

Universidad de Salamanca  
Departamento de Microbiología y Genética  
Instituto Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias (CIALE)



**Tesis doctoral con Mención Internacional**

*Análisis del metabolismo, las funciones, la ecología y la taxonomía del género Pseudomonas*

-

*Analysis of metabolism, functions, ecology and taxonomy in Pseudomonas*

Tesis doctoral presentada por **Zaki Saati Santamaría** para optar al grado de Doctor con Mención Internacional por la Universidad de Salamanca

Zaki Saati Santamaría

Salamanca, 2021



Dr. Raúl Rivas González, Catedrático del Área de Microbiología del Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca y Dra. Paula García Fraile, Profesora Titular del Área de Microbiología del Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca

**AUTORIZAN**

La presentación y defensa de la Tesis Doctoral con Mención Internacional titulada "Análisis del metabolismo, las funciones, la ecología y la taxonomía del género *Pseudomonas*"

Y para que así conste, extendemos la presente autorización en Salamanca, a 26 de abril de 2021.



Fdo: Raúl Rivas González



Fdo: Paula García Fraile



*La capacidad para investigar el mundo que nos rodea es una de las pocas libertades que, en sí misma, te proporciona más libertad*



# *Índice*





# Índice

<b>Resumen</b> .....	- 1 -
<b>Abstract</b> .....	- 13 -
<b>Introducción general</b> .....	- 25 -
<b>Objetivos</b> .....	- 37 -
<b>Materiales y Métodos</b> .....	- 41 -
<b>Capítulo I:</b> Estudio del metabolismo secundario del género <i>Pseudomonas</i> utilizando la minería genómica.....	- 65 -
Introducción.....	- 67 -
Resultados y discusión .....	- 79 -
<b>Capítulo II:</b> Descripción de nuevas especies bacterianas y producción de compuestos antimicrobianos por bacterias del género <i>Pseudomonas</i> aisladas de escarabajos de la madera.....	- 97 -
Introducción.....	- 99 -
Resultados y discusión .....	- 111 -
<b>Capítulo III:</b> Descifrando las interacciones beneficiosas <i>Pseudomonas</i> -planta .....	- 141 -
Introducción.....	- 143 -
Resultados y discusión .....	- 149 -
<b>Capítulo IV:</b> Genómica comparativa del género <i>Pseudomonas</i> para el estudio de asociaciones funcionales a nichos u hospedadores.....	- 175 -
Introducción.....	- 177 -
Resultados y discusión .....	- 183 -
<b>Capítulo V:</b> Organización filogenética y taxonómica del género <i>Pseudomonas</i> basada en herramientas genómicas. ....	- 205 -
Introducción.....	- 207 -
Resultados y discusión .....	- 213 -
<b>Conclusiones</b> .....	- 235 -
<b>Conclusions</b> .....	- 239 -
<b>Referencias</b> .....	- 243 -
<b>Anexos</b> .....	- 279 -



## *Resumen*

Los microorganismos habitan los distintos ecosistemas de la naturaleza, incluyendo plantas y animales. Para ello, deben haber evolucionado y haberse adaptado a cada una de las condiciones ambientales del lugar en el que viven. Los microorganismos juegan un papel muy importante en cada nicho, influyendo en los ciclos biogeoquímicos y, en el caso de hospedadores pluricelulares, participando en su nutrición y defensa, entre otros roles. Por lo tanto, el estudio de la ecología y funciones de los microorganismos puede ayudar a explicar la vasta complejidad de la naturaleza. Además, este conocimiento puede ser de ayuda para el desarrollo y aplicación en industria, biotecnología y clínica de nuevos procesos microbianos.

Las *Pseudomonas* constituyen uno de los géneros procariotas más diversos y adaptables. Su versatilidad metabólica les permite sobrevivir en ambientes muy distintos. Se han identificado *Pseudomonas* en seres humanos, plantas, suelos, ríos, profundidades marinas, ambientes psicrófilos, insectos y en muchos otros nichos u hospedadores. Esta diversidad de ambientes en los que las bacterias del género *Pseudomonas* evolucionan ha dado lugar a una amplia diversificación de sus miembros, de manera que se erigen como uno de los géneros bacterianos más diversos. Esta alta diversidad, junto con su versatilidad y su facilidad de ser cultivadas en condiciones de laboratorio, da lugar a un descubrimiento constante de nuevas especies bacterianas pertenecientes a este género.

En esta tesis se han llevado a cabo distintas aproximaciones para descifrar nuevas funciones y aspectos ecológicos del género *Pseudomonas*.

### **Capítulo I**

La resistencia a antimicrobianos supone un problema a nivel mundial, el cual amenaza la efectividad de los tratamientos antimicrobianos y representa uno de los principales problemas de Salud Pública. Es por ello que la búsqueda de nuevos antimicrobianos constituye uno de los principales retos a los que la humanidad debe buscar soluciones.

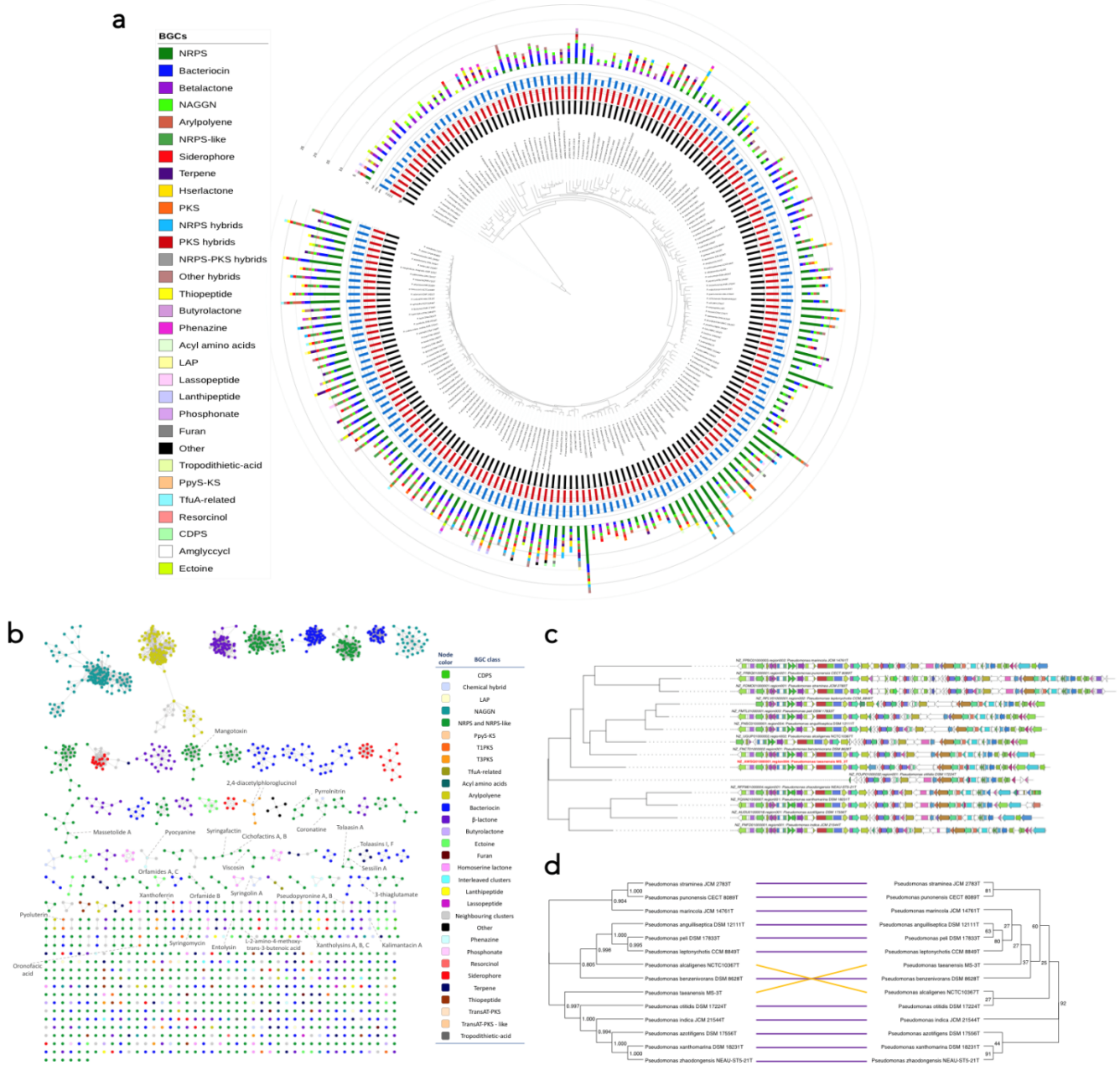
Los microorganismos, incluyendo las *Pseudomonas*, albergan una gran diversidad de conjuntos de genes biosintéticos (BGCs) que codifican la producción de una inconmensurable variedad de metabolitos secundarios con diversas actividades biológicas, como antimicrobianas, antitumorales, antivíricas... Para el desarrollo de nuevos fármacos es esencial estudiar, tanto cepas microbianas, como maquinaria genética relacionada con la producción de compuestos bioactivos, no investigados en profundidad. A pesar de que la tarea de aislar y caracterizar nuevos productos naturales es compleja, las estrategias genómicas microbianas pueden ser de utilidad para facilitar nuevas investigaciones en este área. Sin embargo, a pesar de que está aumentando la investigación genómica del metabolismo secundario, no se han llevado a cabo estudios centrados en el género *Pseudomonas* al completo.

Teniendo todo esto en cuenta, los objetivos de esta sección fueron: (I) descifrar la maquinaria genética subyacente al metabolismo secundario en *Pseudomonas*, (II) estudiar los procesos evolutivos que dan lugar a la evolución de su genes codificantes y (III) identificar cepas de *Pseudomonas* prometedoras para su investigación en búsqueda de nuevos productos naturales.

Para ello se ha llevado a cabo un proceso de genómica comparativa sobre 194 cepas tipo de distintas especies de *Pseudomonas*, prestando especial atención a la evolución y distribución de las distintas clases de BGCs y de las regiones codificantes de péptidos antimicrobianos. Este capítulo también relata el uso de EvoMining para el estudio de expansiones proteicas de enzimas derivadas de lípidos, las cuales pueden haber evolucionado hacia la biosíntesis de nuevos metabolitos secundarios en *Pseudomonas*.

Los análisis muestran que los tipos de BGCs predominantes en las cepas tipo de *Pseudomonas* son sintasas de péptidos no ribosomales (NRPSs), bacteriocinas, N-acetilglutaminilglutaminamidas y  $\beta$ -lactonas (Figura I). También muestran que la evolución de los genes relacionados con la síntesis de metabolitos secundarios está emparejada con la diversificación de especies en *Pseudomonas* (Figura I). Curiosamente, sólo hay unas pocas especies de *Pseudomonas* que codifiquen policétido sintasas (PKSs), las cuales son enzimas multi-modulares derivadas del metabolismo lipídico ampliamente distribuidas entre las bacterias. Debido a esto, se buscaron y encontraron, a través de métodos evolutivos, posibles nuevos tipos de BGCs en los que participen enzimas relacionadas con el metabolismo lipídico.

Los resultados de este capítulo revelan la existencia de una vasta diversidad de metabolitos codificados por *Pseudomonas* que permanecen aún sin caracterizar, y cuyos genes biosintéticos han evolucionado en una manera especie-dependiente. Estos datos también aportan una nueva percepción del metabolismo secundario de *Pseudomonas* y servirán de base para la priorización de cepas en el descubrimiento de nuevos metabolitos de interés.



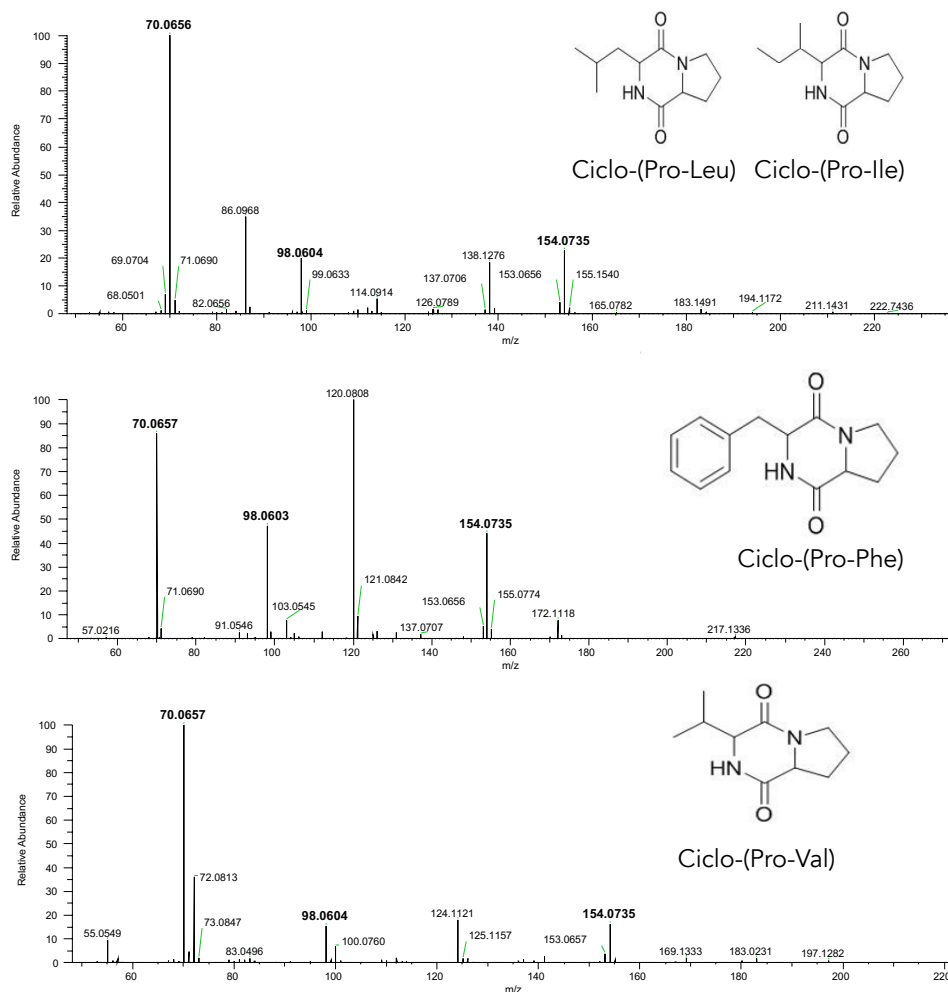
**Figura 1. a.** Árbol filogenético de las cepas tipo de *Pseudomonas* basado en 92 genes *housekeeping* concatenados. Los metadatos se han añadido con el programa Interactive Tree of Life (iTOL). La circunferencia negra interior representa la completitud del genoma (%); la circunferencia roja representa el contenido en G+C (%); la circunferencia azul representa la longitud del genoma; la circunferencia exterior representa los tipos de BGCs según las predicciones de antiSMASH. Bar, 0.1 sustituciones por posición **b** SSN generada por BiG-SCAPE y anotada en Cytoscape representando las relaciones entre los distintos BGCs de este estudio. Aparecen señalados los BGCs públicos ya descritos que codifican compuestos ya conocidos. **c** Ejemplo de un árbol filogenético de un GCF de arilpolienos de *Pseudomonas*. Cada diagrama representa un BGC distinto con sus genes. El BGC rojo denota el BGC representativo de la GCF. **d.** Tanglegrama de la GCF (Izquierda; obtenido con el flujo de trabajo BiG-SCAPE/CORASON) y la filogenia de las cepas tipo con representantes en la GCF (derecha; obtenido con la herramienta UBGC). Los valores de *bootstrap* del árbol filogenético representan el número de árboles filogenéticos de UBGC que apoyan cada diferenciación evolutiva.

## Capítulo II

Los escarabajos de la corteza son pequeños insectos que viven en el floema de sus árboles hospedadores, cuya expansión está representando una plaga a nivel mundial. Estos animales establecen simbiosis con microorganismos que les proveen de nutrientes. Además, algunas bacterias asociadas a ellos juegan un papel en la protección del escarabajo mediante la producción de sustancias que inhiben a microorganismos antagonistas.

En este capítulo se analiza la capacidad de varias cepas bacterianas aisladas de los escarabajos de la corteza *Ips cembrae*, *Ips acuminatus*, *Xylocleptes bispinus* y *Pityogenes bidentatus* de producir compuestos antimicrobianos. Varios aislados, principalmente identificados como *Pseudomonas* spp., fueron capaces de inhibir a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, así como a hongos. El análisis de los genomas de tres de estos aislados pertenecientes al género *Pseudomonas* predice la presencia de diversos BGCs implicados en la producción de metabolitos secundarios. La baja similitud de estos BGCs predichos con otros ya descritos sugiere la probabilidad de que codifiquen nuevas moléculas que podrían ser de utilidad para el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos.

Este capítulo también describe la búsqueda de las moléculas bioactivas responsables de la actividad antimicrobiana de una de estas cepas, *Pseudomonas* sp. IS6. Se utilizaron distintos solventes orgánicos para tratar de aislar e identificar estas moléculas en el sobrenadante de cultivo. En esta búsqueda se encontraron varios ciclodipéptidos que estaban presentes en los extractos bioactivos, siendo ciclo-(Pro-Leu), ciclo-(Pro-Ile), ciclo-(Pro-Phe) y ciclo-(Pro-Val) aquellos que aparecían en mayor concentración (Figura II). Estas moléculas podrían estar producidas por una ciclodipéptido sintasa (CDPS) codificada en el genoma de *Pseudomonas* sp. IS6.



**Figura II.** Espectros de masas en tándem para cada una de las masas de interés encontradas en el UHPLC. Cada masa mostrada representa una fracción de la masa original. A la derecha se muestra el CDP identificado para cada caso

Finalmente, la identificación de varias cepas aisladas de estos escarabajos de la corteza mostró que podrían representar nuevas especies de los géneros *Pseudomonas* y *Arthrobacter*. Basándonos en datos genotípicos, fenotípicos, quimiotaxonómicos y genómicos, en este capítulo se propone la descripción de *Pseudomonas bohémica* sp. nov. (cepa tipo IA19<sup>T</sup> = CECT 9403<sup>T</sup> = LMG 30182<sup>T</sup>), *Pseudomonas fuscus* sp. nov. (cepa tipo IS6<sup>T</sup>) y *Arthrobacter ipsi* sp. nov. (cepa tipo IA7<sup>T</sup> = CECT 30100<sup>T</sup> = LMG 31782<sup>T</sup>).

### Capítulo III

Ciertos microorganismos pueden utilizarse como una alternativa a los fertilizantes químicos respetuosa con el medio ambiente. Algunos de ellos promueven la adquisición de nutrientes de la planta y, por ello, pueden ser aplicados como biofertilizantes. Otros son capaces de defender

a las plantas del ataque de microorganismos fitopatógenos y pueden ser aplicados también como agentes de biocontrol (BCA); esta defensa puede ser llevada a cabo tanto por un antagonismo directo de los fitopatógenos, como por un proceso de *priming* -activación de la resistencia sistémica inducida (RSI) de la planta-. Sin embargo, a parte de las simbiosis mutualistas planta-microorganismo bien estudiadas, como el caso de las interacciones entre rizobios-leguminosas o el de las micorrizas, poco se conoce sobre el diálogo entre las plantas y otras muchas bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGP), como por ejemplo, muchas *Pseudomonas*.

En trabajos previos del grupo de investigación se aisló la cepa *Pseudomonas brassicacearum* CDVBN10 como un endófito de raíces de *Brassica napus*, el cual mostró gran capacidad PGP en condiciones *in vitro* y de invernadero. Además, la cepa mostró mejoras significativas en el número de vainas, en el peso seco de estas y de la parte aérea de la planta tras ser ensayada en condiciones de campo.

Por otro lado, el fitopatógeno *Leptosphaeria maculans* (anamorfo: *Phoma lingam*) es un hongo que causa la enfermedad del pie negro en cultivos de *Brassica napus*, la cual implica importantes pérdidas mundiales en los cultivos de colza.

En este capítulo se han llevado a cabo diversas aproximaciones para tratar de descifrar cuáles son los mecanismos de *P. brassicacearum* CDVBN10 responsables de la promoción del crecimiento de la colza.

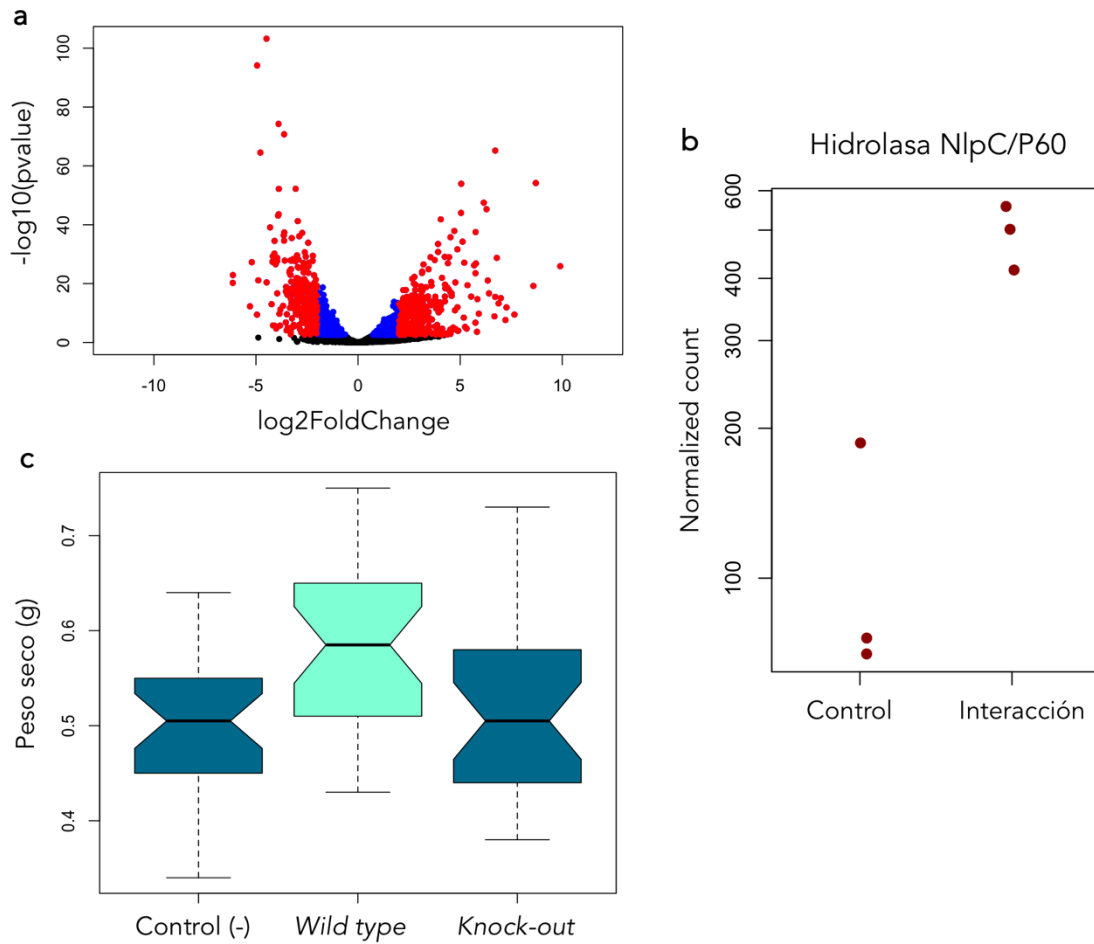
Primero, se ha visto cómo *P. brassicacearum* CDVBN10 es capaz de antagonizar al hongo *L. maculans* y de inducir resistencia sistémica inducida (RSI) en la planta, protegiendo así a los cultivos de colza frente a este hongo que supone una gran amenaza agro-económica. De la misma manera, se ha estudiado el genoma de la cepa CDVBN10 para buscar maquinaria genética que pudiera estar implicada en la actividad antifúngica de la bacteria, encontrando varios BCGs que podrían estar relacionados con la producción de moléculas antimicrobianas. Además, se ha llevado a cabo un proceso de genómica comparativa sobre el complejo de *P. brassicacearum* a partir de los genomas de 21 cepas de esta especie, el cual pone de relieve las grandes características de biocontrol de la especie, así como las diferencias geno- y fenotípicas existentes entre ellas.

Por otro lado, se ha llevado a cabo un análisis de RNA-Seq de *P. brassicacearum* CDVBN10 durante la colonización de las raíces de colza. Este experimento reveló más de 2000 genes sobre o infra expresados de forma estadísticamente significativa en la interacción con la planta. Los datos transcripcionales revelan que la cepa *P. brassicacearum* CDVBN10 tiene muy expresadas las rutas principales de la respiración oxigénica y del metabolismo energético, de los sistemas VI de secreción, de producción de lipopolisacáridos (LPS), que la ACC (1-aminociclopropano-1-carboxilo) desaminasa estaría produciéndose, aunque a bajos niveles, y que la bacteria tiene muy activa la síntesis de ácido salicílico (SA) a partir del crosimato. Además, los datos muestran que la bacterias en las raíces casi no sintetizan flagelos, lo cual confirma que se establecen mediante estructura de *biofilm*, lo que concuerda con un estado estático de adherencia a la superficie de la raíz, tal y



como se ha observado a la bacteria por microscopía electrónica en el momento de la toma de muestra para la transcriptómica. Por otro lado, hay varios genes responsables de la resistencia al estrés oxidativo mediado por peróxido de hidrógeno sobreexpresados, así como proteínas de resistencia antibióticos, lo cual puede conferir una ventaja a la bacteria a la hora de adaptarse a las defensas de la planta. También se ha visto que *P. brassicacearum* CDVBN10 tiene sobreexpresadas en este momento de la interacción planta-bacteria algunas rutas de síntesis de metabolitos secundarios, como pioverdinas, RiPPs (*Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides*) y un lantipéptido, entre otros. Además, los datos muestran que la bacteria podría favorecer la solubilización de distintas formas de fosfato mediante la activación de la síntesis de moléculas con esta acción. En cuanto a mecanismos presentes en la bacteria con muy baja expresión, destacan las rutas de desnitrificación, la síntesis de HCN a través del operón *hcnABC*, la síntesis de polihidroxicanoatos (PHAs), transportadores de potasio y enzimas implicadas en el *quorum quenching*, entre otras.

Dentro de los genes sobreexpresados, hay uno que codifica para una enzima cisteíneptidasa perteneciente a la familia NlpC/P60, un tipo de enzimas con diversas actividades (peptidasas, amidasas, transglutaminasas y acetyltransferasas), que estaría localizada en la membrana externa o que podría ser excretada. Se ha visto que la actividad de esta enzima produce una activación del sistema inmune en seres humanos y en *C. elegans* frente a *Enterococcus faecalis* y *Salmonella* sp., respectivamente. Sin embargo, no existe ningún trabajo que relacione la actividad de esta enzima con las interacciones bacteria-planta. Debido a esto, se ha realizado un mutante *knock-out* (KO) sobre este gen mediante CRISPR-Cas9 en la cepa *P. brassicacearum* CDVBN10 y se ha estudiado su efecto en la promoción del crecimiento del cultivo de colza. Los resultados no muestran diferencias significativas ( $p_{adj} < 0,05$ ) entre el peso seco de las plantas no inoculadas con la bacteria y las plantas inoculadas con el mutante, a la vez que muestran diferencias significativas con la cepa *Wild Type* (WT) (Figura III). Además, mediante microscopía confocal se ha observado que la cepa KO no pierde su capacidad de colonizar las raíces de colza.



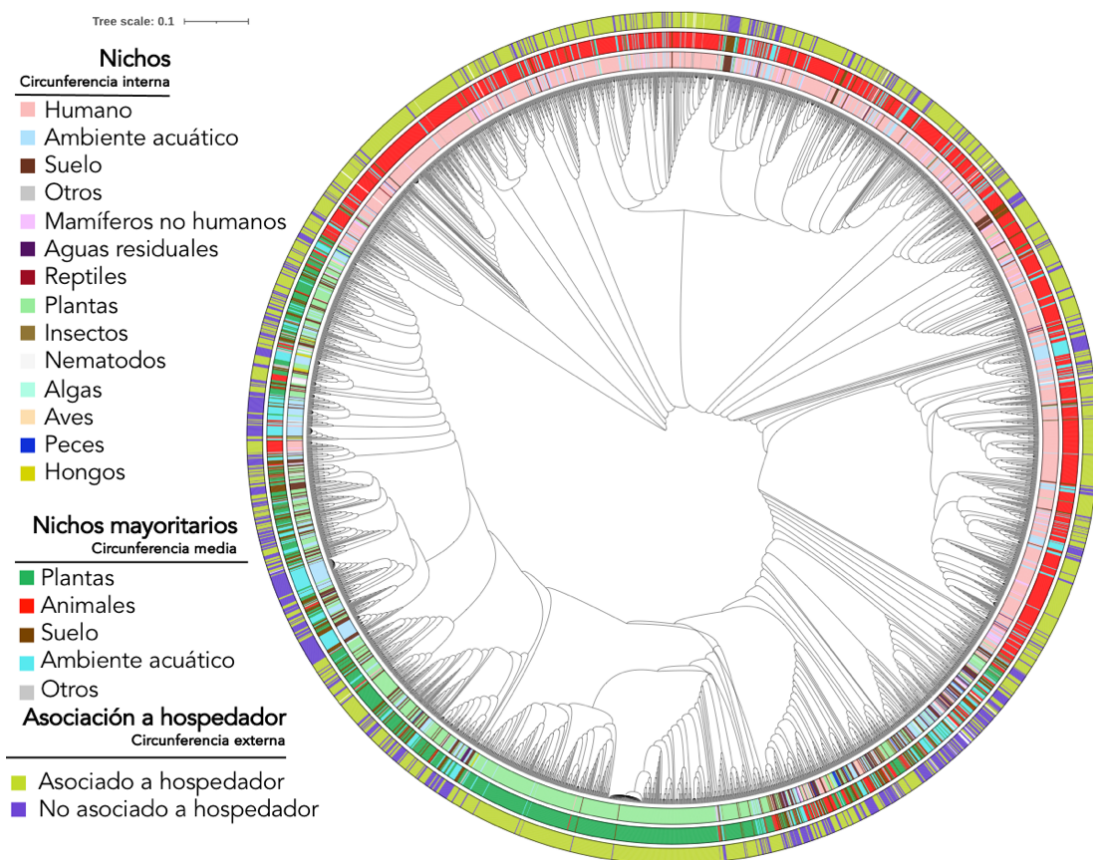
**Figura III. a** *Volcano plot* representando los valores de los genes infra y sobreexpresados de la cepa *P. brassicacearum* CDVBN10 en su interacción con *B. napus* en las raíces. En rojo se muestran los valores de log<sub>2</sub>FoldChange absolutos mayores de 2 y en azul los mayores de 1. **b** Valores de expresión del gen que codifica la hidrolasa de la familia NlpC/P60 en condiciones de vida libre (Control) y en interacción con la planta. **c** *Boxplots* representando los valores de peso seco de plantas de colza en la interacción con la cepa WT y la cepa KO de *P. brassicacearum* CDVBN10 en comparación con plantas Control (-) (sin inocular bacteria).

Finalmente, se estudió el efecto de esta bacteria en las comunidades endofíticas tras su inoculación sobre el cultivo de colza en condiciones de campo. Para ello, se realizó una secuenciación masiva de amplicones del gen 16S ARNr con las raíces de un ensayo de campo en el que esta cepa fue empleada como inoculante. Los resultados muestran que el microbioma de la planta se mantiene inalterado, casi sin cambios en la diversidad bacteriana. Por lo tanto, se deduce que los efectos PGP observados en el cultivo de colza tras la inoculación de la cepa CDVBN10 no deberían estar relacionadas con cambios en las comunidades bacterianas endofíticas de la planta.

## Capítulo IV

Las *Pseudomonas* son capaces de vivir en una gran variedad de hospedadores y ecosistemas. Para ello, estas bacterias deben haber adquirido algunas funciones o genes de utilidad, o haber perdido algunos no eficientes para la adaptación a su ambiente.

Con el propósito de estudiar genes o funciones relacionados con la adaptación de *Pseudomonas* a distintos hospedadores o nichos, en este capítulo se han utilizado 3.274 genomas de calidad de distintas cepas de *Pseudomonas*, cuyo origen de aislamiento es conocido (Figura IV). En el proceso de genómica comparativa se han creado varios grupos según la fuente de aislamiento de cada cepa (plantas, humanos, suelo, animales, aguas residuales, etc.) (Figura IV).



**Figura IV.** Árbol filogenómico de los 3.274 genomas de *Pseudomonas* utilizados. Las circunferencias externas simbolizan los distintos grupos de genomas según su fuente de aislamiento.

Los resultados muestran que el pan-genoma de *Pseudomonas* es extremadamente diverso, conteniendo miles de genes accesorios que parecen estar asociados con alguna fuente de aislamiento (plantas, humanos, suelo, animales, etc.). También se ha estudiado el enriquecimiento de funciones COGs (*Clusters of Orthologous Groups of proteins*) por grupos de genomas. Después, los COGs enriquecidos de cada grupo fueron mapeados a sus categorías metabólicas, mostrándose una relación entre algunos de grupos de genomas y ciertas funciones

COGs., como por ejemplo, el metabolismo de carbohidratos en *Pseudomonas* asociadas a plantas, o el metabolismo energético, el de iones inorgánicos y el de aminoácidos en *Pseudomonas* asociadas a seres humanos.

El enriquecimiento de enzimas activas de carbohidratos (CAZys) concuerda con el de COGs en cuanto a que señala a las *Pseudomonas* asociadas a plantas como el grupo con mayor número de CAZys. Sin embargo, las búsquedas de péptidos señal en estas proteínas reveló que este es uno de los grupos con menor número de posibles CAZys extracelulares o excretadas por bacteria, siendo las asociadas a animales y a seres humanos las que mayor número tienen.

El estudio de resistencias a diversos estreses (antimicrobianos, biocidas y condiciones ambientales adversas) también mostró grandes diferencias entre grupos. De nuevo, los genomas de *Pseudomonas* asociadas a plantas componen el grupo con menor cantidad de genes responsables de estas resistencias por genoma, siendo las asociadas a humanos las que tienen la mayor cantidad de ellos.

Finalmente, también se ha estudiado la dinámica de genes de *Pseudomonas* de los distintos ambientes. Los resultados muestran que gran parte de este pan-genoma está creado tras miles de procesos de transferencia horizontal de genes (HGTs); algunos grupos de genomas tienen hasta el 20% de cada uno de sus genomas conformado por genes transferidos horizontalmente, principalmente provenientes de otras proteobacterias. El número de regiones de plasticidad genómica (RGPs) es también elevado, con una media de 150 de estas regiones por cada genoma de *Pseudomonas*. Tanto los HGT como las RGP podrían ser responsables de gran parte de las diferencias entre los distintos grupos de genomas.

Todos los análisis llevados a cabo para analizar este pan-genoma de *Pseudomonas* han revelado que muchos de los genes o funciones asociados a nicho u hospedador no tienen una anotación clara o permanecen como proteínas hipotéticas. Por lo tanto, los resultados de este trabajo pueden sentar bases para futuras investigaciones que den lugar al descubrimiento de nuevas funciones de relevancia en la interacción de bacterias con sus hospedadores o entornos.

## Capítulo V

Con más de 250 especies validadas, las *Pseudomonas* representan a un extenso género bacteriano para el cual se describen muchas nuevas especies cada año. Sin embargo, la organización taxonómica de este género tan diverso se torna compleja. La correcta definición de linajes taxonómicos y límites para la definición de taxones es de gran importancia para la Microbiología clínica, ecológica e industrial.

Debido a esto, en este capítulo se ha investigado la taxonomía de las distintas especies del género *Pseudomonas*. Para ello se descargaron todos los genomas disponibles de cepas tipo de la familia *Pseudomonadaceae*. Después se generaron diversos árboles filogenéticos y filogenómicos y se

calcularon sus índices de relación genómica. Basándonos en estos análisis, el género fue reorganizado y se sugirió la reclasificación de distintos taxones en cuatro nuevos géneros y en otros taxones ya existentes, incluyendo géneros de un orden distante de *Pseudomonas*, *Lysoobacterales*.

Las cepas previamente mal clasificadas aparecen coloreadas de forma diferencial a las del resto del género en la Figura V. En resumen, se han descrito los siguientes taxones: *Denitrifimonas* gen. nov. comb. nov., *Neopseudomonas* gen. nov. comb. nov., *Chryseomonas* gen. nov. comb. nov., *Parapseudomonas* gen. nov. comb. nov., *Stenotrophomonas geniculata* comb. nov.; y se han sugerido las siguientes reclasificaciones: *Pseudomonas cissicola* como un sinónimo de *Xanthomonas citri*, *Pseudomonas lutea* y *Pseudomonas zeshuii* como sinónimos de *Pseudomonas luteola*, *Pseudomonas abyssi* como sinónimo de *Pseudomonas gallaeciensis*, y *Xanthomonas perforans* como sinónimo de *Xanthomonas euvesicatoria*.

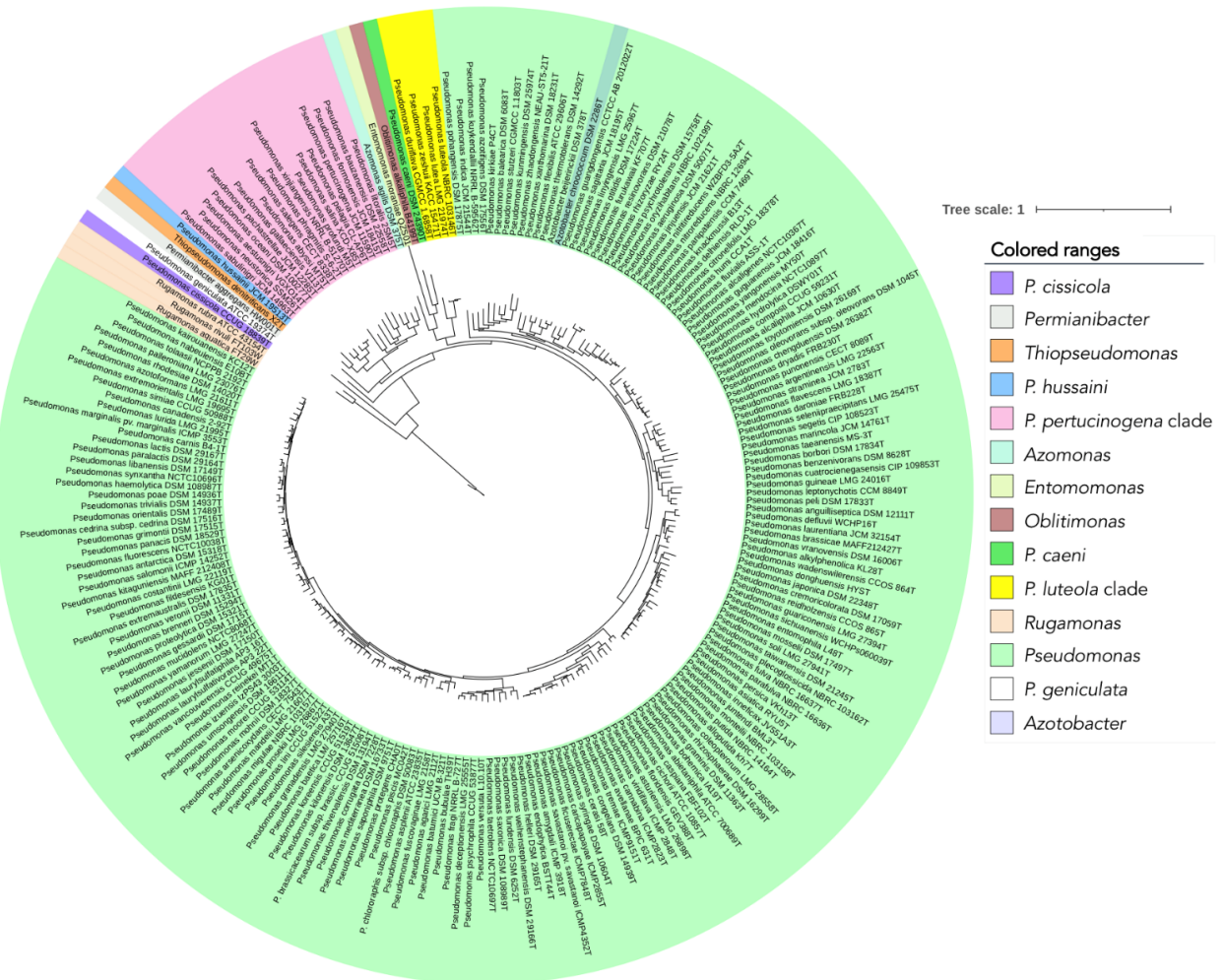


Figura V: Árbol filogenómico basado en 92 genes *housekeeping* de cada una de las 227 especies tipo de la familia *Pseudomonadaceae* utilizados en este capítulo.



## ***Abstract***

Microbes live in almost all the different ecosystems in nature, including plants and animals. For that, they must have evolved and adapted to each of the different environmental conditions where they appear. In each niche, microbes play very important roles, such as in biogeochemical cycles and, in case of pluricellular hosts, in host nourishment and defense, amongst others. Thus, the study of the ecology and functions of microbes may help to explain the complexity of nature. Also, this knowledge may be helpful for the development and application of new microbial processes for industrial, biotechnological and clinical purposes.

*Pseudomonas* bacteria constitute one of the most diverse and adaptable prokaryotic genera. Their metabolic versatility allows them to survive in many different environments. Members of *Pseudomonas* have been identified in human beings, plants, soils, rivers, deep seas, psychrophilic environments, insects and other environmental niches or hosts. The diversity of environments where *Pseudomonas* bacteria evolve and diversify has led to a broad evolution of its members, thus being one of the most diverse bacterial genera. This high diversity of the genus plus its versatility and easy growth in laboratory conditions results in a continuous discovery of new species classified within the genus.

In this thesis, different approaches have been carried out in order to decipher novel functionalities and ecological aspects of the genus *Pseudomonas*.

### **Chapter I**

Antimicrobial resistance is a worldwide problem that threatens the effectiveness of treatments for microbial infection and constitutes an important pressing public health issue which requires urgent efforts to identify new antimicrobial compounds.

Microbes, including *Pseudomonas*, host a huge variety of biosynthetic gene clusters (BGCs) that produce an immeasurable array of secondary metabolites with many different biological activities, including antimicrobial, anticarcinogenic, antiviral... Consequently, it is essential to study unexplored microbial strains and/or unexplored genetic machinery involved in the production of bioactive compounds to develop new drugs. Despite the complex task of isolating and characterizing novel natural products, microbial genomic strategies can be useful for carrying out explorations in this area. However, although genomic-based research on secondary metabolism is on the increase, the literature lacks studies focusing on the entire *Pseudomonas* genus.

Taking all this into account, the aims of this section were: (I) to unveil the genetic background of secondary metabolism in *Pseudomonas*, (II) to study the evolutionary processes that drives the

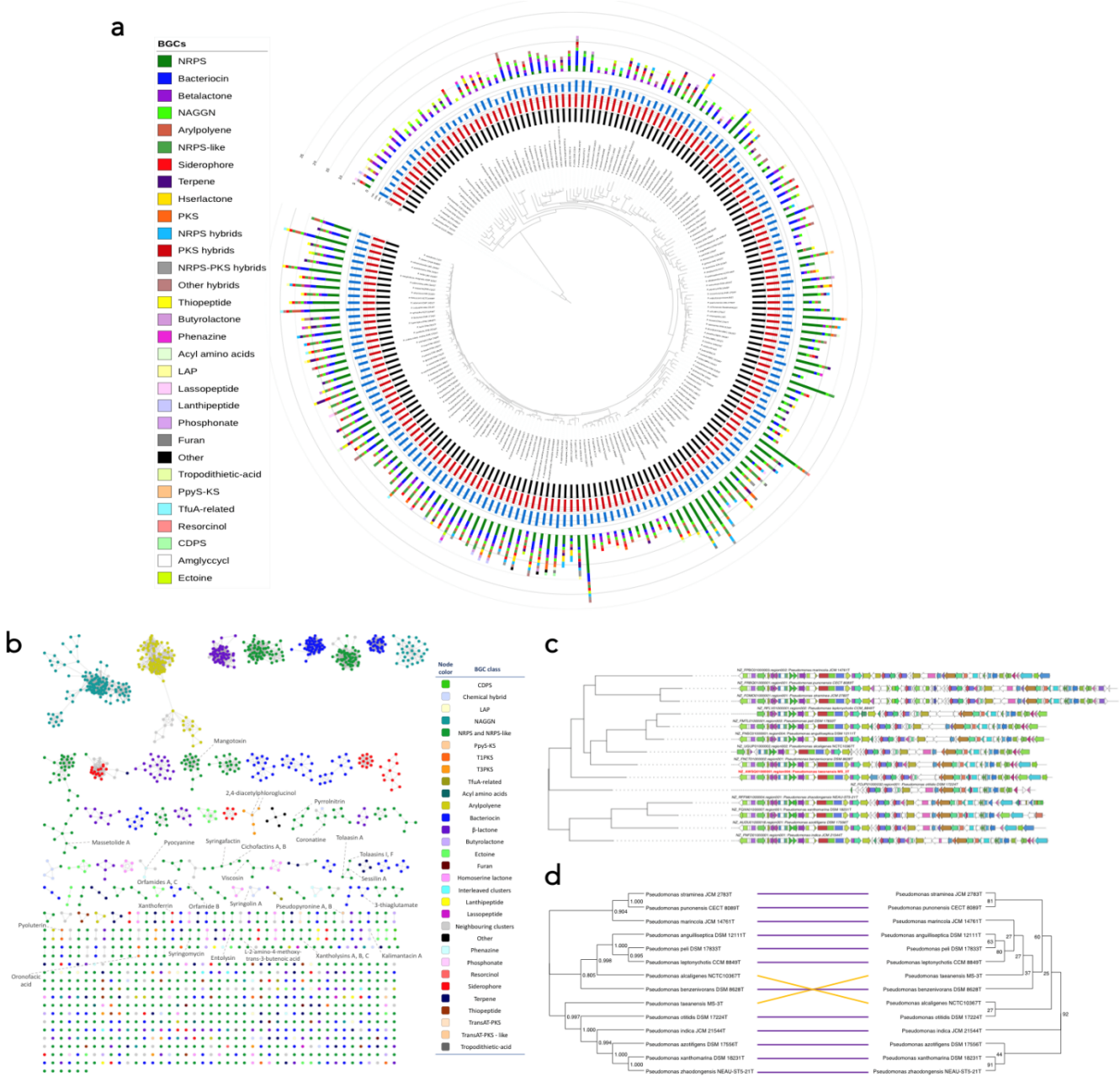
diversification of their coding genes and (III) to point out promising *Pseudomonas* strains for their research in natural product searches.

For that, comparative genomics on 194 *Pseudomonas* species was carried out, paying special attention to the evolution and distribution of different classes of BGCs and the coding features of antimicrobial peptides. This chapter also relates the use of EvoMining for deciphering protein expansions of lipid-derived enzymes, which may have evolved towards the biosynthesis of novel secondary metabolites in *Pseudomonas*.

The predominant types of metabolites encoded in *Pseudomonas* type strains are mostly non-ribosomal peptide synthetases, bacteriocins, N-acetylglutaminylglutamine amides and  $\beta$ -lactones (Figure I). We found that the evolution of genes related to secondary metabolites is paired with *Pseudomonas* species diversification (Figure I). Interestingly, there are only few *Pseudomonas* species that encode polyketide synthases, which are multi-domain enzymes derived from lipid metabolism broadly distributed among Bacteria. Thus, we searched and found possible new types of secondary metabolite gene clusters in which lipid-related enzymes may be involved.

The results of this chapter indicate the existence of a vast number of encoded metabolites that remain uncharacterized in *Pseudomonas*, whose gene clusters evolved in a species-specific way. These data also provide novel insights into the secondary metabolism of *Pseudomonas* and will serve as basis for strain prioritization in the discovery of interesting new metabolites.





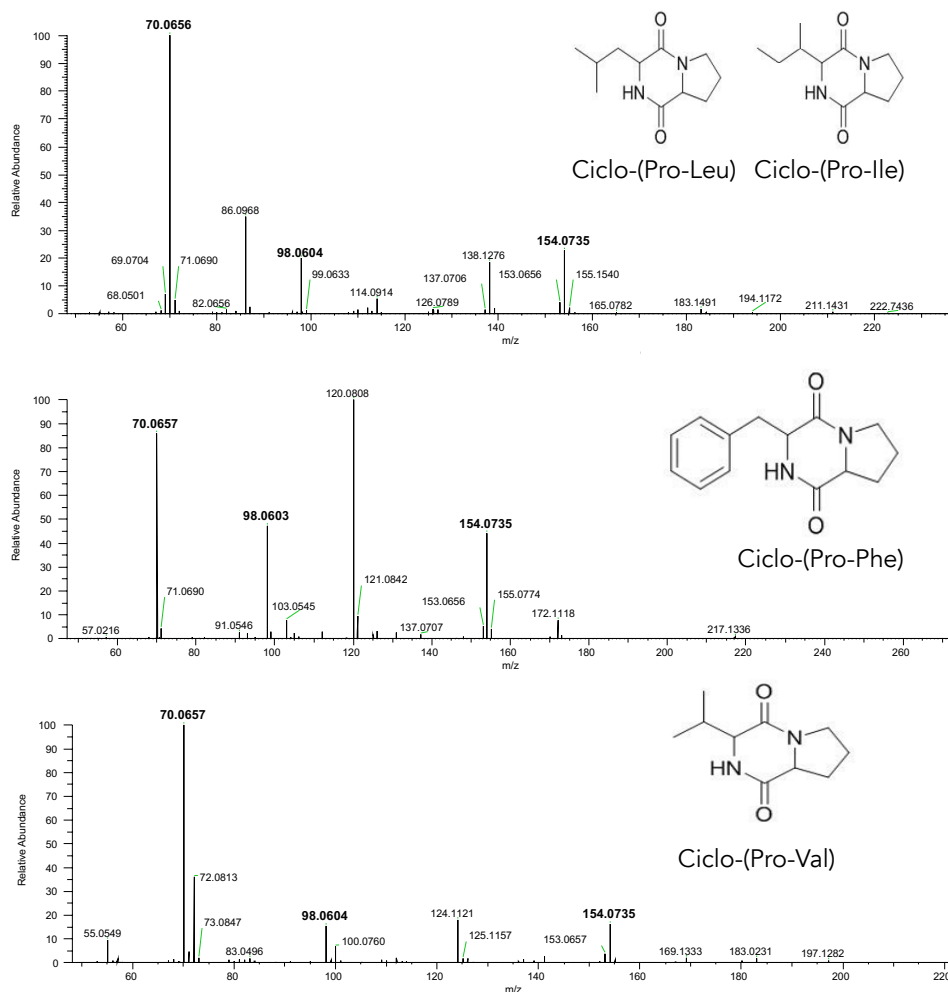
**Figure I.** **a** Phylogenetic tree of *Pseudomonas* type strains based on 92 concatenated housekeeping genes. Metadata were drawn with the Interactive Tree of Life (iTOL) program. The black inner circle represents genome completeness (%); the red circle represents G+C (%) content; the blue circle represents genome length; the outer circle represents BGC types predicted by antiSMASH (colors code reflects each different BGC type). Bar, 0.1 substitution per position. **b** Sequence Similarity Network (SSN) produced by BiG-SCAPE and visualized and annotated with Cytoscape. Nodes represents BGCs. BGC types are colored according to the color legend. MiBIG clusters are labeled according to the metabolic product of the BGC. **c** Example of a CORASON phylogenetic tree of a *Pseudomonas* GCF of aryl polyenes. Each diagram represents a different BGC. The red labelled BGC denotes the representative BGC in the GCF. **d** Tanglegram of the GCF represented in **c** (left; obtained with the BiGSCAPE/Corason workflow) and phylogeny of strains with representatives within the GCF (right; obtained with UBCG tool). Bootstrap values of the phylogeny tree represents the number of UBCG phylogenetic trees that support each differentiation.

## Chapter II

Bark beetles are small insects that live in phloem of host trees and are becoming pests worldwide. These animals establish symbioses with microorganisms that provide them with nutrients. In addition, some of their associated bacteria play a role in the beetle protection by producing substances that inhibit antagonists.

In this chapter the capacity of several bacterial strains isolated from the bark beetles *Ips cembrae*, *Ips acuminatus*, *Xylocleptes bispinus* and *Pityogenes bidentatus* to produce antimicrobial compounds was analyzed. Several isolates, mainly from the *Pseudomonas* genus, exhibited the capacity to inhibit Gram-positive and Gram-negative bacteria, as well as fungi. The genome sequence analysis of three *Pseudomonas* isolates predicted the presence of several gene clusters implicated in the production of diverse secondary metabolites. The low similarity of some of these clusters with those previously described, suggests that they encode new undescribed substances, which might be useful for the development new antimicrobial agents.

The chapter also describes the mining for the bioactive molecules responsible of the antagonistic activity of one of these strains, *Pseudomonas* sp. IS6. Different organic solvents have been used to try to isolate and identify these molecules in the bacterial culture medium supernatant. This search returned to the finding of several cyclodipeptides which were present in bioactive extracts, being cyclo-(Pro-Leu), cyclo-(Pro-Ile), cyclo-(Pro-Phe) and cyclo-(Pro-Val) the ones with higher concentration (Figure II). These molecules may be produced by a cyclodipeptide synthase (CDPS) encoded in the genome of *Pseudomonas* sp. IS6.



**Figure II.** UHPLC-MS/MS mass spectra from each cyclodipeptide. Each mass represent a fraction of the total mass of each molecule. At the right are shown the cyclodipeptide identified from each spectra.

Finally, several strains isolated from these bark beetles showed to represent novel species of the genus *Pseudomonas* and *Arthrobacter*. Based on genotypic, phenotypic, chemotaxonomic and genomic characteristics, the description of *Pseudomonas bohémica* sp. nov. (type strain is IA19<sup>T</sup> = CECT 9403<sup>T</sup> = LMG 30182<sup>T</sup>), *Pseudomonas fuscus* sp. nov. (type strain is IS6<sup>T</sup>) and *Arthrobacter ipsi* sp. nov. (type strain is IA7<sup>T</sup> = CECT 30100<sup>T</sup> = LMG 31782<sup>T</sup>) has been proposed.

### Chapter III

Some microorganisms can constitute an eco-friendly manner to increase crop yields. A few of them promote nutrients acquisition and can be applied as biofertilizers. Some others defend plants against the attack of phytopathogens and can be applied as biological control agents (BCAs); this defense can be achieved either by direct antagonism of the phytopathogens or by

priming -activation of induced systemic resistance (ISR) of the plant-. However, apart from well-known plant-microbe mutualistic symbioses, such as the case of the interaction between rhizobia-legumes or mycorrhizae, the molecular dialogue between plants and many other plant growth promoting (PGP) bacteria, such as several *Pseudomonas*, is not deeply understood.

Previously, *Pseudomonas brassicacearum* CDVBN10 was firstly isolated as a root endophyte of *Brassica napus* and showed plant growth promoting (PGP) potential in *in vitro*, and in green-house conditions. Moreover, the strain showed significant improvements in pod numbers, pod dry weight and shoot dry weight under field conditions.

On the other hand, the phytopathogen *Leptosphaeria maculans* (anamorph *Phoma lingam*) is a fungus that causes the Blackleg disease on *Brassica napus* crops, being a serious disease that causes important losses in rapeseed crops worldwide.

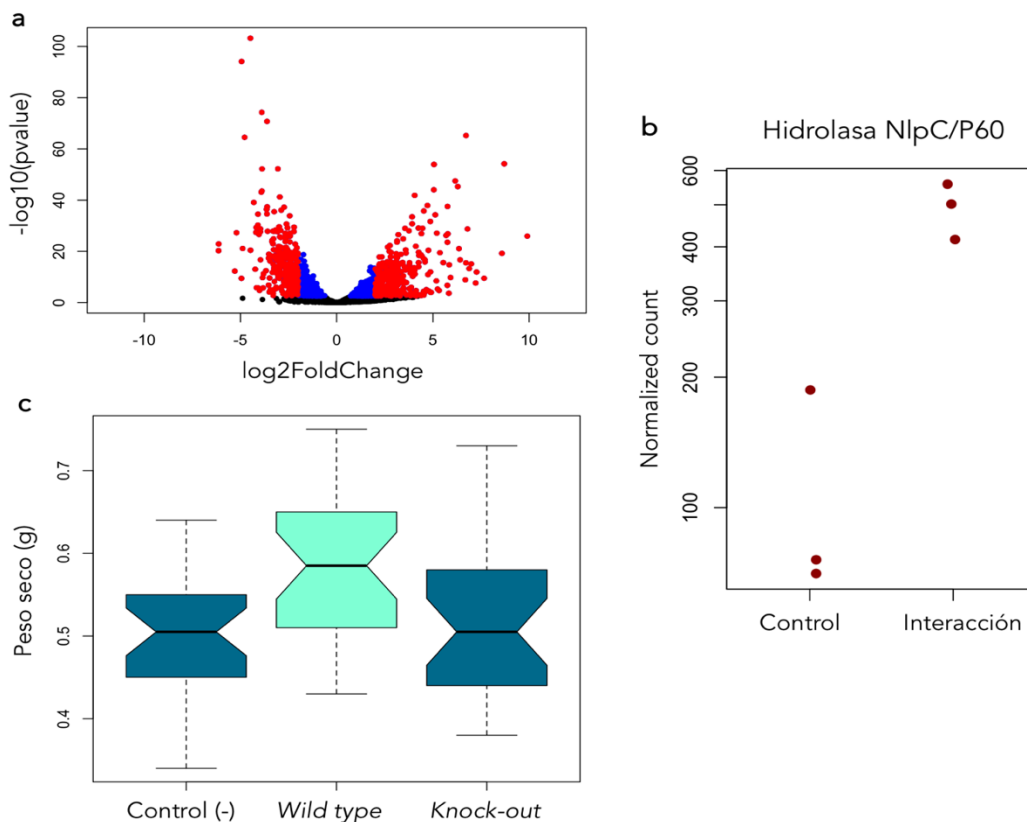
Aiming to expand the knowledge on the effects of *P. brassicacearum* CDVBN10 on the growth promotion of rapeseed crops, several approaches have been carried out.

First, it is shown how *P. brassicacearum* CDVBN10 is able to antagonize *L. maculans*, as well as to trigger ISR in the plant, protecting therefore rapeseed crops against this agro-economically important fungal threat. Likewise, we mined the *P. brassicacearum* CDVBN10 genome sequence, searching for the metabolic machinery potentially implicated in the antifungal activity, finding several BGCs related with the synthesis of possible antimicrobial molecules. Moreover, we performed a comparative genomic analysis of the *P. brassicacearum* taxonomic group, based on the genome sequence of 21 strains from this complex, which highlights the great biocontrol properties of this species and the differences among them.

Also, an RNA-Seq analysis was performed on *P. brassicacearum* CDVBN10 when it is forming a biofilm over the *B. napus* roots. This experiment revealed more than 2000 genes up or downregulated in the bacteria in the present of the counterpart. Transcriptional data show that *P. brassicacearum* CDVBN10 have high levels of expression of the main oxygenic respiratory pathways as well as energy metabolism pathways; also, type VI secretion systems, lipopolysaccharide biosynthesis and the enzyme responsible of salicylic acid synthesis from chrosimate are overexpressed, while ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase) deaminase is slightly expressed. Moreover, according to the results, the CDVBN10 strain is not synthesizing flagella in rapeseed roots, which agrees with microscopic images, which show the biofilm state of this bacteria over rapeseed roots' surface. There are several overexpressed genes involved in the antibiotic resistance and in the hydrogen peroxide-related oxidative stress resistance, which may be an advantage for the *Pseudomonas* adaptation to the plant environment and its defense. Furthermore, the synthesis of some secondary metabolites, such as pyoverdines, RiPPs (*Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides*) and a lanthipeptide, amongst others, is overexpressed in the plant-bacteria interaction. Also, RNA-seq data show that the *Pseudomonas* strain would enhance plant growth through the solubilization of phosphate-containing molecules into plant-assimilable phosphate. In the opposite side, there

are several mechanisms or pathways with low expression or downregulated, such as denitrification pathways, HCN synthesis by *hcnABC* operon, polyhydroxyalkanoates (PHAs) synthesis, potassium transporters and quorum quenching related enzymes, amongst others.

One of the up-regulated genes mediates the synthesis of a cysteine peptidase belonging to the NlpC/P60 family, a type of enzymes with diverse activities (peptidases, amidases, transglutaminases, and acetyltransferases) located in the outer membrane. Previous reports revealed that the action of similar enzymes produce an activation of human or *C. elegans* immune systems against *Enterococcus faecalis* and *Salmonella* sp. respectively. Nevertheless, there is no evidence of any role of this enzyme in the bacteria-plant interaction. Based on this, a CRISPR-Cas9 knock-out (KO) on this *P. brassicacearum* CDVBN10 gene was performed and its effect on the PGP of rapeseed plants was studied. There are not significantly differences ( $p_{adj} < 0,05$ ) between dry weight of negative control rapeseed plants (not inoculated with bacteria) and plants inoculated with the mutant strain lacking the NlpC/P60 hydrolase, while there are significant differences with wild type CDVBN10 strain (Figure III). However, confocal microscopy showed that the KO strain does not lose its ability to colonize rapeseed roots.



**Figure III.** **a** Volcano plot of statistic values of down and overexpression of *P. brassicacearum* CDVBN10 genes when the bacteria forms biofilm on the rapeseed roots. Red dots represents  $>2$  absolute  $\log_2\text{FoldChange}$  values and blue dots,  $>1$ . **b** Normalized expression values of the gene encoding the NlpC/P60 hydrolase in free living conditions (Control) and in the plant-interaction. **c** Boxplots with dry weight values of rapeseed 1 month after WT or KO *P. brassicacearum* CDVBN10 inoculation as well as uninoculated plants (Control).

Finally, the effect of this bacterium on the native bacterial endophytic communities when applied as inoculant to *B. napus* crops grown under field conditions has been investigated through 16S rRNA gene amplicon metagenomics on rapeseed roots took from the field assay. The results show how the plant microbiome remains similar, with almost no change in bacterial diversity. Thus, we can conclude that the PGP effects observed in rapeseed crops inoculated in the fields with the bacterium *P. brassicacearum* CDVBN10 should not be also related with changes in the bacterial endophytic communities associated to the plant.

#### Chapter IV

*Pseudomonas* are able to live in many different ecosystems and hosts. For that, these bacteria may have enriched some functionalities, acquired useful genes, or lost non-efficient genes for the adaptation to its environment.

With the aim to study genes or functions related with the adaptation of *Pseudomonas* to different hosts or niches, in this chapter, 3,274 high quality genomes from *Pseudomonas* strains for which their isolation origin is known have been retrieved from public databases and used for comparative genomics purposes (Figure IV). Several genome groups have been created based on the isolation source of the bacteria (plants, humans, soil, animals, wastewater, etc.).

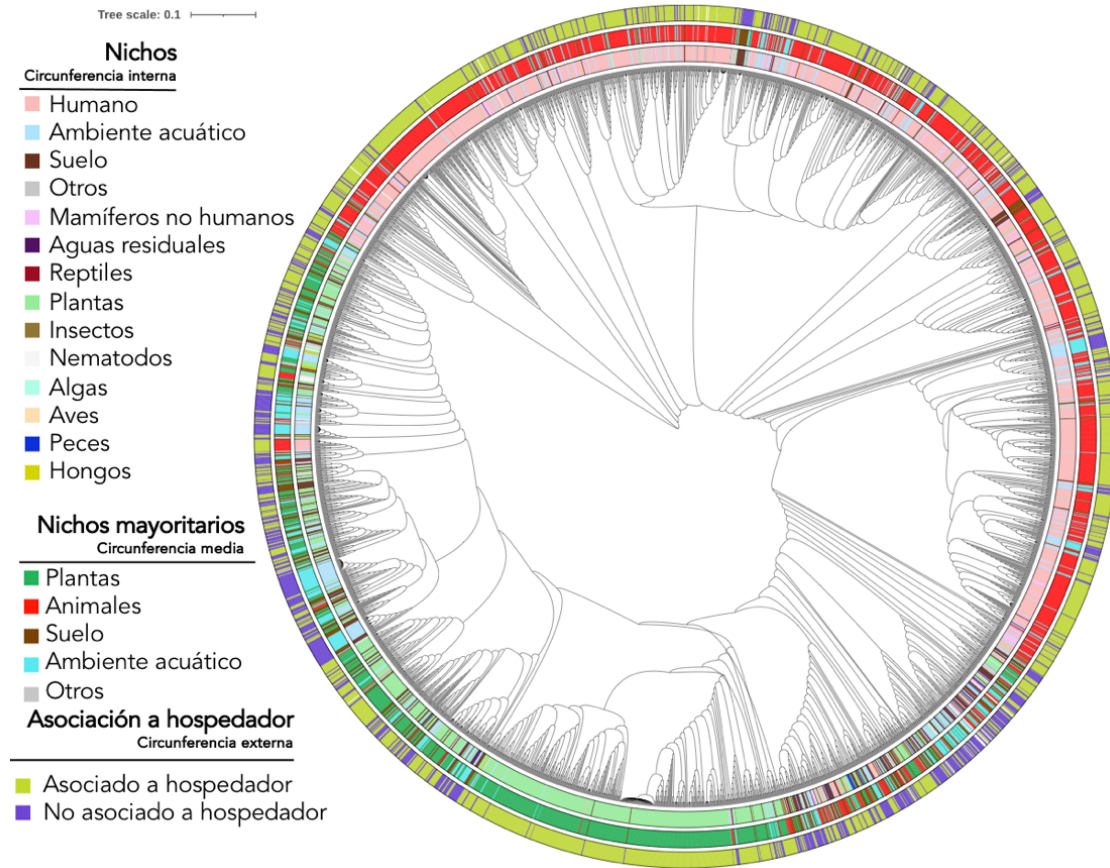


Figure IV. Phylogeomic tree of 3,274 genomes of *Pseudomonas*. External circles symbolizes different groups of genomes according to their isolation source.

