTGCAGCGCATCGCCGAAGAGAACAACCTGTCCGAA	120
Sbjct	1349209	CAACAACCGCTGGAGGCGGCGCAGATGCAGGCCATCGCCAACGAGCTGAACCTGCCGAA	1349150
Query	121	ACCGCTACTTCGTGCGCAACGGCGAAACCTTTGACCTGCGCTGGTTCACCCCGACCGTG	180
Sbjct	1349149	ACCAGTTTTGTCTGGCAGGATGGTGATATGTACGGATCCGCTGGTTCACGCCAACCGGG	1349090
Query	181	GAAAGTCGACCTGTGCGGGCCATGCCACCTTTGGCTCGGGCTATGTGCTGTT	230
Sbjct	1349089	GAAAGTGATCTGTGCGGGCATGCTACTTTGGCTCGGGCGCACGTGCTGTT	1349040

Figura 4. BLAST phz frente a *Serratia*.

Los BLAST frente al género *Pasteuria* y *Stenotrophomonas* no dieron ninguna coincidencia, esto puede significar que, o bien no producen fenazinas, o bien sí que las producen pero poseen genes que han divergido mucho con respecto a los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus*. Esto se podrá aclarar una vez se establezcan las relaciones filogenéticas.

Chitinasas – gen chiA

Tal y como se ha procedido en el caso de las fenazinas, vamos a servirnos de la herramienta de alineamientos múltiples CLUSTAL y de BLAST para tratar de observar las coincidencias y la identidad entre las diferentes especies de bacterias. En primer lugar, utilizamos EMBOSS

Water para alinear el gen que hemos tomado como referencia de *Serratia* para las chitinasas con las respectivas secuencias en *Pseudomonas aeruginosa* y *P. fluorescens* que hemos obtenido de la base de datos del NCBI (anexo I). Se observa que hay un 48% de identidad y un mayor score para el primer caso (*P. aeruginosa*), mientras que para el segundo hay una identidad del 47% (*P. fluorescens*). En ambos casos, las regiones más conservadas se encuentran hacia el final de la secuencia, que se corresponde con el extremo 3'UTR, una región reguladora. De este modo, podemos decir que entre *Pseudomonas* y *Serratia* el gen de la chitinasa sí que presenta homología de secuencia, por lo que podría estar relacionado filogenéticamente y tener un origen común.

Para el género *Bacillus*, hemos escogido las secuencias del gen *chiA* para las especies *Bacillus subtilis* y *B. licheniformis*. Se han alineado las tres secuencias a la vez mediante la herramienta Clustal Omega. En la matriz de identidad se observa que *B. subtilis* tiene una identidad del 42% con respecto a *Serratia* y que *B. licheniformis* un 43%, mientras que entre ellas dos hay una identidad del 82%, como es lógico, ya que son del mismo género. A continuación, empleamos una vista gráfica de la homología entre secuencias mediante la herramienta MView.

```
#
# Percent Identity Matrix - created by Clustal2.1
#
#
1: DQ165083.1 100.00 41.81 42.89
2: KM249883.1 41.81 100.00 81.72
3: FJ465148.1 42.89 81.72 100.00
```

Figura 5. Matriz de identidad *Serratia* vs. *Bacillus*.

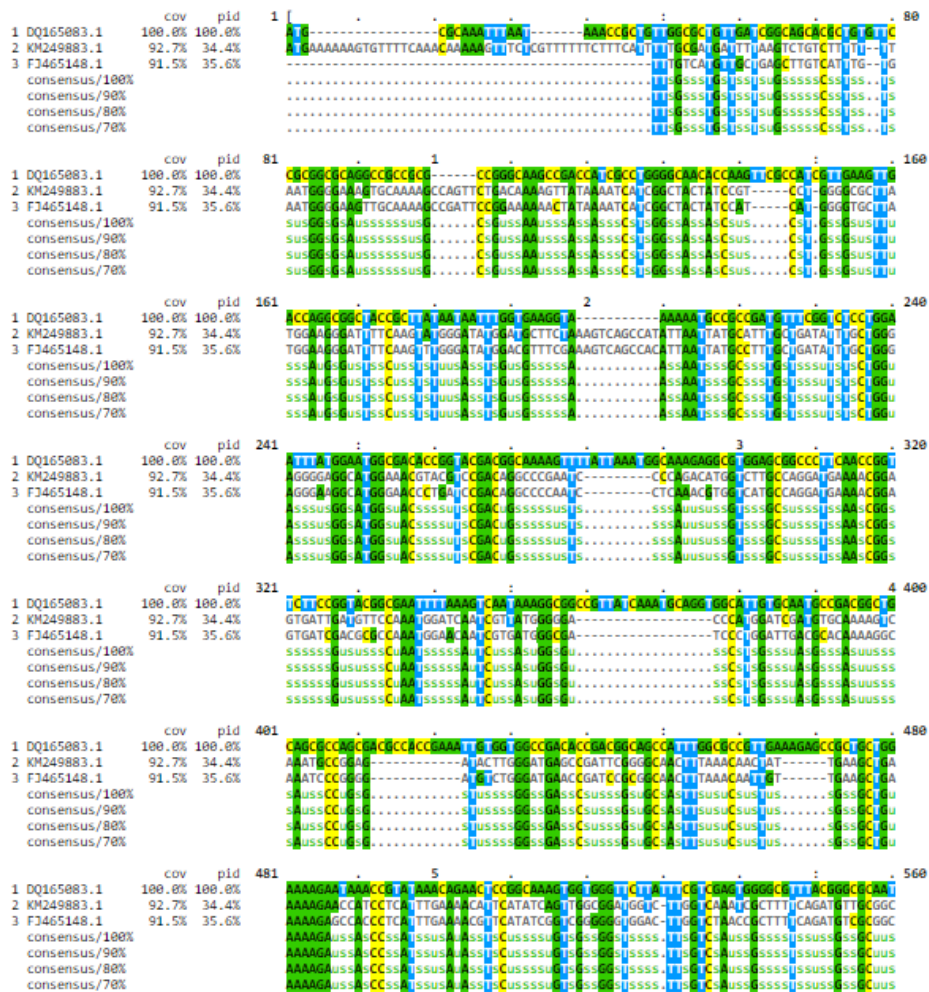


Figura 6. MView de identidad *Serratia* vs. *Bacillus*.

Seguidamente, hemos buscado la secuencia del gen *chiA* para alguna cepa del género *Pasteuria*. Tras no encontrar ninguna, hemos realizado un BLAST con la secuencia de referencia de *Serratia* para interrogar al genoma completo de *Pasteuria*. No se ha encontrado ninguna coincidencia.

Con respecto a *Stenotrophomonas*, se halló la secuencia del gen *chiA* para la especie *S. maltophilia* en la base de datos del NCBI (anexo I), por lo que se enfrentaron ambas secuencias mediante un CLUSTEL. Se encontró una identidad de secuencia del 47%, es decir, ambas secuencias codifican para proteínas homólogas o de función similar, que pueden tener un mismo origen. Además, el score obtenido es alto, por lo que se trata de un buen alineamiento. Se observa homología de secuencia en todas las regiones del gen por igual.

```

#
# Aligned_sequences: 2
# 1: DQ165083.1
# 2: AB973459.1
# Matrix: EDNAFULL
# Gap_penalty: 10.0
# Extend_penalty: 0.5
#
# Length: 2261
# Identity: 1063/2261 (47.0%)
# Similarity: 1063/2261 (47.0%)
# Gaps: 886/2261 (39.2%)
# Score: 2885.0
#
#
#=====
DQ165083.1 1 ATGCG-----CAA-ATTTAATAAACCGCTGTTGGCG-----CTGTTGA 37
|||.|| | | | | | | | | | | | | | | | |
AB973459.1 156 ATGGGACCAGGCCAAGATCT-----ACCGCAG-TGGCGACACCCT----- 194

DQ165083.1 38 TCGGCAGCAGCGCTGTGTTCCGC-----GGCG---CAGGCCGCC-----G 73
|||.|||.|||.|||.|||.|||.|||.|||.|||.|||.|||.|||.|||.|||.
AB973459.1 195 ---GCAGAAAGGGAGGGGTCTCTACCGGGCGAACCCAGGACATCTGGAATG 241

DQ165083.1 74 CGCCGGGCAAGCC-GACCATC--GCCTGGGG-----CAACACCAAGTT 113
||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
AB973459.1 242 CGCC-----GCCGGACCATCCGGCC-GGGGCGCCCTACTACACCAACCT 284

DQ165083.1 114 CG-----CCATC-----GTTGAAGTTGA 131
|| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
AB973459.1 285 CGGCGCCTGCAGCGCGCGGGACCAACAGCCGCCCGTGGTCAGCCTGA 334

DQ165083.1 132 CC-AGGCGGCTACCG-----CTT-----ATAATAATTTGGTGA 163
|||.|||.|||.|||.|||.|||.|||.|||.|||.|||.|||.|||.|||.
AB973459.1 335 CCTCGCCGGCCCAACGGCGCCACCTTCAGCGCCGGCAGCA-----CGGTCA 379

DQ165083.1 164 AGGTAAAAAATGCCGCCGA-----TGTTTCGGTCTCC----- 195
|.|||.|| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
AB973459.1 380 ACGTGA-----CCGCCAACGCCAGTGATGCGGACGGCAGCGTCAGCAAG 423

DQ165083.1 196 -TGGAATT-----TATGGAA-----TGG---CGACACCGGTACGAC 227
|.|||.|| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
AB973459.1 424 GTCGAGTCTTCCGGCATGGCAGTTCGCTGGGCGTCCGACACCGCGCGCC 473

DQ165083.1 228 GGCAAAAGTTTTATTAAA-----TGG--CAA---AGAGGCG----- 258
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
AB973459.1 474 G-----TACAGCGCCAGCTGGGCCAACGCCAGCGCCGGCAGC 510

DQ165083.1 259 -----TG-GAGCGGCC-----CTTCAAC--CGGTTCTTCCGGTAC 290
|||.|||.|||.|||.|||.|||.|||.|||.|||.|||.|||.|||.|||.
AB973459.1 511 CACACCCTGCGCGCGGTCCGCCACCGACAACAACAACGCCACCGCCAGCAC 560

DQ165083.1 291 GGCGA--AT----TTTAAAGTCAATAAAGCGGC-----CGTTATCA-- 326
-||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
AB973459.1 561 CGCGACCATCACCATCACCCTC---AACCGCGCCAGTGGCGATACCACC 606

DQ165083.1 327 -----AATG-CAGGTGGCATTG-----TGCAATGCCGACGG 356
..|| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
AB973459.1 607 GCGCCAGCGTCCCGGTGGCTGGCCGTGGGTACCCGCA---CCGCCAG 653

DQ165083.1 357 CTGCAGCGCC---AGC--GA---CG-CCACCGA-----AATTGTG----- 387
|.|||.||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
AB973459.1 654 CAGCATCGCCCTGAGCTGGAGCCCGTCCACCGACAACACCGGTGGCAGCG 703

```

Figura 7. CLUSTAL de *Serratia* vs. *Stenotrophomonas*.

1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminasa – gen *acdS*

De nuevo, vamos a tratar de hacer análisis comparado del gen *acdS* para los diferentes géneros bacterianos que son potenciales como agentes de biocontrol contra fitopatógenos. En este caso, la secuencia de referencia la tomamos de *Mesorhizobium*.

Empleamos Clustal Omega para realizar el alineamiento múltiple, donde enfrentamos los genes para ACC desaminasa de *Pseudomonas*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* y *Stenotrophomonas acidaminiphila* frente a la secuencia de referencia *acdS*. En la matriz de identidad se observa lo siguiente (KT216610.1= *S. acidaminiphila*; KT216607.1 = *B. cereus*; KR069056.1 = *B.subtilis*; EU520401.1 = *Pseudomonas*; KR154567.1 = *Mesorhizobium*): *B. cereus* presenta un 45% de identidad, *Pseudomonas* un 65%, *B. subtilis* un 64% y *S. acidaminiphila* un 45%. Debe destacarse el gran porcentaje de identidad que presentan las secuencias de *B. cereus* y *S. acidaminiphila* entre ellas (99%).

```
# Percent Identity Matrix - created by Clustal2.1
#
#
1: KT216607.1 100.00 98.95 40.55 44.74 43.51
2: KT216610.1 98.95 100.00 39.20 45.43 43.96
3: KR069056.1 40.55 39.20 100.00 63.79 65.30
4: KR154567.1 44.74 45.43 63.79 100.00 64.73
5: EU520401.1 43.51 43.96 65.30 64.73 100.00
```

Figura 8. Matriz de identidad *Mesorhizobium* vs. resto de géneros.

Por lo tanto, en todos los casos hay homología de secuencia, por lo que el gen para la ACC desaminasa podría tener un origen común para todos estos géneros.

A continuación, puesto que para los géneros *Serratia* y *Pasteuria* no se ha encontrado ninguna secuencia anotada para el gen en cuestión en ninguna base de datos, se procedió a interrogar su genoma completo mediante un BLAST. En el caso de *Pasteuria*, no se encontró ninguna coincidencia, mientras que para el género *Serratia* se hallaron 3. En los tres casos, se observó un buen porcentaje de identidad, por lo que podría tratarse también de una proteína con función homóloga.

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

[Alignments](#) [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident
<input type="checkbox"/>	Serratia rubidaea AcdSPB1 1-aminociclopropano-1-carboxylic acid deaminase (acdS) gene, partial cds	221	221	95%	6e-56	68%
<input type="checkbox"/>	Serratia sp. ATCC 39006 chromosome, complete genome	62.6	62.6	29%	3e-08	67%
<input type="checkbox"/>	Serratia sp. ATCC 39006 chromosome, complete genome	62.6	62.6	29%	3e-08	67%

Figura 9. BLAST de *Mesorhizobium* vs. *Serratia*.

