



Estudio de genómica comparada de genes bacterianos relacionados con la proliferación en la rizosfera.

Maria José Gomila Ubero

Máster en Bioinformática y Bioestadística

Área 4. Subárea 7: Microbiología, Biotecnología y Biología Molecular

Paloma María Pizarro Tobías

David Merino Arranz

04/06/2019



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/)

FICHA DEL TRABAJO FINAL

Título del trabajo:	<i>Estudio de Genómica Comparada de Genes Bacterianos Relacionados con la Proliferación en la Rizosfera</i>
Nombre del autor:	<i>Maria José Gomila Ubero</i>
Nombre del consultor/a:	<i>Paloma María Pizarro Tobías</i>
Nombre del PRA:	<i>David Merino Arranz</i>
Fecha de entrega (mm/aaaa):	<i>06/2019</i>
Titulación:	<i>Máster en Bioinformática y Bioestadística</i>
Área del Trabajo Final:	<i>Microbiología, Biotecnología y Biología Molecular</i>
Idioma del trabajo:	<i>Español</i>
Palabras clave	<i>PGPR /Plant Growth-Promoting Rhizobacteria, Rhizosphere Fitness, Comparative genomics</i>

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

Pseudomonas es un género taxonómicamente muy diverso que alberga una de las especies más estudiada por su relación mutualista con las plantas a nivel de la rizosfera, *Pseudomonas putida*. Está considerada una rizobacteria que promueve el crecimiento de la planta, también conocida como una PGPR (Plant-Growth Promoting Rhizobacteria). Se han definido las distintas etapas de colonización, siendo la adhesión, la biosíntesis de flagelos y la adaptación al estrés, características esenciales para llevar a cabo una colonización óptima de la rizosfera, así como los genes implicados las distintas etapas de la colonización. Los genes *RpoN* y *FliA* han sido descritos como genes implicados en la biosíntesis, el gen *RelA* está relacionado con la adaptación al estrés y el gen *GalU* se describe implicado en las etapas más tardías de la colonización. Este trabajo lleva a cabo un estudio sobre la selección mediante la genómica comparada, determinando la relación entre la estructura y la función de los genes *RpoN*, *FliA*, *RelA* y *GalU*, a través de las distintas especies y cepas de *Pseudomonas*.

Abstract (in English, 250 words or less):

Pseudomonas is a taxonomically diverse genus that harbors one of the most studied species for its mutualistic relationship with plants at the rhizosphere level, *Pseudomonas putida*. It is considered a rhizobacteria that promotes plant growth, also known as a PGPR (Plant-Growth Promoting Rhizobacteria). The different stages of colonization have been defined, being the adhesion, the biosynthesis of flagella and the adaptation to stress, essential characteristics to carry out an optimal colonization of the rhizosphere, as well as the genes involved in the different stages of colonization. The *RpoN* and *FliA* genes have been described as genes involved in biosynthesis, the *RelA* gene is related to stress adaptation and the *GalU* gene is described as involved in the later stages of colonization. This work carries out a study on selection by comparative genomics, determining the relationship between the structure and the function of the genes *RpoN*, *FliA*, *RelA* and *GalU*, through the different species and strains of *Pseudomonas*.

Índice

1. Introducción.....	6
1.1 Contexto y justificación del Trabajo.....	6
1.2 Objetivos del Trabajo	9
1.3 Enfoque, materiales y métodos.....	9
1.4 Planificación del Trabajo	10
1.5 Breve resumen de productos obtenidos.....	11
1.6 Breve descripción de los otros capítulos de la memoria	11
2. Resultados	12
2.1 Relaciones evolutivas basadas en el gen <i>RpoN</i>	12
2.2 Relaciones evolutivas basadas en el gen <i>FliA</i>	14
2.3 Relaciones evolutivas basadas en el gen <i>RelA</i>	15
2.4 Relaciones evolutivas basadas en el gen <i>GalU</i>	16
3. Discusión y conclusiones	19
3.1 Análisis crítico	19
4. Glosario	20
5. Bibliografía	21
6. Anexos	23
6.1 Anexo 1. Supplementary data.....	23
6.2 Anexo 2. Secuencias proteicas	30

Lista de figuras

Fig 1. Relaciones evolutivas entre taxones basadas en el gen <i>RpoN</i>	12
Fig 2. Relaciones evolutivas entre taxones basadas en el gen <i>FliA</i>	14
Fig 3. Relaciones evolutivas entre taxones basadas en el gen <i>RelA</i>	15
Fig 4. Relaciones evolutivas entre taxones basadas en el gen <i>GalU</i>	16
Fig 5. Comparativa entre el árbol filogenético Neighbor-Joining basado en el gen <i>FliA</i> (A) (Fig 2) y el árbol filogenético basado en el gen <i>16S rRNA</i> (B) (Fig A 2).	17
Fig 6. Comparativa entre el árbol filogenético Neighbor-Joining bsado en el gen <i>GalU</i> (A) (Fig 4) y el árbol filogenético basado en el gen <i>16S rRNA</i> (B) (Fig A 4).	17
Fig 7. Comparativa entre el árbol filogenético Neighbor-Joining basado en el gen <i>RelA</i> (A) (Fig 3) y el árbol filogenético basado en el gen <i>16S rRNA</i> (B) (Fig A 3).	18
Fig 8. Comparativa entre el árbol filogenético Neighbor-Joining basado en el gen <i>RpoN</i> (A) (Fig 1) y el árbol filogenético basado en el gen <i>16S rRNA</i> (B) (Fig A 1).	18

Lista de tablas

Tabla A 1	24
Tabla A 2	24
Tabla A 3	25
Tabla A 4	25

1. Introducción

1.1 Contexto y justificación del Trabajo

La rizosfera es la zona del suelo en contacto directo con las raíces de la planta. Esta zona es un nicho que posee propiedades que lo hacen apropiado para la proliferación de muchos microorganismos (Martin & Rivilla, 2011). Esto es así gracias a la secreción, por parte de la planta, de una gran diversidad de compuestos orgánicos como aminoácidos, azúcares, vitaminas y ácidos orgánicos, que son utilizados como nutrientes y energía por los microorganismos (Ahmad, Ahmad, & Pichtel, 2011; B. Lugtenberg & Kamilova, 2009; Spaepen, Vanderleyden, & Okon, 2009). Estas secreciones se denominan exudados.

Las bacterias son los organismos más numerosos del suelo y resultan muy importantes gracias a su capacidad para la descomposición de materia orgánica, la fijación del nitrógeno y la formación de agregados en el suelo (Backer et al., 2018; Bruto, Prigent-Combaret, Muller, & Moënnelocoz, 2014; Vacheron et al., 2013). Estas rizobacterias pueden establecer, a través de los exudados, diferentes interacciones con la raíz de la planta, que pueden tener un efecto tanto positivo como negativo en el crecimiento de la planta (Vacheron et al., 2013). Parte de las acciones beneficiosas que producen las rizobacterias son la promoción del crecimiento y la defensa frente a fitopatógenos, mediante múltiples vías de acción (Spaepen et al., 2009). Las rizobacterias que promueven el crecimiento vegetal son denominadas 'plant growth-promoting rhizobacteria' o PGPR, y son bacterias del suelo que colonizan la superficie del sistema radicular y estimulan el crecimiento de la planta, así como también el buen estado general de la misma (Bruto et al., 2014). Muchas cepas de PGPR albergan más de una propiedad beneficiosa para la planta, y esta agrupación de genes que contribuyen a la propiedad beneficiosa pueden haber sido seleccionados evolutivamente por la interacción entre dichas cepas con las plantas (Bruto et al., 2014). Estas rizobacterias o PGPR pueden modificar la arquitectura del sistema radicular, promoviendo así la producción de fitohormonas y otras moléculas que contribuyen al crecimiento de la planta, así como optimizar la nutrición y influir en la fisiología general del organismo (Vacheron et al., 2013). Existen una gran variedad de genes implicados en la conferencia de propiedades beneficiosas para la planta, propiedades que pueden ser directas, como la fijación del nitrógeno, o indirectas, con una gran variedad de funciones celulares (Bruto et al., 2014). Estos genes que contribuyen a las funciones beneficiosas para la planta son denominados genes PBFC o 'plant-beneficial function contributing genes' (Bruto et al., 2014).

Distintas investigaciones han demostrado que inocular plantas con PGPRs puede ser una estrategia efectiva para promover el crecimiento de cultivos, además de proveer a estos cultivos de mayor tolerancia al estrés abiótico (Backer et al., 2018; Spaepen et al., 2009). Se ha determinado que estas rizobacterias podrían ser usadas en el biocontrol de patógenos y en la detoxificación de compuestos orgánicos contaminantes del suelo (Spaepen et al., 2009).

Las PGPR interactúan con una gran variedad de especies de plantas, y éstas abarcan una gran diversidad taxonómica (Bruto et al., 2014). Es interesante poder describir si existe una posible relación evolutiva entre rizobacterias taxonómicamente distintas, con características similares.

Una de las características más importantes para que las cepas de PGPR sean efectivas y poder ejercer dichas funciones beneficiosas para la planta, es la capacidad para colonizar y sobrevivir en la rizosfera de manera eficaz (Pizarro-Tobías, Udaondo, Roca, & Ramos, 2015). Se han definido distintos factores implicados en el proceso esencial de colonización, como la movilidad y adherencia, adaptaciones metabólicas y reorganización genética, entre otras (Martin & Rivilla, 2011), así como genes específicos implicados directa o indirectamente en la colonización (B. J. J. Lugtenberg, Dekkers, & Bloemberg, 2002; Matilla, Espinosa-Urgel, Rodríguez-Herva, Ramos, & Ramos-González, 2007). Dekkers *et al.* definió en el 1999, mediante un estudio con mutantes, una serie de características y genes implicados en la colonización de la raíz, determinando que la motilidad, la síntesis de O-antígeno LPS y la síntesis de aminoácidos y vitamina B1 resultan esenciales para la colonización de la raíz (Dekkers, 1999).