The results show an extremely diverse *Pseudomonas* pan-genome, for which thousands of accessory genes seem to be associated with some isolation source (plants, humans, soil, animals, etc.). The enrichment of COGs functions was also investigated. Then, enriched COGs per group were mapped to their metabolic categories, which showed some of them being extremely enriched in some datasets, such as carbohydrate metabolism in plant-associated *Pseudomonas* or energy, inorganic ions, and amino acid metabolisms in humans-associated *Pseudomonas*.

Enrichment of carbohydrate active enzymes (CAZys) agreed with COG-enrichment data in displaying plant-associated *Pseudomonas* as the group with higher number of CAZys. However, peptide signal searches revealed that this is one of the groups with lower outer-membrane located or excreted CAZys, in absolute terms, being human and animal-associated *Pseudomonas* the ones with highest number of them.

The study of antimicrobial, biocides and environmental adverse conditions resistance genes also displayed great differences among groups. Again, plant-associated *Pseudomonas* is the group with lower amount of these genes per genome, being the human-associated group the one with the highest number.

Finally, the dynamics of *Pseudomonas* genes from different ecosystems has also been studied. The results show that this pan-genome was created by thousands of horizontal gene transfer (HGTs) events; some sets of genomes of the study have almost 20% of each of their genomes composed by horizontally transferred genes, mainly with proteobacterial origins. Also, the number of regions of genome plasticity (RGPs) is very high, with an average of more than 150 of these regions by genome. Both HGT and RGP may explain the genomic and functional differences amongst genome groups.

All the different approaches employed to analyze this *Pseudomonas* pan-genome revealed that many of the host or niche associated genes or features do not have a clear annotation or they are annotated just as hypothetical proteins. Thus, further research based on the results of this chapter may be profitable for the discovery of new host or environment associated functions of relevance.

## Chapter V

With more than 250 validly published species, *Pseudomonas* represents a broad bacterial genus in which many novel species are being described year by year. However, the taxonomic organization of so diverse and large genera remains quite difficult. The correct definition of taxonomic lineages and taxa borders is of utmost important for ecological, clinical and industrial Microbiology.

Thus, in this chapter, the taxonomic placement of species classified within the *Pseudomonas* genus is investigated. For that, all the available genomes from type species in the *Pseudomonadaceae* family were downloaded. Then, diverse phylogenomic and phylogenetic trees were built, and their gene and genomic relatedness indexes were compared. Based on these analyses, the genus was re-organized, and the reclassification of diverse taxa into four new proposed genera and into already existing taxa, including genera from the *Pseudomonas*-distant *Lysobacterales* order is suggested.

The previously mis-classified strains are depicted in Figure V. In sum, the following taxa have been described: *Denitrifimonas* gen. nov. comb. nov., *Neopseudomonas* gen. nov. comb. nov., *Chryseomonas* gen. nov. comb. nov., *Parapseudomonas* gen. nov. comb. nov., *Stenotrophomonas geniculata* comb. nov.; and the following reclassifications have been proposed: *Pseudomonas cissicola* as a later synonym of *Xanthomonas citri*, *Pseudomonas lutea* and *Pseudomonas zeshuii* as later synonyms of *Pseudomonas luteola*, *Pseudomonas abyssi* as a later synonym of *Pseudomonas gallaeciensis*, and *Xanthomonas perforans* as a later synonym of *Xanthomonas euvesicatoria*.



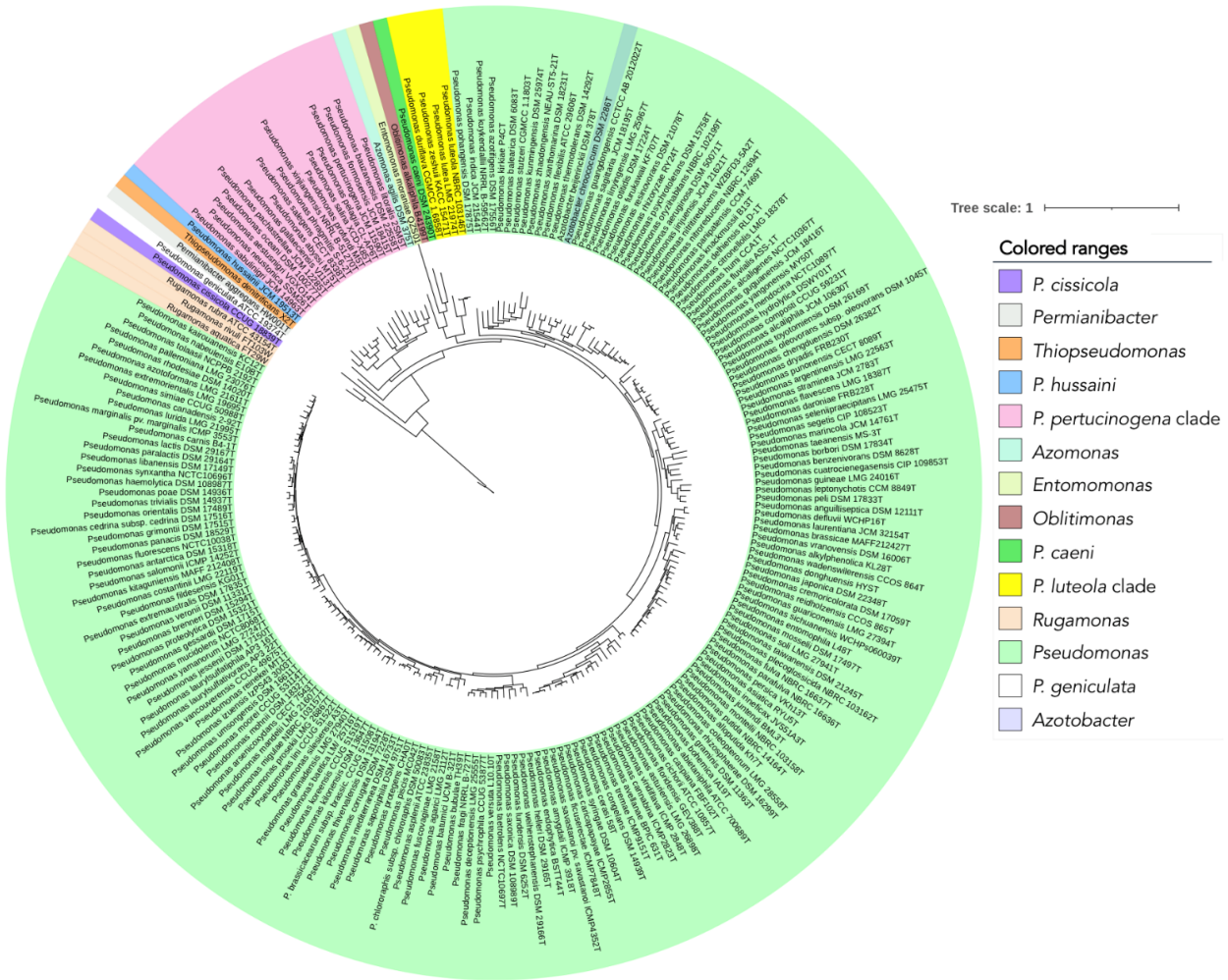


Figure V: Phylogenomic tree based on 92 housekeeping genes from each of the 227 *Pseudomonadaceae* type species used in this chapter.



# *Introducción general*





## *Introducción general*

### **Origen, evolución, ecología y aplicaciones de los microorganismos**

Hace millones de años, posiblemente en las cercanías de fuentes hidrotermales de las profundidades marinas, comenzó la vida en La Tierra (Martin et al., 2008; Rimmer y Shorttle, 2019). Alguna de esas primeras células fue lo que hoy conocemos como el último ancestro universal común (LUCA). Desde entonces hasta nuestros días, los distintos fenómenos evolutivos han diversificado la vida en multitud de direcciones, dando lugar a las distintas especies de los distintos linajes biológicos (Figura 1). Gracias a eso, la vida ha conseguido instaurarse en prácticamente todos los rincones del Planeta (Louca et al., 2019; Takai, 2019). Sin embargo, las bacterias son quienes tienen una mayor distribución biológica y quienes posiblemente lleven a cabo un mayor impacto en los ciclos geoquímicos y biológicos (Schulz et al., 2017; Louca et al., 2019). Al igual que las bacterias, otros microorganismos como los hongos, virus, arqueas, protozoos, oomicetos, etc., componen la microbiota de cada ambiente biológico, incluyendo la de los hospedadores superiores (animales y plantas) (Díez-Méndez y Menéndez, 2020; Archer et al., 2021; Liang y Bushman, 2021; Robins et al., 2021; Saati-Santamaría et al., 2021; Tan et al., 2021).

Los microorganismos llevan a cabo funciones de vital importancia en cada una de sus biosferas. Por ejemplo, son responsables de la fijación de algunos elementos químicos de la atmósfera, de fenómenos de oxidación-reducción de moléculas derivadas del azufre, del nitrógeno, del carbono y del hidrógeno, entre otras, de la solubilización de moléculas insolubles, de la degradación de la materia vegetal, de la producción de oxígeno, etc. (Brittingham et al., 2017; Andreeva et al., 2020; Berg et al., 2020; Mandal et al., 2020; Martínez-Espinosa, 2020; Basu et al., 2021). De la misma manera, la microbiota que habitan los distintos tejidos de animales y plantas es necesaria para múltiples procesos biológicos, no sólo los relativos a los ciclos biológicos de ciertos elementos, sino también a la degradación de nutrientes complejos, la síntesis de vitaminas, la protección frente a patógenos, etc. (Menéndez et al., 2017; Fabryová et al., 2018; García-Fraile, 2018; Levy et al., 2018a; Fontaine et al., 2020; Kim et al., 2020; Malard et al., 2020; Wang et al., 2020; Stressman et al., 2021). Sin embargo, también existen microorganismos perjudiciales para sus hospedadores, los cuales aprovechan los recursos bioquímicos del organismo superior para su propia supervivencia y/o diseminación (Paulussen et al., 2017; Harper et al., 2018; Xin et al., 2018; Compant et al., 2019; Riquelme et al., 2020; Delaux y Schornack, 2021). En ambos casos, suele existir una estrecha relación microorganismo-hospedador desarrollada para tales efectos.

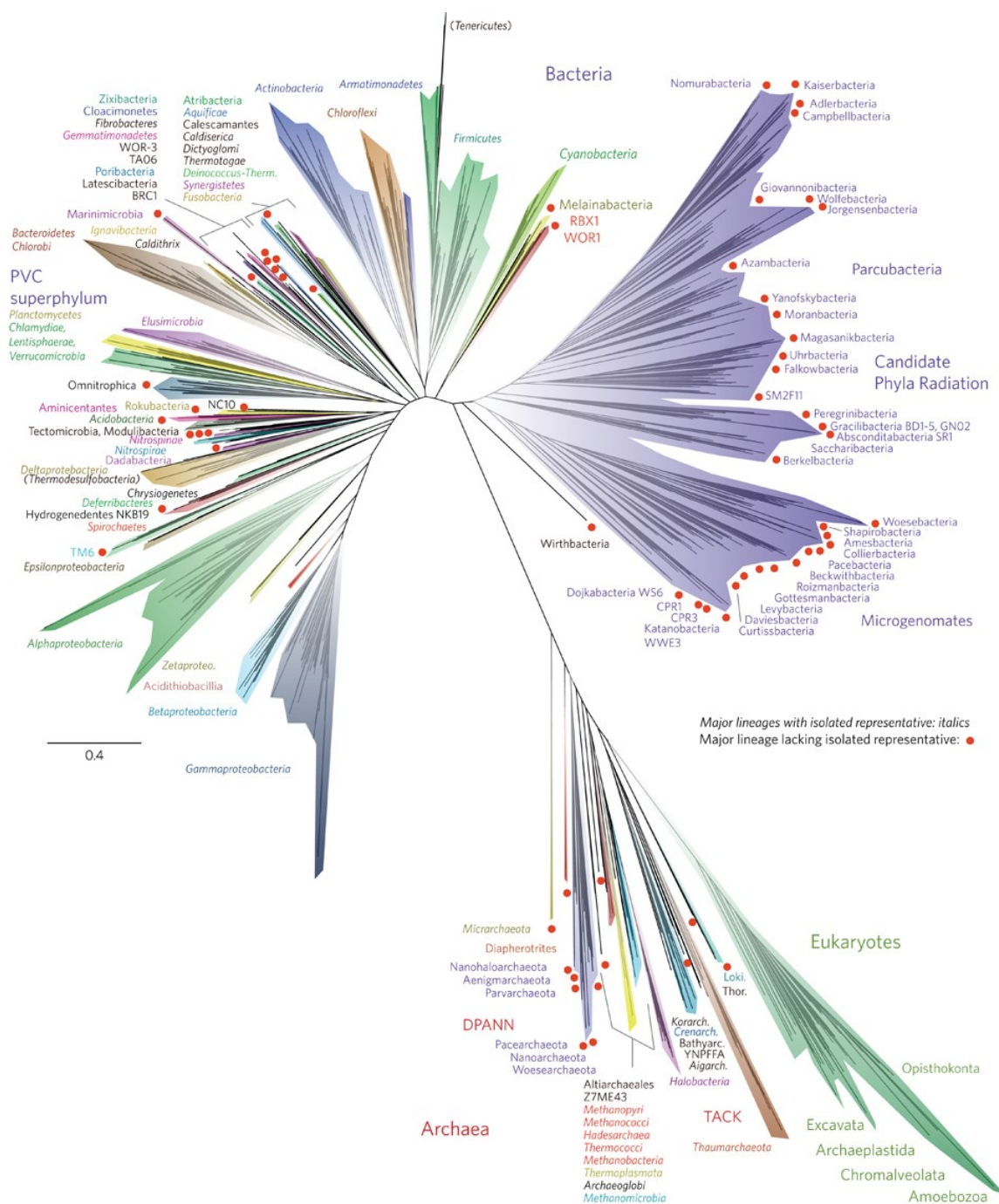


Figura 1. Árbol de la vida según Hug et al. (2016)

Todos estos fenómenos de interacciones entre los microorganismos con sus ambientes se dan tras millones de años de evolución, tanto de los microorganismos como de sus ambientes u hospedadores, lo cual ha dado lugar a una gran adaptabilidad biológica (Browne et al., 2017; Windels et al., 2020; Chen et al., 2021). Esta adaptabilidad de los distintos microorganismos es conducida, entre otros factores, por su propia evolución genética. Debido a esto, el estudio de los procesos ecológicos y evolutivos de los distintos microorganismos de la naturaleza puede ser guiado por la genética y la genómica.

Los millones de años de evolución microbiana han conseguido optimizar procesos biológicos muy diversos; de esta manera, existen microorganismos que son capaces de producir enzimas eficaces para la degradación de casi cualquier compuesto de la naturaleza, de orientarse en base al magnetismo terrestre, o, en modo más amplio, de producir un metaboloma con multitud de acciones biológicas, desde acciones biocidas sobre otros seres vivos, hasta efectos protectores frente a agentes perjudiciales externos (altas o bajas temperaturas, radiaciones físicas, concentraciones de elementos químicos, etc.) (Lebre et al., 2017; Lin et al., 2017; Pulschen et al., 2017; Tyc et al., 2017; Babadi et al., 2020; Kai, 2020). El estudio de estos procesos ha sido y será de gran utilidad para la sociedad, ya que permite hacer uso de recursos biológicos muy optimizados para la síntesis de compuestos químicos, la degradación de contaminantes, reacciones energéticas, etc. (Sauer et al., 2017; Chen y Jiang, 2018). Además, el estudio de las interacciones microorganismo-hospedador permite hacer uso de la Biología, en su concepto más extenso, para el desarrollo de tratamientos farmacológicos, para controlar la salud de personas y animales y para favorecer el crecimiento de cultivos, entre otras aplicaciones biotecnológicas (Brown y Hazen, 2017; López-Mondejar et al., 2017; Aristimuño et al., 2018; Poveda et al., 2018).

### **Importancia de la taxonómica en la Microbiología**

La Taxonomía es un principio organizativo de la Biología, el cual idealmente utiliza datos evolutivos para clasificar los distintos organismos en especies y otros niveles taxonómicos. La importancia de esta organización es ilimitada en el área de la Microbiología, puesto que permite asumir determinadas características asociadas a los distintos organismos de la misma especie. Esto es debido a que, por lo general (salvo excepciones que implican diferencias en unos pocos genes o la presencia de plásmidos), los distintos microorganismos de una misma especie suelen tener genomas poco divergentes y, por lo tanto, tienen un metabolismo similar (Philippot et al., 2010; Chun et al., 2018; Jain et al., 2018; Westoby et al., 2021). De hecho, la presencia de grandes diferencias metabólicas ha implicado la reclasificación de cepas microbianas en especies distintas (Schleifer, 2009). De esta manera, cuando se descubre una nueva función para un microorganismo, esta puede utilizarse como premisa para investigaciones que impliquen a otras cepas de la misma especie. De forma similar, las distintas especies de un género microbiano también tendrán grandes similitudes funcionales (Bortolous, 2008; Philippot et al., 2010; Inkpen et al., 2017).

Las bacterias del género *Rhizobium* suponen un claro ejemplo, ya que muchas tienen especificidad de hospedador (plantas) (Andrews et al., 2017; Velázquez et al., 2017). También existen casos de microorganismos pertenecientes al mismo género que pueden resultar patógenos o beneficiosos para su hospedador, según sean de una especie o de otra (Eberl y Vandamme 2016; Oliveira et al., 2017). Incluso, hay géneros bacterianos con características extendidas, como *Xanthomonas*, que se caracterizan por tener gran cantidad de especies patógenas de plantas, o *Wolbachia*, bacterias endosimbiontes de artrópodos y algunos nematodos (Merda et al., 2017; Ross et al., 2019; Saneaei et al., 2021). En estos casos, la

identificación de una determinada cepa microbiana nos permite tener una idea aproximada sobre sus funciones metabólicas y/o ecológicas.

Las asignaciones taxonómicas bacterianas comenzaron a realizarse en base a algunas pruebas fenotípicas y quimiotaxonómicas; sin embargo, gracias a los distintos avances de la secuenciación del ADN, estas empezaron a basarse en árboles filogenéticos de unos pocos genes conservados intra-especie o, más tarde, también en comparaciones de genomas completos (Jain et al., 2018). La correcta asignación taxonómica de cada microorganismo es de gran relevancia para poder asumir funciones de manera fiable. De no ser así, toda la investigación llevada a cabo para un microorganismo puede dar lugar a conclusiones incorrectas en futuros estudios (Bortolous, 2008). Hoy en día, los microbiólogos han pasado de caracterizar unas pocas cepas a caracterizar microbiomas completos (Inkpen et al., 2017). En estos casos, los programas bioinformáticos y las premisas que se utilizan están basadas, principalmente, en estudios previos sobre las especies microbianas detectadas en el microbioma en cuestión (Inkpen et al., 2017; Douglas et al., 2018). Debido a esto, las investigaciones básicas realizadas sobre cepas microbianas concretas deberán realizarse con garantías taxonómicas; de no ser así, la escalada de errores y asunciones puede resultar funesta (Bortolous, 2008).

A pesar de la gran importancia de la taxonomía, las bases de datos de genes y genomas aún tienen muchos datos erróneos, lo cual implica que cada día se publiquen artículos basados en premisas falsas, por lo menos, en cuanto a conceptos taxonómicos se refiere (Ciuffo et al., 2018; Edgar, 2018). Además, la presencia de errores experimentales a la hora de identificar o describir especies y la existencia de especies microbianas definidas con límites taxonómicos ya obsoletos implican una constante necesidad de reclasificar cepas o taxones previamente mal identificados (Dobritsa et al., 2017; Wittouck et al., 2019; Lalucat et al., 2020). Así, y debido a todo lo anteriormente expuesto, el estudio taxonómico de linajes microbianos para su organización se torna excepcionalmente necesario para las ciencias microbiológicas.

### ***Pseudomonas*: un género bacteriano ampliamente distribuido en la Tierra**

Las *Pseudomonas* son bacterias gramnegativas que componen un amplio género perteneciente a la familia *Pseudomonadaceae*, clase *Gammaproteobacteria*. Actualmente (abril 2021), 252 especies validadas componen este género (fuente: <https://psn.dsmz.de/genus/pseudomonas>), lo cual da lugar a uno de los más diversos del dominio Bacteria. Dada tal abundancia de especies, su diversidad metabólica también es muy elevada, lo cual explica su ubicuidad en la naturaleza (Peix et al., 2018). Existen ejemplares capaces de vivir tanto en aerobiosis como en anaerobiosis, a temperaturas y niveles de pH y de salinidad tanto muy altos como muy bajos; algunos son capaces de fijar nitrógeno atmosférico, otros de participar en la oxidación-reducción de moléculas del azufre, muchos tienen gran versatilidad enzimática que les permiten degradar gran cantidad de moléculas complejas, etc. (Madigan et al., 2017). Además, estas bacterias suelen portar uno o



más flagelos polares que les permiten moverse y colonizar rápidamente los distintos hábitats (Palleroni, 2015).

Distintos estudios, tanto dependientes como no-dependientes de cultivo, han localizado bacterias del género *Pseudomonas* asociadas a plantas, humanos, ganado, insectos, ríos, mares, etc. (ver capítulo IV).

Muchas de las especies de *Pseudomonas* tienen impactos significativos, beneficiosos o perjudiciales, para sus hospedadores (entre los que se destaca el hombre y algunos animales y plantas de interés antropocéntrico), por lo que han sido ampliamente estudiadas, por su relevancia para la industria y la sociedad, entre las que destacan los ejemplos que se mencionan a continuación.

### ***Pseudomonas aeruginosa***

Entre todas las especies de *Pseudomonas*, tal vez sea *P. aeruginosa* la mejor estudiada debido a sus implicaciones clínicas. Esta especie bacteriana es un patógeno oportunista responsable de infecciones severas en pulmones y vías respiratorias de los seres humanos, donde puede causar procesos de neumonía aguda, o, en ocasiones, puede distribuirse por la sangre (sepsis) (Damron et al., 2016; Freschi et al., 2019; Kordes et al., 2019; Sawa et al., 2020). Estas bacterias producen pigmentos azul-verdosos (piocianina) y toxinas que son responsables de su patogenicidad (Hall et al., 2016; Javanmardi et al., 2019). Existen muchos tratamientos antimicrobianos para estas bacterias; sin embargo, muchas cepas han desarrollado resistencias a múltiples antibióticos, lo cual supone una gran amenaza para la Salud Pública mundial. De hecho, debido a sus implicaciones sanitarias, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha declarado el caso de cepas de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenemas como patógenos de Prioridad 1 (crítica) para la búsqueda de nuevos antibióticos que le hagan frente (Tacconelli et al., 2018).

### ***Pseudomonas* y plantas**

Muchas *Pseudomonas* son capaces de colonizar hojas, tallos o raíces de plantas, donde viven de los nutrientes que estas les proporcionan (Xin et al., 2018; Carroll et al., 2020; Jiménez-Gómez et al., 2020). Para ello, tanto las *Pseudomonas* promotoras del crecimiento vegetal (PGP), como las fitopatógenas, han conseguido adaptarse al ambiente del hospedador, de manera que son capaces de evadir, tolerar o manipular las defensas de la propia planta (Pfeilmeier et al., 2016; Xin et al., 2018).

Entre estas últimas, destaca *P. syringae*, una especie capaz de infectar a multitud de cultivos; de hecho, existen más de 60 patovares distintos de esta especie (Xin et al., 2018). Esta bacteria es capaz de dañar a las plantas mediante la nucleación del hielo en las hojas, lo cual causa su

congelación a temperaturas superiores a las habituales (Xin et al., 2018). Además, *P. syringae* se caracteriza por la producción de fitotoxinas (syringomicina, coronatina) y de efectores tóxicos que inyecta en su organismo diana a través del sistema tipo III (T3SS) de secreción (Vargas et al., 2013; Nahar et al., 2020).

Por otro lado, tal y como se ha comentado, también existen *Pseudomonas* beneficiosas para las plantas. Entre estas, destaca *P. fluorescens*, quien, a diferencia de *P. syringae*, suele habitar las raíces y rizosferas, donde promueve el crecimiento de la planta a través de distintos mecanismos: (I) producción de hormonas de crecimiento vegetal y desarrollo radicular (auxinas, giberelinas y citoquinas); (II) inhibición del crecimiento de algunos microorganismos patógenos mediante la síntesis de antimicrobianos y sideróforos; (III) facilitación de la adquisición de nutrientes por la planta, como hierro o fosfato, mediante su quelación o solubilización, respectivamente, y (IV) protección de la planta frente a distintos estreses (Salomon et al., 2014; Barahona et al., 2016; Großkinsky et al., 2016; Meliani et al., 2017; MacLean et al., 2020; Rawat et al., 2020; Durán et al., 2021). Además de *P. fluorescens*, también existen otras *Pseudomonas* con acciones PGP, como *P. chlororaphis*, *P. brassicacearum*, *P. monteilii*, entre muchas otras (Biessy y Filion, 2018; Panichikkal et al., 2019; Jiménez-Gómez et al., 2020).

A pesar de la multitud estudios existentes sobre algunas especies del género, aún quedan muchos mecanismos e interacciones *Pseudomonas*-planta por descubrir (Levy et al., 2018a). Muchos estudios no-dependientes de cultivo revelan que este es uno de los géneros predominantes en los distintos tejidos de muchas plantas (Compant et al., 2019; Trivedi et al., 2020; Chiniquy et al., 2021; Kumar et al., 2021). Por lo tanto, el estudio de las funciones de las distintas *Pseudomonas* en las plantas puede tener importantes aplicaciones en la mejora agrícola.

### ***Pseudomonas* e insectos**

Algunas de las especies de *Pseudomonas* comentadas en el apartado anterior, a pesar de no vivir asociadas a insectos, son capaces de interactuar con ellos de forma que, directa (producción de metabolitos tóxicos para el insecto) o indirectamente (inducción de respuesta sistémica en la planta), tengan un efecto protector frente a insectos patógenos de las plantas (David et al., 2018; Martín-Rivilla et al., 2020; Vesga et al., 2020).

Entre las *Pseudomonas* entomopatógenas, una de las más estudiadas es *P. entomophila*, especie capaz de infectar a insectos de distintos órdenes (Vodovar et al., 2006, Mulet et al., 2012). Su patogenicidad deriva principalmente de la producción de toxinas, algunas de ellas hemolíticas (Vallet-Gely et al., 2010; Opota et al., 2011, Dieppois et al., 2015). Además de *P. entomophila*, *P. protegens* se caracteriza por tener propiedades similares (Vesga et al., 2020). De la misma manera, también han sido descritas otras muchas especies con distintos mecanismos de entomopatogenicidad (Flury et al., 2016).

A diferencia de los casos de especies entomopatógenas, no existe mucha investigación al respecto de interacciones beneficiosas entre *Pseudomonas* e insectos. Sin embargo, diversos estudios indican que las bacterias de este género aparecen asociadas a la microbiota normal de diversos insectos (Menéndez et al., 2015; Berasategui et al., 2016; Pennington et al., 2017; Dada et al., 2018; Fabryová et al., 2018; Kakumanu et al., 2020; Saati-Santamaría et al., 2021). Por lo tanto, existe un vacío de conocimiento al respecto que debe ser investigado para una mayor comprensión de la ecología de los insectos.

### **Ecología y funciones de *Pseudomonas* como inspiración de aplicaciones industriales**

Al igual que para otros microorganismos, las capacidades metabólicas de *Pseudomonas* pueden ser y son aplicadas en distintas industrias de base biotecnológica. Entre estas aplicaciones, destaca la utilización de cepas o sus enzimas para la degradación de moléculas contaminantes, como las que componen detergentes (Phukon et al., 2020), colorantes (Telke et al., 2010; Fabryová et al., 2018) y petróleo (Varjani y Upasani, 2016; Huang et al., 2021). También pueden ser utilizadas para producir compuestos de interés, como rhamnolípidos (Zhao et al., 2021), isobutanol (Ankenbauer et al., 2021), poli-hidroxicanoatos (PHAs) (Pereira et al., 2021) o protocatecuato (Li et al., 2021a), entre muchas otras (Schwanemann et al., 2020). Otro tipo de valiosas moléculas producidas por *Pseudomonas* son aquellas con efectos antimicrobianos, anticarcinogénicos, antivíricos u otras acciones biológicas, como el 2,4-diacetilfluoroglucinol (DAPG), las pioverdinas, la mupirocina (ácido pseudomónico A), la safracina, las poeamidas, o muchos tipos de péptidos no ribosomales (NRPs), policétidos y lipopéptidos (Gross y Loper, 2009; Nguyen et al., 2016; Gutiérrez-García et al., 2017; Schwanemann et al., 2020). Sin embargo, aunque se conozcan algunos metabolitos secundarios de estas bacterias, como los ya citados, se estima que existe una gran cantidad por descubrir, muchos debido a que no son producidos en las condiciones habituales de cultivo (Palazzotto y Weber, 2018)

La búsqueda de nuevas cepas de *Pseudomonas* con las citadas acciones o actividades puede realizarse en base al estudio de sus funciones ecológicas. Por ejemplo, pueden buscarse nuevos antibióticos a través del estudio de las interacciones antagónicas entre *Pseudomonas* y otros organismos (Lanteigne et al., 2012), o pueden buscarse enzimas que degradan compuestos difíciles de degradar mediante el aislamiento y/o estudio del metabolismo de *Pseudomonas* en ambientes contaminados (Fabryová et al., 2018; Das et al., 2020). De esta manera, es posible que se descubran nuevas aplicaciones biotecnológicas con *Pseudomonas* tras recientes o futuros hallazgos metabólicos y/o ecológicos en bacterias de este género.

### **Técnicas -ómicas en el estudio de funciones bacterianas, su ecología y sus aplicaciones**

Las *Pseudomonas* y, en general, las bacterias, realizan sus funciones a nivel microscópico. Por lo tanto, su estudio muchas veces sólo es posible mediante técnicas de detección moleculares muy sensibles. Entre éstas destacan la secuenciación masiva de ADN o la espectrometría de masas. Mediante estas técnicas pueden estudiarse los (meta)genomas, (meta)transcriptomas, (meta)proteomas y metabolomas de un organismo o de muestra biológica con todos sus microorganismos (microbiota) (López-Mondéjar et al., 2017; Nguyen et al., 2020; Saati-Santamaría et al., 2021).

La obtención, anotación y análisis de los genomas permite realizar predicciones sobre las funciones potenciales que tiene un determinado organismo (Ruiz-Pérez et al., 2021). Por ejemplo, permite buscar genes que hayan sido descritos para la producción de moléculas y enzimas de interés (Blin et al., 2019). Cuando estudiamos el metagenoma de una muestra, es decir, el conjunto de genomas de todos los organismos allí presentes, podremos estudiar las posibles funciones de cada uno de los microorganismos, así como sus comunidades (Fadiji y Babalola, 2020).

Mediante la tecnología de RNA-Seq pueden estudiarse todos genes que se están transcribiendo en un determinado momento, bien sea de un solo organismo (transcriptómica) o de todos los que haya en una determinada muestra (metatranscriptómica). Este método nos dará información más fiable sobre las funciones que podrá tener una bacteria en un determinado nicho o ambiente, ya que no todos los genes son necesariamente expresados en unas determinadas circunstancias (Bashiardes et al., 2016).

El caso de la (meta)proteómica es similar, pero todavía más preciso en cuanto a la información ecológica que proporciona. Puesto que existe un tipo de regulación post-transcripcional, no todos los genes o transcritos darán lugar a la producción de su proteína final. De esta manera, la (meta)proteómica permite conocer qué proteínas han sido sintetizadas en un determinado momento (Starke et al., 2021).

Finalmente, el estudio de los metabolitos de una muestra (metabolómica) podrá ser utilizado para conocer a un nivel más íntimo las relaciones moleculares existentes entre un microorganismo y su hábitat u hospedador (Kelly et al., 2018; Sarma et al., 2020).

La comparación y/o integración de todas estas técnicas permite realizar un estudio holístico de las funciones de un determinado microorganismo en su entorno (Chen et al., 2018). La implementación de estas metodologías ha supuesto un antes y un después en la Microbiología, ya que ha permitido conocer de forma mucho más precisa y exacta el metabolismo microbiano. Por ejemplo, han podido estudiarse genes implicados en la interacción de *Pseudomonas* con seres humanos, plantas, animales y ambientes gracias al uso de la genómica (Levy et al., 2018b; Saati-Santamaría et al., 2018; Freschi et al., 2019; Jiménez-Gómez et al., 2020), al igual que ha sido

posible una búsqueda guiada de metabolitos bacterianos (Nguyen et al., 2016; Kenshole et al., 2021).

En este contexto, en la presente Tesis doctoral se hará uso de distintas técnicas -ómicas para el estudio del metabolismo, ecología, funciones y taxonomía de bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas*.





# *Objetivos*



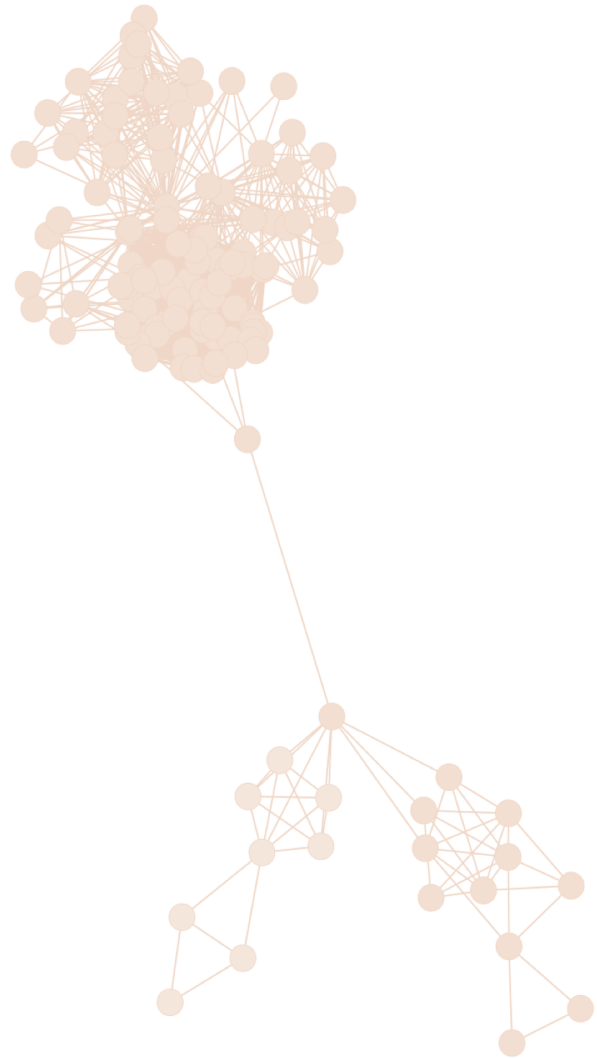


## Objetivos

En la presente tesis doctoral se planteó como objetivo general profundizar en el conocimiento del metabolismo, funciones, ecología y taxonomía de bacterias del género *Pseudomonas*. Para lograr este objetivo general se propusieron los siguientes objetivos específicos:

- I. Determinar los principales sistemas metabólicos que utilizan las bacterias del género *Pseudomonas* para producir metabolitos secundarios de interés ecológico e industrial.
- II. Estudiar los patrones evolutivos de los principales sistemas metabólicos que utilizan las bacterias del género *Pseudomonas* para producir metabolitos secundarios
- III. Determinar especies del género *Pseudomonas* con potencial interés en cuanto a su posible capacidad para producir metabolitos secundarios no descritos.
- IV. Realizar un estudio genómico y metabólico de las interacciones antagónicas de *Pseudomonas* aisladas de escarabajos de la corteza frente a otros microorganismos.
- V. Analizar el diálogo molecular existente en la interacción *Pseudomonas*-planta.
- VI. Estudiar la capacidad de bacterias del género *Pseudomonas* como agentes de biocontrol de los principales microorganismos fitopatógenos de sus cultivo hospedadores.
- VII. Estudiar el efecto de la inoculación de *Pseudomonas* promotoras del crecimiento de las plantas sobre la microbiota endofítica de la planta.
- VIII. Analizar genes, proteínas y funciones de *Pseudomonas* asociadas con los distintos estilos de vida, hábitats y hospedadores de las bacterias de este género.
- IX. Revisar la organización taxonómica del género *Pseudomonas* en base al estudio de los genomas de la mayoría de las cepas tipo de las especies descritas dentro del mismo y reorganizar el género en función de los resultados obtenidos.





# *Materialles y Métodos*



## 1. Aislamiento de cepas bacterianas

A partir de escarabajos de la corteza de las especies *Ips cembrae*, recolectado a partir de sus galerías en ramas de *Larix decidua*, *Xylocleptes bispinus*, recogido en su hospedador *Clematis vitalba* e *Ips acuminatus* y *Pityogenes bidentatus*, ambos recogidos de *Pinus sylvestris*, se realizó un proceso de aislamiento de cepas bacterianas. Las muestras de insectos se recogieron en mayo del 2016 en la localidad de Stará Boleslav (Chequia; coordenadas: 50°12'59.5" N, 14°41'58.4" E). Ramas de estos árboles con orificios de entrada de los insectos se transportaron al laboratorio, donde se retiró su corteza en condiciones de asepsia, dejando al descubierto a los escarabajos en el interior de sus galerías. Se recogieron escarabajos adultos y se dividieron en 5 grupos de 3 individuos cada uno. Los escarabajos se machacaron en 500 µl de agua estéril con pequeños morteros previamente esterilizados en autoclave. Se realizaron diluciones seriadas con las suspensiones de escarabajo obtenidas y se extendieron 100 µl de cada una en placas de Petri con distintos medios: agar nutritivo (AN; Sigma), *Tryptose Soy Agar* (TSA; Difco), medio JMM (O'Hara et al., 1989) o medio con extracto de levadura y celulosa (García-Fraile et al., 2007). Se incubaron las placas a 28°C durante 2 semanas. Las colonias emergentes de distintas morfologías se sembraron en nuevas placas hasta obtener cultivos puros. Las cepas alisadas se guardaron en una solución de glicerol estéril (20%) a -80°C y fueron resembradas en su correspondiente medio de aislamiento.

## 2. Extracción de ADN bacteriano

En los casos en los que se ha necesitado ADN genómico bacteriano para la realización de pruebas de amplificación de regiones genómicas por PCR, se ha seguido el siguiente protocolo de extracción:

1. Suspender biomasa bacteriana en 50 µl tampón de lisis (0,2g NaOH, 0,25g dodecilsulfato sódico (SDS)).
2. Agitar con vortex (2-3 segundos)
3. Calentar a 95°C durante 15 minutos en termoblock (J.P-Selecta™).
4. Centrifugar 10 minutos a 13.000 rpm
5. Diluir 10 µl del sobrenadante en 90 µl de agua estéril (ultrapura, filtrada con filtros Milli-Q®)

En los casos en los que se ha precisado ADN de bacterias para la secuenciación de sus genomas a través de plataformas de secuenciación masiva, se ha utilizado el kit ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep (Zymo Research®).

### 3. Evaluación de la cantidad y calidad del ADN bacteriano

La calidad del ADN se evaluó a través de 2 parámetros: (i) su integridad y (ii) su grado de pureza. El grado de pureza se midió a través de los ratios de absorbancia a 260/280 y a 260/230 nm con un espectrofotómetro NanoDrop™. El ADN tiene su máxima absorbancia a 260 nm, las proteínas a 280 nm y muchos compuestos orgánicos a 230 nm. Así pues, se consideraron los ratios de 260/280 nm y 260/230 nm mayores o iguales a 1,8 como indicadores de baja contaminación de las muestras, es decir, de alto grado de pureza del ADN.

La integridad del ADN se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa (1% en Tris, acetato y EDTA (TAE)). Antes de la solidificación del gel se añadió un 0.002% del reactivo MIDORI<sup>Green</sup> Advance (NIPPON Genetics EUROPE), el cual se intercala en el ADN y emite fluorescencia al excitarse con luz ultravioleta (UV). En el gel se cargaron las muestras correspondientes de ADN (2 µl ADN + 2 µl de tinte de frente de avance (DNA Gel Loading Dye (6X), Thermo Fisher Scientific™)) y también una muestra de referencia conteniendo 2 µl de GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific™). La presencia de bandas de tamaño pequeño en el frente del gel se asoció con degradación del ADN, mientras que la presencia exclusiva de ADN en las regiones correspondientes a altos pesos moleculares se asoció con una buena integridad de la muestra.

Para evaluar la cantidad del ADN se utilizaron dos métodos. El primero, y menos preciso, se realizó mediante visualización del ADN tras electroforesis en gel de agarosa siguiendo la metodología detallada previamente, comparando la cantidad de ADN de la muestra con las bandas del reactivo GeneRuler 1 kb DNA Ladder, para el cual tenemos una concentración conocida de ADN en cada banda. El segundo, y más preciso, se realizó a través de medidas de fluorescencia con Qubit (Invitrogen™), utilizando los kits Qubit dsDNA HS Assay o Qubit dsDNA BR Assay, que contienen moléculas fluorescentes de que se unen al ADN y permiten su cuantificación por espectrofotometría, siguiendo las instrucciones del fabricante.

### 4. Amplificación del gen 16S ARNr mediante PCR y secuenciación

Para realizar la amplificación del gen 16S ARNr se empleó el mix REExtract-N-Amp PCR Ready Mix™ (Sigma), el cual contiene un tampón para la reacción, sales, desoxinucleótidos y la enzima Taq ADN polimerasa. Los oligonucleótidos 27F y 1522R fueron usados para la reacción de amplificación (Díez-Méndez et al., 2019). El tamaño del amplicón resultante se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa según lo descrito en el apartado anterior. El producto de cada PCR fue purificado mediante el GeneJET Gel Extraction and DNA Cleanup Micro Kit (Thermo Fisher Scientific™). El amplicón purificado se secuenció a través el servicio de secuenciación de DNA de NUCLEUS (<https://nucleus.usal.es/>), haciendo uso del kit Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit y utilizando un equipo de secuenciación ABI PRISM (Applied Biosystem®, EEUU).

## 5. Identificación de secuencias de nucleótidos

La identificación de genes se realizó mediante la comparación de su secuencia nucleotídica frente a otros genes de la base de datos del NCBI a través de BLASTn (utilizando los parámetros determinados por defecto). En los casos en los que se pretendía identificar una cepa mediante la comparación de la secuencia de su gen 16S ARNr, se activó la opción de buscar sólo frente a secuencias nucleotídicas de cepas tipo. En estos casos, se compararon los resultados con las identificaciones realizadas a través de la herramienta de identificación del gen ribosómico 16S ARN de la plataforma EzBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net/>).

## 6. Secuenciación y ensamblaje de genomas bacterianos

La secuenciación de los genomas bacterianos se realizó en una plataforma Illumina Miseq de 2x250 pb. Para el ensamblaje del genoma se procesaron las secuencias en formato *FASTQ* con diversos scripts que incluyen funciones de los programas Khmer (Crusoe et al., 2015), Velvet (v1.2.10) (Zerbino y Birney, 2008) y Bowtie2 (Langmead y Salzberg). Como resultado, se generaron distintos ensamblajes, de los cuales se seleccionó el que contenía mejores valores de ensamblaje (bajo número de contigs, N50, etc).

## 7. Descarga de genomas de bacterias del género *Pseudomonas*

En los casos necesarios, los genomas de distintas cepas bacterianas fueron descargados de la base de datos de genomas del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>)

Con el objetivo de estudiar el metabolismo secundario y la filogenia del género *Pseudomonas*, se descargaron los genomas públicos de cepas tipo de bacterias del género *Pseudomonas* disponibles en el NCBI (web) (en junio de 2020 para el estudio del metabolismo secundario y en septiembre de 2020 para el estudio filogenético). Estas descargas se realizaron en formato “fasta nucleótidos”. Se comprobó que todas las cepas eran realmente cepas tipo de cada especie mediante consulta de la web *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature* (LPSN, <https://lpsn.dsmz.de/>). Todos aquellos genomas duplicados fueron eliminados.

La descarga de genomas para el proceso de genómica comparativa aparece detallada en el apartado 16.1 de Materiales y Métodos.

## 8. Predicción de genes y anotación funcional de genomas.

Los genomas utilizados en la presente tesis doctoral fueron anotados con RAST (v2.0) (Aziz et al., 2008), bien a través de la web del programa, o bien a través de la línea de comandos. De la misma

manera, se descargaron los genomas una vez anotados con RAST. Para ello, se utilizaron scripts públicos (<https://github.com/nselem/myrast>). Brevemente, los comandos utilizados fueron los siguientes:

Para activar el docker de MyRAST:

```
docker run -i -t -v $(pwd):/home nselem/myrast /bin/bash
```

Para subir genomas a RAST:

```
svr_submit_RAST_job --user (USUARIO) --passwd (CONTRASEÑA) --fasta  
genoma.fna --domain Bacteria --bioname "nombre del genoma" --genetic_code  
11 --gene_caller rast
```

Descargar genomas de RAST:

```
cut -f1 Rast_ID | while read line; do svr_retrieve_RAST_job USUARIO  
CONTRASEÑA $line genbank > $line.gbk ; done
```

Donde “RAST\_ID” representa un archivo que contiene los identificadores de cada genoma según RAST.

Además, con el objetivo de profundizar en la anotación funcional de cada genoma, se utilizaron distintos programas, como eggNOG-Mapper (v5) (Huerta-Cepas et al., 2019), KoFamKOALA (Aramaki et al., 2020), InterProScan (Jones et al., 2014), Cello (Yu et al., 2006) o, en casos más concretos, los enumerados en siguientes apartados de Materiales y Métodos.

En el caso de anotaciones estructurales y funcionales de genomas que hayan sido utilizados en procesos de genómica comparativa, estos han sido anotados con prokka (Seemann, 2014) debido a una mayor compatibilidad de archivos con otros programas (ver apartado 14).

## 9. Evaluación de la calidad de los genomas.

La calidad de los genomas fue evaluada con QCAST (v5.0.2) (Gurevich et al., 2013) y con BUSCO (v4.0.6) (Simão et al., 2015).

## 10. Análisis de la diversidad de metabolitos secundarios codificados en los genomas de *Pseudomonas*.

El programa antiSMASH (v5.1.2) (Blin et al., 2019) fue utilizado para predecir y analizar conjuntos de genes biosintéticos (BGCs) relacionados con el metabolismo secundario. Se ejecutó el programa de forma local aplicando el siguiente comando para cada genoma:



```
antismash --fullhmm --cb-general --cb-subclusters --cb-knownclusters --
asf --pfam2go --genefinding-tool none --output-dir
"directorio_para_resultados" "genoma_para_annotar.gbk" -c 6
```

Las distancias entre cada BGC anotado por antiSMASH se estudiaron a través de redes de similitud de secuencias (SSNs, *Sequence Similarity Networks*) generadas con el programa BiG-SCAPE (*Biosynthetic Gene Similarity Clustering and Prospecting Engine*) (Navarro-Muñoz et al., 2020) (v1.0.1), en modo “auto”, comparando los BGCs de entrada frente a los BGCs disponibles en la base de datos de MIBiG (v1.4) (Medema et al., 2015) y combinando todos los tipos de BGCs en una sola SSN. La filogenia de las familias de BGCs (GCFs, *Gene Cluster Families*) se realizó con CORASON (*CORe Analysis of Syntenic Orthologs to prioritize Natural Product Biosynthetic Gene Clusters*), un programa que también está integrado en el flujo de trabajo de BiG-SCAPE. Los archivos de entrada para este programa fueron los BGCs de salida de antiSMASH en formato *GeneBank*. Se utilizó el siguiente comando:

```
~/bin/run_bigscape Carpeta_con_BGCs/ Carpeta_de_resultados --mode auto --
mibig --mix
```

Las SSN generadas fueron visualizadas en Cytoscape (v3.7.2) (Shannon et al., 2003). Las anotaciones de los BGCs generadas por BiG-SCAPE se añadieron a las redes de Cytoscape. Los BGCs obtenidos de MIBiG se anotaron según los datos de esta base de datos.

## 11. Estudio del metabolismo secundario derivado del metabolismo de los lípidos

Con el objetivo de investigar una posible evolución de funciones metabólicas relacionadas con el metabolismo lipídico hacia la biosíntesis de metabolitos secundarios, se buscaron expansiones enzimáticas con la herramienta EvoMining y se estudió su posible implicación con el metabolismo secundario (Sélem-Mojica et al., 2019). Para ello, se utilizaron las secuencias de aminoácidos de enzimas que fueron seleccionadas de la siguiente manera:

- I) Se construyó un pan-genoma con los 194 genomas del estudio a través de Proteinortho (v6.0.16) (Lechner et al., 2011). Las proteínas se agruparon con un 70% de similitud. Los archivos de entrada fueron los genomas anotados por RAST en formato fasta aminoácidos. Se utilizó el siguiente comando:

```
proteinortho -project=nombre_del_proyecto -verbose -keep -sim=0.70 -
singles -cpu=6 -clean *.faa
```

- II) Las proteínas del genoma de *P. aeruginosa* DSM 50071<sup>T</sup>, especie tipo del género *Pseudomonas*, fueron anotadas a través de eggNOG-mapper (v5) (Huerta-Cepas et al., 2019). Todas las proteínas anotadas con la categoría COG “*lipid transport and metabolism*” fueron pre-seleccionadas.

III) Se cruzaron los datos del pangenoma generado con Proteinortho y las proteínas seleccionadas. De estas proteínas, se seleccionaron aquellas pertenecientes a grupos de ortólogos con más de 194 copias dentro de este pan-genoma.

Las proteínas seleccionadas conformaron la base de datos del metabolismo central para EvoMining, la cual se etiquetó como “CENTRALlipid\_DB”. La base de datos se configuró con los 194 genomas anotados por RAST en formato fasta aminoácidos. Los archivos .gbk de los BGCs anotados por antiSMASH representaron la base de datos de antiSMASH. Para la correcta conformación de esta base de datos se optimizaron una serie de pasos que han sido recogidos y explicados con detalle en el siguiente repositorio: <https://github.com/nselem/evomining/wiki/Databases-Conformation>. Para ello, hay que ejecutar el siguiente script en un directorio que contenga las carpetas de resultados de antiSMASH para todos los genomas del estudio:

```
perl antiSMASH_DB.pl > antiSMASH_DB
```

Este comando generará un archivo delimitado por tabulaciones que contendrá el “Job ID” del genoma en RAST (primera columna), el localizador del gen (segunda columna), el tipo de BGC al que pertenece el gen (tercera columna) y el nombre del archivo del BGC (cuarta columna) (ver Figura 2 como ejemplo).

862794	6666666.573973.99	NRPS	NZ_FNCO01000001.region001
862794	6666666.573973.100	NRPS	NZ_FNCO01000001.region001
862794	6666666.573973.101	NRPS	NZ_FNCO01000001.region001
862794	6666666.573973.102	NRPS	NZ_FNCO01000001.region001
862794	6666666.573973.103	NRPS	NZ_FNCO01000001.region001
862794	6666666.573973.104	NRPS	NZ_FNCO01000001.region001
862794	6666666.573973.105	NRPS	NZ_FNCO01000001.region001
862794	6666666.573973.106	NRPS	NZ_FNCO01000001.region001
862794	6666666.573973.107	NRPS	NZ_FNCO01000001.region001
862794	6666666.573973.108	NRPS	NZ_FNCO01000001.region001
862794	6666666.573973.3513	bacteriocin	NZ_FNCO01000008.region001
862794	6666666.573973.3514	bacteriocin	NZ_FNCO01000008.region001
862794	6666666.573973.3515	bacteriocin	NZ_FNCO01000008.region001
862794	6666666.573973.3516	bacteriocin	NZ_FNCO01000008.region001
862794	6666666.573973.3517	bacteriocin	NZ_FNCO01000008.region001
862794	6666666.573973.3518	bacteriocin	NZ_FNCO01000008.region001
862794	6666666.573973.3519	bacteriocin	NZ_FNCO01000008.region001
862794	6666666.573973.3520	bacteriocin	NZ_FNCO01000008.region001
862794	6666666.573973.3521	bacteriocin	NZ_FNCO01000008.region001
862794	6666666.573973.3522	bacteriocin	NZ_FNCO01000008.region001
862794	6666666.573973.3523	bacteriocin	NZ_FNCO01000008.region001
862794	6666666.573973.3524	bacteriocin	NZ_FNCO01000008.region001
862794	6666666.573973.3525	bacteriocin	NZ_FNCO01000008.region001
862794	6666666.573973.3526	bacteriocin	NZ_FNCO01000008.region001
862794	6666666.573973.3527	bacteriocin	NZ_FNCO01000008.region001
862795	6666666.573974.502	betalactone	NZ_NTMR01000002.region001
862795	6666666.573974.503	betalactone	NZ_NTMR01000002.region001

Figura 2. Captura de una fracción del archivo antiSMASH\_DB.

Los árboles filogenéticos resultantes de ejecutar EvoMining fueron visualizados en Microreact (Argimón et al., 2016), donde se subieron los archivos .tsv (anotación) y .nwk (estructura del árbol) correspondientes.

## 12. Anotación y análisis de péptidos antimicrobianos

Se utilizó el programa MACREL (*Meta(genomic) AMPs Classification and REtrieval*) (v0.4.0) (Santos-Junior et al., 2020) de forma local para predecir los péptidos antimicrobianos (AMPs, *Antimicrobial Peptides*) codificados en cada genoma bacteriano. Este programa es capaz de detectar AMPs y clasificarlos según sean catiónicos o aniónicos; lineales o con puentes disulfuro; y según el potencial de que sean hemolíticos o no hemolíticos. Las secuencias peptídicas de los AMPs se agruparon en un único archivo fasta aminoácidos que fue utilizado como entrada para el programa EFI-EST (Zallot et al., 2019), el cual generó una SSN que se subió a Cytoscape para la visualización de las relaciones, similitudes y diferencias entre cada uno de los AMPs. Se probaron distintos parámetros para generar las SSNs hasta encontrar los que arrojaron los resultados más confiables: tipo de filtro: *E-value*; valor del filtro: 8. La red se anotó manualmente según el tipo de AMP correspondiente.

Los AMPs predichos se compararon, a través de BLASTP, frente a una base de datos propia compuesta por 23,008 AMPs ya descritos. Esta base de datos se construyó en base a los AMPs disponibles (a fecha 23 de agosto de 2020) en toda la base de datos DRAMP (Kang et al., 2019) y en la base de datos APD3 (Wang et al., 2016).

## 13. Filogenia e índices de similitud entre genomas

### 13.1. Filogenia basada en el gen 16S ARNr y en genes *housekeeping*.

Previamente a la construcción de los árboles filogenéticos, se ha realizado un alineamiento de las secuencias de nucleótidos problema con ClustalW (Li, 2003) a través del programa MEGA7 (Kumar et al., 2017). En el caso de alineamientos múltiples de genes, las secuencias de cada uno de ellos fueron concatenadas en una única secuencia por cepa y, después del alineamiento, las regiones intermedias que no tuvieron representación de todas las cepas del estudio fueron recortadas. Una vez creado el alineamiento, se realizó la construcción de los árboles filogenéticos, bien a través del método *Neighbor-Joining* (Saitou y Nei, 1987) o del *Maximum Likelihood* (Rogers y Swofford), utilizando 1000 réplicas de *bootstrap* para el test aplicado y utilizando los modelos *Tamura-Nei* o *Kimura 2-parameter model* (Kumar et al., 2017).

En los casos necesarios se creó un árbol filogenético con secuencias de genomas mediante el programa UBGC (*Up-to-date Bacterial Core Gene*) (v3.0) (Na et al., 2018), el cual extrae, concatena y alinea hasta 92 genes *housekeeping* de cada genoma para construir un árbol

filogenético basado en esta alineación. Se empleó el programa FastTree para la construcción del árbol. Para ello, se utilizó un comando para dar formato a cada genoma (a) y otro comando para la construcción del árbol (b):

```
a) java -jar UBCG.jar extract -bcg_dir bcg/ -i genoma.fasta -label "nombre_de_la_cepa"
```

```
b) java -jar UBCG.jar align -bcg_dir directorio_con_archivos_bcg -prefix "nombre_del_proyecto"
```

Se utilizó el programa Interactive Tree Of Life (iTOL) tool (v4) (Letunic et al., 2019) para visualizar el árbol filogenético y añadir los metadatos relativos a cada genoma.

### 13.2. Análisis de similitud entre las secuencias nucleotídicas de genomas

Las distancias entre las secuencias genómicas han sido medidas mediante el cálculo de los índices OGRIs.

El programa PYANI (v0.2.10) (Pritchard, 2016) se utilizó para realizar el cálculo de los valores de ANIb compartidos entre genomas. Para ello, fue ejecutado el siguiente comando:

```
average_nucleotide_identity.py -i directorio_con_genomas_fasta/ -o output/ -m ANIb -g
```

Para obtener los valores de dDDH se utilizó el programa GGDC (v2.1), disponible online a través de la web de la DSMZ (<http://ggdc.dsmz.de/ggdc.php#>) (Auch et al., 2010; Meier-Kolthoff et al., 2013).

### 13.3. Filogenia, evolución y anotación de los árboles filogenéticos basados en el metabolismo secundario

Como resultado del procesamiento de BiG-SCAPE / CORASON se generaron árboles filogenéticos de cada GCF detectada (Apartado 9 de Materiales y Métodos). En paralelo, utilizando UBCG, se crearon árboles filogenéticos con cada una de las especies presentes en los árboles de las GCFs. Ambos árboles se enfrentaron y compararon a través de tanglegramas con el programa Dendroscope (v3.7.2) (Huson et al., 2007).

#### 14. Construcción de pangenomas

Los distintos grupos de genomas sobre los que se han querido crear pangenomas han sido anotados con prokka (v1.14.6) (Seemann, 2014), utilizando el siguiente comando:

```
prokka --kingdom Bacteria --outdir directorio_output/ --genus Pseudomonas --centre X --cpus 0 --prefix nombre_cepa genoma.fna
```

Una vez anotados los genomas, se usaron los archivos en formato GFF (*Gene Feature Format*) para hacer los cálculos del pangenoma y los análisis de genómica comparativa. Para ello, ejecutamos PPanGGOLiN (v1.1.96) siguiendo las instrucciones de los desarrolladores (<https://github.com/labgem/PPanGGOLiN>) y utilizando los valores por defecto en cada paso del proceso salvo para el agrupamiento de proteínas de MMSeq2, para el cual se eligió un porcentaje de identidad del 70%.

Se utilizaron scripts del programa PpanGGOLiN para generar matrices de presencia y ausencia de familias proteicas.

Se ejecutó el script roary\_plots.py (<https://sanger-pathogens.github.io/Roary/>) para generar gráficas de los pangenomas, utilizando como base un árbol filogenético construido con el programa UBCG (ver apartado 13.1 de Materiales y Métodos).

#### 15. Estudios de genómica comparativa y de asociación GWAS (*Genome Wide Association Studies*)

Para estudiar la asociación de genes, proteínas o funciones con las variables categóricas de las bacterias en cuestión (grupo filogenético, nicho/hospedador del que han sido aisladas...) se utilizó el programa Scoary (v1.6.16) (Brynildsrud et al., 2016). Para ello, se utilizó como entrada una matriz de presencia/ausencia de genes/proteínas/funciones en cada genoma y una tabla delimitada por comas (.csv) codificada en código binario (0-1) de manera que se asigna cada genoma con un metadato correspondiente. En el caso de la búsqueda de asociación de genes con linajes taxonómicos, se utilizó un árbol filogenético creado con UBCG (ver apartado 13.1 de Materiales y Métodos) como base para los cálculos. Los cálculos estadísticos se realizaron utilizando un valor-p ajustado con el método de Benjamini-Hochberg's (BH) para la corrección de comparaciones múltiples (Benjamini y Hochberg, 1995). Las tablas de resultados se investigaron para seleccionar únicamente aquellos datos con valores menores del límite elegido para el valor-p (corrección BH), el cual fue 0.01 para las comparaciones de CAZys y AMRs, y menor a  $10^{-6}$  para comparar proteínas y funciones COG.

## 16. Estudio de asociación de genes y funciones entre *Pseudomonas* y sus distintos nichos de aislamiento

### 16.1. Obtención de genomas y metadatos. Filtrado de datos.

Un total de 11.167 genomas de bacterias del género *Pseudomonas* fueron descargados con sus metadatos de las bases de datos JGI-IMG (<https://img.jgi.doe.gov/>), *Pseudomonas* Genome DB (<https://www.pseudomonas.com>), EzBioCloud Genome Database (<https://help.ezbiocloud.net/ezbiocloud-genome-database/>) y NCBI genome database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/>). La lista de genomas fue inspeccionada manualmente para eliminar todos aquellos genomas que no tuviesen información concisa sobre el nicho u hospedador del que habían sido aisladas sus bacterias o que, según el nombre de la cepa, fuesen redundantes entre genomas de distintas bases de datos.

Los genomas fueron anotados estructural y funcionalmente con prokka (Seemann, 2014) según lo descrito en el apartado 14 de Materiales y Métodos. La calidad de los genomas fue evaluada según lo detallado en el apartado 9 de Materiales y Métodos. Los genomas con una completitud menor al 95% y/o muy fragmentados fueron eliminados del estudio.

Se generó un árbol filogenético con todos los genomas restantes con el programa UBCG según lo detallado en el apartado 13.1 de Materiales y Métodos. La filogenia fue visualizada con el programa iTOL (Letunic et al., 2019), donde se seleccionaron genomas que eran muy distantes en el árbol filogenético y se eliminaron del análisis. Se creó un nuevo árbol filogenético con los genomas restantes y se visualizó, junto con sus metadatos, de nuevo en iTOL.

### 16.2. Construcción del pangenoma.

Fue realizada según lo descrito en el apartado 14 de “Materiales y métodos”.

### 16.3. Anotaciones funcionales adicionales

Los distintos genomas o proteínas fueron anotados con dbCAN2 (Zhang et al., 2018) para buscar enzimas relacionadas con el metabolismo de carbohidratos (CAZys). Se utilizó el siguiente comando:

```
run_dbcan.py genoma.faa protein --out_dir directorio_resultados --db_dir /home/zaki/db
```

Los resultados de cada genoma fueron filtrados para retener sólo aquellas CAZys que fueran detectadas por al menos 2 de los 3 algoritmos (HMMER, Diamond y HotPep) que emplea el programa.

La búsqueda de proteínas relacionadas con la resistencia a antimicrobianos, biocidas y otros estreses abióticos fue realizada mediante la anotación de las secuencias representantes de los grupos de proteínas ortólogas (obtenidas con PPanGGOLiN) a través del programa AMRFinderPlus (v3.9.8) (<https://github.com/ncbi/amr>). El siguiente comando fue utilizado:

```
amrfinder -p secuencias.faa -o resultados --plus
```

Los posibles eventos de transferencia horizontal de genes (HGT) se estimaron mediante el programa HGTector (v2.9b3) (Zhu et al., 2014) a través de la siguiente línea de comandos:

```
hggtecor search -i secuencias.faa -o resultados -m diamond -p 0 -d hgtdb/diamond/db -t hgtdb/taxdump -evaluate 1e-10 --tax-unirank species
```

La búsqueda de péptidos señal se realizó a través de SignalP (v5.0b) (Armenteros et al., 2019) utilizando el siguiente comando:

```
signalp -fasta secuencias.faa -org gram- -format short -prefix nombre_output.faa
```

Los resúmenes de anotaciones por genomas fueron realizados con scripts construidos a tal propósito.