Sideróforos – gen *fur*

Como en los casos anteriores, hemos buscado las secuencias homólogas del gen *fur* en la base de datos del NCBI. Esta vez, la secuencia de referencia sobre la que se realizaron las comparaciones fue el gen *fur* de una cepa de *Legionella*. La secuencia del gen *fur* solo fue encontrada en el género *Pseudomonas putida*. Así que se realizó un alineamiento dos a dos entre ambas secuencias. El porcentaje de identidad que se encontró fue del 48% y las regiones más similares estaban en la región central del alineamiento.


```

# Aligned_sequences: 2
# 1: U06072.1
# 2: X82037.1
# Matrix: EDNAFULL
# Gap_penalty: 10.0
# Extend_penalty: 0.5
#
# Length: 763
# Identity:   372/763 (48.8%)
# Similarity: 372/763 (48.8%)
# Gaps:      264/763 (34.6%)
# Score: 688.0
#
#
#=====
U06072.1      12  CGGC-----CAGAC----TAAGTTTTAAGGCCGCTAATGGTT-TTT      47
      ||| |          |||. |   ||. | .|. ||| |          ||| | | | . . .
X82037.1      18  CGGCGAGTGCAGCAGTCCCATAGG--GTGAGGC-----TGTTGACA      59

U06072.1      48  AGAGCATGAAAATTATTTTAGGCCTTGAT--GCTAATT--ATTAATCCAA      93
      ||| | | | | | .|. | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
X82037.1      60  AGAGCTTG----GTGTTTT--GCATCGGTGGCGACTTGACTA-----      97

U06072.1      94  TTTTGCTGGA----ATAA---TGATCAAAGCTCGAAATTCGTTACAGTTA      136
      |. |. | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
X82037.1      98  -TCTTCTGGACAACGTAACCCCGATCATA-CCCGA-----TTG      133

U06072.1     137  AGGAGCACAAAGTG-GAAG-AGAGTCAACAGTTAAAA---GACGCTGGAT      180
      ||. | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
X82037.1     134  AGAAGC-----TGCGAAGCAG---CATCGGCGAGAAAGCTGACCATGG-T      174

U06072.1     181  TAAAAAT--CACATTAC-----CTCGTATCAAGGTAT----TGC-----      213
      |. | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
X82037.1     175  TGAATAATAGCGAATTACGCAAAGCCGGTCTCAAGGT-TACCCTGCCTCGA      223

U06072.1     214  --AAATAT-----TG-----GAGCAATCAAGAAACCATCA      241
      ||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
X82037.1     224  GTAAGATCCTTCAGATGCTCGACTCTACCGAGC-----AGCGTCA      264

U06072.1     242  TTTGAGTGCAGAAGCAGTCTAT-AAAGCCTTATTGGAATCGGGTGAGGAT      290
      .. | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
X82037.1     265  CATGAGTGCCG-AGGAGTGTATCAAGGCCCTTGATGGAAGCTGGTGAGGAC      313

U06072.1     291  GTTGGTTTAGCTACTGTGTATAGAGTCTTACTCAATTTGAAGCAGCGGG      340
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
X82037.1     314  GTTGGCCTGGCCACCGTCTACCGCGTGTGACCCAGTTCGAAGCGGCGGG      363

U06072.1     341  ATTAGT--ATCGAGACATAATTTTGAAGGAGGACACTCGGTATTTGAGTT      388
      .. |. | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
X82037.1     364  GCTGGTGGTTC--GCCACAACCTCGACGGCGGCCACGCAGTCTTCGAGCT      411

U06072.1     389  GTCTCAAGGCGAACATCATGACCATCTTGTGTGTTAAGTGTGG-----      433
      |. |. |. | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
X82037.1     412  GCGGATGGCGGTCAACACGACCA-CATG-----GTCAA-CGTGGAAACC      454

U06072.1     434  -GCGGGTAGAG-----GAATTTGTAGA---TGAAATAATAGAACAAGAC      474
      ||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
X82037.1     455  AGCG---AAGTCATCGAGTTCATGGACGCTGAAAT-----C      487

U06072.1     475  AAAAAAGCAATTGCCGAACGCGCTCATTTTAAAATGACAGATCATGCCGTA      524
      . | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
X82037.1     488  GAGAAGC----GTC-AGCGCG-----AGATCGTG-GCCG      515

```

Figura 10. CLUSTAL de *Pseudomonas putida* sobre *Legionella pneumophila*.

Con respecto al resto de géneros bacterianos que hemos escogido para nuestras comparaciones múltiples, se procedió a realizar un BLAST para ver si se hallaba alguna coincidencia del gen fur de *L. pneumophila* frente a los diferentes genomas. En el caso de *Serratia*, se hallaron varias coincidencias, al igual que en el caso de *Stenotrophomonas*. Mientras que, al interrogar los genomas de *Bacillus* y *Pasteuria* con la secuencia de *Legionella*, no se halló ninguna coincidencia. Por lo tanto, estos dos géneros, en principio no comparten homología para este gen, puede deberse a que no se encuentren anotados o a que realmente tengan un origen diferente.

Sequences producing significant alignments:
 Select: [All](#) [None](#) Selected: 0
 Alignments [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident
<input type="checkbox"/> Serratia sp. ATCC 39006 chromosome, complete genome	73.4	73.4	31%	2e-11	69%
<input type="checkbox"/> Serratia sp. ATCC 39006 chromosome, complete genome	73.4	73.4	31%	2e-11	69%
<input type="checkbox"/> Serratia symbiotica str. 'Cinara cedri', complete genome	73.4	73.4	37%	2e-11	68%
<input type="checkbox"/> Serratia symbiotica SCI-VLC genomic scaffold_15	41.0	41.0	35%	0.098	65%
<input type="checkbox"/> Serratia fonticola strain DSM 4576, complete genome	37.4	37.4	33%	1.2	64%
<input type="checkbox"/> Serratia sp. FGI94 chromosome, complete genome	35.6	35.6	24%	4.2	66%

Figura 11. BLAST de *Legionella* frente a *Serratia*.

Sequences producing significant alignments:
 Select: [All](#) [None](#) Selected: 0
 Alignments [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident
<input type="checkbox"/> Stenotrophomonas nitritireducens strain 2001, complete genome	44.6	44.6	20%	0.003	67%
<input type="checkbox"/> Stenotrophomonas sp. KCTC 12332, complete genome	44.6	44.6	20%	0.003	67%

Figura 12. BLAST de *Legionella* frente a *Stenotrophomonas*.

2.3. Análisis filogenético.

Un árbol filogenético es una estimación de las relaciones entre los taxones o secuencias y sus hipotéticos antepasados comunes [40]. En la actualidad, la mayoría de los árboles filogenéticos se construyen a partir de datos moleculares: secuencias de ADN o proteínas. Originalmente, el propósito de la mayoría de los árboles filogenéticos moleculares era estimar las relaciones entre las especies representadas por esas secuencias. Sin embargo, hoy en día, han adquirido nuevos propósitos como la comprensión de las relaciones entre las secuencias sin tener en cuenta a las especies huéspedes, deduciendo funciones de genes que no se han estudiado experimentalmente. También ofrecen la posibilidad de descubrir nuevas asociaciones entre seres vivos que, en principio, no se encontraban filogenéticamente cercanos. Por ejemplo, en el caso de nuestro estudio, lo que buscamos es encontrar rasgos comunes entre microorganismos que pertenecen a diferentes géneros y especies, pero que comparten ciertas características, como la capacidad de comportarse como agentes de biocontrol contra fitopatógenos.

La construcción de un árbol filogenético requiere cuatro pasos: identificar y adquirir un conjunto de secuencias homólogas de ADN o proteína, alinear esas secuencias, estimar un árbol de las secuencias alineadas, y presentar ese árbol de manera que transmita claramente la información relevante a los demás. En este caso, vamos a servirnos de MEGA (Análisis de Genética Evolutiva Molecular) para realizar nuestro análisis filogenético. MEGA es un programa informático para realizar análisis estadísticos de la evolución molecular y para

construir árboles filogenéticos. Incluye muchos métodos sofisticados y herramientas para filogenómica y filomedicina.

El método empleado para el alineamiento fue MUSCLE (MULTiple Sequence Comparison by Log-Expectation), que es un programa informático para la alineación múltiple de secuencias de proteínas y nucleótidos. Al tratarse de una secuencia de ADN, hay dos opciones: Alinear ADN y Alinear codones. Si nuestra secuencia fuera de ADN codificante, debería escogerse la opción de Alinear codones. Esto asegura que las secuencias estén alineadas por codones, un enfoque mucho más realista que la alineación directa de las secuencias de ADN, porque eso evita la introducción de huecos en las posiciones que darían lugar a cambios de marco en las secuencias reales. Sin embargo, nuestras regiones, en muchos casos, contienen codones de stop, por lo que se escogió la opción de Alinear ADN. También debe apreciarse que, así como un árbol filogenético es una "estimación" de las relaciones entre las secuencias, una alineación es solo una estimación de las posiciones de las inserciones y eliminaciones históricas. La calidad de la alineación puede afectar la calidad del árbol filogenético.

En cuanto a la estimación del árbol, hay varios métodos ampliamente utilizados para estimar árboles filogenéticos (Neighbor Joining, UPGMA Maximum Parsimony, Bayesian Inference, y Maximum Likelihood [ML]). En nuestro estudio, se empleó el método NJ, un método basado en matrices de distancias, ya que es un método muy utilizado en las filogenias de secuencias. Los árboles que genera no son ultramétricos, es por lo tanto el más recomendable si no estamos seguros de que se cumple la hipótesis del reloj molecular, es decir si esperamos que distintas ramas puedan haber evolucionado a distinta velocidad. El algoritmo NJ fue creado por Saitou & Nei (1987) y consiste en generar un único "árbol filogenético" final, el cual, según los autores, no necesariamente será el "árbol verdadero". En el paso inicial, se unen los dos neighbors (secuencias) que tengan la menor distancia genética. Luego, este par inicial se considera como una sola entidad, y se busca el siguiente terminal que tenga la menor distancia genética con este. El procedimiento continúa hasta unir todos los terminales al "árbol filogenético". En el caso de secuencias de ADN, la distancia genética entre dos terminales se calcula en base al número total de sustituciones de bases nitrogenadas, es decir, en el número de bases nitrogenadas que son diferentes en estas dos secuencias. Para seleccionar los terminales que tengan menor distancia genética, lo que en la práctica es escoger las secuencias más parecidas, es necesario construir una matriz estándar de distancias entre todas las posibles combinaciones de terminales. Entonces se construye el "árbol filogenético" agregando terminales tomando como información los valores de la matriz de distancias [41].

Un árbol no tiene demasiada utilidad si no evaluamos su significación estadística. Un método filogenético siempre generará un resultado a partir de cualquier conjunto de datos, pero esto no implica que este resultado sea fiable. De algún modo debemos decidir en qué nodos del dendograma podemos confiar y en cuáles no. Uno de los métodos más utilizados es el bootstrap. Este método se puede aplicar a todos los métodos y consiste en crear réplicas de los alineamientos a partir del original, eliminando cierto número de posiciones al azar en cada réplica. El número final de posiciones se mantiene constante, añadiendo duplicaciones de los sitios que han permanecido. Para cada una de estas réplicas aplicaremos el método de reconstrucción filogenética y generaremos un árbol. El paso final será evaluar para cada nodo el porcentaje de árboles en los que aparece. Los nodos con un alto valor de bootstrap tienen, si se cumplen las asunciones del método utilizado, una probabilidad alta de ser correctos mientras que los que tienen un bajo valor de bootstrap podrían haberse generado simplemente por azar. Un valor de bootstrap mayor de 70, es considerado como fiable. Por lo tanto, en el árbol filogenético, los valores de arranque indican cuántas veces de cada se observó la misma rama al repetir la reconstrucción filogenética en un conjunto re-muestreado de los datos.

Analisis filogenético del gen phz

Para realizar el análisis filogenético de la secuencia del gen de las fenazinas seleccionado (phzF) dentro del cluster de genes codificantes para esta proteína, se añadieron más secuencias homólogas de este gen en diferentes microorganismos, para poder llevar a cabo el análisis de bootstrap (se necesitan 4 taxones). Se observa, lógicamente, que las dos especies de *Pseudomonas* son las más próximas filogenéticamente y que ambas presentan un ancestro común con la cepa de *Bulkholderia*. Este género también presenta algunas especies que se han considerado como posibles agentes de biocontrol contra fitopatógenos, como *Bulkholderia multivorans* [7]. Los valores de bootstrap son fiables. En cambio, en el caso de la cepa de *Bacillus*, no se obtiene un valor significativo de bootstrap, es decir, se necesitaría un mejor alineamiento para obtener un valor más fiable. Además, en el árbol se observa que estas cepas de *Pseudomonas* no parecen tener ningún ancestro común con la cepa de *Bacillus* y que no se encuentran demasiado próximas filogenéticamente. Por tanto, podría decirse que *Pseudomonas* y *Bulkholderia*, para el gen phz7 de las fenazinas, son ortólogos, es decir, secuencias homólogas que se han separado por un evento de especiación. En el caso de *Bacillus*, esta especiación puede haber sido mayor y las secuencias para dicho gen presentan una mayor diferencia, por lo que no se trata de genes homólogos en cuanto a su secuencia, aunque sí con respecto a su función.

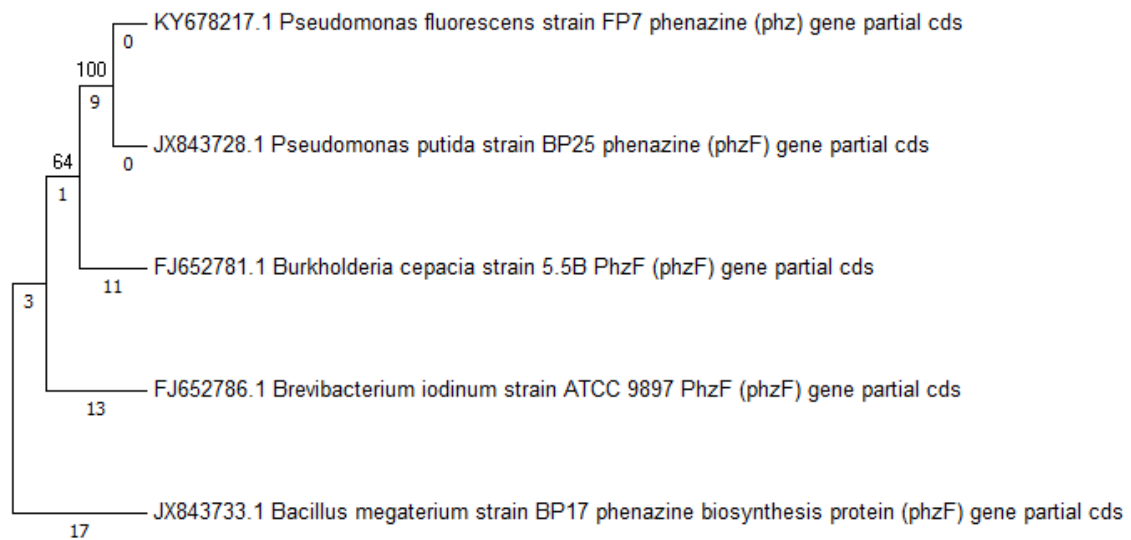


Figura 13. Relaciones evolutivas de las secuencias para el gen de la fenazina seleccionado dentro del cluster (phzF). La historia evolutiva se infirió utilizando el método de Neighbor Joining. Se muestra el árbol óptimo con la suma de la longitud de la rama = 53,60741030. El porcentaje de árboles replicados en el que los taxones asociados se agruparon en la prueba de bootstrap (500 réplicas) se muestran junto a las ramas. El árbol está dibujado a escala, con longitudes de rama en las mismas unidades que las distancias evolutivas utilizadas para inferir el árbol filogenético. Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de máxima verosimilitud compuesta y están en las unidades del número de sustituciones de bases por sitio. El análisis involucró 5 secuencias de nucleótidos. Se eliminaron todas las posiciones que contenían gaps y datos faltantes. Hubo un total de 251 posiciones en el conjunto de datos final. El análisis evolutivo se realizó con MEGA7.