El gen *RpoN* codifica para una proteína que pertenece a la clase σ^{54} de factores sigma, identificado como un elemento de regulación de la expresión de genes de asimilación del nitrógeno, así como de otras funciones metabólicas, como la utilización de aminoácidos, compuestos aromáticos, nitrato, y urea. Este gen parece ser importante en la colonización de la rizosfera debido a que ha sido asociado a otras funciones metabólicas, como la expresión de genes flagelares (Duque et al., 2013; Köhler, Harayama, Ramos, & Timmis, 1989).

(Duque et al., 2013) identificó 11 proteínas implicadas en la adhesión de *P. putida* a la superficie de la raíz, algunas de éstas previamente no identificadas como proteínas de adhesión. Una de estas proteínas es el factor sigma 54 codificado por el gen *RpoN*.

Tanto Köhler en 1989 como Duque en 2013 pudieron ver que mutantes *rpoN* resultaban inmóviles. (Köhler et al., 1989) sugirió en su estudio que la proteína RpoN es necesaria para la expresión de los genes flagelares, o que alteraciones de los componentes de la superficie celular de los mutantes afectan la síntesis.

Más adelante se determinó que el factor RpoN es necesario para la expresión de las proteínas FleQ/FleR en *P. aeruginosa*, y la proteína FleQ es el activador transcripcional necesario para la expresión de *fliD*, la proteína flagelar esencial para la adhesión a la mucina (Dasgupta et al., 2003; Duque et al., 2013).

Además, la proteína RpoN está muy conservada dentro del género *Pseudomonas* (Duque et al., 2013). Pero como en otros géneros, existe un número muy elevado de genes implicados en la biosíntesis flagelar. Otro gen implicado en la síntesis de los flagelos es el gen *FliA*, que codifica para un factor sigma flagelar (Dasgupta et al., 2003). La proteína codificada por el gen *FliA* es un miembro de la clase σ^{28} de factores sigma y está implicado en la transcripción de los genes que codifican para la síntesis de flagelos (Dasgupta et al., 2003; Starnbach & Lory, 1992). El gen *FliC* codifica para la subunidad mayor de flagellin, y es dependiente

de *FliA* (Starnbach & Lory, 1992). Un estudio llevado a cabo por (Rodríguez-Herva et al., 2010) demostró que existen 25 genes regulados por *FliA*, la mayoría de estos son genes relacionados con funciones de motilidad. Además, mostró que tanto los mutantes *fliA* como *fliC* mostraban deficiencias para adherirse al sistema radicular pero la proliferación no se vió afectada (Rodríguez-Herva et al., 2010).

Los mecanismos de respuesta al estrés son muy importantes para la buena colonización de la rizosfera no sólo para la propia rizobacteria sino también para la planta colonizada (Yousef-Coronado, Travieso, & Espinosa-Urgel, 2008). En contacto con la planta, *P. syringae* se encuentra en condiciones de estrés: baja concentración de nutrientes y hierro, así como estrés oxidativo. Esta situación activa el sistema RelA/SpoT, que genera una acumulación de ppGpp. Consecuentemente, ppGpp inhibe de manera directa la transcripción de genes implicados en el crecimiento celular y en la división celular, y a su vez activa la transcripción de genes implicados en la biosíntesis de aminoácidos (Tiyakhon, Li, Korban, & Zhao, 2015). Así pues, se sugiere que la reducción en tamaño de las células está relacionado a la tolerancia al estrés abiótico y supervivencia, y regulado por ppGpp (Tiyakhon et al., 2015). En *P. putida* el módulo RelA/SpoT se asocia también a la adaptación de la rutas anabólicas y la biosíntesis de macromoléculas a una situación de estrés (Reva et al., 2006). La proteína RelA asociada al ribosoma sintetiza ppGpp usando ATP y GTP en respuesta a la falta de aminoácidos (Reva et al., 2006). La función del sistema RelA/SpoT se encuentra muy conservada tanto en bacterias grampositivas como en gramnegativas sugiriendo formar parte de ser un proceso celular que confiere una ventaja selectiva durante periodos de estrés nutricional y estrés ambiental (Reva et al., 2006).

El gen *GalU* codifica para la proteína UDP-glucose pyrophosphorylase (UGPase), y es necesario para la síntesis de lipopolisacáridos intactos en *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas putida* (Yousef-Coronado et al., 2008). Este gen está relacionado con la colonización competitiva de la rizosfera, siendo necesario para tal, como demuestra el mutante mus-40 en el estudio llevado a cabo por (Yousef-Coronado et al., 2008). Las cepas mutantes para *GalU* presentan una mayor adhesión inicial, pero disminuyen en biomasa en la superficie a lo largo del tiempo. Se sugiere que los lipopolisacáridos inhiben la adhesión inicial, pero son necesarios en las etapas más tardías de la colonización como el crecimiento del biofilm.

Este estudio propone definir y analizar un conjunto de genes, de cepas rizobacterianas esenciales para una colonización y proliferación óptima en la rizosfera, analizando las relaciones evolutivas dentro del género *Pseudomonas*, para las proteínas codificadas por los genes *RpoN*, *FliA*, *RelA* y *GalU*, cuatro genes clave para dicha colonización óptima de la rizosfera.

1.2 Objetivos del Trabajo

Objetivo general 1: Estudio y selección de genes bacterianos implicados en la colonización y la proliferación en la rizosfera.

1.1. Determinar, a partir de la bibliografía, los caracteres esenciales presentes en rizobacterias para llevar a cabo la colonización de la raíz de manera óptima.

1.2. Determinar y seleccionar, a partir de la bibliografía, los genes asociados al proceso de colonización de la rizosfera e implicados en la determinación de los caracteres esenciales para la colonización.

1.3. Obtener las secuencias de los genes anteriormente seleccionados mediante bases de datos y navegadores genómicos como RefSeq.

Objetivo general 2: Estudio de la selección sobre los genes y caracteres esenciales para la colonización de la rizosfera.

2.1 Obtención de las secuencias homólogas a los genes de interés, mediante BLAST.

2.2 Comparación de las secuencias homólogas de los genes relacionados con la colonización, mediante alineamientos de secuencias múltiples.

2.3 Determinar las relaciones filogenéticas entre las cepas bacterianas a través de los árboles filogenéticos, con el software MEGA.

2.4 Comparación de las relaciones evolutivas de las cepas bacterianas para los genes seleccionados con los árboles filogenéticos del gen *16S rRNA*.

1.3 Enfoque, materiales y métodos

Identificación de caracteres implicados en la colonización de la rizosfera.

Inicialmente se realiza un estudio bibliográfico para la selección de los caracteres de rizobacterias más relevantes y necesarios implicados en la colonización exitosa de la rizosfera. Se seleccionan 4 caracteres para el estudio; 'Fijación', 'Adhesión', 'Formación de flagelos' y 'Adaptación al estrés'. A continuación, se obtiene 1 gen representante de cada carácter esencial a partir del artículo de Pizarro-Tobías (2015) Events in Root Colonization by *Pseudomonas putida*. Se seleccionan los siguientes genes; *RpoN*, *GalU*, *FliA* y *RelA*, del organismo modelo *Pseudomonas putida*, correspondientes a cada carácter, respectivamente y las cepas bacterianas de referencia para cada gen. Las cepas bacterianas del organismo modelo *P. putida* seleccionadas para cada gen, respectivamente, son GB-1, DOT-T1E, BIRD-1 y F1.

Obtención de las secuencias aminoacídicas de los genes de interés y obtención de secuencias homólogas.

Posteriormente se lleva a cabo un trabajo experimental que consiste, inicialmente, en la obtención de las secuencias de los genes bacterianos mediante bases de datos. La secuencia nucleotídica completa de las 4

cepas de *P.putida* se ha obtenido de la base de datos de NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), así como la localización de los 4 genes de interés dentro de su cepa de referencia y la secuencia aminoacídica de dichos genes. Se han extraído las secuencias en formato .FASTA (Anexo 2).

Para la obtención de secuencias homologas a las secuencias de interés, las secuencias aminoacídicas han sido alineadas usando PSI-BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome). Los hits extraídos del alineamiento con un porcentaje de identidad mayor al 95% han sido seleccionados para realizar el análisis filogenético.

Filogenia

Se establecen las relaciones filogenéticas entre los organismos con secuencias homólogas con identidad mayor al 95%. Se lleva a cabo un alineamiento de secuencias múltiples 'MUSCLE' utilizando el software MEGA7. Mediante el método Neighbor-Joining, se construyen los árboles filogenéticos (software MEGA7). La estimación de la fiabilidad del árbol se calcula a través del método Bootstrap, con un número de réplicas = 100, que nos permite determinar la fiabilidad de cada nodo.

Estudio comparativo con el gen 16S rRNA

El estudio de comparación se lleva a cabo mediante la construcción de los árboles filogenéticos para el gen 16S rRNA. Se obtienen las secuencias proteicas del gen 16S rRNA para todas las cepas resultantes, del alineamiento en BLAST, como secuencias homólogas a nuestros genes de interés. Se realiza un alineamiento múltiple usando MUSCLE con todas las secuencias 16S rRNA y se construyen los árboles filogenéticos, mediante el software MEGA7.

La construcción de las figuras comparativas de los árboles filogenéticos se realiza mediante RStudio.

