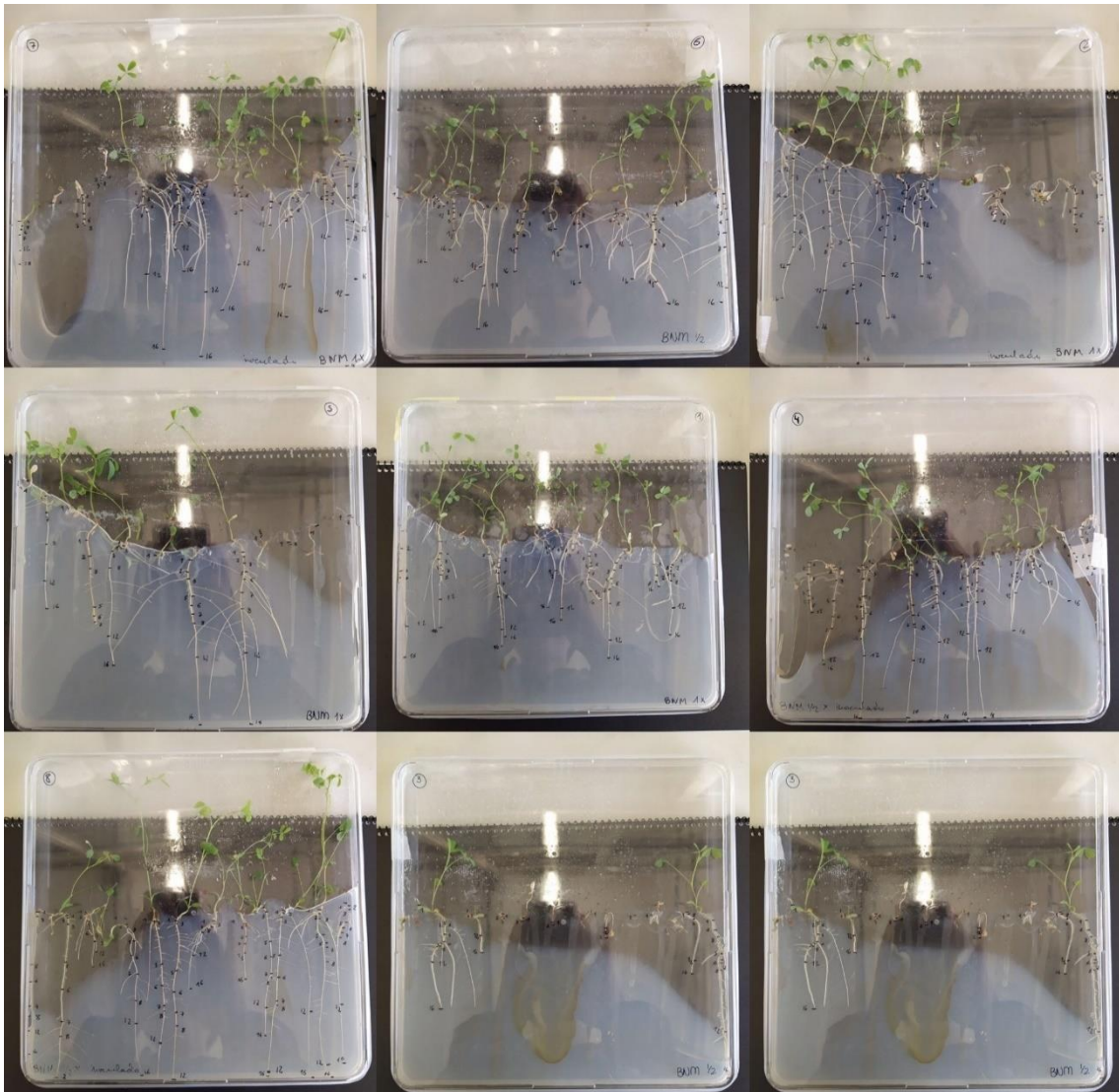


Inoculantes bacterianos para una agricultura sostenible: análisis bioinformático del genoma y aplicación en experimentos piloto.



TFG EXPERIMENTAL

Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla
Sandra Arjona Pino

Sandra Arjona Pino

Universidad de Sevilla

Facultad de Farmacia



Trabajo Fin de Grado, carácter experimental

Grado en Farmacia

“Inoculantes bacterianos para una agricultura sostenible: análisis bioinformático del genoma y aplicación en experimentos piloto”

Departamento de Microbiología y Parasitología

Profesorado tutor:

Eloísa Pajuelo Domínguez (Departamento de Microbiología y Parasitología,
Facultad de Farmacia)

Resumen

Los objetivos de este TFG han sido: 1) utilizar la bacteria *Pantoea agglomerans* RSO7 (una bacteria PGPR previamente aislada de marismas contaminadas por metales pesados) para inocular plantas de interés agronómico, y 2) aislar su ADN, secuenciar su genoma y hacer un análisis del mismo.

P. agglomerans RSO7 mejoró el crecimiento de alfalfa in vitro. Los efectos beneficiosos se observaron principalmente en situación de limitación de nutrientes y afectaron sobre todo a la raíz (mayor masa, longitud y ramificación), aunque también incrementó la longitud del tallo, si bien las diferencias no fueron significativas. Además, mejoró la supervivencia de las plantas y disminuyó la contaminación por hongos.

El análisis global del genoma revela que esta bacteria es capaz de adaptarse a una gran cantidad de situaciones ambientales y tolerar muchos tipos de estrés (calor, frío, radiación UV, estrés oxidativo, etc.). Además de una amplia versatilidad metabólica, se han detectado genes de resistencia a metales pesados (As, Cu, Ni, Co, Zn, Te), a sal (producción de osmoprotectores como glicina betaína, prolina, trehalosa, etc.) y a diversos compuestos tóxicos xenobióticos. Respecto a las propiedades PGPR, se han detectado genes de solubilización de fosfatos (fosfatasas extracelulares, acil-fosfatasas, mio-inositol fosfatasas) y de producción y/o captación de variedad de sideróforos (ferritinas, enterobactina, acromobactina, hemina, etc.). Además, se han identificado genes que participan en importantes procesos rizosféricos (movilidad, quimiotaxis, diálogo planta-bacteria, *quorum sensing* y competencia en la rizosfera).

Finalmente, y dado que la bacteria pertenece al grupo de bioseguridad 2, se han buscado posibles genes implicados en patogenicidad, encontrándose genes de resistencia a múltiples antibióticos y varios sistemas toxina/antitoxina.

Los resultados sugieren el gran potencial de esta bacteria en agricultura. Sin embargo, las restricciones al uso de microorganismos de grupo 2 como bioinoculantes podrían limitar su utilización, por lo que también se han revisado posibles alternativas bioseguras.

Palabras clave: Bioinoculantes, *Pantoea agglomerans* RSO7, PGPR, genoma

ÍNDICE

1. Introducción	3
2. Objetivos	6
3. Metodología	6
3.1. Desinfección superficial de las semillas	6
3.2. Preparación de la placa y cultivo de alfalfa	6
3.3. Determinación del crecimiento de la raíz principal.....	7
3.4. Determinación del índice de ramificación de la raíz.....	7
3.5. Determinación del índice de supervivencia	8
3.6. Determinación del crecimiento del tallo y número de trifolios	8
3.7. Análisis estadístico	8
3.8. Extracción del ADN genómico de <i>Pantoea agglomerans</i> RSO7	8
3.9. Secuenciación del genoma.....	9
4. Resultados y discusión	9
4.1. Efecto de la inoculación sobre la supervivencia de la planta	9
4.2. Efecto de la inoculación sobre el crecimiento de la raíz principal.....	11
4.3. Efecto de la inoculación sobre el índice de ramificación	12
4.4. Efecto de la inoculación sobre parámetros del tallo	14
4.5. Secuenciación del genoma	16
4.6. Estudio detallado del genoma	17
4.6.1. Genes relacionados con la resistencia a metales pesados	18
4.6.2. Genes relacionados con la resistencia a la sal (alta osmolaridad)	20
4.6.3. Genes relacionados con las propiedades PGPR	23
4.6.3.1. Genes relacionados con el transporte y metabolismo de hierro	23
4.6.3.2. Genes relacionados con el fosfato y con la solubilización de fosfato	27
4.6.4. Genes relacionados con procesos rizosféricos importantes para la colonización y la interacción planta microorganismo	29
4.7. Bioseguridad	32
5. Conclusiones	32
6. Bibliografía	33

1. Introducción

El interés por el medio ambiente está cada vez más presente en la vida de las personas, de modo que los riesgos climáticos se encuentran a la cabeza de las preocupaciones del planeta actualmente en términos de probabilidad de ocurrencia, reconociéndosele su enorme impacto potencial (World Economic Forum, 2020). Por ello, y puesto que viene siendo una preocupación recurrente en los últimos años que se agrava cada vez más, se han tomado numerosas medidas para intentar frenar su deterioro. Entre estos intentos de mejora, se encuentra la búsqueda de métodos de fertilización menos contaminantes que los productos de síntesis química que se utilizan habitualmente. Es aquí donde destacamos la existencia de los bioestimulantes de plantas, los cuales quedaron definidos por du Jardin (2015) de la siguiente forma: “un bioestimulante de plantas es cualquier sustancia o microorganismo aplicado a las plantas con el objetivo de mejorar la eficiencia nutricional, la tolerancia al estrés abiótico y/o los rasgos de calidad del cultivo, independientemente de su contenido de nutrientes”. Dichos bioestimulantes quedan recogidos en el nuevo reglamento de la Unión Europea sobre fertilizantes (2019/1009) como una alternativa a considerar y promover frente a los métodos agroquímicos, que son los mayoritariamente usados en la actualidad, lo cual justificaría el interés en la búsqueda de nuevos microorganismos que puedan presentar dichas características.

A las bacterias que se encuentran en el suelo, que son capaces de asociarse con las plantas de forma natural y proporcionarles a estas un beneficio, se les clasifica como PGPR (siglas de Plant Growth-Promoting Rhizobacteria), que pueden colonizar la rizosfera (suelo donde se encuentran las raíces), el rizoplaneo (superficie de la raíz) o la raíz en sí (tejidos radiculares) (Gray and Smith, 2005). Algunos de los géneros bacterianos más frecuentemente utilizados como PGPR son *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Enterobacter*, etc. (Ferreira et al., 2019).

Existen diversos mecanismos por los cuales las PGPRs pueden promover el crecimiento vegetal, se clasifican en mecanismos directos e indirectos. Los mecanismos directos son aquellos que proporcionan nutrientes o regulan el crecimiento. Los mecanismos indirectos son aquellos que protegen a las plantas de adquirir infecciones (estrés biótico) o ayudan a la planta a crecer sana durante un periodo de estrés ambiental (estrés abiótico) (Goswami et al., 2016).

Tabla 1. Clasificación de algunos de los mecanismos de acción de las bacterias PGPR (Dweipayan Goswami et al., 2016).

Directos	Indirectos
Fijación biológica del nitrógeno	Producción de sideróforos
Solubilización de fosfatos	Producción de quinazinas y glucoquinazinas
Producción de auxinas	Inducción de resistencia sistémica
Producción de citoquininas	Producción de ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico desaminasa (ACC desaminasa)
Producción de giberelinas	Resistencia ante el estrés abiótico

Mecanismos directos

El N es un factor limitante del crecimiento vegetal, ya que no pueden usarlo en su forma inerte y mayoritaria (nitrógeno atmosférico N₂). La asociación de la planta y ciertos microorganismos permiten el aprovechamiento de esta forma del nitrógeno (Iqbal, 2016).

El P es el segundo de los factores limitantes para el crecimiento vegetal, por detrás del N. Algunos microorganismos con propiedades PGPR son capaces de solubilizar y mineralizar el fósforo insoluble del suelo para fomentar el crecimiento de la planta. Para ello, o bien secretan ácidos o liberan el fósforo de compuestos orgánicos mediante enzimas como fosfatasas y fitasas (Alori et al., 2017).

Las auxinas son unas fitohormonas que regulan la mayoría de los procesos llevados a cabo por la planta, siendo consideradas como las responsables de la mayoría de los fenómenos de desarrollo en esta. Algunas bacterias PGPR son capaces de sintetizar auxinas, que favorecen el desarrollo de la raíz, la ramificación de raíces secundarias y la formación de más pelos radiculares por los que se absorben los nutrientes (Ahmed y Hasnain, 2014). Las citoquininas son otros reguladores del crecimiento de plantas, que pueden ser también producidas por algunas bacterias PGPR ayudando a su desarrollo (Liu et al., 2013). Finalmente, también son capaces, en ocasiones, de sintetizar giberelinas que son fitohormonas importantes para el desarrollo de la planta (Kang et al., 2013).

Mecanismos indirectos

El Fe, esencial para la planta, puede ser asimilado en forma de sideróforos producidos por las bacterias a las que se asocian. Además de proporcionar Fe a las bacterias y liberarlo para las plantas, el secuestro de Fe es un mecanismo de biocontrol que impide el desarrollo de otros microorganismos fitopatógenos (Aznar y Dellagi, 2015).

La producción de quinazinas y gluconasas por algunas bacterias PGPR permite controlar los patógenos del suelo mediante la degradación de su pared celular (Chet et al., 1990; Kobayashi et al., 2002; Goswami et al., 2016).

Las bacterias PGPR protegen a la planta de enfermedades a través de la resistencia sistemática inducida (ISR) (Goswami et al., 2016).

Hay algunas bacterias PGPR que son capaces de producir ACC desaminasa, enzima que convierte ACC (un precursor inmediato de la biosíntesis de etileno en la ruta de la metionina en plantas superiores) en amoníaco y α -cetobutirato en lugar de etileno. La regularización del nivel de etileno en las plantas reduce los efectos generados por el estrés abiótico o biótico (Mayak et al., 2004; Barnawal et al., 2012; Singh y Jha, 2017).

En el caso que nos ocupa, hemos seleccionado una bacteria denominada *Pantoea agglomerans* RSO7, una bacteria Gram negativa perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*. Este microorganismo ya había demostrado previamente tener muy buenas propiedades PGPR en la planta a la que hospeda de forma natural (Paredes-Páliz et al., 2016) (tabla 2):

Tabla 2. Propiedades estudiadas de *Pantoea agglomerans* RSO7 y posible interés para la planta (Paredes-Páliz et al., 2016).

Propiedades PGPR	<i>Pantoea agglomerans</i> RSO7
Fijación de nitrógeno	+
Solubilización de fosfatos	+
Producción de sideróforos	+ (halo de 15 ± 2 mm)
Producción de auxinas	+ ($14,07 \pm 1,67$ mg/L)
ACC desaminasa	-
Resistencia a Cu	8mM
Resistencia a Zn	6mM
Resistencia a Pb	>10mM
Biocontrol	+ (este trabajo)

La planta a la que hospeda en la naturaleza se llama *Spartina maritima*, una especie presente en las marismas del suroeste de España (Castillo et al., 2010) que, aunque tiene un gran interés medioambiental, no es una planta de cultivo. Para este estudio se ha seleccionado la alfalfa, planta perteneciente a la familia *Fabaceae*, por tres razones: 1) tras los cereales, las leguminosas son los cultivos de mayor importancia, fuente de proteínas de alta calidad, fibra, grasas insaturadas, minerales y vitaminas (Maphosa y Jideani, 2017); 2) se adaptan a suelos estresados (salinos o ácidos); y 3) se asocian a bacterias conocidas como rizobios y forman nódulos simbióticos en los que se produce la fijación biológica de N_2 , con lo que no necesitan fertilizante nitrogenado y son cultivos ecológicos (Ngatia et al., 2019).