Analisis filogenético del gen chiA

El análisis filogenético del gen chiA muestra como las dos especies de *Bacillus* y las dos de *Pseudomonas*, están muy cercanas filogenéticamente para dicho gen. Se observa, especialmente, como *Bacillus* se encuentra más alejada filogenéticamente del resto de géneros. Es decir, *Stenotrophomonas*, *Pseudomonas* y *Serratia* presentan una relación más estrecha entre ellas, sobretodo, las dos primeras, ya que el valor del bootstrap es fiable. En cambio, entre *Pseudomonas* y *Serratia*, la proximidad que se observa precisa de unos datos de alineamiento mejores para obtener un mejor valor de bootstrap. En cualquier caso, parece que para el gen chiA sí que hay un ancestro común para todos estos géneros microbianos, es decir, este gen podría caracterizar a las bacterias susceptibles de clasificarse como agentes de biocontrol contra fitopatógenos, al menos, a aquellas dentro de los géneros seleccionados para este estudio.

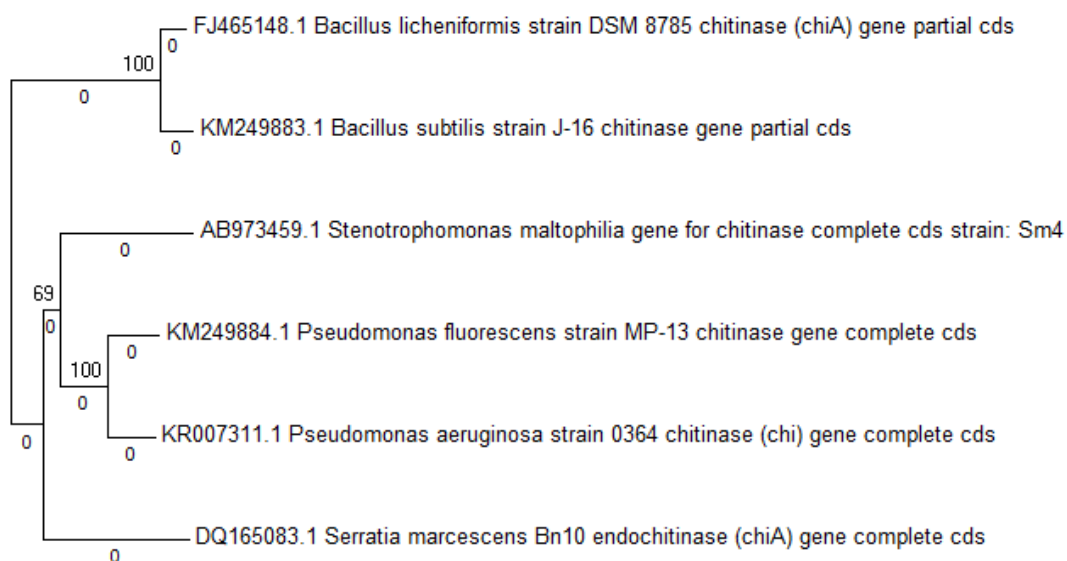


Figura 14. Relaciones evolutivas de las secuencias para el gen de la chitinasa seleccionado (chiA). La historia evolutiva se infirió utilizando el método de Neighbor Joining. Se muestra el árbol óptimo con la suma de la longitud de la rama = 2,17859380. El porcentaje de árboles replicados en el que los taxones asociados se agruparon en la prueba de bootstrap (500 réplicas) se muestran junto a las ramas. El árbol está dibujado a escala, con longitudes de rama (al lado de las ramas) en las mismas unidades que las distancias evolutivas utilizadas para inferir el árbol filogenético. Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de máxima verosimilitud compuesta y están en las unidades del número de sustituciones de bases por sitio. El análisis involucró 6 secuencias de nucleótidos. Se eliminaron todas las posiciones que contenían gaps y datos faltantes. Hubo un total de 851 posiciones en el conjunto de datos final. El análisis evolutivo se realizó con MEGA7.

Analisis filogenético del gen acc deaminasa (acdS)

El análisis filogenético del gen acc deaminasa muestra como, en este caso, especies pertenecientes al mismo género *Bacillus*, se encuentran alejadas filogenéticamente para el mismo gen, mientras que presentan mayor homología en su alineamiento con el gen homólogo en *Pseudomonas* y en *Stenotrophomonas*, respectivamente. Por un lado, se puede observar una rama compuesta por *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas sp.* y, por el otro, la rama compuesta por *B. cereus* y *Stenotrophomonas acidaminiphila*. Esto tiene sentido puesto que

las especies de la primera rama que se cita se han descrito bibliográficamente como potentes agentes de biocontrol con modos de acción muy parecidos. Por lo tanto, se observa que sí que existe una relación filogenética entre este grupo de microorganismos y que, probablemente presenten un ancestro común, así que el gen acc deaminasa podría tratarse de otro gen potencial para caracterizar agentes de biocontrol contra fitopatógenos.

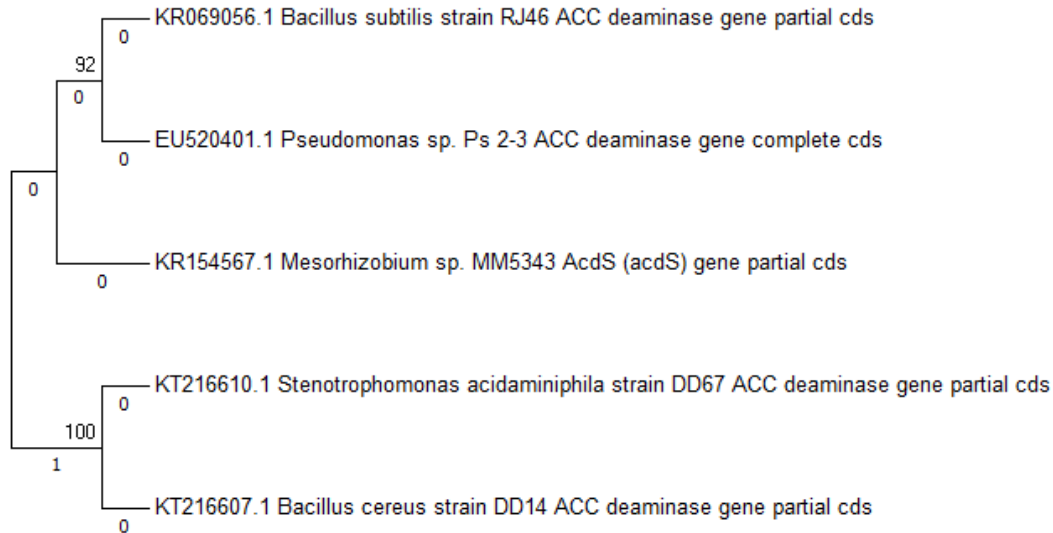


Figura 15. Relaciones evolutivas de las secuencias para el gen de la acc deaminasa seleccionado (acdS). La historia evolutiva se infirió utilizando el método de Neighbor Joining. El porcentaje de árboles replicados en el que los taxones asociados se agruparon en la prueba de bootstrap (500 réplicas) se muestran junto a las ramas. Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de máxima verosimilitud compuesta y están en las unidades del número de sustituciones de bases por sitio. El análisis involucró 5 secuencias de nucleótidos. Se eliminaron todas las posiciones que contenían gaps y datos faltantes. Hubo un total de 637 posiciones en el conjunto de datos final. El análisis evolutivo se realizó con MEGA7.

Analisis filogenético del gen fur

En el caso del gen fur, se emplearon secuencias proteicas en lugar de secuencias de DNA, ya que las secuencias de DNA no estaban anotadas en muchos casos para las bacterias seleccionadas para el estudio. Las secuencias proteicas se obtuvieron de la base de datos UniProt y se encuentran anotadas en el anexo I. El alineamiento de proteínas presenta algunas frente al alineamiento de DNA, por ejemplo: un alfabeto de menor tamaño requiere más coincidencias, las secuencias de DNA pueden contener muchas secuencias no codificantes o no todas las mutaciones de aminoácidos son igualmente dañinas para la estructura proteica. Sin embargo, la importancia de hacer el análisis filogenético con DNA, recae en esto precisamente, ya que lo que interesa en un estudio filogenético es conocer el grado de homología también en las secuencias no codificantes, porque a menudo corresponden a regiones reguladoras de los genes y más conservadas. De este modo, la alineación múltiple del DNA podría ser más útil para construir árboles evolutivos, por esto se ha seguido esta pauta en los casos anteriores.

El análisis filogenético de la secuencia proteica del gen fur muestra que hay una relación filogenéticamente muy cercana entre los géneros *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* y *Serratia*. Los valores de bootstrap lo soportan, ya que son próximos a 100. En cambio, la relación de estos tres géneros con *Bacillus* no está clara, parece que poseen diferente ancestro común o que, por especiación, han divergido mucho. Por lo tanto, se concluye con que el gen fur podría

servir para caracterizar determinados géneros con potencial para comportarse como agentes de biocontrol contra fitopatógenos y que, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* y *Serratia*, sí que podrían poseer un origen común.

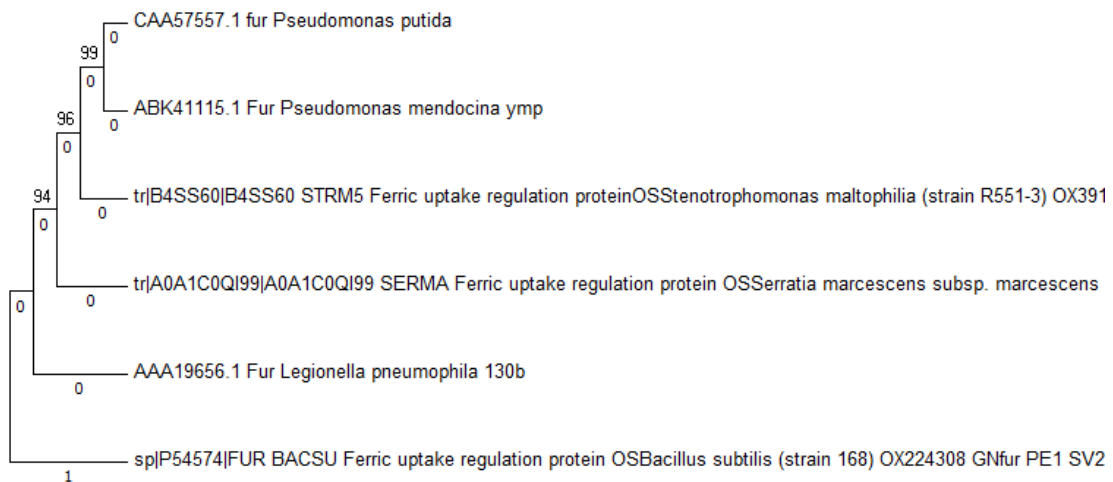


Figura 16. Relaciones evolutivas de las secuencias para el gen fur seleccionado. La historia evolutiva se infirió utilizando el método de Neighbor Joining. Se emplea el árbol de consenso bootstrap con 500 réplicas para representar la historia evolutiva de los taxones analizados. El porcentaje de árboles replicados en el que los taxones asociados se agruparon en la prueba de bootstrap (500 réplicas) se muestran junto a las ramas. Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de corrección de Poisson y están en las unidades del número de sustituciones de aminoácidos por sitio. El análisis involucró 6 secuencias de aminoácidos. Se eliminaron todas las posiciones que contenían gaps y datos faltantes. Hubo un total de 74 posiciones en el conjunto de datos final. El análisis evolutivo se realizó con MEGA7.

3. Discusión y resultados

En el marco científico y ecológico en el que se encuentra la sociedad actualmente, resulta muy importante hallar nuevos métodos alternativos para el tratamiento de plagas y fitopatógenos, que sean capaces de sustituir a los agroquímicos, pesticidas o plaguicidas. Estas soluciones químicas producen muchos efectos nocivos sobre el medio ambiente, por lo que la innovación en este ámbito es muy importante. De este modo, la producción de tratamientos basados en el control biológico, ha adquirido mucha importancia y hay muchos proyectos en curso para encontrar la mejor manera de aplicarlos. A diferencia de los agroquímicos o plaguicidas convencionales derivados del petróleo, los controles biológicos ofrecen independencia y sostenibilidad a los cultivadores sin la necesidad de contaminar mantos freáticos o aguas superficiales y sin perjudicar a los suelos estructuralmente. Además, evitan que aparezcan cepas y plagas cada vez más resistentes a estos productos y difíciles de controlar.

En este estudio se pretendía caracterizar, tanto molecular como filogenéticamente, aquellas bacterias que bibliográficamente se hubieran descrito como agentes de biocontrol contra fitopatógenos. Este comportamiento viene definido por su capacidad para competir contra fitopatógenos (hongos u otras bacterias) y desplazarlos de la rizosfera, que es la región de las plantas donde se concentra la mayor parte de los microorganismos, repercutiendo positivamente en las plantas huésped. De este modo, mediante diferentes modos de acción,

estas bacterias agentes de biontrol, son capaces de evitar plagas y enfermedades en las plantas. Por lo tanto, nos hemos servido de algunos de los genes que desencadenan dichos mecanismos de acción, para poder así encontrar nuevas relaciones filogenéticas entre estas bacterias y poder caracterizar sus rasgos comunes. Concretamente, se seleccionaron 4 genes, uno representativo para cada mecanismo de acción, y se trató de hallar su secuencia para cada uno de los géneros bacterianos seleccionados.