#### **16.4. Estudios de genómica comparativa y de asociación GWAS (Genome Wide Association Studies).**

Fue realizada según lo descrito en el apartado 15 de “Materiales y métodos”.

#### **16.5. Estadística de funciones por genomas y nichos**

Las diferencias significativas en el número de distintas funciones de los genomas de bacterias asociadas a distintos nichos se estudiaron a través del test de Tukey para comparaciones múltiples en ANOVA, para lo cual se utilizó el paquete “stats” de R (v4.0.2). Estas diferencias se visualizaron con el programa ggplot2 (v3.3.2) (Wickham, 2016). El programa UpSetR (v1.4.0) (Conway et al., 2017) también fue utilizado para comparar conjuntos de datos de forma visual.

#### **16.6. Redes de similitud entre proteínas.**

Las redes de similitud entre proteínas asociadas a hospedador y al grupo de bacterias no asociadas a hospedador fueron realizadas según lo descrito en el apartado 12 de Materiales y Métodos.

## 17. Caracterización bacteriana

Aquellas cepas de *Pseudomonas* que fueron consideradas como nuevas especies se sometieron a caracterización fenotípica y quimiotaxonómica.

La tinción de Gram se realizó según el protocolo descrito por Doetsch (1981). La motilidad se comprobó mediante microscopía de fase-contraste tras crecer las cepas a 28°C durante 48 h en AN. El tipo de flagelos se determinó mediante microscopía electrónica según lo descrito por García-Fraile et al. (2015a).

La tolerancia salina de las cepas bacterianas se estudió utilizando el medio *Tryptose Soy Broth* (TSB) con 0-10% (m/v) NaCl. El mismo medio tamponado a distintos pHs (4-10) se utilizó para estudiar la capacidad de las bacterias para crecer a distintos niveles de acidez. En ambos casos, se cultivaron los medios de cultivo a 28°C en agitación (180 rpm). Se utilizaron los mismos medios de cultivo, sin inóculo bacteriano, como control negativo de crecimiento. Además, se cultivaron las cepas en TSA a 4, 8, 22, 28, 37 y 42°C para determinar el rango de temperatura de crecimiento. Para todos estos casos, se realizaron 3 réplicas por condición y se evaluó la presencia o ausencia de crecimiento bacteriano durante una semana.

Para la realización de la prueba de la catalasa, se recogieron células bacterianas previamente crecidas en TSA y se añadieron gotas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30% v/v) sobre ellas. La presencia de burbujas indicó un resultado positivo. La prueba de la oxidasa se realizó según lo descrito por Kovacs (1956).

La caracterización fenotípica de las cepas se realizó mediante el sistema de galerías miniaturizadas API20NE y API50CH (bioMérieux).

Los análisis de los esteres metílicos de ácidos grasos (FAME, *Fatty Acid Methyl Esters*) se realizaron según la metodología descrita por Sasser (1990).

Finalmente, las quinonas respiratorias mayoritarias se identificaron a través del servicio de identificación de microorganismos de la colección de microorganismos alemana DSMZ.

## 18. Evaluación de la producción de compuestos antimicrobianos

La actividad antimicrobiana de los metabolitos producidos por las bacterias del estudio se evaluó a través de ensayos de antagonismos frente distintos microorganismos. En el caso de las bacterias aisladas de escarabajos de la corteza, se estudió su capacidad para inhibir a bacterias Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Serratia marcescens*), Gram-positivas (*Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*), hongos levaduriformes (*Candida humilis* y *Saccharomyces cerevisiae*) y hongos filamentosos (*Metarhizium anisopliae*, *Lecanicillium muscarium*, *Isaria fumosorosea*, *I. farinosa*, *Beauveria bassiana* y *B. brongniartii*).



Las bacterias de este estudio se sembraron en un extremo de las placas de tipo Petri conteniendo AN, *Potato Dextrose Agar* (PDA, Difco) o TSA y se incubaron a 28°C durante una semana, permitiendo la difusión de metabolitos secundarios a través de la matriz de agar. Transcurrido este tiempo, se sembraron las bacterias y levaduras problema de forma perpendicular al microorganismo del estudio. En el caso de los ensayos de antagonismo frente a hongos filamentosos, se colocaron trozos de micelio de ~1 cm de diámetro a 1 cm del microorganismo de estudio. Las placas se incubaron de nuevo a 28°C. La ausencia de crecimiento microbiano en las proximidades de la bacteria de estudio se consideró como un resultado positivo de inhibición. La presencia de crecimiento microbiano indica que en los medios ensayados las bacterias de estudio no producen una cantidad necesaria de ningún compuesto antimicrobiano que pueda inhibir el crecimiento del microorganismo problema.

La evaluación de producción de compuestos antimicrobianos en cultivos líquidos se realizó mediante la siembra de la bacteria en PDB y su incubación a 28°C en agitación durante 1-4 semanas. El sobrenadante de cultivo se filtró con filtros de 0.22 µm de diámetro de poro para eliminar las células bacterianas. Un volumen de 100 µl de este sobrenadante de cultivo fue inoculado en pocillos metálicos estériles colocados sobre una siembra en césped del microorganismo problema en medio PDA, el cual se inoculó en el mismo momento del ensayo. Se utilizaron 100 µl de agua estéril en las mismas condiciones a modo de control negativo. Las placas se incubaron a 28°C durante 24 h. La presencia de un halo de ausencia de crecimiento alrededor del pocillo indicó una inhibición bacteriana por parte del sobrenadante de cultivo.

La evaluación de producción de compuestos antimicrobianos volátiles se ensayó a través del cultivo del microorganismo de estudio y el microorganismo problema en placas de Petri divididas en dos compartimentos que sólo se conectan a través del espacio aéreo libre de la parte superior. Cada microorganismo se colocó en un compartimento distinto. Se ensayó a dos tiempos, colocando el microorganismo problema en los días 0 y 7 después de la siembra de la bacteria del estudio. Se realizó el mismo procedimiento, pero sin la siembra de la bacteria del estudio como control negativo. Las placas se cultivaron a 28°C. La presencia de crecimiento del microorganismo problema se consideró como un resultado negativo, el cual indica que en ese medio de cultivo la bacteria de estudio no produce compuestos antimicrobianos volátiles que inhiban al microorganismo problema a esas concentraciones.

#### **19. Búsqueda, aislamiento y caracterización de metabolitos secundarios**

La extracción de metabolitos secundarios se realizó sobre el sobrenadante de cultivo de la cepa IS6 cultivada en PDB (180 rpm) y sobre el agar de placas de PDA. En ambos casos se realizó el cultivo de la bacteria a 28°C durante 1 mes aproximadamente, para poder obtener así una mayor cantidad de metabolitos secundarios. Las extracciones se han realizado por lotes sobre 6L de cultivo líquido o de 50 placas de Petri. Los cultivos líquidos fueron centrifugados a 4.000 rpm durante 10 min y se recogió su sobrenadante. Las matrices de agar fueron machacadas y

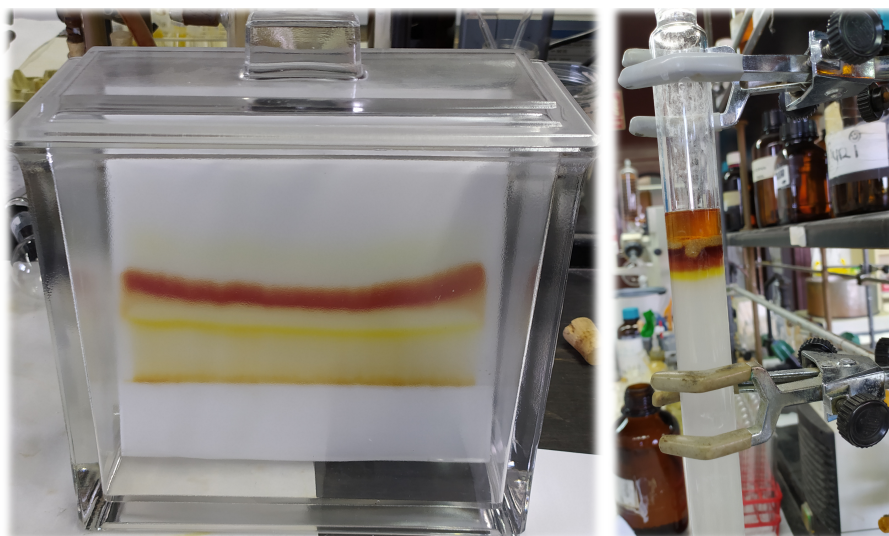
suspendidas en matraces conteniendo 1-2 L de acetona. La suspensión fue mantenida en agitación durante 4 h (180 rpm). Tras esto se recogió el extracto de acetona, la cual se evaporó con un rotavapor utilizando un baño de agua a 40°C. Tanto esta muestra como el sobrenadante de cultivo previo se procesaron de la misma manera. En ambos casos se realizó el mismo procedimiento, pero sin inóculo bacteriano, a modo de control negativo.

Sobre las muestras obtenidas se realizaron diversas extracciones orgánicas con acetato de etilo (AcOEt), cloruro de metileno ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), hexano ( $\text{C}_6\text{H}_{14}$ ), tolueno ( $\text{C}_7\text{H}_8$ ), dietiléter ( $(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{O}$ ) y metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ). Los diluyentes de cada extracto se evaporaron mediante rotavapor y alícuotas de los residuos secos fueron diluidas en agua estéril para ensayar su capacidad para inhibir el crecimiento bacteriano según lo descrito en el apartado 18 de Materiales y Métodos.

Se realizaron perfiles de absorbancia de luz UV (366 y 254 nm) sobre cromatografías en capa fina de los distintos extractos utilizando 10 ml de cloruro de metileno -metanol (95:5 de manera general o proporciones distintas cuando fue necesario) como fase móvil y placa de sílice como fase estacionaria. En este procedimiento se utilizaron placas de sílice de 5 cm.

Los extractos activos se procesaron mediante cromatografía preparativa TLC siguiendo las mismas condiciones ya descritas, utilizando placas de sílice mayores (20 cm) y 100 mL de reactivos para la fase móvil (Figura 3). Las distintas bandas detectadas por su absorbancia de luz UV fueron purificadas mediante elución de la sílice correspondiente a la banda en solventes orgánicos y su posterior filtrado. La bioactividad de los residuos secos fue ensayada según lo descrito previamente (Apartado 18 de Materiales y Métodos).

Una vez detectadas las condiciones óptimas para la extracción de los componentes bioactivos de las muestras, se realizó una cromatografía en columna del extracto en cuestión (Figura 3). Se utilizó sílice como fase estacionaria y cloruro de metileno – metanol (variando las concentraciones) como fase móvil. Las distintas fracciones obtenidas que presentan un mismo perfil de absorbancia de luz UV fueron mezcladas y se evaporó su disolvente en rotavapor. También se ensayó la bioactividad de estas fracciones.



**Figura 3:** Izquierda: Imagen de una cromatografía preparativa TLC. Derecha: Imagen de una cromatografía en columna.

Se realizó resonancia magnética nuclear del protón ( $^1\text{H}$ -RMN) sobre los distintos extractos utilizando cloroformo deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) como solvente y un espectrómetro Varian Mercury 400 MHz. Posteriormente se estudiaron las muestras mediante cromatografía líquida de ultra alta eficacia (UHPLC) acoplada a espectroscopía de masas en tándem (MS/MS) (realizada a través del *Servicio General de Espectrometría de Masas de la Universidad de Salamanca*). La metodología de UHPLC-MS/MS permite, no sólo identificar las masas moleculares de las moléculas presentes en una muestra y su polaridad, sino también, las masas de las moléculas resultantes del fraccionamiento de cada molécula. La búsqueda de metabolitos secundarios en estos espectros se realizó mediante la comparación de picos entre muestras activas y no activas utilizando  $\text{H}_2\text{O}$  + metanol como eluyente. Se añadió 0,1% de ácido fórmico para protonar las sales y que no formasen dímeros que interfirieran en la claridad del espectro. Se utilizaron las predicciones de BGCs realizadas por antiSMASH (ver apartado 10 de Materiales y Métodos) para el genoma de la cepa IS6 para orientar la búsqueda de ciertos tipos de metabolitos secundarios en los espectros obtenidos.

## 20. Desinfección exterior de semillas de colza (*Brassica napus* L.)

Para la realización de los ensayos sobre plantas de *Brassica napus* (colza), las semillas fueron desinfectadas superficialmente. Para ello, fueron mantenidas durante 2 minutos en una solución de etanol-agua (70:30), seguido de 10 minutos en lejía comercial ( $\text{NaClO}$  5%). Tras retirar la lejía, las semillas fueron aclaradas con agua estéril entre 7 y 10 veces.

## 21. Germinación de semillas de colza (*Brassica napus* L.)

En los casos en los que fue necesario pre-germinar las semillas de colza antes de la realización de algún experimento, estas fueron depositadas en placas de tipo Petri con medio agar-agua (2%) y mantenidas a 28°C durante 2 días.

## 22. Ensayos sobre plantas de colza tras la aplicación de un bioinoculante bacteriano.

### 22.1. Ensayos en placa *in vitro*

En los casos necesarios, las plantas pre-germinadas de colza se dispusieron en placas de tipo Petri cuadradas conteniendo medio Hoagland's (2% agar) (Hoagland y Arnon, 1950). Este medio está compuesto por 5 mL/L de 1M Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 5 mL/L de 1M KNO<sub>3</sub>, 2 mL/L de 1M MgSO<sub>4</sub>, 1 mL/L FeEDTA y 1 mL/L de una solución de micronutrientes, la cual contiene, en 1 L, 2,86g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 1,81g MnCl<sub>2</sub>, 0,2g ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,05g CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O y 25 mg Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O.

Las plantas se dispusieron en grupos de 5 por cada placa, separadas equidistantemente, colocando el punto de corte de la raíz con la parte aérea a aproximadamente 4 cm del borde superior. En los casos necesarios, se inoculó 1 mL de la bacteria problema sobre las raíces de cada placa, utilizando una suspensión bacteriana con OD=1 (600 nm absorbancia) (ajustado con espectrofotómetro) en agua estéril. Las plantas controles fueron inoculadas con las mismas cantidades de agua estéril, sin bacterias. Todas las placas fueron selladas con Parafilm™. Las placas fueron cubiertas hasta el punto del inicio de la raíz con papel opaco, para simular la presencia de suelo. Estas fueron depositadas en una cámara iluminada con mezcla de luz incandescente y fluorescente (cantidad 400 μEinsteins/m<sup>2</sup>\*s y longitud de onda de 400 nm a 700 nm), una temperatura de 22°C por el día y 17°C por la noche, con un fotoperiodo de 16 horas de luz diarias, 8 horas de oscuridad y un 60% de humedad relativa.

### 22. 2. Ensayo hidropónico *in vitro*

Con el objetivo de evaluar la producción de ácido indolacético por la cepa *P. brassicacearum* y en la interacción con *B. napus* se realizó un ensayo en medio hidropónico. Para ello, se utilizaron viales con 20 mL de medio Hoagland's (ver apartado 22.1) suplementado con triptófano (200 μL de una solución 16,7 mg/L). El experimento consistió en 3 tratamientos: (I) viales con plantas pre-germinadas de colza inoculadas con agua estéril, (II) viales con plantas pre-germinadas de colza inoculadas con la cepa CDVBN10 y (III) viales sin plantas, con la cepa CDVBN10 en vida libre. Cada vial contuvo un papel de celulosa estéril como soporte para la planta, el cual también fue incluido en los viales de la bacteria en vida libre. Los viales fueron cerrados con tapones de algodón esterilizados, de manera que se permite el flujo de aire a través de los poros. Cada tratamiento fue realizado por triplicado. Las condiciones de pre-germinación, de inoculación bacteriana y de

la incubación fueron las mismas que las detalladas en el punto 22.1. Transcurridos 11 días desde la inoculación, el medio de cultivo fue filtrado con filtros de 22  $\mu\text{m}$  y se realizó sobre este una cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) para buscar distintas auxinas, proceso en el que se utilizaron moléculas patrón para la identificación.

### **22. 3. Ensayo en condiciones de invernadero**

El ensayo en condiciones de invernadero fue llevado a las instalaciones del Instituto Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias (CIALE). Se utilizaron macetas de 9x9x10 cm conteniendo tierra vegetal, la cual había sido tinalizada previamente. Las condiciones de este suelo fueron estudiadas a través del Servicio de Análisis e Instrumentación del Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca (IRNASA).

En cada maceta se colocaron 2 semillas a aproximadamente 1,5 cm de profundidad. En los casos en los que germinaron las dos semillas se quitó una de las plantas, puesto que el objetivo es tener una planta por maceta. Una vez que las plantas emergieron (5 días después) se realizó la inoculación bacteriana (o de agua estéril para los controles negativos) sobre el suelo circundante a la planta. La inoculación consistió en 5 mL / maceta de una suspensión con OD=550 (600 nm absorbancia) en agua estéril. Se dispusieron 30 macetas por tratamiento, separadas en bandejas de 15 macetas cada una. Con el objetivo de evitar efecto lote o variaciones en las condiciones dentro del invernadero, las bandejas de distintos tratamientos fueron intercaladas y se cambiaron de orden 3 veces durante el experimento. El riego se realizó a demanda de la planta. La conductividad del suelo fue de 0,19 mS/cm y la capacidad de intercambio iónico fue de 4,6 cmol(+) / Kg suelo (tras utilización de  $\text{NH}_4$  como extractante).

Transcurridas 6 semanas, las plantas fueron numeradas y se recogieron datos del número de hojas por planta, la longitud de la cuarta hoja desde la parte inferior de la planta, el peso fresco y la clorofila de la cuarta hoja (media de 3 medidas por hoja en distintos puntos). Tras esto, las plantas se secaron 3 días en estufa (60°C) y se midió el peso seco de cada una.

### **22. 4. Ensayo en campo de cultivo**

El ensayo de campo fue llevado a cabo entre septiembre del año 2018 y mayo del año 2019 en la localidad de Cañizal (Zamora; coordenadas NS/EO: 41.152627/-5.356508). El campo en cuestión tiene una historia de rotación de cultivos de girasoles y cebada. No se reportan cultivos de colza previos en este suelo.

El suelo del campo de cultivo utilizado fue un suelo no salino, con alto contenido orgánico (5,6%), un pH ligeramente básico (7,9) y una electroconductividad (EC) también relativamente baja (EC1:2 0.096 dS/m). El contenido en mineral del suelo era el siguiente: Nitrógeno total < 0.045%;

fosfato asimilable: 15 mg/kg; potasio: 0.25%, Zn: 21,9 mg/kg; Fe: 1,2%. El número de unidades formadoras de colonias (UFCs) por gramo de suelo fue de  $1,2 \times 10^7$ .

Se utilizó una parcela de 29,25 m<sup>2</sup>, la cual fue dividida en 4 sub-parcelas de similar tamaño (6 m<sup>2</sup>), contando con un espacio de 0.5 m entre cada sub-parcela. Cada tratamiento ocupó 2 sub-parcelas. Las semillas de colza fueron distribuidas cada 15 cm en líneas rectas.

La inoculación bacteriana fue llevada a cabo 27 días después de la siembra. Los inóculos fueron realizados según lo descrito en el apartado 22.1.

El cultivo no fue regado, fue cultivado en condiciones de secano. Transcurridos 8 meses desde la siembra, se recogieron las plantas para análisis posteriores.

### **23. Estudio de comunidades bacterianas endofíticas a través de metagenómica de amplicones del gen 16S ARNr**

Se recogieron 12 plantas de cada tratamiento del experimento de campo del apartado anterior (22.4). Se crearon muestras con mezclas de 3 raíces del mismo tratamiento. El ADN total de cada muestra fue extraído con el kit DNeasy Power Plant Pro Kit (Qiagen®, Venlo, Netherlands), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se realizó una secuenciación masiva de amplicones del gen 16S ARNr completo (primers 27F: AGRGTTYGATYMTGGCTCAG y 1492R: RGYTACCTTGTTACGACTT) a través de un sistema Sequel SMRT Cell 1M V3 LR (Pacific Biosciences). El método *Circular Consensus Sequences* (CSS) fue aplicado para obtener secuencias con menor ratio de error en la secuencia consenso resultante del alineamiento entre todas las sub-lecturas de cada molécula. Las lecturas obtenidas han sido depositadas en la base de datos NCBI bajo el *SRA accession* PRJNA601164.

Las secuencias con tamaños menores o iguales a 800 nt o mayores o iguales a 1600 nt fueron eliminadas. Los metagenomas de amplicones fueron procesados con el programa QIIME (v1.9) (Caporaso et al., 2010). Las secuencias fueron clasificadas en unidades taxonómicas operativas (OTUs) utilizando un porcentaje de similitud del 97% con un método de *OTU-picking* de tipo *open-reference*. Para ello, los amplicones fueron alineados frente a la base de datos de Greengenes (versión 13.8.97) (DeSantis et al., 2006) y aquellos alineados constituyeron OTUs. Las lecturas que no consiguieron alinearse se agruparon mediante un proceso de agrupación *de-novo*. El algoritmo UCLUST fue utilizado con los parámetros por defecto para tal propósito. Las secuencias quiméricas fueron eliminadas con UCHIME (v6.1.544) (Edgar et al., 2011). Tras la clasificación de las secuencias según la taxonomía de Greengenes, aquellas identificadas como cloroplastos o mitocondrias fueron eliminadas con scripts de QIIME.

Las diversas comparaciones entre tratamientos fueron realizadas a través de scripts de QIIME. La diversidad alfa se midió a través de los índices Phylogenetic Diversity (PD), Chao1, Shannon's, Simpson's y Good's coverage. Las comparaciones de diversidad alfa entre tratamientos fueron

llevadas a cabo mediante el test de Kruskal-Wallis, aplicando el *Benjamini–Hochberg false discovery rate* (FDR) para comparaciones múltiples. En el caso de comparaciones de diversidad beta, se utilizaron valores no paramétricos de p corregidos según la corrección de Bonferroni, tras realizar 999 permutaciones de Monte carlo. Los cálculos de diversidad beta fueron realizados a través de las distancias UniFrac *weighted* y *unweighted*.

#### **24. Marcaje bacteriano a través de proteína verde fluorescente (GFP)**

En los casos en los que fue necesario marcar una cepa bacteriana para su posterior visualización a través de microscopía electrónica, se les introdujo, mediante conjugación, el plásmido synGFP (cedido por J.I. Jiménez-Zurdo), el cual expresa de forma constitutiva una proteína verde fluorescente (GFP). Para ello, las bacterias problema se mezclaron con *E. coli* S17.1 synGFP en placas de TSA con 10 µg/mL de tetraciclina (para inhibir el crecimiento la cepa de *E. coli*) y con 50 µg/mL de kanamicina, antibiótico que seleccionará a las cepas que porten el plásmido synGFP, el cual también tiene un gen responsable de la resistencia a este antibiótico. En paralelo, a modo de control negativo de crecimiento, tanto la cepa donante como la receptora fueron inoculadas en por separado en extremos de cada placa de tipo Petri. Las placas fueron cultivadas a 28°C durante 1 día. Las colonias emergentes fueron sembradas en el mismo medio de cultivo hasta obtener cultivos puros.

#### **25. Microscopía**

##### **25.1. Microscopía electrónica de barrido**

Plantas de colza inoculadas con las cepa bacteriana problema (apartado 24) fueron procesadas para su visualización mediante microscopía electrónica de barrido 11 días después de la inoculación. Para ello, en condiciones de asepsia se cortaron fragmentos de aproximadamente 1 cm de raíz, los cuales fueron sumergidos en una solución fijadora (3% glutaraldehído en 0.1 M tampón cacodilato).

##### **25.2. Microscopía electrónica de transmisión**

Con el objetivo de visualizar la forma y tamaño celular bacteriano y la presencia de flagelos polares, se utilizó microscopía electrónica de transmisión. Para ello, se realizaron suspensiones muy diluidas de bacterias en cultivo puro en agua estéril. Estas muestras fueron entregadas al Servicio de Microscopía de NUCLEUS (Universidad de Salamanca), quienes realizaron una tinción mediante extinción negativa, utilizando acetato de uranilo (30 segundos) como contraste y visualizando con microscopio Tecnai Spirit Twin.

### 25.3. Microscopía confocal

Plantas de colza inoculadas con la cepa bacteriana problema (apartado 22.1 de Materiales y Métodos) marcada con GFP (apartado 24 de Materiales y Métodos) fueron procesadas para su visualización mediante microscopía confocal. Se realizaron cortes de 3-4 cm de raíz con un bisturí estéril y se colocaron en portaobjetos, donde fueron embebidas en agua estéril y se realizó una tinción con 10  $\mu$ L de Yoduro de Propidio (PI) (10  $\mu$ M), el cual tiñe de color rojo las células vegetales. Tras colocar el cubreobjetos, se visualizaron las muestras en un microscopio modelo LEICA TCS SP5 en las instalaciones del Centro de Investigación del Cáncer (CIC) de Salamanca. Se utilizaron longitudes de onda de 488 nm y de 617 nm de un laser de argón para excitar el color verde de la GFP y el rojo del PI, respectivamente. Las proyecciones tridimensionales fueron llevadas a cabo mediante tomas de imágenes de cada micrómetro en el eje Z (profundidad).

### 26. Ensayos de biocontrol bacteriano

Los ensayos de biocontrol se realizaron a través de ensayos de antagonismos frente a distintos microorganismos fitopatógenos cedidos por el Centro Regional de Diagnóstico de Aldearrubia según lo descrito en el apartado 18 del Materiales y Métodos, y a través de ensayos de *priming*. Estos últimos fueron realizados sobre plantas previamente inoculadas en condiciones de invernadero (ver apartado 22.3 de Materiales y Métodos). El hongo *Leptosphaeria maculans* CRD 14 / 99 fue utilizado como microorganismo fitopatógeno para los ensayos de *priming*. Sobre las hojas quinta, sexta y séptima de cada planta se depositaron discos de agar con micelio del hongo, previamente crecido en medio PDA durante una semana. Después, las plantas se mantuvieron en recipientes de plástico cerrados, con humedad elevada y en las condiciones detalladas en el apartado 22.3 de Materiales y Métodos. Transcurridos 5 días, cuando comenzaron a percibirse las lesiones del hongo en las hojas, estas fueron contadas y se midió el diámetro de cada lesión.

### 27. RNA-Seq

Con el objetivo de estudiar el transcriptoma de la bacteria *P. brassicacearum* CDVBN10 sobre su hospedador, *Brassica napus*, durante la interacción, se realizó un proceso de RNA-Seq sobre el transcriptoma bacteriano. Las muestras de la interacción fueron recogidas sobre plantas de colza 11 días post-inoculación (dpi) (según lo descrito en el apartado 22.1 de Materiales y Métodos). En condiciones de asepsia, se recogieron 20 raíces por muestra, enrollándolas en puntas de pipeta estériles y libres de enzimas ribonucleasas. Estas raíces se depositaron en tubos de tipo eppendorf, también libres de ribonucleasas, los cuales fueron congelados inmediatamente en nitrógeno líquido durante 2 minutos. Después, se añadió 1 mL de solución Ringer por muestra y se realizó una sonicación (2" ON, 1' OFF, 10% amplitud, 2 minutos) sobre las muestras con el objetivo de desprender células bacterianas adheridas a las raíces junto con células de la raíz. El



sobrenadante (el cual tiene en suspensión estas células) fue recogido con puntas estériles. Este sobrenadante fue centrifugado durante 10 minutos a 16.000 rpm. Tras retirar el sobrenadante, el pellet resultante (células de bacteria + células de planta) se congeló de nuevo en nitrógeno líquido. El mismo proceso fue realizado sobre un cultivo de la cepa bacteriana crecida 3 días en medio Hoagland's (ver apartado 22.1 de Materiales y Métodos) + 0,1% glucosa. En este último caso (Control), cada muestra consistió en una mezcla de células provenientes de 3 placas distintas, las cuales habían sido incubadas en las mismas condiciones que las plantas.

Sobre todas estas muestras se extrajo el RNA total mediante el kit Quick-RNA Fungal/Bacterial Miniprep (Zymo Research) siguiendo las instrucciones del fabricante. La cantidad de RNA extraído fue medida mediante el kit Qubit™ High Sensitivity Assay sobre un fluorómetro Qubit. La calidad del RNA fue evaluada a través de un sistema BioAnalyzer. Con el objetivo de enriquecer el ARN mensajero, se llevó a cabo un proceso de ribodepleción procariota en todas las muestras y eucariota en las muestras de la interacción, en ambos casos a través de kits Ribo-Zero (Illumina). El ARN mensajero enriquecido fue convertido en ADNc, el cual fue utilizado para la construcción de una librería con el kit TruSeq Stranded total RNA. Esta librería fue secuenciada a través de una plataforma Novaseq 6000 150PE.

Las lecturas obtenidas tras la secuenciación fueron tratadas con distintos programas bioinformáticos. Las secuencias de los adaptadores se quitaron con Trimmomatic (v0.39) (Bolger et al., 2014). Las secuencias resultantes fueron filtradas por tamaño (secuencias <50 pb fueron eliminadas) y por calidad (sólo se retuvieron secuencias >30 phred) con el programa FastX-Toolkit ([http://hannonlab.cshl.edu/fastx\\_toolkit/index.html](http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/index.html)). Estas secuencias fueron mapeadas con Bowtie2 (v2.3.5) (Langmead y Salzberg, 2012) frente al genoma de la cepa CDVBN10 (GCA\_013608025.1). Los archivos SAM resultantes fueron convertidos a formato BAM y estos fueron ordenados con el programa samtools (v1.9) (Li et al., 2009). Con estos archivos realizamos un recuento de lecturas por CDS con FADU (v1.7) (Chung et al., 2021).

## 28. Gráficas para visualización de resultados

Se utilizó el paquete ggplot2 (v3.3.2) en base R (v4.0.2) (Wickham, 2016), para representar algunos resultados de las anotaciones genómicas. Con este programa se crearon mapas de calor (*heatmaps*), gráficos de dispersión, histogramas y gráficos de densidad.

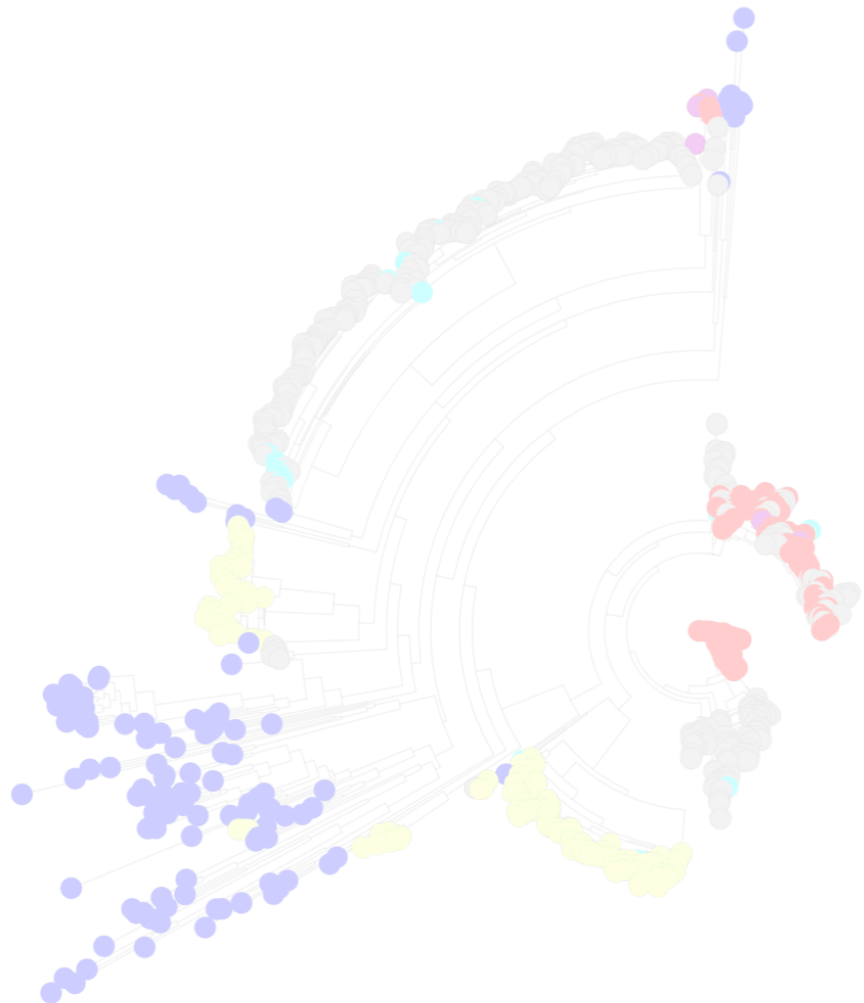
## 29. Estadística

En los casos necesarios se llevaron a cabo tests estadísticos de tipo ANOVA a través del test de Tukey. Este proceso fue realizado con el paquete *stats* (v4.0.2) en base R, utilizando las funciones *lm*, *aov* y *TukeyHSD*.

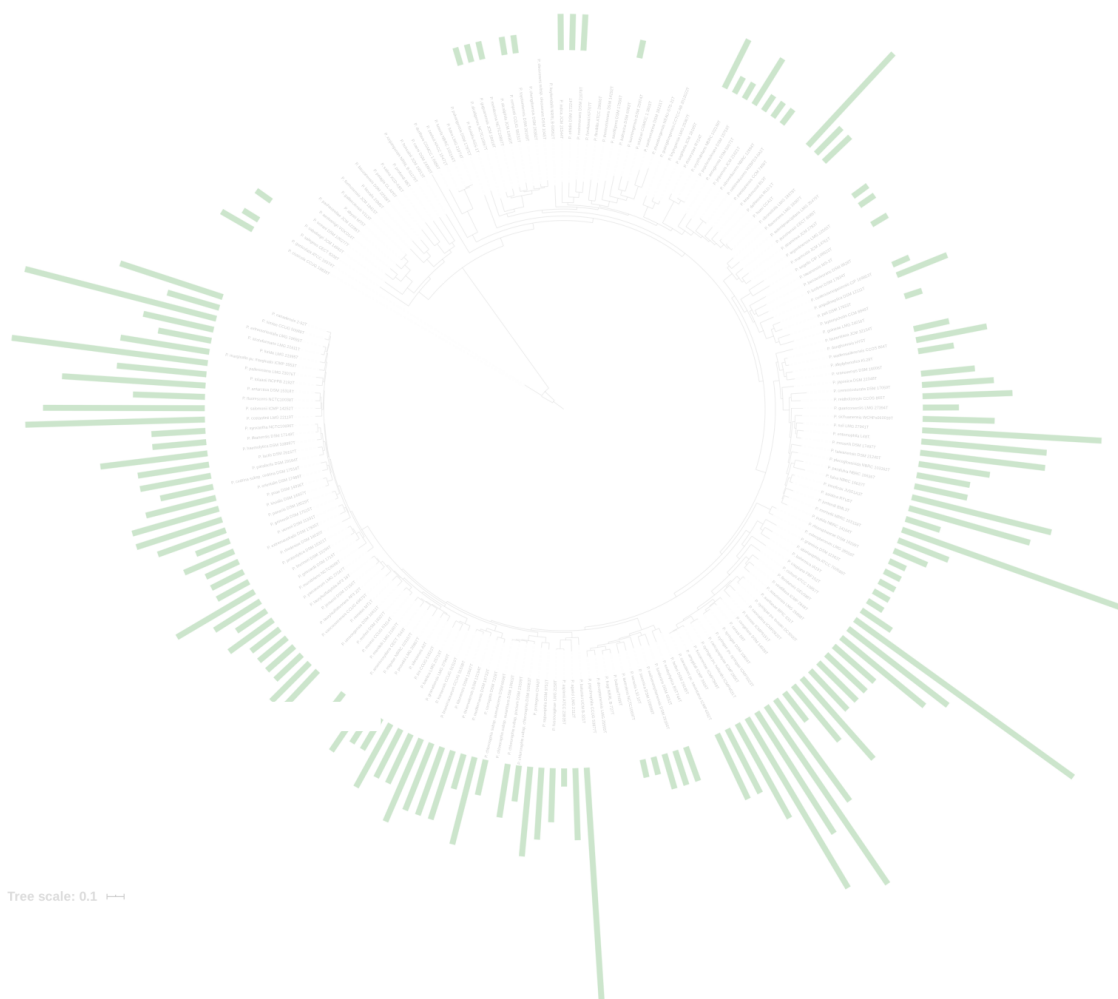


# Capítulo I

*Estudio del metabolismo secundario del género *Pseudomonas* utilizando la minería genómica.*







# *Introducción*



## *Introducción*

### **Metabolismo secundario microbiano**

Los microorganismos sintetizan una incalculable variedad de productos naturales que les facilitan competir frente a otros organismos y sobrevivir en los distintos ambientes de la naturaleza (Tyc et al., 2017; Klapper et al., 2018; Pishchany y Kolter, 2020). La mayoría de estos compuestos son moléculas que derivan del metabolismo secundario. A diferencia del metabolismo primario, el metabolismo secundario engloba reacciones metabólicas que no son imprescindibles para la viabilidad celular del microorganismo. Debido a esto, las rutas de este metabolismo suelen presentar una menor persistencia evolutiva que las del metabolismo primario (Chevrette et al., 2020). Sin embargo, los metabolitos secundarios pueden ser de gran utilidad para la competición y supervivencia microbiana en algunos hospedadores o nichos ecológicos, bien mediante acciones antimicrobianas, realizando funciones osmo- o termo-protectoras, bien interviniendo en la comunicación intercelular, protegiendo frente a radiaciones perjudiciales, etc. (Tyc et al., 2017; Klapper et al., 2018; Pishchany y Kolter, 2020).

A lo largo del último siglo, los microorganismos han sido estudiados en profundidad con el objeto de descubrir nuevos y valiosos metabolitos secundarios, siendo cientos de ellos aplicados en clínica o en industrias como la farmacéutica o la agrícola (Hug et al., 2020). De especial interés son aquellos compuestos que tienen mecanismos de acción antimicrobianos o antitumorales. En la actualidad, muchas de las moléculas utilizadas en farmacoterapia tienen su origen en el metabolismo secundario microbiano, como las penicilinas, las cefalosporinas, los aminoglucósidos, los fenicoles o los macrólidos, entre otros (Baria et al., 2020).

En la biosíntesis de la mayor parte de los metabolitos secundarios participan diversos tipos de genes. Por lo general, los genes responsables de la producción de un cierto metabolito secundario están localizados de forma contigua en la misma región genómica, la cual se suele denominar como BGC, por sus siglas en inglés, *Biosynthetic Gene Cluster* (o grupo de genes biosintéticos) (Medema et al., 2015). Los principales genes de un BGC son los siguientes:

- i.) Genes reguladores: son genes que regulan la transcripción del BGC. Ante la presencia de una molécula reguladora pueden activar o reprimir la transcripción del operón.
- ii.) Genes biosintéticos principales o genes *core*: son los genes que se transcribirán y traducirán a los metabolitos secundarios o a las enzimas responsables de la biosíntesis de estas moléculas.
- iii.) Transportadores: son genes que van a dar lugar a proteínas transportadoras que principalmente llevan a cabo la extrusión del metabolito al exterior celular. Debido a esto, muchas veces son considerados también genes de resistencia ya que, si el metabolito en cuestión tiene acción antimicrobiana, la célula podrá sobrevivir a esta acción mediante su expulsión al exterior.

- iv.) Genes biosintéticos auxiliares: participan en la generación de precursores metabólicos o en la realización de modificaciones a los metabolitos secundarios.

Según el tipo de enzimas codificadas por los genes *core* y según la molécula que sintetizan, los BGCs se clasifican en distintos tipos. Existen muchos tipos de BGCs descritos, siendo los péptidos no ribosomales (NRPSs, *Non Ribosomal Peptide Synthetases*), las bacteriocinas, los terpenos y las policétido sintasas (PKS, *Polyketide Synthases*), algunos de los más abundantes en la naturaleza (Blin et al., 2019). A pesar de que todos los metabolitos de un mismo tipo de BGC se sintetizan a través de una maquinaria enzimática o genética similar, hay multitud de moléculas distintas que pueden ser sintetizadas por BGCs del mismo tipo. Sin embargo, también existen BGCs próximos entre sí, los cuales conforman familias de BGCs o GCFs, por sus siglas en inglés (*Gene Cluster Families*), las cuales darán lugar a la síntesis de moléculas con una estructura similar. Este tipo de agrupamientos facilita el estudio de la diversidad genética y taxonómica de los BGCs, por lo que facilita la búsqueda de nuevos BGCs putativos (Kautsar et al., 2021).

### **Ecología de los metabolitos secundarios microbianos**

Durante muchas décadas se han entendido los metabolitos secundarios microbianos como moléculas producidas por un metabolismo resultante de un proceso evolutivo azaroso, un metabolismo de menor importancia biológica que el metabolismo central o primario. Sin embargo, la tendencia actual va encaminada a considerar a estos compuestos como “metabolitos especializados” con funciones de gran relevancia ecológica (Davies, 2013; Chevrette et al., 2020). A diferencia de la visión antropocéntrica en la que se ve el metabolismo secundario como una fuente de compuestos antimicrobianos y otros agentes terapéuticos, la visión actual refleja que estos metabolitos llevan a cabo funciones específicas y necesarias en las interacciones con su nicho ecológico, tanto con las comunidades microbianas como con su hospedador si lo hubiere (Tyc et al., 2017; Zaynab et al., 2018; Chevrette et al., 2020). Como ejemplo de estas funciones podemos encontrar los metabolitos con actividad biocida, la cual proporciona una ventaja en la competición frente a otros microorganismos u otros seres vivos en un mismo nicho ecológico (González-Dominici et al., 2020). Otro ejemplo reside en la capacidad que tienen estos metabolitos para actuar como moléculas señal que afectan a una amplia variedad de funciones como la motilidad, el desarrollo celular o el uso de nutrientes en células tanto de la misma especie como de taxones distantes (Tyc et al., 2020). Así pues, el estudio del metabolismo secundario puede ayudar a descifrar y a entender las interacciones microbianas que tienen lugar en los distintos ecosistemas de la naturaleza.



### **Búsqueda de nuevos metabolitos secundarios.**

A pesar de la gran cantidad de moléculas disponibles para la terapéutica, hay muchas enfermedades que aún no disponen de un tratamiento eficaz. Además, algunos tratamientos actuales frente a enfermedades infecciosas están dejando de ser útiles debido a la generación de resistencias a antimicrobianos por parte de sus agentes causantes. A diferencia de las resistencias innatas que tienen ciertos microorganismos a algunos fármacos, existen otras resistencias, las adquiridas, que derivan de la transferencia de genes desde otras bacterias resistentes o que aparecen a través de mutaciones puntuales. Estos mecanismos de resistencia pueden consistir en la extrusión del antimicrobiano al exterior celular, la degradación del fármaco, la modificación estructural de la diana farmacológica o la disminución de la permeabilidad al antimicrobiano (Christaki et al., 2020).

La aparición de estas resistencias a los antimicrobianos se está incrementando de forma muy significativa en las últimas décadas debido al mal uso de los agentes antimicrobianos por parte de los humanos, por lo que esta problemática ha llegado a considerarse una de las principales amenazas de Salud Pública a nivel mundial. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que en el año 2050 habrá 10 millones de muertes al año debido a resistencias a antimicrobianos (Tacconelli et al., 2018). Es por esto por lo que la OMS urge al desarrollo de nuevas armas farmacológicas para afrontar las infecciones de microorganismos multirresistentes, sobre todo frente a los patógenos que ha marcado como prioritarios para la investigación de nuevos antibióticos (Tabla 1).

**Tabla 1.** Lista de la OMS de patógenos prioritarios para la investigación de nuevos antibióticos.**Prioridad 1, Crítica:**

---

*Acinetobacter baumannii*, resistente a los carbapenémicos*Pseudomonas aeruginosa*, resistente a los carbapenémicos*Enterobacteriaceae*, resistentes a los carbapenémicos, productoras de ESBL**Prioridad 2, Elevada**

---

*Enterococcus faecium*, resistente a la vancomicina*Staphylococcus aureus*, resistente a la meticilina, con sensibilidad intermedia y resistencia a la vancomicina*Helicobacter pylori*, resistente a la claritromicina*Campylobacter spp.*, resistente a las fluoroquinolonas*Salmonellae*, resistentes a las fluoroquinolonas*Neisseria gonorrhoeae*, resistente a la cefalosporina y resistente a las fluoroquinolonas**Prioridad 3, Media**

---

*Streptococcus pneumoniae*, sin sensibilidad a la penicilina*Haemophilus influenzae*, resistente a la ampicilina*Shigella spp.*, resistente a las fluoroquinolonas

---

Además de la problemática de la resistencia a antimicrobianos, la amenaza de las pandemias cada vez es mayor debido en parte al cambio climático y a la globalización. A lo largo de la Historia han aparecido grandes pandemias cuyo origen ha sido bacteriano o vírico, como la terrible peste bubónica (*Yersinia pestis*), el cólera (*Vibrio cholerae*), la viruela (*Variola virus*), la mal llamada Gripe Española (*virus Influenza A*) o la actual COVID-19 (*SARS-CoV-2*) (Morens y Fauci, 2020).

Debido a estas amenazas de origen microbiológico, el aislamiento y caracterización de nuevos metabolitos antimicrobianos es de gran importancia, sobre todo aquellos con acción antibiótica, antifúngica y antivírica, ya que pueden ayudar a combatirlos (Albarano et al., 2020). Sin embargo, en las últimas décadas, el alto ratio de re-descubrimientos en los procesos de búsqueda de nuevos metabolitos secundarios microbianos ha ralentizado la caracterización de nuevas moléculas antimicrobianas (Wohlleben et al., 2016); a diferencia de la velocidad con la que se descubrieron nuevas familias de antibióticos a mediados del siglo XX, casi no se ha aprobado el uso de nuevos antimicrobianos en los años más recientes (Figura 4).

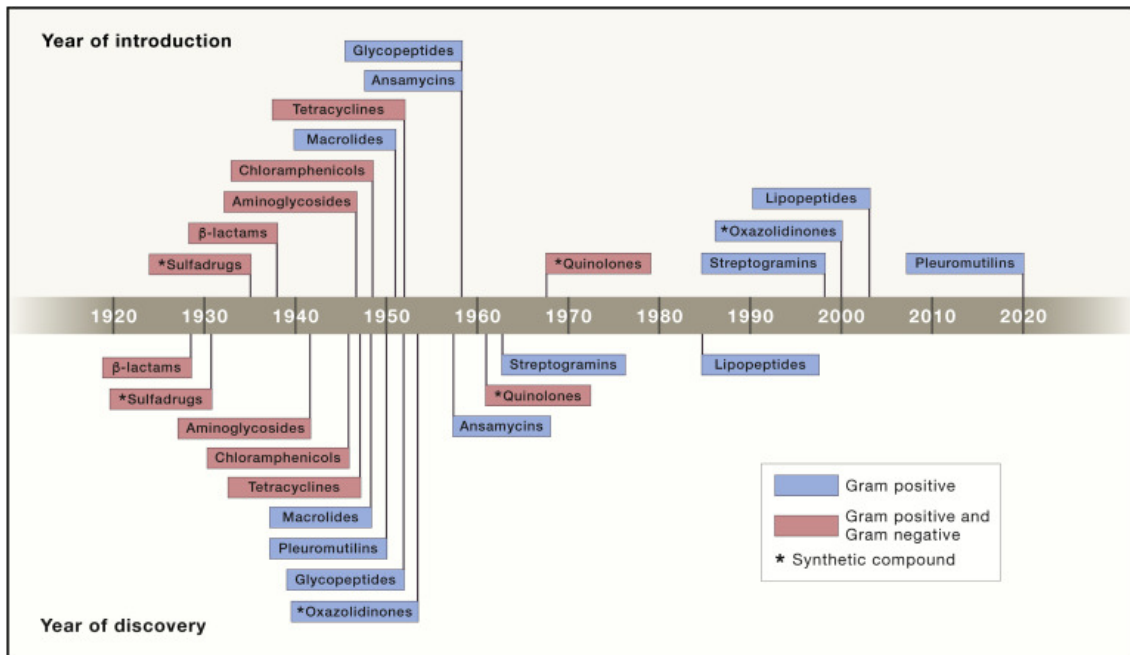


Figura 4. Esquema que representa el año de descubrimiento o de la primera síntesis de los principales grupos de antimicrobianos utilizados en clínica (Figura tomada de Lewis, 2020).

Al margen de la utilización de metabolitos secundarios como agentes antiinfecciosos, también se pueden explotar los recursos microbianos para otras aplicaciones clínicas o industriales. Por ejemplo, en lo relativo al área sanitaria, se han encontrado muchos metabolitos secundarios que ejercen acción antitumoral, inmunomoduladora o, incluso, frente al colesterol, como las estatinas (Vaishnav y Demain, 2011). Teniendo en cuenta estas aplicaciones, la búsqueda de nuevas moléculas en el metabolismo secundario microbiano es más que deseable.

### La era de la Genómica en el estudio del metabolismo secundario

La secuenciación de genomas es cada vez más barata y accesible a más grupos de investigación gracias a los últimos avances en secuenciación masiva de ADN. Debido a esto, la genómica se erige como un área prometedora que guía la investigación de los productos naturales (Albarano et al., 2020). La minería genómica nos permite entender el universo químico subyacente al metabolismo microbiano. De esta manera, el desarrollo de herramientas bioinformáticas que permiten su análisis facilita la exploración de genes relacionados con el metabolismo secundario (Blin et al., 2019; Meunier et al., 2020; Navarro-Muñoz et al., 2020; Ziemert et al., 2020). La mayor parte de estos programas suelen basarse en la búsqueda de patrones genéticos y/o en la detección y clasificación de unos dominios enzimáticos determinados. Uno de los programas más utilizados hoy en día para el estudio del metabolismo secundario en genomas bacterianos es antiSMASH, el cual realiza una predicción y anotación detallada de multitud de tipos de BGCs, los compara con BGCs de genomas públicos y también con BGCs ya descritos para la producción de

algún metabolito concreto (Medema et al., 2011; Blin et al., 2019). Gracias a este tipo de programas, y a través de la combinación de estos, se pueden realizar flujos de trabajo muy completos para el estudio del metabolismo secundario de bacterias a través de sus genomas (Figura 5).

La combinación de la minería genómica con la filogenómica y con la genómica comparativa está siendo de gran utilidad para encontrar microorganismos prometedores para el descubrimiento de nuevas moléculas (Kang, 2017; Beedessee et al., 2019). Además, el desarrollo de bases de datos que contienen BGCs ya descritos para la producción de metabolitos secundarios permite comparar las predicciones genómicas frente a ellos y, por tanto, permite priorizar esfuerzos a la hora de seleccionar nuevos BGCs para su análisis (van Santen et al., 2020). Una de las bases de datos de BGCs descritos más amplia y actualizada es MiBIG, la cual guarda información sobre los genes que componen un BGC, sobre el tipo de BGC y sobre el microorganismo productor de un determinado BGC (Kautsar et al., 2020).

Asimismo, están surgiendo nuevos conceptos en la minería de genomas que se postulan como vías prometedoras para descubrir nuevos tipos de metabolitos secundarios. Un ejemplo de esto es la herramienta EvoMining, la cual desarrolla un flujo de trabajo que utiliza principios evolutivos y trata de encontrar expansiones de funciones enzimáticas a partir de duplicaciones génicas que puedan estar implicadas en nuevos sistemas biosintéticos (Sélem-Mojica et al., 2019). Sus creadores argumentan que las enzimas relacionadas con metabolitos secundarios han evolucionado desde el metabolismo central o primario a través de expansiones enzimáticas en las cuales las enzimas son reclutadas para llevar a cabo nuevas funciones; basándose en esto, tratan de encontrar estas enzimas a través de su estudio filogenético y evolutivo. Por lo tanto, el estudio de genes/proteínas duplicados/as y de su contexto puede dar lugar al descubrimiento de nuevos sistemas biosintéticos (Cruz-Morales et al., 2016).



### Metabolismo secundario en *Pseudomonas*

Debido a su gran versatilidad metabólica, la mayor parte de los esfuerzos de investigación en el área de los compuestos naturales se ha enfocado en las actinobacterias, especialmente en las pertenecientes al género *Streptomyces* (Baria et al., 2020; Belknap et al., 2020; Kautsar et al., 2020). Sin embargo, cada vez se dirigen más recursos a desvelar el metaboloma de bacterias menos estudiadas y de bacterias asociadas a nichos menos investigados, para así intentar descubrir nuevas familias de compuestos químicos sin caer en el redescubrimiento de moléculas conocidas (Ding et al., 2019).

*Pseudomonas* es uno de los géneros bacterianos más diversos y dispersos de la naturaleza (Loper et al., 2012; Crone et al., 2020), por lo que su estudio puede desvelar una gran cantidad de metabolitos secundarios nuevos. Este género se ha encontrado asociado con animales, plantas, suelo, agua y muchos otros nichos ecológicos, donde es capaz de sobrevivir en condiciones ambientales muy heterogéneas (Loper et al., 2012; Crone et al., 2020; Jiménez-Gómez et al., 2020). Para sobrevivir y competir en todos estos micro-habitats, las cepas de *Pseudomonas* son capaces de producir un gran repertorio de metabolitos secundarios que las protege frente a condiciones extremas o las ayuda a competir frente a otros microorganismos presentes en mismo nicho (Loper et al., 2012; Saati-Santamaría et al., 2018; Peral-Aranega et al., 2020). Se han descrito diversos metabolitos secundarios a partir de cepas de *Pseudomonas*, siendo las pioverdinas, las piocianinas y el 2,4-diacetil-fluoroglucinol (DAPG) algunos de los más estudiados (Gross y Loper, 2009; Nguyen et al., 2016). De hecho, se han caracterizado experimentalmente los genes responsables de la síntesis de algunos de estos compuestos. Como ejemplo, 68 BGCs de *Pseudomonas* han sido depositados en la base de datos de MiBIG (Gross y Loper., 2009; Li et al., 2013; Kautsar et al., 2020). No obstante, a pesar de que el género *Pseudomonas* es muy amplio (engloba actualmente a 252 especies distintas), la gran parte de los descubrimientos en este área han derivado del metabolismo de cepas de unas pocas especies, como *P. aeruginosa*, *P. putida*, *P. fluorescens*, *P. syringae* y *P. chlororaphis*. Por lo tanto, el estudio del metabolismo secundario del género *Pseudomonas* en su totalidad puede ser muy prolífico, sobre todo si se dirigen los esfuerzos de investigación sobre taxones o cepas menos estudiados o sobre aquellos en los que estudios genómicos preliminares señalen como prometedores.

Por otro lado, la genómica comparativa está resultando de gran utilidad para el estudio de la relación del metabolismo secundario con diversos taxones bacterianos (Gregory et al., 2019; González-Dominici et al., 2020; Määnle et al., 2020). Estos estudios desvelan la diversidad de los productos naturales, sus BGCs asociados y su relación evolutiva con la taxonomía bacteriana. Esto puede ser de gran utilidad para poder predecir diversificaciones moleculares en los productos biosintéticos de los BGCs. En lo relativo a bacterias del género *Pseudomonas*, Gutiérrez-García et al. (2017) llevaron a cabo una aproximación filogenómica en la cual se muestran pruebas de una correlación entre la evolución de 6 especies de *Pseudomonas* y la diversidad química del DAPG. Sin embargo, no se ha publicado ningún estudio amplio que reporte la evolución y distribución

del contexto genético responsable de la biosíntesis de los metabolitos secundarios en el género *Pseudomonas*.

Por todo ello, en este trabajo se realiza una investigación holística sobre la diversidad y evolución de los genes relacionados con el metabolismo secundario de *Pseudomonas* con el objetivo de encontrar nuevos BGCs aún no descritos que puedan guiar la búsqueda de nuevos metabolitos interés.







# *Resultados y discusión*



## Resultados

### Características de los genomas de las 194 cepas tipo de *Pseudomonas* seleccionados.

Todos los genomas disponibles de cepas tipo del género *Pseudomonas* en el momento de la realización de este trabajo fueron descargados. La lista de los genomas seleccionados y las características generales de estos genomas se presenta en la Tabla Suplementaria 1 del Anexo I. El contenido en G+C de estos genomas de *Pseudomonas* varía entre un 48,26 y un 68,26% (Figura 6). El tamaño de los genomas está comprendido entre 3.022.325 pb y 7.375.852 pb (Figura 6). El número de secuencias codificantes de genes (CDSs) varía entre 2.913 y 7.098.

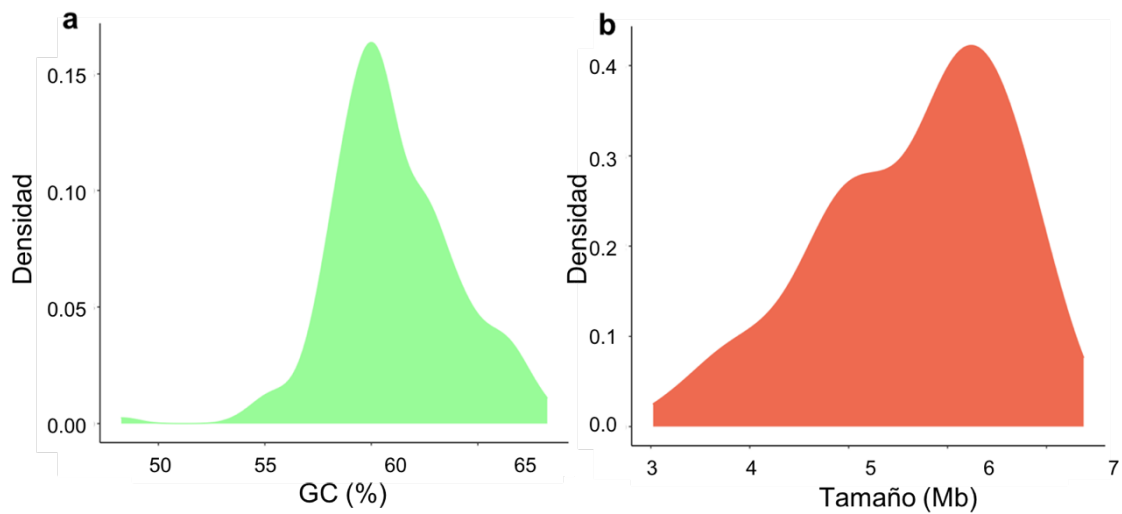
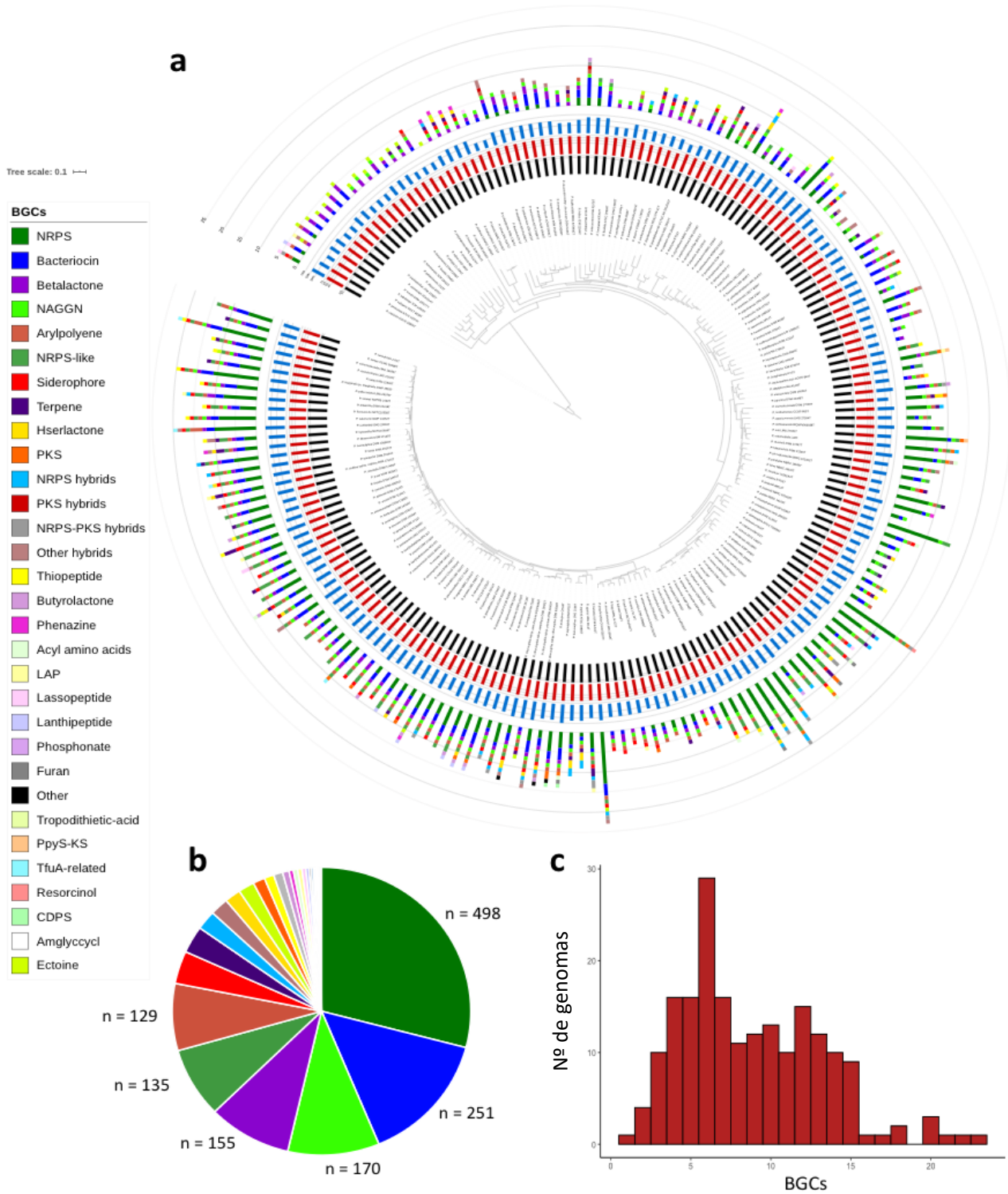


Figura 6. Gráficos de densidad representando (a) el contenido en G+C (%) y (b) el tamaño (Mb) de los 194 genomas de este estudio.

### Diversidad y distribución de BGCs en *Pseudomonas*.

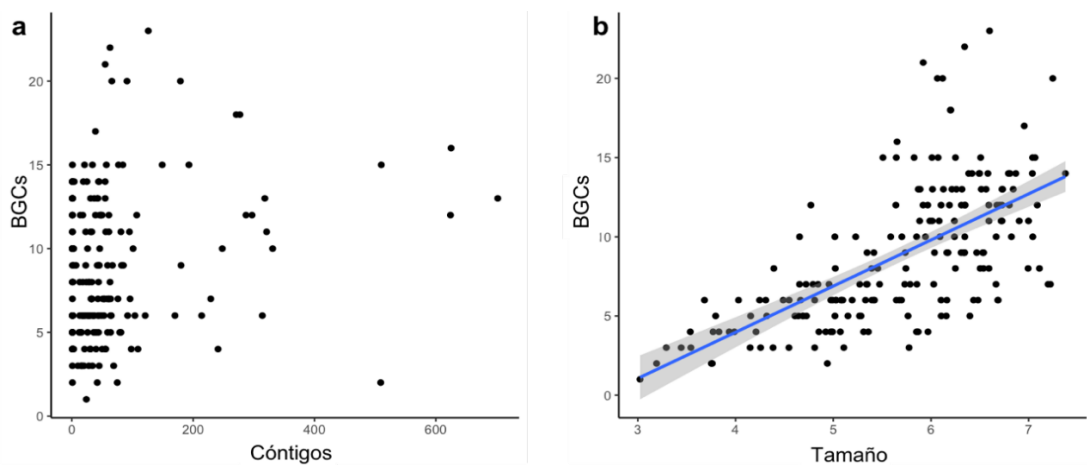
La herramienta antiSMASH, empleada para predecir, anotar y caracterizar los grupos de genes que codifican la biosíntesis de metabolitos secundarios (BGCs), nos permitió encontrar 1.721 BGCs entre todos los genomas, con una distribución de 1 - 23 BGCs por genoma (Figura 7).



**Figura 7.** Representación de las características genómicas, de los BGCs y de la filogenia de las cepas tipo de *Pseudomonas* incluidas en este trabajo. **a.** Árbol filogenético de las cepas tipo de *Pseudomonas* basado en 92 genes *housekeeping* concatenados. Los metadatos se han añadido con el programa Interactive Tree of Life (iTOL). La circunferencia negra interior representa la completitud del genoma (%); la circunferencia roja representa el contenido en G+C (%); la circunferencia azul representa la longitud del genoma; la circunferencia exterior representa los tipos de BGCs según las predicciones de antiSMASH. Bar, 0.1 sustituciones por posición. **b.** Diagrama que resume los diversos tipos de BGCs encontrados entre todos los genomas del análisis. **c.** Histograma del nº de cepas tipo de *Pseudomonas* (eje Y) que tienen determinados números de BGCs (eje X).