1.4 Planificación del Trabajo

Task Name	Duration	Start	Finish
PEC 2. Desenvolupament Fase 1	27d	19/03/19	24/04/19
Establecimiento del plan de trabajo definitivo	2d	19/03/19	20/03/19
Seleccionar caracteres para la colonización	4d	19/03/19	22/03/19
Seleccionar genes asociados a la colonización	4d	19/03/19	22/03/19
Revisar Introducción	2d	25/03/19	26/03/19
Obtención de las secuencias de los genes	6d	27/03/19	03/04/19
Elaboración de la memoria	9d	23/03/19	03/04/19

Primer análisis de las secuencias	13d	03/04/19	19/04/19
Elaboración PEC 2	7d	16/04/19	24/04/19
Revisión con el tutor			
PEC 3. Desenvolupament Fase 2	18d	25/04/19	20/05/19
Segundo análisis de las secuencias	5d	25/04/19	01/05/19
Comparación de secuencias	7d	02/05/19	10/05/19
Establecer relaciones filogenéticas	6d	11/05/19	17/05/19
Elaboración de la memoria	15d	29/04/19	17/05/19
Elaboración PEC 3	7d	12/05/19	20/05/19
Revisión con el tutor			
PEC 4. Tancament de la Memòria	11d	21/05/19	04/06/19
Elaboración de la Discusión	8d	21/05/19	30/05/19
Revisión de la Introducción	3d	31/05/19	04/06/19
Revisión con el tutor			
PEC 5A. Elaboració de la Presentació	6d	05/06/19	12/06/19
Elaboración del PowerPoint	4d	05/06/19	10/06/19
Revisión con el tutor	3d	10/06/19	12/06/19
PEC 5B. Defensa Pública	9d	13/06/19	25/06/19

1.5 Breve resumen de productos obtenidos

Los productos obtenidos de este estudio son los árboles filogenéticos que nos permiten realizar establecer las relaciones evolutivas entre taxones.

1.6 Breve descripción de los otros capítulos de la memoria

Esta memoria consta de 7 capítulos. El capítulo 1 corresponde a la Introducción que contiene el marco contextual que permite presentar la temática del estudio. El capítulo 2, Resultados, contiene los productos obtenidos del trabajo experimental, en este caso, se muestran los árboles filogenéticos obtenidos a partir de cada secuencia de proteína de interés. El capítulo 3 (Discusión y conclusiones) contiene la interpretación de los resultados obtenidos y se contrastan con los hallazgos anteriores, además de un análisis crítico evaluando el proceso de realización del estudio. El capítulo 4 corresponde al glosario, apartado que contiene los términos y acrónimos más utilizados y relevantes a lo largo de la memoria. El capítulo 5 corresponde a la bibliografía. Finalmente, el capítulo 7 (Anexo) contiene figuras y tablas relevantes obtenidas de la realización del estudio no incluidas dentro de ningún otro capítulo de la memoria.

2. Resultados

2.1 Relaciones evolutivas basadas en el gen *RpoN*

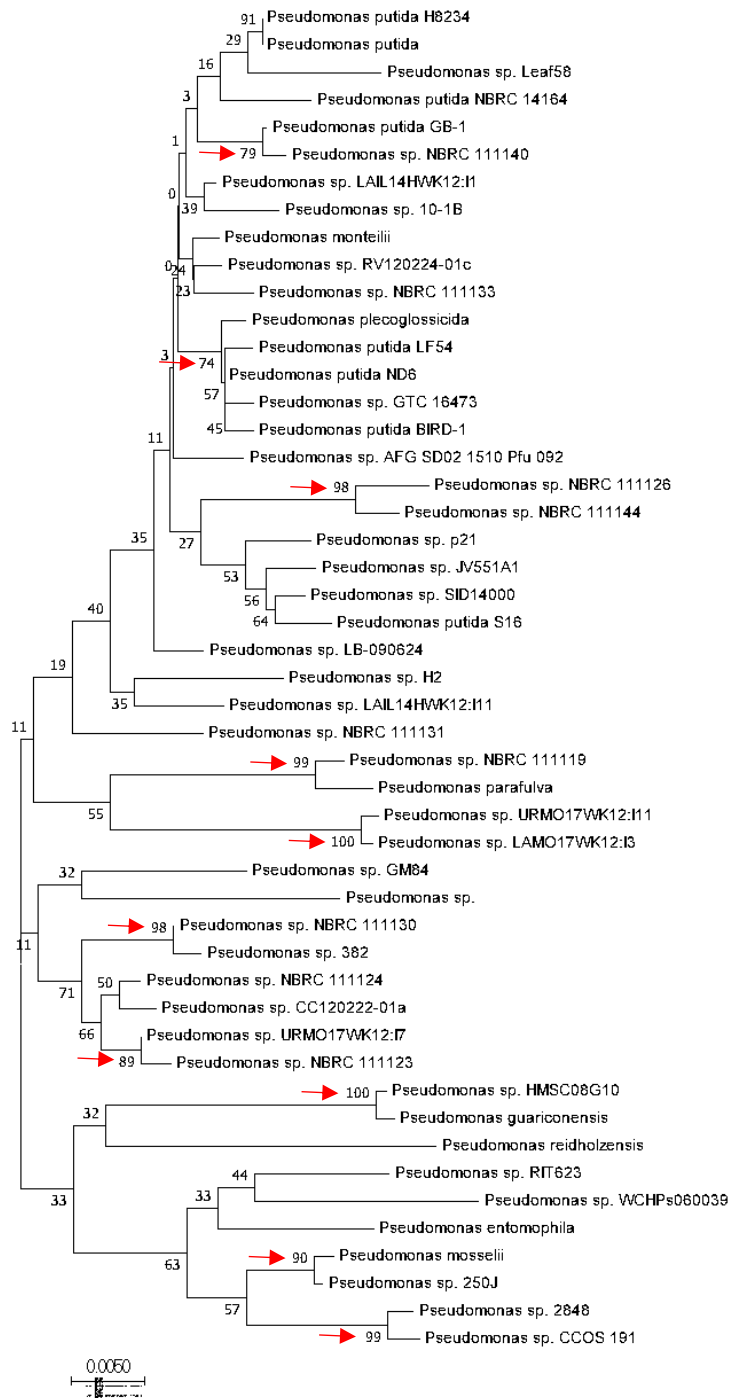


Fig 1. Relaciones evolutivas entre taxones basadas en el gen *RpoN* inferidas mediante el método Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987). Se muestra el árbol óptimo con una suma de longitud de la rama = 0.344. El porcentaje de réplicas en las cuales los taxones han sido asociados mediante el método Bootstrap (100 réplicas) se muestran al lado de las ramas (Felsenstein, 1985). El árbol se dibuja a escala, presentando las longitudes de rama las mismas unidades que las distancias evolutivas utilizadas para inferir el árbol filogenético (Tabla A 1). El análisis se llevó a cabo con 49 secuencias de aminoácidos. Todas las posiciones que contienen 'gaps' y 'missing data' fueron eliminadas. El dataset final contiene 483 posiciones. El análisis evolutivo se llevó a cabo en MEGA7 (Kumar, Stecher, & Tamura, 2016).

Este estudio se centró en analizar las relaciones evolutivas de distintas cepas de *Pseudomonas putida* a partir de la proteína codificada por el gen *RpoN*, un gen relacionado con la síntesis de los flagelos, elementos clave para la adhesión de las rizobacterias a la superficie de la raíz.

Mediante una búsqueda en BLAST usando como query la secuencia de aminoácidos se identificaron más de 500 secuencias homólogas a la secuencia de la proteína RpoN, debido a la alta conservación de esta proteína en el género *Pseudomonas*. Se seleccionaron sólo las secuencias hit con un porcentaje de identidad mayor al 95%, obteniendo 114 secuencias finales. Se eliminan los hits repetidos y los 'MULTISPECIES', debido a la imposibilidad de extraer información de estos. El alineamiento múltiple de las secuencias se realiza a través del software MEGA7, con el que se estima el árbol filogenético basado en el gen *RpoN* (Fig 1). La estimación de la fiabilidad de los nodos del árbol se calcula mediante el método Bootstrap, de 100 réplicas. Como podemos observar en la Fig 1. no todos los nodos son igual de fiables. Consideramos un valor mayor a 70 (porcentaje) como fiable, demostrando la relación evolutiva entre distintas cepas de *P.putida* y especies de *Pseudomonas*.

Las distancias evolutivas obtenidas, presentadas en el Anexo 1, basadas en el gen *RpoN* corresponden a valores muy pequeños, sugiriendo que dicho gen está muy conservado. Obtenemos distintas especies de *Pseudomonas* que presentan un elevado porcentaje Bootstrap, marcadas en la Fig 1. Estas representan las especies más cercanas evolutivamente presentando distancias evolutivas menores (Tabla A 1).

La comparación del árbol basado en el gen *RpoN* con el árbol basado en el gen *16S rRNA* (Fig A 1) también sugiere que el gen *RpoN* está muy conservado dentro del género *Pseudomonas* (Fig 7). La mayoría de las especies más cercanas evolutivamente del árbol basado en *RpoN* coinciden con las especies más cercanas evolutivamente en el árbol basado en *16S rRNA*. Entre estas encontramos la subespecie NBRC11140 y la cepa de *P.putida* GB-1 (79% en *RpoN* (Fig 1)) y (99% en *16S rRNA* (Fig A 1)), *Pseudomonas sp. HMSC08910* y *Pseudomonas guariconensis* (100% en *RpoN* (Fig 1)) y (99% en *16S rRNA* (Fig A 1)). Aunque los árboles basados en los dos genes son parecidos, es necesario destacar que mientras las distintas cepas de *P. putida* (ND6, BIRD-1, H8234 y F54) basándonos en el gen *16S rRNA* se estiman muy cercanas evolutivamente, en el árbol basado en el gen *RpoN*, no es así y se distribuyen más cercanas a otras subespecies de *Pseudomonas* en lugar de entre ellas, como cabría esperar.