Centrándonos no solo en la familia, sino en la especie concreta, la alfalfa, *Medicago sativa*, es una planta tetraploide perteneciente al género *Medicago*, de amplio uso en alimentación animal y, en menor medida, humana. Por otra parte, existe otra planta del mismo género, *Medicago truncatula*, que es un modelo de leguminosa diploide con la particularidad de tener su genoma completamente secuenciado (Benedito et al., 2008). Esto quiere decir que, en el caso de querer investigar en un futuro los mecanismos moleculares de la interacción entre la alfalfa y nuestra bacteria *P. agglomerans* RSO7, se dispondrá de información genética de una especie con gran homología.

2. Objetivos

Con estos antecedentes, nuestros objetivos son:

- Comprobar que efectivamente promueve el crecimiento de la planta escogida, en este caso, la alfalfa, mediante un test de placas.
- Secuenciar el ADN completo de *Pantoea agglomerans* RSO7 y realizar un estudio bioinformático del mismo.
- Localizar los genes implicados en las propiedades PGPR y de la resistencia a metales pesados y salinidad de la bacteria.

3. Metodología

3.1. Desinfección superficial de las semillas

Las semillas se desinfectaron superficialmente sumergiéndolas durante 5 minutos en alcohol al 90%, tras lo cual se lavaron abundantemente con agua destilada estéril. Posteriormente, se trataron con una disolución de hipoclorito sódico (lejía comercial diluida 1:5) durante 5 minutos. Finalmente, se lavaron de nuevo abundantemente con agua destilada estéril para eliminar restos de lejía que pudieran inhibir la germinación.

3.2. Preparación de la placa y cultivo de alfalfa

Para llevar a cabo la prueba fueron utilizadas 8 placas cuadradas estériles de 20cm x 20cm. Como medio de cultivo para las plantas se utilizó el medio BNM (Buffered Nodulation Medium) que es específico para leguminosas. Este medio carece de fuente de nitrógeno ya que se utiliza para estudios de nodulación leguminosa-rizobio (Ehrhardt et al., 1992). Puesto que, en este caso, las plantas de alfalfa no están inoculadas con rizobio, el medio se suplementó con nitrato amónico 2.5 mM. El medio se ha utilizado a concentración normal (a la que se le denominará BNM x1) y a una concentración con la mitad de los nutrientes (a la que se le denominará BNM x1/2).

Se prepararon cuatro placas con medio BNM x1 y otras cuatro con medio BNM x1/2. Una vez que el medio solidificó en las placas, se procedió a la colocación de las semillas. Se colocaron en el borde superior del medio, mediante el uso de unas pinzas esterilizadas. En cada placa se colocó una media de 11-14 semillas, a una distancia equidistante entre ellas.

Tras esto, se inocularon las placas dentro de una campana de flujo laminar para mantener la esterilidad. A las placas que denominaremos “inoculadas” se les puso 100 μ L del cultivo de *P. agglomerans* RSO7 con medio TSB sobre cada una de las semillas, mientras que a las que denominamos “sin inocular” solo se les añadió medio TSB.

Las placas se sellaron por el borde con parafilm y la parte inferior de las mismas se cubrió con cartulina negra para evitar que la luz incidiera sobre las raíces, mientras que la parte superior se dejó al descubierto. Las placas se incubaron durante 16 días en una cámara de cultivo de plantas con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, con un régimen de temperatura día:noche de 22:18°C.

El día 8 se volvió a inocular las placas con el cultivo en medio TSB a aquellas que contenían la bacteria inicialmente (5 μ L a cada semilla) y solo con TSB a las que no estaban inoculadas en un principio.

3.3. Determinación del crecimiento de la raíz principal

Para saber cómo afecta la presencia o no de la bacteria *P. agglomerans* RSO7 al desarrollo de la raíz, se midió a partir del segundo día de crecimiento el tamaño de la raíz de cada una de estas día a día. A partir del día 8 de medida, se midió el tamaño de la raíz cada cuatro días hasta llegar al día 16. Una vez se obtuvieron todos los datos, se calculó la media diaria del tamaño de las raíces por placa, descartando todas aquellas semillas no viables o desprendidas del agar. Usando estas medias diarias se estableció la cinética del crecimiento de la raíz y se representó gráficamente.

3.4. Determinación del índice de ramificación de la raíz

Otro de los parámetros que se compararon entre las placas inoculadas y no inoculadas fue el número de raíces secundarias que crecía en cada semilla. Para ello, se mantuvo el recuento de estas durante siete días, y una vez obtenidos los datos, se realizó la media del número de raíces secundarias por semilla al día en cada placa y con estas tablas se representó una gráfica para establecer una comparativa visual entre las plantas inoculadas y no inoculadas, tanto en medio BMN x1 como BNM x1/2.

3.5. Determinación del índice de supervivencia

Del mismo modo, se realiza un estudio de cuántas semillas sobreviven hasta el día 16. Se recopilaron los porcentajes por placa y se realizó una media entre placas que cumplieren las mismas condiciones (mismo medio y presencia o no de la bacteria).

3.6. Determinación del crecimiento del tallo y número de trifolios

Por último, el día 16 también fueron medidos el tamaño del tallo y el número de trifolios que presentaban las distintas plantas para establecer las posibles diferencias que pudiese generar en estas características la presencia o no de *P. agglomerans* RSO7.

3.7. Análisis estadístico

Se realizó un análisis estadístico el último día (día 16, excluyendo en el caso del cálculo del número de las raíces secundarias, que se determinaron el día 8) en el que los resultados obtenidos se expresaron como la media \pm error estándar de 2 experimentos independientes (2 placas para cada condición) con $n=14-24$ plantas cada uno de ellos. Las medias se compararon mediante el test de Student, entendiendo que existe una diferencia significativa cuando $p < 0,05$.

3.8. Extracción del ADN genómico de *Pantoea agglomerans* RSO7

Para comenzar este estudio, se inocularon 4 mL de un medio TSB líquido con la bacteria, procedente a su vez de una colonia aislada. Se cultivó a 28°C durante 24 horas. El medio TSB (medio de digerido de soja y caseína) es un medio líquido para el enriquecimiento y cultivo de microorganismos aerobios que no sean excesivamente exigentes. Una vez preparado el medio, este fue esterilizado en autoclave durante 20 min a 1 atm y 121 °C. Para el aislamiento de colonias bacterianas se utilizó el medio sólido TSA, análogo al TSB y que contiene 15 g L⁻¹ de agar.

Pasadas las 24 horas se procede a la extracción del ADN genómico. Para ello se utilizó un kit llamado G-spin™ Genomic DNA Extraction Kit (for Bacteria) de la casa iNtRON Biotechnology DR. Se siguió un protocolo específico para bacterias Gram negativas proporcionado por el fabricante. De forma resumida, el protocolo de extracción de ADN consistió en centrifugar 2 mL de cultivo, el cual se resuspendió en 300 μ L de solución G-Buffer (todas suministradas en el kit). Tras incubar a 65°C durante 15 minutos, se añadieron 250 μ L de Binding Buffer y se aplicó a la columna, incubando 1 minuto a temperatura ambiente. Se centrifugó 1 minuto y se descartó el eluyente de la columna. Tras lavar dos veces, la primera con 500 μ L del Washing Buffer A y la segunda con 500 μ L del Washing Buffer B, se eluyó el ADN. Para ello se aplicaron 150 μ L del Elution Buffer directamente sobre la membrana de la columna. Se incubó a temperatura

ambiente durante 1 minuto, y luego se centrifugó durante 1 minuto a 13000 rpm para eluir el ADN genómico. Tras esto, los tubos fueron almacenados en un congelador a una temperatura de -80°C. Su secuenciación posterior se realizó por un laboratorio externo, concretamente fue enviado a Sistemas Genómicos, en Valencia.

3.9. Secuenciación del genoma

La secuenciación del genoma se ha llevado a cabo a través de la empresa Sistemas Genómicos, S.A. (Valencia) utilizando la plataforma Illumina miSeq. Para realizar el análisis de la calidad se utilizó la herramienta FASTQC (www.bioinformatics.bbrsc.ac.uk/projects/fastqc). El ensamblaje de las secuencias se realizó utilizando el programa VELVET (Zerbino y Birney, 2008) mientras que los gaps fueron rellenados utilizando la herramienta Project 2 y la predicción de marcos abiertos de lectura (open reading frame, orf) se llevó a cabo utilizando el programa GLIMMER3 (Kurtz et al., 2004). Para la comparación de las secuencias se utilizó el programa BLAST V.2.2.30+ (Altschul et al., 1997) del National Centre for Biotechnology Information (NCBI, USA) con un valor de "cut-off" de ϵ igual a 10^{-3} . Se compararon con las bases de datos RNA (RNA central, 2014) y con la base de datos de nucleótidos NT (non-redundant nucleotide sequences) del NCBI, así como con la base de datos de proteínas Uniprot Swissprot (UniprotKB/Swiss-Prot Release 2015_08) para bacterias (Magrane, 2011). Las secuencias que no cumplían un mínimo tamaño (al menos la mitad de la secuencia más corta de los alineamientos) fueron descartadas. La anotación funcional de los genes se realizó mediante la base de datos de proteínas Uniprot Swissprot (UniprotKB/Swiss-Prot Release 2015_08) para bacterias (Magrane, 2011), así como mediante la Comisión de Enzimas (EC) y la base de datos Gene Ontology (GO).

4. Resultados y discusión

4.1. Efecto de la inoculación sobre la supervivencia de la planta

Se realizó un estudio de cuántas semillas sobreviven hasta el día 16 sin secarse, abortar o desprenderse para establecer posibles diferencias causadas por la presencia de *P. agglomerans* RSO7. Los datos se muestran en la tabla 3. Los datos presentan una supervivencia similar en el caso del medio que tiene la totalidad de los nutrientes (BNM x1) siendo superior en el caso de las inoculadas en un 4,16%. En el caso de las placas con la mitad de nutrientes, la supervivencia de las placas inoculadas aumenta hasta un 79,16% mientras que la supervivencia de las placas sin la bacteria desciende hasta un 58,33%, existiendo una diferencia entre ambas de 20,83%.

Tabla 3. Porcentaje de supervivencia durante 16 días de las plantas inoculadas y no inoculadas en medio BNM x1 (normal) y BNM x1/2 (mitad de nutrientes). Total de 24 plantas consideradas por cada medio y condición.

Medio de cultivo	Condiciones de inoculación	Porcentaje de supervivencia
BNM x1	Sin inocular	66,67%
	Inoculado	70,83%
BNM x1/2	Sin inocular	58,33 %
	Inoculado	79,16%

Parte de estos resultados de supervivencia pueden deberse a la presencia de un posible efecto de biocontrol de la bacteria *P. agglomerans* ROS7, lo que puede observarse comparando la contaminación presente en placas inoculadas y placas sin inocular. Como muestran las fotos tomadas el día 16 (figura 1 y figura 2), ambas placas presentan contaminación, ya que, aunque las semillas fueron esterilizadas superficialmente, estas podían contener de forma endógena alguno de los organismos que, posteriormente, fueron causantes de la contaminación. La diferencia reside en cómo crece la contaminación según si está inoculada o no. En el caso de las placas inoculadas, la mayoría de la contaminación se presenta en forma de pequeñas colonias aisladas alrededor de las raíces (figura 1) mientras que, en el caso de la contaminación presente en placas no inoculadas, sobre todo cuando se trata del medio con la mitad de nutrientes, esta contaminación avanza por toda la placa, llegando a presentar en algunos casos incluso un micelio central que ocupa aproximadamente 9 cm de ancho en el agar de la placa (figura 2).

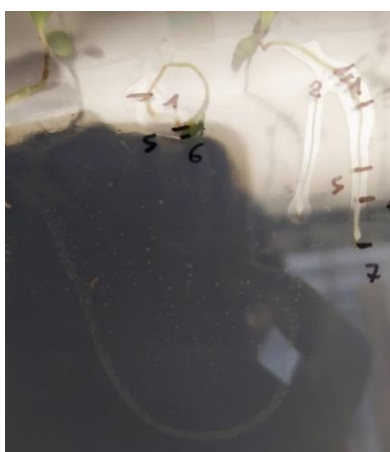


Figura 1. Contaminación presente en placa BNM x1/2 no inoculada (día 16).



Figura 2. Contaminación presente en placa BNM x1/2 no inoculada (día 16).

4.2. Efecto de la inoculación sobre el crecimiento de la raíz principal

Para comprobar el efecto de la inoculación con *P. agglomerans* RSO7 sobre el crecimiento de la raíz, se determinó el tamaño de la raíz principal cada día y, a partir del día 8, cada cuatro días.

Los resultados se muestran en las figuras 4 y 5. En medio completo (BNM x1), los datos demostraron un leve y tardío efecto positivo de la inoculación que se observó a partir del día 12. Finalmente, el día 16, la media de la raíz en plantas no inoculadas fue de 6,59 cm, mientras que en las plantas inoculadas fue de 8,55 cm (figura 3).

Los resultados en medio deficitario (BNM x1/2) fueron muy diferentes. En este caso, se observó un marcado efecto positivo de la inoculación desde el 5º día. Las raíces llegaron a presentar una longitud aproximadamente dos veces mayor en las plantas inoculadas frente a las no inoculadas. Finalmente, el día 16, la media de la raíz en plantas no inoculadas fue de 5,48 cm, mientras que en las plantas inoculadas fue de 9,41 cm (figura 4). Estos resultados indican que el efecto de las bacterias respecto al crecimiento de la raíz principal es mucho mayor cuando las plantas se encuentran en situación de carencia de nutrientes.

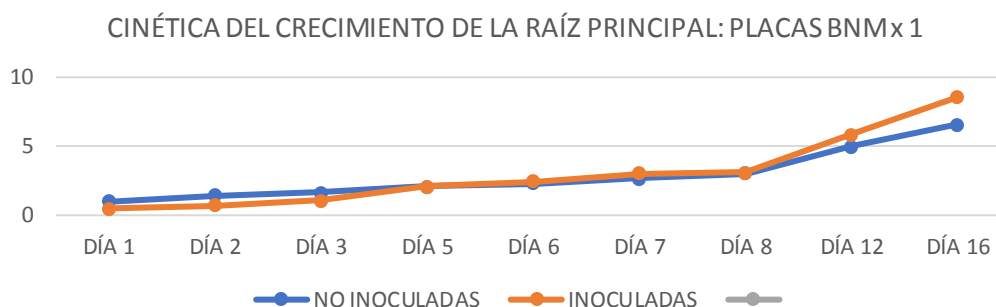


Figura 3. Cinética del crecimiento de la raíz principal durante 16 días en plantas inoculadas n=17 (color naranja) y no inoculadas (color azul) en medio BNM x1 n=16 (medio completo).