*Pseudomonas batumici* UCM B-321<sup>T</sup> (n = 23 BGCs), *Pseudomonas extremorientalis* LMG 19695<sup>T</sup> (n = 22 BGCs) y *Pseudomonas cichorii* ATCC 10857<sup>T</sup> (n = 21 BGCs) fueron las cepas cuyos genomas revelaron mayor número de BGCs, mientras que *Pseudomonas caeni* DSM 24390<sup>T</sup>, la cual tiene el genoma más pequeño del análisis, sólo reveló 1 BGC. Entre todos esos BGCs, el tipo mayoritario está compuesto por NRPSs (n = 498 BGCs) seguido de las bacteriocinas (n = 251 BGCs), N-acetil glutaminil-glutaminamidas (NAGGNs) (n = 170 BGCs),  $\beta$ -lactonas (n = 155 BGCs) y regiones del tipo NRPS-like (n = 135 BGCs). Además, se detectaron 91 híbridos de distintos tipos de BGCs. Según los resultados del análisis, la distribución de los NRPSs, tanto híbridos como no híbridos, arilpolienos, NAGGNs y PKSs, es dependiente de clado a lo largo del género *Pseudomonas* (Figura 7 y Figuras Suplementarias del Anexo II). Sin embargo, la distribución de BGCs relacionados con la síntesis de bacteriocinas y sideróforos no parece estar relacionada con la taxonomía de *Pseudomonas* (Figura 7 y Figuras Suplementarias del Anexo II).

Al comparar el número de BGCs con el tamaño del genoma se ha encontrado una correlación directamente proporcional; cuanto más grandes son los genomas de las cepas de *Pseudomonas*, más BGCs codifican. Sin embargo, no existe una correlación directa o inversa entre el número de BGCs y el número de cóntigos de los genomas (Figura 8)



**Figura 8.** Diagramas de dispersión representando el número de BGCs por genoma frente al número de cóntigos (a) y frente al tamaño del genoma (b).

Se utilizaron los programas BiG-SCAPE/CORASON para analizar y estudiar la diversidad y distribución de los BGCs detectados con antiSMASH. Con este procedimiento se crearon 800 GCFs (familias de BGCs que producirían metabolitos muy similares), con una media de 2 BGCs por familia, conteniendo 58 BGCs (arilpolienos) la GCF más numerosa. Este proceso incluyó 22 BGCs de la base de datos de MIBiG por su similitud con los presentes en este trabajo. La Figura 9 representa un *heatmap* con las 20 GCFs mayoritarias entre los 194 genomas del trabajo.

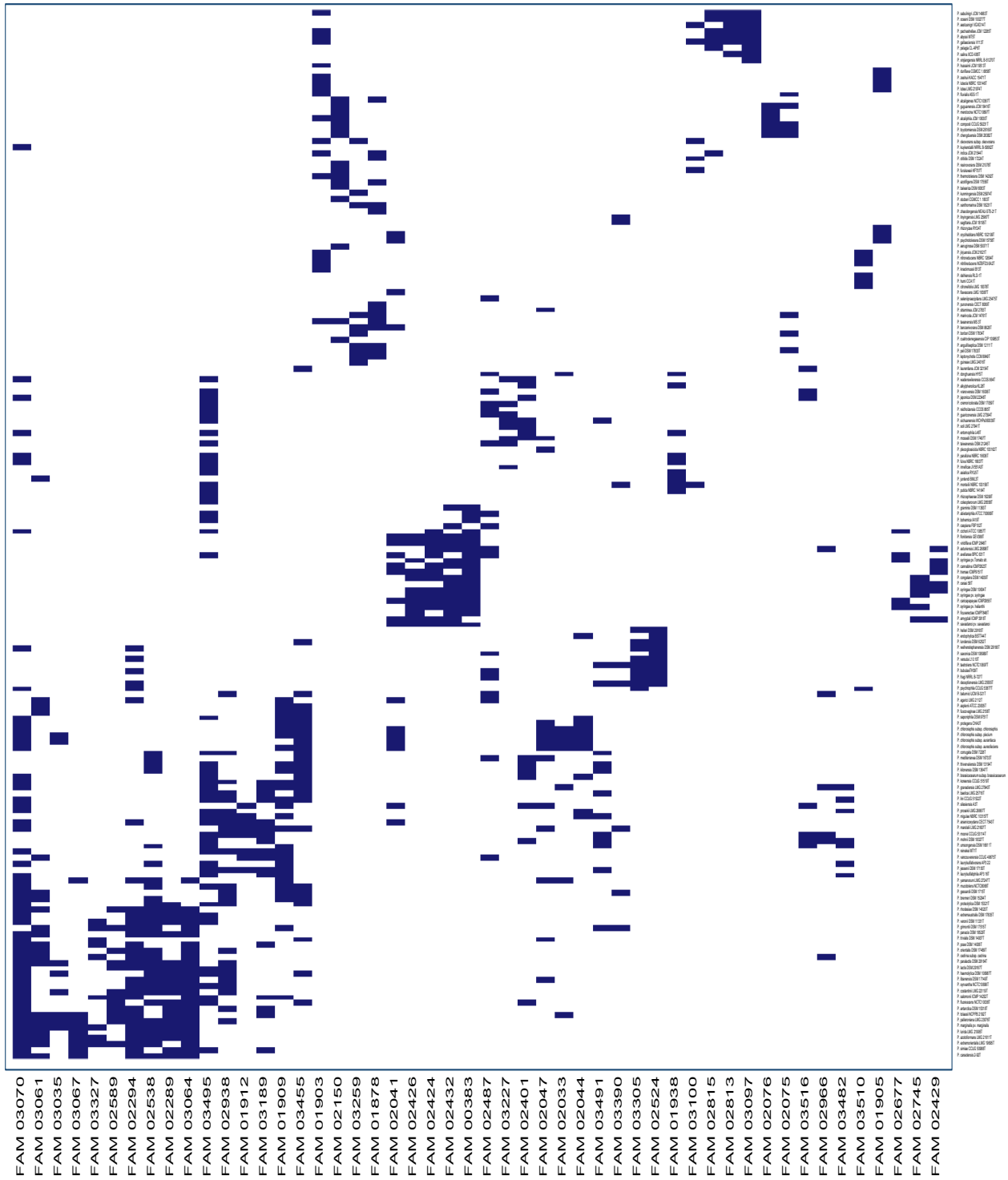
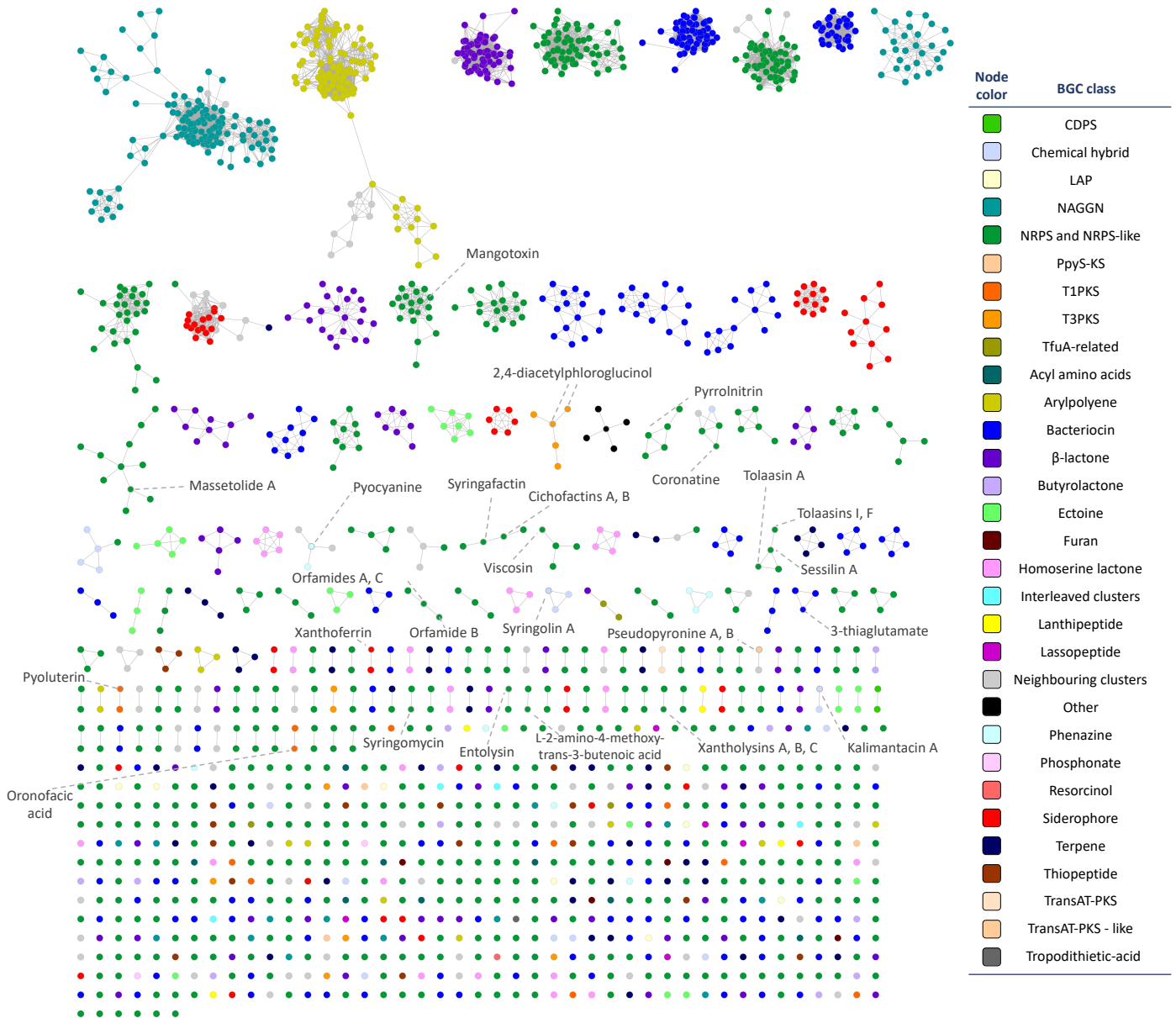


Figura 9. *Heatmap* representando la presencia (azul) o ausencia (blanco) de BGCs pertenecientes a las 20 GCFs mayoritarias entre los 194 genomas del trabajo.

Finalmente, utilizando Cytoscape se han visualizado las redes de similitud de secuencias (SSN), las cuales reflejan las relaciones entre los distintos BGCs encontrados en el pangenoma (Figura 10). En esta red se observan 54 sub-redes o clanes que contienen más de 2 BGCs, de las cuales 19 comprenden a más de 10 BGCs. Los clanes más grandes no incluyen a ningún BGC de MiBIG, es decir, no aparecen en esta base de datos de BGCs descritos, y, por lo tanto, estos clanes representan maquinaria genética que probablemente está implicada en la síntesis de nuevas moléculas.



**Figura 10.** SSN generada por BiG-SCAPE y anotada en Cytoscape representando las relaciones entre los distintos BGCs de este estudio. Aparecen señalados los BGCs públicos ya descritos que codifican compuestos ya conocidos.

### Co-evolución entre especies de *Pseudomonas* y sus GCFs

Se estudiaron las dinámicas evolutivas de las GCFs que engloban a más de 10 BGCs. Para ello, se construyeron tanglegramas entre los árboles filogenéticos de cada GCF y árboles construidos con UBCG con cada uno de los genomas de las especies bacterianas que forman parte de cada GCF (Figura 11 y Figuras Suplementarias del Anexo III).

Los tanglegramas incluidos en este análisis incluyen diversos tipos de BGCs, como arilpolienos, sideróforos, NAGGNs, bacteriocinas,  $\beta$ -lactonas, NRPSs y NRPS-like. Generalmente, la organización de los clados de los BGCs en estos tanglegramas es muy similar o exactamente la misma que la organización de los clados de especies de *Pseudomonas* en el árbol filogenético; esto parece indicar que la evolución de los patrones genéticos de los BGCs incluidos en las diferentes GCFs ha ocurrido en paralelo a la propia evolución de las especies de *Pseudomonas*. Los diagramas incluidos en los árboles de las GCFs (Figura 11b y Figuras Suplementarias del Anexo III) muestran cómo las principales fuerzas que condujeron a la diversificación de los BGCs de este estudio fueron ganancias o pérdidas de genes. Sin embargo, algunas GCFs no muestran diferencias en el número de genes de sus BGCs, sino sólo en las secuencias de nucleótidos o, al traducir, de aminoácidos, de las proteínas ortólogas.

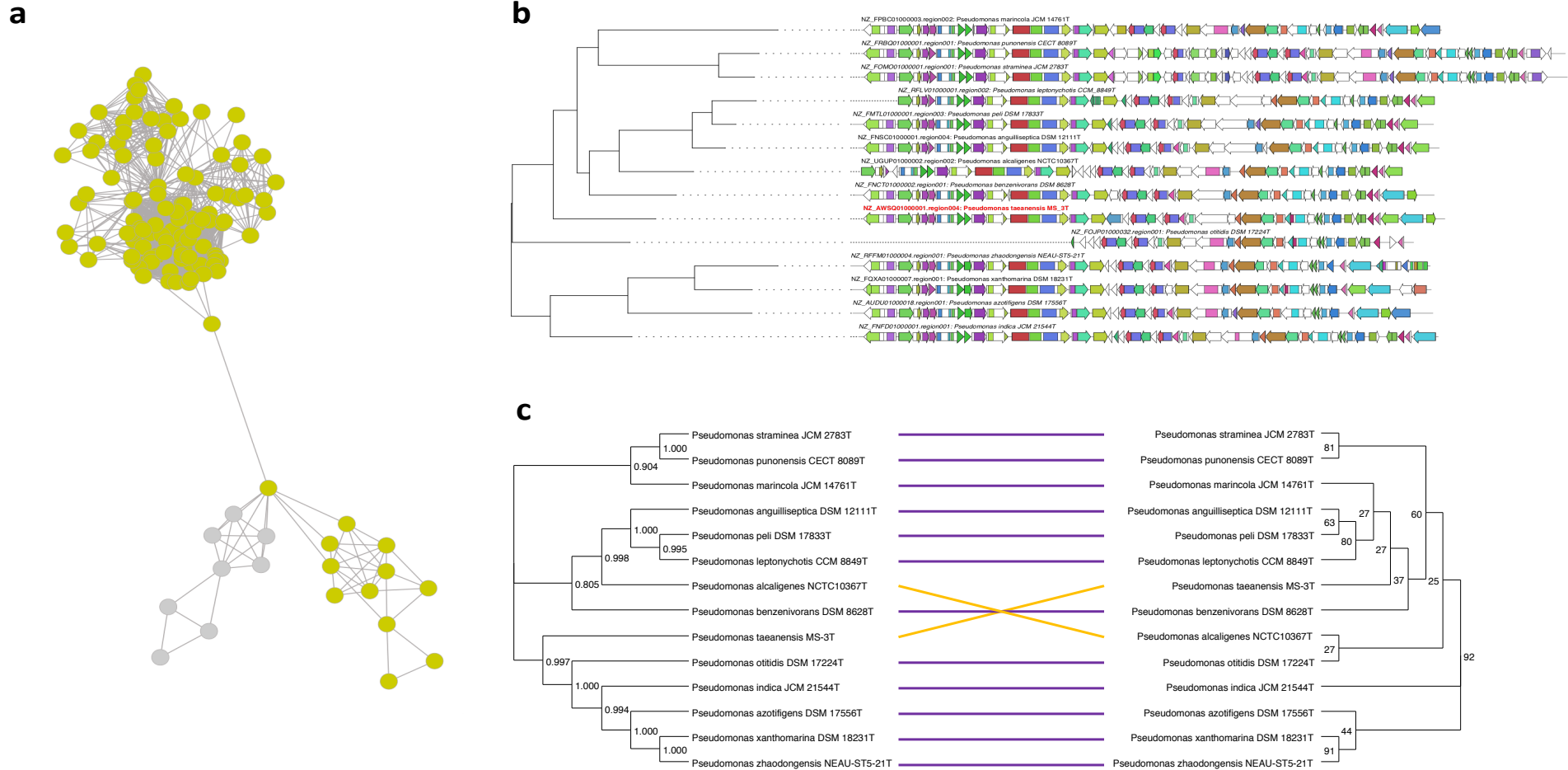
### Estudio de posibles nuevas implicaciones de las funciones del metabolismo lipídico en el metabolismo secundario de *Pseudomonas*.

Las policétido sintetasas (PKSs) son BGCs que han evolucionado desde el metabolismo lipídico y que están distribuidas de manera global entre las bacterias. Sin embargo, en este trabajo se han detectado muy pocas PKSs en el pangenoma de *Pseudomonas* ( $n = 36$ , 2% de los BGCs totales). Debido a esto, se hipotetiza que sería posible la existencia de otros sistemas biosintéticos del metabolismo secundario derivados de enzimas del metabolismo lipídico que, debido a la evolución, hayan adquirido nuevas funciones. Así pues, se ha investigado una posible implicación de proteínas pertenecientes a rutas metabólicas relacionadas con lípidos en el metabolismo secundario de *Pseudomonas*. Para ello se han utilizado métodos evolutivos (basados en la herramienta EvoMining) que permiten descubrir expansiones génicas del metabolismo central que puedan haber adoptado funciones en el metabolismo secundario. La construcción de un pangenoma con los genomas del estudio nos permitió identificar proteínas relacionadas con el metabolismo lipídico. Se seleccionaron 20 proteínas codificadas por el genoma de *P. aeruginosa* DSM 50071<sup>T</sup>, las cuales tienen más de 194 ortólogos dentro del pan-genoma y están representadas en la mayoría de los genomas. Estas 20 proteínas compusieron la base de datos del metabolismo central para EvoMining (Tabla 2).

Se extrajeron todos los ortólogos de estas proteínas en el pan-genoma utilizando sus secuencias de aminoácidos como referencia. Se identificó una expansión funcional cuando el número de proteínas ortólogas detectadas para cada proteína de referencia fue mayor que la media de cada



proteína por genoma. Las predicciones de BGCs obtenidas en apartados anteriores conformaron la base de datos de antiSMASH. Las proteínas de referencia se compararon con la base de datos de MIBiG para extraer BGCs ya descritos que contengan ortólogos proteicos de estas secuencias de aminoácidos. Se realizó una reconstrucción filogenética de cada familia proteica para identificar copias de proteínas que puedan haber evolucionado hacia la producción de nuevos metabolitos (Figura 12 y Figuras Suplementarias del Anexo IV). Las expansiones de enzimas están coloreadas en azul oscuro si están localizadas dentro de BGCs disponibles en MIBiG, o en cian si lo están en BGCs de las predicciones de antiSMASH. Se asume que las copias de enzimas alejadas a estas estarán implicadas en el metabolismo central (rojo). Cuando una de estas proteínas está localizada entre los límites de un BGC de las predicciones de antiSMASH, pero a su vez está localizada en el árbol filogenético muy cerca de copias implicadas en el metabolismo central, se ha señalado de color morado. Así pues, aquellos ortólogos que estén más cerca de los resultados relacionados con BGCs de MIBiG o de antiSMASH que del metabolismo central serán considerados hits de EvoMining (verde), los cuales podrían estar llevando a cabo nuevas funciones implicadas en sistemas de producción de metabolitos secundarios aún no descritos. Se han encontrado muchas de estas proteínas entre todos los árboles filogenéticos construidos (Figuras Suplementarias del Anexo IV), lo cual sugiere que algunas de dichas proteínas relacionadas con el metabolismo lipídico podrían cumplir funciones dentro de rutas biosintéticas de metabolitos secundarios en *Pseudomonas*.



**Figura 11.** **a.** Red individual de la SSN que representa un ejemplo de un clan de GCFs que contiene distintos BGCs de arilpolioides (nodos color mostaza) e híbridos de arilpolioides (nodos grises). **b.** Árbol filogenético de un GCF de arilpolioides incluido en este clan. Cada diagrama representa un BGC distinto con sus genes. El BGC rojo denota el BGC representativo de la GCF. **c.** Tanglegrama de la GCF (Izquierda; obtenido con el workflow BiGSCAPE/CORASON) y la filogenia de las cepas tipo con representantes en la GCF (derecha; obtenido con la herramienta UBGC). Los valores de bootstrap del árbol filogenético representan el número de árboles filogenéticos de UBGC que apoyan cada diferenciación evolutiva

Tabla 2. Selección de 20 proteínas que componen la base de datos del metabolismo central para EvoMining.

Nº en Central-DB	Nombre dado en CENTRALlipid_DB	Anotación funcional de la proteína
1	acyl-CoADeHydrogenase	acyl-CoA deshidrogenasa
2	PhaCNTerminus	Poli-beta-hidroxibutirato polimerasa (PhaC) N-terminal
3	Thiolase	Pertenece a la familia de las tiolasa
4	ThiolaseNTerminalDomain	Tiolasa, dominio N-terminal
5	OMPP1	Proteína de transporte de la membrana exterior (OMPP1/FadL/TodX)
6	syntheAcetoacetylCoA	Cataliza la síntesis de acetoacetyl CoA desde dos moléculas de acetyl CoA. Puede actuar también como tiolasa, catalizando la reacción reversa y generando dos unidades de carbono desde el producto de 4C de la oxidación de ácidos grasos.
7	AccCHomodimer	Un homodímero AccC que forma la subunidad biotina carboxilasa de la acetyl CoA carboxilasa, una enzima que cataliza la formación de malonil-CoA
8	acyl-CoADeHydrogenaseNterminal	Acil-CoA deshidrogenasa N terminal
9	3-OHisobutyrateDh	Pertenece a la familia del 3-hidroxiisobutirato deshidrogenasa
10	acyl-CoADeHydrogenaseCTerminal	Acil-CoA deshidrogenasa, dominio C-terminal
11	BiotinCarboxy	Biotina carboxilasa, dominio N-terminal
12	Enoyl-CoAHydratase	Pertenece a la familia del enoil-CoA hidratasa
13	CarboxylTransf	Proteína con dominio carboxil-transferasa
14	Acyl-CoaDeyC-terminusDos	Acil-CoA deshidrogenasa, dominio C-terminal
15	CisUnsaturation	Necesaria para la introducción de insaturaciones <i>cis</i> en ácidos grasos. Cataliza la deshidratación de (3R)-3-hidroxidecanil-ACP en E-(2)-decenoil-ACP y, después, su isomerización en Z-(3)-decenoil-ACP.
16	Glyce3PDehy	Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa NAD-dependiente, C-terminal
17	Malonyl-CoA	Primero, la biotina carboxilasa cataliza la carboxilación de la proteína transportadora y después la transcarboxilasa transfiere el grupo carboxilo para formar malonil-CoA
18	PhospholipaseD	Fosfolipasa D
19	Malonyl-ACP	Cataliza la reacción de condensación de la síntesis de ácidos grasos por la adición de un aceptor acilo del malonil-ACP
20	FAOxidation	Cataliza el paso final de la oxidación de ácidos grasos en la que se libera acetyl-CoA y se forma el éster de CoAs de un ácido graso de dos carbonos menos.

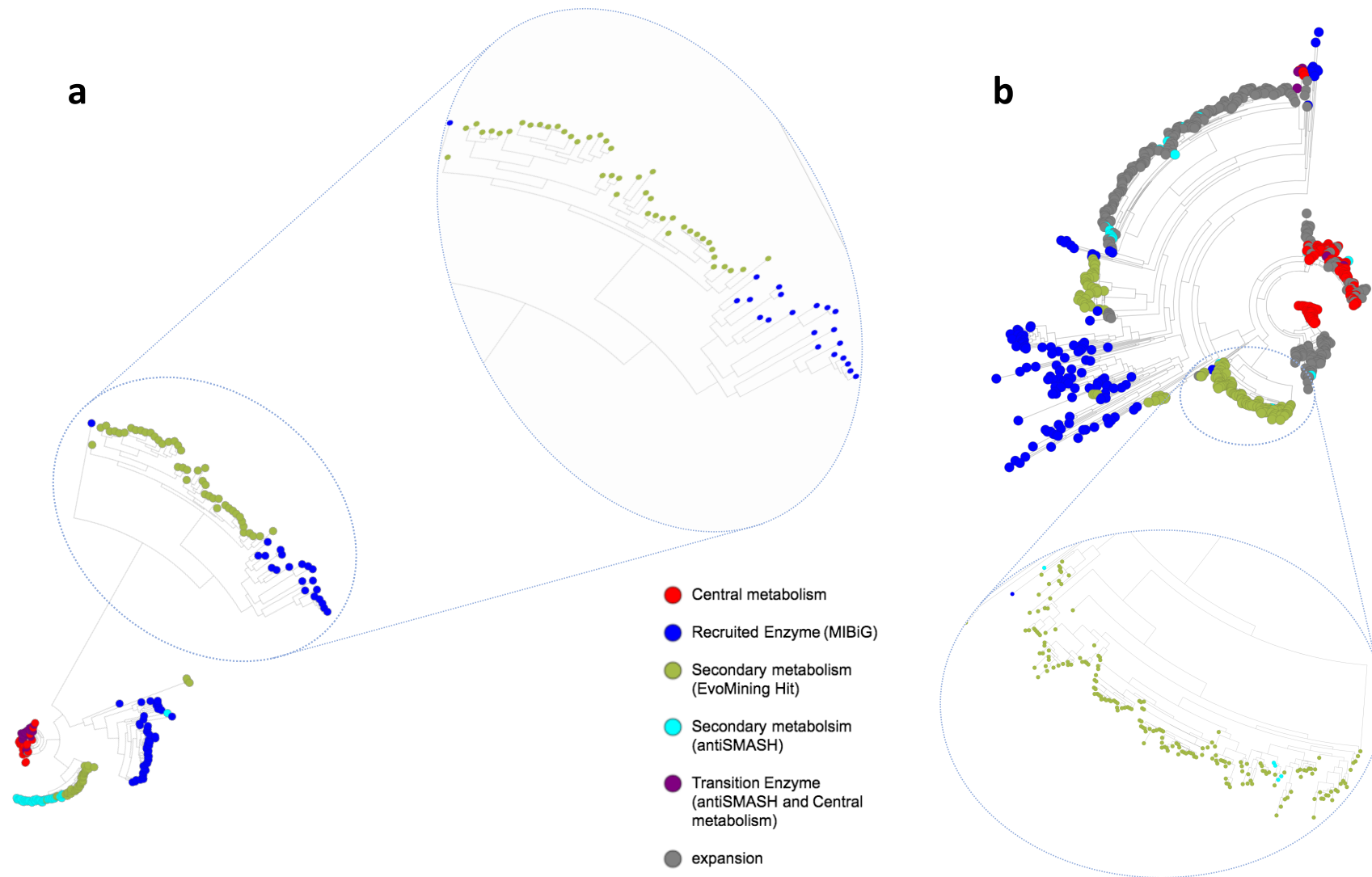
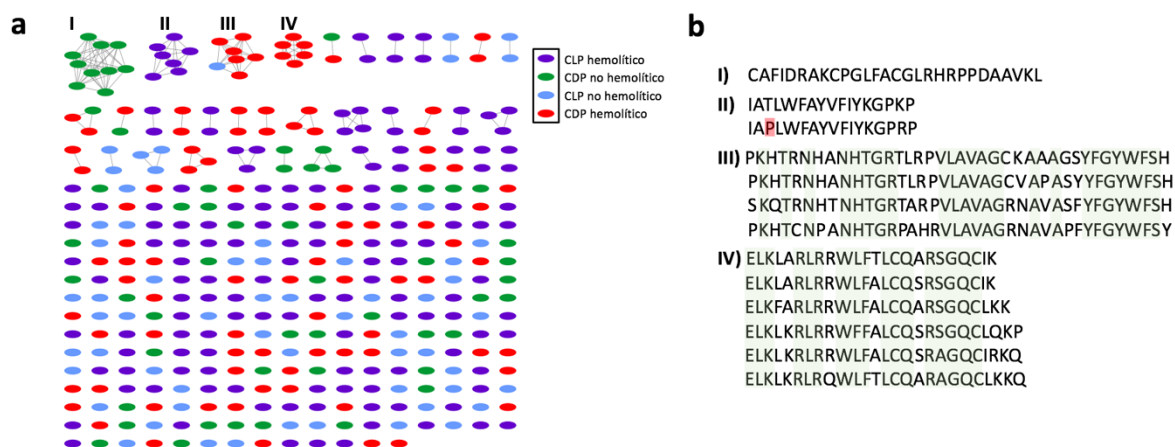


Figura 12. Ejemplo de árboles resultantes del proceso de EvoMining. Los nodos verdes representan copias de enzimas que podrían estar implicadas en nuevos sistemas biosintéticos de metabolitos secundarios.

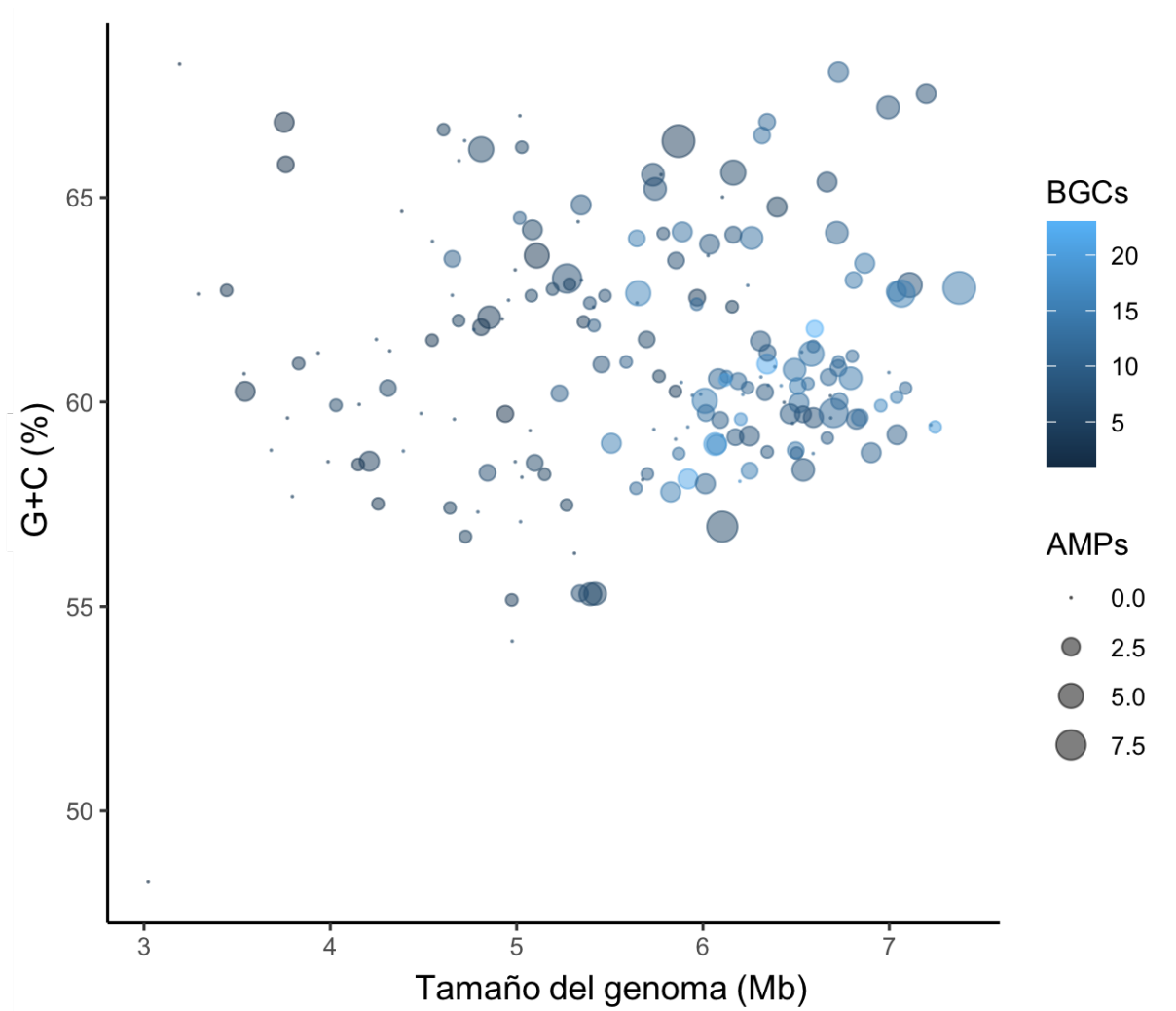
Con el objeto de profundizar en el metabolismo secundario del género *Pseudomonas*, se han predicho y clasificado los péptidos antimicrobianos (AMPs) codificados en los genomas a través del programa MACREL. A través de este procedimiento, se detectaron los marcos abiertos de lectura pequeños y se clasificaron según su carga (catiónicos o aniónicos) y su posibilidad de ser hemolíticos o no (Tabla Suplementaria 2 del Anexo I). En total se detectaron 356 AMPs catiónicos entre 151 genomas de los 194 genomas de *Pseudomonas* utilizados; 205 resultaron ser péptidos catiónicos lineales (CLPs) y 151 péptidos con puentes disulfuro (CDPs). Respecto a su potencial hemolítico, 119 de ellos se clasificaron como no-hemolíticos (61 CLPs y 58 CDPs), mientras que 237 se clasificaron como hemolíticos (144 CLPs y 93 CDPs). La longitud de los AMPs detectados varía entre 11 y 60 aminoácidos. Las cepas que codifican más AMPs resultaron ser *P. jinjuensis* JCM 21621<sup>T</sup> (n = 9) y *P. saponiphila* DSM 9751<sup>T</sup> (n = 9).

A través de BlastP, ejecutado de forma local, se compararon los 356 AMPs frente a la base de datos generada al unir 23.008 AMPs ya descritos y depositados en las bases de datos de DRAMP y APD3. Como resultado de esta comparación se encuentra que ninguno de los AMPs de este estudio ha tenido ninguna similitud significativa con ningún AMP ya descrito. La diversidad de los AMPs detectados se estudió a través de la SSN generada con EFI-EST (Figura 13a). Se encontró que los AMPs codificados por los genomas de *Pseudomonas* son muy diversos; sólo 55 AMPs forman parte de algún grupo o red de AMPs, siendo los 251 AMPs restantes únicos dentro de la red. Además se han encontrado pequeñas familias de AMPs que contienen pequeñas variaciones intrapeptídicas que podrían dar lugar a cambios en la bioactividad de las moléculas (Figura 13b).



**Figura 13.** a. SSN de las similitudes peptídicas de los AMPs detectados en este estudio. b. Secuencias peptídicas contenidas en las subredes numeradas (I-IV) en la figura de la izquierda. En verde se marcan las posiciones aminoacídicas compartidas entre distintos péptidos del mismo grupo.

Mediante la comparación del número de AMPs por cepa y el tamaño de su genoma (Figura 14) se encuentra una ligera tendencia de correlación entre ambos, es decir, a mayor tamaño del genoma, hay una mayor cantidad de AMPs codificados. Sin embargo, no se observa ninguna correlación directa ni inversa entre el contenido en G+C de los genomas o el número de BGCs con la cantidad de AMPs encontrados.



**Figura 14.** Gráfico de burbujas en el que se comparan el tamaño de los genomas de *Pseudomonas*, su contenido en G+C (%), el número de AMPs y el número de BGCs que están codificados en el genoma.

## ***Discusión***

Los metabolitos secundarios microbianos representan una valiosa fuente de agentes antibacterianos, antifúngicos, antivirales y antitumorales que pueden ser utilizados tanto en clínica como en la industria. Debido a esto, en las últimas décadas se han realizado grandes esfuerzos para aislar y caracterizar nuevos compuestos bioactivos de utilidad para la sociedad (Hug et al., 2020). Sin embargo, los microorganismos codifican una vasta diversidad de compuestos metabólicos que todavía no han sido descubiertos a través de técnicas dependientes de cultivo (Lok, 2015; Ziemert et al., 2016). En este sentido, las investigaciones guiadas por la genómica microbiana pueden ayudar a priorizar y seleccionar tanto cepas como maquinaria genética que pueda producir nuevos metabolitos de interés (Albarano et al., 2020).

Con estas premisas, y teniendo también en cuenta la diversidad metabólica de las bacterias del género *Pseudomonas* (Silby et al., 2011), en este capítulo se ha propuesto realizar un análisis genómico que sirviera como base para el descubrimiento de nuevas rutas metabólicas implicadas en la síntesis de metabolitos secundarios en las especies de este género bacteriano. Supondrá una importante herramienta que servirá como guía de futuras investigaciones encaminadas al descubrimiento de nuevas moléculas bioactivas de interés farmacológico y de otras industrias de base biotecnológica.

Como resultado de estas investigaciones, se ha encontrado una gran cantidad de BGCs que no están relacionados con BGCs responsables de la biosíntesis de metabolitos conocidos. De hecho, muchos de ellos están correlacionados, componiendo diversas GCFs que podrían dar lugar a la producción de nuevas familias químicas, por lo que su estudio conduciría al descubrimiento de numerosos metabolitos secundarios. Nuestros resultados desvelan que gran parte del potencial biosintético del género *Pseudomonas* está ligado a NRPSs. Las NRPSs son mega-enzimas responsables de la biosíntesis modular de péptidos con actividad antimicrobiana, antitumoral, surfactante, quelante o inmunomoduladora, entre otras (Flissi et al., 2020). La abundancia de los NRPSs detectados en *Pseudomonas* es acorde con la gran cantidad de NRPs descritos como productos de las bacterias del género (Gross y Loper, 2009). Sin embargo, muchos de los NRPSs detectados en genomas de microorganismos suelen aparecer incompletos cuando los genomas no han sido ensamblados en un único cromosoma completo (Meleshko et al., 2019). Debido a esto, es posible que el número de NRPSs detectados no sea del todo representativo. De hecho, muchos de los NRPSs detectados que tienen similitud con los descritos para la síntesis de pioverdinas aparecen sistemáticamente divididos en distintos BGCs, donde coincide un final de *contig* después del primer módulo biosintético del NRPS.

No existen muchas bacteriocinas descritas que sean producidas por *Pseudomonas*; sin embargo, este tipo de BGC es el segundo más numeroso detectado en este trabajo, lo cual ejemplifica la gran cantidad de metabolitos que quedan por descubrir en el género. De hecho, este tipo de BGCs parece ser muy diverso en el género, según lo representado en la SSN (Figura 2). Las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos sintetizados de forma ribosomal que son activos frente a distintos tipos de bacterias (Chikindas et al., 2018). Estos péptidos son una alternativa viable para solucionar la amenaza de las multi-resistencias a antimicrobianos debido no sólo a sus

actividades, sino a su facilidad para ser biotecnológicamente producidos y modificados (Cotter et al., 2013). Por lo tanto, el estudio y aplicación de las bacteriocinas codificadas por *Pseudomonas* podría ayudar a luchar frente a las resistencias a antibióticos.

De manera general, los resultados de este trabajo apoyan una relación entre la presencia/ausencia de algunos genes del metabolismo secundario y la taxonomía dentro del género *Pseudomonas*. Los NRPSs y arilpolienos están más presentes en un súper-clado de *Pseudomonas* que en el resto de las especies. Los NAGGNs están representados a lo largo de todo el género, excepto en unos pocos clados. Además, el estudio evolutivo de los tanglegramas de GCFs nos indica que los BGCs coevolucionan en la misma dirección que la diversificación de las especies bacterianas de *Pseudomonas*. Por lo tanto, un estudio basado en la filogenia de *Pseudomonas* podría ayudar a descubrir nuevas familias químicas codificadas por estas GCFs aún no descritas. Resultados similares han sido descritos en mixobacterias; Hoffman y colaboradores (2018) describieron cómo la presencia/ausencia de familias químicas producidas por estas bacterias tiene relación con su distribución filogenética. Una investigación análoga fue llevada a cabo sobre cepas de *Streptomyces* (Chevrette et al., 2019). En ella se demostró que la filogenia no sólo está relacionada con la diversidad de BGCs codificados por sus genomas, sino también con los perfiles de metabolómica. De la misma manera, se ha descrito una relación entre los metabolitos secundarios y su distribución filogenética en *Amylocaprosia* (Adamek et al., 2018). Sin embargo, a pesar de la evolución conservada, comentada anteriormente, se han encontrado algunos cruces notorios en los tanglegramas, los cuales podrían indicar eventos de transferencia horizontal de genes que podrían dar lugar a una diversificación química de sus productos (Adamek et al., 2019).

Tal y como se ha expuesto anteriormente, el tipo de BGC más frecuente en el pan-genoma de *Pseudomonas* está representado por las NRPSs, las cuales sintetizan péptidos bioactivos a través de macro-enzimas que utilizan aminoácidos derivados del metabolismo central como sustrato (Marahiel, 2016). A diferencia de las NRPSs, las PKSs biosintetizan metabolitos construidos a través de “bloques” de ácidos grasos en lugar de aminoácidos (Nivina et al., 2019). Sin embargo, a pesar de que las PKSs representan uno de los tipos de BGCs más abundantes en bacterias (Kautsar et al., 2020), solo se han encontrado unas pocas PKSs entre los genomas de *Pseudomonas*. Esta tendencia también aparece reflejada en la base de datos MiBIG, donde sólo aparecen 15 PKSs entre los 68 BGCs descritos de *Pseudomonas*, lo cual contrasta con las 324 PKSs depositadas (de un total de 636 BGCs) pertenecientes a *Streptomyces*. Debido a esto, se hipotetiza que otras proteínas del metabolismo lipídico podrían haber evolucionado hacia el metabolismo secundario en *Pseudomonas*. Esta hipótesis se consolida con los resultados del presente trabajo, donde se encuentra que muchos ortólogos de proteínas de la “CENTRALlipid-DB” son similares o próximos a proteínas que están inmersas entre los límites de BGCs detectados en las predicciones de antiSMASH o en BGCs ya descritos y depositados en la base de datos MiBIG. Estos casos están representados como *hits* de EvoMining. Por lo tanto, el estudio del contexto genético de estos *hits* podría dar lugar al descubrimiento de nuevos metabolitos secundarios o, incluso, de nuevas familias de compuestos químicos. La fiabilidad de esta aproximación podría ser ejemplificada por el descubrimiento de metabolitos arsénico-orgánicos en estreptomicetos a través de una metodología similar (Cruz-Morales et al., 2016). La gran cantidad de *hits* de



EvoMining que derivan de las bases de datos de este estudio apoyan la hipótesis de que algunas funciones del metabolismo lipídico podrían haber evolucionado hacia la ganancia de nuevas funciones dentro del metabolismo secundario en *Pseudomonas*.

Las estrategias guiadas por la genómica están siendo adoptadas en el estudio de los compuestos naturales. Sin embargo, los métodos utilizados para prospectar el potencial metabólico de los microorganismos suelen excluir a los genes más pequeños, debido a la dificultad de detectar y anotar de forma precisa los marcos de lectura pequeños o smORFs, por sus siglas en inglés (*small Open Reading Frames*) (Miravet-Verde et al., 2019). Los AMPs son péptidos antimicrobianos pequeños que están constituidos por menos de 100 aminoácidos y que, por tanto, están codificados por smORFs. Debido a su simple maquinaria genética, la bioingeniería y estudio de estos péptidos pequeños resulta sencilla. Por lo tanto, aparte del estudio presentado sobre metabolitos secundarios codificados por grandes conjuntos de genes, se ha querido dilucidar el potencial metabólico de las bacterias del género *Pseudomonas* para producir AMPs a través de la búsqueda y caracterización *in silico* de pequeños péptidos. El gran número de AMPs detectados que no tienen similitud con AMPs ya descritos desvela una oportunidad para descubrir nuevos péptidos de utilidad en la industria farmacéutica. Además, la falta de redundancia encontrada entre los AMPs en el pan-genoma del estudio sugiere que la presencia de AMPs no tiene patrones filogenéticos en *Pseudomonas*.

Finalmente, desde un punto de vista especie-específico, la comparación de todas las cepas tipo de *Pseudomonas* incluidas en estos análisis permite señalar algunas de ellas como cepas prometedoras para el descubrimiento de nuevos productos naturales bioactivos. Basándonos en el número y diversidad de los BGCs y AMPs crípticos detectados y la poca información disponible en la literatura sobre el metabolismo secundario de cepas bacterianas pertenecientes a estas especies, se sugiere que la utilización de las cepas tipo de las especies *P. constantinii*, *P. extremorientalis*, *P. batumici*, *P. cichorii* y *P. jinjuensis* podría ser rentable para el descubrimiento de nuevas moléculas bioactivas.

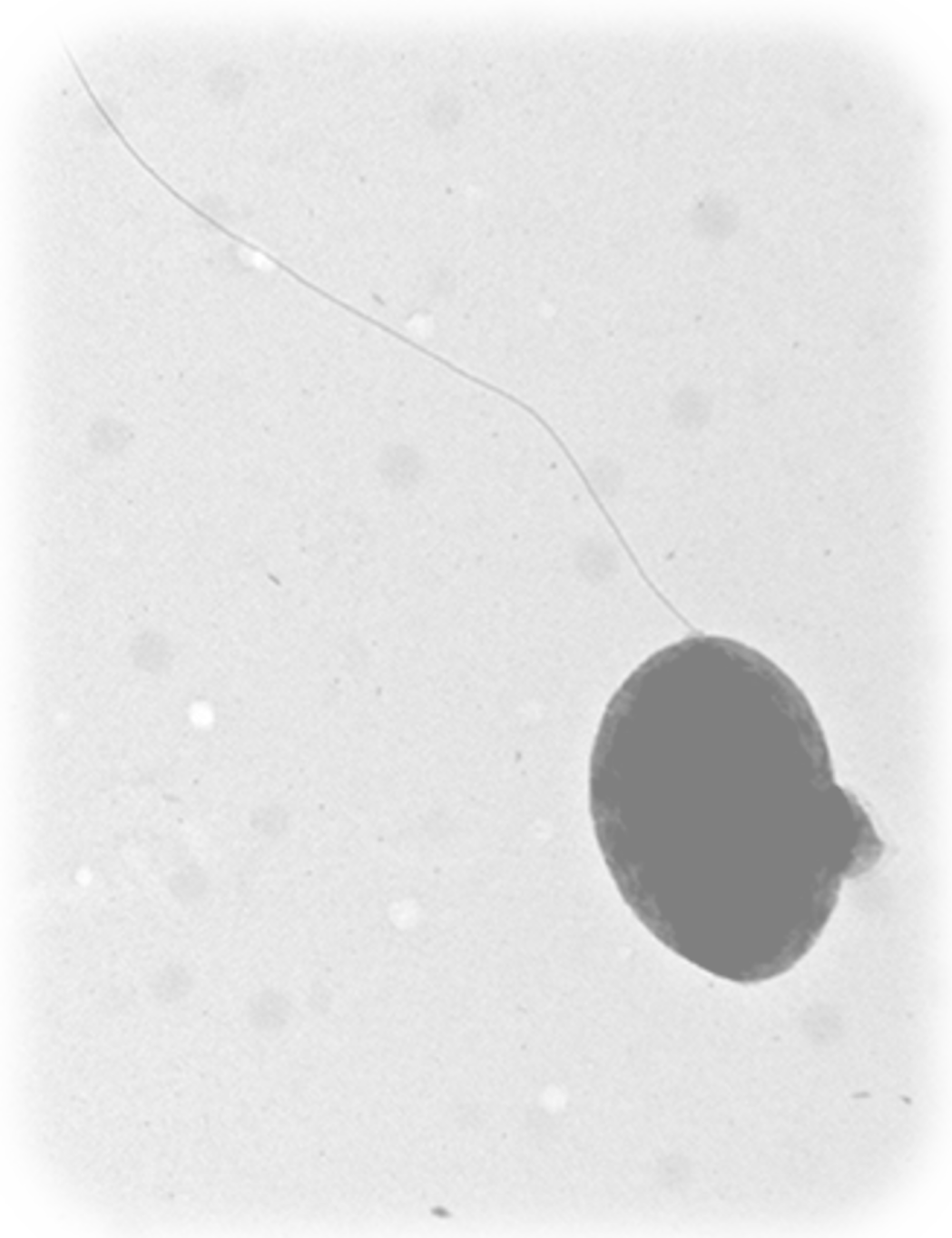


# Capítulo II

*Descripción de nuevas especies bacterianas y producción de compuestos antimicrobianos por bacterias del género *Pseudomonas* aisladas de escarabajos de la madera.*







# *Introducción*



## ***Introducción***

### **Microbioma de insectos. Funciones y fuente de nuevos antimicrobianos.**

En los últimos años, la importancia del “microbioma” se ha vuelto cada vez más evidente. El concepto “microbioma” concebido por Joshua Lederber en 2001, engloba a todos los microorganismos, junto con sus genomas, de un determinado nicho u hospedador (Hooper y Gordon, 2001; Mullis et al., 2021). Tras miles de trabajos que han tratado de descifrar la importancia del microbioma, se ha conseguido saber que éste no sólo es el agente causal de muchas enfermedades, sino que es también de vital importancia para la supervivencia de su hospedador (Chomicki et al., 2020; Wodzanowski et al., 2020). Los distintos miembros del microbioma, tanto de humanos, como de plantas, hongos y de cualquier tipo de animal, han sido capaces de evolucionar para adaptarse a su hospedador, y viceversa (Hosokawa y Fukatsu, 2020; Moreau, 2020). Esta coevolución ha dado lugar a simbiosis mutualistas, en las cuales tanto el hospedador como el huésped se benefician de la interacción (Chomicki et al., 2020). Algunas de las funciones de mayor relevancia del microbioma incluyen la degradación de sustratos complejos que facilitan la absorción de nutrientes al hospedador, el aporte de nutrientes esenciales, la activación del sistema inmune y la protección directa frente a otros microorganismos a través de la producción de moléculas antimicrobianas (Chomicki et al., 2020; Wang et al., 2020; Saati-Santamaría et al., 2021). Dentro de estas interacciones huésped-hospedador también se incluyen las interacciones bacteria-insecto, las cuales están siendo ampliamente estudiadas en las últimas décadas (Trienens y Beukeboom 2019; Teoh et al., 2021). El rol de los endosimbiontes de insectos cubre funciones como el aporte de aminoácidos esenciales y vitaminas del grupo B (Moriyama et al., 2015; Mao et al., 2020), la resistencia a insecticidas (Chen et al., 2020; Teoh et al., 2021) o, incluso, la regulación de la reproducción del hospedador (Bi et al., 2020).

La composición del microbioma de distintos hospedadores, incluyendo los insectos, está siendo descifrada gracias a las recientes técnicas de secuenciación masiva (Peixoto et al., 2020; Trivedi et al., 2020; Moreno-Indias et al., 2021). Estas técnicas, sobre todo la metatranscriptómica y la metagenómica *shotgun*, además de informar sobre la diversidad de microorganismos presentes en un hospedador, pueden dar pistas sobre las posibles funciones del microbioma (Daliri et al., 2021; Nguyen et al., 2021; Westermann y Vogel., 2021).

Sin embargo, las predicciones funcionales de los miembros del microbioma precisan del aislamiento de microorganismos para poder tener la certeza sobre las capacidades reales predichas (Jiménez-Gómez et al., 2020; Jing et al., 2020). Además, el aislamiento de estos microorganismos puede dar lugar a diversas aplicaciones de interés, como es el caso de la producción de nuevos antimicrobianos. Por ejemplo, se ha visto que bacterias del género *Streptomyces* aisladas de insectos son capaces de producir más compuestos antimicrobianos que cepas de la misma especie aisladas de otros nichos (Figura 15) (Chevrette et al., 2019). De hecho, se han descubierto nuevos antimicrobianos a partir de bacterias comensales de insectos (Scott et al., 2008; Van Arnem et al., 2016; Molloy et al., 2017; Chevrette et al., 2019). En su conjunto,

este tipo de estudios refleja la capacidad de las bacterias simbiotas de insectos para inhibir a otros microorganismos y así proteger a su hospedador.

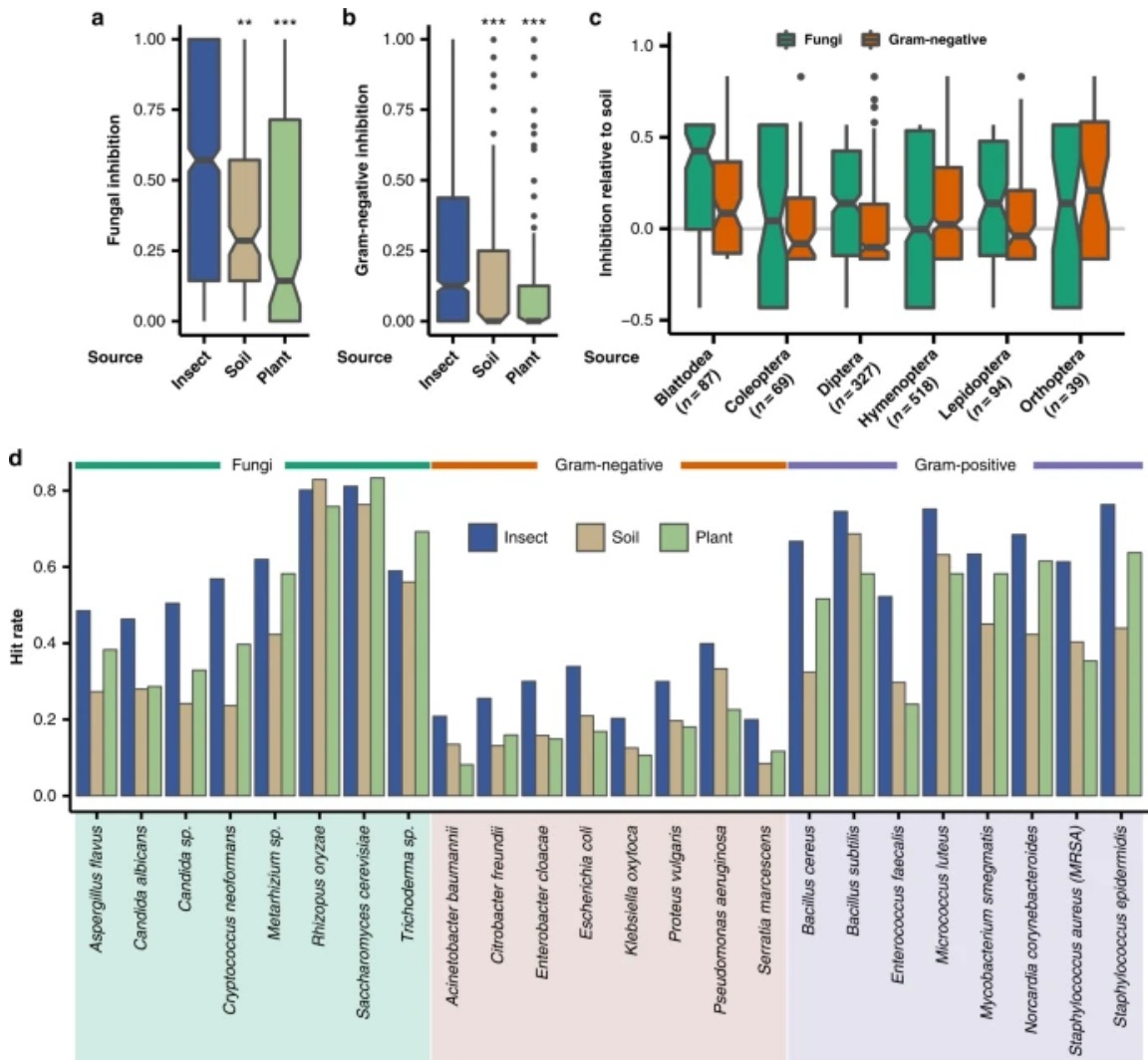


Figura 15. Bioactividad de *Streptomyces* aislados de insectos. **a** Los hongos y **b** las bacterias Gram-negativas son más inhibidos por bacterias aisladas de insectos que de plantas o suelo. **c** Las cepas aisladas de distintos órdenes de insecto varían en su potencial antimicrobiano. **d** Número de cepas que inhiben a distintos microorganismos según el nicho de aislamiento. Imagen tomada de Chevrette et al. (2019).

### Escarabajos de la corteza y su microbioma

Los escarabajos de la corteza (*Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae*) son pequeños insectos que viven bajo la corteza de los árboles (Figura 16). La mayor parte de su ciclo biológico –desde huevos hasta adultos– sucede bajo esta corteza, pero después emergen en la búsqueda de nuevos árboles hospedadores donde llevar a cabo el estadio reproductivo y comenzar un nuevo ciclo (Lindgren y Raffa, 2013).



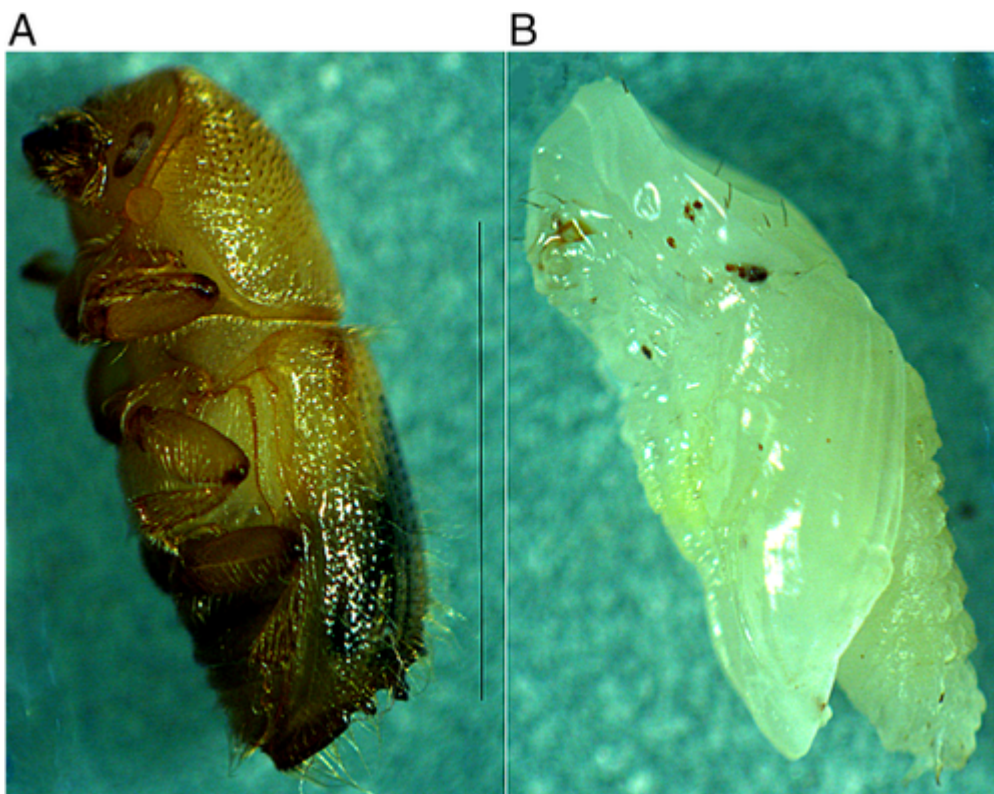
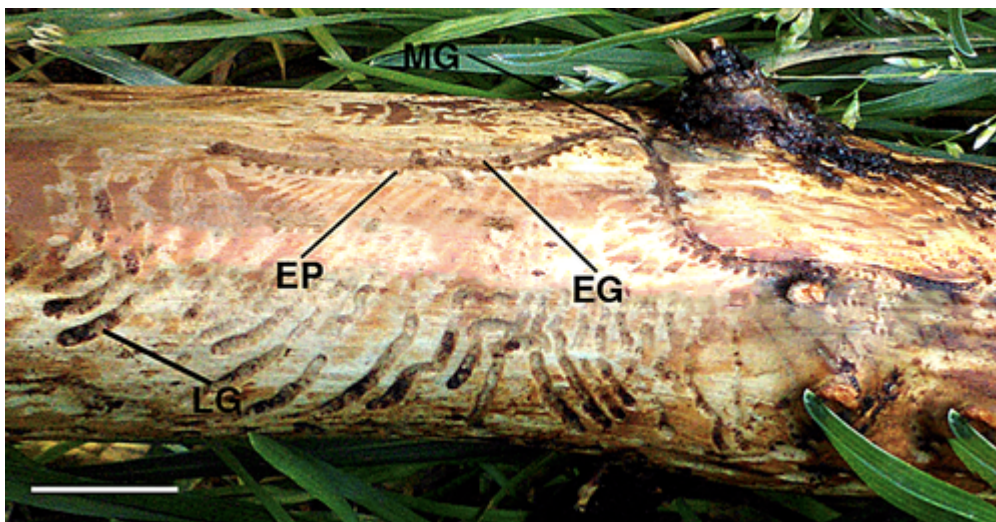


Figura 16: Fotografías del escarabajo de la corteza *Ips typographus*. A. adulto. B. Pupa. Escala 2 mm. Imagen tomada de García-Fraile (2018).

Bajo la corteza, estas especies de escarabajos crean una serie de conductos o galerías donde se aparean y depositan los huevos y, más tarde, se desarrollan las larvas y pupas, hasta llegar a la fase adulta (Figura 17).

Estos insectos se clasifican en dos grupos ecológicos: los escarabajos ambrosia, quienes dependen nutricionalmente del cultivo de hongos del grupo Ambrosia y, por otro lado, los escarabajos que se nutren del floema y de la corteza del árbol (Raffa et al., 2015). Por lo general, cada especie de escarabajo floeofago sólo se nutre en un estrecho abanico de especies de árboles, los cuales suelen pertenecer al mismo género, mientras que los ambrosia tienen un espectro más generalista (Byers, 1995). Aunque algunos escarabajos sólo atacan árboles muertos, otros pueden causar enormes devastaciones forestales, por lo que son considerados como plagas en muchas regiones del planeta (García-Fraile, 2018; Biedermann et al., 2019).



**Figura 17.** Interior de las galerías de escarabajos de la corteza del género *Ips* en una rama de abeto. Escala, 1 cm. MG, galería de apareamiento; EG, galería de huevos; EP, sitio de los huevos; LG, galería larvaria. Imagen tomada de García-Fraile (2018).

Al igual que los seres humanos y otros organismos superiores, los escarabajos de la corteza tienen su propio microbioma, el cual cohabita en estos insectos constituyendo una entidad conocida como “escarabajo holobionte” (García-Fraile, 2018). Se ha reportado cómo numerosos microorganismos de este holobionte tienen un rol importante en la nutrición de su hospedador (Six, 2013; García-Fraile, 2018; Fabryová et al., 2018), mientras que otros protegen al escarabajo de compuestos de defensa producidos por el árbol (Boone et al., 2013) o frente a microorganismos patógenos (Scott et al., 2008).

Una de las simbiosis más estudiadas de los escarabajos de la corteza es aquella establecida con hongos ambrosia u ofiostomatoides (Raffa et al., 2015). A diferencia de la gran cantidad de paradigmas descubiertos en las últimas décadas para estas interacciones (Six et al., 2013; Veselská et al., 2019), las llevadas a cabo entre bacterias y escarabajos sólo están empezando a ser estudiadas, y se centran, principalmente, en las posibles funciones de estos simbiosiontes en la nutrición del hospedador o la detoxificación del ambiente (García-Fraile, 2018; Peral-Aranega et al., 2020; Saati-Santamaría et al., 2021). Sin embargo, no existen muchos trabajos que estudien el rol de bacterias en la defensa biológica de los escarabajos de la corteza.