2.2 Relaciones evolutivas basadas en el gen *FliA*

El gen *FliA* es otro gen destacado en el proceso de colonización de la rizosfera por su implicación en la expresión de genes determinantes para la biosíntesis de los flagelos. Se realizaron los mismos procedimientos descritos en el apartado “árbol filogenético basado en *RpoN*” para la construcción de la filogenia basada en este gen.

Se obtuvieron, mediante la selección de secuencias homólogas con una identidad mayor al 95%, un total de 60 hits. El análisis y tratamiento de los datos posterior basado en la eliminación de secuencias de especies repetidas y hits “MULTISPECIES”, dio lugar a una selección de 22 secuencias pertenecientes a distintas especies de *Pseudomonas*.

El árbol filogenético basado en el gen *FliA* se presenta en la Fig 2, y las distancias evolutivas entre especies en la Tabla A 3. La prueba Bootstrap muestra la poca fiabilidad del árbol en general, presentando porcentajes por debajo del 70%, a excepción de la relación entre 2 taxones: *Pseudomonas* sp. NBRC111130 y *Pseudomonas* sp. 382 que presenta un 93%.

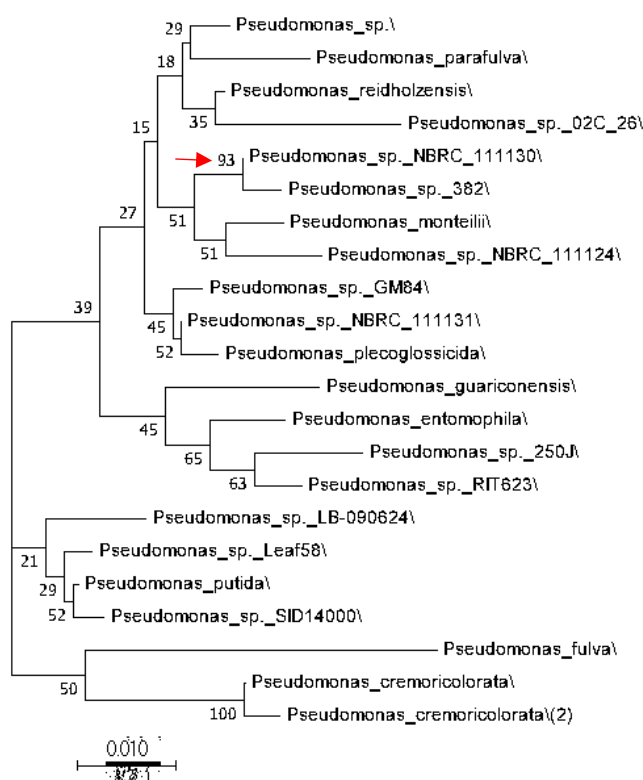


Fig 2. Relaciones evolutivas entre taxones basadas en el gen *FliA* inferidas mediante el método Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987). Se muestra el árbol óptimo con una suma de longitud de la rama = 0.258. El porcentaje de réplicas en las cuales los taxones han sido asociados mediante el método Bootstrap (100 réplicas) se muestran al lado de las ramas (Felsenstein, 1985). El árbol se dibuja a escala, presentando las longitudes de rama las mismas unidades que las distancias evolutivas utilizadas para inferir el árbol filogenético (Tabla A 3). El análisis se llevó a cabo con 22 secuencias de aminoácidos. Todas las posiciones que contienen ‘gaps’ y ‘missing data’ fueron eliminadas. El dataset final contiene 240 posiciones. El análisis evolutivo se llevó a cabo en MEGA7 (Kumar et al., 2016).

El árbol construido con los mismos taxones basado en el gen *16S rRNA* (Fig A 2) muestra relaciones evolutivas adicionales a las que encontramos en el árbol basado en *FliA* como la cercanía evolutiva entre *Pseudomonas*

plecoglossida y *Pseudomonas* SID114000, aunque la relación más destacada es la misma entre los taxones marcados en el árbol basado en nuestro gen de interés.

2.3 Relaciones evolutivas basadas en el gen *RelA*

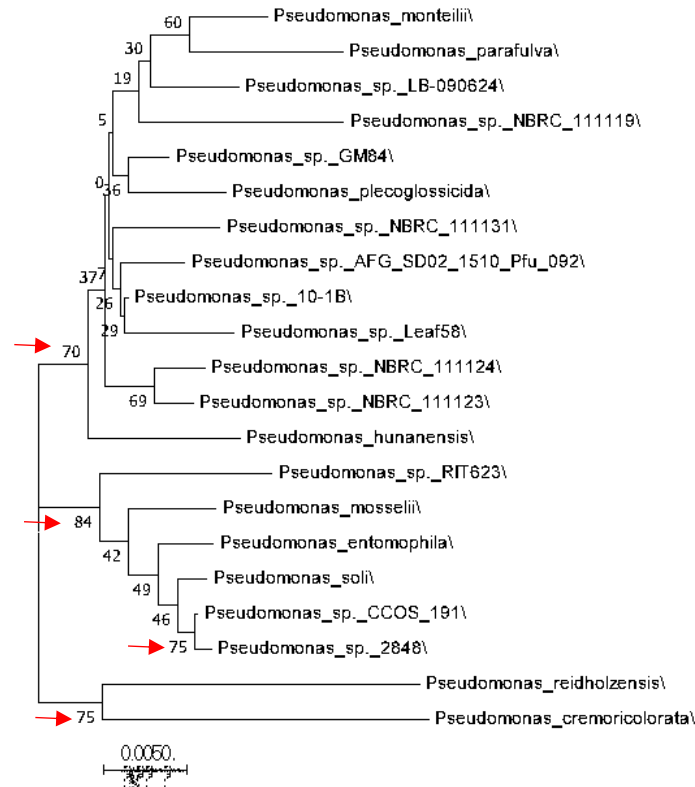


Fig 3. Relaciones evolutivas entre taxones basadas en el gen *RelA* inferidas mediante el método Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987). Se muestra el árbol óptimo con una suma de longitud de la rama = 0.164. El porcentaje de réplicas en las cuales los taxones han sido asociados mediante el método Bootstrap (100 réplicas) se muestran al lado de las ramas (Felsenstein, 1985). El árbol se dibuja a escala, presentando las longitudes de rama las mismas unidades que las distancias evolutivas utilizadas para inferir el árbol filogenético (Tabla A 4). El análisis se llevó a cabo con 21 secuencias de aminoácidos. Todas las posiciones que contienen 'gaps' y 'missing data' fueron eliminadas. El dataset final contiene 701 posiciones. El análisis evolutivo se llevó a cabo en MEGA7 (Kumar et al., 2016).

El gen *RelA* es un gen implicado en el manejo del estrés nutricional y que permite a las rizobacterias tener la habilidad de metabolizar una gran variedad de nutrientes disponibles en los exudados de la raíz.

El árbol basado en este gen se estimó a partir de 21 secuencias de aminoácidos homólogas a la secuencia proteica de la cepa de *Pseudomonas* BIRD-1, obteniendo la Fig 3. Podemos ver la distinción entre 3 grupos de *Pseudomonas*, marcadas en la figura, y destacamos la cercanía evolutiva entre *Pseudomonas* sp. CCOS191 y *Pseudomonas* sp. 2838. Las relaciones filogenéticas dentro de los 3 grupos formados, no se puede considerar fiable debido a los bajos porcentajes obtenidos en la prueba Bootstrap.

La comparativa con el árbol basado en el gen *16S rRNA* (Fig A 3, Fig 7) no concuerda, puesto que en el árbol basado en *16S rRNA* se destacan la relación entre *P. monteilii* y *P. humanensis*, y *P. parafulva* y *P. cremicolorata*, relaciones que no obtenemos en el árbol basado en *RelA*.