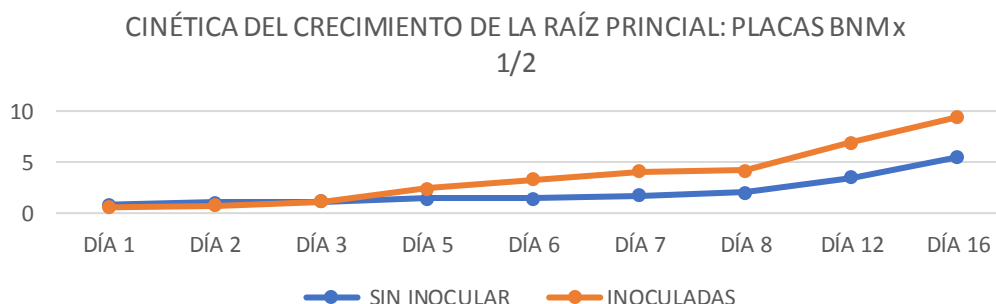


Figura 4. Cinética del crecimiento de la raíz principal durante 16 días en plantas inoculadas n=19 (color naranja) y no inoculadas (color azul) en medio BNM x1/2 n=14 (mitad de nutrientes).

El último día de medida, día 16, se realizó un análisis estadístico del crecimiento de la raíz principal. Para ello, se midieron todas las plantas de cada condición y se estableció la media entre estas. Los resultados fueron expresados como media \pm error estándar (tabla 4) y se compararon mediante el test de T-Student, entendiendo que existe una diferencia significativa cuando $p < 0,05$.

Tabla 4. Media del tamaño de la raíz principal de las plantas inoculadas y no inoculadas en medio BNM x1 (normal) y BNM x1/2 (mitad de nutrientes) el día 16.

Medio de cultivo	Condiciones de inoculación	Media del tamaño de la raíz principal (cm)
BNM x1	Sin inocular	7,36 \pm 0,77 (n= 16)
	Inoculado	8,55 \pm 0,75 (n= 17)
BNM x1/2	Sin inocular	5,48 \pm 0,66 (n= 14)
	Inoculado	9,41 \pm 0,58 (n= 19)

Se realizó la prueba T-Student para ambas condiciones, de donde se obtuvieron los siguientes resultados:

- Para medio de cultivo BNM x1, $p=0,271$, no existe diferencia significativa.
- Para medio de cultivo BNM x1/2 $p= 0,001$, existe diferencia significativa.

La presencia de una diferencia no significativa cuando se trata de medio BNM x1 puede deberse a que, ante la presencia de la totalidad de nutrientes, en ambas condiciones las plantas crecen muy bien. En el caso de BNM x1/2 la disponibilidad de nutrientes es más limitada, por lo que los efectos beneficiosos de las bacterias pueden observarse mejor, ya que como veremos en el análisis del genoma pueden solubilizar fosfato, fijar nitrógeno, sintetizar sideróforos, etc. permitiendo un crecimiento mejor de la raíz con menos aporte de nutrientes.

4.3. Efecto de la inoculación sobre el índice de ramificación

Para comprobar el efecto de la inoculación con *P. agglomerans* RSO7 sobre el número de raíces secundarias, se contabilizó el número de raíces secundarias día a día, hasta el día 8. Los resultados se muestran en las figuras 5 y 6. En medio completo (BNM x1), los datos demostraron una notable diferencia entre el número de raíces secundarias de las placas no inoculadas, con una media de 0, y el número de raíces secundarias presentes en las placas inoculadas, con una media de 3,54 (figura 5).

Los resultados en medio deficitario (BNM x1/2) también mostraron una diferencia notable frente a la presencia de la bacteria, aunque algo menor que en el caso del medio completo. Las placas no inoculadas alcanzaron una media del número de raíces secundarias de 0,5, mientras que, en las placas inoculadas, la media del número de raíces secundarias fue de 2,42 (figura 6). Los datos permiten afirmar que la presencia

de la bacteria aumenta el número de raíces secundarias de la planta, independientemente del medio considerado.

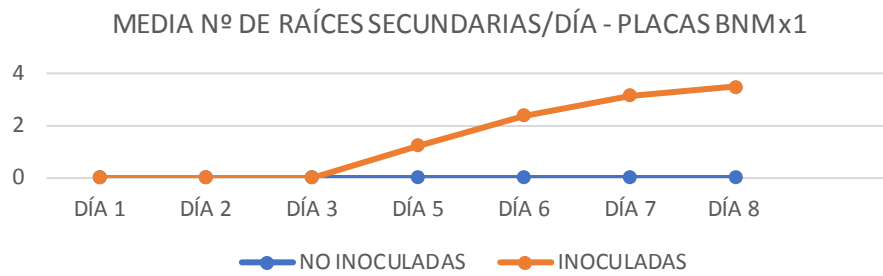


Figura 5. Media del número de raíces secundarias durante 8 días en plantas inoculadas (color naranja) y no inoculadas (color azul) en medio BNM x1 (medio completo). Total de 24 plantas de cada condición.

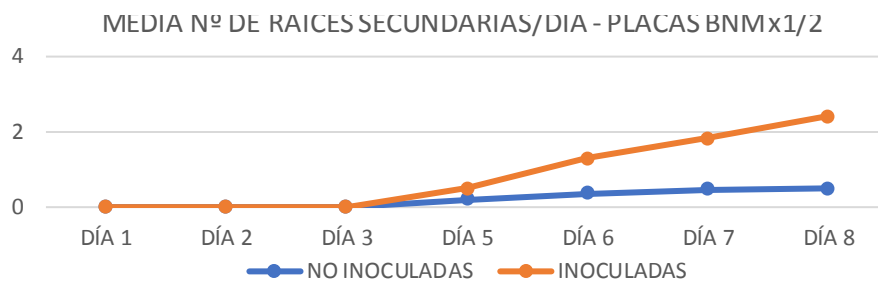


Figura 6. Media del número de raíces secundarias durante 8 días en plantas inoculadas (color naranja) y no inoculadas (color azul) en medio BNM x1/2 (medio deficitario). Total de 24 plantas de cada condición.

El día 8 se realizó un análisis estadístico del número de raíces secundarias. Para ello, se realizó un recuento de todas las raíces secundarias de todas las plantas de cada condición y se estableció la media entre aquellas sometidas a las mismas condiciones. Los resultados serán expresados como media \pm error estándar (tabla 5) y se compararon mediante el test de T-Student, entendiéndose que existe una diferencia significativa cuando $p < 0,05$.

Tabla 5. Media del número de raíces secundarias de las plantas inoculadas y no inoculadas en medio BNM x1 (normal) y BNM x1/2 (mitad de nutrientes).

Medio de cultivo	Condiciones de inoculación	Media del n° de raíces secundarias
BNM x1	Sin inocular	0 (n= 24)
	Inoculado	3,50 \pm 0,63 (n= 24)
BNM x1/2	Sin inocular	0,50 \pm 0,2 (n= 24)
	Inoculado	2,41 \pm 0,52 (n= 24)

Se realizó la prueba T-Student para ambas condiciones, de donde se obtuvieron los siguientes resultados:

- Para medio de cultivo BNM x1, $p=2,613^{-5}$, existe diferencia significativa.
- Para medio de cultivo BNM x1/2 $p=0,002$, existe diferencia significativa.

En este caso sí existen diferencias significativas para ambos casos, en un principio, porque puede que la bacteria ejerza un efecto positivo para el crecimiento de las raíces secundarias en ambos medios, destacando especialmente en el caso de BNM x1, lo cual puede deberse a que, en un medio BNM x1/2, al tener falta de nutrientes, incluso las plantas no inoculadas tienen tendencia a desarrollar raíces secundarias para así intentar captar un mayor número de nutrientes del medio. Estos efectos están relacionados con la capacidad de la bacteria de sintetizar auxinas (Paredes-Páliz et al., 2016a), ya que estas fitohormonas regulan, entre otros procesos, el crecimiento y ramificación de la raíz y el desarrollo de un mayor número de pelos absorbentes (Weijers et al., 2018).

4.4. Efecto de la inoculación sobre parámetros del tallo

El último día de medida, día 16, se midieron los tallos de todas las plantas para establecer o no la presencia de diferencias que podrían haberse producido al estar sometidas a distintas condiciones. Los resultados se muestran en la tabla 6. Los datos presentan un aumento en el tamaño medio del tallo de las plantas de las plantas inoculadas frente a aquellas que estaban sin inocular, tanto en medio con la totalidad de nutrientes, BNM x1 como en el medio deficitario en estos, BNM x1/2, siendo mayor la diferencia en este último caso. El incremento del tallo en BNM x1 fue del 20%, mientras que el incremento de la longitud del tallo en medio BNM x1/2 fue del 53%. Estos resultados sugieren que hay un mayor efecto promotor del crecimiento en condiciones de limitación de nutrientes.

Tabla 6. Media del tamaño del tallo y el número de trifolios de las plantas inoculadas y no inoculadas en medio BNM x1 (normal) y BNM x1/2 (mitad de nutrientes).

Medio de cultivo	Condiciones de inoculación	Media del tamaño del tallo (cm)	Media del número de trifolios
BNM x1	Sin inocular	5,79 ± 0,49 (n= 16)	2,19 ± 0,85 (n= 16)
	Inoculado	6,88 ± 0,63 (n=17)	3,41 ± 0,33 (n= 17)
BNM x1/2	Sin inocular	5,42 ± 0,66 (n=14)	2,28 ± 0,26 (n= 14)
	Inoculado	8,31 ± 0,55 (n=19)	3,42 ± 0,24 (n= 19)

Se realizó la prueba T-Student para ambas condiciones, de donde se obtuvieron los siguientes resultados para la media del tamaño del tallo:

- Para medio de cultivo BNM x1, $p= 0,185$, no existe diferencia significativa.

- Para medio de cultivo BNM x1/2 $p= 0,001$, existe diferencia significativa.

En este caso, vuelve a no existir una diferencia significativa en los medios BNM x1, esto puede deberse a que las plantas en ambas condiciones crecen muy bien al tener una cantidad óptima de nutrientes, y las placas no están preparadas para tener un tallo de gran tamaño, puesto que son llenadas de más de la mitad de medio, quedando apenas unos 11-14 cm de máximo para que el tallo crezca. La limitación de espacio puede frenar su crecimiento, siendo éste el motivo más probable por el que puede no existir una diferencia significativa en el supuesto considerado.

También se realizó un recuento del número de trifolios de todas las plantas y se hizo la media entre aquellas sometidas a las mismas condiciones. Los resultados se muestran en tabla 6.

Se realizó la prueba T-Student para ambas condiciones, de donde se obtuvieron los siguientes resultados:

- Para medio de cultivo BNM x1, $p=0,003$, existe diferencia significativa.
- Para medio de cultivo BNM x1/2 $p=0,011$, existe diferencia significativa.

Existen diferencias significativas en el número de trifolios tanto en el caso de BNM x1 como en el de BNM x1/2, siendo el número de estos ligeramente superior en el último caso probablemente porque, al tener menos nutrientes en el medio, la fotosíntesis, realizada por medio de estos trifolios, puede cobrar una mayor relevancia.

Por último, también se realizaron unas fotografías para establecer una comparativa visual entre las placas inoculadas y las placas sin inocular. En el caso de las placas con medio completo BNM x1 mostraba alguna diferencia en su apariencia, pero lo más llamativo sucedió en el caso de las placas BNM x1/2 donde se podía ver claramente el efecto beneficioso de la bacteria sobre la planta, como se muestra en la figura 7:

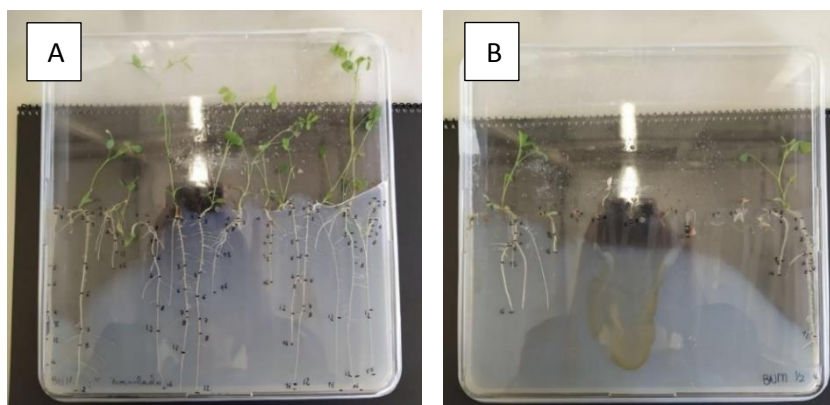


Figura 7. Aspecto de plantas de alfalfa cultivadas en medio BNM x1/2 inoculadas (A) y no inoculadas (B) (día 16).

4.5. Secuenciación del genoma

En primer lugar, se hizo una evaluación de la calidad de la secuenciación. Para ello, se evaluaron dos parámetros estadísticos:

Calidad de la secuenciación por base:

Se evaluó mediante un parámetro logarítmico Q conocido como nivel de calidad Phred. Este parámetro da la probabilidad de que una base determinada sea correcta en la secuencia (Ewing et al., 1988; Ewing y Green, 1988). Así, por ejemplo, un valor de 20 indica que hay 1 en 100 (10^2) probabilidades de que la base sea incorrecta. La figura 8 muestra los valores de Q para las bases según su posición en la lectura. Los valores de Q van desde 30 a 40 aproximadamente, lo que indica que la probabilidad de que la lectura de estas bases sea correcta está comprendida entre 99,99 y 99,999%.

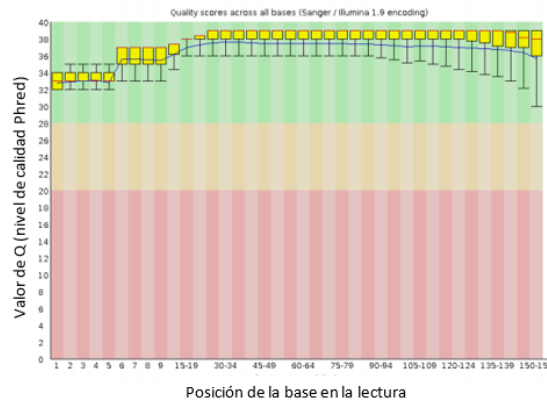


Figura 8. Análisis de la calidad de la secuencia mediante el parámetro Q (nivel de calidad Phred) según la posición de las bases en la lectura. La línea azul representa la media de los valores de Q y la línea roja representa la mediana.

Calidad de la secuenciación global.