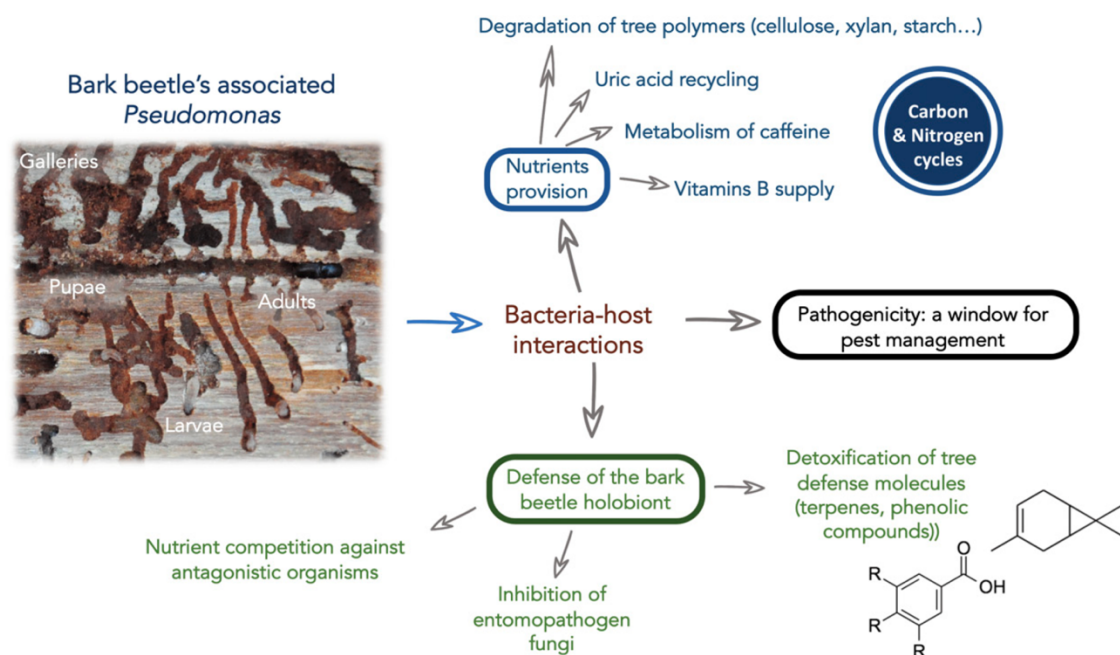
### Interacciones entre *Pseudomonas* y escarabajos de la corteza

Entre todos los grupos bacterianos asociados a los escarabajos de la corteza, se ha encontrado que las *Pseudomonas* representan un constante en su microbioma (Saati-Santamaría et al., 2021). Este género de bacterias se ha detectado en 35 especies de escarabajos de la corteza, pertenecientes a 11 géneros distintos (*Anisandrus*, *Dendroctonus*, *Ips*, *Xyleborinus*, *Hylesinus*, *Xyleborus*, *Xylocleptes*, *Pityogenes*, *Cryphalus*, *Hypothenemus*, y *Scolytodes*), los cuales han sido recogidos de 24 especies de árboles pertenecientes a 9 géneros (*Pinus*, *Pseudotsuga*, *Coffea*, *Cecropia*, *Corylus*, *Larix*, *Fraxinus*, *Abies* y *Picea*) (Saati-Santamaría et al., 2021). La asociación de

*Pseudomonas* a estos escarabajos se ha descrito tanto a través de métodos dependientes de cultivo, como a través de metagenómica, bien de amplicones del gen 16S ARNr como de tipo *shotgun* (Tabla 3). Entre estos trabajos, las *Pseudomonas* se han encontrado en distintos estadios del escarabajo (adultos, pupas y larvas) e, incluso, en distintas partes del cuerpo o del nicho (intestino, heces, superficie externa, excreciones orales, galerías y floema), llegando a representar parte del microbioma *core* o central de estos insectos (Tabla 3).

Tal y como se muestra en la Tabla 3, las *Pseudomonas* asociadas a estos insectos podrían ser capaces de favorecer la nutrición del escarabajo a través de la degradación de moléculas complejas, como son algunos polisacáridos de la corteza del árbol, el aporte de vitaminas o la incorporación de nitrógeno al ciclo nutricional del holobionte. Además, se han demostrado distintos casos en los que cepas de *Pseudomonas* aisladas de estos escarabajos son capaces de metabolizar terpenos y compuestos fenólicos del árbol hospedador, lo cual podría favorecer la supervivencia del insecto, o incluso, de transformar estas moléculas en feromonas detectables por los escarabajos (Tabla 3, Figura 18).

Por otro lado, la diversidad metabólica de las *Pseudomonas* permite que estas bacterias sean capaces de inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos de los escarabajos de la madera a través de metabolitos con acción antimicrobiana (Tabla 3, Figura 18). Sin embargo, no existen estudios que desvelen qué molécula o moléculas son las responsables de estas inhibiciones microbianas por parte de ninguna cepa del género *Pseudomonas*.



**Figura 18.** Esquema de las funciones de *Pseudomonas* en escarabajos de la corteza. Imagen tomada de Saati-Santamaría et al. (2021).

**Tabla 3.** Resumen de estudios en los que se han encontrado *Pseudomonas* asociadas a escarabajos de la corteza. Se incluye el árbol hospedador del escarabajo, el tipo de muestra o parte del escarabajo donde se han detectado las *Pseudomonas*, el estadio vital del escarabajo, el método de detección (MD) de las *Pseudomonas* y las funciones propuestas de *Pseudomonas* en el escarabajo. I = Intestino; Ga = galería; H = heces; E = escarabajo entero machacado; F = floema; SO = secreción oral; S = superficie; L = larva; Pu = pupa; Im = imago; PA = adultos pre-emergentes ; A = Adultos; CIA =Métodos independientes de cultivos basados en secuenciación masiva de amplicones; CIS = Métodos independientes de cultivos basados en metagenómica *shotgun*; CD = métodos dependientes de cultivo. Tabla traducida de Saati-Santamaría et al. (2021).

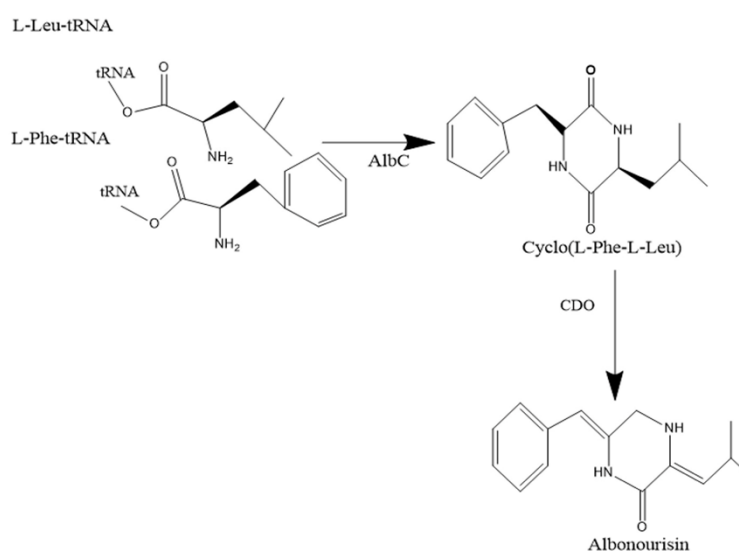
Escarabajo (árbol hospedador)	Muestra	Estadio	MD	Funciones de <i>Pseudomonas</i>	Referencia
<i>Dendroctonus adjunctus</i> ( <i>Pinus hartwegii</i> ), <i>D. approximatus</i> ( <i>P. teocote</i> ), <i>D. jeffreyi</i> ( <i>P. jeffreyi</i> ), <i>D. mesoamericanus</i> ( <i>P. teocote</i> ), <i>D. mexicanus</i> ( <i>P. patula</i> ), <i>D. parallelocollis</i> ( <i>P. hartwegii</i> ), <i>D. ponderosae</i> ( <i>P. strobiformis</i> ), <i>D. pseudotsugae</i> ( <i>Pseudotsuga menziesii</i> var. <i>glauca</i> ), <i>D. rhizophagus</i> ( <i>P. arizonica</i> ), <i>D. valens</i> ( <i>P. leiophylla</i> ), <i>D. vitei</i> ( <i>P. pseudostrabus</i> )	I	-	CIA	-	Hernández-García et al., 2017
<i>D. rhizophagus</i> ( <i>P. arizonica</i> )	I	L, Pu, Im, PA, EA	CIA	-	Briones-Roblero et al., 2017b
<i>D. simplex</i> ( <i>Larix x eurolepis</i> )	Cutícula, Ga	A	CIA	-	Durand et al., 2015
<i>D. valens</i> ( <i>P. resinosa</i> )	Ga	-	CIA	-	Mason et al., 2016
<i>D. valens</i> ( <i>P. tabuliformis</i> )	I	A	CIA	Predicción de funciones metabólicas con PICRUST	Xu et al., 2019
<i>Xyleborinus saxeseni</i> , <i>D. ponderosae</i> , <i>D. frontalis</i>	E, Ga	L, A	CIA CIS	Reconstruyen genomas de <i>Pseudomonas</i> de diversos insectos y muestran que són muy similares a través de valores ANI	Aylward et al., 2014
<i>Xyleborus affinis</i> , <i>Xyleborus bispinatus</i> , <i>Xyleborus volvulus</i> (cultivados artificialmente)	E	A	CIA	Predicción de funciones metabólicas con PICRUST	Ibarra-Juarez et al. (2018)
<i>Xyleborus affinis</i> (cultivados artificialmente)	E	A	CIA	Predicción de funciones metabólicas con PICRUST	Ibarra-Juarez et al. (2020)
<i>D. ponderosae</i> ( <i>P. contorta</i> y <i>P. contorta</i> – <i>P. banksiana</i> hybrid)	E, Ga	A	CIS	Potencial para degradar terpenos y diterpenos.	Adams et al. (2013)
<i>D. rhizophagus</i> ( <i>P. arizonica</i> )	I	L, A	CD	Actividades lipolíticas, amilolíticas, esterasicas, celulolíticas y xilanolíticas	Briones-Roblero et al., 2017a
<i>D. ponderosae</i> ( <i>Pinus</i> sp.)	E, Ga, F	A	CD	Degradación <i>In vitro</i> de monoterpenos	Boone et al., 2013
<i>D. valens</i> ( <i>P. montezumae</i> or <i>P. leiophylla</i> )	I	-	CD	Actividad uricolítica. Capacidad para usar ácido úrico como única Fuente de nitrógeno, carbono y energía	Morales-Jiménez et al., 2013
<i>D. ponderosae</i> ( <i>P. contorta</i> )	S	L, A	CD	-	Winder et al., 2010
<i>D. armandi</i> ( <i>P. armandii</i> )	I	L	CD	Actividad celulolítica	Hu et al., 2014
<i>D. valens</i> ( <i>Pinus</i> sp.)	I, H	A	CD	Producción de verbenone, degradación de $\alpha$ -pinene	Xu et al., 2015, 2016
<i>D. micans</i> ( <i>Picea orientalis</i> )	E	L, A	CD	-	Yılmaz et al., 2006
<i>D. rufipennis</i> ( <i>Picea</i> sp.), <i>D. ponderosae</i> ( <i>P. contorta</i> )	SO	A	CD	-	Cardoza et al., 2009
<i>Anisandrus</i> (=Xyleborus) <i>dispar</i> ( <i>Corylus</i> sp.)	E	L	CD	-	Kati y Kati, 2013
<i>D. valens</i> ( <i>P. contorta</i> y <i>P. contorta</i> — <i>P. banksiana</i> hybrids)	E	A	CD	Pueden crecer en presencia de monoterpenos	Adams et al., 2011

<i>Hylesinus fraxini</i> ( <i>Fraxinus excelsior</i> )	E	A	CD	Actividad celulolítica	Menéndez et al., 2015
<i>Cryphalus piceae</i> ( <i>Abies alba</i> ), <i>Ips typographus</i> ( <i>Picea abies</i> )	E	A, L	CD	Degradación de celulosa, xilano, almidón y diversos colorants químicos.	Fabryová et al., 2018
<i>D. rufipennis</i>	SO	A	CD	Inhibe hongos asociados con cavidades orales del escarabajo	Cardoza et al., 2006
<i>D. ponderosae</i> ( <i>P. contorta</i> )	SO	L, A	CD	Promueven el crecimiento de hongos simbios, mientras que inhiben el crecimiento de hongos antagónicos	Adams et al., 2009
<i>D. valens</i> ( <i>P. tabuliformis</i> )	S, H, I	L	CD	La inoculación de distintas cepas de <i>Pseudomonas</i> reduce los efectos antagónicos de <i>L. procerum</i> y <i>O. minus</i> sobre el crecimiento larvario. Inhiben directamente el crecimiento de <i>O. minus</i> . Cuando la bacteria es inoculada, el consume de D-pinitol y D-glucose se reduce en <i>O. minus</i> , mientras que aumenta el de D-pinitol por parte de <i>L. procerum</i>	Zhou et al, 2016
<i>I. sexdentatus</i> ( <i>P. orientalis</i> )	E	A	CD	Un aislado aumenta la mortalidad de larvas cuando es inoculado. Otra cepa, no.	Sevim et al., 2012
<i>D. valens</i>	-	-	CD	Volátiles de <i>Pseudomonas</i> disminuyen el crecimiento de <i>O. minus</i> y, por tanto, aumenta el crecimiento larvario	Wang et al., 2017
<i>D. valens</i>	-	-	CD	Volátiles de <i>Pseudomonas</i> disminuyen el crecimiento de <i>L. procerum</i> y, por tanto, aumenta el crecimiento larvario	Zhou et al., 2017
<i>D. ponderosae</i>	E, Ga	-	CD	La inoculación de cepas de <i>Pseudomonas</i> en <i>P. contorta</i> y <i>P. banksiana</i> reduce los efectos antagónicos de <i>Aspergillus</i> y <i>Trichoderma</i> , lo cual da lugar a que haya más larvas y galerías más grandes.	Therrien et al., 2015
<i>Cryphalus piceae</i> ( <i>Abies alba</i> )	E	A	CD	Capacidad para inhibir a otros microorganismos	Saati-Santamaría et al., 2018
<i>Ips pini</i> ( <i>P. resinosa</i> )	I	P, A	CD	-	Delalibera et al., 2007
<i>Hypothenemus hampei</i> ( <i>Coffea arabica</i> , <i>Coffea arabica</i> var <i>limani</i> , <i>C. congensis</i> x <i>C. canephora</i> ), <i>H. eruditus</i> ( <i>Cecropia</i> sp.), <i>Scolytodes maurus</i> ( <i>Cecropia</i> sp.)	E	-	CD CIA	Degradación <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de cafeína (uso como única fuente de C y N)	Ceja-Navarro et al., 2015
<i>Ips duplicatus</i> , <i>I. typographus</i> y <i>Polygraphus poligraphus</i> ( <i>Picea abies</i> ), <i>I. acuminatus</i> y <i>I. sexdentatus</i> ( <i>Pinus sylvestris</i> ), <i>I. cembrae</i> ( <i>Larix decidua</i> ).	I	A	CIA	Predicción de funciones metabólicas con PICRUST	Chakraborty et al. (2020)
<i>D. frontalis</i> ( <i>P. taeda</i> )	I	A	CD CIA	-	Vasanthakumar et al., 2006

### Ciclodipéptidos: biosíntesis y funciones

Los ciclodipéptidos (CDPs) son dipéptidos cíclicos formados tras la condensación de dos aminoácidos que da lugar a una estructura 2,5-dicetopiperazina (DKP) (Yao et al., 2018). Esta estructura aporta valiosas cualidades a estas moléculas, ya que suele proporcionar resistencia a la proteólisis y capacidad para atravesar barreras biológicas, como la intestinal o la hematoencefálica (Teixidó et al., 2007). Diversos compuestos con esta estructura están siendo investigados debido a su potencial como agentes antitumorales, antimicrobianos o antiinflamatorios, como la plinabulina (NPI.2358), la fenilhistina o la biciclomicina (Yao et al., 2018).

La condensación de los dos aminoácidos que dan lugar a los ciclodipéptidos puede suceder, de forma biológica, a través de dos mecanismos, las sintetas de péptidos no ribosomales (NRPSs) y las ciclodipéptido sintetas (CDPSs) (Mishra et al., 2017). Las NRPSs son enzimas multimodulares que ensamblan péptidos a partir de aminoácidos libres, los cuales son seleccionados a través de sus dominios de adenilación (Mishra et al., 2017; Yao et al., 2018). En contraposición a esto, las CDPSs precisan de la presencia de aminoacil ARNts, a quienes sustrae los aminoácidos para la síntesis del CDP en cuestión (Liu et al., 2018). Recientemente, Harding y colaboradores (2021) han demostrado que estas enzimas podrían ser capaces de utilizar amino-ésteres activados en lugar de aminoacil ARNts, aunque dando lugar a una catálisis muy poco eficaz. Una vez producida la condensación aminoacídica, el CDP puede sufrir modificaciones, ampliando así la diversidad química de estas moléculas (Mishra et al., 2017) (Figura 19).



**Figura 19.** Biosíntesis de CDPs por CDPSs y su modificación posterior a través de “*tailoring enzymes*”. Albonourisin [Cyclo( $\Delta$ Phe- $\Delta$ Leu)] (AlbC), es un ciclodipéptido antimicrobiano producido tras la acción de una ciclodipéptido oxidasa (CDO) sobre el CDP ciclo(l-Phe-l-Leu). Imagen tomada de Mishra et al., 2017.

La caracterización cristalográfica de ejemplares de CDPSs ha permitido entender parcialmente su mecanismo de acción y, por tanto, determinar el centro activo de la enzima (Jacques et al., 2015). En base a la comparación *in silico* de decenas de ejemplares de estas proteínas y la determinación de ciertos residuos conservados (principalmente, los aminoácidos 40, 202 y 203 según la numeración de la proteína *AlbC*, PDB: 3OQV), las CDPSs se clasifican en 3 subfamilias: NYH, SYQ y

XYP, nombres que responden a los aminoácidos presentes en las posiciones comentadas (Jacques et al., 2015). Las CDPSs tienen cierta promiscuidad en su segundo sitio activo. De esta manera, una CDPSs puede producir distintos CDPs que se diferencian en el segundo aminoácido (el primero permanece invariable), aunque suelen producir una de sus moléculas producto de forma predominante sobre el resto (Gondry et al., 2018). En conjunto, se han descrito casi 100 CDPs distintos producidos por CDPSs provenientes de muchos organismos, principalmente bacterias y, en concreto, actinobacterias (Gondry et al., 2018), aunque sólo dos, ciclo(Glu-Ala) y ciclo(Leu-Glu), han sido purificadas de cepas de *Pseudomonas* (ambas con CDPSs de la subfamilia XYP) (Jacques et al., 2015). Esto también se refleja en los datos obtenidos en el capítulo I, en el que, de los 1.721 BGCs detectados entre todas las genomas de cepas tipo de *Pseudomonas*, sólo se encontraron 3 CDPSs.

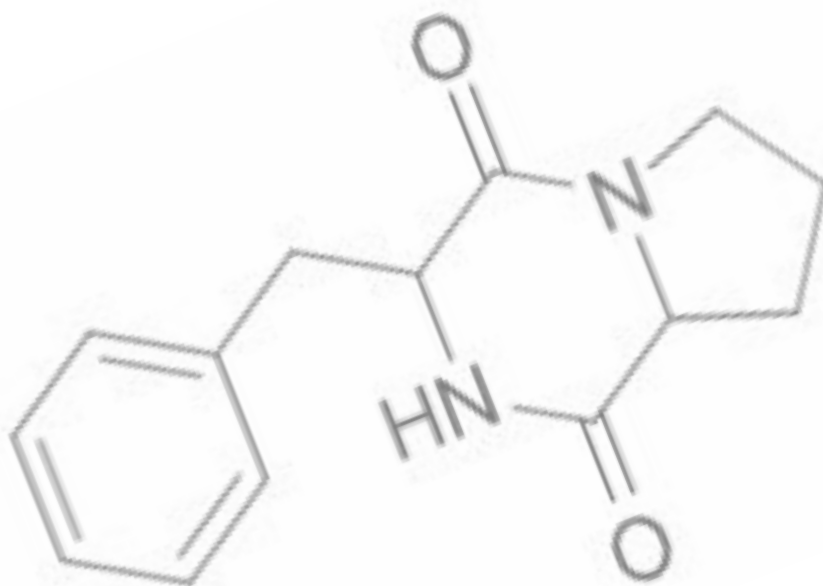
Teniendo en cuenta el potencial poco estudiado de las bacterias asociadas a los escarabajos de la madera para producir sustancias antimicrobianas -relacionadas con el rol de algunas de estas cepas, entre las que destacan las bacterias del género *Pseudomonas*, en la protección del escarabajo holobionte-, en el presente capítulo, se pretende profundizar en el estudio las moléculas antimicrobianas producidas por estos aislados.

Partiendo de la obtención de una colección de aislados de diversas especies de estos escarabajos y un análisis de su capacidad para inhibir microorganismos, se encontró que las cepas con mayor potencial antagonista pertenecen al género *Pseudomonas*. Así, se profundiza en el estudio del potencial de estas cepas para producir compuestos antimicrobianos mediante la secuenciación y minería genómica de las cepas más prometedoras. Además, se selecciona una de las cepas para la obtención de extractos y la purificación e identificación de moléculas antimicrobianas, encontrándose la capacidad de dicho aislado para producir CDPs, moléculas con actividad antimicrobiana poco comunes en el género *Pseudomonas*.

Finalmente, y teniendo en cuenta que el aislamiento e identificación de aislados a partir de escarabajos de la corteza sugirió la presencia de nuevas especies bacterianas entre las cepas del estudio, en este capítulo se incluye también un estudio taxonómico de dichas cepas, el cual concluye con la descripción de tres nuevas especies, dos de ellas pertenecientes al género *Pseudomonas* y una más perteneciente al género *Arthrobacter*.







*Resultados y  
discusión*



## Resultados

### Aislamiento e identificación de microorganismos

En el presente trabajo se obtuvieron un total de 41 aislados bacterianos de los escarabajos de la corteza *Ips cembrae*, *Xylocleptes bispinus*, *Ips acuminatus*, y *Pityogenes bidentatus* (todos Coleoptera, Scolytinae). La identificación de estas bacterias mediante la comparación de la secuencia de sus genes 16S ARNr aparece en la Tabla 4.

**Tabla 4:** Cepas bacterianas aisladas en este capítulo, escarabajo del que han sido aisladas. Se incluye la identificación basada en el gen 16S ARNr. A la derecha aparecen los resultados de los ensayos de antagonismo microbiano frente a *B. subtilis* (BS), *E. coli* (EC), *S. cerevisiae* (SC), *M. luteus* (ML), *C. Humilis* (CH) y *S. marcescens* (SM)

Cepa	Escarabajo	Identificación (% similitud 16S ARNr)	BS	EC	SC	ML	CH	SM
IS1	<i>I. cembrae</i>	<i>Erwinia billingiae</i> CIP 106121(T) (100)			+		+	*
IS2	<i>I. cembrae</i>	<i>Pseudomonas koreensis</i> Ps 9-14(T) (98,97)	+	+	+		+	+
IS3	<i>I. cembrae</i>	<i>Pseudomonas koreensis</i> Ps 9-14(T) (98,97)	+	+	+		+	+
IS6	<i>I. cembrae</i>	<i>Pseudomonas koreensis</i> Ps 9-14(T) (98,97)	+	+	+		+	+
IS7	<i>I. cembrae</i>	<i>Pseudomonas koreensis</i> Ps 9-14(T) (98,97)	+	+	+		+	+
IS8	<i>I. cembrae</i>	<i>Pseudomonas koreensis</i> Ps 9-14(T) (98,97)	+	+	+		+	+
IS10	<i>I. cembrae</i>	<i>Pseudomonas koreensis</i> Ps 9-14(T) (98,97)	+		+		+	
IS11	<i>I. cembrae</i>	<i>Pseudomonas koreensis</i> Ps 9-14(T) (98,97)	+	+	+		+	+
IS12	<i>I. cembrae</i>	<i>Pseudomonas koreensis</i> Ps 9-14(T) (98,97)	+	+	+		+	+
IS14	<i>I. cembrae</i>	<i>Pseudomonas koreensis</i> Ps 9-14(T) (98,97)	+	+	+		+	+
IS15	<i>I. cembrae</i>	<i>Paraburkholderia kirstenboschensis</i> Kb15(T) (98,82)						
IS16	<i>I. cembrae</i>	<i>Pseudomonas ficuserectae</i> M7D1(T) (100,00)	*		+		+	*
IS19	<i>I. cembrae</i>	<i>Paraburkholderia kirstenboschensis</i> Kb15(T) (98,82)						
IS20	<i>I. cembrae</i>	<i>Pseudomonas taiwanensis</i> BCRC17751(T) (100)						
IS21	<i>I. cembrae</i>	<i>Pseudomonas amygdali</i> CFBP 3205(T) (99,21)			+			*
IS24	<i>I. cembrae</i>	<i>Neisseria perflava</i> U15 (99,92)						
IS27	<i>I. cembrae</i>	<i>Streptococcus oralis</i> subsp. <i>tigurinus</i> AZ_3a(T) (99,11)			+			
XB1	<i>X. bispinus</i>	<i>Pseudomonas graminis</i> DSM 11363(T) (99,93)						
XB4	<i>X. bispinus</i>	<i>Pseudomonas graminis</i> DSM 11363(T) (99,95)			+		+	
XB6	<i>X. bispinus</i>	<i>Pseudomonas graminis</i> DSM 11363(T) (100)	+		+		+	*
XB7	<i>X. bispinus</i>	<i>Actinomyces oris</i> CCUG 34288(T) (99,19)	+		+	+	+	
IA19	<i>I. acuminatus</i>	<i>Pseudomonas lutea</i> DSM 17257(T) (98,6)	+		D	+	D	+
PB9	<i>P. bidentatus</i>	<i>Erwinia typographi</i> DSM 22678 (T) (99,2)			D		D	
IA7	<i>I. acuminatus</i>	<i>Arthrobacter globiformis</i> NBRC12137(T) 99,52	+		D	D	D	+
IA4	<i>I. acuminatus</i>	<i>Pseudomonas lutea</i> DSM 17257(T) (98,6)	+					
IA13	<i>I. acuminatus</i>	<i>Pseudomonas lutea</i> DSM 17257(T) (98,6)	+					*
IA3	<i>I. acuminatus</i>	<i>Micrococcus yunnanensis</i> YIM 65004 (T) (99,7)						*
PB4	<i>P. bidentatus</i>	<i>Pseudomonas agarici</i> NCPPB 2298 (T) (99,7)						
PB6	<i>P. bidentatus</i>	<i>Erwinia billingiae</i> CIP 106121 (T) (100)	D					
PB2	<i>P. bidentatus</i>	<i>Acidovorax radialis</i> N35 (T) (99,5)			+			
IA5	<i>I. acuminatus</i>	<i>Pseudomonas koreensis</i> AF 468452 (99,4)	+				+	*
PB8	<i>P. bidentatus</i>	<i>Pseudomonas cichorii</i> ATCC 10857 (T) (99,2)						
IA2	<i>I. acuminatus</i>	<i>Pseudomonas lutea</i> DSM 17257(T) (98,6)	+				+	*

IA15	<i>I. acuminatus</i>	<i>Pseudomonas lutea</i> DSM 17257(T) (98,6)	+			+	*
IA16	<i>I. acuminatus</i>	<i>Pseudomonas lutea</i> DSM 17257(T) (98,6)	+		D	D	*
IA18	<i>I. acuminatus</i>	<i>Pseudomonas lutea</i> DSM 17257(T) (98,6)					
IA9	<i>I. acuminatus</i>	<i>Pseudomonas yamanorum</i> 8H1 (T) (99,9)				D	*
IA12	<i>I. acuminatus</i>	<i>Pseudomonas gessardii</i> DSN 17152 (T) (99,9)	+		D	D	*
IA14	<i>I. acuminatus</i>	<i>Pseudomonas lutea</i> DSM 17257(T) (98,6)	+		D	D	
IA6	<i>I. acuminatus</i>	<i>Pseudomonas yamanorum</i> 8H1 (T) (99,9)		+		+	
IA17	<i>I. acuminatus</i>	<i>Pseudomonas lutea</i> DSM 17257(T) (98,6)	+		D		D

+: Resultado positivo

D: Resultado positivo débil

Vacío: resultado negativo

\*: interfiere en la producción de pigmentos de *Serratia marcescens*

Color azul: cepas seleccionadas por su potencial para inhibir a los microorganismos de referencia

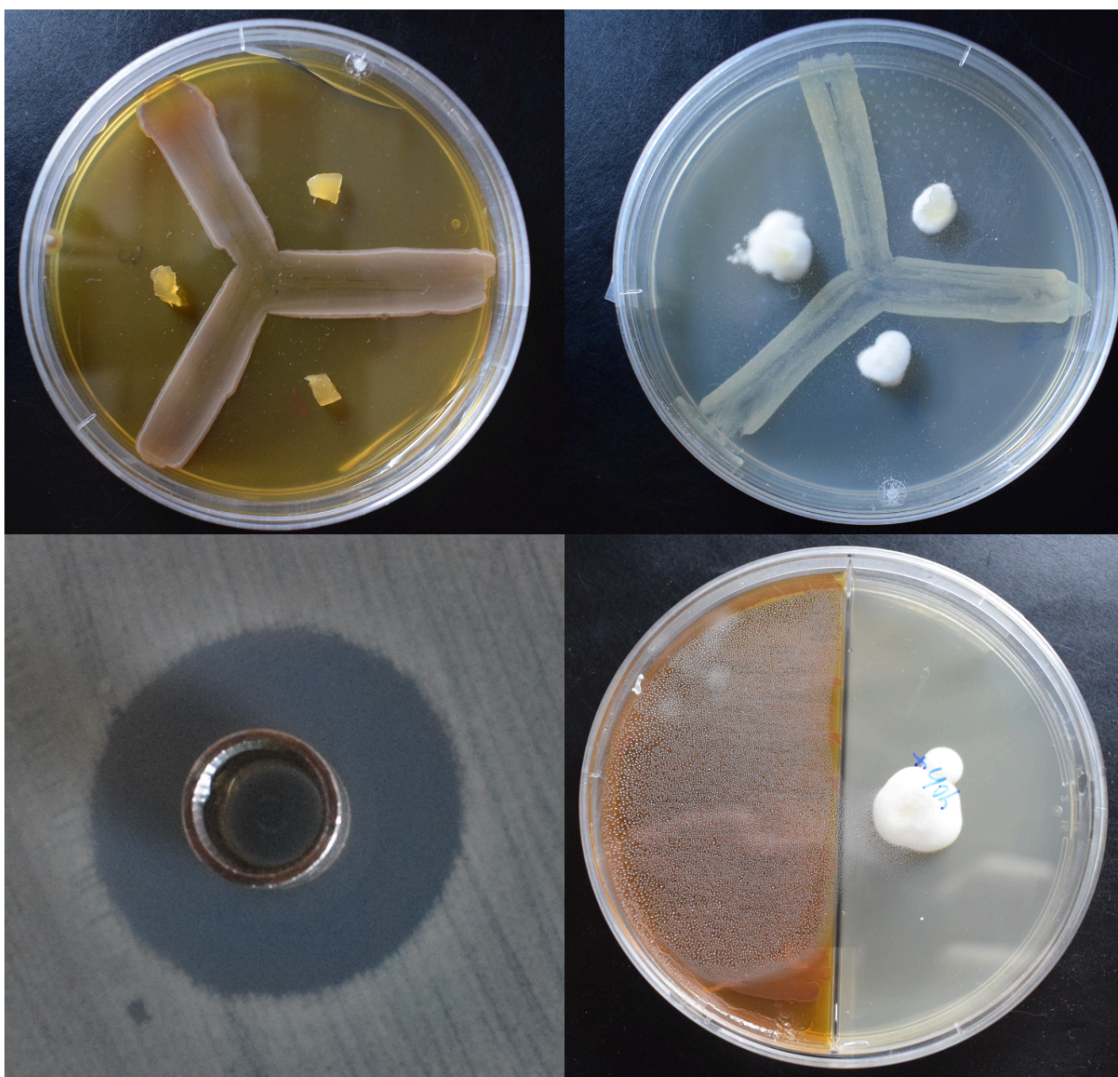
En estos resultados es destacable la abundancia de cepas del género *Pseudomonas* (30/41 aislados), aunque también se han encontrado cepas de los géneros *Erwinia*, *Acidovorax*, *Micrococcus*, *Actinomyces*, *Streptococcus*, *Neisseria*, *Paraburkholderia* y *Arthrobacter* (Tabla 4).

### Ensayos de antagonismos microbianos

Con el objetivo de averiguar si las cepas aisladas de los escarabajos pudieran tener un rol en la protección del holobionte, se ensayó su capacidad para producir compuestos antimicrobianos. Para ello, se han realizado antagonismos microbianos, cuyos resultados (Tabla 4) desvelan cepas del género *Pseudomonas* capaces de inhibir a bacterias Gram-positivas, Gram-negativas y a hongos levaduriformes.

Las cepas con resultados más prometedores fueron seleccionadas para realizar más ensayos de antagonismo que nos permitan profundizar en el rol de las *Pseudomonas* en la protección de su holobionte. Estas cepas - IS2, IS3, IS6, IS7, IS8, IS10, IS11, IS12, IS14, IA19- se enfrentaron a 9 hongos entomopatógenos capaces de atacar a escarabajos de la corteza del género *Ips*, del cual habían sido aisladas todas las cepas seleccionadas. A excepción de la cepa IA19, las otras 9 han sido capaces de inhibir totalmente el crecimiento de los siguientes hongos (Figura 20):

- *Metarhizium anisopliae* CCF0966
- *Lecanicillium muscarium* CCF6041
- *L. muscarium* CCF3297
- *Isaria fumosorosea* CCF4401
- *I. farinosa* CCF4808
- *Beauveria bassiana* CCF4422
- *Beauveria bassiana* CCF5554
- *B. brongniartii* CCF1547



**Figura 20.** Arriba izquierda: resultado positivo en ensayo de inhibición de hongos filamentosos. Arriba derecha: resultado negativo en ensayo de inhibición de hongos filamentosos. Abajo izquierda: halos de inhibición del sobrenadante de cultivo filtrado sobre un cultivo bacteriano. Abajo derecha: ensayo de inhibición por volátiles, con resultado negativo.

El viraje de color del medio de cultivo (PDA) a un tono marrón tras el crecimiento de las cepas con resultados positivos indica que estas bacterias producen una gran cantidad de moléculas de esta tonalidad difusibles por el agar.

Por otro lado, para comprobar que las moléculas responsables de la bioactividad encontrada no son volátiles, se realizó un ensayo de inhibición por volátiles, encontrado resultados negativos (Figura 20), lo cual confirma que las inhibiciones producidas son consecuencia de la presencia de moléculas bioactivas que se difunden en la matriz del agar.

### Secuenciación de genomas

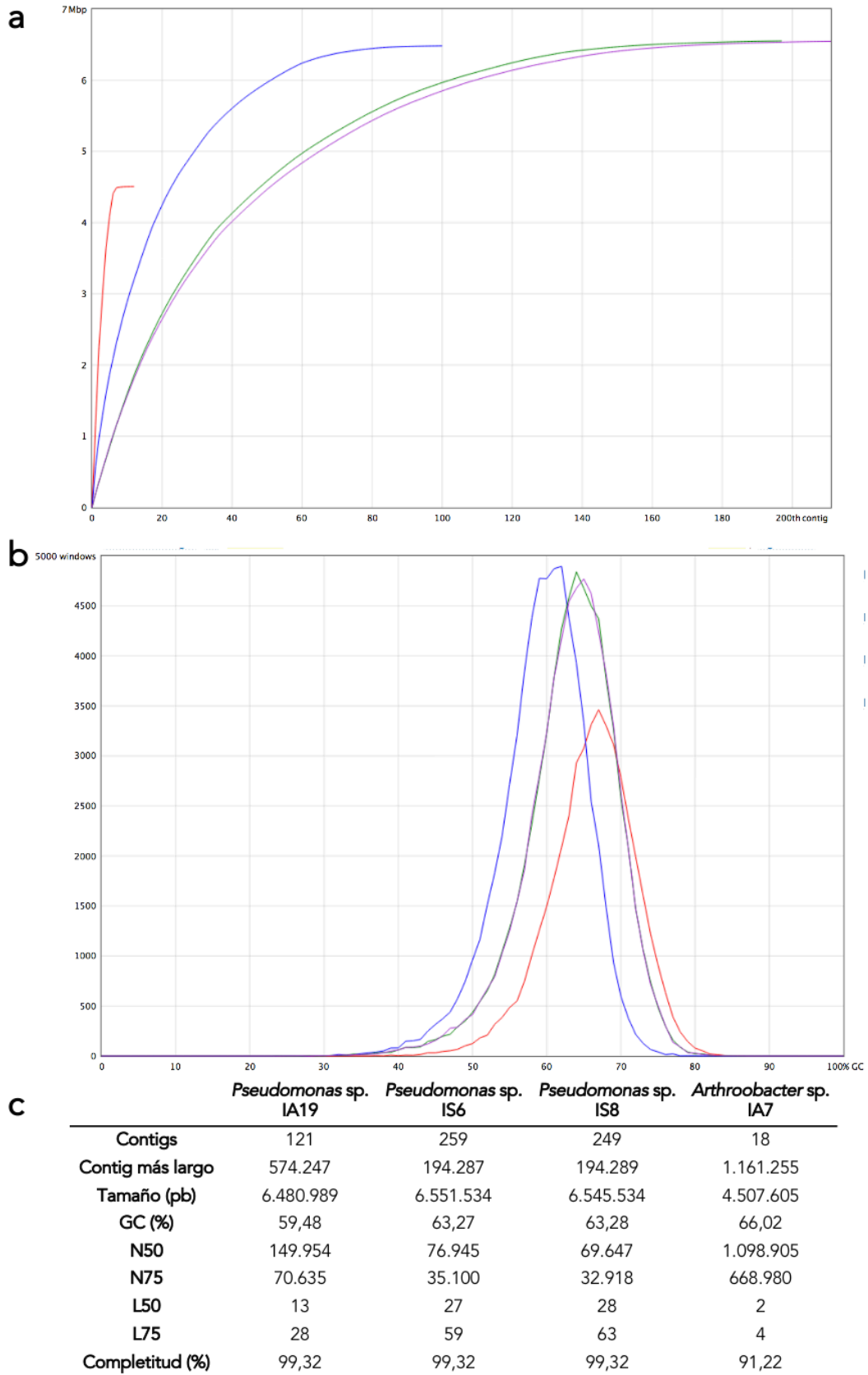
Tal y como se muestra en la Tabla 4, las cepas con mejores resultados en cuanto a su capacidad para inhibir microorganismos, marcadas en color azul, pertenecen al género *Pseudomonas*. La cepa tipo más próxima a la cepa IA19 es *Pseudomonas lutea* DSM 17257<sup>T</sup> (98,6), con la que presenta un porcentaje de similitud del 98,6% en la secuencia del gen ribosómico 16S. La cepa tipo más próxima a los aislados IS2, IS3, IS6, IS7, IS8, IS10, IS11, IS12 e IS14 en base a las secuencia del mismo gen es *Pseudomonas koreensis* Ps 9-14<sup>T</sup>, presentando un porcentaje de similitud del 98,97%.

En ambos grupos de cepas, estos niveles de similitud del gen 16S ARNr con respecto a las cepas tipo de las especies más próximas indican que podrían formar parte de dos nuevas especies, respectivamente, del género *Pseudomonas*.

Con el doble objetivo de profundizar en el potencial de estas cepas para producir sustancias bioactivas responsables de su capacidad para inhibir microorganismos, por un lado, y de profundizar en su correcta asignación taxonómica, por otro, se secuenciaron los genomas de las cepas IA19, IS6 e IS8.

Del mismo modo, la similitud del gen ribosómico 16S de la cepa IA7, con respecto a la cepa tipo de la especie más próxima, *Arthrobacter globiformis* NBRC 12137<sup>T</sup> (99,52%) es similar al existente entre otras especies existentes en el género, lo que indica que dicha cepa podría también constituir una nueva especie dentro del género *Arthrobacter*, por lo que el genoma de esta cepa también fue seleccionado para ser secuenciado.

Las características generales de los genomas obtenidos en este capítulo se resumen en la Figura 21.



**Figura 21:** **a** Curva que representa el tamaño del genoma según el número de contigs. **b** Regiones de los genomas con distintos porcentajes de G+C mol%. **c** Tabla resumen con las características generales de los genomas. Azul: *Pseudomonas* sp. IA19; verde: *Pseudomonas* sp. IS6; morado: *Pseudomonas* sp. IS8; rojo: *Arthrobacter* sp. IA7.

## Minería genómica

Las cepas cuyos genomas se han secuenciado como parte de este capítulo de la presente tesis doctoral tienen un gran potencial para producir nuevas moléculas bioactivas por tres razones: (I) representan a especies no descritas, por lo que es muy probable que su metabolismo no haya sido investigado todavía, (II) han sido aisladas de un nicho con gran cantidad de interacciones microbianas y poco investigado en el área de los productos naturales y (III), son capaces de inhibir el crecimiento de otros microorganismos. Puesto que los genomas bacterianos permiten investigar el metabolismo secundario codificado por la gran diversidad de genes bacterianos (Ver Capítulo I), en el presente capítulo se ha profundizado en el estudio de este tipo de rutas metabólicas a través de la minería genómica. En los genomas analizados hemos encontrado los siguientes tipos de BGCs:

- *Pseudomonas* sp. IS6: 8 NRPSs, 1 CDPS (ciclodipéptido sintasa), 1 aril polieno, 1 NAGGN, 1 híbrido NRPS-homoseril lactona y 1 homoseril lactona.

- *Pseudomonas* sp. IS8: 8 NRPSs, 1 CDPS, 1 aril polieno, 1 NAGGN, 1 híbrido NRPS-homoseril lactona y 1 homoseril lactona.

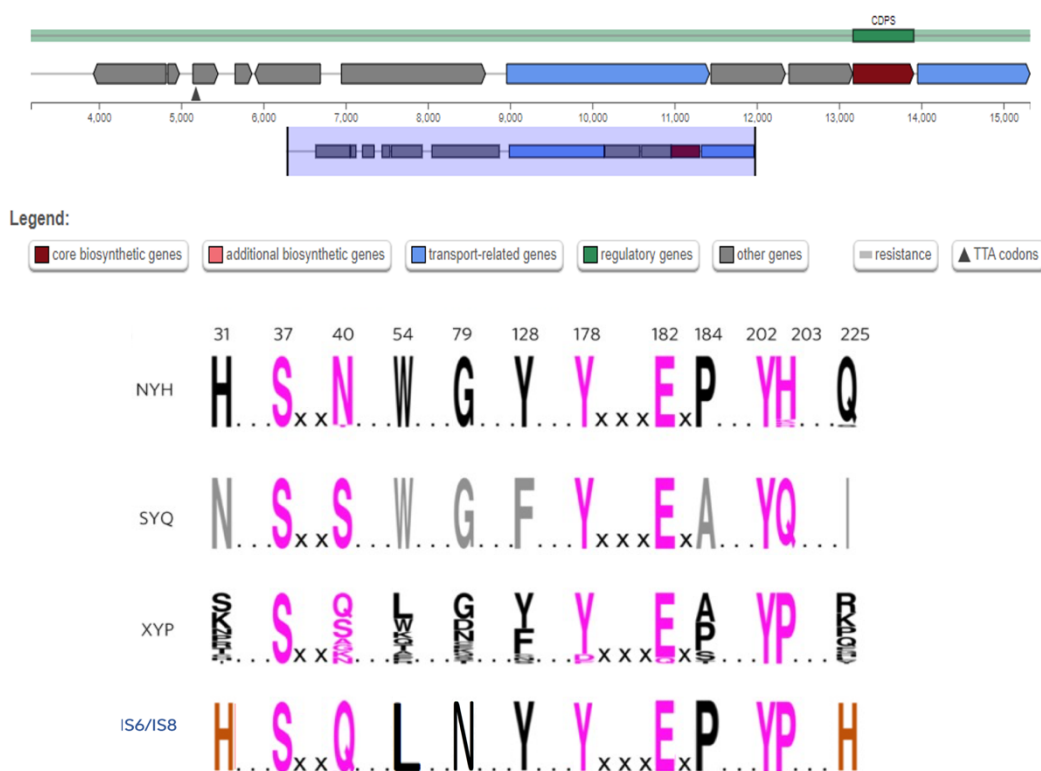
- *Pseudomonas* sp. IA19: 1 NAGGN, 1 bacteriocina, 1 tiopéptido, 1 sideróforo, 1 terpeno y 1 NRPS-like (BGC similar a NRPS).

- *Arthrobacter* sp. IA7: 2 NRPS-like (BGC similar a NRPS), 1 sideróforo, 1  $\beta$ -lactona, 1 T3PKS.

En los resultados se observa que los BGCs de las cepas IS6 e IS8 son los mismos. De todos los resultados encontrados, ningún BGC comparte una similitud sustancial con ningún BGC descrito para la producción de metabolitos secundarios.

Los CDPSs de las cepas IS6 e IS8 comparten los aminoácidos S37, Q40, Y202 y P203 (numeración según la proteína AlbC, Protein Data Bank (PDB): 3OQV) con las enzimas CDPSs de la subfamilia XYP (Figura 22). Atendiendo a su alineación con la proteína AlbC, los aminoácidos del primer sitio activo (posiciones 33-35-65-67-119-185-186-200 en AlbC) serían LLIVEIYY y los del segundo sitio activo (posiciones 152-155-156-159-204-206-207 en AlbC), TLFHRHA.



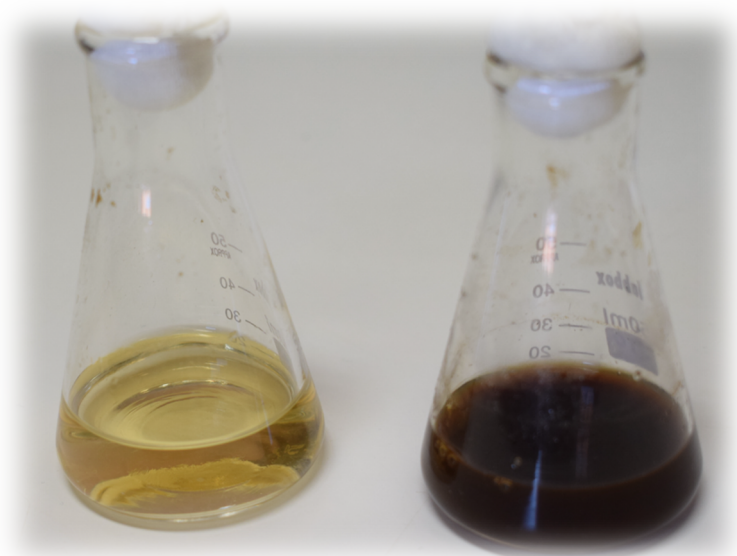


**Figura 22.** Parte superior: BGC del tipo CDPS detectado por antiSMASH en el genoma de la cepa *Pseudomonas* sp. IS6. Abajo: Posiciones de distintos aminoácidos (numeración *AlbC*, *PDB*: 3OQV) de las subfamilias de CDPS NYH, SYQ y XYP (imagen tomada de Jacques et al., 2015) y de la CDPS de las cepas *Pseudomonas* sp. IS6 y *Pseudomonas* sp. IS8.

### Aislamiento e identificación de metabolitos secundarios

Como se muestra en el capítulo anterior, entre los 194 genomas de cepas tipo del género *Pseudomonas* estudiados sólo se encontraron 3 CDPSs. Esto implica que la presencia de CDPSs en las cepas IS6 e IS8 es una característica casi única en el género. Debido a esto y a su gran capacidad para inhibir de forma potente el crecimiento de los microorganismos ensayados, se propuso aislar e identificar el o los metabolitos secundarios responsables de la inhibición de hongos entomopatógenos producido por estas bacterias. Puesto que el análisis de la secuencia de los genomas indicó que los BGCs codificados por la IS6 e IS8 son iguales, se continuó el trabajo únicamente con una de las dos cepas, la cepa *Pseudomonas* sp. IS6.

A partir de esta cepa *Pseudomonas* sp. IS6, se realizaron extracciones con distintos solventes orgánicos, partiendo de cultivos tanto en medio líquido (PDB) como en medio sólido (PDA) (Figura 23).



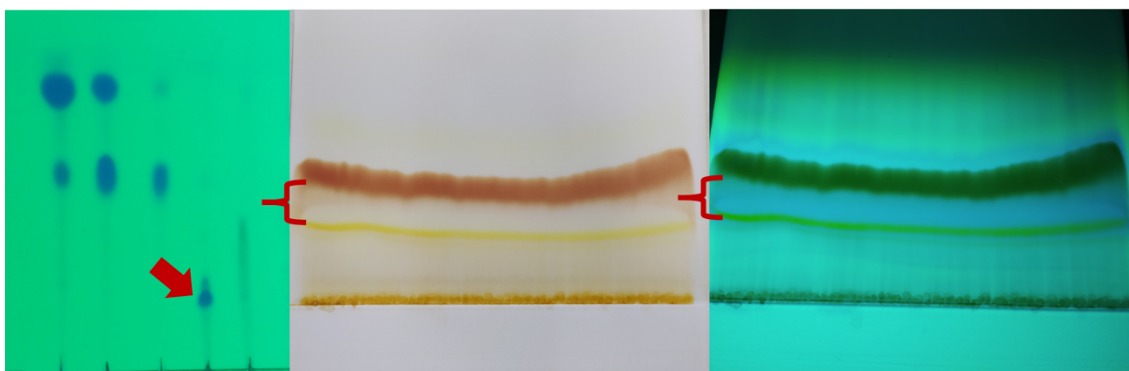
**Figura 23.** Izquierda: medio de cultivo PDB. Derecha: Medio de cultivo PDB tras el crecimiento y producción de metabolitos secundarios de la cepa IS6.

Tanto en las fracciones extraídas con AcOEt o con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (Figura 24) pudo observarse actividad antimicrobiana.



**Figura 24:** Fotografías de distintos extractos sobre el sobrenadante de cultivo de la cepa IS6.

Las cromatografías en capa fina de los extractos activos localizan a las moléculas activas en un rango de polaridad media, con absorbancia en el espectro UV (Figura 25). Estos datos se han utilizado para localizar a las fracciones bioactivas de una forma más sencilla y directa en cromatografía preparativa TLC y en cromatografía en columna, las cuales aparecen próximas a fracciones responsables de la tonalidad marrón del medio de cultivo (Figura 25).



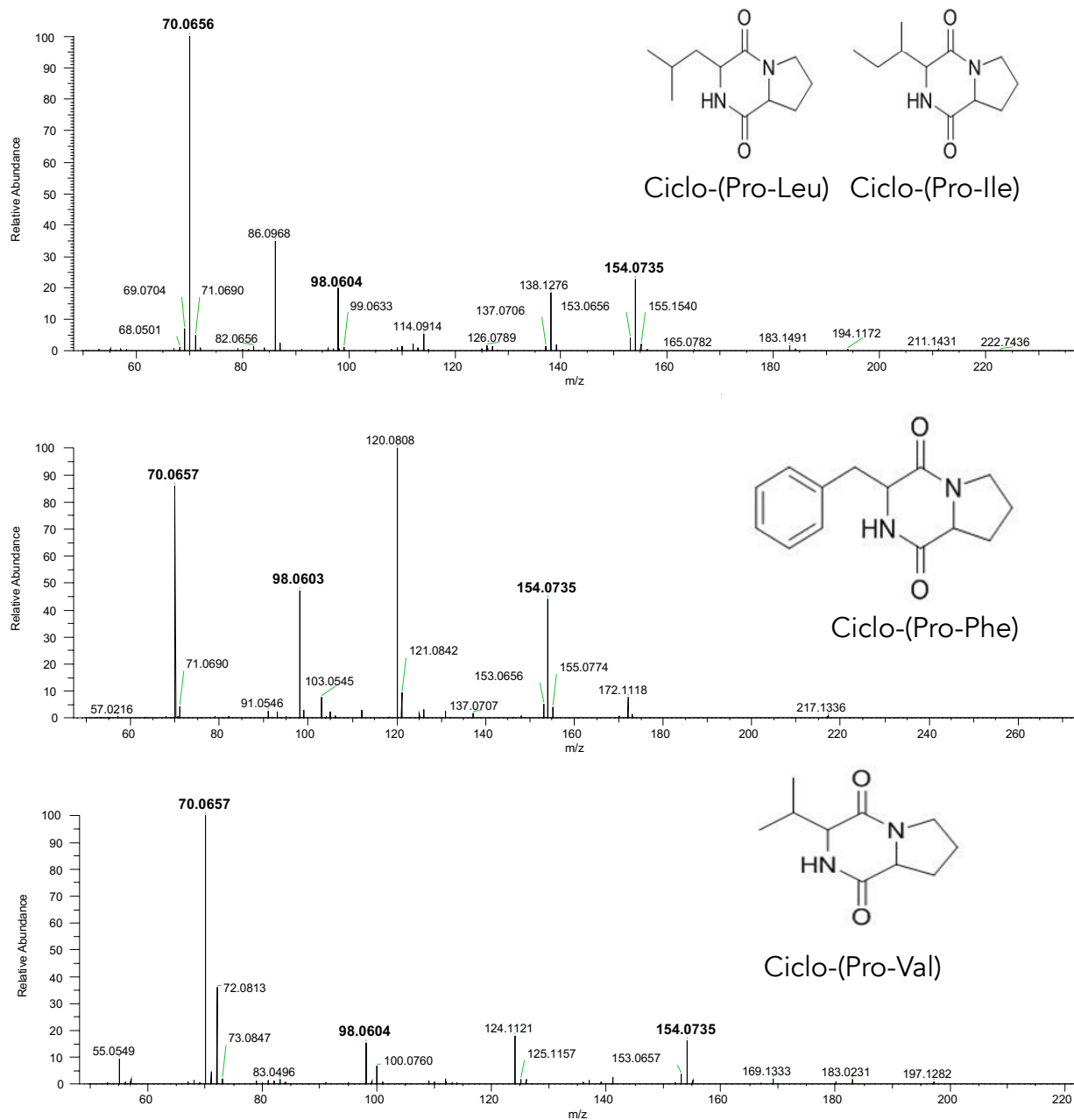
**Figura 25:** Izquierda: placa de cromatografía en capa fina visualizada en luz UV. La muestra señalada es la correspondiente a un extracto con actividad antimicrobiana. Centro: Placa preparativa TLC una vez utilizada con un extracto de la cepa IS6. La parte señalada es la fracción con actividad antimicrobiana. En la derecha, la misma placa bajo luz UV.

Las pruebas de  $^1\text{H-RMN}$  no permitieron averiguar la identidad de la/las moléculas responsable/s de las inhibiciones microbianas. Estos espectros indican que en las fracciones más purificadas coexisten distintas moléculas juntas. Sin embargo, los espectros de UHPLC-MS/MS fueron de mayor utilidad. Encontramos picos que estaban presentes en las fracciones que presentan mayor actividad antimicrobiana y ausentes o casi ausentes en el resto de las fracciones, incluyendo los controles negativos. Las masas moleculares de estos picos coinciden con masas moleculares con combinaciones de diversos átomos, entre los que la opción más probable incluye 2 átomos de nitrógeno, algo común en las diketopiperazinas de los CDPs (Tabla 5).

**Tabla 5:** Datos obtenidos para cada pico de interés en el UHPLC-MS/MS, junto con la(s) molécula(s) posteriormente identificada(s) para cada pico.

Tiempo UHPLC (min)	Masa (u)	Fórmula	Molécula
10,67	197,1280	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}_2\text{N}_2$	ciclo-(Pro-Val)
11,12	211,1436	$\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{O}_2\text{N}_2$	ciclo-(Pro-Ile) o ciclo-(Pro-Leu)
11,25	245,1281	$\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{O}_2\text{N}_2$	ciclo-(Pro-Phe)

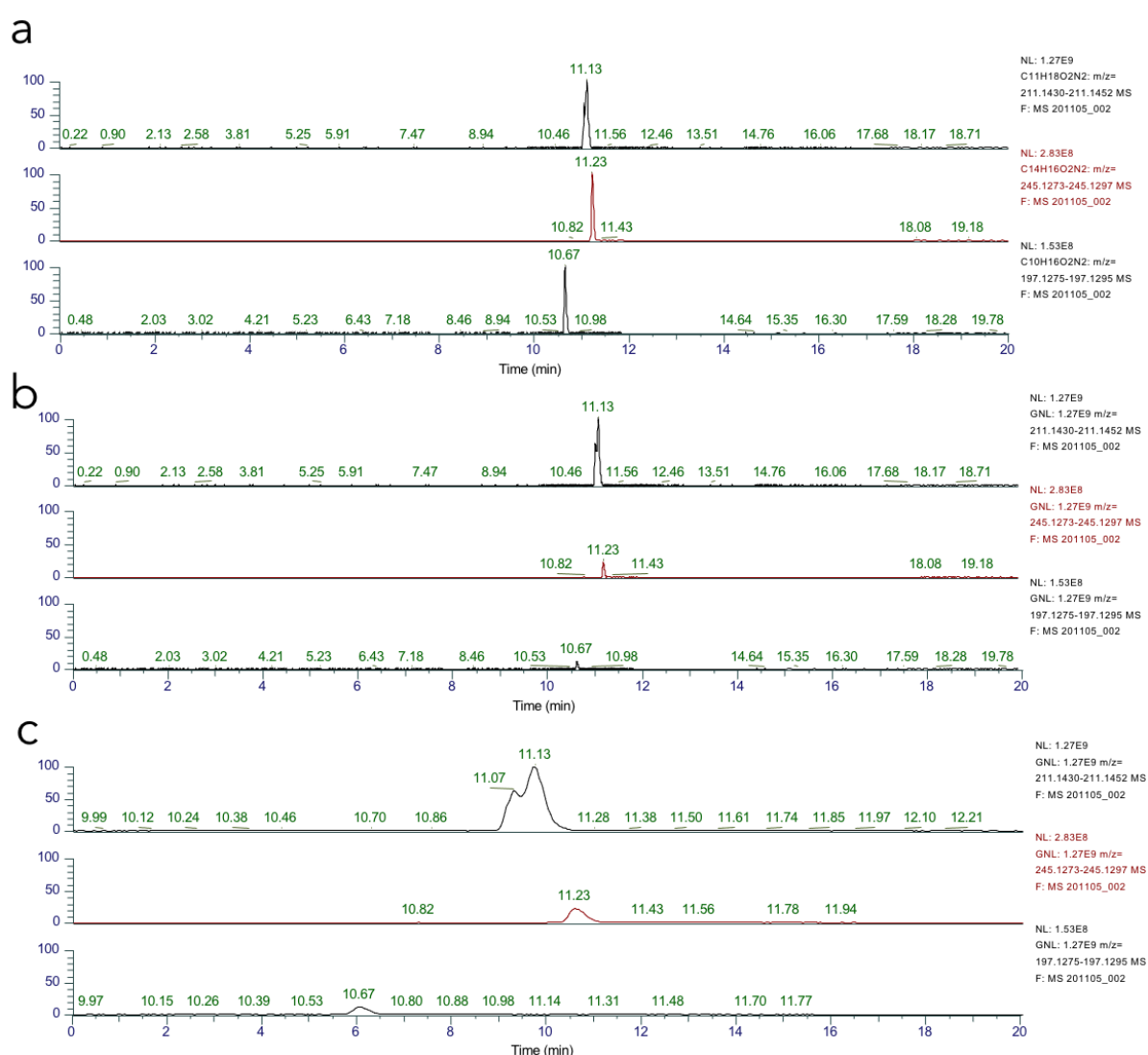
Los espectros de masas en tandem son concluyentes para la identificación de estas moléculas (Figura 26).



**Figura 26.** Espectros de masas en tándem para cada una de las masas de interés encontradas en el UHPLC. Cada masa mostrada representa una fracción de la masa original. A la derecha se muestra el CDP identificado para cada caso

Se observa que los 3 picos mayoritarios presentan fracciones con masas de 70,065u, 98,060u y 154,073u, las cuales, si son sustraídas de las masas totales de cada pico, corresponden a las masas de posibles fragmentos mayoritarios derivados de la fragmentación de un ciclodipéptido con presencia del aminoácido prolina. Teniendo en cuenta la presencia de prolina, la masa total de las moléculas y el resto de las masas de sus fragmentos identificamos a las moléculas señaladas como ciclo-(Pro-Phe) (245,1284u;  $C_{14}H_{16}O_2N_2$ ), ciclo-(Pro-Val) (197,1285u;  $C_{10}H_{16}O_2N_2$ ) y ciclo-(Pro-Leu o Ile) (211,1440u;  $C_{11}H_{18}O_2N_2$ ) (Figura 26).

En este último caso, las masas moleculares de los fragmentos no permiten discernir entre ciclo-(Pro-Leu) o ciclo-(Pro-Ile). Sin embargo, en el espectro de masas aparecen dos isómeros juntos (11,07 min y 11,13 min), los cuales indican que no está presente exclusivamente una de las dos opciones de ciclodipéptidos, sino las dos, las cuales corresponderían, respectivamente, al ciclo-(Pro-Ile) y a ciclo-(Pro-Leu), siendo este último un poco más abundante que el anterior. Estos dos isómeros aparecen en una proporción mucho más alta (intensidad NL:  $1,27E^9$ ) que el ciclo-(Pro-Phe) (NL:  $2,83E^8$ ) y que el ciclo-(Pro-Val) (NL:  $1,53E^8$ ) (Figura 27). Debido a que una única enzima CDPS puede producir muchas variedades de CDPs, buscamos las masas moleculares de otras combinaciones de péptidos cíclicos de prolina con otros aminoácidos en los espectros del UHPLC-MS/MS. En esta búsqueda también encontramos las moléculas ciclo-(Pro-Tyr), ciclo-(Pro-Pro) y ciclo-(Pro-Gly), aunque en unas concentraciones mucho menores.



**Figura 27:** **a** Espectros del UHPLC mostrando únicamente los picos correspondientes a los CDPs identificados. **b** misma imagen, pero representando la proporción de cada masa según la altura del pico. **c** misma imagen, con la proporción de cada masa representada según el área bajo la curva. En cada imagen, el espectro superior corresponde a los CDPs ciclo-(Pro-Ile) y ciclo-(Pro-Leu), el intermedio a ciclo-(Pro-Phe) y el inferior a ciclo-(Pro-Val).

### Descripción de nuevas especies bacterianas aisladas de escarabajos de la corteza

Teniendo en cuenta que los porcentajes de similitud de las secuencias del 16S ARNr de algunas de las cepas de este estudio y las cepas tipos de sus especies más próximas (Tabla 4) eran inferiores a los existentes entre algunas especies clasificadas como distintas dentro de sus géneros, en este trabajo se profundizó en la clasificación taxonómica de dichas cepas. Así, se profundizó en la clasificación taxonómica de los siguientes grupos de cepas:

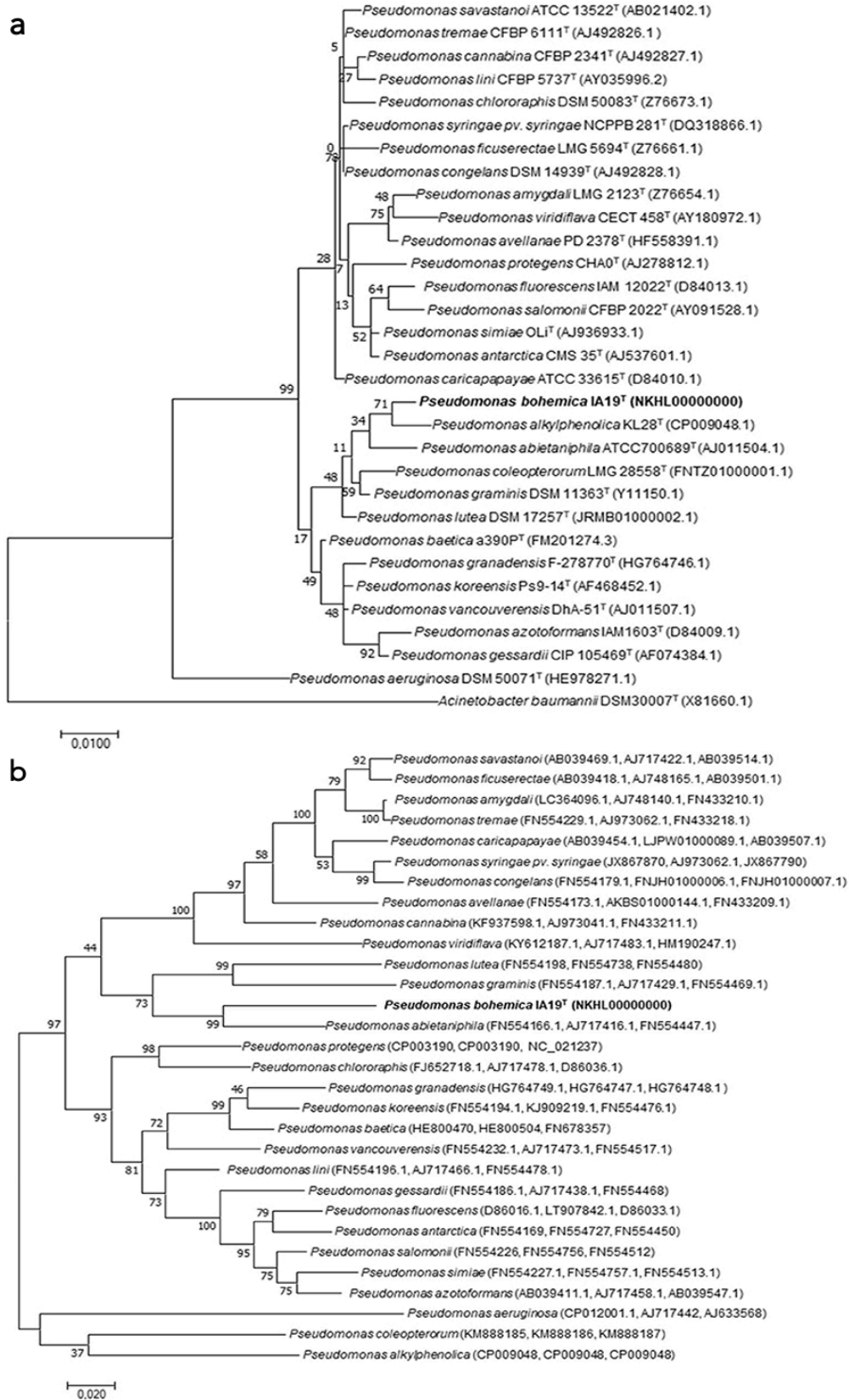
Grupo I: constituido por las cepas IA4, IA13, IA2, IA 14, IA15, IA16, IA17, IA18 e IA19, todas ellas con idéntica secuencia del gen 16S ARNr y una similitud del 98,6% con *Pseudomonas lutea* DSM 17257<sup>T</sup>, su cepa tipo más próxima.