En primer lugar, vamos a discutir los resultados encontrados para el gen de las fenazinas (phz7). Estas biomoléculas presentan la capacidad de experimentar transformaciones de oxidación-reducción y así causar la acumulación de radicales superóxido tóxicos en las células diana, es decir, su mecanismo de acción es el de compuesto antibiótico. Como se ha comentado anteriormente, su genética está compuesta por un cluster de 7 genes, y cada uno de ellos posee una función diferente y es fundamental para su biosíntesis. El gen que se escogió fue el phz7, por ser aquel que se encontró más veces anotado en las bases de datos y uno de los genes clave para la ruta de biosíntesis. Tras realizar el análisis de alineamiento múltiple de secuencias, se observó que las cepas seleccionadas de los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Serratia*, presentaban relaciones de homología, lo cual apuntaba a una posible relación filogenética cercana; mientras que los géneros *Pasteuria* y *Stenotrophomonas*, no presentaban coincidencias u homología para las fenazinas con respecto al resto de géneros. Sin embargo, tras realizar el árbol filogenético se observa que *Pseudomonas* y *Bacillus*, aparentemente y a falta de un mejor alineamiento puesto que el valor de bootstrap es muy bajo, no presentarían un ancestro común y no tendrían una relación filogenética cercana para el gen phz7. De hecho, la relación más concluyente que se obtiene a partir del análisis filogenético con MEGA es que, *Pseudomonas*, está mucho más cercano de *Bulkholderia* que de cualquier otro género para el gen de las fenazinas, tal y como se había descrito bibliográficamente [7]. Por lo tanto, el gen phz7 de la ruta de las fenazinas no es un buen gen para caracterizar a las bacterias descritas como agentes de biocontrol contra fitopatógenos.

En segundo lugar, vamos a discutir los resultados encontrados para el gen de las chitininas (chiA), que se comporta como una enzima hidrolítica capaz de digerir las paredes celulares fúngicas y exoesqueletos de insectos contienen quitina, un homopolímero de β (1,4) unido a residuos de N-acetil-glucosamina. Tras realizar el análisis de alineamiento múltiple de secuencias, se observó que había homología de secuencia para las regiones anotadas de dicho gen en las cepas de los géneros bacterianos *Serratia*, *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Stenotrophomonas*, mientras que no se encontró ninguna coincidencia para el género *Pasteuria*. Con respecto al análisis filogenético con MEGA, se confirmaron los resultados observados para los alineamientos múltiples, es decir, sí que pareció haber relaciones filogenéticas cercanas entre los géneros bacterianos seleccionados y por tanto, un posible ancestro común. Se vio que *Bacillus* pertenecía a una rama diferente a *Serratia*, *Pseudomonas* y *Stenotrophomonas*, aunque con el mismo origen común. Esto también se confirma en los porcentajes de similitud calculados en CLUSTAL, ya que *Bacillus* presenta valores del 42-43% de similitud con respecto al resto, mientras que el resto entre ellas presentan valores entre 47-48%. Por lo tanto, el gen chiA sí que podría tratarse de un gen candidato y con potencial para caracterizar a las bacterias descritas como agentes de biocontrol contra fitopatógenos.

Con respecto al gen *acdS*, se ha observado que la disminución del etileno en la planta por desaminación de su precursor inmediato 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) es un rasgo clave que se encuentra en muchas rizobacterias. Por esta razón, se escogió este gen como candidato para el estudio. Tras realizar el análisis de alineamiento múltiple de secuencias, se observó que había homología de secuencia para las regiones anotadas de dicho gen en las cepas de los géneros bacterianos *Serratia*, *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Stenotrophomonas*, mientras que no se encontró ninguna coincidencia para el género *Pasteuria*. Con respecto al

análisis filogenético con MEGA, se confirmó la relación filogenética entre estos géneros, más concretamente se vio patente la proximidad que hay entre *B. subtilis* y *Pseudomonas* y *B. cereus* y *Stenotrophomonas*. Esto se vio apoyado en el porcentaje de similitud encontrado en el alineamiento, un 98% con respecto al primer caso y, un 65% con respecto al segundo. Por lo tanto, el gen *acdS* sí que podría tratarse de un gen candidato y con potencial para caracterizar a las bacterias descritas como agentes de biocontrol contra fitopatógenos.

Por último, vamos a discutir los resultados encontrados para el gen *fur* y que interviene en el mecanismo de acción de los sideróforos, ya que el represor *Fur* es el denominador común en la regulación de estos sistemas de captación de hierro. El procedimiento de análisis de este gen fue un poco diferente al de los demás, puesto que no se encontraron muchas secuencias anotadas para los diferentes géneros seleccionados. Tras realizar el análisis de alineamiento múltiple de secuencias, se observó que sí que se observaron coincidencias entre los géneros *Pseudomonas*, *Serratia* y *Stenotrophomonas* y la secuencia de referencia en *Legionella*. Sin embargo, no se hallaron coincidencias para *Bacillus* y *Pasteuria*. En cuanto al análisis filogenético con MEGA, se optó por buscar secuencias de aminoácidos en lugar de DNA, ya que sí que se encontraron más anotaciones para la proteína *Fur* en UniProt. De este modo, para el análisis filogenético, al hacer el alineamiento de proteínas, solo se emplearon las regiones codificantes que son las que se traducen. Por lo tanto, podrían esperarse diferencias entre ambas maneras de afrontar el análisis; sin embargo, los resultados se correspondieron con lo observado en el análisis de comparaciones múltiples, ya que se mantuvieron en la misma rama los géneros *Pseudomonas*, *Serratia* y *Stenotrophomonas*, y con buenos valores de bootstrap, mientras que *Bacillus* quedó más alejada. Por lo tanto, los tres primeros géneros sí que podrían tener un ancestro común para el gen *fur* a diferencia de *Bacillus*, es decir, este gen no es el mejor para caracterizar a las bacterias descritas como agentes de biocontrol contra fitopatógenos.

4. Conclusiones

Las conclusiones que se obtienen tras la realización del trabajo son las siguientes:

1. Los genes *chiA* y *acdS* son buenos candidatos y tienen potencial para caracterizar a las bacterias descritas como agentes de biocontrol contra fitopatógenos, ya que presentan homología de secuencia para las diferentes cepas de los géneros seleccionados y muestran relaciones filogenéticas cercanas con la posibilidad de tener un ancestro común.
2. Los genes *phz7* y *fur* **no** son buenos candidatos para caracterizar a las bacterias descritas como agentes de biocontrol contra fitopatógenos, ya que no se encuentran coincidencias y relaciones filogenéticas cercanas entre las diferentes cepas seleccionadas de los géneros en cuestión.

Las razones por las cuales *phz7* y *fur* no han resultado ser buenos candidatos pueden encontrarse entre las siguientes:

- 2.1. Los alineamientos múltiples no han sido buenos, ya que no se han encontrado suficientes secuencias anotadas para realizar el análisis y esto, a su vez, ha dado lugar a un árbol filogenético poco fiable.

- 2.2. Las secuencias de estos genes han divergido mucho por especiación y no se hallan coincidencias significativas para obtener buenos resultados en los alineamientos. Esta razón sería la más robusta para descartarlos como buenos candidatos para caracterizar a las bacterias descritas como agentes de biocontrol contra fitopatógenos.
- 2.3. Las complicadas rutas de biosíntesis y de regulación a las que pertenecen, hacen complicado su análisis entre géneros, por lo que su genética puede haber sido un inconveniente para encontrar las verdaderas relaciones existentes entre estos genes para las diferentes bacterias seleccionadas.

En este trabajo se ha consolidado la necesidad inicial de hacer una búsqueda exhaustiva de las secuencias anotadas para hacer una buena elección de los genes que se van a analizar, ya que lo más importante para este tipo de análisis es el alineamiento de partida y que este sea de calidad. En cuanto a los objetivos planteados al inicio del trabajo, no se ha logrado llevar a cabo el análisis filogenético con R, como se hubiera deseado, ya que el lenguaje de programación ha supuesto un problema para conseguirlo. En cambio, el resto de objetivos planteados, sí que se han logrado, ya que se el objetivo principal del estudio era hallar las relaciones filogenéticas y caracterizar a aquellas bacterias o géneros que se comportan como agentes de biocontrol contra fitopatógenos, según bibliografía.

Por lo que respecta al seguimiento de la planificación y la metodología, se ha sobrellevado correctamente, exceptuando la última tarea en la que debía realizarse el análisis filogenético con R, debido a estos problemas, hubo un retraso imprevisto de última hora. Este hecho hizo que se introdujera el cambio del software para el análisis filogenético, siendo MEGA el empleado finalmente para cumplir el objetivo. Finalmente, como líneas de investigación que pueden optimizarse en el futuro y que han quedado pendientes, se encuentran la posibilidad de realizar una nueva búsqueda de secuencias para mejorar los alineamientos, la introducción de nuevos genes candidatos, la caracterización más profunda de los genes *chiA* y *acdS* y la realización de los análisis filogenéticos con R.

4. Glosario

CLUSTAL: programa de alineación de secuencia múltiple.

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

MUSCLE: MUltiple Sequence Comparison by Log-Expectation.

MEGA: Análisis de Genética Evolutiva Molecular

NJ: Neighbor Joining

Análisis filogenético: La clasificación filogenética es una clasificación científica de las especies basada únicamente en las relaciones de proximidad evolutiva entre las distintas especies,

5. Bibliografía

1. Lugtenberg, B., Rozen, D. E., & Kamilova, F. (2017). Wars between microbes on roots and fruits. *F1000Research*. <https://doi.org/10.12688/f1000research.10696.1>
2. Adhikari, M., Yadav, D. R., Kim, S. W., Um, Y. H., Kim, H. S., Lee, S. C., ... Lee, Y. S. (2017). Biological control of bacterial fruit blotch of watermelon pathogen (*Acidovorax citrulli*) with Rhizosphere associated bacteria. *Plant Pathology Journal*. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.09.2016.0187>
3. Expósito, R. G., Bruijn, I. De, Postma, J., & Raaijmakers, J. M. (2017). Current Insights into the Role of Rhizosphere Bacteria in Disease Suppressive Soils, 8(December), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02529>
4. 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*. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002784>
5. Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (n.d.). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>
6. Sindhu, S. S., Sehrawat, A., Sharma, R., & Dahiya, A. (2016). Biopesticides : Use of Rhizosphere Bacteria for Biological Control of Plant Pathogens. *Defence Life Science Journal*, 01(2), 135–148. Retrieved from <http://publications.drdo.gov.in/ojs/index.php/dlsj/article/view/10747/5712>
7. Azizpour, N., & Rouhrazi, K. (2016). Advances in Plants & Agriculture Research Isolation and Characterization of Rhizosphere Bacteria for the Biocontrol of the Asochyta Rabiei in Iran. *Advances in Plants and Agriculture Research*. <https://doi.org/10.15406/apar.2016.03.00104>
8. Figueroa-lópez, A. M., Damián Cordero-ramírez, J., Martínez-álvarez, J. C., López-meyer, M., Lizárraga-sánchez, G. J., Félix-gastélum, R., ... Maldonado-mendoza, I. E. (2016). Rhizospheric bacteria of maize with potential for biocontrol of *Fusarium verticillioides* Background. *SpringerPlus*, 5. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-1780-x>
9. Ganeshan, G., & Kumar, A. M. (2005). *Pseudomonas fluorescens*, a potential bacterial antagonist to control plant diseases. *Journal of Plant Interactions*. <https://doi.org/10.1080/17429140600907043>
10. Tejera-hernández, B., & Heydrich-pérez, M. M. R. M. (2011). Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos.
11. Raaijmakers, J. M., & Mazzola, M. (2012). Diversity and Natural Functions of Antibiotics Produced by Beneficial and Plant Pathogenic Bacteria, (May), 1–22. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-081211-172908>

12. Hollensteiner, J., Wemheuer, F., Harting, R., Kolarzyk, A. M., Diaz Valerio, S. M., Poehlein, A., ... Liesegang, H. (2017). *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus weihenstephanensis* inhibit the growth of phytopathogenic *Verticillium* species. *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02171>
13. Xue, C., Penton, C. R., Shen, Z., Zhang, R., Huang, Q., Li, R., ... Shen, Q. (2015). Manipulating the banana rhizosphere microbiome for biological control of Panama disease. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/srep11124>
14. Fan, H., Zhang, Z., Li, Y., Zhang, X., Duan, Y., & Wang, Q. (2017). Biocontrol of bacterial fruit blotch by *Bacillus subtilis* 9407 via surfactin-mediated antibacterial activity and colonization. *Frontiers in Microbiology*, 8(OCT), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01973>
15. Wang, K., Yan, P.-S., Cao, L.-X., Ding, Q.-L., Shao, C., & Zhao, T.-F. (2013). Potential of chitinolytic *Serratia marcescens* strain JPP1 for biological control of *Aspergillus parasiticus* and aflatoxin. *BioMed Research International*, 2013, 397142. <https://doi.org/10.1155/2013/397142>
16. Dhar Purkayastha, G., Mangar, P., Saha, A., & Saha, D. (2018). Evaluation of the biocontrol efficacy of a *Serratia marcescens* strain indigenous to tea rhizosphere for the management of root rot disease in tea. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191761>
17. Khaldi, R. El, Daami-remadi, M., Hamada, W., Somai, L., & Cherif, M. (2015). Plant Pathology & Microbiology The Potential of *Serratia marcescens* : An Indigenous Strain Isolated from Date Palm Compost as Biocontrol Agent of *Rhizoctonia solani* on Potato. *Plant Pathology and Microbiology*, 3, 3–5. <https://doi.org/10.4172/2157-7471.S3-006>
18. Bosmans, L., De Bruijn, I., Gerards, S., Moerkens, R., Van Looveren, L., Wittemans, L., ... Lievens, B. (2017). Potential for biocontrol of hairy root disease by a *Paenibacillus* clade. *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00447>
19. Tian, B., Yang, J., & Zhang, K. Q. (2007). Bacteria used in the biological control of plant-parasitic nematodes: Populations, mechanisms of action, and future prospects. *FEMS Microbiology Ecology*. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2007.00349.x>
20. Borneman, J., & Becker, J. O. (2007). Identifying Microorganisms Involved in Specific Pathogen Suppression in Soil. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.45.062806.094354>
21. Zhang, L., Tian, X., Kuang, S., Liu, G., Zhang, C., & Sun, C. (2017). Antagonistic activity and mode of action of phenazine-1-carboxylic acid, produced by marine bacterium *Pseudomonas aeruginosa* PA31x, against *Vibrio anguillarum* In vitro and in a zebrafish in vivo model. *Frontiers in Microbiology*, 8(FEB), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00289>
22. Upadhyay, A., & Srivastava, S. (2011). Phenazine-1-carboxylic acid is a more important contributor to biocontrol *Fusarium oxysporum* than pyrrolnitrin in *Pseudomonas fluorescens* strain Psd. *Microbiological Research*, 166(4), 323–335. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2010.06.001>