La figura 9 representa el número de bases que tienen un determinado índice Q. De casi 4,6 millones de bases que contuvo la secuencia total, menos de 2000 presentaban un índice Phred inferior a 30, es decir, que la probabilidad de que sean incorrectas es 10^{-3} , o sea, que son correctas en un 99,9%. El resto tienen valores de Q más altos, por lo que la probabilidad de que sean correctas es mayor (hasta 99,99%), lo que correspondería a un valor de Q de 40. Utilizando estos criterios, las secuencias que presentaron una lectura de mala calidad se eliminaron.

El ensamblaje del genoma produjo 717 contigs. Este número puede parecer bastante alto, sin embargo, hay que destacar que los 100 primeros contigs más largos aglutinaban un 96% del genoma, ya que se encontraron 86 contigs con un tamaño

superior a 1 Kb. El contig con el tamaño superior contenía 187.661 pb. En el otro extremo, la mayoría del resto de los contigs tenían menos de 300 pb, con lo cual es poco probable que codifiquen un gen. De todas formas, se han conservado en el análisis. El valor de N50 (un parámetro estadístico que evalúa la longitud media de un set de secuencias; es decir, que al menos el 50% del genoma está contenido en un número de contigs igual o superior a ese número) fue de 73.054.

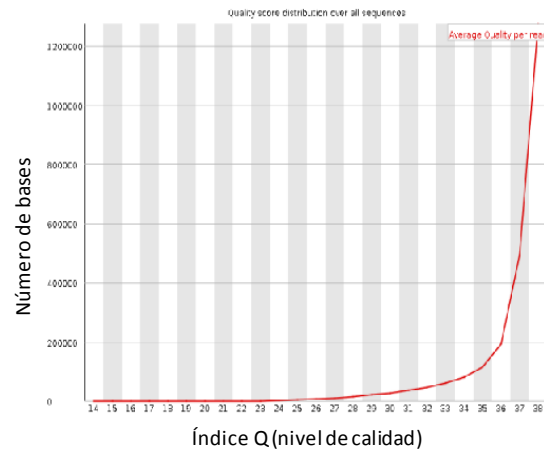


Figura 9. Análisis global de la calidad de la secuencia mediante el parámetro Q (nivel de calidad Phred).

4.6. Estudio detallado del genoma

Un análisis global del genoma revela que *P. agglomerans* RSO7 es una bacteria muy versátil y es capaz de adaptarse a una gran cantidad de situaciones ambientales. Por ejemplo, se han encontrado operones para la utilización de un gran número de fuentes de C (sorbitol, tartrato, citrato, xilulosa, galactofuranosa, ramnosa, arabinosa, galactosa, maltosa, manosa, etc.). También puede utilizar diversas fuentes de N (nitrato, amonio, aminoácidos, incluso se han detectado genes de fijación de N₂) y S (sulfato, aminoácidos como cisteína y metionina junto a taurina). Junto a su versatilidad metabólica, esta bacteria muestra resistencia a muchos tipos de estrés, no solo a metales pesados y salinidad, sino también a calor, frío, radiación UV, ácidos, estrés oxidativo (se han encontrado catalasas y diversas peroxidasas, así como superóxido dismutasa y glioxilasa) y diversos xenobióticos como compuestos azoicos (se ha encontrado una FMN-azorreductasa), curcumina (se ha encontrado una curcumina reductasa), a compuestos con grupos formilo (posee formilasa y formil-transferasa), compuestos halogenados (gracias a una dehalogenasa), compuestos con grupos nitro (se ha encontrado una nitrorreductasa), etc. Por otra parte, se han encontrado varios genes (*Syx*, *crp*) que indican que es competente natural, siendo capaz de incorporar ADN y por lo tanto de adquirir nuevas capacidades. También puede adquirir ADN plasmídico mediante conjugación, habiéndose detectado genes del precursor de pilina, una ATPasa implicada en la retracción del *pilus* y los genes *ppdAB* implicados en

conjugación. La presencia de integrasas y genes de fagos (lisogenia) hace sospechar que también pueda adquirir información genética mediante transducción. Todo esto indica que está muy bien equipada para adaptarse a muchas variaciones medioambientales y es muy competitiva en la rizosfera.

En particular, de todos los genes nos vamos a centrar en cuatro aspectos que son fundamentales para su aplicación como bacteria promotora del crecimiento vegetal:

- Resistencia a metales pesados.
- Resistencia a sal (alta osmolaridad).
- Propiedades PGPR: genes relacionados con el metabolismo y transporte del hierro y con el fosfato o la solubilización de este.
- Procesos rizosféricos importantes para la colonización e interacción planta-microorganismo.

4.6.1. Genes relacionados con la resistencia a metales pesados

El análisis manual reveló que el genoma lleva operones en racimo que codifican proteínas relacionadas con la resistencia al arsénico (As) y cobre (Cu), así como genes para la tolerancia al Zn, Co y Ni y al Te.

Tabla 7. Genes de resistencia a metales pesados encontrados en el genoma de *Pantoea agglomerans*RSO7.

Metal/ Metaloide	Gen	Producto génico/función	Máxima identidad	Número de acceso
Cobre	<i>CopA</i>	ATPasa tipo P exportadora de cobre. Participa en la salida de cobre.	COPA_STAAB (<i>Staphylococcus aureus</i>)	Q2YWA3
	<i>CueR</i>	Regulador transcripcional tipo HTH CueR. Detecta el estrés citoplásmico de cobre y activa la transcripción en respuesta a este.	CUER_SALTY (<i>Salmonella typhimurium</i>)	Q93CH6
	<i>CueO</i>	Cobre-oxidasa periplásmica. Implicada en la detoxificación al oxidar Cu ⁺ a Cu ²⁺ impidiendo su captación al citoplasma.	CUEO_YERPE (<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>)	Q8ZBK0
	<i>ComR</i>	Represor transcripcional de tipo HTH ComR. Reprime la transcripción cuando bajan los niveles de cobre.	COMR_ECOLI (<i>Escherichia coli</i>)	P75952
	<i>YebZ</i>	Proteína de membrana interna YebZ. Media en la salida de iones de cobre.	YEBZ_ECOLI (<i>Escherichia coli</i>)	P39172
	<i>CutC</i>	Proteína de homeostasis de cobre CutC. Participa en el control de la homeostasis del cobre.	CUTC_ERWT9 (<i>Erwinia tasmaniensis</i>)	B2VJB9
	<i>CusS</i>	A4752 sensor de Cu.	CUSS_ECOL6 (<i>Escherichia coli</i>)	Q8FK37

Zinc	<i>ZitB</i>	Transportador de zinc ZitB. Reduce la acumulación de Zn en el citoplasma haciendola más resistente al zinc.	ZITB_SALTY (<i>Salmonella typhimurium</i>)	Q8ZQT3
	<i>ZntB</i>	Proteína de transporte de zinc ZntB. Transportador transmembrana que media la salida de iones de zinc.	ZNTB_CITK8 (<i>Citrobacter koseri</i>)	A8AGD8
Arsénico	<i>ArrH</i>	FMN-reductasa dependiente de NADPH. Inducible por As.	ARREH_ACIF2 (<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>)	B7J950
	<i>ArsB</i>	Bomba de expulsión de As (III) utilizando como energía gradiente de H ⁺ .	ARSB1_ECOLX (<i>Escherichia coli</i>)	P08691
	<i>ArsC</i>	Arseniato reductasa.	ARSC_ECOLI (<i>Escherichia coli</i>)	POAB96
	<i>YffB</i>	Proteina YffB. Pertenece a la familia ArsC.	YFFB_ECOLI (<i>Escherichia coli</i>)	P24178
Níquel y cobalto	<i>RcnA</i>	Sistema de eflujo de níquel / cobalto putativo HI_1248. Sistema de eflujo de níquel y cobalto.	Y1248_HAEIN (<i>Haemophilus influenzae</i>)	P44136
Magnesio y cobalto	<i>CorC</i>	Proteína implicada en la expulsión de magnesio y cobalto CorC.	CORC_SALTI (<i>Salmonella typhimurium</i>)	P0A2L4
	<i>CorA</i>	Proteína de expulsión de magnesio y cobalto CorA. Homeostasis del Mg.	CORA_THEMEA (<i>Thermotoga marítima</i>)	Q9WZ31
Hierro	<i>FetA</i>	Proteína de unión a ATP FetA. Parte del transportador de tipo ABC FetAB, implicada en la exportación de Fe y en la resistencia al estrés oxidativo mediada por H ₂ O ₂ . Aporta la energía para el sistema de transporte.	FETA_ECOLI (<i>Escherichia coli</i>)	P77279
	<i>FetB</i>	Permeasa FetB. Parte del transportador de tipo ABC FetAB, implicada en la exportación de Fe y en la resistencia al estrés oxidativo.	FETB_ECOLI (<i>Escherichia coli</i>)	P77307
Teluro	<i>TehB</i>	Telurito metiltransferasa. Es responsable de la resistencia al teluro.	TEHB_ECOLI (<i>Escherichia coli</i>)	P25397
Reguladores	Gen	Producto génico/función	Máxima identidad	Número de acceso
Zinc y plomo	<i>HydH G</i>	Regulador transcripcional ZraR. Miembro del Sistema regulador de dos componentes ZraS/ZraR. Además de autorregular la expresión del operón ZarSR, regula la de ZarP.	ZRAR_ECOLI (<i>Escherichia coli</i>)	P14375
Multimetal : Co, Cd y Zn.	<i>CzcR</i>	Regulador transcripcional CzcR. Forma parte del sistema de dos componentes CzcSR que controla la expresión de diferentes sistemas de resistencia a metales pesados.	CZCR_CUPMC (<i>Cupriavidus metallidurans</i>)	Q44006

Uno de los mecanismos más frecuentes de resistencia de los procariontes frente a los metales pesados consiste en el bombeo del metal fuera de la célula bacteriana (Nies, 2003). A pesar de ser también un micronutriente esencial, el cobre es uno de los elementos más tóxicos ya que es muy oxidante. Las bacterias han desarrollado múltiples sistemas de resistencia a este elemento (Moraleta-Muñoz et al., 2010). En

RSO7 se han encontrado un regulador transcripcional positivo (CueR) y un represor (ComR) que se activan alternativamente según la concentración periplásmica de Cu (Stoyanov et al., 2001; Mermod et al., 2012). También una proteína periplásmica de unión a Cu (CutC) y una cobre-oxidasa periplásmica (CueO) que oxida Cu^{2+} a Cu^+ impidiendo su entrada al citoplasma (Grass y Rensing, 2001), así como dos bombas de expulsión de Cu fuera del citoplasma (CopA y YebZ) (Rensing et al., 2000). Del mismo modo, el Zn también es tóxico a altas concentraciones, habiéndose encontrado una bomba de expulsión de Zn (ZntB) (Worlock y Smith, 2002) junto a otra bomba de tipo ZitB (Grass et al., 2001). Por otra parte, Co y Ni son expulsados fuera de la célula a través de un mismo transportador, en este caso el RcnA (Rodrigue et al., 2005). Genes adicionales para la expulsión de Co y Mg son *CorC* y *CorA*, participando en la homeostasis de este último elemento (Nordin et al., 2013). Con respecto al As, se ha identificado el operón de resistencia formado por *arrH*, *arsB* y *arsC* (Ben Fekih et al., 2018), junto a una proteína adicional de tipo Yffb con actividad arseniato reductasa (Suhadolnik et al., 2017). Por su parte, el Fe, aunque es muy necesario como cofactor en muchas enzimas, también es perjudicial en exceso, de modo que se ha encontrado un sistema de expulsión de Fe (FetAB) formado por una permeasa y una ATPasa que suministra la energía para el transporte (Nicolaou et al., 2013).

A diferencia de estos mecanismos de resistencia basados en la expulsión del elemento tóxico fuera de la célula, la resistencia frente a Se y Te (ambos del grupo VIB de la tabla periódica) consiste en la metilación y la volatilización a través de la membrana plasmática de especies volátiles como el dimetilselenio y el dimetilteluro (Chasteen y Bentley, 2003). Se ha encontrado el gen *TehB* que codifica una enzima con actividad telurito metiltransferasa.

En cuanto a los genes reguladores, se han encontrado los genes reguladores *HydHG*, que codifica el regulador transcripcional ZraR, el cual regula la expresión de ZraP (Leonhartsberger et al., 2001). Adicionalmente se ha encontrado el regulador CzcR, que forma parte del sistema de dos componentes CzcSR, el cual controla la expresión de diferentes sistemas de resistencia a metales pesados como Zn, Cd y Co (Baeyens et al., 1997).

4.6.2. Genes relacionados con la resistencia a la sal (alta osmolaridad)

El análisis manual del genoma reveló la presencia de genes involucrados en la resistencia a alta osmolaridad, tales como osmoprotectores o reguladores transcripcionales para evitar un posible daño producido por la sal.

Tabla 8. Genes relacionados con la resistencia a la sal (alta osmolaridad) encontrados en el genoma de *Pantoea agglomerans* RSO7.

Osmoprotector	Gen	Producto génico/función	Máxima identidad	Número de acceso
Glicina betaína	<i>BetA</i> (dos copias)	Colina deshidrogenasa que participa en la biosíntesis de glicina betaína.	BETA_KLEP7 (<i>Klebsiella pneumoniae</i>)	A6T613
	<i>BetB</i>	Betaína aldehído deshidrogenasa. Biosíntesis de glicina betaína.	BETB_ECOLU (<i>Escherichia coli</i>)	B7N8L4
	<i>BetT</i>	Proteína de transporte de colina de alta afinidad. Participa en la ruta de biosíntesis de betaína a partir de colina.	BETT_ECO57 (<i>Escherichia coli</i>)	P0ABD0
	<i>YehX</i>	Proteína de unión a ATP YehX. Sistema de absorción de glicina betaína de baja afinidad.	YEHX_ECOLI (<i>Escherichia coli</i>)	P33360
	<i>YehY</i>	Permeasa YehY. Sistema de absorción de glicina-betaína de baja afinidad.	YEHY_ECOLI (<i>Escherichia coli</i>)	P33361
	<i>YehZ</i>	Proteína de unión a glicina-betaína YehZ. Parte de un complejo transportador de glicina betaína de baja afinidad.	YEHZ_ECOLI (<i>Escherichia coli</i>)	P33362
Prolina/ glicina betaína/ prolina betaína	<i>ProP</i>	Transportador de prolina / glicina betaína.	PROP_STAAR (<i>Staphylococcus aureus</i>)	Q6GJ96
	<i>ProV</i>	Proteína de unión a ATP. Parte del complejo ProU involucrado en la absorción de glicina betaína y prolina betaína.	PROV_ECOLI (<i>Escherichia coli</i>)	P14175
	<i>ProW</i>	Permeasa que forma parte del complejo ProU implicado en la captación de glicina betaína y prolina betaína.	PROW_SALTY (<i>Salmonella typhimurium</i>)	P17327
	<i>ProX</i>	Proteína periplásmica de unión a glicina betaína/prolina betaína de alta afinidad.	PROX_ECO57 (<i>Escherichia coli</i>)	P0AFM3
	<i>ProY</i>	Permeasa específica de prolina ProY.	PROY_SALTY (<i>Salmonella typhimurium</i>)	P37460
Colina-O-sulfato y glicina betaína	<i>OsmV</i>	Proteína de unión de importación de osmoprotectores dependiente de ATP.	OSMV_SALTY (<i>Salmonella typhimurium</i>)	Q8ZPK4
	<i>OsmW</i>	Permeasa para colina-O-sulfato y glicina betaína.	OSMW_SALTY (<i>Salmonella typhimurium</i>)	Q8ZPK3
	<i>OsmX</i>	Parte del complejo transportador OsmU para colina-O-sulfato y glicina betaína.	OSMX_SALTY (<i>Salmonella typhimurium</i>)	Q8ZPK2
	<i>OsmY</i> (dos copias)	Proteína periplásmica importadora de colina-O-sulfato y glicina betaína.	OSMY_ECOL6 (<i>Escherichia coli</i>)	P0AFH8
Trehalosa	<i>OtsA</i>	Trehalosa-6-fosfato sintasa. Biosíntesis de trehalosa.	OTSA_SALAR (<i>Salmonella arizonae</i>)	A9MMQ2