Grupo II: formado por las cepas IS6, IS8, IS2, IS3, IS7, IS10, IS11, IS12 e IS14, todas ellas con similitud del 100% en su secuencia del gen 16S ARNr y una similitud del 98,97% con respecto a su cepa tipo más próxima, *Pseudomonas koreensis* Ps 9-14<sup>T</sup>.

Grupo III: correspondiente con la cepa IA7, cuya cepa tipo más próxima en base a la secuencia de su gen ribosómico 16S es *Arthrobacter globiformis* NBRC 12137<sup>T</sup> (99,52% de similitud).

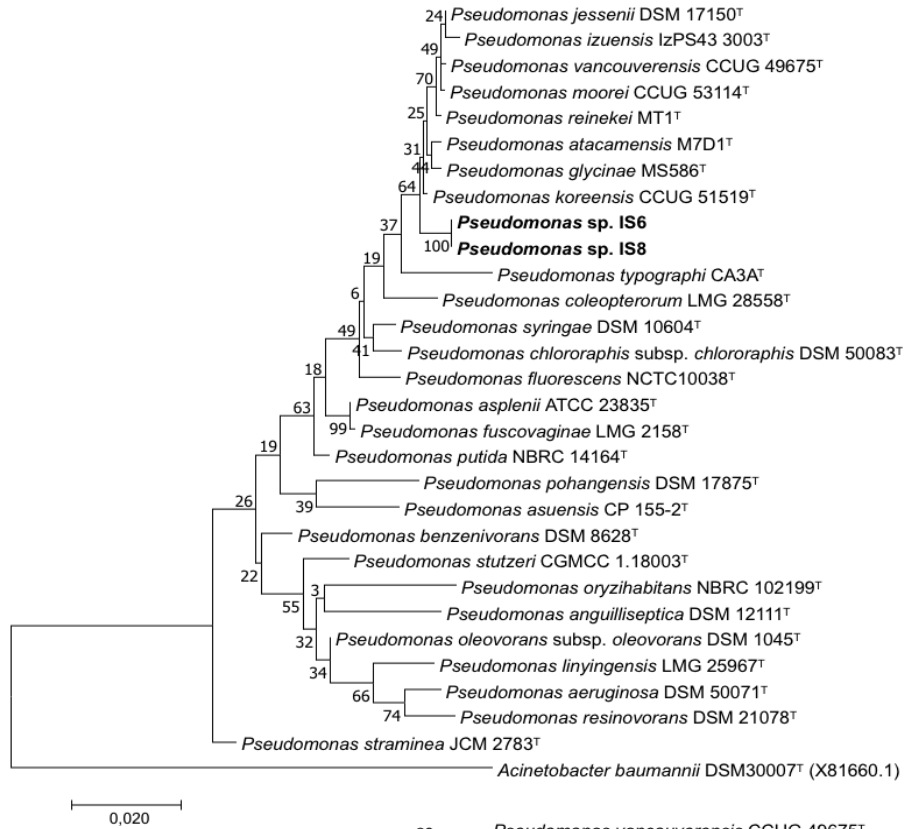
Para determinar la relación filogenética de las cepas de estos grupos con respecto a las cepas tipo de sus especies más próximas, se realizaron árboles filogenéticos con las secuencias nucleotídicas de los genes 16S ARNr y de los genes *housekeeping* (*gyrB*, *rpoB*, *rpoD*, en el caso de *Pseudomonas*, y *tuf*, *secY*, *rpoB*, *recA*, *fusA* y *atpD*, en el caso de *Arthrobacter*) concatenados. Para realizar estos análisis filogenéticos, se tomaron como representantes de los grupos I y II, ambos con diversas cepas entre las que la similitud de la secuencia del 16S era del 100%, aquellas para las que se disponía de la secuencia genómica por su alto potencial en la inhibición de microorganismos - cepa IA19 en el caso del grupo I y cepas IS6 e IS8 en el caso del grupo II-.

Los árboles obtenidos se muestran en las (Figuras 28, 29 y 30). En estos árboles se observó que las ramas pertenecientes a las cepas del trabajo se diferencian claramente de las cepas tipo de las especies descritas más próximas, lo que apoya la hipótesis de que estos aislados constituyen nuevas especies. Además, se comprobó que las cepas IS6 e IS8 pertenecen a la misma especie, por lo que se seleccionó a la cepa IS6 como la cepa tipo de la nueva especie.

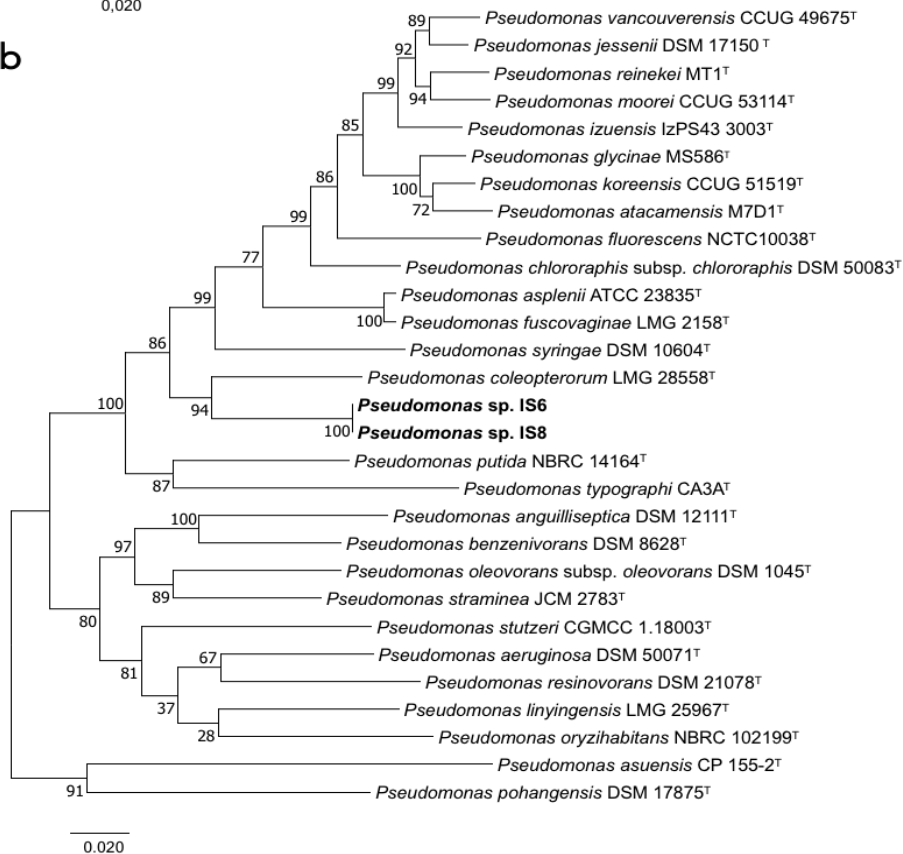


**Figura 28:** Árboles filogenéticos (maximum likelihood) basados en las secuencias del gen 16S (**a**) y MLSA (**b**) de las cepas tipo más próximas a *Pseudomonas* sp. IA19. Los valores de bootstrap aparecen en cada rama y representan el porcentaje de cada 1.000 réplicas. Escala = 1 sustitución de nucleótido por cada 100. Imágenes tomadas de Saati-Santamaría et al. (2018).

a

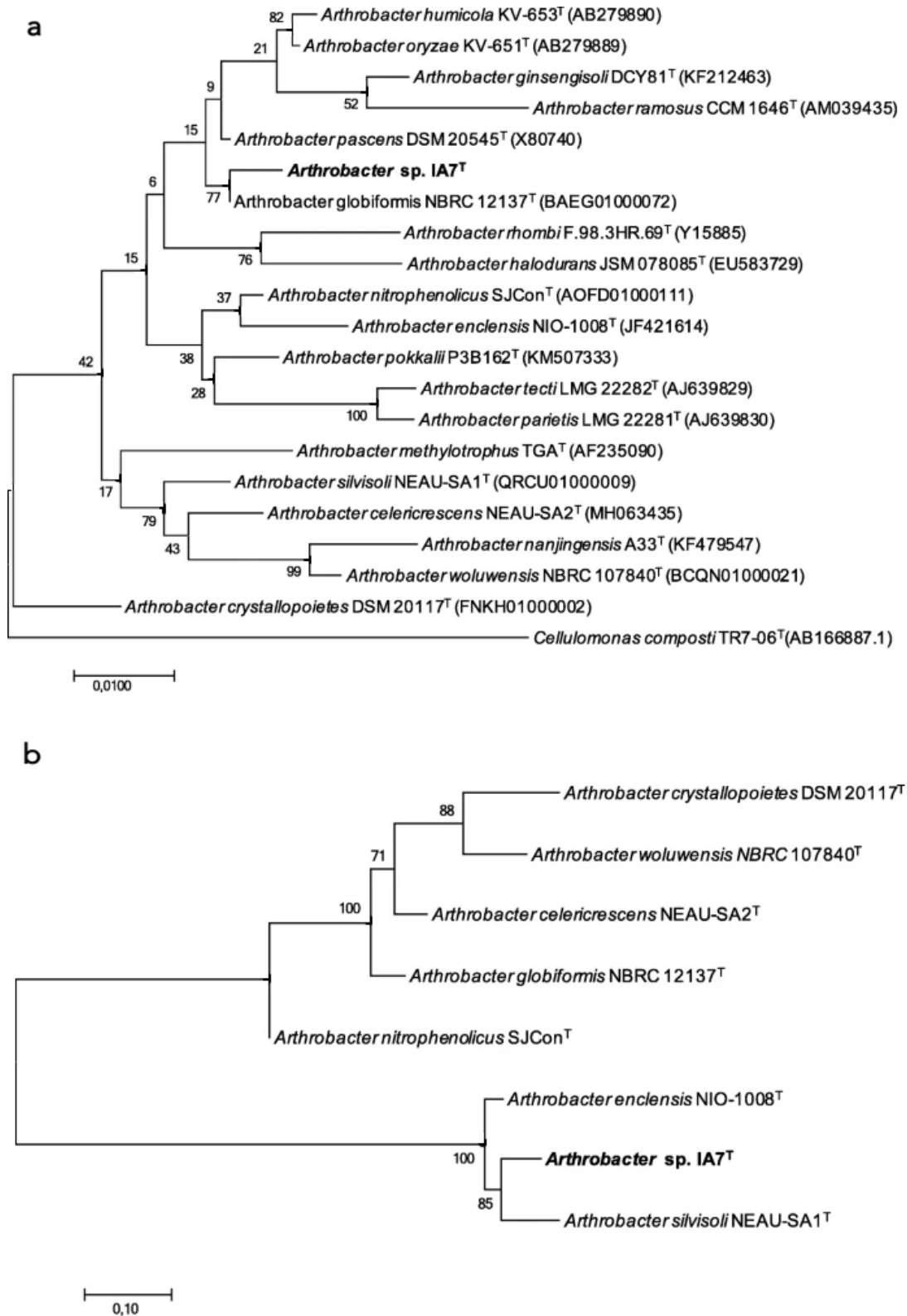


b



**Figura 29:** Árboles filogenéticos (maximum likelihood) basados en las secuencias del gen 16S (a) y MLSA (b) de las cepa tipo más próximas a *Pseudomonas* sp. IS6 y *Pseudomonas* sp. IS8. Los valores de bootstrap aparecen en cada rama y representan el porcentaje de cada 1.000 réplicas. Escala = 1 sustitución de nucleótido por cada 100.





**Figura 30:** Árboles filogenéticos (maximum likelihood) basados en las secuencias del gen 16S (a) y MLSA (b) de las cepa tipo más próximas a *Arthrobacter* sp. IA7. Los valores de bootstrap aparecen en cada rama y representan el porcentaje de cada 1.000 réplicas. Escala = 1 sustitución de nucleótido por cada 100.

Imagen tomada de González-Dominici et al., 2020.

En cuanto al árbol filogenético basado en la secuencia del gen 16S ARNr de la cepa IA19<sup>T</sup> y de las cepas tipo de las especies relacionadas dentro del género *Pseudomonas*, mostró como la cepa

IA19<sup>T</sup> se agrupaba con *P. alkylphenolica* KL28<sup>T</sup> en un grupo más amplio que también contenía *P. lutea* OK2<sup>T</sup> y *P. graminis* DSM 11363<sup>T</sup> (Figura 28a). Sin embargo, las distancias filogenéticas entre la cepa IA19<sup>T</sup> y sus especies relacionadas más cercanas eran más amplias que las distancias existentes entre otras de las especies definidas como diferentes pertenecientes a este género, lo que sugiere la clasificación de nuestra cepa en una especie diferente. Estos resultados se confirman en el análisis filogenético MLSA basado en la secuencia concatenada de los tres genes housekeeping *gyrB*, *rpoB* y *rpoD*, donde se mostró que la cepa IA19<sup>T</sup> se agrupaba con *P. abitaniphila* DSM 17554<sup>T</sup>, pero la distancia filogenética entre ambas cepas indicaba claramente que pertenecían a diferentes especies (Figura 28b).

Respecto a la cepa IS6<sup>T</sup>, el análisis filogenético de su secuencia del gen 16S ARNr junto con las del las cepas tipo de las especies próximas dentro del género *Pseudomonas* muestra cómo se agrupa en una rama relativamente amplia del género en el que aparece la especie más cercana, *P. koreensis* CCUG 51519<sup>T</sup> y las especies *P. glycinae* MS586<sup>T</sup> y *P. jessenii* DSM 17150<sup>T</sup>, entre otras (Figura 29a). En cuanto al análisis filogenético MLSA basado en la secuencia concatenada de los tres genes housekeeping *gyrB*, *rpoB* y *rpoD*, la cepa IS6<sup>T</sup> aparecía agrupada junto a *P. coleopterorum* LMG 28558<sup>T</sup> (Figura 29b).

Finalmente, en cuanto a las relaciones filogenéticas de la cepa IA7<sup>T</sup> y las cepas tipo de las especies relacionadas dentro del género *Arthrobacter*, el árbol basado en las secuencias del gen ribosómico 16S mostraba como la cepa IA7<sup>T</sup> se agrupa con *A. globiformis* NBRC 12137<sup>T</sup>, cepa tipo del género, en un grupo más amplio que incluye a *A. pascens* DSM 20545<sup>T</sup>, *A. humicola* KV-653<sup>T</sup> y *A. oryzae* KV-651<sup>T</sup>, entre otros (Figura 30a). El árbol construido en base a las secuencias concatenadas de seis genes housekeeping (*tuf*, *secY*, *rpoB*, *recA*, *fusA* y *atpD*) (Figura 30b), mostró un agrupamiento de la cepa IA7<sup>T</sup> con *A. enclensis* NIO-1008<sup>T</sup> y *A. silvisoli* NEAU-SA1<sup>T</sup>.

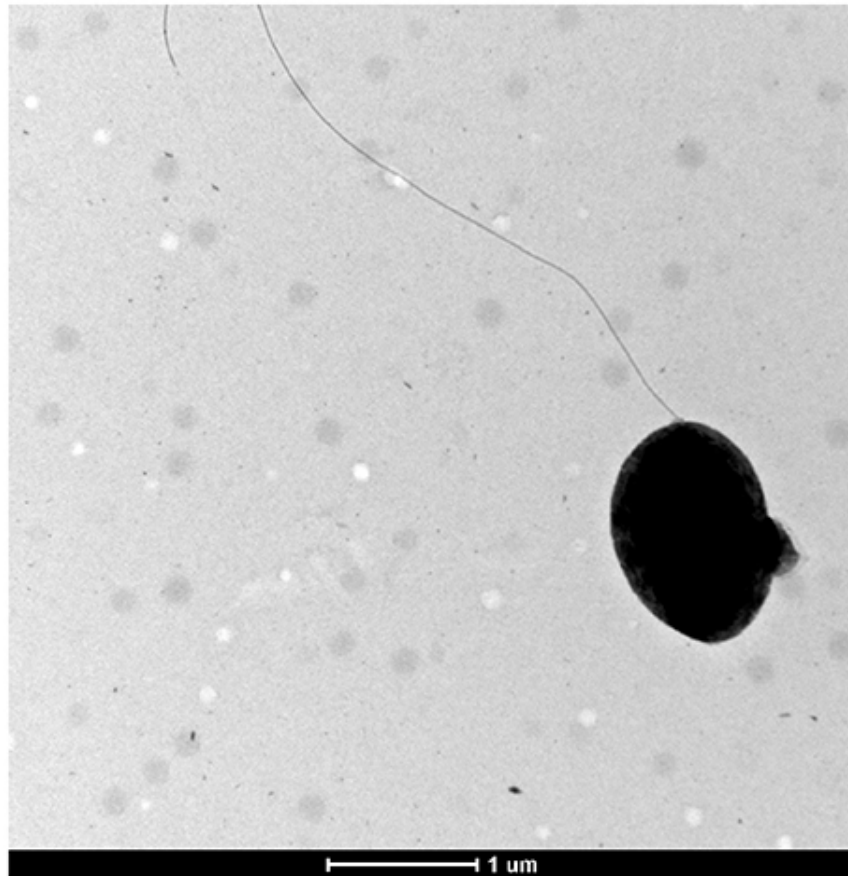
Para confirmar que estas cepas pertenecen a nuevas especies de *Pseudomonas*, se estimaron sus índices de similitud genómica -ANIb y dDDH- con respecto a los de los genomas de las cepas tipo de las especies más próximas (Tabla 6).

**Tabla 6:** Valores de relación de similitud entre los genomas de las cepas IS6 e IA19 con los genomas de las cepas tipo más cercanas filogenéticamente.

<i>Pseudomonas</i> sp. IS6 <sup>T</sup>		
	ANIb (%)	dDDH (%)
<i>Pseudomonas</i> sp. IS8	99,97	100
<i>Pseudomonas coleopterorum</i> LMG 28558 <sup>T</sup>	79,85	23,70
<i>Pseudomonas koreensis</i> CCUG 51519 <sup>T</sup>	79,26	22,90
<i>Pseudomonas glyciniae</i> MS586 <sup>T</sup>	79,26	22,70
<i>Pseudomonas jessenii</i> DSM 17150 <sup>T</sup>	79,25	23,30
<i>Pseudomonas vancouverensis</i> CCUG 49675 <sup>T</sup>	79,16	23,00
<i>Pseudomonas moorei</i> CCUG 53114 <sup>T</sup>	79,00	23,00
<i>Pseudomonas izuensis</i> IzPS43 3003 <sup>T</sup>	78,94	23,30
<i>Pseudomonas atacamensis</i> M7D1 <sup>T</sup>	78,89	22,90
<i>Pseudomonas reinekei</i> MT1 <sup>T</sup>	78,85	22,60
<i>Pseudomonas typographi</i> CA3A <sup>T</sup>	77,19	20,09
<i>Pseudomonas</i> sp. IA19 <sup>T</sup>		
<i>Pseudomonas abietaniphila</i> ATCC 700689 <sup>T</sup>	84,20	28,60
<i>Pseudomonas graminis</i> DSM 11363 <sup>T</sup>	82,90	26,70
<i>Pseudomonas alkylphenolica</i> KL28 <sup>T</sup>	78,50	22,50
<i>Pseudomonas lutea</i> LMG 21974 <sup>T</sup>	73,00	19,10
<i>Arthrobacter</i> sp. IA7 <sup>T</sup>		
<i>Arthrobacter globiformis</i> NBRC 12137 <sup>T</sup>	88,90	37,10
<i>Arthrobacter silvisoli</i> NEAU-SA1 <sup>T</sup>	78,41	2,10
<i>Arthrobacter enclensis</i> NIO-1008 <sup>T</sup>	79,20	22,60

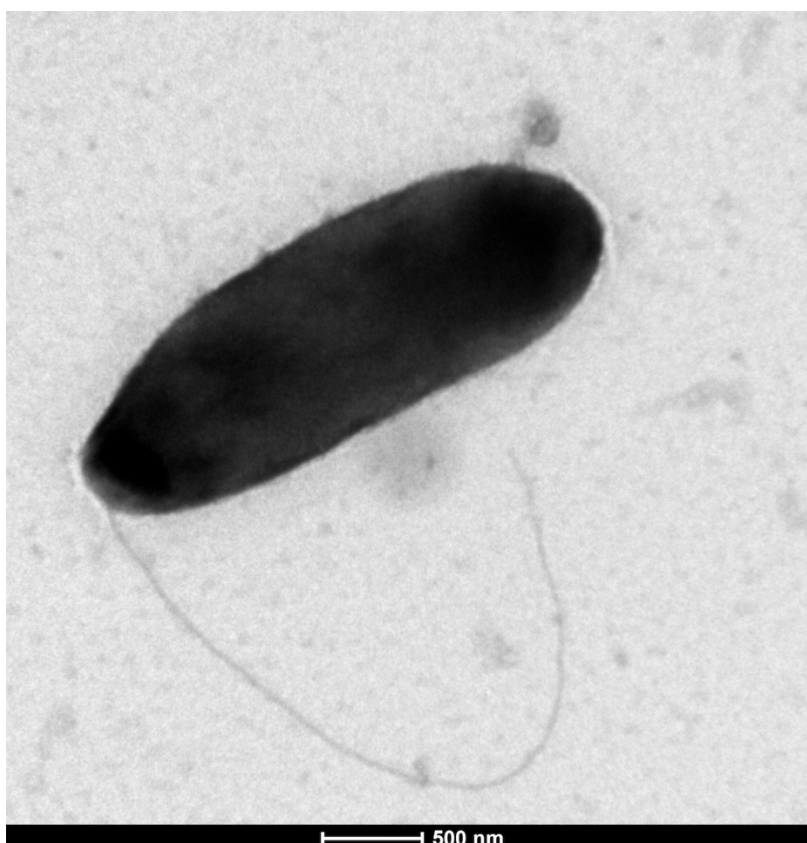
### Fisiología y morfología celular y de colonia de las cepas tipo de las nuevas especies

En TSA, la cepa IA19 forma colonias convexas, redondeadas y de un color beige claro brillante, con los bordes completos, las cuales son visibles después de 24 h de incubación a 28°C; estas colonias alcanzan un tamaño de 1-3 mm después de 72 horas de crecimiento. Esta cepa puede crecer en un rango de 4-37°C, siendo su temperatura óptima 28°C, y en un rango de pH de 6,5-8, siendo pH 7 el óptimo para su crecimiento. Crece en concentraciones de 0-5% de NaCl en TSB. Las células son bacilos Gram-negativos y portan un flagelo polar (Figura 31)



**Figura 31.** Forma y flagelo de una célula de la cepa IA19. Imagen tomada con microscopía electrónica.

Las cepas IS6 forma colonias convexas, redondeadas y de un color marrón caramelo, con los bordes lisos, las cuales son visibles después de 24 h de incubación a 28°C en PDA; estas colonias alcanzan un tamaño de 1 mm después de 72 horas de crecimiento. Esta cepa puede crecer en un rango de 4-28°C, siendo su temperatura óptima 28°C, y en un rango de pH de 6,5-8, siendo pH 7 el óptimo para su crecimiento. Es capaz de crecer de forma óptima en TSB con concentraciones de NaCl hasta el 2,5% y débilmente en 5% NaCl. Las células son bacilos Gram-negativos y portan un flagelo polar (Figura 32)



**Figura 32.** Forma y flagelo de una célula de la cepa IS6. Imagen tomada con microscopía electrónica.

La cepa IA7 forma colonias color crema y circulares con márgenes enteros cuando se cultivan durante 3 días a 28 °C en medio TSA. Puede crecer a 12-37 °C con un óptimo a 28 °C, a un pH de 6,5 a 8,5 con un óptimo a 6,5 - 7,5 y en presencia de NaCl a concentraciones de hasta el 4% (p/v), con un óptimo de 0-1% (p/v) de NaCl. Las células son bacilos gramnegativos cortos con 0,4  $\mu\text{m}$  de longitud y 0,1  $\mu\text{m}$  de ancho.

### Caracterización fenotípica y quimiotaxonómica

La descripción de nuevas especies del género *Pseudomonas* requiere el análisis de quinonas respiratorias y composición de ácidos grasos de la cepa seleccionada como cepa tipo de la especie a describir. Así, para las cepas IA19 e IS6 se realizaron dichos análisis quimiotaxonómicos.

El análisis de las quinonas respiratorias reveló que las cepas IA19 e IS6 tienen como mayoritaria a la ubiquinona-9 (Q9) (97%) y pequeñas cantidades de ubiquinona-8 (Q8) (3 y 1,8%, respectivamente).

Los ácidos grasos mayoritarios de la cepa IA19 son  $\text{C}_{16:0}$  (30,5%) y “summed feature 3” (21,1%). En el caso de la cepa IS6, los principales ácidos grasos son  $\text{C}_{16:0}$  (29,1%) y  $\text{C}_{18:1} \omega 7\text{c}$  (16,2%). La composición de los ácidos grasos de cada una de estas cepas aparece detallada en las Tablas 7, y 8.

**Tabla 7:** Composición de los ácidos grasos (%) de *Pseudomonas* sp. IA19<sup>T</sup> y las cepas tipo de sus especies más cercanas. Cepas: 1, *Pseudomonas* sp. IA19<sup>T</sup>; 2, *P. abietaniphila* DSM 17554<sup>T</sup>; 3, *P. graminis* DSM 11363<sup>T</sup>; 4, *P. lutea* OK2<sup>T</sup>; 5, *P. alkylphenolica* KL28<sup>T</sup>(Mulet et al., 2015) ; 6, *P. aeruginosa* ATCC 10145<sup>T</sup> (Menéndez et al., 2015). Los valores representan el porcentaje de ácidos grasos totales. Los valores correspondientes a la cepa IA19<sup>T</sup> por debajo del 1% no están incluidos.

Ácido graso	1	2	3	4	5	6
C <sub>10:0</sub> 3OH	2.6	2.2	1.7	1.5	7.8	3.6
C <sub>12:0</sub>	5.7	5.2	4.6	4.9	3.2	4.8
C <sub>12:0</sub> 2OH	4.0	3.5	2.9	2.8	7.1	3.7
C <sub>12:0</sub> 3OH	5.7	4.0	4.1	3.5	7.8	4.5
Sum In Feature 3 <sup>¶</sup>	20.1	27.2	38.7	37.2	26.7	20.0
C <sub>16:0</sub>	30.5	24.7	27.7	25.6	27.8	20.5
C <sub>17:0</sub> cyclo	14.6	10.3	1.3	1.7	6.0	ND
C <sub>17:0</sub>	0.3	1.9	0.3	0.6	ND	TR
Sum In Feature 5 <sup>¥</sup>	1.5	0.4	ND	ND	ND	20.0
Sum In Feature 8 <sup>§</sup>	11.4	17.3	17.4	21.2	10.5	38.9
C <sub>19:0</sub> Cyclo ω8c	1.3	0.5	ND	ND	ND	ND

¶ Sum in Feature 3: 16:1 ω7c/16:1 ω6c

¥ Sum in Feature 5: 18:2 ω6,9c/18:0 ante

§ Sum in Feature 8: 18:1 ω7c/: 18:1 ω6c

Los valores son porcentajes del total de ácidos grasos. No se muestran valores menores del 1%.

ND: No Detectado. TR: Trazas

**Tabla 8:** Composición de los ácidos grasos (%) de *Pseudomonas* sp. IS6 y las cepas tipo de sus especies más cercanas. Cepas: 1, *Pseudomonas* sp. IS6<sup>T</sup>; 2, *P. coleopterorum* LMG 28558<sup>T</sup> (Menéndez et al., 2015); 3, *P. koreensis* CCUG 51519<sup>T</sup> (Cámara et al., 2007; Kwon et al., 2015); 4, *P. glyciniae* MS586<sup>T</sup> (Jia et al., 2020); 5, *P. jessenii* DSM 17150<sup>T</sup> (Verhille et al., 1999; Cámara et al., 2007); 6, *P. aeruginosa* ATCC 10145<sup>T</sup> (Clark et al., 2006; Palleroni, 2005; Xiao et al., 2009; Menéndez et al., 2015). Los valores representan el porcentaje de ácidos grasos totales. Los valores correspondientes a la cepa IS6<sup>T</sup> por debajo del 1% no están incluidos

Ácido graso	1	2	3	4	5	6
C <sub>16:0</sub>	29,1	25,9	34,1	22,6	30,0	20,5
C <sub>18:1</sub> ω7c	16,2	ND	13,3	ND	11,31	ND
C <sub>17:0</sub> cyclo	13,1	1,8	2,4	10,3	1,56	ND
Summed Feature 3 <sup>¶</sup>	10,8	ND	ND	ND	ND	ND
C <sub>19:0</sub> Cyclo ω8c	10,1	ND	ND	1,2	ND	ND
C <sub>12:0</sub> 2OH	6,8	3,2	6,0	5,5	5,6	3,7
C <sub>12:0</sub> 3OH	5,0	5,1	4	6,7	3,2	4,5
C <sub>10:0</sub> 3OH	3,6	2,4	1,9	6,6	3,1	3,6
C <sub>12:0</sub>	2,4	5,4	2,1	2,9	5,4	4,8

¶ Summed Feature 3: 16:1 ω7c/15 iso 2OH

Las principales diferencias fenotípicas de las cepas IA19, IS6 e IA7 con respecto a las cepas tipo de sus especies filogenéticamente más cercanas se muestran en la tablas 9, 10 y 11, respectivamente.

**Tabla 9.** Diferencias fenotípicas entre *Pseudomonas* sp. IA19<sup>T</sup> y sus especies más próximas, incluyendo la especie tipo del género *P. aeruginosa* ATCC 10145<sup>T</sup>. Cepas: 1, *Pseudomonas* sp. IA19<sup>T</sup>; 2, *P. abietaniphila* DSM 17554<sup>T</sup>; 3, *P. graminis* DSM 11363<sup>T</sup>; 4, *P. lutea* OK2<sup>T</sup>; 5, *P. alkylphenolica* KL28<sup>T</sup> (Frasson et al., 2017; Mulet et al., 2015); 6, *P. aeruginosa* ATCC 10145<sup>T</sup> (Clark et al., 2006; Palleroni, 2005; Xiao et al., 2009).

	1	2	3	4	5	6
Arginina dihidrolasa	-	+	+	-	+	+
Ureasa	-	+	+	-	-	V
Hidrólisis de esculina	+	-	+	+	+	-
Asimilación de:						
L-arabinosa	+	+	+	+	-	-
Glicerol	+	+	-	+	ND	+
L (+) fructosa	+	+	-	ND	+	+
Rhamnosa	-	+	-	-	ND	-
Sorbitol	-	+	+	-	ND	-
Sacarosa	-	+	+	-	-	-
D-maltosa	-	+	-	-	-	-
Caprato	-	+	+	+	+	ND
Malato	-	+	+	+	+	ND
Adonitol	-	+	W	+	-	-
Galactosa	-	+	W	+	-	-
Manosa	+	+	-	+	-	-
Meso-inositol	-	+	W	ND	-	-
Manitol	-	+	W	+	-	+
Amigdalina	+	-	-	-	-	ND
Arbutina	+	-	-	-	ND	ND
Salicina	+	-	-	-	ND	ND
Melobiosa	-	-	+	+	ND	-
D (-) trehalosa	-	+	-	-	-	-
Xilitol	-	+	+	+	-	-
D-Fucosa	-	+	+	+	ND	ND
L-Fucosa	-	+	+	+	-	-
D-Arabitól	-	+	+	+	-	-
L-Arabitól	-	+	+	+	ND	ND
Gluconato	-	+	+	+	+	-
2-cetogluconato	-	+	+	+	ND	+
5-cetogluconato	-	-	+	-	ND	ND

+: La bacteria crece. -: La bacteria no crece. **W**: Crecimiento débil de la bacteria. **ND**: No hay datos. **V**: Variable.

**Tabla 10.** Diferencias fenotípicas entre *Pseudomonas* sp. IS6<sup>T</sup> y sus especies más próximas, incluyendo la especie tipo del género *P. aeruginosa* ATCC 10145<sup>T</sup>. Cepas: 1, *Pseudomonas* sp. IS6<sup>T</sup>; 2, *P. coleopterorum* LMG 28558<sup>T</sup> (Menéndez et al., 2015); 3, *P. koreensis* CCUG 51519<sup>T</sup> (Kwon et al., 2015); 4, *P. glycinae* MS586<sup>T</sup> (Jia et al., 2020); 5, *P. jessenii* DSM 17150<sup>T</sup> (Verhille et al., 1999); 6, *P. aeruginosa* ATCC 10145<sup>T</sup> (Clark et al., 2006; Palleroni, 2005; Xiao et al., 2009; Menéndez et al., 2015).

	1	2	3	4	5	6
Oxidasa	-	+	+	+	+	+
Reducción de nitratos	-	-	-	-	+	+
Producción de gelatinasa	-	-	+	+	-	+
β-glucosidasa	+	ND	ND	ND	-	ND
Arginina dihidrolasa	-	+	+	+	+	+
Ureasa	-	+	V	-	-	V
Hidrólisis de esculina	+	+	ND	-	+	-
Asimilación de:						
L-arabinosa	+	+	+	+	+	-
Glicerol	-	+	+	ND	+	+
L-rhamnosa	+	-	-	-	V	-
Sorbitol	-	-	-	-	V	-
N-acetil-glucosamina	-	-	+	+	+	+
D-maltosa	-	-	-	-	V	-
Fenil-acetato	+	-	-	-	+	+
Malato	+	+	+	-	+	d
Adonitol	-	-	-	-	V	-
D-Galactosa	+	+	+	-	+	-
Manosa	+	+	+	+	+	-
Melobiosa	-	-	-	-	V	-
D (-) trehalosa	-	-	-	-	V	-
Xilitol	-	-	-	-	V	-
D-xilosa	+	ND	ND	-	ND	ND
L-Fucosa	-	-	-	-	V	-
D-Arabitol	-	+	+	-	+	-
Gluconato	+	+	+	+	+	-
2-cetogluconato	-	ND	ND	-	+	+

+ : La bacteria crece. - : La bacteria no crece. **W**: Crecimiento débil de la bacteria. **ND**: No hay datos. **V** : Variable.



**Tabla 11.** Diferencias fenotípicas entre *Arthrobacter* sp. IA7<sup>T</sup> y las cepas tipo de sus especies más próximas, incluyendo la especie tipo del género *A. globiformis* NBRC12137<sup>T</sup>. Cepas: 1. *Arthrobacter* sp. IA7<sup>T</sup>; 2, *A. globiformis* NBRC12137<sup>T</sup>; 3, *A. enclensis* NIO-1008<sup>T</sup>; 4, *A. silvisoli* NEAU-SA1<sup>T</sup>

	1	2	3	4
Rango de temperatura (°C)	12–37	ND	10–45	10–40
Rango de pH	6,5–8,5	ND	5,0–9,0	5,0–10,0
Rango de NaCl (% p/v)	0,0–4,0	0,0–5,0	0,0–9,0	0,0–5,0
Reducción de nitratos	-	+	+	-
Hidrólisis de esculina	+	+	-	-
Fermentación/oxidación de glucosa	-	ND	-	-
Producción de:				
Gelatinasa	+	-	-	-
Ureasa	+	+	-	+
Esterasa lipasa	+	-	+	ND
Fosfato ácido	+	-	+	ND
β-galactosidasa	+	+	-	+
β-glucosidasa	+	ND	-	-
β-glucuronidasa	+	-	-	ND
Asimilación de:				
D-Mannosa	+	+	+	+
D-Manitol	+	ND	-	+
D-Maltosa	+	+	+	ND
D-Glucosa	-	ND	+	+
L-Arabinosa	-	+	+	+
Contenido en G + C (mol%)	66.0	62.0–65.5	61.3	66.7

+ : La bacteria crece. - : La bacteria no crece. **W**: Crecimiento débil de la bacteria. **ND**: No hay datos. **V** : Variable.

## Discusión

Numerosos estudios sugieren la existencia de una interacción entre *Pseudomonas* y escarabajos de la corteza (revisado en Saati-Santamaría et al., 2021). En muchos de estos trabajos se destaca la presencia de *Pseudomonas* como un género bacteriano siempre presente en estos insectos (microbioma *core*), lo que sugiere que bacterias del género *Pseudomonas* podrían desempeñar roles importantes en la ecología de estos escarabajos. En este capítulo se ha aislado una gran proporción (73%) de *Pseudomonas* de los escarabajos de la corteza *I. cembrae*, *X. bispinus*, *I. acuminatus*, y *P. bidentatus*.

Diversos artículos aluden a la implicación de bacterias en la protección del holobionte del escarabajo de la corteza (García-Fraile, 2018; González-Dominici et al., 2020; Saati-Santamaría et al., 2021). Esto ocurre a través de la inhibición de antagonistas del insecto o de la detoxificación de su micro-hábitat (García-Fraile, 2018). La investigación de este tipo de interacciones es de gran relevancia, puesto que permite, no sólo entender ciertos aspectos de la ecología microbiana, sino que también sirve de base para la búsqueda de nuevas moléculas de interés (Molloy y Hertweck, 2017). En este trabajo se muestra cómo las bacterias aisladas de *I. cembrae*, *X. bispinus*, *I. acuminatus*, y *P. bidentatus*, en especial algunas cepas de *Pseudomonas* son capaces de inhibir a diversos microorganismos, incluyendo a hongos entomopatógenos de sus hospedadores.

Entre estas cepas, aquellas que presentaron mayor capacidad para antagonizar a otros microorganismos distan mucho de especies bacterianas ya descritas, por lo que se propone su inclusión en nuevas especies. Los distintos árboles filogenéticos, los índices de similitud genómica y las diferencias fenotípicas apoyan esta hipótesis. Teniendo esto en consideración, se sugiere que la cepa IA19 represente la cepa tipo de la especie *Pseudomonas bohémica* sp. nov. y que las cepas IS6 (cepa tipo) y próximas (IS2, IS3, IS6, IS7, IS8, IS10, IS11, IS12, IS14) sean consideradas también como una nueva especie, *Pseudomonas fuscus* sp. nov.

El hallazgo de nuevas especies bacterianas ofrece valiosas oportunidades para descubrir nuevas funciones metabólicas o nuevos metabolitos, ya que, al no estar descritas, las posibilidades de que su metabolismo haya sido investigado son mucho menores. Además, tal y como se comentó previamente, el estudio de los contextos ecológicos de las interacciones microbianas puede llegar a ser muy rentable en la búsqueda de compuestos antimicrobianos (Molloy y Hertweck, 2017). Así pues, se torna de gran interés el estudio del metabolismo secundario de las especies *P. bohémica* y *P. fuscus*, nuevas especies que son capaces de inhibir a diversos microorganismos y que han sido aisladas de nichos ecológicos poco investigados en esta área.

La prospección de los genomas de estas especies ha revelado un gran potencial biosintético para producir metabolitos secundarios. Las cepas IS6 e IS8 portan una CDPS de la subfamilia XYP, una enzima poco extendida en el género *Pseudomonas* y que da lugar a la biosíntesis de CDPs, moléculas con multitud de aplicaciones en la industria farmacéutica (Yao et al., 2018). En este capítulo se han caracterizado los CDPs (cPL, cPI, cPF, cPV, cPY, cPP y cPG) resultantes de la acción de la CDPS de la cepa IS6, siendo moléculas que probablemente puedan proteger al holobionte del escarabajo de la corteza frente a microorganismos entomopatógenos. Este trabajo muestra,

por primera vez, una cepa del género *Pseudomonas* capaz de sintetizar esta combinación de CDPs. De hecho, casi no existen reportes de CDPs que utilicen al aminoácido prolina como el principal sustrato del primer sitio activo y los que hay, son de la subfamilia NYH (Jacques et al., 2015; Gondry et al., 2018). Los aminoácidos responsables de la catálisis del sitio activo donde se une la prolina en la CDPS de la cepa IS6 difieren de los descritos en Gondry et al. (2018). Así pues, los resultados de este trabajo extienden la diversidad enzimática de las enzimas CDPS.

Los CDPs producidos de forma mayoritaria parecen ser cPL y cPI. Tanto estos, como el resto de CDPs han sido descritos como productos del metabolismo de *Bacillus* spp., de *Propionibacterium* spp., de *Pseudomonas* spp., de la esponja marina *Dysidea* sp. e, incluso, como moléculas presentes en el café tostado o como resultado del proceso de pirólisis de la ovoalbúmina (Ginz y Engelhardt, 2000; Lind et al., 2007; Ren et al., 2010; Xu et al., 2011a; Zhai et al., 2019; Park et al., 2020). Sin embargo, ninguna de estas investigaciones sugiere que el origen de estos CDPs derive de la acción de enzimas CPDSs. En esos trabajos se describe una amplia variedad de actividades biológicas para las moléculas detectadas en este capítulo, como actividades antibacterianas (incluyendo activas frente a enterococos resistentes a vancomicina), antifúngicas, antitumorales o nematocidas, entre otras. En lo relativo al rol ecológico de estas moléculas, Park y colaboradores (2020) aislaron los 4 CDPs mayoritarios de la cepa IS6 (cPL, cPI, cPF y cPV) de una cepa endófito de plantas de la especie *Bacillus thuringiensis*. Los autores probaron que la inoculación de estas moléculas en plántulas de *Pinus thunbergii* incrementa la resistencia de estas plantas frente a la enfermedad del decaimiento del pino (pine wilt disease) causada por el nematodo *Bursaphelenchus xylophilus*. Además, muestran que esta cepa es capaz de inducir respuestas del sistema inmune de la planta. Basándonos en esto, no se podría descartar que estos CDPs producidos por la cepa IS6 puedan proteger de organismos patógenos, no sólo al escarabajo, sino al holobionte en su concepto más amplio, incluyendo al árbol hospedador.

En resumen, esta investigación aporta nueva información sobre las interacciones *Pseudomonas*-hospedador y, en concreto, entre bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas* y escarabajos de la corteza. Además, el capítulo destaca la utilidad de la minería genómica para guiar el aislamiento y caracterización de compuestos antimicrobianos que podrían estar jugando un rol importante en la ecología del holobionte del escarabajo de la corteza.

Finalmente, las investigaciones incluidas en este capítulo conllevan a la descripción de tres nuevas especies entre los aislados obtenidos a partir de los escarabajos de la madera empleados en este estudio, dos de ellas pertenecientes al género *Pseudomonas* y una de ellas incluida en el género *Athrobacter*.

#### **Descripción de *Pseudomonas bohémica* sp. nov. (Saati-Santamaría et al. 2018)**

*Pseudomonas bohémica* (bo.he'mi.ca. M.L.adj. en relación a Bohemia, región de Chequia donde la cepa tipo fue aislada).

El rango de temperaturas de crecimiento es de 4-37 °C, el rango de pH entre 6,5 y 8. Crecimiento óptimo a 28 °C y pH 7-8. Capaz de crecer hasta con 2,5% NaCl en TSB. Las ubiquinonas respiratorias son Q9 (97%) y Q8 (3%). Los ácidos grasos mayoritarios son C<sub>16:0</sub> (30.5%) y “*summed feature 3*” (20.1%). Oxidasa y catalasa positiva. En el sistema API20NE, muestra hidrólisis de esculina, asimilación de D-glucosa, L-arabinosa, D-manosa, D-manitol, gluconato potásico y citrato trisódico, mientras que hay resultados negativos para la reducción de nitratos, fermentación de glucosa, producción de gelatinasa, ureasa, indol arginina di-hidrolasa y β-galactosidasa, igual que para la asimilación de adonitol, metil-xilósido, N-acetil glucosamina, D-maltosa, caprato, adipato, malato y fenilacetato. En la galería API50CH se observa utilización de D-glucosa, glicerol, ribosa, L-xilosa, L-fructosa, D-manosa, L-arabinosa, amigdalina, arbutina y salicina como fuentes de carbono.

La cepa tipo, IA19<sup>T</sup> (=CECT 9403<sup>T</sup> =LMG 30182<sup>T</sup>), fue aislada del escarabajo de la corteza *Ips acuminatus* en Chequia. El contenido en G+C genómico es de 59,5 mol%.

#### **Descripción de *Pseudomonas fuscus* sp nov.**

*Pseudomonas fuscus* (fus'cus. M.L.adj. *fuscus*, marrón, debido al color a los pigmentos que produce la cepa tipo de la especie).

El rango de temperaturas de crecimiento es de 4-28 °C, el rango de pH entre 6,5 y 8. Crecimiento óptimo a 28 °C y pH 7. Capaz de crecer hasta con 2,5% NaCl en TSB. Las ubiquinonas respiratorias son Q9 (97,3%) y Q8 (1,8%). Los ácidos grasos mayoritarios son C<sub>16:0</sub> (29,1%) y C<sub>18:1 w7c</sub> (16,2%). Oxidasa netagiva y catalasa positiva. En el sistema API20NE, muestra hidrólisis de esculina, actividad β-glucosidasa, asimilación de D-glucosa, L-arabinosa, D-manosa, D-manitol, gluconato potásico, caprato, malato y fenil-acetato mientras que hay resultados negativos para la reducción de nitratos, fermentación de glucosa, producción de gelatinasa, ureasa, indol arginina di-hidrolasa y β-galactosidasa, igual que para la asimilación de adonitol, metil-xilósido, N-acetil glucosamina, D-maltosa, adipato,. En la galería API50CH se observa fermentación de L-arabinosa, D-xilosa, D-galactosa, D-glucosa, D-mamnososa, L-rhamnosa y D-fucosa.

La cepa tipo, IS6<sup>T</sup>, fue aislada del escarabajo de la corteza *Ips cembrae* en Chequia. El contenido en G+C genómico es de 63,3 mol%.

#### **Descripción de *Arthrobacter ipsi* sp. nov. (González-Dominici et al. 2020)**

*Arthrobacter ipsi* (ip'si. M.L.adj. en relación a *Ips*, género de escarabajo del que la cepa tipo ha sido aislada)

Las células de la cepa IA7<sup>T</sup> forman colonias de color crema crema, suaves y circulares con márgenes enteros cuando se cultivan durante 3 días a 28 °C en medio TSA. La cepa puede crecer a 12-37 °C con un óptimo a 28 °C, a un pH de entre 6,5 y 8,5 con un óptimo a 6,5 - 7,5 y en

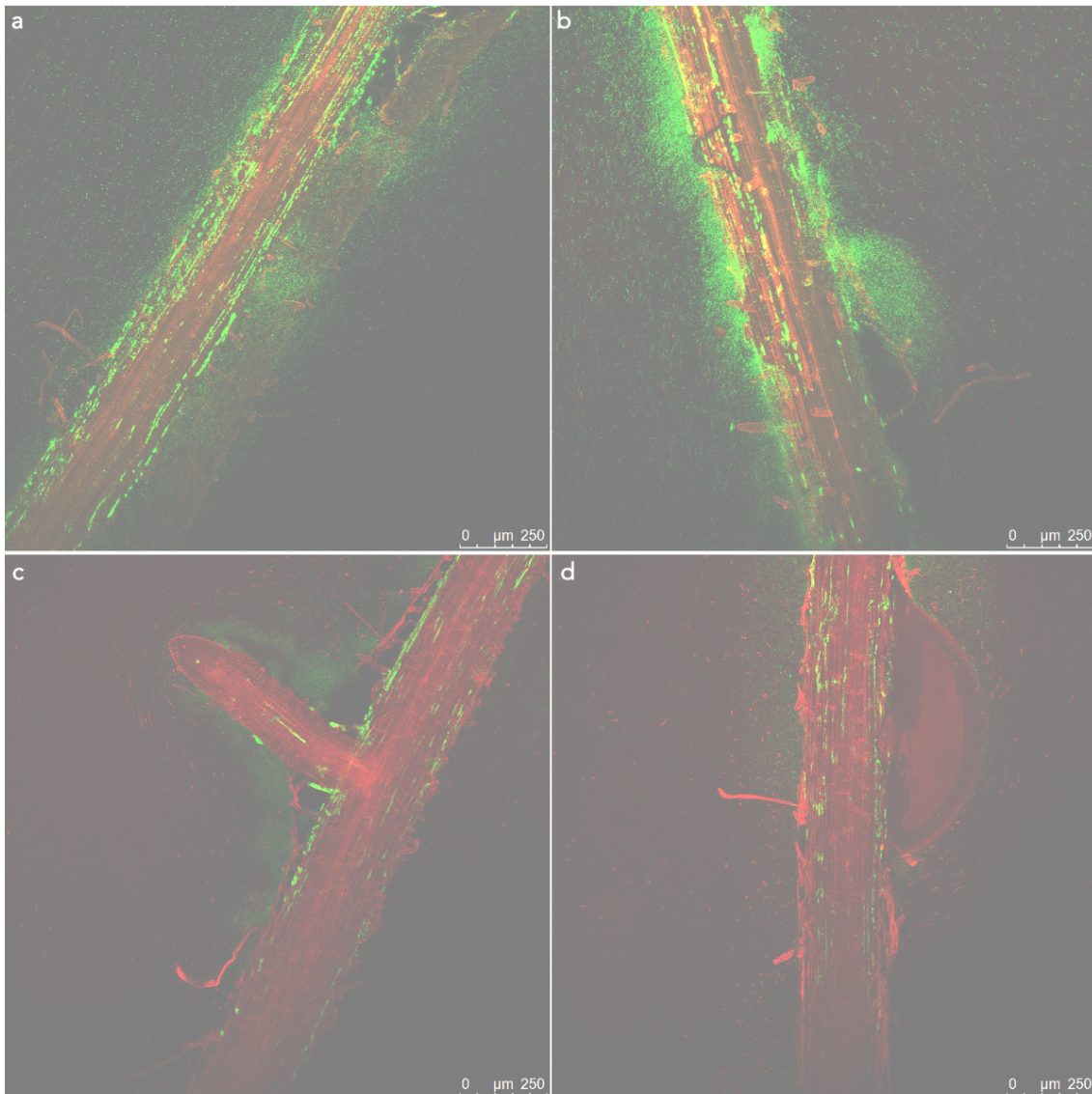
presencia de NaCl al 0 - 4% (p / v), con un óptimo al 0-1% (p / v). Las células son bacilos gramnegativos cortos con 0,4  $\mu\text{m}$  de longitud y 0,1  $\mu\text{m}$  de ancho. IA7<sup>T</sup> es catalasa positiva y oxidasa negativa. En el sistema API20E, la prueba de fermentación / oxidación de glucosa fue negativa, pero fue positiva para la hidrólisis de esculina, la producción de ureasa, gelatinasa y  $\beta$ -galactosidasa y para la asimilación de D-manosa, D-manitol, N-acetilglucosamina y D-maltosa; la reducción de nitratos, fermentación de glucosa, producción de indol y arginina dihidrolasa y asimilación de D-glucosa, L-arabinosa, gluconato de potasio, caprato, adipato, malato, citrato trisódico y fenilacetato fueron negativas. Se observó además que las actividades enzimáticas eran positivas para la fosfatasa alcalina, esterasa, esterasa lipasa, fosfatasa ácida, naftol-AS-BI-fosfohidrolasa,  $\alpha$ -galactosidasa,  $\beta$ -galactosidasa,  $\alpha$ -glucosidasa,  $\beta$ -glucosidasa, N-acetil- $\beta$ -glucosaminidasa y  $\alpha$ -manosidasa, pero negativas para lipasa, leucina arilamidasa, valina arilamidasa, cistina arilamidasa, tripsina,  $\alpha$ -quimotripsina y  $\alpha$ -fucosidasa.

La cepa tipo IA7<sup>T</sup> (= CECT 30100<sup>T</sup> = LMG 31782<sup>T</sup>) se aisló de un escarabajo de la corteza de la especie *Ips acuminatus* en la República Checa. La composición de base G + C fue 66,0% en moles.



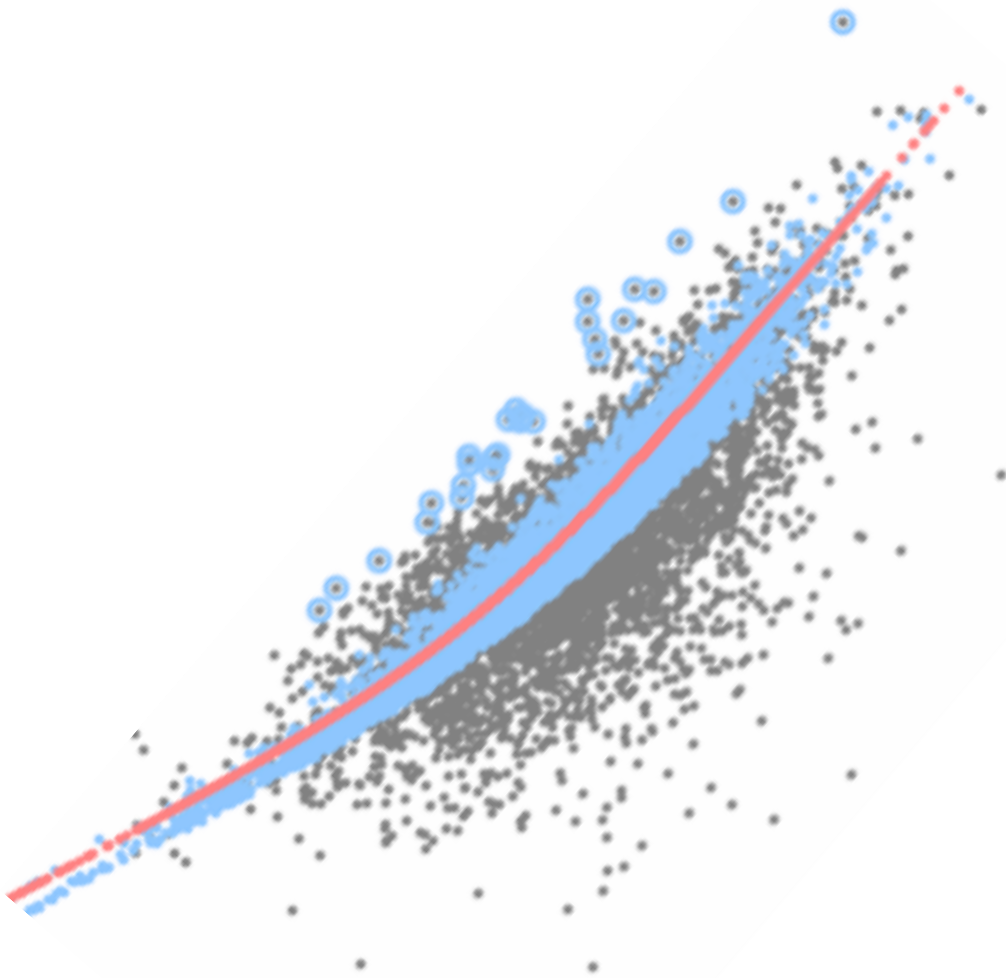
# Capítulo III

*Descifrando las interacciones beneficiosas  
Pseudomonas-planta*









# *Introducción*



## ***Introducción***

### **Utilización de probióticos en cultivos**

El último siglo ha sido testigo de multitud de descubrimientos científicos, desarrollos tecnológicos y avances sanitarios, los cuales, junto con la evolución en los derechos de la sociedad, han dado lugar a un incremento de la población mundial, la cual requiere un aumento en nuestra capacidad para producir alimentos. Gracias a la Revolución Verde, acaecida entre los años 1960 y 1980, se consiguió mejorar el rendimiento de los cultivos a través del uso de fertilizantes químicos y pesticidas, salvando así a millones de personas de la hambruna (García-Fraile et al., 2017). Sin embargo, estas implementaciones no tienen un coste cero: la mayoría de los compuestos químicos utilizados en los cultivos tienen impactos negativos en la salud y en el medio ambiente (Menéndez y García-Fraile, 2017).

La utilización de microorganismos como probióticos de plantas, bien sean bacterias u hongos, constituye una alternativa a los químicos para incrementar los rendimientos de los cultivos respetuosa con el medio ambiente. Dentro de las bacterias más estudiadas y aplicadas en este sentido destacan las fijadoras de nitrógeno, como los rizobios (*Rhizobium*, *Ensifer*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, etc.), cuya simbiosis con las leguminosas ha sido investigada con gran profundidad (Backer et al., 2018; García-Fraile et al., 2017; Menéndez y García-Fraile, 2017). En esta relación, la planta proporciona fuentes de carbono y protección a las bacterias mientras que éstas son capaces de transformar el nitrógeno para que pueda ser utilizado por las plantas en unos órganos especializados formados para tal fin en las raíces de las plantas (los nódulos) (Backer et al., 2018). Debido a esto, los primeros biofertilizantes bacterianos se basaron en este tipo de simbiosis mutualista y gracias a ellos se consiguen fijar millones de toneladas de nitrógeno atmosférico en los cultivos de las leguminosas (Backer et al., 2018). Hoy en día, tras multitud de estudios en los que se prueba el efecto de las bacterias en las plantas, se comercializan también bacterias pertenecientes a otros géneros, como *Pseudomonas* o *Bacillus*, entre otros (Backer et al., 2018).

Algunos de los microorganismos que aparecen comúnmente asociados a cada cultivo (microbioma core) son capaces de promover el crecimiento de las plantas. La asociación sistemática de estos microbios con la planta hospedadora hace presuponer un éxito en el establecimiento de la asociación planta-bacteria cuando esta última se aplica como biofertilizante (Lemanceau et al., 2017; Compant et al., 2019). Así, el estudio de la composición y funciones del microbioma de las plantas es esencial para un desarrollo óptimo de biofertilizantes. A través de estos estudios será posible determinar qué microorganismos están presentes en las plantas y qué funciones pueden llevar a cabo, para después utilizar esta información en beneficio de los cultivos (López-Mondéjar et al., 2017). De esta manera, podrán desarrollarse biofertilizantes cada vez más eficaces que puedan conducir a una verdadera revolución verde, esta vez respetuosa con el medio ambiente.

### Interacciones beneficiosas planta-microorganismo

Los microorganismos poseen mecanismos muy diversos con los que son capaces de promover el crecimiento de las plantas (PGP) (García-Fraile et al., 2017; Poveda et al., 2019). Entre estos mecanismos, la ya comentada fijación de nitrógeno supone un ejemplo muy relevante. Sin embargo, no es el único caso. Los microorganismos también pueden favorecer a la nutrición de las plantas a través de la solubilización de fosfato; cuando éste está en forma de sales inorgánicas, no asimilables por las plantas, algunos microorganismos son capaces de producir ácidos orgánicos o de excretar protones que facilitan la solubilización de estas formas de fosfato y, por tanto, estará disponible como nutriente para las plantas (Menéndez y García-Fraile, 2017). Al igual que con el fosfato, los microorganismos también pueden favorecer la solubilización de potasio insoluble a través de la síntesis de ácidos carboxílicos y de lipopolisacáridos (Imran et al., 2020). La producción de sideróforos -moléculas quelantes de hierro- por parte de algunos microorganismos, también mejora el desarrollo de las plantas, facilitando el aporte de dicho nutriente al vegetal.

Al mismo tiempo, los microorganismos también sacan provecho de estas interacciones con las plantas. En el entorno de la rizosfera y la raíz, los microbios son capaces de encontrar abundantes fuentes de carbono y nitrógeno. De hecho, el microbioma de las plantas se caracteriza por ser capaz de degradar y utilizar los carbohidratos complejos que éstas producen, siendo en muchas ocasiones una característica que les permite generar vías de entrada al interior de las plantas (Carro y Menéndez, 2020).

Otra de las funciones más conocidas de los microorganismos beneficiosos de las plantas es la protección del holobionte. La producción de compuestos antimicrobianos que inhiben el crecimiento de microorganismos patógenos es un proceso de suma importancia para la salud de las plantas, sobretodo en el entorno rizosférico (Anjum et al., 2019; Nazli et al., 2020). Además, a través de moléculas microbianas que actúan como antígenos para las plantas (MAMPs, *Microbe-Associated Molecular Pattern*), algunos microorganismos beneficiosos son capaces de inducir una respuesta sistémica en los cultivos, de forma que resisten mejor al ataque de los patógenos. Algunos de los MAMPs más conocidos son los lipopolisacáridos (LPSs) de membrana, los flagelos bacterianos, el factor EF-Tu (*Elongation Factor Tu*) y la acetoina (Pel y Pieterse, 2013). La respuesta de las plantas a la presencia de estos elementos es muy variable y depende de muchos factores, pudiendo generar una respuesta muy fuerte o únicamente sufrir una pequeña inducción que le permita tener un estado basal de resistencia frente a estreses bióticos y abióticos (*priming*) (Pel y Pieterse, 2013). Tanto la capacidad para producir moléculas biocidas frente a microorganismos fitopatógenos como el efecto de *priming* son de gran utilidad para proteger a los cultivos, algo que se utiliza a través de los llamados agentes de biocontrol (BCAs) microbianos.

Otro tipo de mecanismo de interacción entre las plantas y su microbiota es la capacidad que tiene esta última de producir o regular los niveles de algunas hormonas vegetales como los ácidos salicílico y jasmónico, distintas auxinas (destacando el ácido indolacético), giberelinas (destacando el ácido abscísico), citoquininas (como la zeatina) y el etileno, entre otras (Menéndez y García-Fraile, 2017). Todas estas moléculas son responsables de cambios fisiológicos en las

células y tejidos vegetales a distintos niveles, participando en procesos de germinación, crecimiento, senescencia, desarrollo radicular, defensa a estreses bióticos y abióticos, etc. (Jan et al., 2019; Isoda et al., 2021). De esta manera, cuando los microorganismos producen estos compuestos o son capaces de regular su homeostasis a través de su degradación o de la inducción de su producción, pueden modular todos estos procesos fisiológicos tan importantes (Menéndez y García-Fraile, 2017).

A pesar de todos estos mecanismos ya descritos, los estudios en los que se persigue descifrar funciones microbianas en las plantas se encuentran con gran cantidad de proteínas hipotéticas asociadas a estas (Levy et al., 2018a), lo que indica que muy probablemente quedan aún muchos otros mecanismos de promoción del crecimiento vegetal por descubrir. Además, gran parte de las investigaciones relacionadas con la interacción planta-bacteria, se centran en los efectos que tienen los microorganismos en las plantas, pero poco se conoce sobre los efectos que tienen las plantas en las bacterias. Por ello, estudios más profundos de las interacciones planta-microorganismo, fuera de las conocidas y ampliamente descritas simbiosis mutualistas que forman las micorrizas o los rizobios y las leguminosas, son necesarios para el desarrollo de nuevos bioinoculantes microbianos eficientes para el desarrollo de los cultivos.

#### ***Pseudomonas* y *P. brassicacearum* en el microbioma de las plantas**

En la introducción general de la presente tesis doctoral se menciona la ubicuidad de las bacterias del género *Pseudomonas* en distintos tejidos de distintas especies de plantas. La aplicación de bacterias del género *Pseudomonas* para la mejora en el rendimiento de los cultivos ha sido reportada en diversos estudios (Vyas y Gulati, 2009; Lanteigne et al., 2012; Otieno et al., 2015; Backer et al., 2018; David et al., 2018; Jiménez-Gómez et al., 2020). Además, existen muchas cepas de este género que han sido estudiadas como agentes de biocontrol, puesto que son capaces de producir diversos antibióticos como fenacinas, 2,4-diacetilfluoroglucinol, pioluteorina, pirrolnitrina, lipopéptidos cíclicos, HCN y otros compuestos orgánicos volátiles (VOCs), etc. (Chaudhari et al., 2017; Mishra y Arora, 2018). Gran parte de estos estudios se centran en cepas de la especie *P. fluorescens*: hay más de 37.000 artículos que citan de forma conjunta los términos “*P. fluorescens*” y “biocontrol”, a la vez que existen más de 250 genomas públicos de esta especie bacteriana en la base de datos del NCBI en el momento de la escritura de la presente tesis doctoral.

Dentro de las especies del género *Pseudomonas*, se han reportados muchos casos de asociación entre *P. brassicacearum* y distintos hospedadores vegetales, incluyendo colza, patata, tomate, *Arabidopsis thaliana*, etc. (Achouak et al., 2000; Zhou et al., 2012; Zachow et al., 2017; Jiménez-Gómez et al., 2020). Además, diversos estudios describen acciones de biocontrol por parte de cepas de esta especie (Ramette et al., 2003; Novinscak et al., 2016; Zachow et al., 2017), lo cual sugiere que este taxón debería ser estudiado con mayor profundidad en como BCA.