23. Banger, M. G., & Thomashow, L. S. (1999). Identification and characterization of a gene cluster for synthesis of the polyketide antibiotic 2,4-diacetylphloroglucinol from *Pseudomonas fluorescens* q2-87. *Journal of Bacteriology*, *181*(10), 3155–3163. <https://doi.org/10.1128/JB.181.10.3155-3163.1999>
24. Singh, H. B. (2014). Management of Plant Pathogens with Microorganisms. *Proc Indian Natn Sci Acad Spl. Sec*, *80*(2), 443–454. <https://doi.org/10.16943/ptinsa/2014/v80i2/55120>
25. Patil, S., Shivannavar, C. T., Bheemaraddi, M. C., & Gaddad, S. M. (2015). Antiphytopathogenic and Plant Growth Promoting Attributes of Bacillus Strains Isolated from Rhizospheric Soil of Chickpea. *Journal of Agricultural Science and Technology*, *17*(5), 1365–1377. Retrieved from <http://journals.modares.ac.ir/article-23-10637-en.html>
26. 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), 421–426. <https://doi.org/10.1007/s002030100347>
27. Harman, G. ., Hayes, C. K., Lorito, M., Broadway, R. M., Di Petro, A., Peterbauer, C., & Tronsmo, A. (1993). Chitinolytic enzymes of *Trichoderma harzianum*: purification of chitobiosidase and endochitinase. *Molecular Plant Pathology*.
28. Kamensky, M., Ovadis, M., Chet, I., & Chernin, L. (2003). Soil-borne strain IC14 of *Serratia plymuthica* with multiple mechanisms of antifungal activity provides biocontrol of *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum* diseases, *35*, 323–331.
29. Glick, B. R. (2004). Bacterial ACC deaminase and the alleviation of plant stress. *Advances in Applied Microbiology*, *56*, 291–312. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(04\)56009-4](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(04)56009-4)
30. Wang, C., Knill, E., Glick, B. R., & Défago, G. (2000). Effect of transferring 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase genes into *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 and its *gac* A derivative CHA96 on their growth-promoting and disease-suppressive capacities. *Canadian Journal of Microbiology*, *46*(10), 898–907. <https://doi.org/10.1139/w00-071>
31. Hernández-León, R., Rojas-Solís, D., Contreras-Pérez, M., Orozco-Mosqueda, M. del C., Macías-Rodríguez, L. I., Reyes-de la Cruz, H., ... Santoyo, G. (2015). Characterization of the antifungal and plant growth-promoting effects of diffusible and volatile organic compounds produced by *Pseudomonas fluorescens* strains. *Biological Control*, *81*, 83–92. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2014.11.011>
32. Ebord, S. Y. D., Baghi, M. O. S., & Drian, M. A. A. (2002). Phytoalexins from the Vitaceae : Biosynthesis , Phytoalexin Gene Expression in Transgenic Plants , Antifungal Activity , and, 7–9. <https://doi.org/10.1021/jf011429s>
33. Mavrodi, D. V., Ksenzenko, V. N., Bonsall, R. F., Cook, R. J., Boronin, A. M., & Thomashow, L. S. (1998). A seven-gene locus for synthesis of phenazine-1-carboxylic acid by *Pseudomonas fluorescens* 2-79. *Journal of Bacteriology*, *180*(9), 2541–2548.
34. Schneemann, I., Wiese, J., Kunz, A. L., & Imhoff, J. F. (2011). Genetic approach for the fast discovery of phenazine producing bacteria. *Marine Drugs*, *9*(5), 772–789. <https://doi.org/10.3390/md9050772>

35. Okay, S., & Tefon, B. E. (2008). Expression of chitinase A (chiA) gene from a local isolate of *Serratia marcescens* in Coleoptera-specific *Bacillus thuringiensis*, *104*, 161–170. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03570.x>
36. Govindasamy, V., & Senthilkumar, Æ. M. (2008). Isolation and Characterization of ACC Deaminase Gene from Two Plant Growth-Promoting Rhizobacteria, 312–317. <https://doi.org/10.1007/s00284-008-9195-8>
37. Crosa, J. H., & Walsh, C. T. (2002). Genetics and Assembly Line Enzymology of Siderophore Biosynthesis in Bacteria, *66*(2), 223–249. <https://doi.org/10.1128/MMBR.66.2.223>
38. Datta, B., & Chakrabartty, P. K. (2014). Siderophore biosynthesis genes of *Rhizobium* sp . isolated from *Cicer arietinum* L ., 391–401. <https://doi.org/10.1007/s13205-013-0164-y>
39. Najimi, M., Lemos, M. L., & Osorio, C. R. (2008). Identification of siderophore biosynthesis genes essential for growth of *Aeromonas salmonicida* under iron limitation conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, *74*(8), 2341–2348. <https://doi.org/10.1128/AEM.02728-07>
40. Hall, B. G. (2013). Building phylogenetic trees from molecular data with MEGA. *Molecular Biology and Evolution*, *30*(5), 1229–1235. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst012>
41. Peña, C. (2011). Métodos de inferencia filogenética. *Revista Peruana de Biología*, *18*(2), 265–267. <https://doi.org/10.15381/rpb.v18i2.243>
- Alavi, P., Starcher, M. R., Thallinger, G. G., Zachow, C., Müller, H., & Berg, G. (2014). *Stenotrophomonas* comparative genomics reveals genes and functions that differentiate beneficial and pathogenic bacteria. *BMC Genomics*. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-482>
- Bach, E., Seger, G. D. dos S., Fernandes, G. de C., Lisboa, B. B., & Passaglia, L. M. P. (2016). Evaluation of biological control and rhizosphere competence of plant growth promoting bacteria. *Applied Soil Ecology*. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2015.11.002>
- Bennett, D. J., Sutton, M. D., & Turvey, S. T. (2017). Treeman: An R package for efficient and intuitive manipulation of phylogenetic trees. *BMC Research Notes*, *10*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13104-016-2340-8>
- Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clément, C., & Barka, E. A. (2005). MINIREVIEW 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. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.9.4951-4959.2005>
- De Boer, W., Hundscheid, M. P. J., Gunnewiek, P. J. A. K., De Ridder-Duine, A. S., Thion, C., Van Veen, J. A., & Van Der Wal, A. (2015). Antifungal rhizosphere bacteria can increase as response to the presence of saprotrophic fungi. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137988>
- Dirk Van Elsas, J., Dini Andreote, F., Singh, B., Raaijmakers, J. M., Expósito, G. R., Bruijn, de I., ... Postma, J. (2017). Current Insights into the Role of Rhizosphere Bacteria in Disease Suppressive Soils. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02529>

- Etesami, H., & Alikhani, H. A. (2018). *Bacillus* species as the most promising bacterial biocontrol agents in rhizosphere and endorhiza of plants grown in rotation with each other. *European Journal of Plant Pathology*. <https://doi.org/10.1007/s10658-017-1276-8>
- Kong, H. G., Kim, N. H., Lee, S. Y., & Lee, S. W. (2016). Impact of a recombinant biocontrol bacterium, *Pseudomonas fluorescens* pc78, on microbial community in tomato rhizosphere. *Plant Pathology Journal*. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.08.2015.0172>
- Lu, J., Yang, F., Wang, S., Ma, H., Liang, J., & Chen, Y. (2017). Co-existence of rhizobia and diverse non-rhizobial bacteria in the rhizosphere and nodules of *Dalbergia odorifera* seedlings inoculated with *Bradyrhizobium elkanii*, *Rhizobium multihospitium*-Like and *Burkholderia pyrrocinia*-like strains. *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02255>
- Madhavan, G. (2006). *Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins (3Ed)*. Edited by Andreas D. Baxeavanis and B. F. Francis Ouellette. *Annals of Biomedical Engineering* (Vol. 34). <https://doi.org/10.1007/s10439-006-9105-9>
- Magno-erez-Bryan, M. C., Mar inez-Gar ía, P. M., Hierrezuelo, J., Rodríguez-Palenzuela, P., Arrebola, E., Ramos, C., ... Romero, D. (2015). Comparative Genomics Within the *Bacillus* Genus Reveal the Singularities of Two Robust *Bacillus amyloliquefaciens* Biocontrol Strains. *MPMI*, 28(10), 1102–1116. <https://doi.org/10.1094/MPMI-02-15-0023-R>
- Mexicana De Fitopatología, S., México Hernández-Lauzardo, A. C., Niurka, A., Bautista-Baños, S., Valle, V.-D., Gerardo, M., & Texcoco, A. C. (2007). *Revista Mexicana de Fitopatología*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 25(1), 66–74. Retrieved from <http://www.redalyc.org/pdf/612/61225109.pdf>
- Mota, M. S., Gomes, C. B., Souza Júnior, I. T., & Moura, A. B. (2017). Bacterial selection for biological control of plant disease: criterion determination and validation. *Brazilian Journal of Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.09.003>
- Pal, K. K., & Mc Spadden Gardener, B. (2006). Biological Control of Plant Pathogens. *The Plant Health Instructor*, 1–25. <https://doi.org/10.1094/PHI-A-2006-1117-02.Biological>
- Raaijmakers, J. M., & Mazzola, M. (2012). Diversity and Natural Functions of Antibiotics Produced by Beneficial and Plant Pathogenic Bacteria, (May), 1–22. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-081211-172908>
- van Peer, R., Niemann, G. J., & Schippers, B. (1991). Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of Fusarium Wilt of Carnation by *Pseudomonas* sp. Strain WCS417r.PDF. *Phytopathology*. <https://doi.org/10.1094/Phyto-81-728>
- Wang, Z., Xu, G., Ma, P., Lin, Y., Yang, X., & Cao, C. (2017). Isolation and characterization of a phosphorus-solubilizing bacterium from rhizosphere soils and its colonization of Chinese cabbage (*Brassica campestris* ssp. *chinensis*). *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01270>
- Whipps, J. M. (2001). Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 52(suppl 1), 487–511. https://doi.org/10.1093/jexbot/52.suppl_1.487

Yi, Y., de Jong, A., Frenzel, E., & Kuipers, O. P. (2017). Comparative transcriptomics of *Bacillus mycoides* root exudates reveals different genetic adaptation of endophytic and soil isolates. *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01487>

6. Anexos

ANEXO I

Secuencias de los genes seleccionados en formato fasta.

Fenazinas

Pseudomonas fluorescens strain FP7 phenazine (phz) gene, partial cds

GenBank: KY678217.1

```
>KY678217.1 Pseudomonas fluorescens strain FP7 phenazine (phz) gene,
partial cds
CAGGTCGATGCGTTTTCCGCCGAACCATTCGGGGGCAACCCGGCGGCAGTGATCCCGCTGCAAAGCTGGC
TGCCGGACGATGTGCTGCAGCGCATCGCCGAAGAGAACAACCTGTCGAAAACCGCCTACTTCGTGCGCAA
CGGCCAAAACCTTTGACCTGCGCTGGTTCACCCCGACCGTGGAAGTCGACCTGTGCGGCCATGCCACCTTG
GCCTCGGCCTATGTGCTGTTTGAACAGCTGGGCGAGCAGGCGCAGGTACGGCGTTTTCAACACCCGCGAGTG
GCGAGCTGCGCGTCAGCCGCAACGCCGACGGGCTGCTGGCCATGGACTTTCCGGCCAAGCAGCCGGTTCGC
CGTGATATGCTGCCGGGCTGTTGCAGGCGCCGGGCTTGGCCAGGCACAGGCGCTGTACCGCAGTGAC
GACTACGTGGTGGTGATCGATGACGCTTGTGCTGCTCGACACCTGCAGCCGGACTTCGTTGCGCTATCGG
CCTTCGATGTGCGCGGCATCGCCGTTACCGCGGCAGGGCGTGGCTTTGATTTTCGTACCCGCTGGTTCGG
CCCGCGGGTCGGCGTGAATGAAG
```

Bacillus megaterium strain BP17 phenazine biosynthesis protein (phzF) gene, partial cds

GenBank: JX843733.1

```
>JX843733.1 Bacillus megaterium strain BP17 phenazine biosynthesis
protein (phzF) gene, partial cds
ACCATAATTGCTTTTGGCTCCATGTTTTCTATCAGTTTGAAATATTTTTCTTTGTCTACATGTATCTCTT
TAGCAGCTTCTAATGATGTTAAAGGGACAAGAATGACCGGCAGACCGGTGGATACTTCTTGAACGGGAAA
ACGCATATCAATATAAGTTTTTCATCAAGGTTTAAACACGTCCGCCACCTGCTTTTTTATCTAACACTTTCCCA
AACGTCGGCTGACCTTGTGTCATCCACAGTACATCTTTTTTGTTCATCGTATGTAACAGGCGTAGGACCTG
CTTTATAATGAAGAGTAAGCTCCTCTGTATCTCTTTCTTCTAGTTCTTCTCGGATAACATAAGCGGTACC
GAGCGTCGGATG
```

Pseudomonas putida strain BP25 phenazine (phzF) gene, partial cds

GenBank: JX843728.1

```
>JX843728.1 Pseudomonas putida strain BP25 phenazine (phzF) gene,
partial cds
TCTTCCAGGTCGATGCGTTTTCCGCCGAACCATTCGGGGGCAACCCGGCGGCAGTGATCCCGCTGCAAAG
CTGGCTGCCGGACGATGTGCTGCAGCGCATCGCCGAAGAGAACAACCTGTCGAAAACCGCCTACTTCGTG
CGCAACGGCGAAAACCTTTGACCTGCGCTGGTTCACCCCGACCGTGGAAGTCGACCTGTGCGGCCATGCCA
CCTTGGCCTCGGCCTATGTGCTGTTTGAACAGCTGGGCGAGCAGGCGCAGGTACTGCGTTTTCAACACCCG
CAGTGGCGAGCTGCGCGTCAGCCGCAACGCCGACGGGCTGCTGGCCATGGACTTTCCGGCCAAGCAGCCG
GTCGCCGTGGATATGCTGCCGGGCTGTTGCAGGCGCTGGGCTTGGCCAGGCACAGGCGCTGTACCGCA
GTGACGACTACGTGGTGGTGATCGATGACGCTTGTGCTGCTCGACACCTGCAGCCGGACTTCGTTGCGCT
ATCGGCCTTCGATGTGCGCGGCATCGCCGTTACCGCGGCAGGGCGTGGCTTTGATTTTCGTACCCGCTGG
TTCGGCCCCGCGGTCGGCGTGAATGAAGACCC
```