	<i>OtsB</i>	Trehalosa-fosfato fosfatasa. Elimina el fosfato de la trehalosa 6-fosfato para producir trehalosa libre.	OTSB_SALTY (<i>Salmonella typhimurium</i>)	P0CL50
	<i>TreA</i>	Trehalasa periplásmica. Descompone trehalosa en glucosa al volver las células a osmolaridad normal.	TREA_ECOK1 (<i>Escherichia coli</i>)	A1AAC5
	<i>TreF</i>	Trehalasa citoplasmática. Hidroliza la trehalosa a glucosa cuando regresan las células a condiciones de baja osmolaridad.	TREF_ECOSM (<i>Escherichia coli</i>)	B1LJ63
	<i>TreH</i>	Trehalasa TreH.	TREH_MYCS2 (<i>Mycolicibacterium smegmatis</i>)	A0R0W9
	<i>TreY</i>	Maltooligosil trehalosa sintasa.	TREY_ARTSQ (<i>Arthrobacter</i> sp.)	Q44315
	<i>TreZ</i>	Maltooligosil trehalosa trehalohidrolasa.	TREZ_SACSO (<i>Sulfolobus solfataricus</i>)	Q55088
Múltiples osmoprotectores	<i>OusA</i>	Transportador de glicina betaína/ prolina/ ectoína/ ácido piperóico OusA, pertenece a la superfamilia MSF. Implicado en transporte y acumulación de varios osmoprotectores. Se induce por estrés osmótico.	OUSA_DICD3 (<i>Dickeya dadantii</i>)	Q47421
Reguladores transcripcionales	Gen	Producto génico/función	Máxima identidad	Número de acceso
Reguladores transcripcionales	<i>OmpR-EnvZ</i>	Sistema de dos componentes EnvZ/OmpR implicado en osmoregulación. Regula la transcripción de las porinas OmpF y OmpC. Respuestas al estrés ácido y osmótico.	OMPR_ECO57 (<i>Escherichia coli</i>) ENVZ_SALTY (<i>Salmonella typhimurium</i>)	P0AA18 P08982
	<i>DoeX</i>	Proteína reguladora transcripcional DoeX. Su función es la degradación/síntesis de ectoína en respuesta a sal.	DOEX_HALED (<i>Halomonas elongata</i>)	E1V7V9
	<i>BetI</i>	Represor transcripcional tipo HTH implicado en la biosíntesis de glicina betaína.	BETI_CROS8 (<i>Enterobacter sakazakii</i>)	A7MFA6
	<i>OsmB</i>	Lipoproteína osmóticamente inducible B. Resistencia al estrés osmótico. Importante para la supervivencia en fase estacionaria.	OSMB_ECOLI (<i>Escherichia coli</i>)	P0ADA7
	<i>OsmE</i>	Lipoproteína osmóticamente inducible OsmE. Posible regulación osmótica del nitrógeno.	OSME_ECO57 (<i>Escherichia coli</i>)	P0ADB2

La cepa RSO7 está equipada con una batería de genes que regulan la resistencia a la sal (estrés osmótico). La regulación se lleva a cabo mediante la actividad un sistema de dos componentes OmpR/EnvZ (Forst Set al., 1989) y otros más específicos como el regulador de la síntesis de ectoína *DoeX* (Schwibbert et al., 2011) o el represor de la

síntesis de glicina betaína *BetI* (Scholz et al., 2016). Estos activadores transcripcionales regulan la expresión de genes de la síntesis de betaína (del que se ha encontrado un operón de tipo *BetIABT*) (Cánovas et al., 2000) y de la síntesis de trehalosa (*OtsAB*) (Kaasen et al., 1994) y *TreYZ* (Maruta et al., 1996). También regulan la captación desde el periplasma de prolina y la síntesis a partir de colina de glicina betaína y prolina betaína mediante tres sistemas: *ProPVWXY* (Stirling et al., 1989), *OsmVWXY* (Frossard et al., 2012) y *YehXYZ* (Checroun y Gutierrez, 2004), este último de baja afinidad. También se ha detectado el gen *OusA*, que codifica un transportador de la familia MFS (Major Facilitator Superfamily) implicado en el transporte y la acumulación de varios osmoprotectores tales como glicina betaína, prolina, ectoína y ácido pipercolico (Gouesbet et al., 1996). Tras la desaparición de las condiciones de estrés osmótico los metabolitos osmóticos son “reciclados” como fuente de carbono. Por ejemplo, se han encontrado tres trehalasas, una citosólica y otra periplásmica (*TreA* y *TreF*) (Horlacher et al., 1996) y una *TreH* recientemente descubierta (Carrol et al., 2007), que degradan trehalosa a glucosa cuando las células regresan a condiciones de baja osmolaridad. Finalmente, se han encontrado otras proteínas reguladas por estrés osmótico que a su vez están implicadas en diferentes procesos celulares como el metabolismo del nitrógeno (*OsmE*) o la supervivencia en la fase estacionaria del cultivo (*OsmB*). Todos estos genes ponen de manifiesto la resiliencia frente a situaciones de estrés osmótico y la fina y compleja regulación de esta respuesta.

4.6.3. Genes relacionados con las propiedades PGPR

Los genes potencialmente involucrados en la promoción del crecimiento de las plantas también se extrajeron cuidadosamente, destacando aquellos implicados en el transporte y metabolismo del hierro, así como aquellos relacionados con el fosfato o la solubilización de este.

4.6.3.1. Genes relacionados con el transporte y metabolismo de hierro

El hierro es un elemento fundamental para las bacterias, formando parte de muchos cofactores de enzimas redox, transportadores de electrones, etc. Por ello, las bacterias se aseguran de conseguirlo e incluso de competir por este elemento.

Tabla 9. Genes relacionados con el transporte y metabolismo del Fe encontrados en el genoma de *Pantoea agglomerans* RSO7.

Proceso	Gen	Producto génico/función	Máxima identidad	Número de acceso
Transporte de iones Fe ²⁺	<i>EfeO</i>	Componente del sistema de absorción de hierro Fe ²⁺ EfeO. Componente de unión de hierro y / o transferencia de electrones.	EFEO_ECOL6 (<i>Escherichia coli</i>)	Q8FJ35

	<i>FeoA</i>	Proteína FeoA implicada en el transporte de iones ferrosos Fe ²⁺ .	FEOA_ECO57 (<i>Escherichia coli</i>)	P0AEL5
	<i>FeoB</i>	FeoB GTPasa. Se acopla a FeoA aportando la energía para el transporte de Fe ²⁺ mediante la hidrólisis de GTP.	FEOB_SALTY (<i>Salmonella typhimurium</i>)	P74884
	<i>EfeU</i>	Ion ferroso permeasa EfeU. Captación de iones Fe ²⁺ a través de la membrana.	EFEU_SHIFL (<i>Shigella flexneri</i>)	Q83LK5
	<i>ESA_00329</i>	Proteína implicada en el tráfico de iones Fe ²⁺ . Mediador en las transacciones de hierro.	FETP_CROS8 (<i>Cronobacter sakazakii</i>)	A7MLY0
Transporte de iones Fe ³⁺	<i>FbpB</i>	Permeasa implicada en el transporte de Fe ³⁺ FbpB. Parte del complejo transportador FbpABC involucrado en la importación de iones férricos.	FBPB_ACTPL (<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>)	Q44123
	<i>FbpC</i> (dos copias)	Proteína de unión a ATP FbpC. Parte del complejo transportador FbpABC involucrado en la importación de iones Fe ³⁺ . Responsable del acoplamiento de energía al sistema de transporte.	FBPC_ECOLI (<i>Escherichia coli</i>) FBPC_BRUME (<i>Brucella melitensis</i>)	P37009 Q8YCG3
Sideróforos	Gen	Producto génico/función	Máxima identidad	Número de acceso
Hemo (Fe ²⁺)	<i>HemH</i>	Ferroquelatasa citoplásmica. Cataliza la inserción de Fe ²⁺ en protoporfirina IX.	HEMH_PECAS (<i>Pectobacterium atrosepticum</i>)	Q6D7Z4
	<i>EfeB</i>	Deferroquelatasa/peroxidasa EfeB. Participa en la recuperación de hierro hemo exógeno. Extrae hierro mientras conserva intacto el anillo de tetrapirrol.	EFEV_ECOK1 (<i>Escherichia coli</i>)	A1A9S3
Hemina (Fe ³⁺)	<i>HmuS</i>	Proteína de transporte de hemina HmuS. Parte del sistema de transporte para hemina.	HMUS_YERPE (<i>Yersinia pestis</i>)	Q56990
	<i>HmuT</i>	Proteína periplásmica de unión a hemina HmuT. Parte del sistema de transporte para hemina.	HMUT_YERPE (<i>Yersinia pestis</i>)	Q56991
	<i>HmuU</i>	Permeasa implicada en el sistema de transporte de hemina HmuU. Responsable de la translocación del sustrato a través de la membrana.	HMUU_YERPE (<i>Yersinia Pestis</i>)	Q56992
	<i>HmuV</i>	Proteína importadora de hemina con unión a ATP.	HMOV_SODGM (<i>Sodalis glossinidius</i>)	Q2NSR0
Ferritina	<i>YciF</i>	Proteína Ycif. Proteína similar a la ferritina. Implicada en el transporte y el metabolismo del hierro.	YCIF_ECOLI (<i>Escherichia coli</i>)	P21362
Bacterioferritina	<i>Bfr</i>	Bacterioferritina. Proteína de almacenamiento de hierro. Tiene actividad ferroxidasa: une Fe ²⁺ , lo oxida a Fe ³⁺ que almacena dentro de la cavidad central del complejo proteico.	BFR_SALTY (<i>Salmonella typhimurium</i>)	O68926
	<i>Bfd</i>	Ferredoxina asociada a bacterioferritina. Parece asociarse con BFR; componente redox.	BFD_SALTI (<i>Salmonella typhi</i>)	P0A1Z7

Ferritina no hemo	<i>FtnA</i>	Es, probablemente, una ferritina bacteriana no hemo. Implicada en el almacenamiento de hierro.	FTN1_HAEIN (<i>Haemophilus influenzae</i>)	P43707
Enterobactina	<i>EntA</i> <i>EntB</i> <i>EntC</i> <i>EntD</i> <i>EntE</i> <i>EntF</i>	Enterobactina sintetasa. Complejo enzimático formado por 6 componentes: EntABCDEF. Participa en la biosíntesis del sideróforo enterobactina, que es una lactona trimérica macrocíclica de N- (2,3-dihidroxibenzoil) -serina.	ENTA_ECOLI (<i>Escherichia coli</i>) ENTB_ECO57 (<i>Escherichia coli</i>) ENTC_ECO57 (<i>Escherichia coli</i>) ENTD_SALTI (<i>Salmonella typhi</i>) ENTE_ECO57 (<i>Escherichia coli</i>) ENTF_ECOLI (<i>Escherichia coli</i>)	P15047 P0ADI5 P0AEJ3 Q8Z8L9 Q8XBV3 P11454
	<i>FepA</i>	Receptor de Fe-enterobactina FepA, implicado en el transporte enterobactina-Fe ³⁺ a través de la membrana externa de bacterias Gram negativas.	FEPA_ECOLI (<i>Escherichia coli</i>)	P05825
Acromobactina	<i>CbrD</i>	Proteína transportadora de acromobactina de unión a ATP. Parte del sistema de transporte CbrABCD para la captación del sideróforo acromobactina. Probablemente responsable del acoplamiento de energía al sistema de transporte.	CBRD_DICD3 (<i>Dickeya dadantii</i>)	Q47087
Ferrioxamina	<i>FoxA</i>	Receptor de ferrioxamina. Unión y absorción de ferrioxamina, en asociación con la proteína TonB.	FOXA_YEREN (<i>Yersinia enterocolitica</i>)	Q01674
	<i>FhuE</i>	Receptor de la membrana externa para Fe ³⁺ -coprógeno, Fe ³⁺ -ferrioxamina B y Fe ³⁺ -ácido rodotrílico.	FHUE_ECOLI (<i>Escherichia coli</i>)	P16869
	<i>FhuF</i>	Reductasa férrica FhuF. Implicada en la reducción de Fe ³⁺ -ferrioxamina citoplásmica.	FHUF_ECOLI (<i>Escherichia coli</i>)	P39405
Bacilibactina	<i>BesA</i>	Ferri-bacilibactina esterasa BesA. Cataliza la hidrólisis del ciclo trilactona para liberar los monómeros y Fe disponibles.	BESA_BACSU (<i>Bacillus subtilis</i>)	O32102
Múltiples quelatos de hierro	<i>YfeB</i>	ATPasa. Parte del complejo YfeABCD que transporta múltiples complejos de Fe utilizando como energía la hidrólisis de ATP.	YFEB_YERPE (<i>Yersinia pestis</i>)	Q56953
	<i>YfeC</i>	Proteína de membrana YfeC perteneciente a los transportadores de tipo ABC que transporta complejos de Fe.	YFEC_YERPE (<i>Yersinia pestis</i>)	Q56954
	<i>YfeD</i>	Proteína de membrana YfeD Parte de los transportadores ABC de que transporta complejos de Fe.	YFED_YERPE (<i>Yersinia pestis</i>)	Q56955

Reguladores	Gen	Producto génico/función	Máxima identidad	Número de acceso
	<i>YfeE</i>	Regulador YfeE de <i>YfeABCD</i> , un locus transportador ABC involucrado en el transporte de quelatos de hierro.	YFEE_YERPE (<i>Yersinia pestis</i>)	Q56956
	<i>HssR</i>	Regulador de respuesta hemo HssR. Miembro del sistema regulador de dos componentes HssS/HssR involucrado en la homeostasis del grupo hemo.	HSSR_STAEQ (<i>Staphylococcus epidermidis</i>)	Q5HLN2
	Fur	Proteína reguladora de la absorción férrica. Actúa como un elemento de control negativo global. Regula, entre otras proteínas, el operón de transporte de hierro.	FUR_ECO57 (<i>Escherichia coli</i>)	P0A9B1

Se han encontrado transportadores de iones libres, tanto ferrosos (EfeO, FeoAB, EfeU, ESA_00329) (Lau et al., 2016) como férricos (FbpBC) (Wyckoff et al., 2006). Junto a estos, la bacteria produce y/o transporta una gran diversidad de sideróforos, entre los que se encuentran hemo (protoporfirina que compleja Fe²⁺) (Otto et al., 1992). Se han detectado el gen *HemH* que codifica una ferroquelatasa, la cual incorpora el Fe al anillo tetrapirrólico (Shepherd et al., 2006), mientras que la deferroquelatasa EfeB lo libera (Létoffé et al., 2009). El Fe³⁺ puede ser incorporado en forma de hemina (protoporfirina que compleja Fe³⁺) habiéndose encontrado el complejo transportador de hemina HmuSTUV (Hornung Jet al., 1996). Otro tipo de sideróforos son las ferritinas bacterianas, de las que se han encontrado tres clases: YciF, Bfr/Bfd y la ferritina no hemo FtnA (Yao et al., 2011). También se ha encontrado el sideróforo enterobactina, sintetizado por el complejo enzimático EntABCDEF (Reitz et al., 2017) y del cual se ha detectado el receptor/transportador en la membrana externa (Armstrong et al., 1990). Junto a este se ha detectado una ATPasa CbrD para el transporte del sideróforo acromobactina (Berti y Thomas, 2009), dos receptores para Fe³⁺-ferrioxiamina (FoxA y FhuE; Sauer et al., 1987) y una esterasa BesA que rompe el anillo de tres lactonas de la ferri-bacilibactina y libera el Fe para su uso metabólico (Miethke et al., 2006). Finalmente, se ha encontrado el complejo YfeBCD que transporta múltiples complejos de hierro (Bearden et al., 1998).