Entre las cepas de esta especie, *P. brassicacearum* CDVBN10 fue aislada del interior de raíces de colza y se estudió su potencial como bacteria PGP (Jiménez-Gómez et al., 2020). Se encontró que esta cepa es capaz de producir sideróforos, de solubilizar fosfato, de producir celulosa (esencial en la formación de *biofilms* bacterianos en las raíces de las plantas) y compuestos indólicos y de promover el crecimiento de las plantas de colza en condiciones *in vitro*, en invernadero y en campo (Figura 33).

**Figura 33.** Ejemplo del efecto de promoción vegetal de la cepa *P. brassicacearum* CDVBN10 en un experimento en condiciones de campo. A) Control no inoculado; B) Planta inoculada con la cepa bacteriana. Escala, 12 cm. Figura tomada de Jiménez-Gómez et al., 2020.



#### Cultivo de colza (*Brassica napus*)

El cultivo de colza (*Brassica napus*) es uno de los más importantes a nivel económico en todo el mundo; el aceite extraído de sus semillas es utilizado para la alimentación humana y del ganado, pero también sirve de fuente para producir biodiesel, velas, productos de cosmética, lubricantes industriales, etc. (Friedt et al., 2018; Beszterda y Nogala-Kałucka, 2019). Sin embargo, este cultivo sufre grandes pérdidas de rendimiento a causa del hongo fitopatógeno *Leptosphaeria maculans* (anamorfo: *Phoma lingam*), agente causal de la enfermedad del pie negro (Howlett et al., 2001; Zhang y Fernando, 2018; Darma et al., 2019; Ma et al., 2019; Urquhart et al., 2019).

Teniendo en cuenta la mencionada importancia del cultivo de la colza, junto con la necesidad de proteger el medio ambiente y la salud de los consumidores, la búsqueda de una solución respetuosa con el medio ambiente para promover y proteger el cultivo de colza es más que deseable.

En base a todos los datos expuestos, en este capítulo se propone realizar un estudio en profundidad de los mecanismos de interacción planta-bacteria existentes entre *P. brassicacearum* CDVBN10 y *B. napus*, con el objetivo de averiguar, no sólo cómo esta cepa bacteriana es capaz de promover el crecimiento de este cultivo, sino también cómo afecta esta planta a la bacteria. De esta manera, los descubrimientos realizados podrán servir de base para el desarrollo de biofertilizantes eficaces.



## *Resultados y discusión*





## Resultados

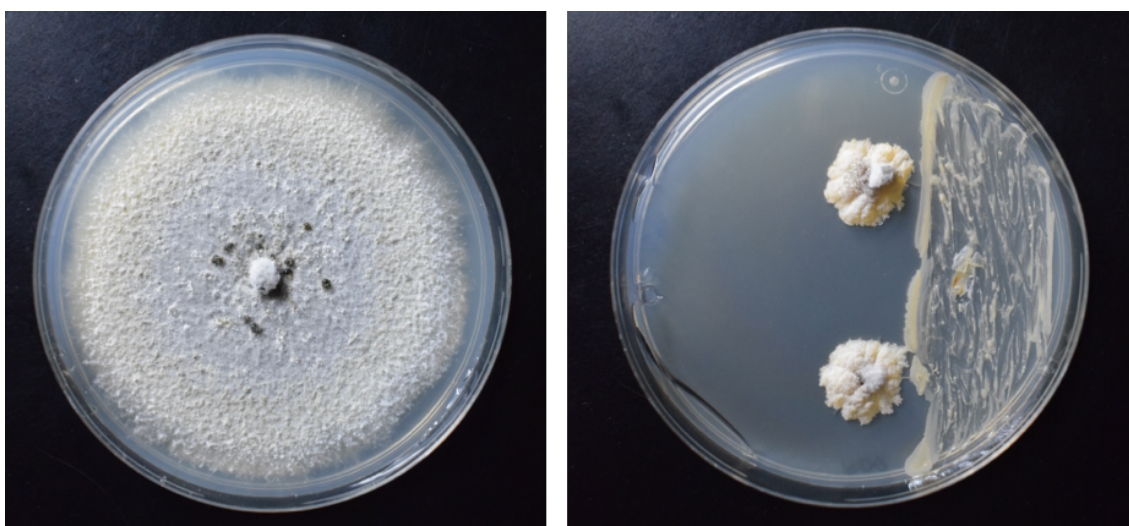
### Potencial de *P. brassicacearum* CDVBN10 como agente de biocontrol

Debido a los buenos resultados obtenidos en los ensayos previos de promoción de crecimiento del cultivo de colza empleando como inoculante la cepa *P. brassicacearum* CDVBN10, se propuso investigar más en profundidad los mecanismos por los que esta bacteria tiene tan elevada capacidad de promover el desarrollo de la planta.

Uno de los posibles mecanismos que podría tener la cepa *P. brassicacearum* CDVBN10 para mejorar el rendimiento del cultivo de colza es la capacidad para proteger a la planta frente a estreses bióticos. Se eligieron los siguientes microorganismos fitopatógenos de la colza para estudiar si la cepa CDVBN10 protege a la planta frente a su desarrollo:

- *Sclerotinia sclerotiorum* CRD 98 / 547
- *Verticillium dahliae* CRD 12 / 186
- *Leptosphaeria maculans* / *Phoma lingam* CRD 14 / 99
- *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* CRD 14 / 237

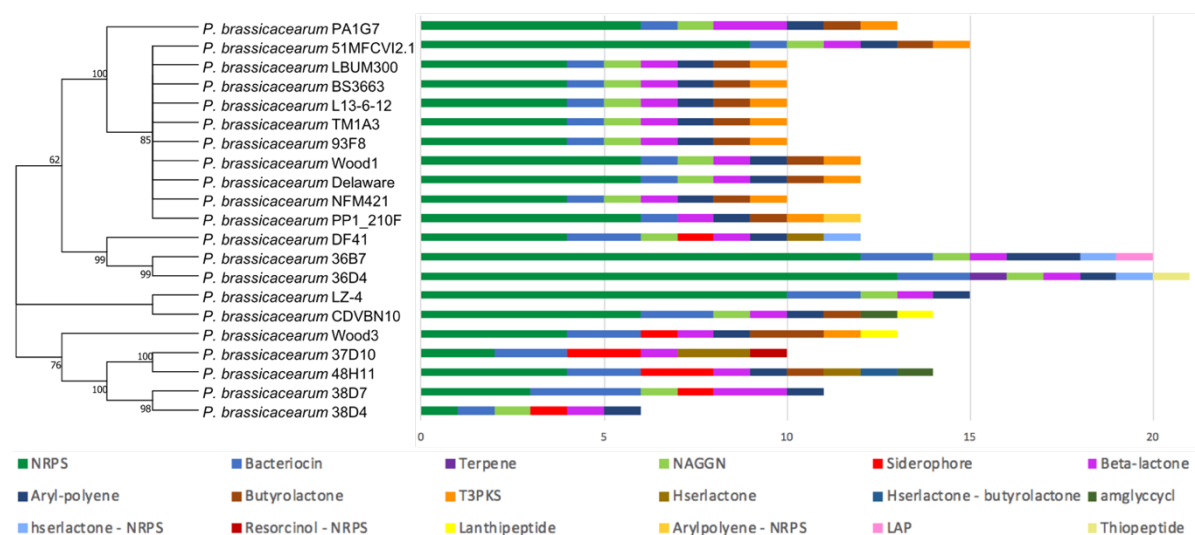
En primer lugar, se realizó un ensayo de antagonismo microbiano, observándose que, en las condiciones ensayadas, *P. brassicacearum* CDVBN10 es capaz de inhibir el crecimiento del hongo *L. maculans* (Figura 34), pero no de los otros microorganismos. Las placas se revisaron durante 1 mes y el hongo no se desarrolló más de lo que aparece en la Figura 34.



**Figura 34.** Ensayo de inhibición de la cepa *P. brassicacearum* CDVBN10 frente al hongo *Leptosphaeria maculans*. 10 días después de la inoculación del hongo. Izquierda: crecimiento del hongo control, sin presencia de *P. brassicacearum* CDVBN10. Derecha: crecimiento del hongo tras el crecimiento previo de *P. brassicacearum* CDVBN10.

Este resultado indica el potencial de la cepa *P. brassicacearum* CDVBN10 para proteger al cultivo de colza mediante la inhibición del hongo fitopatógeno ensayado, siendo probable que este

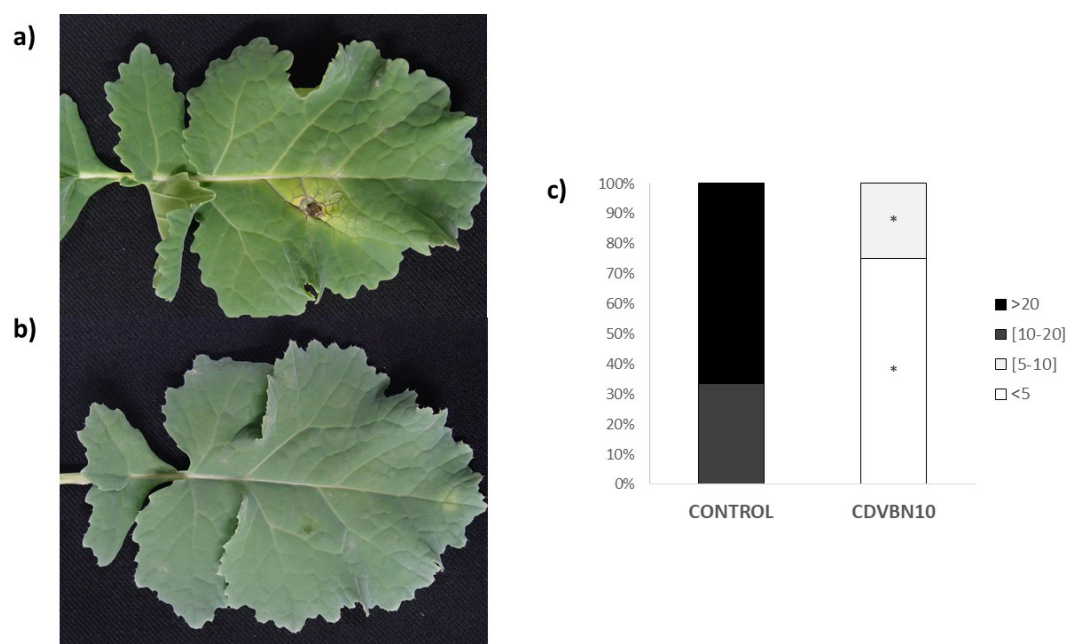
efecto sea consecuencia de la producción de un metabolito secundario antifúngico. Para confirmarlo, el genoma de la cepa CDVBN10 fue analizado con antiSMASH, encontrándose los siguientes tipos de BGCs: 6 NRPSs, 2 bacteriocinas, 1 híbrido aminoglucósido/aminocyclitol, 1 arilpolieno, 1 NAGGN, 1  $\beta$ -lactona, 1 lantipéptido y 1 butirolactona. Con el objetivo de encontrar BGCs diferenciales frente a otras cepas de la misma especie, también se analizaron genomas públicos de otras cepas de *P. brassicacearum* (Figura 35). Se conocen distintas capacidades de biocontrol de estas cepas, algunas son capaces de inhibir a microorganismos que la cepa CDVBN10 no es capaz de inhibir, pero no existen reportes de que ninguna pueda antagonizar a *L. maculans*. El genoma de la cepa CDVBN10 revela la capacidad de biosintetizar un lantipéptido único en el grupo de genomas estudiado, el cual podría ser responsable de la inhibición diferencial de *L. maculans*. Este BGC es muy similar al descrito para la producción de 2,4-diacetilfluoroglucinol, un antifúngico producido por muchas otras cepas de *Pseudomonas*. Es posible que este metabolito sea el responsable de la inhibición de microorganismos que la cepa CDVBN10 no es capaz de inhibir. Por otro lado, se investigaron las anotaciones funcionales de RAST de cada genoma en busca del operón *hcnABC*, responsable de la síntesis de ácido cianhídrico en *Pseudomonas*, un compuesto que muchas veces es responsable de antagonismos biológicos. Todas las cepas menos las cepas 38D7 y 38D4 mostraron presencia de ese operón.



**Figura 35.** Representación de los BGCs codificados por distintas cepas de la especie *P. brassicacearum* (derecha). A la izquierda se muestra la filogenia sus genomas, recreada con UBCG.

Los resultados mostrados versan sobre la capacidad directa de inhibición microbiana. Sin embargo, las bacterias también son capaces de proteger a las plantas de estreses bióticos a través de *priming*, o inducción de resistencia sistémica en la planta. Para probar este efecto, plantas de colza dispuestas en macetas en condiciones de invernadero fueron inoculadas con la cepa CDVBN10 y, tras 1 mes, el hongo *L. maculans* fue inoculado en las hojas de la planta para estudiar la generación de lesiones necróticas. Los resultados revelaron que la cepa CDVBN10 es capaz de proteger al cultivo de colza frente a la infección de *L. maculans*, observándose un número

significativamente menor de lesiones en hojas de plantas inoculadas con la bacteria que en las de las plantas sin inocular (Figura 36).



**Figura 36.** Infección de hojas de colza *L. maculans*. **a** Hoja de planta control, sin bacteria inoculada; **b** Hoja de planta inoculada con la cepa CDVBN10. Ambos casos, 10 días después de la infección. **c** Cuantificación de las lesiones producidas. Se representan los porcentajes de hojas según grupos divididos por el tamaño (diámetro) de las lesiones producidas por el hongo. Cada muestra está compuesta por 18 hojas. Se utilizaron 6 réplicas biológicas distintas por tratamiento. Los asteriscos muestran diferencias significativas (valor  $p < 0,05$ ; test no paramétrico de Friedmann).

#### Estudio de cambios en las comunidades microbianas endofíticas de colza tras la inoculación de *P. brassicacearum* CDVBN10

Algunas bacterias, pueden beneficiar a las plantas *per se*, debido a sus propios mecanismos de promoción del crecimiento vegetal. Sin embargo, también es posible que la inoculación de la bacteria no tenga efectos directos sobre la planta, sino que desencadene cambios en la composición de su microbioma y que sean estos cambios los que determinan el éxito de la promoción del crecimiento del cultivo. Así, en esta tesis doctoral se propuso estudiar si existían cambios relevantes en las comunidades bacterianas de las raíces de colza tras la inoculación con la cepa *P. brassicacearum* CDVBN10. Para ello, como parte de un trabajo previo en el que se realizó un ensayo de campo con esta cepa para mostrar su capacidad de promoción del cultivo, se recogieron 4 réplicas de raíces de cada tratamiento -plantas inoculadas y control sin inocular- 8 meses después de la siembra, momento en que las plantas ya habían formado semillas pero aún estaban verdes. A partir de dichas muestras, se realizó un proceso de secuenciación masiva de amplicones del gen ribosómico 16S ARNr completo.

En este proceso se obtuvieron un total de 376.370 lecturas de copias del gen 16S ARNr (Tabla 12). Después del filtrado por calidad y tamaño, se mantuvieron 96.105 lecturas ( $\geq 800$  y  $\leq 1600$  pb). Se aplicó un proceso de *clustering* al 97% de similitud que generó un total de 3.419 OTUs. Sin embargo, si no se tienen en cuenta todos los OTUs compuestos por 1 o 2 lecturas, el número total de OTUs es de 2.130.

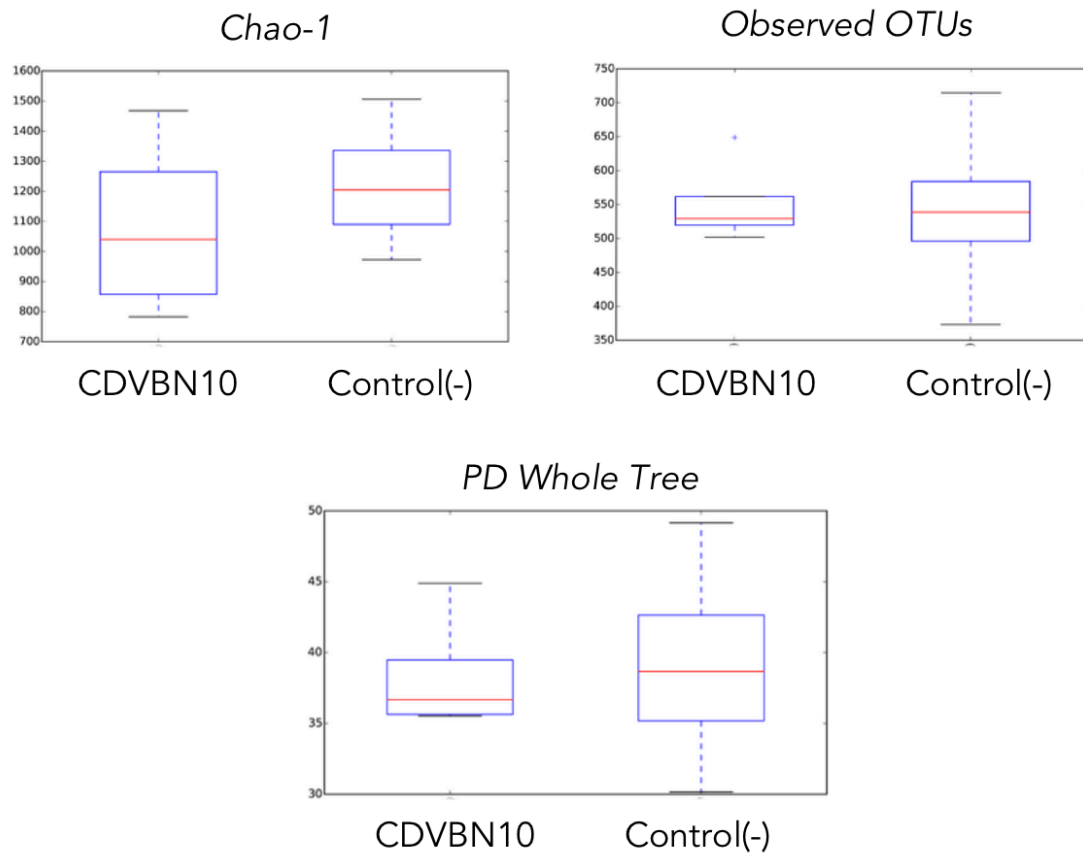
**Tabla 12.** Lecturas antes y después del filtrado por tamaño y calidad de cada muestra. Distintos índices de diversidad alfa son mostrados para cada muestra

Muestras	Lecturas	Lecturas tras filtrado	Observed OTUs	PD whole tree	Chao-1	Shannon	Simpson	Good's Coverage	
<b>CDVBN10</b>	A1	40.297	15.884	540	69,68	2.465,58	5,56	0,75	0,95
	A2	49.926	15.190	714	71,17	2.416,30	8,35	0,97	0,96
	A3	50.086	7.353	537	44,89	1.369,97	7,46	0,97	0,95
	A4	30.213	14.870	373	53,98	2.083,64	3,95	0,61	0,96
<b>Control</b>	B1	47.285	2.381	532	31,42	782,39	7,51	0,97	0,90
	B2	61.430	4.491	525	35,55	1.041,56	7,86	0,99	0,93
	B3	44.494	14.480	501	64,73	2.201,01	5,51	0,77	0,95
	B4	52.639	21.274	648	81,05	2.083,64	7,48	0,94	0,96
<b>Total</b>	-	376.370	96.105	-	-	-	-	-	-

Según lo observado en la tabla anterior y en la Figura 37, no existen grandes cambios en la diversidad bacteriana alfa de las raíces de plantas inoculadas frente a plantas no inoculadas. En cuanto a la diversidad beta, no existen ningún taxón que tenga ninguna asociación estadísticamente significativa con ningún tratamiento (valor p, la corrección de Bonferroni  $> 0.05$ ). Es decir, en este análisis no se han encontrado especies bacterianas más enriquecidas en los controles o en las plantas inoculadas frente a su tratamiento contrario

Dentro de las comunidades bacterianas endofíticas estudiadas se han encontrado once filos, siendo *Proteobacteria* el más abundante (28,8 - 37,1%), seguido por *Bacteroidetes* (18,0 - 19,0%) y *Verrucomicrobia* (4,6 - 5,6%). A nivel de clase, *Betaproteobacteria* es el más abundante (18,9 - 20,9%), seguido por *Flavobacteria* (9,9 - 11,5%) y *Gammaproteobacteria* (4,2 - 5,6%). Los órdenes *Burkholderiales* (15.6 - 18.5%), familias *Commamonadecae* (8,8 - 10,6%) y *Oxalobacteraceae* (6.8 - 7.8%), géneros *Polaromonas* (2.1% - 2.6%) y *Janthinobacterium* (2,9 - 3,4%); y *Flavobacteriales* (9.9 - 11.5%), familia *Flavobacteriaceae* (9.6 - 11.2%), y el género *Flavobacterium* (9.6 - 11.2%) son los taxones con mayor abundancia relativa entre las muestras.

También están presentes otros taxones ecológicamente importantes como los pertenecientes al orden *Rhizobiales* (2,1%) o a la familia *Pseudomonadaeae* (0,7%).



**Figura 37.** Boxplots de distintos índices de diversidad alfa de las muestras de comunidades bacterianas endofíticas de colza analizadas a través de secuenciación masiva de amplicones.

#### Estudio de expresión diferencial de la cepa *P. brassicacearum* CDVBN10 sobre plantas de colza. RNA-Seq dual.

Los resultados del ensayo de campo mostraron que *P. brassicacearum* CDVBN10 promueve de forma eficaz el crecimiento del cultivo de colza. Se ha encontrado que no es muy probable que estos cambios se deban a modificaciones del microbioma endofítico tras la inoculación bacteriana. Además, se ha mostrado que otro posible mecanismo por el cual la bacteria pueda haber favorecido el crecimiento del cultivo es la protección de este frente a estreses bióticos.

Sin embargo, existen muchos otros mecanismos bacteriano de promoción de crecimiento vegetal descritos en la literatura y muchos otros más aún no descritos. Debido a esto, se realizó un estudio de expresión diferencial de genes de esta bacteria entre los estados de vida libre -sin interacción con la planta- y del momento de la colonización radicular. Los resultados obtenidos fueron analizados con el propósito de encontrar genes sobreexpresados en la interacción que puedan estar implicados en el éxito de la promoción de este cultivo por parte de la bacteria.

Antes de la realización del estudio transcripcional se estudió en qué momento post-inoculación las bacterias realizan una colonización efectiva de las raíces. Mediante microscopía electrónica de barrido, se pudo comprobar que a los 11 días post-inoculación la bacteria realiza una colonización muy amplia sobre la superficie de las raíces de colza (Figura 38).

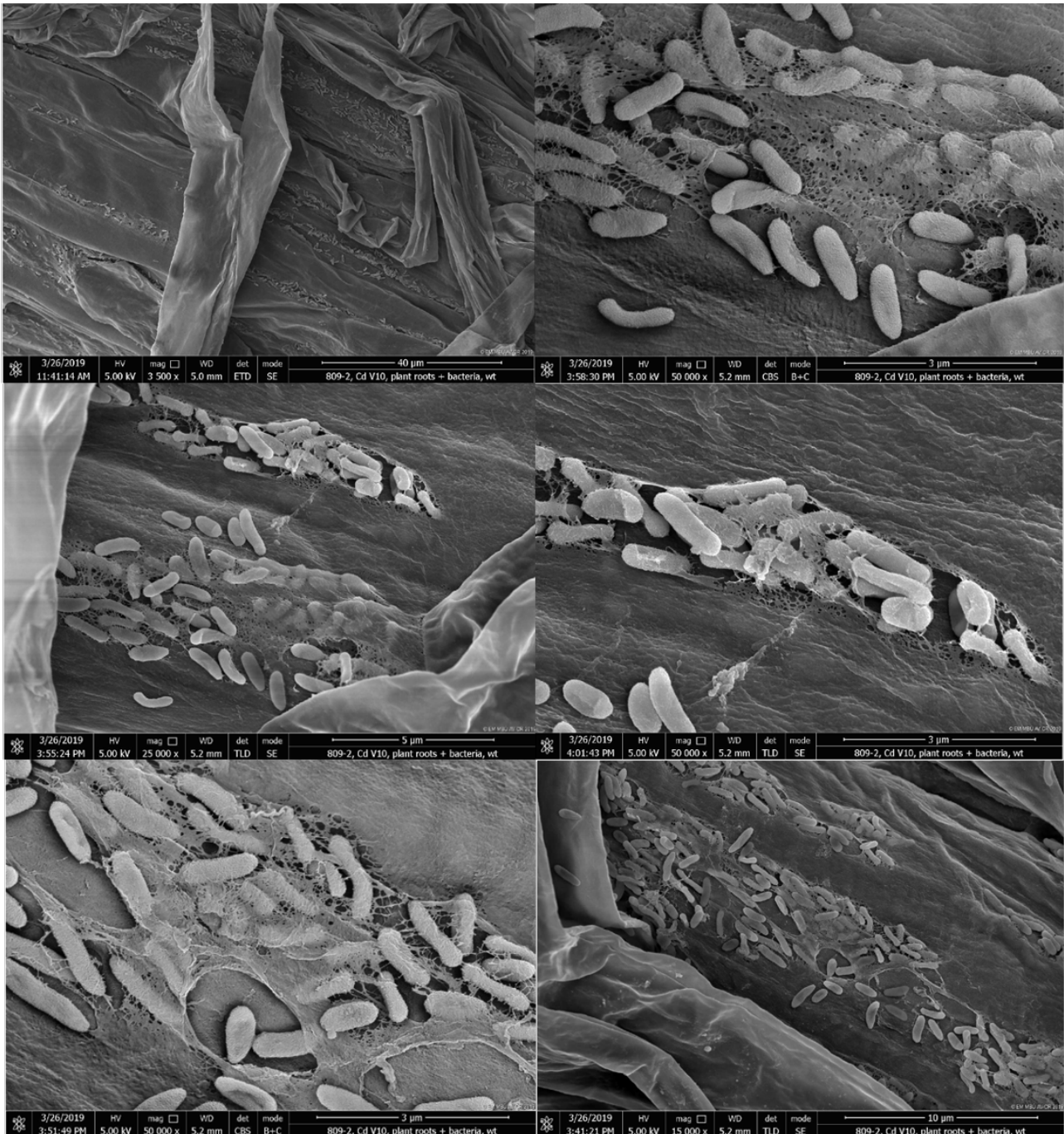


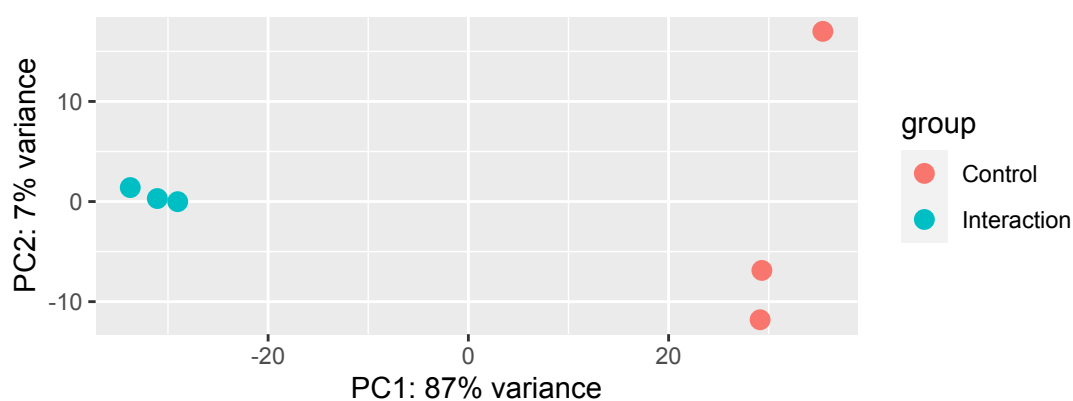
Figura 38. Fotografías de microscopía electrónica de barrido sobre raíces de colza 11 días tras la inoculación de la bacteria *P. brassicacearum* CDVBN10.

Una vez determinado un momento óptimo de interacción bacteria-planta, y con el objetivo de averiguar qué rutas metabólicas y qué mecanismos bacterianos de la cepa *P. brassicacearum* CDVBN10 se expresan cuando está colonizando las raíces de *B. napus*, se secuenció el

transcriptoma de las bacterias adheridas al rizoplasma, las cuales fueron obtenidas mediante ultrasonificación de raíces de colza 11 dpi, así como el transcriptoma de *P. brassicacearum* CDVBN10 en condiciones control (mismo medio de cultivo, con glucosa como fuente de carbono y sin presencia de la planta). El RNA-Seq arrojó una media de 66,5 millones de lecturas por muestra (55,9 millones después de filtrarlas por calidad y tamaño) consiguiendo mapear al genoma de la bacteria aproximadamente un 99% de las lecturas finales de las muestras control y un 93,5% de las muestras de la bacteria en la interacción con raíces de colza (Tabla 13). La Figura 39 muestra que las réplicas de cada tratamiento son muy similares y que se diferencian claramente las de un tratamiento de las del otro.

**Tabla 13.** Resumen del rendimiento de lecturas del RNA-Seq llevado a cabo sobre el transcriptoma de la cepa *P. brassicacearum* CDVBN10 colonizando raíces de colza (“Interacción”) y en cultivo puro (“Control”)

Muestra	Lecturas originales	Tras filtrado de calidad	Lecturas mapeadas 1 vez	Lecturas mapeadas >1 vez	Mapeado total (%)
Control 1	57.598.646	45.811.490	45.261.157	23.943	98,85
Control 2	55.920.670	43.579.824	43.247.449	23.193	99,29
Control 3	64.788.627	56.527.995	56.156.950	21.850	99,38
Interacción 1	74.750.548	64.437.934	59.368.189	361.520	92,69
Interacción 2	73.711.066	62.336.661	58.083.451	560.947	94,08
Interacción 3	72.373.008	62.772.410	58.339.228	400.811	93,58



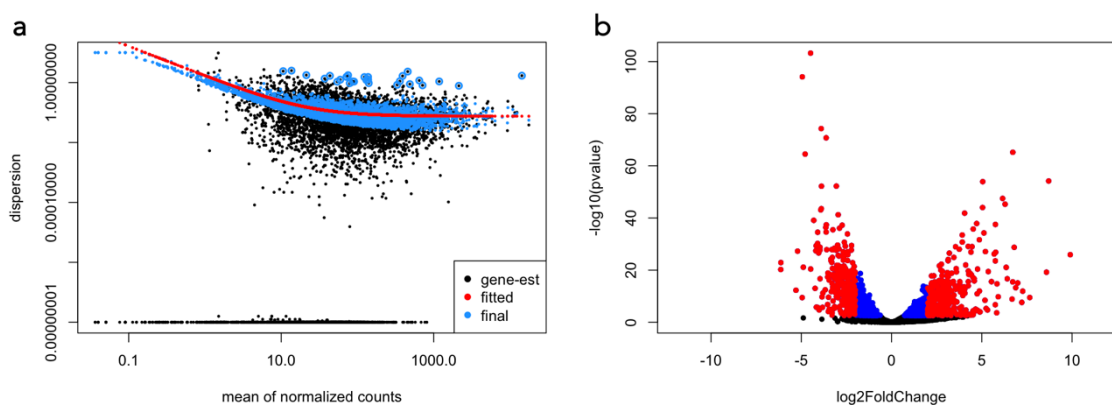
**Figura 39.** PCA de las muestras del RNA-Seq llevado a cabo sobre el transcriptoma de la cepa *P. brassicacearum* CDVBN10 colonizando raíces de colza (“Interacción”) y en cultivo puro (“Control”). Cada punto representa una muestra.

El análisis de expresión diferencial arrojó una gran cantidad de genes diferencialmente expresados (DEGs) (Tabla 14, Figura 40). *P. brassicacearum* CDVBN10 tiene 5.768 genes detectados, de los cuales 1.440 (25%) son DEGs con un valor p ajustado (padj) menor del 0,05 y

un valor de cambio de pliegue en sistema logarítmico en base 2 ( $\text{Log}_2\text{FoldChange}$ ) absoluto mayor de 2. Si tenemos en cuenta aquellos diferencialmente expresados con valores de  $|\text{Log}_2\text{FoldChange}| > 1$ , aparecen 2.068 DEGs (35,9%). 432 de los genes con  $>1 |\log_2\text{FoldChange}|$  y  $<0,05$  padj son proteínas hipotéticas.

**Tabla 14.** Resumen de los Genes Diferencialmente Expresados (DEGs) de la cepa *P. brassicacearum* CDVBN10 en su interacción con raíces de *B. napus*.

<b>Log<sub>2</sub>FoldChange</b>	<b>DEGs (padj &lt;0,05)</b>	<b>DEGs (padj &lt;0,01)</b>
>2 (sobreeexpresados)	464	392
>1 (sobreeexpresados)	1.092	824
<(-2) (infraexpresados)	309	302
<(-1) (infraexpresados)	976	853



**Figura 40.** a) Curva de distribución de dispersión y medias de número de lecturas normalizadas que muestra que los valores del análisis de las muestras de este experimento se ajustan al modelo de DESeq2. b) *Volcano plot* representando los valores de los genes infra y sobreeexpresados de la cepa *P. brassicacearum* CDVBN10 en su interacción con *B. napus* en las raíces. En rojo se muestran los valores de  $|\log_2\text{FoldChange}| > 2$  y en azul  $> 1$ .

### Metabolismo energético y respiración

Como ocurre en muchos otros grupos taxonómicos, las bacterias del género *Pseudomonas* median las reacciones de respiración oxigénica a través de la cadena de transporte de electrones en la membrana interna. Diversas enzimas componen este sistema, llevando a cabo reacciones de oxidación-reducción que generan un gradiente electroquímico que será necesario para la síntesis de energía a través de moléculas de ATP. Por lo tanto, una mayor actividad de estas enzimas dará lugar a una mayor obtención de energía celular.

Algunos de los genes que codifican enzimas de la cadena de transporte de electrones aparecen sobreeexpresados en la interacción con la planta, como el operón *cyoABCD* (que codifica para la citocromo oxidasa o) ( $1,3-6,8 \text{ Log}_2\text{FoldChange}$ ;  $5,8 \times 10^{-3}-2,3 \times 10^{-27}$  padj) y el gen *sdhC* (que codifica



para la succinato deshidrogenasa) ( $2,6 \text{ Log}_2\text{FoldChange}$ ;  $2,3 \times 10^{-11}$  padj). Esta última enzima forma parte también del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) o ciclo de Krebs, el cual continúa con la respiración celular de la glucosa e interviene en gran parte de los procesos metabólicos celulares (metabolismo oxidativo de glúcidos, lípidos, proteínas, etc). Una vez que la glucosa es degradada a piruvato a través de la cadena transportadora de electrones, éste es oxidado a  $\text{CO}_2$  a través del TCA. El primer paso sería la descarboxilación del piruvato a través de la citrato sintasa (EC:2.3.3.1), cuyo gen (*gltA*) está muy expresado en *P. brassicacearum* CDVBN10 en las condiciones de interacción con la planta.

Por el contrario, la reductasa de óxido nítrico (*norBC*), que está implicada en las rutas de desnitrificación y que representa un tipo de respiración anaerobia está infraexpresada (*norB*:  $-2,7 \text{ Log}_2\text{FoldChange}$ ;  $1,4 \times 10^{-3}$  padj; *norC*:  $3,5 \text{ Log}_2\text{FoldChange}$ ;  $3,2 \times 10^{-4}$  padj).

### **Influencia de la interacción mutualista en los ciclos de nutrientes de *P. brassicacearum* CDVBN10 con *B. napus***

Los exudados de las raíces de las plantas suponen una gran fuente de nutrientes que las bacterias pueden aprovechar. Por otro lado, las plantas también pueden hacer uso de los metabolitos liberados por las bacterias adheridas a sus raíces.

En el caso de este estudio, *P. brassicacearum* CDVBN10 sobreexpresa sobre las raíces de colza distintos genes relacionados con el metabolismo del fósforo, entre los que se incluyen aquellos que codifican la síntesis de una enzima con actividad trifosfatasa inorgánica (EC 3.6.1.25;  $0,8 \text{ Log}_2\text{FoldChange}$ ;  $4,6 \times 10^{-2}$  padj) y una pirofosfatasa inorgánica (EC 3.6.1.1;  $2,0 \text{ Log}_2\text{FoldChange}$ ;  $3,6 \times 10^{-6}$  padj), una enzima responsable de la síntesis de pirroloquinolina quinona (PQQ) (*pqqD*;  $1,8 \text{ Log}_2\text{FoldChange}$ ;  $1,9 \times 10^{-2}$  padj) y una glucosa deshidrogenasa PQQ-dependiente (*gdc*;  $1,7 \text{ Log}_2\text{FoldChange}$ ;  $1,4 \times 10^{-3}$  padj). Todas estas enzimas podrían favorecer la disponibilidad de fósforo para la planta, bien mediante su liberación en moléculas directamente asimilables, o bien mediante la síntesis de moléculas que facilitarían la solubilización de fósforo insoluble. En cuanto al transporte del potasio, aparecen sobreexpresados de forma significativa los genes *kefA* ( $1,5 \text{ Log}_2\text{FoldChange}$ ;  $2,5 \times 10^{-5}$  padj) y *kefF* ( $2,1 \text{ Log}_2\text{FoldChange}$ ;  $1,8 \times 10^{-2}$  padj), implicados en la síntesis de una bomba de potasio y su regulador, respectivamente. En contraposición, no están diferencialmente expresados los genes *pstSABC* y *phnCDE*, los cuales sintetizan transportadores de fósforo y fosfonatos, respectivamente, ni los genes *kup* ni *kdp* (implicados en la síntesis de transportadores de potasio).

Las bacterias pueden activar distintos mecanismos de resistencia a condiciones con baja disponibilidad de nutrientes. Por ejemplo, la proteína CstA se sobreexpresa en estas circunstancias. Sin embargo, como se ha mencionado, la rizosfera constituye un ambiente rico en nutrientes y así, en el caso de *P. brassicacearum* CDVBN10 vemos infraexpresado en las raíces de colza ( $-1,1 \text{ Log}_2\text{FoldChange}$ ;  $3,8 \times 10^{-7}$  padj) su gen que codifica para la proteína CstA. En la misma línea, los polihidroxialcanoatos (PHAs) son unos poliésteres producidos como sustancias de reserva de carbono y energía, cuya síntesis también está significativamente infraexpresada.

Una proporción relevante de los nutrientes liberados por las raíces de las plantas está compuesta por carbohidratos complejos, usualmente degradados a través de enzimas activas de carbohidratos (CAZys). En este transcriptoma aparece una beta-glucosidasa (EC:3.2.1.21; GH3) sobreexpresada (0,8 Log<sub>2</sub>FoldChange; 1,0x10<sup>-2</sup> padj), la cual tiene un péptido señal que la localizaría en la membrana o en el exterior celular. Esta glucosidasa rompe los enlaces de los residuos beta-D-glucosil principalmente de celulosa, aunque también de otros polisacáridos complejos. También hay una CAZY (AA10) sobreexpresada (2,6 Log<sub>2</sub>FoldChange; 4,1x10<sup>-5</sup> padj) con un posible rol en la degradación de celulosa o quitina. También aparece sobreexpresada una nitrilasa inducible por plantas que puede implicar la utilización de β-ciano-L-alanina de la planta como fuente de nitrógeno para la bacteria (4,4 Log<sub>2</sub>FoldChange; 1,2x10<sup>-25</sup> padj). Curiosamente, aparece otra enzima catalítica sobreexpresada, la enzima NADH-azoreductasa FMN-dependiente (*azoR*, EC 1.7.1.6) (5,1 Log<sub>2</sub>FoldChange; 1,1x10<sup>-32</sup> padj), la cual actúa sobre enlaces N-N. También con relación al metabolismo de moléculas nitrogenadas, aparecen sobreexpresados la mayoría de los genes pertenecientes al subsistema de la biosíntesis de nucleótidos purínicos *de novo*.

### Comunicación intercelular y quimiotaxis

Tanto el proceso de colonización radicular bacteriana como el de formación de *biofilm* están coordinados por la percepción de señales químicas procedentes tanto de la planta como de otras células bacterianas. Sin embargo, en el momento en el que se realizó el experimento de transcriptómica, la cepa CDVBN10 ya habrá realizado estos procesos, puesto que se encuentra instaurada sobre la superficie de las raíces de *B. napus*.

En este sentido, hay dos genes que codifican proteínas relacionadas con la quimiotaxis, MCP (*Methyl-accepting chemotaxis protein*), significativamente infraexpresadas (-4,1 y -4,5 Log<sub>2</sub>FoldChange; 9,6x10<sup>-29</sup> y 3,4x10<sup>-100</sup> padj).

En cuanto a la comunicación intercelular, aparece infraexpresada una hidrolasa de N-acil-homoserina lactonas responsable de la degradación de estas y, por tanto, implicada en el *quorum quenching*; al estar infraexpresada, las N-acil-homoserina lactonas (N-AHL), que median procesos de *quorum sensing*, no estarán siendo degradadas. También aparece sobreexpresado un regulador positivo crucial en el *quorum sensing* y en la formación de *biofilm*, el MqsR (2,2 Log<sub>2</sub>FoldChange; 6,2x10<sup>-6</sup> padj). Sin embargo, no se han encontrado genes relacionados con la producción de N-AHL diferencialmente expresados.

### Metabolismo secundario y sistemas de defensa

El entorno radicular suele ser un punto de confluencia para muchos microorganismos que son atraídos por los exudados radicales. Por tanto, para poder colonizar este nicho, unos microorganismos han de competir con otros por los nutrientes del lugar. Un método eficaz en esta competición es la producción de metabolitos secundarios con acción antimicrobiana. En este

sentido, en las raíces de *B. napus* la bacteria *P. brassicacearum* CDVBN10 sobreexpresa distintos tipos de BGCs que podrían estar relacionados con la producción de moléculas antimicrobianas, como un lantipéptido de tipo II, un RiPP (*Ribosomally synthesized and Post-translationally modified Peptide*) y varios NRPSs, uno de los cuales parece estar implicado en la síntesis de pioverdina. De hecho, el gen *pvdS* también está sobreexpresado (2,7 Log<sub>2</sub>FoldChange;  $1,2 \times 10^{-2}$  padj), el cual es un regulador global de la síntesis de pioverdinas. El operón *hcnABC*, responsable de la producción de cianuro de hidrógeno (HCN), un metabolito volátil también con acciones antimicrobianas, casi no está expresado en la cepa CDVBN10 en su interacción con las raíces de colza.

Otro mecanismo de competitividad entre células microbianas distintas es mediado a través de la inyección de moléculas perjudiciales mediante los sistemas de secreción tipo VI. Existen reguladores negativos para la síntesis de este sistema, como el RsmA, un regulador postranscripcional cuyo gen está infraexpresado en el transcriptoma del estudio (-3,3 Log<sub>2</sub>FoldChange;  $3,3 \times 10^{-11}$  padj). Al no activarse, la síntesis de los sistemas VI de secreción (hay 5 posibles loci en el genoma de la cepa CDVBN10) no está sufriendo una regulación postranscripcional negativa en las células bacterianas.

Muchas veces los microorganismos necesitan mecanismos para ser inmunes a las propias moléculas antimicrobianas que producen, los cuales pueden resultar eficaces para resistir a compuestos xenobióticos con características similares que puedan producir otros microorganismos u hospedadores superiores. En este sentido, la cepa CDVBN10 sobreexpresa dos genes similares a aquellos que sintetizan una proteína de inmunidad frente a colicina (4,2 Log<sub>2</sub>FoldChange;  $4,8 \times 10^{-3}$  padj) y otra frente al péptido bactericida MccB17 (McbE, 4,2 Log<sub>2</sub>FoldChange;  $4,2 \times 10^{-3}$  padj).

### Síntesis de moléculas que pueden inducir respuesta sistémica en las plantas

Las bacterias pueden activar distintos mecanismos a través de los cuales se generan moléculas que actúan como MAMPs, de manera que desencadenan respuestas en el sistema inmune de las plantas. Por ello, se ha estudiado la expresión de algunos de estos mecanismos en *P. brassicacearum* CDVBN10. Hay varios genes implicados en la síntesis flagelar, *fliC*, *fliD*, *fliF*, *fliG*, *fliM*, *fliN*, que están infraexpresados en la cepa CDVBN10 en la interacción con la planta, así como el factor sigma 28 ( $\sigma^{28}$ , *fliA*) responsable de la activación de la síntesis flagelar en *Pseudomonas*. Puesto que en el estado de *biofilm* las células no sintetizan flagelos, esto concuerda con las imágenes de microscopía en las que se ve a *P. brassicacearum* CDVBN10 formando *biofilm* sobre las raíces (Figura 38). En lo relativo a la síntesis de LPSs, los genes *lpxABCDHL* están muy expresados en la interacción, aunque sólo el *lpxC* (UDP-3-O-(R-3-hidroxiiristoil)-N-acetilglucosamina deacetilasa) está significativamente sobreexpresado, el cual es esencial para la síntesis del lípido A del LPS. También aparecen sobreexpresados los factores EF-Tu (*Elongation factor Tu*) (1,7 Log<sub>2</sub>FoldChange;  $4,8 \times 10^{-6}$  padj) y EF-Ts (*Elongation factor Thermo-stable*) (0,98 Log<sub>2</sub>FoldChange;  $6,5 \times 10^{-3}$  padj). Finalmente, la enzima acetolactato sintasa (*ilvHI*), responsable de

la síntesis de acetoína, está infraexpresada de forma significativa (0,98 Log<sub>2</sub>FoldChange; 6,5x10<sup>-3</sup> padj) en la interacción.

### **Adaptación a los factores adversos y estreses del entorno de la interacción planta-bacteria**

La bacteria deberá ser capaz de resistir a las moléculas de defensa producidas por la planta. Algunas de estas moléculas son compuestos antimicrobianos y algunos de los mecanismos de resistencia a estos compuestos están basados en canales o bombas de extrusión, los cuales muchas veces son capaces de actuar sobre diversos sustratos. En este sentido, la cepa CDVBN10 sobreexpresa en las raíces de colza el transportador mdtABC. Este es una bomba de eflujo de múltiples compuestos (*multidrug efflux system*) de la familia RND (*resistance-nodulation-cell division*) que requiere de su interacción con TolC para funcionar.

Las plantas, en respuesta a los microorganismos, también pueden producir especies reactivas de oxígeno (ROS), moléculas que generan estreses muy perjudiciales en las células. Sin embargo, las bacterias también tienen mecanismos para resistir a ellas. *P. brassicacearum* CDVBN10 sobreexpresa algunos genes que podrían mediar esta resistencia, como un gen responsable de la síntesis de la superóxido dismutasa (*sodB*; 1,4 Log<sub>2</sub>FoldChange; 1,4x10<sup>-5</sup> padj), el gen *ohr* (4,9 Log<sub>2</sub>FoldChange; 2,0x10<sup>-11</sup> padj) y el *cpxP* (8,7 Log<sub>2</sub>FoldChange; 5,3x10<sup>-52</sup> padj). En este sentido, esta bacteria también podría estar sobreexpresando la nitrilasa inducible por plantas comentada anteriormente como mecanismo de resistencia a concentraciones tóxicas de la β-ciano-L-alanina, o la enzima NADH-azoreductasa FMN-dependiente en el caso de que existan derivados azídicos tóxicos.

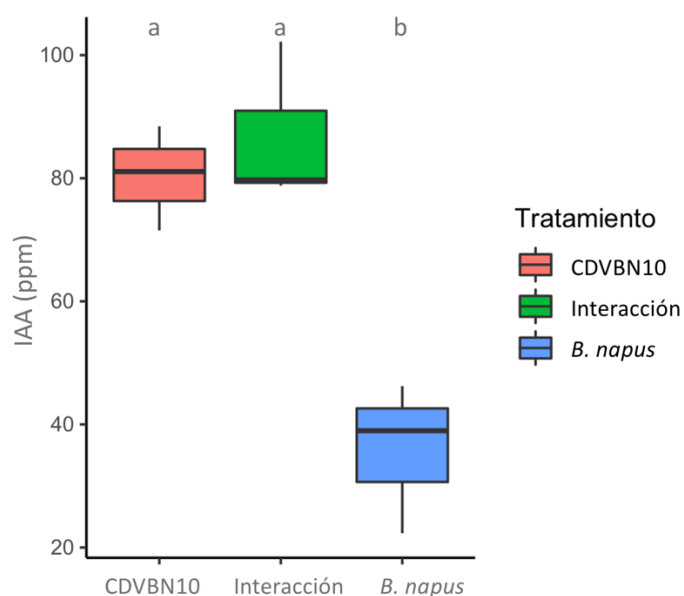
### **Síntesis de hormonas con actividad en plantas**

Las bacterias son capaces de producir hormonas que controlan muchos procesos fisiológicos en las plantas. Entre ellas, la cepa *P. brassicacearum* CDVBN10 sobreexpresa una isocrosimato piruvato-liasa en las raíces de colza (4,3 Log<sub>2</sub>FoldChange; 3,6x10<sup>-3</sup> padj), una enzima que cataliza la síntesis de ácido salicílico utilizando crosimato como sustrato. La bacteria también posee el gen *acdS*, el cual codifica la síntesis de 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC)-desaminasa, cuya acción disminuye de manera indirecta los niveles de etileno. Sin embargo, a pesar de tener activado este gen en la interacción, sus niveles de expresión, ligeramente superiores a los de las muestras control, no son muy elevados.

Las poliaminas son moléculas policatiónicas que también actúan como hormonas vegetales. Una de las poliaminas principales es la putrescina, la cual es sintetizada a través de rutas metabólicas que pueden implicar a la arginina o a la ornitina. En *P. brassicacearum* CDVBN10 aparecen sobreexpresados dos genes que pueden sintetizar esta molécula, el gen *aguB*, que codifica a la N-carbamoylputrescina amidasa (EC 3.5.1.53; 1,5 Log<sub>2</sub>FoldChange; 1,4x10<sup>-4</sup> padj) y el gen *speB*, agmatinasa (2,6 Log<sub>2</sub>FoldChange; 1,0x10<sup>-10</sup> padj). También está sobreexpresado el gen de la

arginina descarboxilasa, ornitina carcomoiltransferasa y argininosuccinato sintasa, todas enzimas relacionadas con el metabolismo de la arginina y previas a la síntesis de putrescina. Hay algunas posibles vías de degradación de putrescina, como la de la espermidina sintasa, no diferencialmente expresada, o la gamma-glutamyl-putrescina oxidasa, significativamente infraexpresada (*puuD*; -1,9 Log<sub>2</sub>FoldChange;  $1,4 \times 10^{-2}$  padj). En lo relativo a transportadores de putrescina en la bacteria, aparecen varios importadores infraexpresados.

Otra de las principales hormonas que podría estar sintetizando *P. brassicacearum* CDVBN10 es el ácido indolacético (IAA), sin embargo, las anotaciones del genoma no permiten discernir con exactitud qué enzimas podrían llevar a cabo esta acción en esta bacteria y aparecen algunos genes candidatos para ello tanto infra como sobreexpresados. Con el objetivo de confirmar este dato, se llevó a cabo una cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) sobre el sobrenadante de cultivo de la bacteria CDVBN10 en vida libre, de la planta *B. napus* y el de ambos organismos en interacción (en los tres casos, medio Hoaglands suplementado con triptófano). Se encontró que la bacteria es capaz de producir y liberar al medio de cultivo más IAA que la planta en las condiciones ensayadas. Existe más cantidad de IAA en el sobrenadante de la interacción bacteria-hospedador que en el de *B. napus* en sistema gnotobiótico (Tukey, p valor <0,01), pero no hay diferencias significativas con respecto a la cantidad de IAA liberada por *P. brassicacearum* CDVBN10 en vida libre. No se detectaron giberelinas ni citoquininas en esta cromatografía.



**Figura 41.** Medidas de ácido indolacético (IAA) liberado al medio por la cepa CDVBN10, por la planta (*B. napus*) y por el sistema *B. napus* + CDVBN10, transcurridos 11 días después de la inoculación. Las letras representan valores significativamente distintos (Tukey, p valor <0,01)

### Transportadores

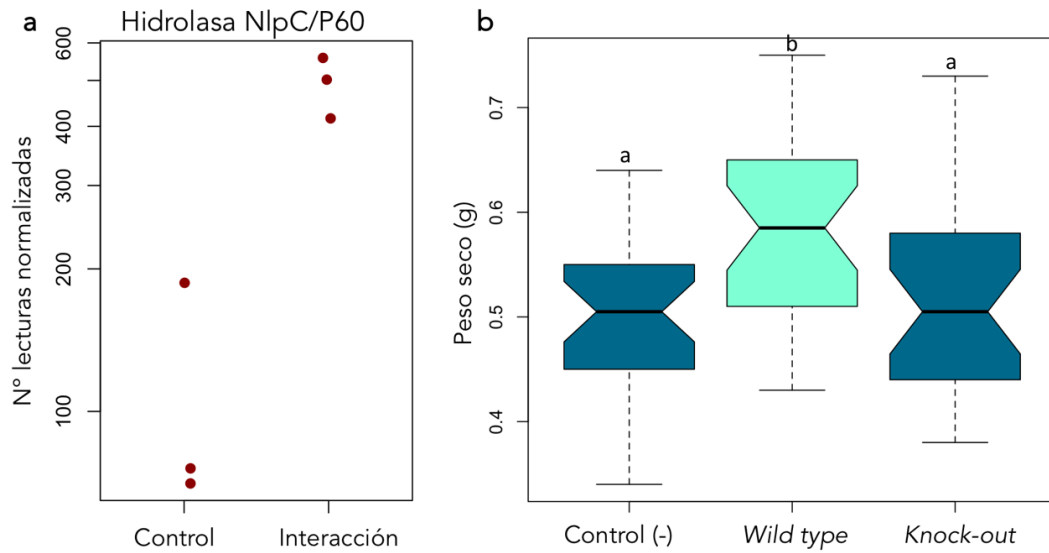
Para que el metaboloma de la bacteria y de la planta interactúen con su contraparte, éste ha de ser excretado al exterior celular. De la misma manera, en muchas ocasiones el organismo contraparte deberá de importar el metaboloma en cuestión a su citosol. En ambos procesos

participan los transportadores de membrana, algunos de los cuales aparecen diferencialmente expresados en la cepa CDVBN10 en su interacción con la planta. Por ejemplo, el operón *araFGH*, implicado en la síntesis de un importador de arabinosa, está infraexpresado ( $-1.7 - -3 \text{ Log}_2\text{FoldChange}$ ;  $1,4 \times 10^{-9} - 7,8 \times 10^{-27} \text{ padj}$ ). También están diferencialmente expresados transportadores de glicerol (unos infra- y otros sobreexpresados), de zinc (*znuABC*; sobreexpresado), canales de importe de espermidina/putrescina (infraexpresados), transportadores de hexurionato (unos infra- y otros sobreexpresados), porinas de la familia OprD, las cuales facilitan la entrada de aminoácidos y algunos antibióticos (unas infra- y otros sobreexpresados) y los genes *yadG* y *yadH*, pertenecientes a un transportador de tipo ABC no caracterizado (sobreexpresado), entre otros muchos.

### **Rol de una cisteíneptidasa de la familia NlpC/P60 en la interacción de *P. brassicacearum* con *B. napus*.**

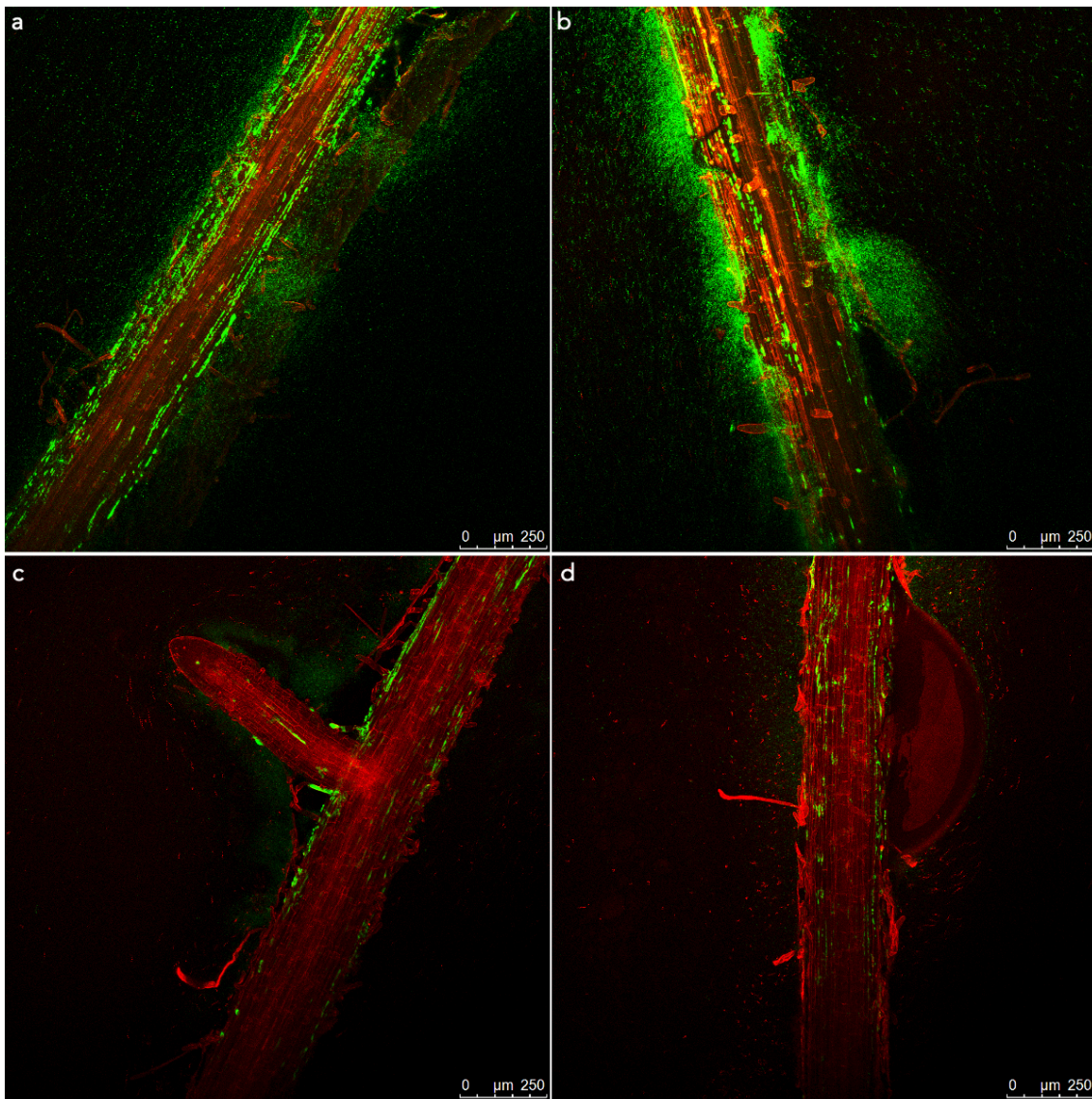
Entre todos los genes diferencialmente expresados aparece un gen sobreexpresado similar al gen *yafL* ( $2,1 \text{ Log}_2\text{FoldChange}$ ;  $9,9 \times 10^{-7} \text{ padj}$ ) (Figura 42a). La anotación de este gen permite averiguar que la enzima codificada es una cisteíneptidasa con un dominio hidrolítico de la familia NlpC/P60 y que, en base a sus características fisicoquímicas y la presencia de un péptido señal, seguramente se localice en la membrana externa celular o sea excretada al exterior celular. Las acciones de las hidrolasas NlpC/P60 son variadas, actuando sobre mureína, pero también sobre otros compuestos. Sin embargo, estas enzimas no están muy bien caracterizadas y, además, las anotaciones y las búsquedas comparativas de esta proteína en bases de datos públicas no permiten conocer con certeza el sustrato de esta enzima, tal vez aún por descubrir. Se ha descrito que la acción de estas enzimas puede tener un papel en la inmunidad del hospedador superior (humanos y nematodos), mediada por los fragmentos liberados tras la hidrólisis, pero no ha sido descrita ninguna función en la interacción bacteria-planta. Debido a esto, se propuso profundizar en el papel de esta enzima hidrolítica en la interacción *P. brassicacearum* CDVBN10 con *B. napus*. Para ello, mediante el sistema CRISPR-Cas9 se realizó un mutante *knock-out* (KO) sobre el gen *yafL* ( $\Delta yafL$ ) y se estudió la influencia de este mutante en la capacidad para promover el crecimiento del cultivo de la planta de colza.

Para ello, se realizó un ensayo de invernadero en el cual se inocularon plantas de colza recién germinadas en suelo vegetal con la cepa *P. brassicacearum* CDVBN10 *wild type* (WT) (n=30),  $\Delta yafL$  (n=30) y con agua estéril como control negativo (n=30). Transcurridos 43 días se evaluó el número de hojas, la longitud de la parte aérea, el contenido en clorofila, el peso húmedo y el peso seco de las plantas. A pesar de no encontrarse diferencias significativas entre el mutante y la cepa WT en el resto de las medidas, sí existen diferencias significativas importantes en cuanto al peso seco de las plantas (Tukey, p valor <0,01) (Figura 42b).



**Figura 42.** **a** Valores de expresión del gen que codifica la hidrolasa de la familia NlpC/P60 en condiciones de vida libre (Control) y en interacción con la planta. **b** Boxplots representando los valores de peso seco de plantas de colza en la interacción con la cepa WT y la cepa *knock-out* ( $\Delta yafL$ ) de *P. brassicacearum* CDVBN10 en comparación con plantas Control (-) (sin inocular bacteria).

Para saber si la disminución de la promoción del crecimiento de colza por parte de la cepa  $\Delta yafL$  era debida a una peor colonización radicular, se realizó un ensayo de colonización con la cepa WT y la cepa  $\Delta yafL$  marcadas con la proteína GFP y visualizando las raíces mediante microscopía confocal. Los resultados de este ensayo indican que el mutante  $\Delta yafL$  sigue siendo capaz de colonizar las raíces de colza tanto a los 11 dpi como a 29 dpi, sin cambios aparentes cualitativos respecto a la colonización de la cepa WT (Figura 43).



**Figura 43.** Imágenes de microscopía confocal sobre raíces de colza inoculadas con *P. brassicacearum* CDVBN10 WT (a, c) y  $\Delta yafL$  (b, d) expresando la proteína verde fluorescente (GFP) a los 11 días (a, b) y a los 29 días (c, d) post inoculación.



## Discusión

Existe mucha bibliografía al respecto de las interacciones acaecidas entre rizobios y plantas leguminosas, un tipo de simbiosis para la cual se han descrito muchos de los mecanismos simbióticos principales (Oldroyd et al. 2011). Sin embargo, en lo referido a otros linajes bacterianos, más allá del efecto que tienen en la promoción del crecimiento de las plantas, no han sido determinados muchos de sus mecanismos de interacción con las plantas. Este es el caso de *P. brassicacearum*, una especie bacteriana asociada a plantas con propiedades beneficiosas para las mismas (Achouak et al., 2000; Zhou et al., 2012; Zachow et al., 2017; Jiménez-Gómez et al., 2020), pero cuyos mecanismos de acción no han sido estudiados en profundidad. Por ello, en el presente capítulo se ha propuesto profundizar en los mecanismos de interacción entre *P. brassicacearum* CDVBN10 (endófito de colza) con su hospedador superior, *B. napus*.

Existen casos en los que la inoculación de una bacteria PGP sobre las plantas puede provocar, de manera directa o indirecta, grandes cambios en la composición de su microbiota, por lo que no sería fácil discernir si los beneficios derivan de los mecanismos moleculares del inoculante o de los mecanismos de otros microorganismos (Gadhavé et al., 2018; Henkes et al., 2018). Además, la modificación de una microbiota adaptada a su hospedador puede implicarle algunos déficits funcionales. Los resultados del estudio de comunidades endofíticas muestran que este no es el caso para la cepa *P. brassicacearum* CDVBN10, cuya inoculación en condiciones de campo no altera las comunidades endofíticas de las raíces de colza.

El estudio del potencial como agente de biocontrol (BCA) de la cepa CDVBN10 reveló que es capaz de producir sustancias biocidas frente al patógeno de colza *L. maculans*, así como de inducir una respuesta sistémica en la planta que le permite resistir al ataque de este hongo. Estos datos realzan el interés y las posibles aplicaciones biotecnológicas y agrícolas de esta cepa, ya no sólo como promotora del crecimiento, sino también como BCA. El ataque de *L. maculans* supone millones de euros anuales de pérdidas en el cultivo de la colza (Howlett et al., 2001; Zhang y Fernando, 2018; Darma et al., 2019; Ma et al., 2019; Urquhart et al., 2019), por lo que la utilización de este inoculante bacteriano podría tener un gran impacto en la economía agrícola mundial.