2.4 Relaciones evolutivas basadas en el gen *GalU*

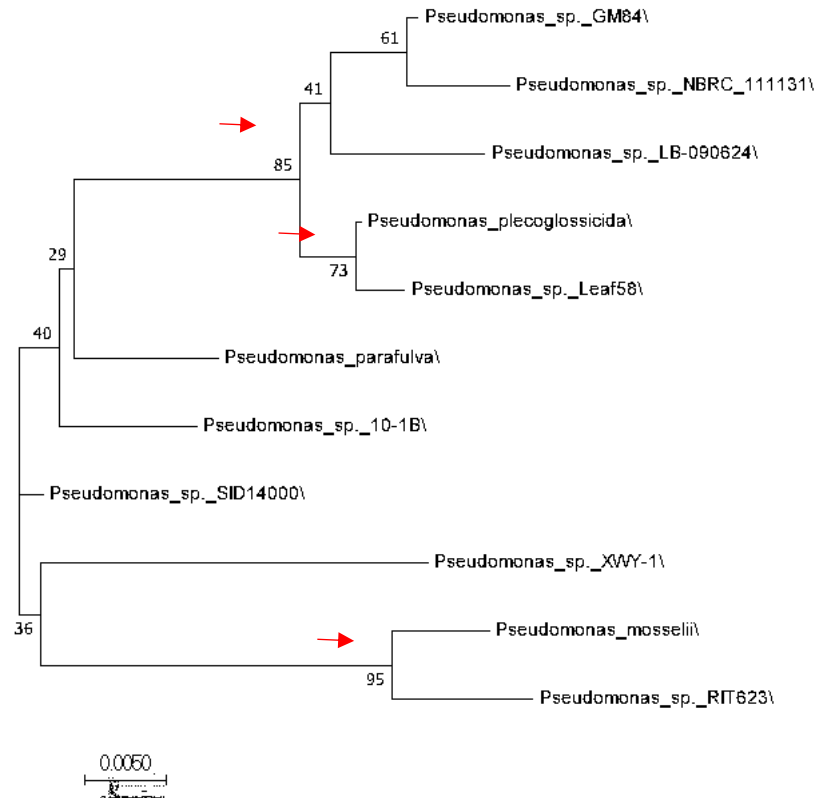


Fig 4. Relaciones evolutivas entre taxones basadas en el gen *GalU* inferidas mediante el método Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987). Se muestra el árbol óptimo con una suma de longitud de la rama = 0.134. El porcentaje de réplicas en las cuales los taxones han sido asociados mediante el método Bootstrap (100 réplicas) se muestran al lado de las ramas (Felsenstein, 1985). El árbol se dibuja a escala, presentando las longitudes de rama las mismas unidades que las distancias evolutivas utilizadas para inferir el árbol filogenético (Tabla A 2). El análisis se llevó a cabo con 11 secuencias de aminoácidos. Todas las posiciones que contienen 'gaps' y 'missing data' fueron eliminadas. El dataset final contiene 278 posiciones. El análisis evolutivo se llevó a cabo en MEGA7 (Kumar et al., 2016).

El gen *GalU* está relacionado con la proliferación de la rizobacteria en la rizosfera, siendo necesario tanto en las primeras etapas de la colonización del sistema radicular como en las etapas más tardías de la colonización y la proliferación en la rizosfera.

El árbol filogenético se estimó a partir de 11 secuencias homólogas a la proteína *GalU* de *Pseudomonas putida* DOT-T1E. Las relaciones evolutivas resultantes se muestran en forma de árbol unrooted en la figura 4. La prueba Bootstrap sugiere de la formación de un grupo con una relación evolutiva estrecha formado por *Pseudomonas* sp. *GM84*, *Pseudomonas* sp. *NBRC111131*, *Pseudomonas* sp. *LB-090624*, *Pseudomonas plecoglossicida* y *Pseudomonas* sp. *Leaf58*, destacando estas dos últimas como las más cercanas evolutivamente (Fig 4). Además, encontramos dos especies de *Pseudomonas*, *P. mosselii* y *Pseudomonas* sp. *RIT623* con un 95% de Bootstrap, siendo las especies más cercanas evolutivamente de todo el árbol (Fig 4).

El árbol basado en el gen *16S rRNA* (Fig A 4, Fig 6) para llevar a cabo la comparación con el árbol basado en *GalU* no parece ser muy fiable debido a los bajos valores de la prueba Bootstrap. Las relaciones establecidas no

coinciden con las relaciones mostradas en el árbol basado en *GalU*. Siendo estos dos árboles muy distintos, se sugiere que el gen *GalU* está muy poco conservado dentro del género *Pseudomonas* y dentro de las rizobacterias en general.

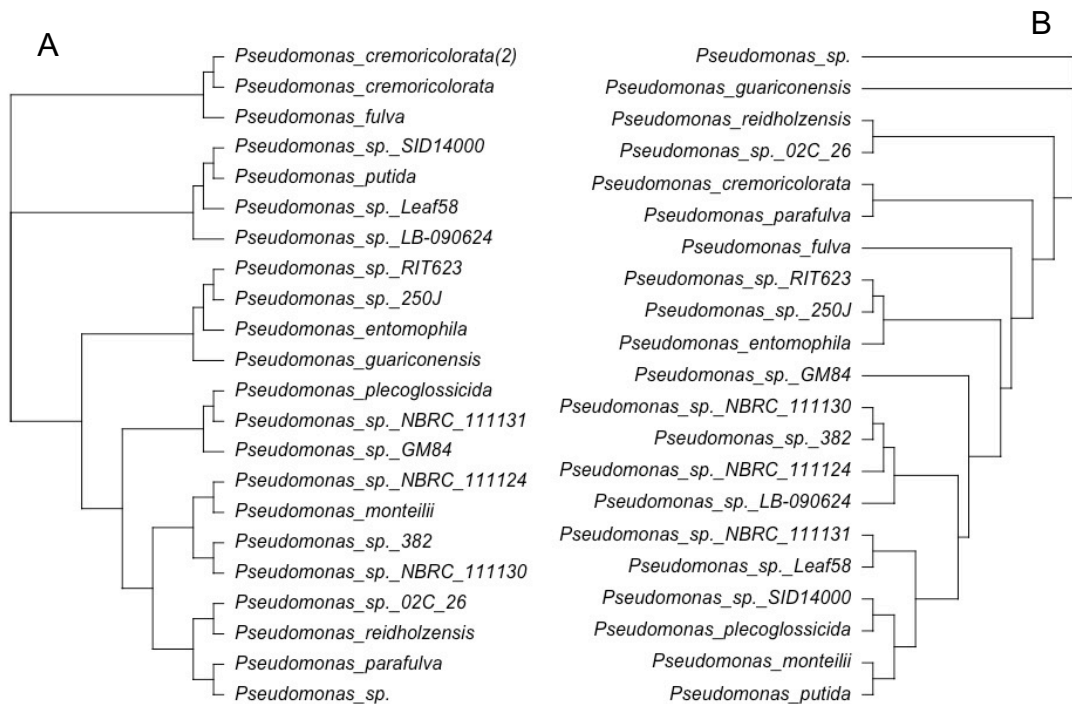


Fig 5. Comparativa entre el árbol filogenético Neighbor-Joining basado en el gen *FliA* (A) (Fig 2) y el árbol filogenético basado en el gen *16S rRNA* (B) (Fig A 2).

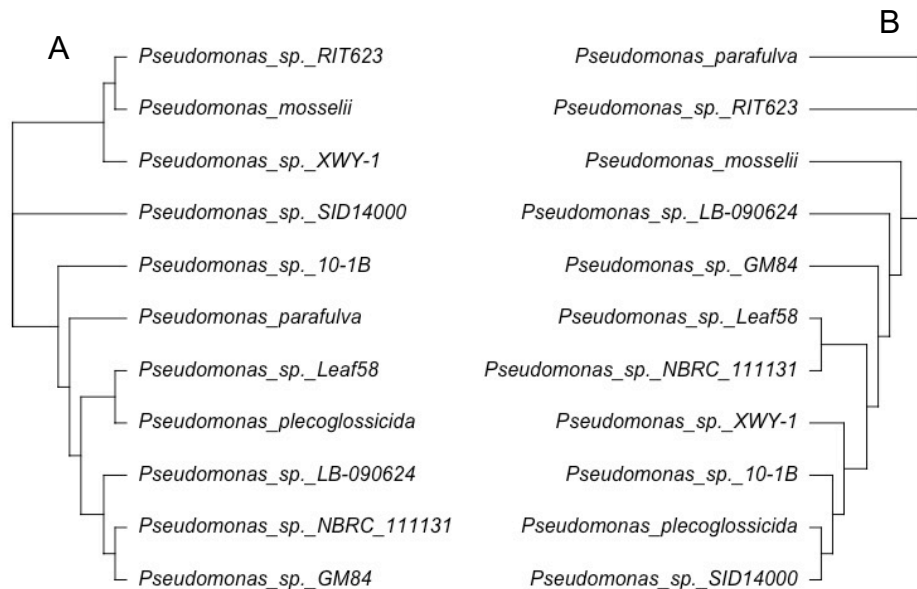


Fig 6. Comparativa entre el árbol filogenético Neighbor-Joining bsado en el gen *GalU* (A) (Fig 4) y el árbol filogenético basado en el gen *16S rRNA* (B) (Fig A 4).

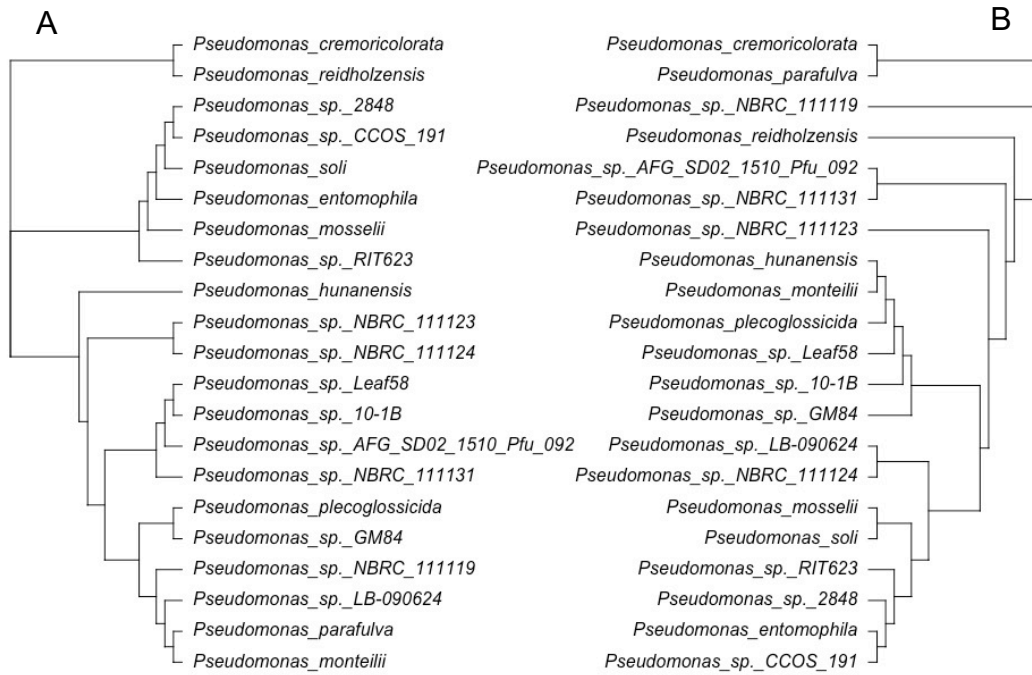


Fig 7. Comparativa entre el árbol filogenético Neighbor-Joining basado en el gen *ReIA* (A) (Fig 3) y el árbol filogenético basado en el gen 16S *rRNA* (B) (Fig A 3).