En cuanto a la regulación de estos procesos, se han encontrado el regulador YfeE que regula la expresión del sistema de captación de quelatos de Fe YfeABCD (Bearden et al., 1998) y el sistema de dos componentes HssS/HssR que regula la homeostasis del grupo hemo (Stauff et al., 2007). Finalmente, se ha encontrado también el regulador Fur que es un regulador maestro de la homeostasis global del hierro (Troxell y Hassam, 2013).

4.6.3.2. Genes relacionados con el fosfato y con la solubilización de fosfato.

El fósforo puede ser captado tanto en forma inorgánica como orgánica. En sus formas inorgánicas, lo más frecuente es que se encuentre en forma de fosfato (PO_4^{-3}). El fósforo es uno de los elementos fundamentales de los que se nutre la planta, de una adecuada asimilación de este depende en gran medida su crecimiento y desarrollo adecuado.

Tabla 10. Genes encontrados en el genoma de *Pantoea agglomerans* RSO7 relacionados con el fosfato o la solubilización de fosfato.

Forma de fosfato	Gen	Producto génico/función	Máxima identidad	Número de acceso
Fosfato inorgánico (PO_4^{-3})	<i>PstS</i>	Proteína periplásmica de unión a fosfato PstS. Participa en el sistema de transporte de fosfato a través de la membrana citoplasmática.	PSTS_PSEAB (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	Q02DZ3
	<i>PstB1</i>	Proteína importadora de fosfato de unión a ATP. Parte del complejo transportador ABC PstSACB involucrado en la importación de fosfato. Responsable del acoplamiento de energía al sistema de transporte.	PSTB1_PECA S (<i>Erwinia carotovora</i>)	Q6D2D5
	<i>PitB</i>	Transportador de fosfato inorgánico de baja afinidad.	PITB_ECOLI (<i>Escherichia coli</i>)	P43676
Fosfito (PO_3^-)	<i>PtxC</i>	Permeasa sistema de transporte de fosfito PtxC. Probablemente forma parte de un transportador de fosfito responsable de la translocación del sustrato a través de la membrana.	PTXC_PSEST (<i>Pseudomonas stutzeri</i>)	O69053
Fosfato orgánico	<i>Ppx</i> (dos copias)	Exopolifosfatasa. Degradación de los polifosfatos inorgánicos (poli-P). Libera ortofosfato de forma progresiva desde los extremos de la cadena poli-P.	PPX_SALTY (<i>Salmonella typhimurium</i>)	P0A269
			PPX_ECOLI (<i>Escherichia coli</i>)	P0AFL6
Fosfonatos	<i>PhnD</i>	Proteína periplásmica de unión a fosfonatos. Proteína de unión a fosfonato que forma parte del sistema de absorción de fosfonato.	PHND_ECOLI (<i>Escherichia coli</i>)	P16682
	<i>PhnC</i>	Proteína importadora de fosfonatos de unión a ATP PhnC. Parte del complejo transportador ABC PhnCDE participa en la importación de fosfonatos, ésteres de fosfato, fosfito y fosfato. Responsable del acoplamiento de energía al sistema de transporte.	PHNC_ECOLI (<i>Escherichia coli</i>)	P16677
Inositol-fosfato	<i>SuhB</i>	Inositol-1-monofosfatasa. Desfosforilación del myo-inositol fosfato.	SUHB_XYLFT (<i>Xylella fastidiosa</i>)	Q87BG1

Movilización de polifosfato	<i>Ppk</i>	Polifosfato quinasa. Proteína de membrana que cataliza la transferencia reversible del fosfato terminal de ATP para formar un polifosfato de cadena larga (poli-P).	PPK1_VIBCH (<i>Vibrio cholerae</i>)	Q9KU07
	<i>Ppa</i>	Pirofosfatasa inorgánica. Cataliza la hidrólisis del pirofosfato inorgánico (PPi) formando dos iones fosfato.	IPYR_SALTY (<i>Salmonella typhi</i>)	P65749
Reguladores		Producto génico/función	Máxima identidad	Número de acceso
	<i>PsiF</i>	Proteína inducible por deficiencia de fosfato PsiF.	PSIF_ECOL6 (<i>Escherichia coli</i>)	P0AFM5
	<i>PhoH</i>	Proteína PhoH. Proteína inducible por deficiencia de fosfato.	PHOH_ECO57 (<i>Escherichia coli</i>)	P0A9K2
	<i>PhoB</i>	Proteína reguladora transcripcional del regulón de fosfato PhoB. Junto a PhoR controlan la expresión del regulón fosfato.	PHOB_ECO57 (<i>Escherichia coli</i>)	P0AFJ6
	<i>PhoR</i>	Proteína de membrana PhoR que actúa como sensor del regulón de fosfato. Miembro del sistema regulador de dos componentes PhoR / PhoB involucrado en la expresión de los genes de regulón fosfato.	PHOR_KLEPN (<i>Klebsiella pneumoniae</i>)	P45608
	<i>PhnF</i>	Probable regulador transcripcional PhnF. Pertenece a un operón involucrado en la absorción de alquilfosfonatos PhnCDE y actividad C-P liasa.	PHNF_ECOLI (<i>Escherichia coli</i>)	P16684

El fósforo puede ser captado tanto en forma inorgánica como orgánica. En sus formas inorgánicas, lo más frecuente es que se encuentre en forma de fosfato (PO_4^{3-}). Para sensar los niveles extracelulares de fosfato, La bacteria RSO7 tiene un sistema de dos componentes PhoB/PhoR en el que regulador PhoR es el activador transcripcional que regula todo el regulón fosfato Pho (Tomassen et al., 1982). Además, se han identificado en el genoma otros genes inducibles por deficiencia de P como *PhoH* y *PsiF*, los cuales forman parte del regulón fosfato Pho que mantiene la homeostasis de este elemento (Chekabab et al., 2014). El fosfato inorgánico PO_4^{3-} puede ser transportado al interior a través de diversos transportadores de diferente afinidad tales como PstB y PitB (Willsky y Malamy, 1980). En algunos casos se puede encontrar el fósforo en forma de fosfito (P con valencia +3). En este sentido, se ha encontrado el gen *PtxC* que codifica la proteína PtxC la cual forma parte de un transportador PtxABC de fosfito (Metcalf y Wolfe, 1998).

Refiriéndonos a formas orgánicas de fósforo, la bacteria puede hidrolizar enlaces C-P mediante exopolifosfatasas secretadas al exterior de las que se ha encontrado dos copias de la fosfatasa Ppx (Akiyama et al., 1993). Los fosfonatos son moléculas

orgánicas que contienen P en estado de oxidación 3+ (Horsman y Zechel, 2017). Se ha encontrado el operón *PhnCDEF* para la utilización de estos compuestos (Stasi et al., 2019). Junto a esto, se ha detectado el gen *SuhB* que codifica una fosfatasa capaz de hidrolizar inositol-P (Matsuhisa et al., 1995).

El fósforo captado se puede acumular en gránulos de polifosfato gracias a la polifosfato kinasa Ppk (Shiba et al., 2000) y ser movilizado cuando sea necesario ya en el citoplasma por medio de la pirofosfatasa inorgánica Ppa (Kajander et al., 2013). Al movilizar estos compuestos de fosfato, este queda también disponible para las plantas, por lo que es una importante propiedad PGPR (Idris et al., 2002).

4.6.4. Genes relacionados con procesos rizosféricos importantes para la colonización y la interacción planta microorganismo

La correcta colonización de la raíz es un requisito importante para que el microorganismo que se asocia a la planta ejerza su función. Esta colonización puede depender de muchos factores, como su movilidad, su capacidad para formar biofilms o la comunicación bacteriana, entre otros.

Tabla 11. Genes encontrados en el genoma de *Pantoea agglomerans* RSO7 relacionados con procesos rizosféricos.

Proceso rizosférico		Gen(es) /Operón	Producto(s) génico(s)/función
Movilidad (Flagelo)	Biosíntesis del flagelo	<i>FliHABE</i>	Proteínas de biosíntesis flagelar FliHABE. Constituyentes del aparato de exportación de flagelina.
		<i>FliBCD</i>	Proteínas FliBCD. Flagelina y proteínas implicadas en la modificación post-traducional de la flagelina y su polimerización en la punta del filamento en crecimiento.
		<i>FliJ</i>	Proteína flagelar FliJ implicada en eventos quimiotácticos. Mutaciones en FliJ resultan en la incapacidad de responder a los estímulos quimiotácticos.
	Movimiento del flagelo	<i>MotAB</i>	Proteínas de motilidad A y B. Requeridas para la rotación del motor flagelar.
		<i>YcgR</i>	Proteína de freno flagelar YcgR. Actúa como un freno flagelar, regulando la natación.
	Regulación de la expresión de los genes del flagelo	<i>FliH, FliA, FliT, FliZ</i>	Reguladores transcripcionales. Activan la expresión de genes flagelares.
Quimiotaxis		<i>Tsr, Tar</i>	Proteínas de quimiotaxis que se regulan por metilación (MCP I y II; methyl-accepting chemotaxis proteins I y II). Receptores para atrayentes (aminoácidos, ácidos dicarboxílicos) y responsable de la quimiotaxis negativa de repelentes (leucina, indol, ácidos débiles, Ni, Co, alquitrán).
		<i>CheR/CheB</i>	Sistema de transducción de señales que modula la quimiotaxis en respuesta a diversos estímulos mediante metilación (CheR) y desmetilación (CheB) de las proteínas Tsr y Tar.

		<i>CheAWYZ</i>	Proteínas de quimiotaxis CheAWYZ. Participan en la transmisión de señales sensoriales de los quimiorreceptores a los motores flagelares.
Formación de biofilms		<i>AriR, BssS</i>	Proteínas reguladoras de la formación de biofilms AriR y BssS. Regulan la formación de biofilms en diversos medios y no en otros, dependiendo de la composición y en respuesta a estrés.
		<i>BdIA</i>	Proteína de dispersión de biofilm BdIA. Esencial para la dispersión de biopelículas mediante la detección de señales ambientales. Modulación de la motilidad de natación y la adhesividad de la superficie celular bacteriana.
Comunicación bacteriana (<i>quorum sensing</i>)		<i>QseE</i>	Sensor histidina quinasa QseE. Miembro del sistema regulador de dos componentes QseF / QseE requerido para la formación de microcolonias sobre las células del hospedador.
		<i>QseG</i>	Proteína reguladora de <i>quorum sensing</i> G. Translocación de moléculas efectoras en células del huésped.
		<i>LuxS, Rhil</i>	S-ribosilhomocisteína liasa y acil-homoserina-lactona sintasa. Participan en la síntesis de moléculas autoinductoras (AI-2, BHL y HHL). Se trata de moléculas de <i>quorum sensing</i> secretadas por bacterias para testar la densidad celular y el potencial metabólico del medio ambiente.
Interacción planta-bacteria	Comunicación planta-bacteria	<i>MocR</i>	Proteína MocR. Regulador transcripcional de los genes <i>moc</i> para el catabolismo de rizopina.
		<i>OccM, OccQ, NocT</i>	Permeasas del sistema de transporte de octopina OccMQ. Proteína periplásmica de unión a nopalina NocT. Componentes del sistema de transporte activo de octopina y nopalina OccQMPT.
	Exopolisacáridos implicados en virulencia y formación de biofilms	<i>AmsBCDFJKL</i>	Proteínas AmsBCDFJKL. Participan en la biosíntesis de amilovorano, polisacárido extracelular que funciona como un factor de virulencia y de formación de biofilms.
	Degradación pared de las células vegetales (endófitos)	<i>YesR, KdgF</i>	Proteína de degradación de pectina ramnogalacturonil hidrolasas YesR y KdgF.
	Supervivencia dentro del hospedador	<i>MsgA, PagC</i>	Proteínas de virulencia MsgA y PagC. Esenciales para la plena virulencia y supervivencia dentro de los macrófagos.
	Regulación de la virulencia y resistencia a péptidos antibacterianos del hospedador	<i>PhoPQ</i>	Proteínas reguladoras transcripcionales de virulencia PhoPQ. Miembro del sistema regulador de dos componentes PhoQ / PhoP que regula la expresión de genes implicados en la virulencia y la resistencia a los péptidos antimicrobianos de defensa del huésped.
Competencia en la rizosfera	Síntesis de toxinas (Sistemas toxina/antitoxina)	<i>CdiA, RelE3, HipAB</i>	Sistema de toxina-antitoxina (TA). Sistemas de dos componentes en el que uno es una toxina y el otro una proteína de inmunidad a la toxina. CdiA: toxina que permite que las bacterias se comuniquen e inhiben el crecimiento de bacterias vecinas estrechamente relacionadas de una manera dependiente del contacto. Toxina RelE3: Tiene actividad RNAasa.

	Inhibición de la comunicación entre otras bacterias	<i>YvrE</i>	Proteína YvrE con actividad lactonasa (hidroliza las moléculas de <i>quorum sensing</i> de otras bacterias). Une como cofactor un catión divalente por subunidad.
	Antibiosis	<i>CvpA</i>	Proteína productora de colicina V.
		<i>SlyA</i>	Regulador transcripcional SlyA del operón <i>cpmABCDEFGH</i> involucrado en la producción de antibióticos tipo carbapenem.