Brevibacterium iodinum strain ATCC 9897 PhzF (phzF) gene, partial cds

GenBank: FJ652786.1

```
>FJ652786.1 Brevibacterium iodinum strain ATCC 9897 PhzF (phzF) gene,
partial cds
AACTACCGTTTGGCTGGACACCCGCTCCTCGGTGCAGCCAGAGTGCATCTGGACCGTCATCAACTTTCTAA
CGCAACGTTTCGAACTTCGAACGGCGCGGTTTCGGATCTCCAATGATCCGGCTGATACGAGTTCATGCAA
```

ATTACACAAGCGATGCCTACAGAGATGGTGACCGAACATACAGCGGAGCTGAAAACCGCTCTAGGGTCAT
CGAGCTTCGCCGGGCCAGCCTTATACGACGCAGGCGCCAGGCATCTTGTAGTACCCCTCAGGACCGT
AAAAGAAGTATGATGGAGGTCCGCCAGACCATAGTCTGCTTTTCTATTTTCGAGGATATGGCGATCAACTGC
TATGCCCTCGAGAACGGAGTGGTGTTTAATCGAAT

***Burkholderia cepacia* strain 5.5B PhzF (phzF) gene, partial cds**

GenBank: FJ652781.1

>FJ652781.1 *Burkholderia cepacia* strain 5.5B PhzF (phzF) gene, partial cds

AGCTGCCGTTTCGCGGGCCATCCGCTGCTGGGAACGGCCGTGGCGCTCAGGCACGTCAACGCGCAGGATCG
CTTCGTGTTTGTAGACGGGCATGGGGCTCGTGCCGTTTCGATGTGCGATCCGATGCGCCCGGCGAGGCTTAC
GTCACCATGCAGCAGCCGATCCCGACGTGGACGCGCTTTGATCGGGCCGAGCGTCTGCTCGAAGCGCTCG
GCGTAGAAGCGTCCGCTGCTGCCGTGGAGGCCATCGAAAACGGCCCGGCCACGTGTTTCGTCACGTTGCC
CGACGCCTCCGCGCTTTCCGACGTGCATCCGGACCATCGCGCGTTGGCTGAGTTCGAGGATATGTCGGCC
ATGTGCCTGGCCCCCGGGCGACCACTGGCGCTGCCGGAT

>FJ652783.1 *Pectobacterium carotovorum* strain cc303 PhzF (phzF) gene, partial cds

AATTGCCCTTTGCTGGCCATCCGTTGATGGGAACCGCCAGTGCATTTTCACGGCGCCATGGTCTGGATCA
ATTTGTATTTTCACTGCTCTTGGCGCCGTCAGAATTTTCGGTTAAGCACCATAACCGAAACACTCAGCACA
GTGAAAATCAACGTTCCCTCCAGCAAGAACGGTTCCTTTTAATGAAGAAAAGCGTCTGCTTAAGGCGCTGG
GGCTGAAACAGAGTGTGCTTCCGTGAAATGTACGATGCAGGAGCCAGGCATGTACTGATTTCCGTCGA
CAGTGTGAAACCTTACGCGCGATACGGCCAGACCATCAGGCGCTGGCCGAATTTGAAAATCTTGCAGTG
AACTGTTTTGCGTGGTGGGATTTTCAGGCGGAAAACCGCAT

Chitinasas

***Serratia marcescens* Bn10 endochitinase (chiA) gene, complete cds**

GenBank: DQ165083.1

>DQ165083.1 *Serratia marcescens* Bn10 endochitinase (chiA) gene, complete cds

ATGCGCAAATTTAATAAACCGCTGTTGGCGCTGTTGATCGGCAGCAGCTGTGTTCCGCGGGCGCAGGCCG
CCGCGCCGGGCAAGCCGACCATCGCCTGGGGCAACACCAAGTTCGCCATCGTTGAAGTTGACCAGGCGGC
TACCGCTTATAATAATTTGGTGAAGGTAAAAATGCCGCCGATGTTTCGGTCTCCTGGAATTTATGGAAT
GGCGACACCGGTACGACGGCAAAAAGTTTTATTTAAATGGCAAAGAGGCGTGGAGCGGCCCTTCAACCGGTT
CTTCCGGTACGGCGAATTTTAAAGTCAATAAAGGCGGGCGTTATCAAATGCAGGTGGCATTTGTGCAATGC
CGACGGCTGCAGCGCCAGCGACGCCACCGAAAATGTGGTGGCCGACACCGACGGCAGCCATTTGGCGCCG
TTGAAAGAGCCGCTGCTGGAAAAGAATAAACCGTATAAACAGAACTCCGGCAAAGTGGTGGGTTCTTATT
TCGTCGAGTGGGGCGTTTACGGGCGCAATTTACCGTGCACAAGATCCCGGCGCAGAACTTGACCCACCT
GCTGTACGGCTTTATCCCGATCTGCGGCGGCAACGGCATCAACGACAGCCTGAAAGAGATCGAAGGCAGC
TTCCAGGCGCTGCAGCGCTCCTGCCAGGGCCGCGAGGACTTCAAAGTCTCGATCCACGATCCGTTTCGCCG
CGCTGCAAAAAGCGCAGAAGGGCGTTACCGCCTGGGATGACTCCTACAAGGGCAACTTCGCCAGCTGAT
GGCGCTGAAAACAGGCGCATCCTGACCTGAAAATTTCTGCCGTCGATCGGCGGCTGGACGCTGTCCGACCCG
TTCTTCTTCATGGGTGATAAGGTGAAGCGCGATCGCTTCGTCGGTTTCGGTGAAGAGTTCTTGCAGACCT
GGAAGTTCTTCGATGGCGTGGATATCGACTGGGAGTTCCCGGGCGGCAAAGGCGCCAACCCGAACCTGGG
CAGCCCGCAGGACGGGAAAACCTATGTGCTGCTGATGAAGGAGCTGCGGGCGATGCTGGATCAGCTGTCCG
GCGGAAACCGGCCGAAATATGAACTGACCTCCGCCATCAGCGCCGGCAAGGACAAGATCGACAAGGTGG
CTTACAACGTCGCGCAGAACTCGATGGATCACATTTTCTGATGAGCTACGACTTCTATGGCGCCTTCGA
TCTGAAGAACCTGGGGCATCAGACCGCGCTGAATGCGCCGGCCTGGAAGCCGGACACCGCTTACACCAG
GTGAACGGCGTCAATGCGCTGCTGGCGCAGGGCGTCAAGCCGGGCAAATCGTCGTCGGCACCGCCATGT
ATGGCCCGGGCTGGACCGGGGTGAACGGCTACCAGAACAACATTCGGTTCACCGGTACCGCCACCGGGCC
GGTTAAAGGCACCTGGGAGAACGGCATCGTGGACTACCGCAAATCGCTGGCCAGTTTCATGAGCGGCGAG
TGGCAGTACACCTACGACGCCACGGCAGAAAGCGCCATACGTGTTCAAGCCTTCCACCGGCGATCTGATCA
CCTTCGACGATGCCCGCTCGGTGCAGGCCAAAGGCAAGTACGTGCTGGATAAGCAGCTGGGCGGCCTGTT
CTCTTGGGAGGTCGACGCGGACAACGGCGATATTTCTCAACAGCATGAACGCCAGCCTGGGCAAACAGCGCC
GGCGTTCAATAA

Pseudomonas aeruginosa strain 0364 chitinase (chi) gene, complete cds

GenBank: KR007311.1

>KR007311.1 *Pseudomonas aeruginosa* strain 0364 chitinase (chi) gene, complete cds

```
ATGATCAGGATCGACTTTTCCCAGTTGCACCAGGCCCGCGAAGATGCCGCGGGCCATGCCGAGCATCG
CCGGCAAGAAGATTCTCATGGGCTTCTGGCACAACCTGGCCGGCCGGCGCCGACGGCTACCAGCAGGG
CTCGTTCGCCAACATCGCGCTGGAAGACGTGCCGAGCGAGTACAACGTGGTTCGCCGTGGCCTTCATGAAA
GGGCGCGGCATCCCCGACCTTCCAGCCATACAACCTGTCCGACGCGGAGTTTCGCCGCCAGGTTCGGCGTGC
TCAACGCCCCAGGGCCGCGCGGTGCTGATTTCCGCTGGGGGGCGCCGACGCGCACATCGAGTTGCACGCCGG
GCAGGAGCAGGGCGCTGGCCGCCGAGATCGTCCGCTTGGTGGAAACCTACGGTTTCGACGGCCTGGACATC
GACCTGGAGCAGAGCGCCATCGACCTGGCCGACAACCAGCGGGTGTGCCGGCGGGCCCTCAAGCTGGTGC
GCGAGCACTACGCCGGCAGGGCAAGCACTTCATCGTCAGCATGGCCCCGGAGTTTCCCTATCTGCACAA
GAACGGCAAGTACGTGCCTTATCTGCAGGCCCTGGAAGGCGTCTACGACTTCATCGCGCCGAGTACTAC
AACCAGGGCGGGCAGCGCCTGTGGGTCCAGGAGGCGAACGGCGGCAAGGGCGCCTGGATCGCGCAGAACA
ACGACGCGATGAAAGAAGACTTCTCTACTACCTACCGAGAGCCTGGCCACCGGAGCCTGGCCACCGCCGACTTCGT
GCGGATCCCCGGCGCAGCGCCTGGCCATCGCCCTGCCGAGCAACGTCGATGCCGCGGTACCAGGCTACGTG
ATCGATCCCCGCCGCGGTGAGCAACGCGTTTCGCCGCTGGAAAGCCGCCGTCACGCGATCAAGGGCCTGA
TGACCTGGTTCGGTGAACCTGGGACGATGGCCTGAACAAGCGCGGCGAGCGCTACAACCTGGGAGTTCCGCAA
GCGCTACGCCAGCCTCATCCATGACGGCGAGGGCGGCGACCAGCGCCGGCGGGCGCCGAGGGCCTGCGT
CTGCTGGAGCGCGGCGAGACCAGCCTGGTGTGGCTGGAACGCCCTCCAGCGGGCAGCGTCCGATCGATT
ACTACAGCCTCTATCGCGACGGCGCCATGGTTGGCCAGAGCGCCGCGCTGGGTTCCACCGACAGCGGCCCT
GACGGCGGACACCCGCTACAGCTATTTTCGTCACCGCCCGGATACCCAGGGCAACCAGTCGCTGCCCAGC
GAAGGCCTGGAGGTCAGCACCAGCGGGCGGGCGGTGGATCCGCAATTCGCCAATGGCGGGGAGAACCAGG
CCTATCGGGTCGACGATGGGGTGACCTACGAGGGGCTGCGCTATCTCTGCCTGCAGGCGCACACCTCCAA
CAGCGGCTGGACGCCCGCGGTAGCCTTCACCTCTGGCGGCCGCTGCGCTGA
```

Pseudomonas fluorescens strain MP-13 chitinase gene, complete cds

GenBank: KM249884.1

>KM249884.1 *Pseudomonas fluorescens* strain MP-13 chitinase gene, complete cds

```
ATGTCTAAATTCGACTTTACGTTATTGAAATCCGCCGTCAGCGACGCTGCGTTCGTTGATGCCGAGCATCG
CCGGTAAAAAGATCCTCATGGGTATCTGGCACAACCTGGCCTGCCGGGCCGAGCGACGGTTACCAGCGCGG
CCAGTTCGCCAACATCGCGCTGCATGATGTGCCGAAGGATTACAACGTGGTGGCCGTGGCCTTCATGAAA
GGCAACGGCATCCCTACCTTCAATCCGTACAACCTGTCCGATGCCGAGTTCGCCGCCAGGTTCGGTGTGC
TGAACAGCCAGGGCCGCGCGGTGCTGATATCCCTCGGTGGTGGCGATGCGCACATCGAATTGCACAAAGG
CAACGAACAGCCACTGGCCAACGAAATCATCCGCTTGGTGGAGCACCTACGGCTTCGATGGCCTGGACATC
GATCTTGAACAGAGCGCGATTGATTTCCGCCGACAACAAGACCGTCTGCCTGCCGCGCTGAAACTGGTCA
AGGACCATTACGCCGGTGAAGGCAAACTTCATCATCATGCGCGCCGGAGTTTCCGTACCTGACCAC
CGCTGGCAAAATACGTTCGGTTACCTCCAGGCCCTGGAAGGTTATTACGACTTCATCGCCCCGAGTATTAC
AACCAGCGCGGTGACGGGATCTGGGTGCAGGAAGCCAACAACGGCAACGGTTCGCTGGATCGCCAGAACA
ACGACGCGATGAAAGAAGACTTCTGTACTACCTGACCGAAAAGTCTGGTGAGCGGGACTCGCGGCTTCAC
CAGGATCCCGGCGGCAAGTTTGTGATCGGCTGCCGGACAACGTCGACGCGGGCCACCGGCTACGTG
ATCAACCCGGCGCAGTGGTGAATGCCCTCAAGCGTCTGGACGCCAAAGGGCTCTCGATCAAAGGCCGTA
TGACCTGGTTCGGTGAACCTGGGACAATGCCGTCACAACAAGGACCACGTGCCGTACAACCTGGGAATTCAGTCG
TCGCTACGGGCCGTTGATCAACGGCAAGCGGTTGTCTTGGCATGAGGAAGCGCTCGCGGCAACCGAAGTC
GCTAACACGCTGTAA
```

Bacillus subtilis strain J-16 chitinase gene, partial cds

GenBank: KM249883.1

>KM249883.1 *Bacillus subtilis* strain J-16 chitinase gene, partial cds

```
ATGAAAAAAGTGTTTTCAAAACAAAAAGTTTCTCGTTTTTTTCTTTTCAATTTTTTTCGATGATTTTAAGTCTGT
CTTTTTTAATGGGGAAAAGTGCAAAAGCCAGTTCAGCAAAAAGTTATAAAATCATCGGCTACTATCCGTC
CTGGGGCGCTTATGGAAGGGATTTTCAAGTATGGGATATGGATGCTTCTAAAGTCAGCCATATTAATTAT
GCATTTGCTGATATTTGCTGGGAGGGGAGGCATGGAAACGTACGTCCGACAGGCCCGAATCCCCAGACAT
GGTCTTGCCAGGATGAAAACGGAGTGATTGATGTTCCAAATGGATCAATCGTTATGGGGGACCCATGGAT
CGATGTGCAAAAAGTCAAAATGCCGAGATACTTGGGATGAGCCGATTCGGGGCAACTTTAAACAACATTTG
AAGCTGAAAAAGAACCATCCTCATTTGAAAACATTCATATCAGTTGGCGGATGGTCTTGGTCAAATCGCT
TTTCAGATGTTGCGGCAGATCCTGCGGCAAGAGAGAATTTTGTGCTTTCAGCAGTAAATATGTTAAGAAA
ATATGGGTTTGTGAGGGTTCGACCTTGACTGGGAATACCCGGTTAGTGGAGGGCTGCCGGGAAACAGCACC
CGTCCGGAGGATAAGAGAAAACCTACACGCTACTCTTGCAGGATGTGCGAGAAAAGCTTGACGCCGCGAGAAG
```