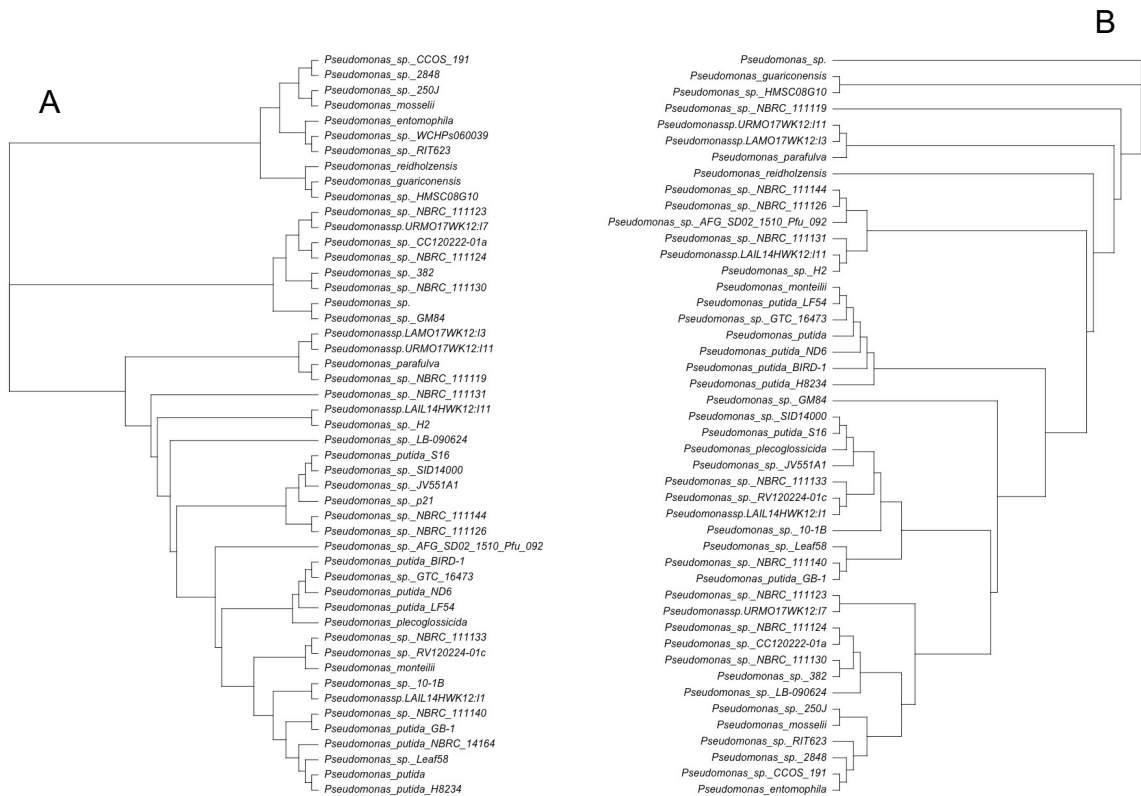


Fig 8. Comparativa entre el árbol filogenético Neighbor-Joining basado en el gen *RpoN* (A) (Fig 1) y el árbol filogenético basado en el gen 16S *rRNA* (B) (Fig A 1).

3. Discusión y conclusiones

La colonización de la rizosfera como la posterior supervivencia en ésta son dos procesos básicos y muy importantes para las rizobacterias. En este estudio se han seleccionado 4 genes específicos que, aparentemente, confieren una ventaja para aquellos microorganismos que los posean. El gen *RpoN* ha resultado ser el más conservado de los 3 dentro del género *Pseudomonas*, tanto a nivel estructural como funcional, como ya destacaron anteriormente distintos estudios (Duque et al., 2013; Köhler et al., 1989). Las relaciones evolutivas mostradas basadas en el gen *RelA* sugieren cierto grado de conservación, probablemente debido a su función clave en la adaptación al estrés (Reva et al., 2006; Tiyakhon et al., 2015), una característica muy beneficiosa y necesaria para la colonización de la rizosfera. El gen *FliA* no parece estar muy conservado dentro del género *Pseudomonas*. Este gen está implicado en la expresión de genes flagelares, y estos genes también están bajo la regulación de otros factores regulatorios como *RpoN* (Starnbach & Lory, 1992), un gen que sí está muy conservado. Es posible que su función no sea tan necesaria en la colonización de la rizosfera, puesto que se ha demostrado que *fliA* mutantes, aunque deficientes en adhesión, la proliferación en el sistema radicular no se veía alterada (Rodríguez-Herva et al., 2010). Con relación al gen *GalU*, se considera que con los datos obtenidos en este estudio no se pueden sacar conclusiones.

3.1 Análisis crítico

Este estudio ha logrado llevar a cabo los objetivos planteados inicialmente, así como todas las tareas asignadas a dichos objetivos. Aunque se ha intentado seguir la planificación establecida al inicio del estudio, se han ido generando dudas y problemas que han requerido un tiempo determinado para ser resueltas, tanto en cuestiones académicas como en cuestiones de desarrollo de la parte más práctica del estudio. No se han introducido cambios en el trabajo, aunque con los resultados obtenidos finalmente, es posible que se pudieran mejorar muchos aspectos para obtener resultados más interesantes y fiables. Uno de estos aspectos es una selección distinta de genes, además de aumentar la selección de secuencias homólogas para cada gen de interés para poder establecer más relaciones evolutivas, incluso fuera del género *Pseudomonas*.

Sería interesante poder explorar cómo se relacionan distintas especies consideradas PGPRs, para poder determinar qué genes han sido altamente seleccionados y conservados dentro de ese grupo.

4. Glosario

Alineamientos

Cepas

Colonización

Estrés abiótico

Exudados

Flagellin

Mucina

Mutantes

PBFC

PGPR

ppGpp

Rizosfera

Rutas anabólicas

Recuencias homólogas

Test Bootstrap

5. Bibliografía

- Ahmad, I., Ahmad, F., & Pichtel, J. (2011). Microbes and microbial technology: Agricultural and environmental applications. *Microbes and Microbial Technology: Agricultural and Environmental Applications*, 1–516. <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7931-5>
- Backer, R., Rokem, J. S., Ilangumaran, G., Lamont, J., Praslickova, D., Ricci, E., ... Smith, D. L. (2018). Plant Growth-Promoting Rhizobacteria: Context, Mechanisms of Action, and Roadmap to Commercialization of Biostimulants for Sustainable Agriculture. *Frontiers in Plant Science*, 9(October), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01473>
- Bruto, M., Prigent-Combaret, C., Muller, D., & Moënne-Loccoz, Y. (2014). Analysis of genes contributing to plant-beneficial functions in plant growth-promoting rhizobacteria and related Proteobacteria. *Scientific Reports*, 4, 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep06261>
- Dasgupta, N., Wolfgang, M. C., Goodman, A. L., Arora, S. K., Jyot, J., Lory, S., & Ramphal, R. (2003). A four-tiered transcriptional regulatory circuit controls flagellar biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology*, 50(3), 809–824. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03740.x>
- Dayhoff, M., Schwartz, R., & Orcutt, B. (1978). A model of evolutionary change in proteins. In *In Atlas of protein sequence and structure*.
- Dekkers, L. (1999). Bacterial traits and genes involved in rhizosphere colonization. *Atlanta Canada Society* Retrieved from <http://socrates.acadiau.ca/isme/Symposium26/dekkers.pdf>
- Duque, E., de la Torre, J., Bernal, P., Molina-Henares, M. A., Alaminos, M., Espinosa-Urgel, M., ... Ramos, J. L. (2013). Identification of reciprocal adhesion genes in pathogenic and non-pathogenic *Pseudomonas*. *Environmental Microbiology*, 15(1), 36–48. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2012.02732.x>
- Felsenstein, J. (1985). CONFIDENCE LIMITS ON PHYLOGENIES: AN APPROACH USING THE BOOTSTRAP. *Evolution; International Journal of Organic Evolution*. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x>
- Köhler, T., Harayama, S., Ramos, J. L., & Timmis, K. N. (1989). Involvement of *Pseudomonas putida* RpoN sigma factor in regulation of various metabolic functions. *Journal of Bacteriology*. <https://doi.org/10.1128/jb.171.8.4326-4333.1989>
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), 1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- Lugtenberg, B. J. J., Dekkers, L., & Bloemberg, G. V. (2002). Molecular Determinants of Rhizosphere Colonization by *Pseudomonas*. *Annual Review of Phytopathology*, 39(1), 461–490. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.39.1.461>
- Lugtenberg, B., & Kamilova, F. (2009). Plant-growth-promoting Rhizobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Martin, M., & Rivilla, R. (2011). *Colonización de la rizosfera por Pseudomonas*. (May).
- Matilla, M. A., Espinosa-Urgel, M., Rodríguez-Herva, J. J., Ramos, J. L., & Ramos-González, M. I. (2007). Genomic analysis reveals the major driving forces of bacterial life in the rhizosphere. *Genome Biology*, 8(9), R179.