La movilidad de la bacteria está determinada por la presencia de flagelos, para cuya síntesis, rotación y regulación se han encontrado los genes *Fli* y *Fli* (Nakamura y Minamino, 2019). La movilidad de la bacteria en la rizosfera está determinada por la quimiotaxis hacia la raíz, la cual secreta compuestos atrayentes para las bacterias (exudados radiculares). Se han encontrado genes *Che* implicados en quimiotaxis, así como *Tsr/Tar* (que codifican las proteínas de quimiotaxis que se regulan por metilo MCP I y II, quimiorreceptores de aminoácidos y ácidos orgánicos respectivamente (Feng et al., 2018). Los exudados radiculares también determinan la formación de biofilms, proceso altamente regulado del que se han encontrado genes como *AriR* y *BssS* (Zhang et al., 2015). Además, el gen *BdlA* codifica una proteína de dispersión de biofilm, que está implicada en la modulación de la movilidad/formación de biofilm en respuesta a señales ambientales (Morgan et al., 2006). Para que ocurran todos estos procesos rizosféricos es necesario que haya una mínima densidad celular, detectada mediante los sistemas de *quorum sensing*, de los que hemos encontrado los genes *Qse*, *Lux* y *Rhi* (Altaf et al., 2017).

Otro grupo de genes presentes en RSO7 tienen que ver con la interacción planta-bacteria. De hecho, tras la inoculación de plantas con PGPR se observa en pocos días una respuesta negativa de la planta (defensa) y luego ya cambia a una respuesta simbiótica y de mejora del crecimiento (Bordiec et al., 2011). El operón *AmsBCDFJKL* participa en la biosíntesis de amilovorano, polisacárido extracelular que funciona como un factor de virulencia y de formación de biofilms (Koczan et al., 2009). Una vez que la bacteria se adhiere y multiplica sobre la raíz, tiene pectinasas (YesR y KdgF) que degradan la pared vegetal (Bhadrecha et al., 2020) y permiten sobrevivir en el hospedador (incluso como endófito) y se defiende de los péptidos antibacterianos producidos por el hospedador como respuesta defensiva, habiéndose encontrado los genes *MsgA*, *PagC* (Pulkkinen y Miller, 1991) y el módulo de virulencia PhoPQ (Tu et al., 2016).

Finalmente, se encontraron genes que aseguran la competencia de la bacteria en la rizosfera, por ejemplo, es capaz de inhibir las señales de comunicación celular *quorum sensing* de otras bacterias mediante la posesión de lactonasa (Zhang et al., 2007). También produce toxinas (de las que se protege mediante el sistema toxina-antitoxina

(Shidore y Triplett, 2017) y es capaz de producir antibióticos como la colicina V y carbepenem (Kenawy et al., 2019).

4.7. Bioseguridad

Desde el punto de vista de la bioseguridad *Pantoea agglomerans* se engloba en el grupo 2. Solo los microorganismos de grupo 1 están autorizados por la legislación europea para ser utilizados como inoculantes (microorganismos GRAS, siglas de Generally Recognized as Safe). La especie *Pantoea agglomerans* ha sido causa de infecciones oportunistas sobre todo en pacientes nosocomiales con patologías previas como fibrosis quística, cáncer, etc. (Cruz et al., 2007). Algunas cepas PGPR endófitos de plantas también han causado infecciones en trabajadores como jardineros al pincharse con plantas (Jain et al., 2012).

Por esta razón se han buscado específicamente en el genoma genes que puedan estar relacionados con patogenicidad. La cepa RSO7 presenta varios determinantes de resistencia a múltiples antibióticos entre los que se encuentran: polimixina B, fosfotricina, cloranfenicol, fumonisina, novobiocina, biciclomicina, nitroimidazol y bacitracina. Junto a estas actividades posee varias beta-lactamasas que rompen el anillo betalactámico. Por otra parte, la presencia de una gran cantidad de bombas de expulsión de sustancias tóxicas también incrementa su resistencia a antibióticos, así como una bomba de eflujo de varios antibióticos hidrófobos que puede expulsar fuera de la célula eritromicina, tetraciclina, ampicilina y norfloxacin. Además, es capaz de sintetizar toxinas (hemolisinas, RNAasa). Posee el operón *YejABEF* de resistencia a péptidos antibacterianos de defensa del hospedador. Finalmente, recordemos que la competencia por el Fe, la producción de sideróforos y la captación (robo) de sideróforos heterólogos son también mecanismos que aseguran la competitividad de esta bacteria. Todos estos factores son considerados factores de virulencia.

Por estas razones no puede ser utilizada como inoculante. Se han diseñado estrategias para aprovechar las características PGPR en extractos libres de células. De este modo, se cultiva la bacteria y se utiliza solo el sobrenadante del cultivo para inocular las plantas. En este sobrenadante van las moléculas y proteínas secretadas por la bacteria las cuales ejercen su efecto sobre la planta sin el riesgo de utilizar un microorganismo de grupo 2 (Luziatelli et al., 2020).

5. Conclusiones

1. *Pantoea agglomerans* RSO7 mejora el crecimiento de plantas de alfalfa. Los efectos beneficiosos se observaron más en situación de limitación de nutrientes y afectaron sobre todo a la raíz (mayor masa, longitud y ramificación), aunque también se observaron efectos positivos en la longitud del tallo, aunque las diferencias no

fueron significativas, aunque sí en el número de trifolios. Además, mejoraron la supervivencia de las plantas y disminuyeron la contaminación por hongos.

2. El genoma de *P. agglomerans* RSO7, con 4,56 Mb, es similar en tamaño y en contenido de G+C a otras cepas de la misma especie. Un análisis global revela que es una bacteria muy versátil, capaz de adaptarse a una gran cantidad de situaciones ambientales y tolerar un gran número de situaciones de estrés (calor, frío, radiación UV, estrés oxidativo, etc.), además de mostrar una amplia versatilidad metabólica.

3. Respecto a la resistencia a metales pesados, se han detectado genes/operones de resistencia a As, Cu, Ni, Co, Zn y Te. La resistencia a sal se ha relacionado con la presencia de genes de producción de osmoprotectores como glicina betaína, prolina, trehalosa, etc. También se han hallado genes de detoxificación de diversos compuestos xenobióticos.

4. Respecto a las propiedades PGPR se han detectado genes de captación y solubilización de fosfatos (fosfatasas extracelulares, acil fosfatasas, mio-inositol fosfatasas) y de producción y/o captación de una gran variedad de sideróforos (varias ferritinas, enterobactina, acromobactina, hemina, etc.). Además, se han encontrado genes que participan en importantes procesos rizosféricos como movilidad, quimiotaxis, diálogo planta-bacteria, *quorum sensing* y competencia en la rizosfera.

5. Finalmente, y dado que la bacteria es del grupo de bioseguridad 2, se han encontrado genes de resistencia a múltiples antibióticos y producción de varias toxinas (sistemas toxina/antitoxina).

6. Con los resultados anteriores se puede concluir el gran potencial de esta bacteria como promotora del crecimiento vegetal. Sin embargo, las restricciones al uso de microorganismos de grupo 2 de bioseguridad como bioinoculantes podrían limitar su utilización, por lo que también se han revisado posibles alternativas bioseguras.

7. Bibliografía

1. Ahmed A, Hasnain S. Auxins as one of the factors of plant growth improvement by plant growth promoting rhizobacteria. *Pol J Microbiol.* 2014; 63(3): 261-266.
2. Akiyama M, Crooke E, Kornberg A. An exopolyphosphatase of *Escherichia coli*. The enzyme and its ppx gene in a polyphosphate operon. *J Biol Chem.* 1993; 268(1): 633-639.
3. Alori ET, Glick BR, Babalola OO. Endophytic phytohormones and their role in plant growth promotion. *Front Microbiol.* 2017; 8: 971.
4. Altaf MM, Khan MSA, Abulresh HH, Ahmad I. *Quorum Sensing* in Plant Growth-Promoting Rhizobacteria and Its Impact on Plant-Microbe Interaction. En: Singh D., Singh

- H., Prabha R, editores. Plant-Microbe Interactions in Agro-Ecological Perspectives. Singapur: Springer; 2017. p. 311-331.
5. Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 1997; 25(17): 3389-3402.
 6. Armstrong SK, Francis CL, McIntosh MA. Molecular analysis of the *Escherichia coli* ferric enterobactin receptor FepA. *J Biol Chem.* 1990; 265(24): 14536-14543.
 7. Aznar A, Dellagi A. New insights into the role of siderophores as triggers of plant immunity: what can we learn from animals?. *J. Exp. Bot.* 2015; 66(11): 3001-3010.
 8. Baeyens W, Mergeay M, Nies DH. Two-component regulatory system involved in transcriptional control of heavy-metal homeostasis in *Alcaligenes eutrophus*. *Mol. Microbiol.* 1997; 23(3): 493-503.
 9. Barnawal D, Bharti N, Maji D, Chanotiya CS, Kalra A. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase-containing rhizobacteria protect *Ocimum sanctum* plants during waterlogging stress via reduced ethylene generation. *Plant Physiol Biochem.* 2012; 58: 227-235.
 10. Bearden SW, Staggs TM, Perry RD. An ABC transporter system of *Yersinia pestis* allows utilization of chelated iron by *Escherichia coli* SAB11. *J Bacteriol.* 1998; 180(5): 1135-1147.
 11. Ben Fekih I, Zhang C, Li YP, Zhao Y, Alwathnani HA, Saquib Q, et al. Distribution of Arsenic Resistance Genes in Prokaryotes. *Front Microbiol.* 2018; 9: 2473.
 12. Benedito VA, Torres Jerez I, Murray JD, Andriankaja A, Allen S, Kakar et al. A gene expression atlas of the model legume *Medicago truncatula*. *Plant J.* 2008; 55(3): 504-513.
 13. Berti AD, Thomas MG. Analysis of achromobactin biosynthesis by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a. *J Bacteriol.* 2009; 191(14):4594-4604.
 14. Bhadreacha P, Bala M, Khasa YP, Arshi A, Singh J, Kumar M. *Hippophae rhamnoides* L. rhizobacteria exhibit diversified cellulase and pectinase activities. *Physiol Mol Biol Plants.* 2020; 26(5): 1075-1085.
 15. Bordiec S, Paquis S, Lacroix H, Dhondt S, Barka EA, Kauffmann S, et al. Comparative analysis of defence responses induced by the endophytic plant growth-promoting rhizobacterium *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN and the non-host bacterium *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* in grapevine cell suspensions. *J Exp Bot.* 2011; 62(2): 595-603.
 16. Cánovas D, Vargas C, Kneip S, Morón MJ, Ventosa A, Bremer E et al. Genes for the synthesis of the osmoprotectant glycine betaine from choline in the moderately halophilic bacterium *Halomonas elongata* DSM 3043, USA. *Microbiology.* 2000; 146 (Pt 2): 455-463.
 17. Carroll JD, Pastuszak I, Edavana VK, Pan YT, Elbein AD. A novel trehalase from *Mycobacterium smegmatis* - purification, properties, requirements. *FEBS J.* 2007; 274(7): 1701-1714.

18. Castillo JM, Ayes DR, Leira-Doce P, Bailey J, Blum M, Strong DR et al. The production of hybrids with high ecological amplitude between exotic *Spartina densiflora* and native *S. maritima* in the Iberian Peninsula: New *Spartina* hybrid in Iberian Peninsula. *Divers Distrib.* 2010; 16(4): 547-558.
19. Chasteen TG, Bentley R. Biomethylation of selenium and tellurium: microorganisms and plants. *Chem Rev.* 2003; 103(1): 1-25.
20. Checroun C, Gutierrez C. Sigma(s)-dependent regulation of yehZYXW, which encodes a putative osmoprotectant ABC transporter of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett.* 2004; 236(2): 221-226.
21. Chekabab SM, Harel J, Dozois CM. Interplay between genetic regulation of phosphate homeostasis and bacterial virulence. *Virulence.* 2014; 5(8): 786-793.
22. Chet I, Ordentlich A, Shapira R, Oppenheim A. Mechanisms of biocontrol of soil-borne plant pathogens by Rhizobacteria. *Plant soil.* 1990; 129: 85-92.
23. Cruz AT, Cazacu AC, Allen CH. *Pantoea agglomerans*, a plant pathogen causing human disease. *J Clin Microbiol.* 2007; 45(6): 1989-1992.
24. du Jardin P. Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. *Sci Hortic.* 2015; 196: 3-14.
25. Ehrhardt DW, Atkinson EM, Long SR. Depolarization of alfalfa root hair membrane potential by *Rhizobium meliloti* Nod factors. *Science* 1992; 256(5059): 998-1000.
26. Ewing B, Green P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Res.* 1998; 8(3): 186-194.
27. Ewing B, Hillier L, Wendl MC, Green P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res.* 1998; 8(3): 175-85.
28. Feng H, Zhang N, Du W, Zhang H, Liu Y, Fu R et al. Identification of Chemotaxis Compounds in Root Exudates and Their Sensing Chemoreceptors in Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9. *Mol Plant Microbe Interact.* 2018; 31(10): 995-1005.
29. Ferreira CMH, Soares HMVM, Soares EV. Promising bacterial genera for agricultural practices: An insight on plant growth-promoting properties and microbial safety aspects. *Sci Total Environ.* 2019; 682: 779-799.
30. Forst S, Delgado J, Inouye M. Phosphorylation of OmpR by the osmosensor EnvZ modulates expression of the ompF and ompC genes in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989; 86(16): 6052-6056.
31. Frossard SM, Khan AA, Warrick EC, Gately JM, Hanson AD, Oldham ML et al. Identification of a third osmoprotectant transport system, the osmU system, in *Salmonella enterica*. *J Bacteriol.* 2012; 194(15): 3861-3871.
32. Goswami D, Thakker CN, Dhandhukia PC. Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. *Cogent Food Agric.* 2016; 2(1).