CGAAGGATGGCAAGAAATACTTGTGACGACCGTGTCCGGCGCCAGTCCAGAATATGTAAGCAACACTGA
ATTAGATAAGATTGCTGAAACCGTTGATTGGATTAAACATTATGACCTATGACTACAATGGCGGATGGCAA
AGTATAAGCGCTCATAATGCCCCATTATCTATGATCCAAAAGCGAAAGAAGCCGGCGTTCCAAACGCTG
AGACATTTAACATTGAAAACCGTGAAGCGCTACAAGGAAGCCGGTGTCAAAGCGGACAAATTAGTGCT
TGGCACACCGTTCTATGGCAGAGGCTGGAGCAATTGTGAGCCTGCAGACAACGGAGAATATCAAAAATGC
GGACCGCTAAAGAAGGGACGTGGGAAAAGGGGGTATTTGATTTTTTTCAGATCTTGAAGAAGTACATCA
ATAAAAATGGATATAAAGATATTTGGAATGATCGAGCAAAAGTGCCGTTTTTGTATAATGCGGAGAATGG
AAACTTCATTACCTACGATGATGAAGAATCATATGGATACAAAACCGATTTAATTCATCAAACGGATTA
AGCGGGGCTATGTTTTGGGATTTTCAGCGGTGATTCGCATCAGACTTTGCTCAACAAATTAGCAGCCGATT
TAGGGTTCGCTCCGGTGGGGTAAATCCAGAGCCGCTTCATCTGCACCGGATAATTTGCGTGTGACCGA
AAAAACCGCAACCAGTATCAGTCTGGCGTGGGATGCACCGAGCGACGCAACATCGCAGCGTCGTATGTG
CTGTATATGAAGGCGGGCCGTATCGGTCAAGGATACATCGGCGACAATCGGGCAATTAAGCCGCGTA
CGACATACTCATTTACAGTATCGGCAAAAGGATGCGGACGGAAAGCTCCATACCGGGCCAACGATAGAAGC
AGCAACAACTCTGATCAAAATGATTGGGTATAACGAAATGGAAAGGTACAGCCGCTACACAGGCGGAGAC
CGAGTCGTCTTTAACGGCAAAAGTGTATGAAGCGAAATGGTGGCGTCAAGGAGAGCAGCCGGATCAGGCGG
GTGAGTCGGGTGTATGGAAATTAATTGGTGATTGCAA

***Bacillus licheniformis* strain DSM 8785 chitinase (chiA) gene, partial cds**

GenBank: FJ465148.1

>FJ465148.1 *Bacillus licheniformis* strain DSM 8785 chitinase (chiA)
gene, partial cds

TTTGTGATGTTGCTGAGCTTGTGCAATTTGTGAATGGGGAAGTTGCAAAAGCCGATTCGGGAAAAAACTATA
AAATCATCGGCTACTATCCATCATGGGGTGTATGGAAGGGATTTTCAAGTTTGGGATATGGACGTTTC
GAAAGTCAGCCACATTAATATGCCTTTGCTGATATTTGCTGGGAGGGAAGGCATGGGAACCCTGATCCG
ACAGGCCCAATCTCAAACGTGGTCATGCCAGGATGAAAACGGAGTGATCGACGCGCCAAATGGAACAA
TCGTGATGGGCGATCCCTGGATTGACGCACAAAAGGCAAATCCCGGGGATGTCTGGGATGAACCGATCCG
CGGCAACTTTAAACAATTTGTTGAAGCTGAAAAAGAGCCACCTCATTTGAAAACGTTTCATATCGGTGCGG
GGGTGGACTTGGTCTAACCGCTTTTCAGATGTGCGGCGAGATCCTGCGGCAAGGGAGAATTTTCGCCGCTT
CGGCCGTTGAGTTTTTAAAGAAATACGGGTTTGACGGGTGCGATCTTGACTGGGAATATCCGGTCAGCGG
AGGATTGCCGGGGAACAGCACACGTCCGGAAAGATAAAAAGAACTACACGCTGCTCCTGCAAGAGGTGCGC
AAAAAACTTGACGCTGCAGAAGCAAAAAGACGGCAAGGAATACTTGCTGACGATCGCATCCGGCGCAAGTC
CCGATTATGTAAGCAACACTGAGCTCGATAAAAATCGCTCAAACCGTGGATTGGATTAACATTATGACCTA
TGACTTTAATGGCGGATGGCAAAGCATAAGCGCCATAATGCACCGCTGTTCTATGATCCAAAAGCGAAA
GAAGCAGGCGTTCCAAACGCTGAGACCTACAATATTGAAAACACTGTGAAACGCTACAAGGAAGCCGGTG
TCAAGGGTGACAAATTAGTGCTTGGAAACACCGTCTACGGAAGGGGCTGGAGCGGTTGTGAACCAAGGGG
GCACGGGAGATATCAGAAATGCGGACCGGTTCAAGAAGGGACATGGGAAAAGGGCGTATTCGATTTTTTCA
GATCTTGAAGGAACATATGTGAATCAAAACGGCTATAAAAAGGATTTGGAACGATCAAGCAAAAGTGCCTG
TTTTGTATAATGCGGAAAATGGCAATTTTCATCACTTATGATGATGAACAATCATTTCGGCCACAAAACGGA
TTTTATTAAGCAAAACGGATTAAGCGGAGCAATGTTCTGGGATTTTCAGCGGCGATTCCAATCGGACGCTT
CTCAATAAAATGGCAGCCGATTTAGATTTTGCACCGGACGGAGGCAATCCGGAGCCGCTTCATCGGCAC
CTGTGAATGTGCGTGTAAACCGGAAAACTGCTACAAGTGTGAGCCTGGCGTGGGATGCGCCGAGCAGCGG
AGCAACATTGCGGAATATGTCGTGTCATTTGAAAACCGGTCGATATCTGTAAGAAACATCAGCGGAA
ATAGGCGGCTTGAAGCCGGTACGGCTACTCATTTACTGTTTCAGCAAAGGATGCGGATGGAAAGCTCC
ATGCCGGACCAACGGTAGAGGTCACGACGAATCTGACCAAGCCTGTTTCATATGACGAATGGAAAGAGAC
GAGCGCATAACAGCGGAGAGCGGGTTCATTTAACGGAAAAGTGTATGAAGCGAAATGGTGGACGAAA
GGCGACCGCCTGATCAACCCGGTGAATGGGGCGTATGGCGGCTGATCGGAGGCTGCGAATAA

***Stenotrophomonas maltophilia* gene for chitinase, complete cds, strain: Sm4**

GenBank: AB973459.1

>AB973459.1 *Stenotrophomonas maltophilia* gene for chitinase, complete
cds, strain: Sm4

ATGTACGACCCGATTGTGCAGAGTGCCGATGTACGCAGTGCCACCCCTCCCTTCATCGCTGTCGCCCCG
GCCGCTGTCGCTGGCTGCTGGCCCTGGCCGGGGCGGTTGCCCTGCCCGGCTGGCCCAGGCCGCCAGCTG
TGCCGGCGTGGCCGAATGGGACCAGGCCAAGATCTACCGCAGTGGCGACACCCGTCAGAAGGGAGGGGTC
CTCTACCGGGCGAACCAGGACATCTGGAATGCGCCGCCGACCATCCGGCCGGGGCGCCCTACTACACCA
ACCTCGGGCCTGCGACGGCGGGGACCAACCAGCCGCCCGTGGTTCAGCCTGACCTCGCCGGCCAACGG
CGCCACCTTCAGCGCCGGCAGCACGGTCAACGTGACCGCCAACGCCAGTGATGCGGACGGCAGCGTCAGC
AAGGTCGAGTTCTTCCGCGATGGCAGTTCGCTGGGGCTGACACCAGCGCGCCGTACAGCGCCAGCTGGG
CCAACGCCAGCGCCGGCAGCCACACCTGCGCGCGGTCGCCACCGACAACAACAACGCCACCGCCAGCAC
CGCGACCATACCATCACCGTCAACGCGGCCAGTGGCGATACCACCGCGCCAGCGTGCCCGGTGGCCTG

GCCGTGGGTACCCGCACCGCCAGCAGCATCGCCCTGAGCTGGAGCCCCTCCACCGACAACACCGGTGGCA
GCGGCGTGGCCGGCTACGACGTGTACCGCAATGGCAGTCTGGTCGGCTCACCGTCCAGCGCCAGCTATGT
CGATGGTGGCCTGACTGCATCGACCAGCTACAGCTACCGCGTGC GCGCCCGTGACAACGCCGGCAACGCG
TCGGCACAGGGCACGGCAGTGACCGCCAGCACCCTGGCCGGCGATCGTGGCACCACCGGCAAGCGGGTCA
TCGGGTACTTCACCCAGTGGGGCATCTATGGCCGCAACTACCGGGTCAAGAACATCGACAGCAGCGGTTC
GGCCGCGCCTGACCCACATCAACTACGCCTTCGGCAACGTGCGCAACAACCGCTGCGAAGTAGGCATC
ACCCAGGCGTCGGACCCGAACAGCGGAGCCGGTGGCGATGCCCTTCGCCGACTACACCAAGGCTTTCGGTG
CCGGCGAAAGCGTGAGCGGCAGCGCCGATACCTGGGACCAGCCGCTGCGCGGCAACTGGAACCAGCTCAA
GCAGCTCAAGGCAAGTACCCGGGCATGAAGGTGTGATCTCGCTGGGTGGCTGGACCTGGTCGCGCGGC
TTCTCCAGCGCGGCGCAACCCGGCAACCCAGGCCTTCGTGCTTCGTGCATCGACGCCTACATCAAGG
GCAACCTGTGCGGTGACCGACGGTGCCGGTGGCCCCGGTGC GCGCGCTGGGGGTGTTTCGATGGCATCGACAT
CGACTGGGAGTACCCGGTGGCCTGCGGTATCGCCTGCGGCACGCCCGAGGACAACGCCAACTTCACCGCG
CTGATGGCCGAATTCCGCCGCCAGCTCGATGCGGTGCGCCCGGGCCTGCTGCTGACGGTGGCGGTGCGTG
CCGGCATCGACAAGATCCGCGTCAACCGATCCGGCCGCATACCACCCGTACCTGGACTACATCAACGTGAT
GACCTACGACTTCCACGGCGCTGGGATGCGAAGACCAATCACCAGTCGGCGCTGTTTCGATTCCGCCGAAT
GATCCGTCCACCGGCGACCAGAAGCTGTACAACAGCAACGACGCCATCGAGGCCTTCATCAGCCGCGGTG
TTCCCGCCGCAAGCTCAACCTGGGCATCGGTTATTACGGGCGTGGCTGGACCGGGGTGACCAACGCCAA
CAACGGCCTGTACCAGAACGCCACCGGTGCGGCACCGGTACCTACGAGGCCGGCATTGAAGACTGGAAG
GTGCTGAAGAACCTGGCGTGGCCGGGTACACCGACAACACCGCCGGTGCCACCTGGATCTACAACGGCA
GCACGTTGTGGAGCTTCGATACACCGGCCAACATCACCCGCAAGATGGGCTACGTGAAGACCCAGGGACT
GGGCGGTGCGTTCGTCTGGGAGTTCAGCGGCGACGATGCGCAGGGCACGCTGACCAAGGCGGTGAGTGA
GGCTGA

1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminasa – gen acdS

Mesorhizobium sp. MM5343 AcdS (acdS) gene, partial cds

GenBank: KR154567.1

```
>KR154567.1 Mesorhizobium sp. MM5343 AcdS (acdS) gene, partial cds
GAATACATCATCCCTGACGCGATCGCATCAAATGCCGACACGCTCGTCTCGATCGGCGGCGTGCAGTCAA
ACCACACACGCATGGTTCGCTGCGGTCGCGCCCAAGATCGGCATGAAATGCCCTCCTGGTACAGGAGAGCTG
GGTGCCGCATGAGGATGCCGTCTACTACCGCGTCGGCAACGTTCTCTTGAGCCGCATCATGGGAGCAGAG
GTGCGCCTGGTTCGACCAAGGCTTTGACATCGGCATCCGCCGAGTTGGGAAGAAGCGCTCGACGAGGTCA
AGGCAAGGGGGCGGCAGACCCTATGCAATACCGGCCGGAGCCTCCGTTACAAAATATGGCGGACTCGGCTA
CGTCCAGTTTCGCGCAGGAGGTGCGCGCGCAAGAGAAGCAGCTTGGCTTTGCCTTCGACTATATCATCGTA
TGTACGGTTCACGGGCTCGACGCAAGCCGGCATGGTTCGTCGGCTTCGCCAGGACGGACGACAGCGCAATG
TGGTTCGGCATCGATGCCTCCGCGACCCCCGAGCAGGCCAGCGCGCAAGTGTAGACATCGCCAAAAACAC
CGCAAAGCTCGTGGACCTTGGTACCGGTTTAACCGAGGACGACGTGGTGTGCTCAAGGCGTACGCATAC
CCGTGCTATGGCATCCCATCGCGGAAACAAAGGAAGCCATCCGTCTGTGTGCCAGGCTTGAGGGCATGA
TTACCGATCCCGTCTATGAAGGC
```