- <https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-9-r179>
- Pizarro-Tobías, P., Udaondo, Z., Roca, A., & Ramos, J. L. (2015). Events in Root Colonization by *Pseudomonas putida*. In *Pseudomonas: Volume 7: New Aspects of Pseudomonas Biology*. https://doi.org/10.1007/978-94-017-9555-5_10
- Reva, O. N., Weinel, C., Weinel, M., Böhm, K., Stjepandic, D., Hoheisel, J. D., & Tümmler, B. (2006). Functional genomics of stress response in *Pseudomonas putida* KT2440. *Journal of Bacteriology*, 188(11), 4079–4092. <https://doi.org/10.1128/JB.00101-06>
- Rodríguez-Herva, J. J., Duque, E., Molina-Henares, M. A., Navarro-Avilés, G., van Dillewijn, P., de la Torre, J., ... Ramos, J. L. (2010). Physiological and transcriptomic characterization of a *fliA* mutant of *Pseudomonas putida* KT2440. *Environmental Microbiology Reports*, 2(3), 373–380. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2009.00084.x>
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>
- Spaepen, S., Vanderleyden, J., & Okon, Y. (2009). Plant Growth-Promoting Actions of Rhizobacteria. In *Advances in Botanical Research*.
- Starnbach, M. N., & Lory, S. (1992). The *filA* (*rpoF*) gene of *Pseudomonas aeruginosa* encodes an alternative sigma factor required for flagellin synthesis. *Molecular Microbiology*, 6(4), 459–469. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1992.tb01490.x>
- Tiyakhon, C., Li, Z., Korban, S. S., & Zhao, Y. (2015). *The bacterial alarmone (p)ppGpp is required for virulence and controls cell size and survival of Pseudomonas syringae on plants*. 118(24), 6072–6078. <https://doi.org/10.1002/cncr.27633>. Percutaneous
- Vacheron, J., Desbrosses, G., Bouffaud, M.-L., Touraine, B., Moënné-Loccoz, Y., Muller, D., ... Prigent-Combaret, C. (2013). Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Frontiers in Plant Science*, 4(September), 356. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00356>
- Yousef-Coronado, F., Travieso, M. L., & Espinosa-Urgel, M. (2008). Different, overlapping mechanisms for colonization of abiotic and plant surfaces by *Pseudomonas putida*. *FEMS Microbiology Letters*, 288(1), 118–124. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01339.x>

6. Anexos

6.1 Anexo 1. Supplementary data

Distancias evolutivas

Árbol filogenético para 16S rRNA

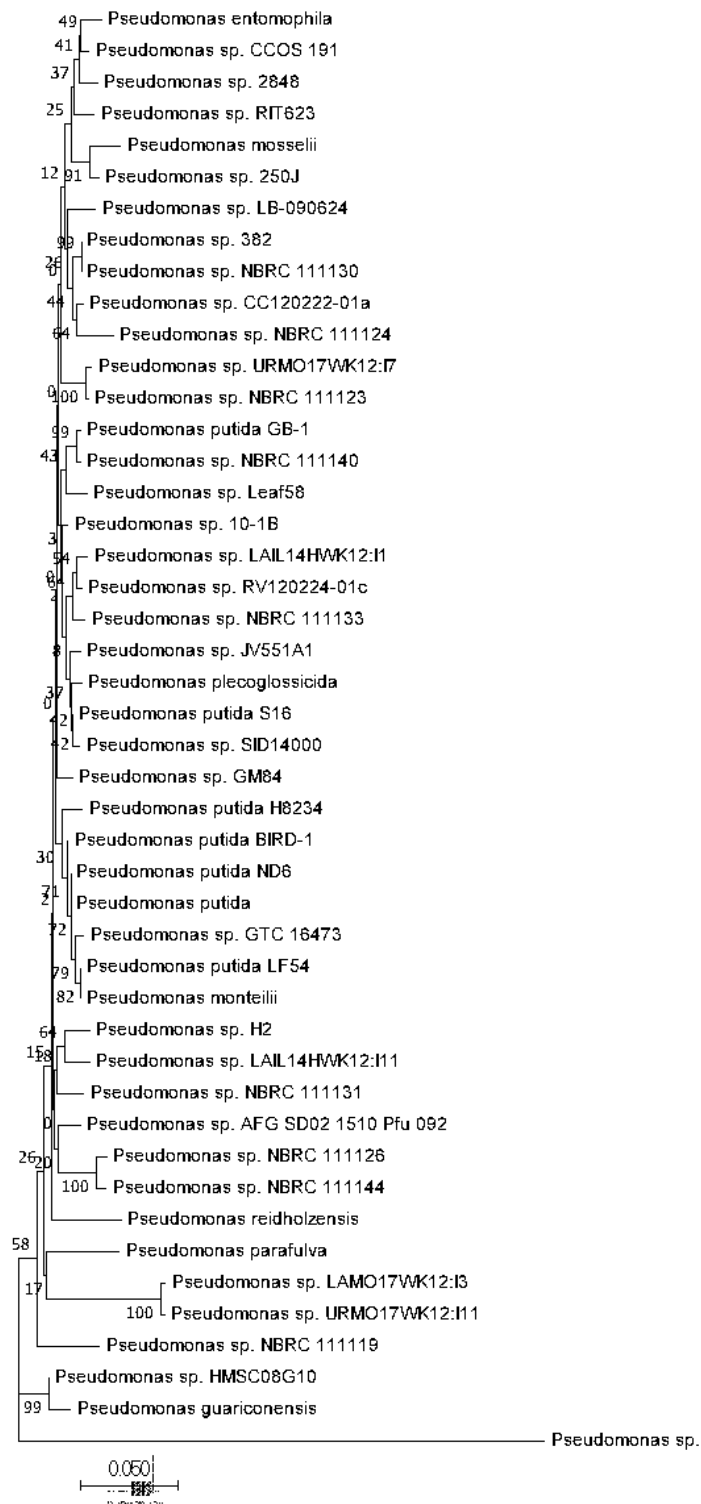


Fig A 1. Relaciones evolutivas entre taxones presentes en el árbol filogenético del gen *RpoN*, basados en el gen *16S rRNA*, inferidas mediante el método Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987). Se muestra el árbol óptimo con una suma de longitud de la rama = 0.843. El porcentaje de réplicas en las cuales los taxones han sido asociados mediante el método Bootstrap (100 réplicas) se muestran al lado de las ramas (Felsenstein, 1985). El árbol se dibuja a escala, presentando las longitudes de rama las mismas unidades que las distancias evolutivas utilizadas para inferir el árbol filogenético. El análisis se llevó a cabo con 46 secuencias de aminoácidos. Todas las posiciones que contienen 'gaps' y 'missing data' fueron eliminadas. El dataset final contiene 434 posiciones. El análisis evolutivo se llevó a cabo en MEGA7 (Kumar et al., 2016).

Árbol filogenético para *16S rRNA*.

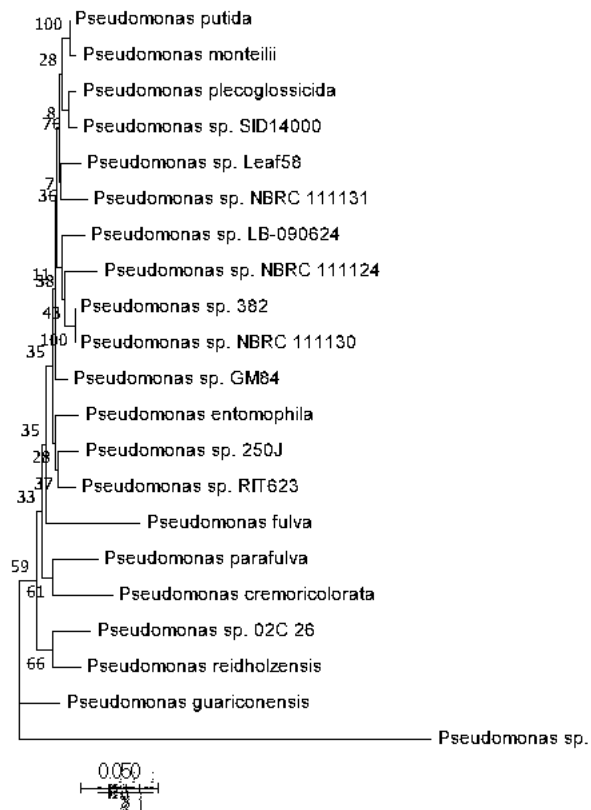


Fig A 2. Relaciones evolutivas entre taxones presentes en el árbol filogenético del gen *FliA*, basados en el gen *16S rRNA*, inferidas mediante el método Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987). Se muestra el árbol óptimo con una suma de longitud de la rama = 0.674. El porcentaje de réplicas en las cuales los taxones han sido asociados mediante el método Bootstrap (100 réplicas) se muestran al lado de las ramas (Felsenstein, 1985). El árbol se dibuja a escala, presentando las longitudes de rama las mismas unidades que las distancias evolutivas utilizadas para inferir el árbol filogenético. El análisis se llevó a cabo con 21 secuencias de aminoácidos. Todas las posiciones que contienen 'gaps' y 'missing data' fueron eliminadas. El dataset final contiene 434 posiciones. El análisis evolutivo se llevó a cabo en MEGA7 (Kumar et al., 2016).