33. Gouesbet G, Trautwetter A, Bonnassie S, Wu LF, Blanco C. Characterization of the *Erwinia chrysanthemi* osmoprotectant transporter gene *ousA*. J Bacteriol. 1996; 178(2): 447-455.
34. Grass G, Fan B, Rosen BP, Franke S, Nies DH, Rensing C. ZitB (YbgR), a member of the cation diffusion facilitator family, is an additional zinc transporter in *Escherichia coli*. J Bacteriol. 2001; 183(15): 4664-4667.
35. Grass G, Rensing C. CueO is a multi-copper oxidase that confers copper tolerance in *Escherichia coli*. Biochem Biophys Res Commun. 2001; 286(5): 902-908.
36. Gray EJ, Smith DL. Intracellular and extracellular PGPR: Commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. Soil Biol. Biochem. 2005; 37(3): 395-412.
37. Horlacher R, Uhland K, Klein W, Ehrmann M, Boos W. Characterization of a cytoplasmic trehalase of *Escherichia coli*. J Bacteriol. 1996; 178(21): 6250-6257.
38. Hornung JM, Jones HA, Perry RD. The *hmu* locus of *Yersinia pestis* is essential for utilization of free haemin and haem-protein complexes as iron sources. Mol Microbiol. 1996; 20(4): 725-739.
39. Horsman GP, Zechel DL. Phosphonate Biochemistry. Chem Rev. 2017; 117(8): 5704-5783.
40. Idriss EE, Makarewicz O, Farouk A, Rosner K, Greiner R, Bochow H et al. Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 contributes to its plant-growth-promoting effect. Microbiology. 2002; 148(Pt 7): 2097-2109.
41. Jain S, Bohra I, Mahajan R, Jain S, Chugh TD. *Pantoea agglomerans* infection behaving like a tumor after plant thorn injury: an unusual presentation. Indian J Pathol Microbiol. 2012; 55(3): 386-388.
42. Kaasen I, McDougall J, Strøm AR. Analysis of the *otsBA* operon for osmoregulatory trehalose synthesis in *Escherichia coli* and homology of the OtsA and OtsB proteins to the yeast trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase complex. Gene. 1994; 145(1): 9-15.
43. Kajander T, Kellosalo J, Goldman A. Inorganic pyrophosphatases: one substrate, three mechanisms. FEBS Lett. 2013; 587(13): 1863-1869.
44. Kang SM, Waqas M, Khan AL, Lee IJ. Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria: Potential Candidates for Gibberellins Production and Crop Growth Promotion. En: Miransari M, editor. Use of Microbes for the Alleviation of Soil Stresses, Volume 1. 1^a ed. Nueva York: Springer; 2014. p.1-19.
45. Kenawy A, Dailin DJ, Abo-Zaid G, Malek RA, Ambehatabi KK, Zakaria KHN, et al. Biosynthesis of Antibiotics by PGPR and Their Roles in Biocontrol of Plant Diseases. En: R. Z. Sayyed, editor. Plant Growth Promoting Rhizobacteria for Sustainable Stress Management. Volumen 13. Singapur: Springer; 2019. p. 1-35.
46. Kobayashi DY, Reedy RM, Bick JA, Oudemans PV. Characterization of a chitinase gene from *Stenotrophomonas maltophilia* strain 34S1 and its involvement in biological control. Appl Environ Microbiol. 2002; 68(3): 1047-1054.

47. Koczan JM, McGrath MJ, Zhao Y, Sundin GW. Contribution of *Erwinia amylovora* exopolysaccharides amylovoran and levan to biofilm formation: implications in pathogenicity. *Phytopathology*. 2009; 99(11): 1237-1244.
48. Kurtz S, Phillippy A, Delcher AL, Smoot M, Shumway M, Antonescu C et al. Versatile and open software for comparing large genomes. *Genome Biol*. 2004; 5(2): R12.
49. Lau CK, Krewulak KD, Vogel HJ. Bacterial ferrous iron transport: the Feo system. *FEMS Microbiol Rev*. 2016; 40(2): 273-298.
50. Leonhartsberger S, Huber A, Lottspeich F, Böck A. The *hydH/G* Genes from *Escherichia coli* code for a zinc and lead responsive two-component regulatory system. *J Mol Biol*. 2001; 307(1): 93-105.
51. Létoffé S, Heuck G, Delepelaire P, Lange N, Wandersman C. Bacteria capture iron from heme by keeping tetrapyrrol skeleton intact. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; 106(28): 11719-11724.
52. Liu F, Xing S, Ma H, Du Z, Ma B. Cytokinin-producing, plant growth-promoting rhizobacteria that confer resistance to drought stress in *Platykladus orientalis* container seedlings. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2013; 97(20): 9155-9164.
53. Luziatelli F, Ficca AG, Bonini P, Muleo R, Gatti L, Meneghini M et al. A Genetic and Metabolomic Perspective on the Production of Indole-3-Acetic Acid by *Pantoea agglomerans* and Use of Their Metabolites as Biostimulants in Plant Nurseries. *Frontiers in Microbiology*, 2020, Manuscript ID: 547862. (En prensa).
54. Magrane M, UniProt Consortium. UniProt Knowledgebase: a hub of integrated protein data. *Database (Oxford)*. 2011; 2011: bar009.
55. Maphosa I, Jideani VA. The Role of Legumes in Human Nutrition. En: Hueda Chavarri M, editor. *Functional Food - Improve Health through Adequate Food*. 1^a ed. Rijeka: InTech; 2017. p. 103-122.
56. Maruta K, Hattori K, Nakada T, Kubota M, Sugimoto T, Kurimoto M. Cloning and sequencing of trehalose biosynthesis genes from *Arthrobacter* sp. Q36. *Biochim Biophys Acta*. 1996; 1289(1): 10-13.
57. Matsuhisa A, Suzuki N, Noda T, Shiba K. Inositol monophosphatase activity from the *Escherichia coli* *suhB* gene product. *J Bacteriol*. 1995; 177(1): 200-205.
58. Mayak S, Tirosh T, Glick BR. Plant growth-promoting bacteria that confer resistance to water stress in tomatoes and peppers. *Plant Sci*. 2004; 166(2): 525-530.
59. Mermod M, Magnani D, Solioz M, Stoyanov JV. The copper-inducible ComR (YcfQ) repressor regulates expression of ComC (YcfR), which affects copper permeability of the outer membrane of *Escherichia coli*. *Biometals*. 2012; 25(1): 33-43.
60. Metcalf WW, Wolfe RS. Molecular genetic analysis of phosphite and hypophosphite oxidation by *Pseudomonas stutzeri* WM88. *J Bacteriol*. 1998; 180(21): 5547-5558.
61. Miethke M, Klotz O, Linne U, May JJ, Beckering CL, Marahiel MA. Ferri-bacillibactin uptake and hydrolysis in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*. 2006; 61(6): 1413-1427.

62. Moraleda-Muñoz A, Pérez J, Extremera AL, Muñoz-Dorado J. Differential regulation of six heavy metal efflux systems in the response of *Myxococcus xanthus* to copper. *Appl Environ Microbiol.* 2010; 76(18): 6069-6076.
63. Morgan R, Kohn S, Hwang SH, Hassett DJ, Sauer K. BdlA, a chemotaxis regulator essential for biofilm dispersion in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* 2006; 188(21): 7335-7343.
64. Nakamura S, Minamino T. Flagella-Driven Motility of Bacteria. *Biomolecules.* 2019; 9(7): 279.
65. National Center for Biotechnology Information. The Nucleotide database [en línea]. [Consultado en Mayo 2020]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>
66. Ngatia L, Johnny MG, Moriasi D, Taylor R. Nitrogen and Phosphorus Eutrophication in Marine Ecosystems. En: Homa Bacharri F, editor. *Monitoring of Marine Pollution.* InTechOpen; 2019.
67. Nicolaou SA, Fast AG, Nakamaru-Ogiso E, Papoutsakis ET. Overexpression of fetA (*ybbL*) and fetB (*ybbM*), Encoding an Iron Exporter, Enhances Resistance to Oxidative Stress in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* 2013; 79(23): 7210-7219.
68. Nies DH. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev.* 2003; 27(2-3): 313-339.
69. Nordin, N., Guskov, A., Phua, T., Sahaf, N., Xia, Y., Lu, S et al. Exploring the structure and function of *Thermotoga maritima* CorA reveals the mechanism of gating and ion selectivity in Co²⁺/Mg²⁺ transport. *Biochem. J.* 2013; 451 (3), 365-374.
70. Otto BR, Verweij-van Vught AM, MacLaren DM. Transferrins and heme-compounds as iron sources for pathogenic bacteria. *Crit Rev Microbiol.* 1992; 18(3): 217-233.
71. Paredes Páliz KI, Caviedes MA, Doukkali B, Mateos Naranjo E, Rodríguez Llorente ID, Pajuelo E. Screening beneficial rhizobacteria from *Spartina maritima* for phytoremediation of metal polluted salt marshes: comparison of gram-positive and gram-negative strains. *Environ Sci Pollut R.* 2016; 23(19): 19825-19837.
72. Pulkkinen WS, Miller SI. A *Salmonella typhimurium* virulence protein is similar to a *Yersinia enterocolitica* invasion protein and a bacteriophage lambda outer membrane protein. *J Bacteriol.* 1991; 173(1): 86-93.
73. Reitz ZL, Sandy M, Butler A. Biosynthetic considerations of triscatechol siderophores framed on serine and threonine macrolactone scaffolds. *Metallomics.* 2017; 9(7): 824-839.
74. Rensing C, Fan B, Sharma R, Mitra B, Rosen BP. CopA: An *Escherichia coli* Cu(I)-translocating P-type ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 97(2): 652-656.
75. RNAcentral Consortium, Petrov AI, Kay SMJ, Gibson R, Kulesha E, Staines D, et al. RNAcentral: an international database of ncRNA sequences. *Nucleic Acids Res.* 2015; 43 (Database issue): D123-D129.
76. Rodrigue A, Effantin G, Mandrand-Berthelot MA. Identification of rcnA (*yohM*), a nickel and cobalt resistance gene in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 2005; 187(8): 2912-2916.

77. Sauer M, Hantke K, Braun V. Ferric-coprogen receptor FhuE of *Escherichia coli*: processing and sequence common to all TonB-dependent outer membrane receptor proteins. *J Bacteriol.* 1987; 169(5): 2044-2049.
78. Scholz A, Stahl J, de Berardinis V, Müller V, Averhoff B. Osmotic stress response in *Acinetobacter baylyi*: identification of a glycine-betaine biosynthesis pathway and regulation of osmoadaptive choline uptake and glycine-betaine synthesis through a choline-responsive BetI repressor. *Environ Microbiol Rep.* 2016; 8(2): 316-322.
79. Schwibbert K, Marin-Sanguino A, Bagyan I, Heidrich G, Lentzen G, Seitz H et al. A blueprint of ectoine metabolism from the genome of the industrial producer *Halomonas elongata* DSM 2581 T. *Environ Microbiol.* 2011; 13(8): 1973-1994.
80. Shepherd M, Dailey TA, Dailey HA. A new class of [2Fe-2S]-cluster-containing protoporphyrin (IX) ferrochelatases. *Biochem J.* 2006; 397(1): 47-52.
81. Shiba T, Tsutsumi K, Ishige K, Noguchi T. Inorganic polyphosphate and polyphosphate kinase: their novel biological functions and applications. *Biochemistry (Mosc).* 2000; 65(3): 315-323.
82. Shidore T, Triplett LR. Toxin-Antitoxin Systems: Implications for Plant Disease. *Annu Rev Phytopathol.* 2017; 55: 161-179.
83. SIB Swiss Institute of Bioinformatics. Enzyme nomenclature database [en línea]. [Consultado en Mayo 2020]. Disponible en: <https://enzyme.expasy.org/>
84. Singh RP, Jha PN. The PGPR *Stenotrophomonas maltophilia* SBP-9 Augments Resistance against Biotic and Abiotic Stress in Wheat Plants. *Front. Microbiol.* 2017; 8: 1945.
85. Stasi R, Neves HI, Spira B. Phosphate uptake by the phosphonate transport system PhnCDE. *BMC Microbiol.* 2019; 19(1): 79.
86. Stauff DL, Torres VJ, Skaar EP. Signaling and DNA-binding activities of the *Staphylococcus aureus* HssR-HssS two-component system required for heme sensing. *J Biol Chem.* 2007; 282(36): 26111-26121.
87. Stirling DA, Hulton CS, Waddell L, Park SF, Stewart GS, Booth I, et al. Molecular characterization of the proU loci of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* encoding osmoregulated glycine betaine transport systems. *Mol Microbiol.* 1989; 3(8): 1025-1038.
88. Stoyanov JV, Hobman JL, Brown NL. CueR (YbbI) of *Escherichia coli* is a MerR family regulator controlling expression of the copper exporter CopA. *Mol Microbiol.* 2001; 39(2): 502-511.
89. Suhadolnik MLS, Salgado APC, Scholte LLS, Bleicher L, Costa PS, Reis MP et al. Novel arsenic-transforming bacteria and the diversity of their arsenic-related genes and enzymes arising from arsenic-polluted freshwater sediment. *Sci Rep.* 2017; 7(1): 11231.
90. The Gene Ontology Consortium. The Gene Ontology Resource [en línea]. [Consultado en Mayo 2020]. Disponible en: <http://geneontology.org/>
91. The RNAcentral Consortium. RNAcentral: The non-coding RNA sequence database [en línea]. [Consultado en Mayo 2020]. Disponible en: <https://macentral.org/>

92. The UniProt Consortium. The UniProt Knowledgebase (UniProtKB) [en línea]. [Consultado en Mayo 2020]. Disponible en: <https://www.uniprot.org/uniprot/>
93. Tommassen J, de Geus P, Lugtenberg B, Hackett J, Reeves P. Regulation of the *pho* regulon of *Escherichia coli* K-12. Cloning of the regulatory genes *phoB* and *phoR* and identification of their gene products. *J Mol Biol.* 1982; 157(2): 265-274.
94. Troxell B, Hassam HM. Transcriptional regulation by Ferric Uptake Regulator (Fur) in pathogenic bacteria. *Front Cell Infect Microbiol.* 2013; 3: 59.
95. Tu J, Huang B, Zhang Y, Xue T, Li S, Qi K. Modulation of virulence genes by the two-component system PhoP-PhoQ in avian pathogenic *Escherichia coli*. *Pol J Vet Sci.* 2016; 19(1): 31-40.
96. Weijers D, Nemhauser J, Yang Z. Auxin: small molecule, big impact. *J Exp Bot.* 2018; 69(2): 133–136.
97. Willsky GR, Malamy MH. Characterization of two genetically separable inorganic phosphate transport systems in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 1980; 144(1): 356-365.
98. World Economic Forum. The Global Risk Report 2020. 2020 [en línea]. [Consultado en Mayo 2020]. Disponible en: http://www3.weforum.org/docs/WEF_Global_Risk_Report_2020.pdf
99. Worlock AJ, Smith RL. ZntB is a novel Zn²⁺ transporter in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *J Bacteriol.* 2002; 184(16): 4369-4373.
100. Wyckoff EE, Mey AR, Leimbach A, Fisher CF, Payne SM. Characterization of ferric and ferrous iron transport systems in *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol.* 2006; 188(18): 6515-6523.
101. Yao H, Jepkorir G, Lovell S, Nama PV, Weeratunga S, Bataile KP et al. Two distinct ferritin-like molecules in *Pseudomonas aeruginosa*: the product of the *bfrA* gene is a bacterial ferritin (FtnA) and not a bacterioferritin (Bfr). *Biochemistry.* 2011; 50(23): 5236-5248.
102. Zerbino DR, Birney E. Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Res.* 2008; 18(5): 821-829.
103. Zhang HB, Wang LH, Zhang LH. Detection and analysis of quorum-quenching enzymes against acyl homoserine lactone *quorum-sensing* signals. *Curr Protoc Microbiol.* 2007; 1C. 3.1-1C. 3.15.
104. Zhang N, Yang D, Wang D, Miao Y, Shao J, Zhou X, et al. Whole transcriptomic analysis of the plant-beneficial rhizobacterium *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 during enhanced biofilm formation regulated by maize root exudates. *BMC Genomics.* 2015; 16(1): 685.