Pseudomonas sp. Ps 2-3 ACC deaminase gene, complete cds

GenBank: EU520401.1

```
>EU520401.1 Pseudomonas sp. Ps 2-3 ACC deaminase gene, complete cds
TATGAATCTGAAACGATTTGCTCGTTATCCGCTGACCTTTGGTCCCTCTCCCATCACCCCTTGAAGCGT
CTCAGCGAACATTTGGGCGGCAAGGTGCAGTTGTATGCCAAGCGTGAAGACTGCAACAGTGGCCTGGCTT
TCGGCGGGAACAAAACCCGCAAGCTTGAATACCTGATTCCCGAAGCACTTGAGCAAGGCTGCGATACCCT
GGTTTCCATCGGCGGAATCCAGTCGAACCAGACCCGCCAGGTAGCCGCCGTCGCTGCTCACCTGGGCATG
AAGTGCCTACTGGTGCAGGAAAACTGGGTGAACTACTCCGATGCGGTGTATGACCGGGTAGGCAATATCG
AGATGTCCCGGATCATGGGTGCAGAGGTACGTCGAGCGCCGCCGGGTTTGACATCGGCATTCGTCCAG
CTGGGAGAAGGCCATGAGCGACGTGGTTCGAGCGAGGCGGCAAGCCATTCGCCATCCCGGCCGGGTGTTC
GAGCATCCCTACGGCGGCTCGGGTTCGTGGGTTTCGCCGAAGAGGTACGGCAGCAGGAAAAAGAACTGG
GCTTCAAGTTTGATTACATTTGTGGTCTGCTCGGTGACCGGTAGTACCCAGGCCGATGGTGGTTCGGTTT
CGTGCCGAGCCCGCTCGAAGAACGTCATCGGTATCGACGCTCGGCCAAACCGGAGCAGACCAAGGCA
CAGATTCTGCGCATTGCCCGGCACACCGCTGAGCTGGTGGAGCTGGGTGCGGAGATCACTGAAGAGGACG
TGGTCCCTCGATACGCGCTTCGCCTACCCGGAATATGGCTTGCCCAACGACGGCAGCTGGAAGCTATCCG
ACTGTGCGCGAGCCTTGAGGGCGTACTGACAGACCCGGTGTATGAAGGTAATCCATGCACGGGATGTTT
GATATGGTTCGCTGTTGGTGGTTCCTGAAAGGCTCGAAAGTGCCTTTATGCGCATTTGGGCGGGGTTCGG
CGCTGAACGCATATAGCTTTCTGTTTCGAGACGGCTAAA
```

Bacillus subtilis strain RJ46 ACC deaminase gene, partial cds

GenBank: KR069056.1

```
>KR069056.1 Bacillus subtilis strain RJ46 ACC deaminase gene, partial
cds
TCCTCGCCTCGGGCGGACACCCTCGTCTCGATCGGCGGCTACCAGTCCAACCACACCCGCCAGGTTCG
CGCCGTCGCCGCGCACCTCGGACTGAAGTCCCGCCTCGTCCAGGAGCGCTGGGTGCACTGGGACGACCCG
GTCAACGACCGGGTCGGCAACATCGAGATCTCACGGATCATCGGCGCCGACGTCCGCCTCGACGACTCCG
GTTTCGACATCGGCATCCGCTCGAGCTGGGAGGACGCGATCGCCGAGGTGGAGGCCGCCGGCGGCACCC
GTACCCGATCCCGCCGGAGCCTCGGAGCATCCCTCGGCGGACTCGGGTTCGCGAACCTGGGCGTACGAG
GTCGCCCGGACAGGAGGCCGAGCTCGGGGCTCTTTCGACACCATCGTCTGTCACGGTACCCGGATCGA
CGCACGCCGGCATGATCGCCGGCTTCGCCGCCCTCGAAGCCGCCGGCGGCGGCCCGGACGATCATCGG
CATCGACGCTCGGCGACGCTGGACAAGACCCGCGAGCAGGTACGCGGATCGCGAACCGCACCCGCCGAC
CTCATCAGGCTCGGCCGCGAGATCACACCGGCCGAGGTGACATCCGCTCCGGCTGGCAGGGACCCGCT
ACGGCATCCCGACGAGACGACGGTTCGCCGCGATCCGCACGA
```

Bacillus cereus strain DD14 ACC deaminase gene, partial cds

GenBank: KT216607.1

```
>KT216607.1 Bacillus cereus strain DD14 ACC deaminase gene, partial
cds
TTGGTTTAAACAGCCGGTGGCAATAAGACGAGAAAATTAGAATTTTTAGTTGCAGATGCACAGGAAAAGGG
TGCAGATACGTTAATTACAGCTGGTGGTATTCAGTCAAATCATTTGCCGCTGACACTGGCAGCTGCGGTA
AAAGAAAAAATGAAATGTATTTCTGTATTAGAGGAAGGGCTTGAGCCAGAAGAGAAGAGACTTTAACG
```

GAAACTATTTCTTATATCACTTATTAGGTGCTGAAAACGTCATTGTTGTACCGAACGGAGCAGACCTGAT
GGAAGAAATGCATAAAGTAGCAAAAGAAAGTAAGTGAAAAAGGAAATACACCATATGTAATTCAGTTGGT
GGATCAAAACCTACAGGCGCTATGGGATACGTTGCTTGTGCGCAAGAAATATGGCGCAATCATTTGAGC
AAGGAATTGATTTTCAGTTTCAGTTGTTTGTGTAAGTGGTAGCGGCGGTATGCATGCTGGTTAAATTA
TTTTTCTGGAACACAAAAGCCATATTCCTGTAATCGGGATTAATGTAAGTAGAGGAAAAGCTGAGCAAGAA
GAGAAAGTAGCAAAACTTGTAGATGAACTTCAGCACATGTTGGTATTCCAACTTTATCTCGCGCGACG
CTGTTACGTGCTTTGATGAATATGTAGGACCAGGCTATGCGTTACCAACGCCGAAATGGTAGAGGCAGT
TCAGTTACTTGCGAAAACAGAAGGTATTTTACTTGATCCAGTGTATACAGGTAAGGCAGTAGCGGGATTA
ATCGACTTAA

***Stenotrophomonas acidaminiphila* strain DD67 ACC deaminase gene, partial cds**

GenBank: KT216610.1

>KT216610.1 *Stenotrophomonas acidaminiphila* strain DD67 ACC deaminase
gene, partial cds
CTTGGTTTAAACAGCCGGTGGCAATAAGACGAGAAAGTTAGAATTTCTAGTTGCAGATGCACAGGAAAATG
GTGCAGATACGTTAATTACAGCTGGTGGTATTTCAGTCAAATCATGCGCCCTGACACTTGTGCTGCGGT
AAAAGAAAAAATGAAATGTATTCTTGTATTAGAGGAAGGGCTTGAGCCAGAAGAGAAGAGACTTTAAC
GGAAACTATTTCTTATATCACTTATTAGGTGCTGAAAACGTCATTGTTGTACCGAACGGAGCAGACCTGA
TGGAAAGAAATGCATAAAGTAGCAAAAAGAAGTAAGTGAAAAAGGAAATACACCATATGTAATTCAGTTGG
TGGATCAAACCTACAGGCGCTATGGGATACGTTGCTTGTGCGCAAGAAATATGGCGCAATCATTTGAG
CAAGGAATTGATTTTCAGTTTCAGTTGTTTGTGTAAGTGGTAGCGGCGGTATGCATGCTGGTTAAATTA
GTTTTTCTGGAACACAAAAGCTATATTCCTGTAATCGGGATTAATGTAAGTAGAGGAAAAGCTGAGCAAGA
AGAGAAAGTAGCAAAACTTGTAGATGAACTTCAGCACATGTTGGTATTCCAACTTTATCTCGCGCGAC
GCTGTTACGTGCTTTGATGAATATGTAGGACCAGGCTATGCGTTACCAACGCCGAAATGGTAGAGGCAG
TTCAGTTACTTGCGAAAACAGAAGGTATTTTACTTGATCCAGTGTATACAGGTAAGGCAGTAGCGGGATT
AATCGACTTAA

Sideróforos – gen fur

***Legionella pneumophila* 130b (Wadsworth) ferric uptake regulation protein (fur) gene,
complete cds**

GenBank: U06072.1

>U06072.1 *Legionella pneumophila* 130b (Wadsworth) ferric uptake
regulation protein (fur) gene, complete cds
TTGCCATTATTCGGCCAGACTAAGTTTTAAGGCCGCTAATGGTTTTTTAGAGCATGAAAATTATTTTAGGC
CTTGATGCTAATTATTAATCCAATTTTGGCTGGAATAATGATCAAAGCTCGAAATTCGTTACAGTTAAGGA
GCACAAGTGGAAAGAGAGTCAACAGTTAAAAGACGCTGGATTAATAATCACATTACCTCGTATCAAGGTAT
TGCAAAATATTGGAGCAATCAAGAAAACCATCATTTGAGTGCAGAAGCAGTCTATAAAGCCTTATTGGAATC
GGGTGAGGATGTTGGTTTAGCTACTGTGTATAGAGTTCTTACTCAATTTGAAGCAGCGGGATTAGTATCG
AGACATAATTTTGAAGGAGGACACTCGGTATTTGAGTTGTCTCAAGGCGAACATCATGACCATCTTGTTT
GTGTTAAGTGTGGGCGGTAGAGGAATTTGTAGATGAAATAATAGAACAAAGACAAAAGCAATTGCCGA
ACGCGCTCATTTTAAAATGACAGATCATGCGCTAAACATATATGGTATATGTCCGAGTGTCAATGACTT
TGATATTTTAACTGGATTGGCTTGTACCTCACGGAATATTATAAGCGTATTTACTATATTTCTTTTGCAG
TGCTTTATCATTACAATAATTGGAGT

>AAA19656.1 Fur [*Legionella pneumophila* 130b]
MEESQQLKDAGLKITLPRIKVLQILEQSRNHLSAEAVYKALLESGEDVGLATVYRVLTQFEAAGLVS
RHFEGGHSVFELSQGEHHDHLVVCVKGRVEEFVDEIIEQRQKAI AERAHFKMTDHALNIYGICPQCQ

***P. putida* fur gene**

GenBank: X82037.1

>X82037.1 *P. putida* fur gene
CCCGGAAACGAGCAACCGGCGAGTGCAGCAGTCCCCATAGGGTGAGGCTGGTTGACAAGAGCTTGGTG
TTTTGCATCGGTGGGCGACTTGGACTATCTTCTGGACAACGTAACCCCGATCATAACCCGATTGAGAAGCT
GCGAAGCAGCATCGGCGAGAAAAGCTGACCATGGTTGAAAATAGCGAATTACGCAAAGCCGGTCTCAAGGT
TACCCTGCCTCGAGTAAAGATCCTTCAGATGCTCGACTCTACCGAGCAGCGTCACATGAGTGCCGAGGAG
TGTATCAAGGCCCTTGATGGAAGCTGGTGAGGACGTTGGCCTGGCCACCGTCTACCGCGTGTGACCCAGT
TCGAAGCGGCGGGGCTGGTGGTTGCGCACAACTTCGACGCGGCCACGCAGTCTTCGAGCTGGCGGATGG

CGGTCACCACGACCACATGGTCAACGTGGAACCAGCGAAGTCATCGAGTTCATGGACGCTGAAATCGAG
AAGCGTCAGCGCGAGATCGTGGCCGAGCATGGCTTCGAGCTGGTGGACCACAATCTGGTCCGTACGTGC
GTAAGAAAAAGTAACGATTTTCGATCGTTATAAAATAGCAAAGGCGACCTTCGGGTCCGTTTTGTGCTTTGTC
TGCAG

>CAA57557.1 fur [Pseudomonas putida]
MVENSELRKAGLKVTLPRVKILQMLDSTEQRHMSAEECIKALMEAGEDVGLATVYRVLTQFEAAGLVVRH
NFDGGHAVFELADGGHHDHVMNVETSEVIEFMDAEIEKRQREIVAEHGFELVDHNLVLYVRKKK

***Pseudomonas mendocina* ymp Fur (fur) gene, complete cds**

GenBank: DQ996045.1

>DQ996045.1 Pseudomonas mendocina ymp Fur (fur) gene, complete cds
ATGAGAAAGCAGACCATGGTTGAAAATAACGAACTGCGCAAAGCTGGACTGAAGGTGACCCCTGCCGCGGG
TCAAAATCCTGCAGATGCTGGACAACGCCGAGCACCGCCACATGAGTGCAGGAAAGACGCTCTACAAGGCACT
GATGGAAGCCGGTGAAGACGTCGGTCTGGCGACCGTGTACCGCGTGTGACCCAGTTCGAGGCCGCTGGT
CTGGTGGTGCGCCACAACCTTCGATGGCGGCCATGCGGTGTTTCGAACTGGCCGACAGCGGCCACCACGATC
ACATGGTCTGTGTGCATTCGGCGAAGTGATCGAGTTCCTTCGACGCCGAGATCGAGAAGCGCCAGAAGGA
AATCGTCAAGGAGCACGGTTTCGAGCTGGTCGATCACAACTGGTGTGTACGTGCGCAAGAAGAGCTGA

>ABK41115.1 Fur [Pseudomonas mendocina ymp]
MRKQTMVENNELRKAGLKVTLPRVKILQMLDNAEHRHMSAEDVYKALMEAGEDVGLATVYRVLTQFEAAG
LVVRHNFDDGGHAVFELADSGHHDHMCVDSGEVIEFFDAEIEKRQKEIVKEHGFELVDHNLVLYVRKKS

>sp|P54574|FUR_BACSU Ferric uptake regulation protein OS=Bacillus
subtilis (strain 168) OX=224308 GN=fur PE=1 SV=2
MENRIDRIKKQLHSSSYKLTTPQREATVRVLLENEEDHLSAEDVYLLVKEKSPEIGLATVY
RTLELLTELKVVDKINFGDGVSRYDLRKEGAAHFHHHLVCMCEGAVDEIEEDLLEDVEEI
IERDWKFKIKDHRLTFHGICHRCNGKETE

>tr|A0A1C0QI99|A0A1C0QI99_SERMA Ferric uptake regulation protein
OS=Serratia marcescens subsp. marcescens OX=211759 GN=fur PE=3 SV=1
MTDNNIALKKAGLKVTLPRKILEVLQNPECHHVSAEDLYKKLIDMGEEIGLATVYRVLN
QFDDAGIVTRHNFEGGKSVFELTQQHHHDHLICLDCGKVIEFSDESIEVRQORDIAKQHGI
KLTNHSLYLYGHCEGTGDCREDETLHDKK

>tr|B4SS60|B4SS60_STRM5 Ferric uptake regulation
proteinOS=Stenotrophomonas maltophilia (strain R551-3) OX=391008
GN=fur
PE=3SV=1METHDLRKVGLKVTHPRMRILALLEQRNAQHMTAEDIYRQLLEHGDEIGLATVYRVLTQ
FEAAGLVLKHNFEGGQAVYELDRGGHHDHMDVDSGKIEFESHEIEELQRKIAADHGYELEHSLVLYV
RKKRK