Árbol filogenético para 16S rRNA

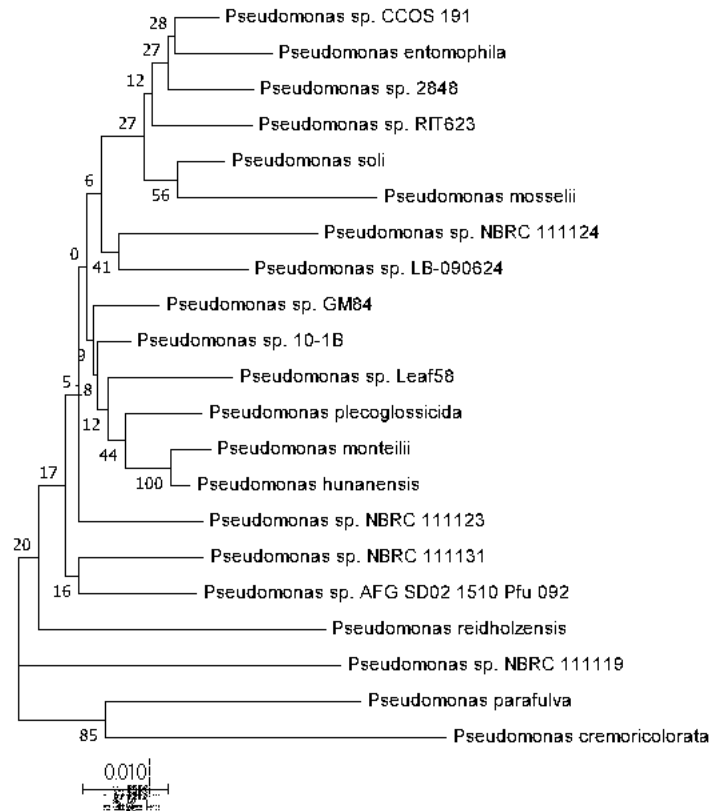


Fig A 3. Relaciones evolutivas entre taxones presentes en el árbol filogenético del gen *RelA*, basados en el gen *16S rRNA*, inferidas mediante el método Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987). Se muestra el árbol óptimo con una suma de longitud de la rama = 0.381. El porcentaje de réplicas en las cuales los taxones han sido asociados mediante el método Bootstrap (100 réplicas) se muestran al lado de las ramas (Felsenstein, 1985). El árbol se dibuja a escala, presentando las longitudes de rama las mismas unidades que las distancias evolutivas utilizadas para inferir el árbol filogenético. El análisis se llevó a cabo con 21 secuencias de aminoácidos. Todas las posiciones que contienen 'gaps' y 'missing data' fueron eliminadas. El dataset final contiene 435 posiciones. El análisis evolutivo se llevó a cabo en MEGA7 (Kumar et al., 2016).

Árbol filogenético para 16S rRNA

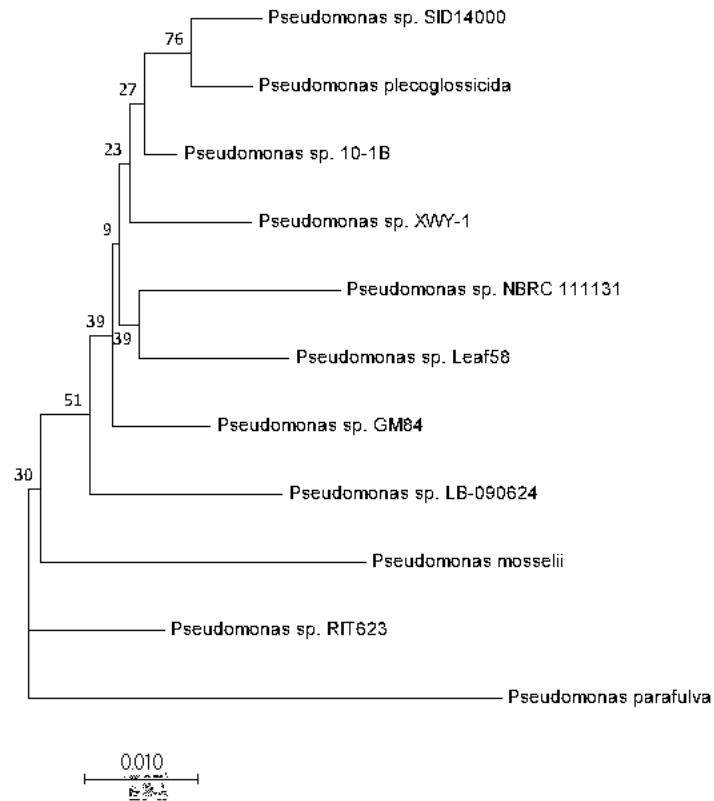


Fig A 4. Relaciones evolutivas entre taxones presentes en el árbol filogenético del gen *GalU*, basados en el gen *16S rRNA*, inferidas mediante el método Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987). Se muestra el árbol óptimo con una suma de longitud de la rama = 0.182. El porcentaje de réplicas en las cuales los taxones han sido asociados mediante el método Bootstrap (100 réplicas) se muestran al lado de las ramas (Felsenstein, 1985). El árbol se dibuja a escala, presentando las longitudes de rama las mismas unidades que las distancias evolutivas utilizadas para inferir el árbol filogenético. El análisis se llevó a cabo con 11 secuencias de aminoácidos. Todas las posiciones que contienen 'gaps' y 'missing data' fueron eliminadas. El dataset final contiene 436 posiciones. El análisis evolutivo se llevó a cabo en MEGA7 (Kumar et al., 2016).

6.2 Anexo 2. Secuencias proteicas

Secuencia de la proteína codificada por el gen *RpoN*

[WP_041166385.1](#)

MKPSLVLMKMGQQLTMTPOQLQQAIRLLQLSTLDLQOEIQEALSNPMLERQEDGDDFDNSDPMAD
NAENKPAAEAQDNSFQESTVSADSLEDGEWSEIPNELPVDTAWEDIYQTSASSLPSNDDDEWD
FTTRTSAGESLQSHLLWQLNLAPMSDTRDLIAVTLIDSINGQYLEDTLEEICAGFDPELDIEL
DEVEAVLHRIQQFEPAGVVGARNLGECLLLQLRQLPASTPWMTEAKRLVTDFFIDLLGSRDYSQLM
RRMKIKEDELQVIELVQSLNPRPGSQIESSEPEYVVPDVIVRKDSERWLVELNQEAIPLRVN
PQYAGFVRRADTSADNTFMRNQLQEARWFIKSLQSRNETLMKVATQIVEHQRGFLDHGDEAMKP
LVLHDIAEAVGMHESI SRVTTQKYMHTPRGIYELKYFFSSHVSTSEGGECSSTAIRAIKKLV
AAENQKKPLSDSKIAGLLEAQGIQVARRTVAKYRESLGIAPSSERKRLM

Secuencia de la proteína codificada por el gen *FliA*

[ABQ77683.1](#)

MNASGFKMYSRAAKDAQYELIERYAPLVKRIAYHLLARLPANVQVEDLIQAGMIGLLEVANKYD
ASKGASFETYAGIRIRGAMLDEVKGDWAPRSVHRNTRMVS DAMRAVEARTGRDAKDHEVAEEL
QLSLDDYYGILNDTLGSRLEFSFDDLLQDGEHEGLHEDGASGQVEPARGLEERFQAALTEAIAN
LPERERLVLALYYDEELNLKEIGEVLGVSESRVSQLHSQCAARLRSRLGEWRAR

Secuencia de la proteína codificada por el gen *RelA*

[ADR62642.1](#)

MPGIEALAERLSTYLGPEQVNLVRRAYFYAEQAHGQRRRSGEPEYVTHPLAVASILADMHMDHQ
SLMAAMLHDVIEDTGIAKEALSQQFGETVAELVDGVSKLTQMNFKAEQAENFQKMAMAMAR
DIRVILVKLADRLHNMRTLEVLSGEKRRRIAKETLEIYAPIANRLGMHTVRVEFEDLGFKAMHP
MRSLSLIHRAVKSARGNRKEIVAKIEHSLANCLAADGIEGEVSGRQKHLGYIYKKMRGKRRAFNE
IMDVYAFRIIVDKVDTCYRVLGAVHNLYKPLPGRFKDYIAIPKANGYQSLHTTLFGMHGVPIEI
QIRTREMEEMANGIAAHWLYKSNDDQPKGSHARARQWVKGILELQQRAGNSLEFIESVKIDL
FPDEVYVFTPKGRIMELPKGSTAVDFAYAVHTDVGNSCIACRINRRLAPLSEPLQSGSTVEIVS
APGARNPAWLNFFVSGKARTNIRHALKQQRSEISLGERLLNKVLTGFDSLEKIPQDRIQS
ILAEYRLELIEDLLEDIGLGNRMAYVVARLLSAEGEQLPAPEGPLAIRGTEGLVISYAKCCTP
IPGDPVIGHLSAGKGMVVHLENCRNISEIRHNPEKCVQLSWAKDITGEFNVELRVELEHQGLI
ALLASSVNAADGNIEKISMDERDGRISVVQLVSVHDRVHLARVIKKLRTLTVVRI TRMRT

Secuencia de la proteína codificada por el gen *GalU*

[WP_010954649.1](#)

MIKKCLFPAAGYGTFRFLPATKAMPKEMLPVVKPLIQYGVVEALDAGLNEISIVTGRGKRALED
HFDISYELENQIKGTDKEKYLVGIRLLNECSFSYTRQTEMKGLGHAILTGRPLIGDEPFAVVL
ADDLCVNPEGDGVLTQMVKLYKQYRCSIVAIQEVDPQETNKYGVVIAGEMIRDDIFRVNTMVEKP
APEDAPSNLAIIGRYILTPDIFDI IANTKPGKGGEIQITDALLQQAQKDGCVIAYKFKGKRFDCG
GAEGYIDATNFCFENYYKTGKY