La prospección genómica de *P. brassicacearum* CDVBN10 detectó algunos BGCs que podrían estar implicados en la inhibición *in vitro* del hongo fitopatógeno, como algunos que sintetizarían NRPs, una bacteriocina, un aminoglucósido y/o un lantipeptido, tipos de moléculas que han sido estudiadas por sus acciones antimicrobianas (Krause et al., 2016; Agrawal et al., 2017; Ahmad et al., 2017, Repka et al., 2017).

Esta es la primera vez que se reporta la capacidad de *P. brassicacearum* para inhibir a *L. maculans* o para proteger al cultivo de colza frente a este hongo. Sin embargo, algunas de las cepas cuyos genomas han sido estudiados en este capítulo han mostrado capacidad de biocontrol. Las cepas PA1G7 y PP1\_210F son capaces de inhibir a la bacteria causante de la podredumbre blanda, *Pectobacterium* spp. (Des Essarts et al., 2016). La cepa TM1A3 tiene capacidad de biocontrol

frente a *Pythium ultimum*, *Phomopsis sclerotioides* y *Rhizoctonia solani* (Ramette et al., 2003). Las cepas Wood3, 36B7, 36D4, 93F8, Wood1, Delaware, 37D10, 48H11, 38D7 y 38D4 son capaces de antagonizar a *Phytophthora cryptogea* (Martin, 2017). DF41 es capaz de controlar al patógeno fúngico *Sclerotinia sclerotiorum* (Savchuk y Dilantha-Fernando, 2004). LBUM300 muestra actividad antagonica frente a los fitopatógenos *Verticillium dahliae*, *Phytophthora cactorum*, y *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Novinscak et al., 2016). Y, finalmente, la cepa L13-6-12 es capaz de inhibir a los microorganismos *R. solani*, *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Penicillium italicum*, *P. betae*, *S. sclerotiorum*, *V. dahliae* y *S. rolfsii* (Zachow et al., 2017). Además, otras cepas de *P. brassicacearum* cuyos genomas aún no han sido secuenciados y que, por tanto, no han sido incluidos en el trabajo, también han demostrado potencial antimicrobiano (Chung et al., 2008; Levenfors et al., 2008; Holmberg et al., 2009; Zhou et al., 2012). Teniendo todo esto en cuenta, *P. brassicacearum* se erige como una especie bacteriana con gran interés para su estudio como BCA.

En muchos casos se ha estudiado con mayor profundidad la respuesta de las plantas a la presencia de la bacteria que los efectos que tienen las plantas sobre las bacterias. Por ello, en esta tesis se realizó un estudio de RNA-Seq comparativo de la expresión génica de esta bacteria en vida libre y asociada a raíces de colza, con el fin de estudiar la respuesta de la bacteria a la presencia de la planta. Uno de los principales inconvenientes en este tipo de estudios es la dificultad para conseguir suficiente mRNA de calidad de la bacteria en su interacción, ya que muchas veces el RNA de la planta sobrepasa al de las bacterias y, gran parte del RNA bacteriano, resulta ser ribosomal en muchas ocasiones Levy et al. (2018a). Debido a esto, casi no existen casos de estudios transcripcionales de bacterias en interacción con plantas. En este sentido, entre los pocos trabajos existentes, Paungfoo-Lonhienne et al. (2016) solo consiguen mapear un 5,7% de las lecturas de la bacteria (*Burkholderia* spp.) a su genoma a través de transcritos bacterianos obtenidos de las raíces de caña de azúcar. Pankievicz et al. (2016) sólo consiguen un 12-15% de lecturas de *Herbaspirillum seropedicae* colonizando raíces de trigo, de las cuales menos del 10% pertenecen a CDSs, y Balsanelli et al. (2015) mapean un 50% de las lecturas (una vez eliminadas todas las ribosómicas) a CDSs en un experimento con una cepa de esta última especie sobre raíces de maíz. Mientras que Nobori et al. (2018) consiguen que, en torno a un 20% de las lecturas totales de su estudio, provengan de *P. syringae* en hojas de *Arabidopsis thaliana*. En comparación con estos datos, la cantidad de lecturas de *P. brassicacearum* obtenidas mediante el método descrito en este trabajo (en torno al 93% de las lecturas) son significativamente mejores a los obtenidos con métodos empleados en otros estudios.

Las acciones de biocontrol de la cepa *P. brassicacearum* CDVBN10 pueden ser, en parte, responsables de la promoción del cultivo de colza. Es posible que la inducción de respuesta sistémica en este cultivo sea debido a la producción de LPS y EF-Tu, cuyos genes aparecen sobreexpresados en la interacción con la planta. EF-Tu elicit la respuesta inmune de las plantas, mejorando de esta manera la resistencia a estreses bióticos y abióticos (Kunze et al., 2004; Fu et al., 2012 Schoonbeek et al., 2015). EF-Ts, también sobreexpresada, es una proteína necesaria para que EF-Tu recupere su estado activo mediante el intercambio de GDP y GTP (Weijland y

Parmeggiani, 1994), lo cual haría aumentar todavía más los niveles de EF-Tu. Los LPSs también son potentes elicitores de la inmunidad de las plantas (Rapicavoli et al., 2018). Sin embargo, los genes relacionados con la síntesis del antígeno O, componente del LPS, casi no tienen expresión. Algunos estudios han mostrado que *P. fluorescens* pierde su capacidad para colonizar las plantas tomate cuando no produce este antígeno (Dujiff et al., 2017; Dekkers et al., 1998). No obstante, los resultados presentados muestran que *P. brassicacearum* CDVBN10 es capaz de persistir formando *biofilm* sobre las raíces de *B. napus* a pesar de la baja expresión de este antígeno. En contraposición, la baja expresión de flagelina bacteriana y de la enzima responsable de la síntesis de acetoina pueden compensar la ISR, de manera que la respuesta de la planta no llegue a ser perjudicial para *P. brassicacearum* CDVBN10. Al igual que en este caso, Pankievicz y colaboradores (2016) también reportan que *Herbaspirillum seropedicae* tiene genes relativos a la síntesis de flagelos infraexpresados durante la formación de *biofilm* en raíces de trigo.

A parte de los efectos ya comentados sobre MAMPs de la bacteria, los datos obtenidos tras el análisis del RNA-Seq han revelado mucha más información sobre la interacción bacteria-hospedador de *P. brassicacearum* CDVBN10 durante la formación de *biofilm* en las raíces de colza. Este tipo de estructuras a veces se caracteriza por condiciones de hipoxia en las que la matriz extracelular bacteriana disminuye el flujo de oxígeno (Paungfoo-Lonhienne et al., 2016; Schiessl et al., 2019). Sin embargo, en el transcriptoma bacteriano obtenido se observa una sobreexpresión de rutas respiratorias dependientes de oxígeno, lo cual indica que las células bacterianas siguen recibiendo gran cantidad de oxígeno. El operón *cyoABCD* (citocromo o oxidasa) aparece sobreexpresado. Cotter et al. (1990) vieron que este solo se expresa en condiciones de altas concentraciones de oxígeno. Sin embargo, Lunak y Noel (2015a) vieron que esta enzima es esencial para la adaptación y crecimiento de *Rhizobium etli* CFN42 a bajas concentraciones de oxígeno en su simbiosis con *Phaseolus vulgaris*, describiendo posteriormente que este operón se sobreexpresa en esas condiciones microaerófilas así como a pH bajos (Lunak y Noel, 2015b). Al igual que en el presente trabajo, los resultados de Paungfoo-Lonhienne et al. (2016) indican cómo una cepa de *Burkholderia* también sobreexpresa los citocromos en la rizosfera de la caña de azúcar. La infraexpresión de los genes *norBC* también confirma que la bacteria no está llevando a cabo la respiración anaeróbica de la desnitrificación (Shiro, 2012). La respiración oxigénica en CDVBN10 parece continuar con una eficiente utilización de la glucosa a través del ciclo de Krebs. Los genes sobreexpresados de estas rutas y de otras también relacionadas con el metabolismo energético indican que las raíces de colza suponen un entorno favorable para esta bacteria, en el que la disponibilidad de nutrientes le permite obtener grandes niveles de energía para llevar a cabo sus procesos metabólicos. De hecho, aparecen infraexpresados otros genes relacionados con la respuesta a situaciones de baja disponibilidad de nutrientes, como los implicados en el metabolismo de PHAs o el gen *cstA* (Schultz et al., 1991, Dubey et al., 2003; Pavez et al., 2009).

De acuerdo con estos resultados, los datos de RNA-Seq indican que *P. brassicacearum* CDVBN10 puede utilizar diversas fuentes de carbono y otros nutrientes de las raíces o de los exudados radicales. Aparecen CAZys sobreexpresadas relacionadas con la utilización de polisacáridos

complejos como la celulosa, lo cual puede resultar útil para la bacteria, no sólo en cuanto a su nutrición, sino también para generar vías de entrada al interior de las raíces (Carro y Menéndez, 2020). En cuanto a la utilización de otros nutrientes, se han encontrado diversos transportadores de membrana diferencialmente expresados que pueden dar pistas sobre los metabolitos de la planta utilizados o no utilizados por esta bacteria. Entre ellos, el operón *araFGH*, implicado en la síntesis de un importador de arabinosa, está infraexpresado en la interacción. García-Fraile y colaboradores (2015b) vieron que la utilización de este nutriente favorece a la colonización rizosférica de *Rhizobium leguminosarum* en *Pisum sativum*. Sin embargo, los resultados mostrados sugieren que *P. brassicacearum* no necesita importar arabinosa al interior celular para mantenerse de forma eficaz en las raíces de colza.

Existen mecanismos de quimiotaxis a través de los cuales las bacterias son capaces de dirigirse hacia las raíces de sus plantas hospedadoras y realizar una colonización efectiva. Para percibir estas señales, las bacterias han de tener receptores específicos, como las MCP. Estudios previos han mostrado que esta proteína está sobreexpresada en *Herbaspirillum seropedicae* durante la colonización radicular de trigo y de maíz (Balsanelli et al., 2015; Pankiewicz et al., 2016). En el trabajo de este capítulo, el transcriptoma de la cepa CDVBN10 se ha obtenido de células que ya se han instaurado en las raíces, por lo que la infraexpresión de las MCPs de esta bacteria nos indica que, en esta situación, no precisa de alguna de estas señales de quimiotaxis para mantenerse adherida. Sin embargo, los datos revelan que sí que hay mecanismos de *quorum sensing* activos y sobreexpresados que pueden intervenir en la comunicación intercelular bacteriana y en el mantenimiento del *biofilm*.

Una vez que la cepa CDVBN10 está instaurada en las raíces puede proporcionar nutrientes y hormonas a la planta. En este sentido, destaca la sobreexpresión de rutas metabólicas relacionadas con la producción de ácido salicílico y putrescina, o la solubilización y transporte de fosfato y potasio. Estos dos últimos casos son mecanismos muy conocidos de promoción de crecimiento vegetal por parte de bacterias probióticas de plantas (Menéndez y García-Fraile et al., 2017). El ácido salicílico interviene en procesos como la respuesta a estreses abióticos, la germinación de semillas, expresión de genes asociados a senescencia, así como en la resistencia a enfermedades (Catinot et al., 2008; Vlot et al., 2009; Lee et al., 2010). También se ha descrito cómo puede intervenir en la homeostasis de otras hormonas vegetales, como el ácido jasmónico, el etileno, y las auxinas (Westfall et al., 2016; Li et al., 2019). Los ensayos realizados *in vitro* confirman que esta bacteria es capaz de producir IAA y que se produce y libera más cantidad en las raíces de colza cuando se inocula esta bacteria que en condiciones gnotobióticas. Sin embargo, con los datos existentes no se puede asegurar que el origen de este incremento provenga del metabolismo bacteriano, ya que también es posible que la producción de esta hormona por la planta incremente como consecuencia de la interacción microbiana.

Por otro lado, en el transcriptoma bacteriano de la cepa CDVBN10 aparecen sobreexpresadas dos enzimas implicadas en la síntesis de putrescina, ambas mediadas por la arginina, así como otras enzimas previas en la ruta de la biosíntesis de este aminoácido. Estos datos indican que se está

utilizando la ornitina para sintetizar más arginina, la cual se degrada hacia putrescina a través de la vía de la agmatina. Los posibles mecanismos de degradación de la putrescina hacia otras poliaminas (espermidina, espermina) o hacia GABA no están muy activadas. Esto indica que *P. brassicacearum* CDVBN10 puede estar realizando una síntesis elevada de putrescina en las raíces de colza. Además, hay proteínas de importe de putrescina y otras poliaminas cuyos genes están infraexpresados. Esto puede ser debido a que concentraciones superiores a las que sintetice la bacteria ejerzan un efecto bacteriostático, según se demostró previamente con *Pseudomonas* spp. colonizando raíces de tomate (Kuiper et al., 2001). Las poliaminas intervienen en el crecimiento bacteriano, la biosíntesis de sideróforos, de componentes de la pared celular bacteriana, en la formación del *biofilm* en *Pseudomonas* y otras bacterias (Wortham et al., 2007; Liu et al., 2018; Melnyk et al., 2019). Además, la putrescina puede interferir con la planta y/o el entorno de la interacción a través de distintas vías: es capaz de modular la entrada de metales pesados en las células vegetales (Soudek et al., 2016), puede alcalinizar el entorno, modificar la absorción de cadmio por la planta, actuar como agente anti-senescente, etc. (Han et al., 2018). También, debido a la presencia de grupos amino terminales, puede unirse a moléculas aniónicas y provocar cambios en sus funciones (Mattoo et al., 2015). De esta manera llegan a tener un papel en la regulación post-transcripcional de los genes (Mattoo et al., 2015). Se ha demostrado que los niveles de poliaminas en las plantas son elevados en respuesta a situaciones de estrés abiótico (sequía, salinidad, hipoxia, ozono, radiación UV, heridas, herbicidas, etc) y, por otro lado, también durante los procesos de división celular vegetal, aunque estos niveles bajan durante la expansión y elongación de estas células, lo cual puede interferir en la morfología de los pelos radiculares (Mattoo et al., 2015). De hecho, la expresión de los genes *rol* (*hairy root*) afecta al metabolismo de poliaminas en plantas a la vez que genera una mayor ramificación de las raíces (Mattoo et al., 2015). En general, se ha reportado una acumulación de poliaminas en respuesta a muchos estreses abióticos. Incluso, en el caso concreto de las plantas de colza, se ha visto que la aplicación de putrescina exógena sobre sus raíces mejora el potencial de fitoremediación de suelos contaminados con nickel, que su aplicación puede estimular la germinación de las semillas y que al interaccionar con las hojas aumenta el contenido de clorofila (Shevyakova et al., 2011). En lo referente a *Pseudomonas* y su interacción con las plantas, se ha visto que la putrescina podría tener un papel en la inducción del sistema inmune cuando la bacteria es inoculada en las raíces de *A. thaliana*, puesto que mutantes de *P. fluorescens* sin un gen que sintetiza una enzima responsable de la degradación de putrescina dan lugar a respuestas de defensa de la planta (Liu et al., 2018). Debido a todo lo anteriormente expuesto, junto con los datos de sobreexpresión, la putrescina puede estar jugando un papel importante en la interacción de *P. brassicacearum* CDVBN10 con las plantas de colza. De hecho, algunos estudios aún no publicados realizados en nuestro grupo de investigación sugieren que la delección de una de las dos vías sobreexpresadas de síntesis de putrescina (N-carbamoylputrescina amidasa) en *P. brassicacearum* CDVBN10 provoca una menor promoción del crecimiento de *B. napus* cuando se inocula la bacteria en condiciones de invernadero, así como cambios en la morfología de los pelos radiculares.

Entre los DEGs encontrados también aparecen genes que pueden estar jugando un papel en la protección de la bacteria frente a las defensas de la planta, como aquellos implicados en la

resistencia a antimicrobianos o a especies reactivas de oxígeno. Sin embargo, no existe mucha investigación sobre estos mecanismos en las interacciones *Pseudomonas*-planta, por lo que el estudio de estos genes puede ayudar a comprender con mayor profundidad este aspecto de las interacciones microbianas. En lo relativo a la defensa y competición de la cepa CDVBN10, además de la sobreexpresión de los metabolitos secundarios bacterianos ya comentados, esta bacteria también podría estar regulando positivamente de manera postranscripcional (a través de la depleción de RsmA) (Kulkarni et al., 2014) la producción de sistemas de secreción de tipo VI, los cuales son empleados para inyectar toxinas a otros microorganismos (Smith et al., 2020). Sin embargo, también es posible que esta bacteria sea capaz de interactuar con las células vegetales a través de estos sistemas, algo que debería estudiarse con mayor profundidad para esclarecer las funciones que estos sistemas de secreción tienen en la interacción planta-bacteria.

Finalmente, aparece sobreexpresado un gen similar al *yafL*, cuyas anotaciones indican que está relacionado con la síntesis de una cisteínpeptidasa perteneciente a la familia NlpC/P60. Esta familia de enzimas realiza reacciones hidrolíticas muy variadas, pudiendo ser peptidasas, amidasas, transglutaminasas y acetiltransferasas (Xu et al., 2011b). Puesto que las anotaciones sugieren que la localización de esta proteína podría ser en la membrana exterior de la bacteria, es posible que su sustrato sea algún componente mureínico. Se ha demostrado que la inoculación en plantas de peptidoglucanos o muropéptidos, que son pequeños fragmentos del peptidoglucano, activa las respuestas de defensa (Pel y Pieterse, 2013). También se ha reportado que la presencia de esta enzima en *Enterococcus faecalis* y en *Salmonella* sp. puede dar lugar a una activación del sistema inmune en seres humanos (Kim et al., 2019) y en *Caenorhabditis elegans* (Rangan et al., 2016), respectivamente. Sin embargo, no ha sido descrito ningún papel de esta enzima en las interacciones planta-microorganismo. La delección del gen *yafL* y la inoculación del mutante KO sobre plantas de colza revelan que la falta de esta enzima provoca una menor promoción del crecimiento vegetal por parte de *P. brassicacearum* CDVBN10 a la vez que mantiene su capacidad de colonizar las raíces de la colza. Las diferencias en la promoción del crecimiento han sido encontradas tras evaluar el peso seco de las plantas, pero no en el peso húmedo, lo cual indica que las plantas inoculadas con  $\Delta yafL$  habrán activado mecanismos para acumular más agua en sus tejidos. De esta manera, en esta tesis se reporta por primera vez la asociación entre una hidrolasa de la familia NlpC/P60 y las interacciones planta-microorganismo. Sin embargo, para poder conocer con certeza las implicaciones de la actividad de esta proteína, deberá ser purificada y cristalizada para conocer su estructura terciaria, así como para poder estudiar con certeza su sustrato biológico.

En general, en este capítulo se ha conseguido profundizar en los mecanismos de interacción existentes entre *P. brassicacearum* CDVBN10 y *B. napus*. Se ha encontrado por primera vez que *P. brassicacearum* es capaz de ejercer funciones de biocontrol frente a *L. maculans*, lo cual postula a la cepa CDVBN10 como un prometedor BCA. También se ha demostrado que su inoculación sobre el cultivo de colza no altera las comunidades bacterianas endofíticas de las raíces. Finalmente se han encontrado multitud de mecanismos diferencialmente expresados que pueden interferir en la interacción *Pseudomonas*-planta, incluyendo aproximaciones genéticas

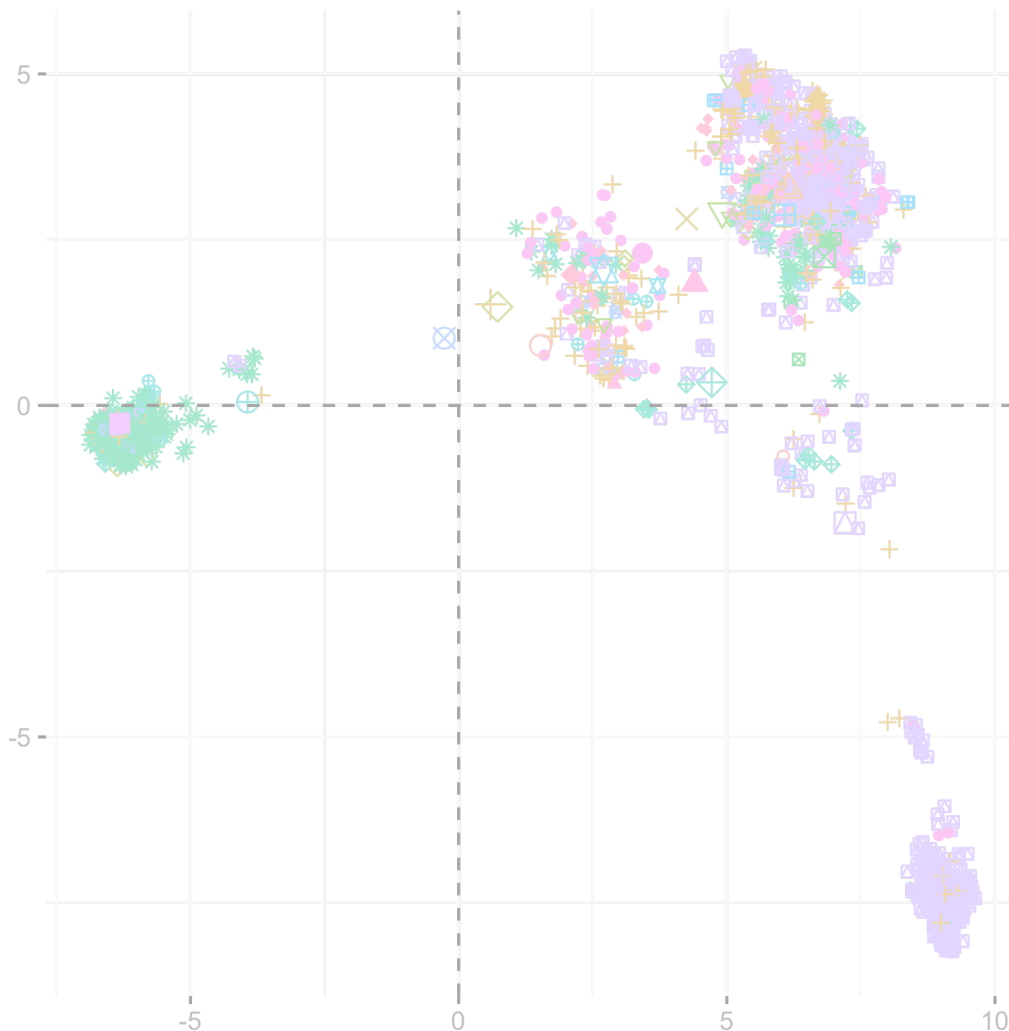
que asocian a la hidrolasa NlpC/P60 con una función beneficiosa en este sentido. Sin embargo, muchos de los DEGs detectados codifican proteínas hipotéticas, proteínas cuyas funciones no están muy descritas o son genes cuyas implicaciones en las interacciones planta-microorganismo no han sido aún dilucidadas. Por lo tanto, estos datos pueden servir de base para descubrir nuevas funciones del microbioma de las plantas mediante técnicas genéticas (deleciones, modificaciones, sobreexpresiones, etc.) (Leyv et al., 2018a).



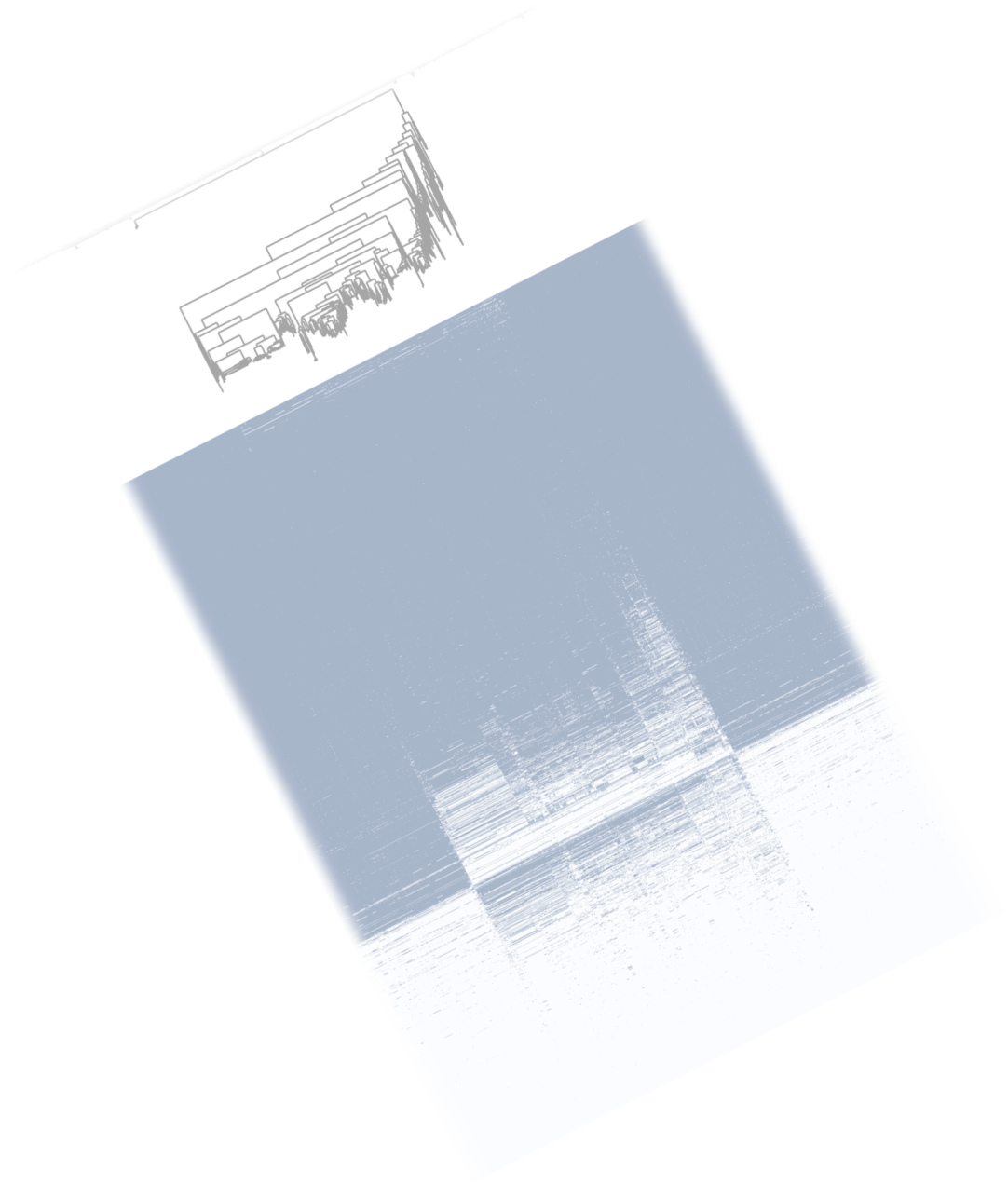


# Capítulo IV

*Genómica comparativa del género *Pseudomonas* para el estudio de asociaciones funcionales a nichos u hospedadores.*







# *Introducción*



## ***Introducción***

### **Evolución y adaptación de bacterias a nichos u hospedadores**

En 1859, un hombre cambió la visión de la vida en la Tierra: Charles Robert Darwin publicó sus teorías en la obra *El origen de las especies*. Desde este momento, sus ideas, junto con el concepto de la supervivencia “del más apto” de H. Spencer, han inspirado investigaciones básicas y aplicadas en el estudio de enfermedades infecciosas, el estudio del cáncer, y de la ecología microbiana, entre otras muchas áreas (Hellman, 1997; Penn et al., 2003; Alizon y Méthot, 2018). Según estas teorías evolutivas y aquellas posteriores a las que han dado lugar, un organismo que haya adquirido alguna función que le proporcione una ventaja en la supervivencia tendrá más oportunidades de tener una descendencia, a la cual le transferirá su material genético; de esta manera, sus descendientes también tendrán una mayor adaptabilidad al entorno (Kraemer y Boynton, 2017; Baquero et al., 2021).

Las bacterias no suponen una excepción sobre estas ideas. Para conseguir sobrevivir y proliferar en los distintos ambientes de la Tierra han tenido que sufrir procesos evolutivos dirigidos a la adaptación a estos hábitats (Kraemer y Boynton, 2017; Sheppard et al., 2018; Baquero et al., 2021). Cada pequeño ambiente, terrestre o acuático, incluyendo cada tejido de cada hospedador superior, tiene unas características propias, lo cual hace que tenga una microbiota específica o especializada. Distintos miembros de la misma especie bacteriana, o de especies cercanas, son capaces de habitar en distintos nichos biológicos, algo posible gracias a estos procesos de adaptación (Baquero et al., 2021; Desmond, 2021; Houwenhuysse et al., 2021).

La evolución genética de las bacterias tiene dos motores principales: (I) los errores de replicación en el ADN, los cuales pueden generar mutaciones puntuales, deleciones, o reorganizaciones génicas de muchos tamaños; y (II) los eventos de transferencia horizontal de genes (HGTs), en los cuales el material genético de una fuente externa, como por ejemplo, otra cepa bacteriana, es incorporado en el cromosoma por recombinación homóloga (si se sustituye una región de ADN por otra similar) o no homóloga (si se inserta una región completamente nueva de ADN) (Didelot et al., 2012; Sheppard et al., 2018). Gracias a estos procesos distintas cepas bacterianas con un ancestro común pueden diversificarse según su micro-hábitat (Sheppard et al., 2018).

Como se ha comentado anteriormente, las condiciones de un determinado ambiente son únicas. Entre estas, pueden existir diversos factores que, en principio, serían adversos para la supervivencia bacteriana, como la presencia de altas concentraciones de antibióticos, o de estreses abióticos como las altas temperaturas y la presencia de metales pesados (Cornforth et al., 2013; Sheppard et al., 2018; Ritter et al., 2020). Para poder adaptarse a estas condiciones, las bacterias adquieren o desarrollan mecanismos de resistencia a esas condiciones (Zhu et al., 2014; Sheppard et al., 2018; Chaudhry y Patil, 2020). Debido a esto, el estudio del enriquecimiento de genes de resistencias en bacterias de un determinado ambiente puede ser de gran utilidad para entender la ecología microbiana subyacente a la adaptación a ese nicho.

A pesar de lo expuesto en el apartado anterior, la adaptación bacteriana a un nicho no se lleva a cabo exclusivamente para sobrevivir a condiciones adversas, sino que también se intentan aprovechar al máximo los recursos químicos y energéticos del entorno. De esta manera, el metabolismo bacteriano acabará adaptándose a la composición química del lugar. Por ejemplo, si un determinado ambiente tiene gran cantidad de carbohidratos complejos, las bacterias que allí habiten necesitarán disponer de una maquinaria enzimática capaz de metabolizarlos, como por ejemplo las enzimas CAZy (*Carbohydrate Active EnZymes*) (Cantarel et al., 2009). Otro caso puede ser el exceso o defecto de un determinado elemento químico (metales pesados, sales, oligoelementos, etc.), en cuyo caso la bacteria deberá adaptarse para regular sus concentraciones en el interior celular (Chandrangsu et al., 2017). En definitiva, la maquinaria genética evolucionará a través de la ganancia de genes necesarios para aprovechar al máximo los recursos energéticos y químicos de su hábitat o a través de la pérdida de aquellos innecesarios para su supervivencia, lo cual quedará reflejado en el enriquecimiento de algunas categorías o rutas metabólicas (Levy et al., 2018b; Chen et al., 2021).

En ciertas ocasiones, para poder interactuar de una forma más eficiente con su entorno, ciertas proteínas o enzimas han de ser excretadas o localizadas en la parte externa de la pared bacteriana para llevar a cabo su función en el exterior celular. Por ejemplo, se ha visto que algunas bacterias simbiotas de plantas localizan en la membrana externa una enzima con actividad celulítica para romper ciertas estructuras celulares de los pelos radicales y poder así generar un espacio de entrada para la bacteria a los tejidos internos de la planta (Robledo et al., 2008; Menéndez et al., 2019). Normalmente, la vía general de secreción (Sec) y la vía Tat (twin-arginine translocation) son las encargadas de llevar a cabo el proceso de excretar o translocar una proteína en bacterias (Armenteros et al., 2019). La manera que tienen estos sistemas de identificar a una proteína para que sea translocada o excretada es detectando un pequeño péptido señal en un extremo de la proteína (Armenteros et al., 2019).

### **Genómica comparativa en el estudio de la ecología microbiana**

Las recientes técnicas de secuenciación masiva (NGS) han permitido secuenciar los genomas de millones de bacterias aisladas de distintos nichos ecológicos. Este incremento en la disponibilidad de datos ha permitido la realización de múltiples estudios de genómica comparativa entre bacterias de linajes cercanos o distantes, aisladas de distintos nichos (Levy et al., 2018b; Zhang et al., 2020; Chen et al., 2021). Mediante estas comparaciones se puede averiguar si algunos genes, funciones o incluso rutas metabólicas están más enriquecidas en las bacterias asociadas a un determinado ambiente que en otras. De esta manera, se podrán descubrir genes implicados en las interacciones bacteria-hospedador y/o en la adaptación a los distintos ambientes.

Esta metodología ha sido llevada a cabo para intentar asociar variaciones genéticas o genes con distintos grados de virulencia bacteriana (Gu et al., 2020; Wagner et al., 2020), con distintas resistencias a antimicrobianos (Boolchandani et al., 2019;), con un posible rol de las interacciones

bacteria-planta (Levy et al., 2018b) y con múltiples eventos de especialización a nichos biológicos (Lee et al., 2017; Zhang et al., 2020; Chen et al., 2021).

Para llevar a cabo estas comparaciones, los distintos genes han de ser agrupados por similitud o por sus anotaciones funcionales. Tras la creación de estos grupos, han de generarse matrices de presencia/ausencia de genes o funciones en los distintos genomas del estudio, las cuales servirán de base para la realización de múltiples procesos estadísticos de asociación entre esta presencia/ausencia y un determinado fenotipo o metadato. Muchos programas bioinformáticos han sido desarrollados para la consecución del primer paso, entre los que destacan Proteinortho (Lechner et al., 2011), Roary (Page et al., 2015) y GET\_HOMOLOGUES (Contreras-Moreira y Vinuesa, 2013). Recientemente, se ha publicado un nuevo programa, PPanGGOLiN (*Partitioned PanGenome Graph Of Linked Neighbors*) (Gautreau et al., 2020), el cual realiza una agrupación de proteínas homólogas ultra-rápida gracias a la implementación del algoritmo MMseqs2 (Steinegger y Söding, 2017) en su flujo de trabajo. Además, en base a gráficas de conectividad entre nodos y teniendo en cuenta múltiples factores, clasifica de manera novedosa y robusta los distintos genes en distintas categorías según su abundancia en el pangenoma de estudio (genes *core* -presentes en todos los genomas-, *shell* -presentes en una frecuencia intermedia entre los genomas-, accesorios -presentes sólo en unos pocos genomas-, etc.). Sin embargo, tras este proceso, aún quedarían por realizar las comparaciones múltiples, para lo cual hay que llevar a cabo múltiples análisis estadísticos. Brynildsrud y colaboradores (2016) desarrollaron el programa SCOARY, el cual es capaz de realizar todos estos procesos de una manera rápida y eficaz para evaluar el agrado de asociación entre la presencia/ausencia de genes o funciones y los distintos fenotipos o metadatos.

#### **Ubicuidad de *Pseudomonas*. Distintos estilos de vida.**

Las bacterias del género *Pseudomonas*, al igual que otras muchas Proteobacterias, se han adaptado a condiciones muy diversas. Miembros de este género se han encontrados asociados a diversas plantas (Garrido-Sanz et al., 2017; Rieusset et al., 2020; Jiménez-Gómez et al., 2020), mamíferos (Falodun y Musa, 2020), reptiles (Brockmann et al., 2020; Martins et al., 2020), insectos (Vodovar et al., 2006; Menéndez et al., 2015; Saati-Santamaría et al., 2018;), nematodos (Dirksen et al., 2016), seres humanos (Sawa et al., 2020), ríos (Mulet et al., 2020), mares (Sun et al., 2018), desiertos (Campos et al., 2010), ambientes antrópicos (Afshinnekoo et al., 2015; Zolfo et al., 2015), entre otros muchos.

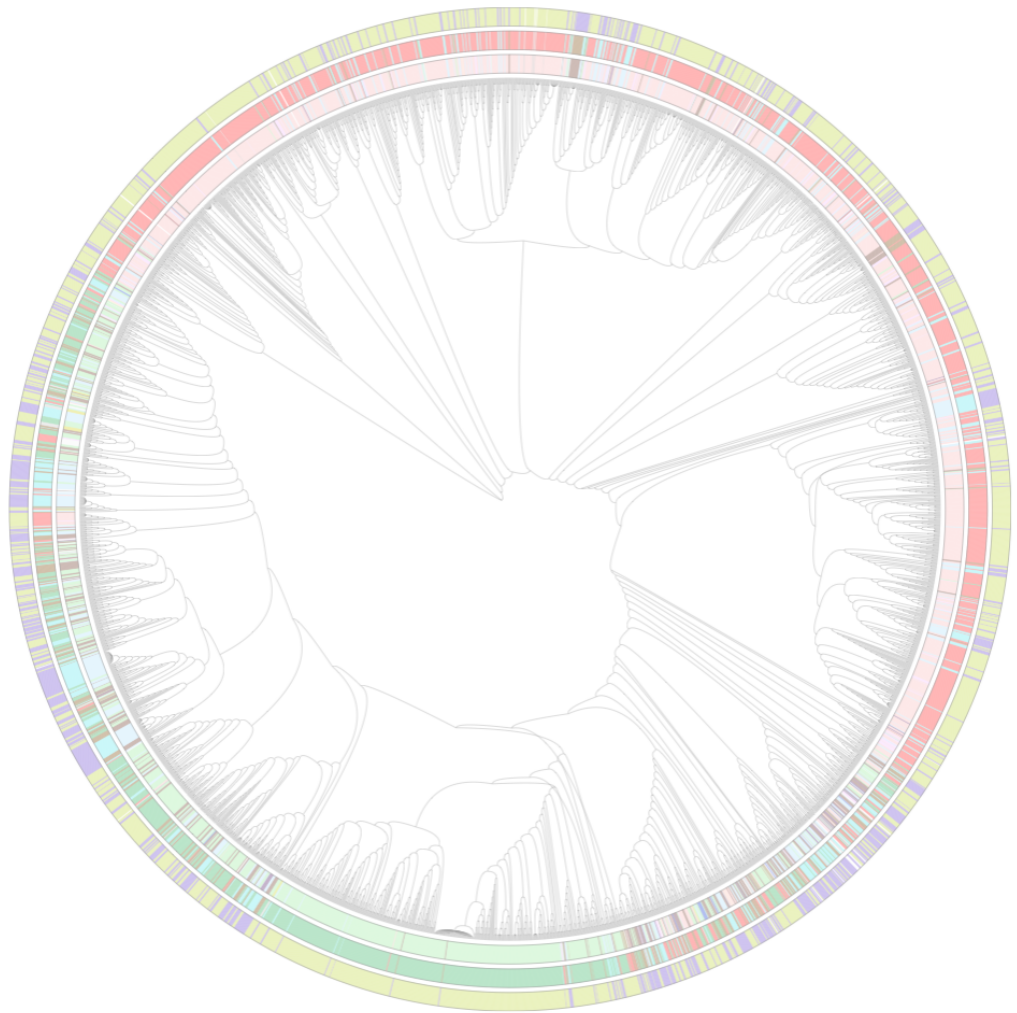
Dentro de cada uno de sus nichos biológicos, las *Pseudomonas* juegan papeles muy importantes, interviniendo en los ciclos del carbono, nitrógeno y azufre (Guo et al., 2015; Zhan et al., 2016; Nogales et al., 2020). Son capaces de degradar gran cantidad de moléculas presentes en suelos y aguas, incluyendo compuestos contaminantes como algunos componentes del petróleo (Varjani y Upasani). En los casos en los que la *Pseudomonas* aparecen asociadas a hospedadores superiores, se ha visto que pueden actuar como agentes beneficiosos para estos organismos,

pero también como agentes patógenos. Dentro de este último caso, destacan especies patógenas de seres humanos (*P. aeruginosa*), de plantas (*P. syringae*) y de insectos (*P. entomophila*), para las cuales se han estudiado algunos de los principales mecanismos de virulencia, muchas veces mediados por distintos sistemas de secreción (Lombardi et al., 2019; Chien et al., 2020; Nonaka et al., 2020). En cuanto a los efectos beneficiosos, muchos se basan en la protección de su holobionte frente a patógenos o en la degradación de nutrientes complejos para convertirlos en moléculas biodisponibles para el hospedador (Roquigny et al., 2015; Saati-Santamaría et al., 2021).

Sin embargo, aún quedan muchísimas funciones por descubrir de estas bacterias en sus hábitats. Cada hallazgo en esta línea puede ser de gran importancia, no solo porque permitirá entender mejor las interacciones bacteria-hospedador o bacteria-ambiente, sino porque permitirá inspirar aplicaciones biotecnológicas, medioambientales o clínicas.

Debido a esto, en este capítulo se pretende realizar un proceso de genómica comparativa entre genomas de *Pseudomonas* aisladas de distintos nichos u hospedadores, con el objetivo de encontrar genes, funciones o rutas metabólicas asociadas a cada distinto estilo de vida.





# *Resultados y discusión*



## Resultados

### Colección de genomas

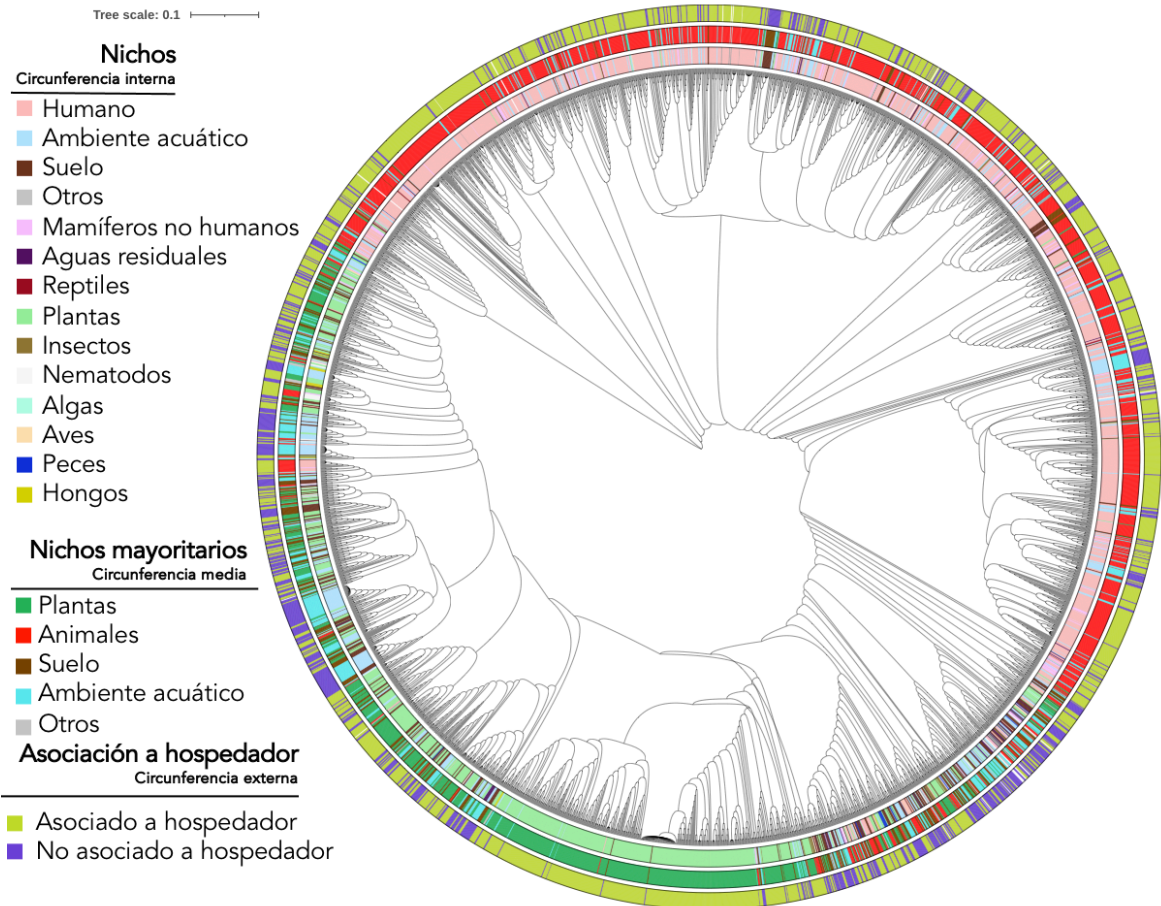
La base de datos de este trabajo fue conformada con genomas descargados de diversas bases de datos públicas (originalmente 11.167 genomas), de los cuales sólo fueron analizados aquellos con una calidad y fiabilidad suficiente; en total, 3.274 genomas de calidad pertenecientes a bacterias del género *Pseudomonas* conformaron la base de datos de este trabajo. Estos genomas pertenecen a bacterias aisladas de diversos nichos u hospedadores que fueron clasificados de acuerdo con lo reflejado en la Tabla 15. La alta cantidad y variabilidad de genomas de esta colección en comparación con las de otros trabajos de genómica comparativa aportará un valor añadido a este estudio.

Tabla 15. Organización de grupos de genomas para el estudio de genómica comparativa

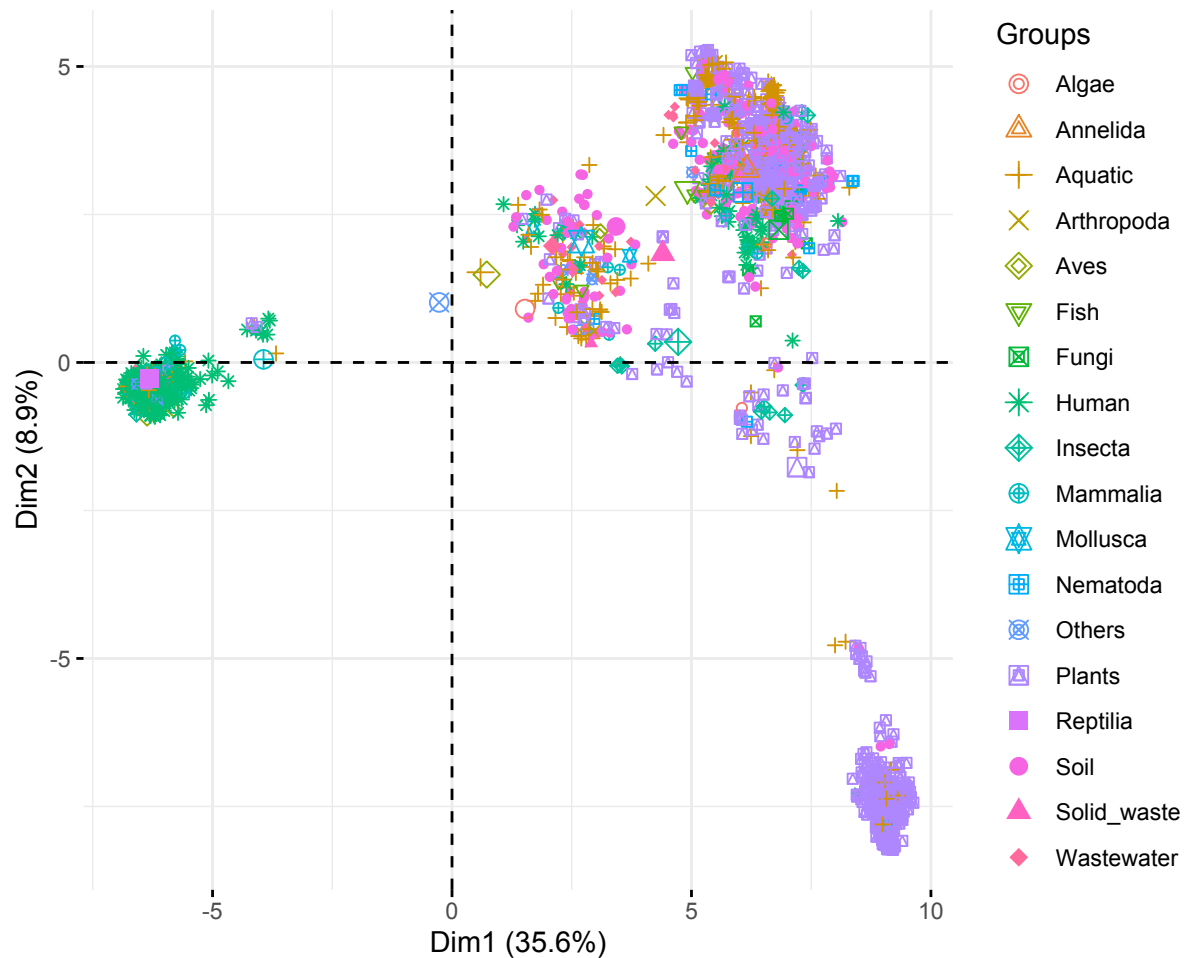
Nicho / hospedador (n° de genomas)	Clasificación superior 1	Clasificación superior 2
Algas (6)	-	Asociado a hospedador
Anélidos (1)	Animal	Asociado a hospedador
Ambiente acuático (533)	-	No asociado a hospedador
Artrópodos (2)	Animal	Asociado a hospedador
Aves (8)	Animal	Asociado a hospedador
Peces (14)	Animal	Asociado a hospedador
Hongos (12)	-	Asociado a hospedador
Humanos (1.300)	Animal	Asociado a hospedador
Insectos (19)	Animal	Asociado a hospedador
Mamíferos no humanos (119)	Animal	Asociado a hospedador
Moluscos (2)	Animal	Asociado a hospedador
Nematodos (29)	Animal	Asociado a hospedador
Plantas (833)	-	Asociado a hospedador
Reptiles (5)	Animal	Asociado a hospedador
Suelo (323)	-	No asociado a hospedador
Aguas residuales (51)	-	No asociado a hospedador
Otros*(17)	-	-

\*El grupo "Otros" fue creado con genomas de bacterias aisladas de ambientes humanos, como por ejemplo grifos, muebles, basura, etc. Se consideró que estas bacterias no reunían requisitos para ser asignados de forma fiable a ningún nicho u hospedador, ya que podrían tener orígenes tanto ambientales como humanos. Debido a esto, se decidió utilizarlos para aumentar el número de genomas a comparar y hacer que las comparaciones estadísticas fuesen más robustas, pero no se utilizaron como un grupo en sí mismo en los análisis posteriores.

Los genomas de *Pseudomonas* asociados a humanos y a plantas componen dos de los grupos más diferenciados del resto de genomas, tanto filogenéticamente (Figura 44), como funcionalmente (Figura 45). En contraposición, el resto de los genomas, bien sean asociados a hospedador o no, aparecen distribuidos de una forma más aleatoria en el árbol filogenético del género (Figura 44 y Figura 45).



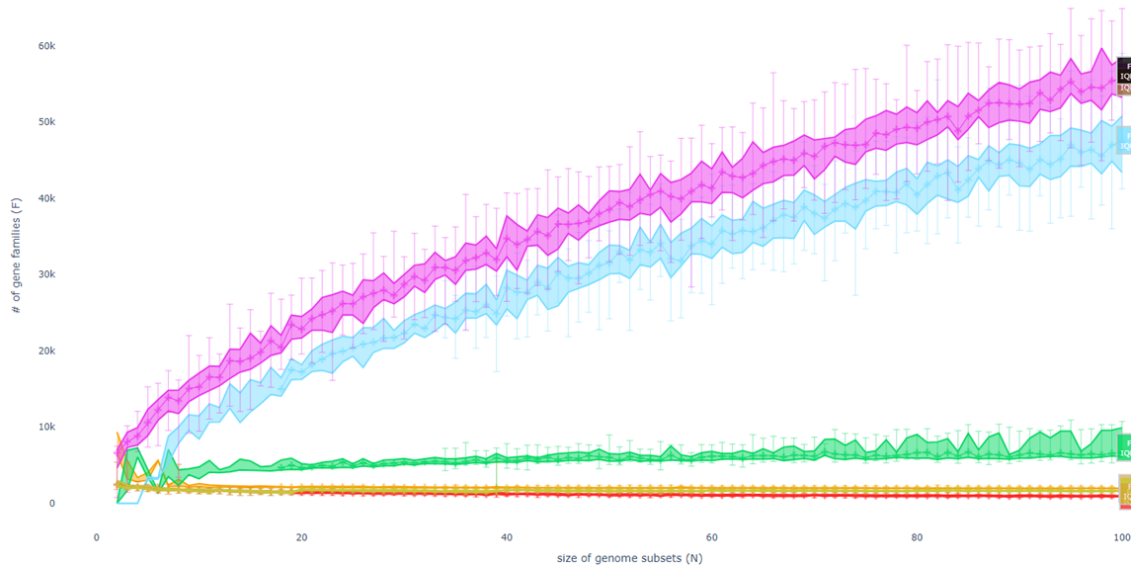
**Figura 44.** Árbol filogenético de los 3.274 genomas de este trabajo (generado con UBCG y anotado en iTOL). Las circunferencias simbolizan distintos grupos de genomas según su nicho de aislamiento.



**Figura 45.** Matriz de componentes principales (PCA) de los 3.274 genomas de *Pseudomonas* seleccionados para los siguientes análisis. Cada símbolo representa un genoma. Cada forma y color, representa un grupo de genomas según su fuente de aislamiento. El PCA ha sido generado a partir de una tabla de presencia/ausencia de funciones COGs en cada genoma del análisis.

### El pangenoma de *Pseudomonas*

Con el objetivo de generar una matriz de presencia y ausencia de proteínas en los distintos genomas del estudio, se llevó a cabo una agrupación de todo el proteoma codificado por las 3.274 *Pseudomonas* según su similitud. En total, 19.056.667 genes fueron agrupados en 326.707 grupos (70% similitud y 80% *coverage* de secuencias de aminoácidos). Los cálculos del pangenoma muestran que la mayor parte de estos genes forman parte del genoma accesorio, lo cual revela la gran diversidad genética dentro del género *Pseudomonas*. Únicamente 65 genes son compartidos entre los 3.274 genomas, los cuales componen el genoma “core” o central del género. En la representación del pangenoma (Figura 46), se observa que el número de nuevas proteínas sigue aumentando a medida que se añaden genomas al análisis, la curva no llega a *plateau*, de donde se puede deducir que es posible que si se añadiesen más genomas al análisis se descubriesen más genes dentro del género.



**Figura 46.** Representación del pangenoma de *Pseudomonas* a través de curvas de rarefacción. La curva rosa representa el genoma accesorio; la azul, el “cloud”; la verde, el “shell”; la amarilla, el persistente y la roja, el “core”.

#### Las funciones COGs en *Pseudomonas* varían según los distintos nichos de aislamiento

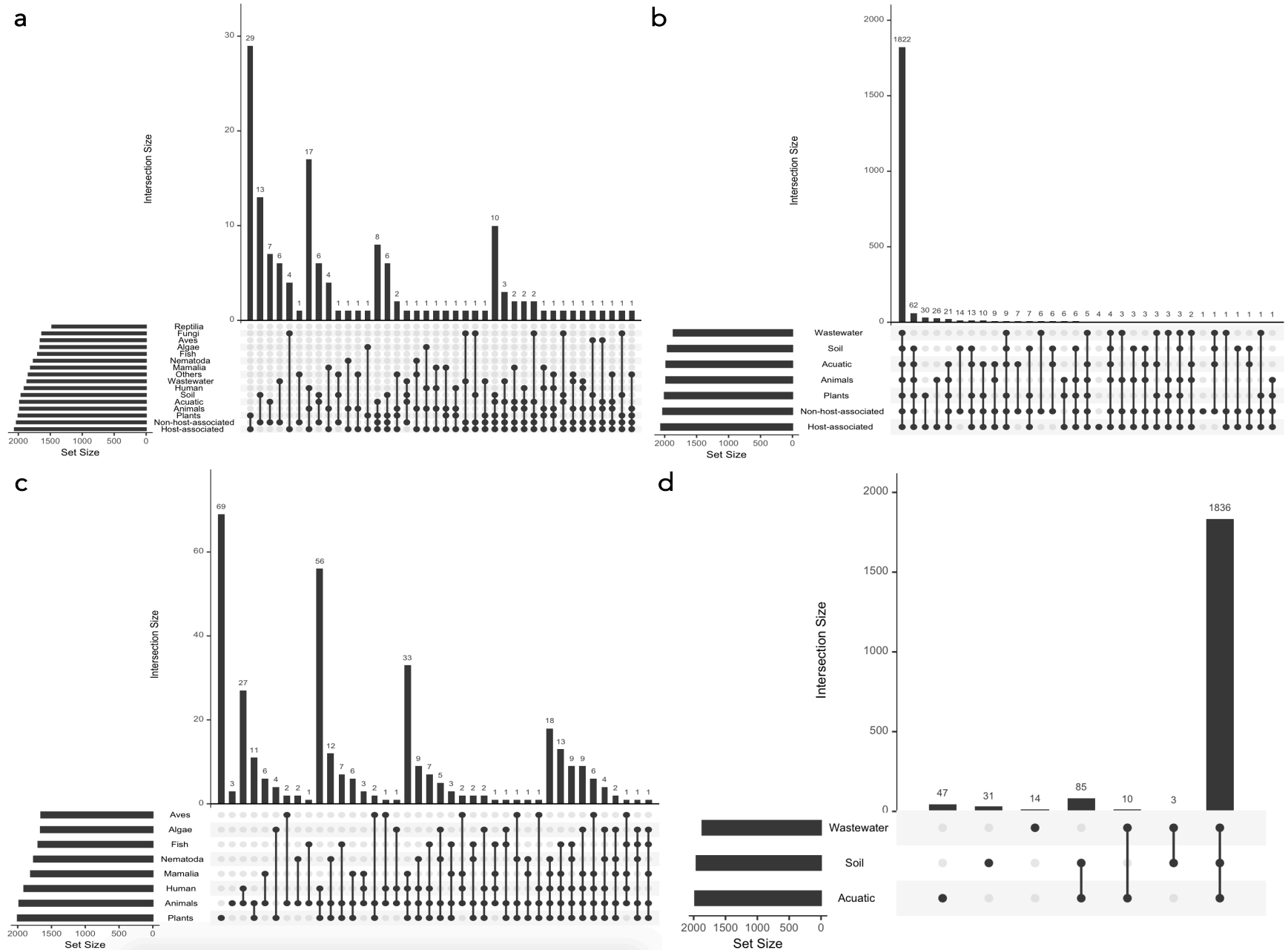
Las anotaciones proteicas pueden realizarse sobre términos referidos a funciones metabólicas universales, como los términos COGs. Una alta diversidad de COGs en un genoma puede estar relacionada con una mayor versatilidad metabólica que permita al microorganismo adaptarse a su micro-hábitat. Los resultados de las anotaciones muestran que el pangenoma de *Pseudomonas* existen un total de 2.164 funciones. El grupo de primer nivel de genomas con más diversidad de metabólica es el de *Pseudomonas* asociadas a planta (2.002 COGs), el cual es, de hecho, más diverso que el grupo que reúne todos los genomas asociados a los distintos animales (1.979 COGs), y el menos diverso el de asociados a reptiles (1.473 COGs) (Tabla 16).

**Tabla 16.** Número de distintos COGs presentes en los genomas de cada grupo de *Pseudomonas* según su nicho de aislamiento.

Grupo	n° COGs
Humanos	1906
Algas	1661
Ambientes acuáticos	1978
Aves	1655
Peces	1697
Hongos	1631
Mamíferos no humanos	1807
Nemátodos	1763
Plantas	2002
Reptiles	1473
Suelo	1955
Aguas residuales	1863
Otros	1843
Animales	1979
Asociados a hospedador	2059
No asociados a hospedador	2028

Cabría esperar que las bacterias aisladas de dos ambientes más similares compartan más COGs que si han sido aisladas de ambientes más diferenciados. En conjunto, la mayor parte de toda la funcionalidad metabólica es compartida entre todos los genomas del estudio, sólo unas pocas funciones son únicas de algunos grupos de genomas (Figura 47 y Figura 48). Los grupos de genomas incluidos en la categoría de genomas “asociados a hospedador” con más COGs únicos pertenecen a las categorías de “Plantas” y de “Hongos” (Figura 47). Sorprendentemente, entre los genomas de “Ambientes acuáticos” y “Aguas residuales” se comparten muchos menos COGs únicos (10 COGs) que entre “Ambientes acuáticos” y “Suelo” (85 COGs) (Figura 47).

Figura 47. a, b, c, d UpSetR plots que muestran los COGs presentes en cada grupo de genomas y las intersecciones entre ellos.





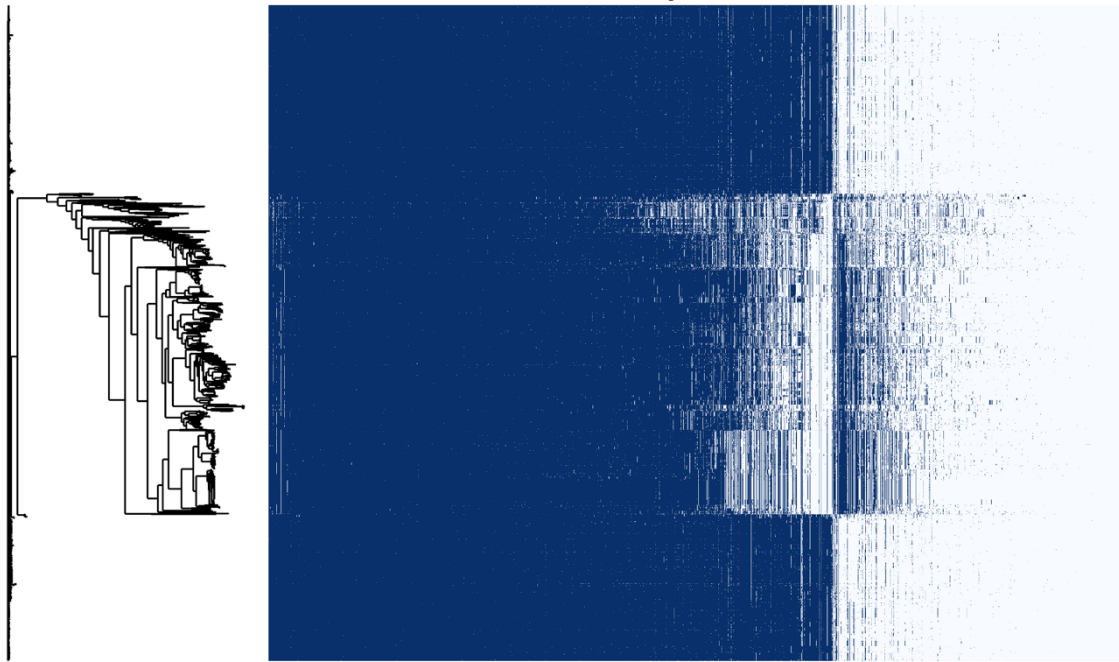


Figura 48. Visualización de la presencia (azul) / ausencia (blanco) de COGs en los genomas de estudio.

#### Distribución de genes de resistencia a antimicrobianos y a otros estreses

Las bacterias muchas veces están expuestas a compuestos nocivos o a condiciones de estrés, circunstancias que suelen variar según el micro-hábitat en cuestión en el que se encuentren. Así pues, para sobrevivir a estas condiciones, las *Pseudomonas* han adquirido distintos mecanismos de resistencia. Con el objetivo de estudiar la distribución de estos mecanismos según el nicho de aislamiento, las proteínas representantes de cada grupo proteico del pangenoma fueron anotadas con AMRfinderPlus para encontrar funciones de resistencia a estreses bióticos y abióticos (AMRs). En total, 251 proteínas se clasificaron como tal, estando la mayor parte de ellas relacionadas con la resistencia a antibióticos, de los cuales más de la mitad serían resistencias a Beta-lactámicos:

- ⇒ Resistencia a antibióticos (208)
  - Aminoglucósidos (51)
  - Beta-lactámicos (105)
  - Bleomicina (3)
  - Bombas de eflujo
    - Fluoroquinolonas (1)
    - Fosfomicina (6)
    - Glipopéptidos (1)
    - Macrólidos (5)

- Fenicoles (13)
  - Quinolonas (2)
  - Rifamicinas (4)
  - Streptograminas (1)
  - Sulfonamidas (3)
  - Tetraciclinas (4)
  - Trimetoprim (1)
- ⇒ Estrés (43)
- Biocidas (2)
  - Calor (7)
  - Metales (34)

Los grupos de genomas con mayor cantidad de AMRs fueron el de “Humanos” (9 proteínas AMRs distintas de media), seguido del de “Animales” (8) y “Aguas residuales” (6), mientras que los genomas asociados a “Plantas” (2) y a “Suelos” (3), son los que menos tipos de resistencias portan. En general, los genomas de este trabajo asociados a hospedador tienen más resistencias que los no asociados (Tukey; p valor < 0.05) (Figura 49).

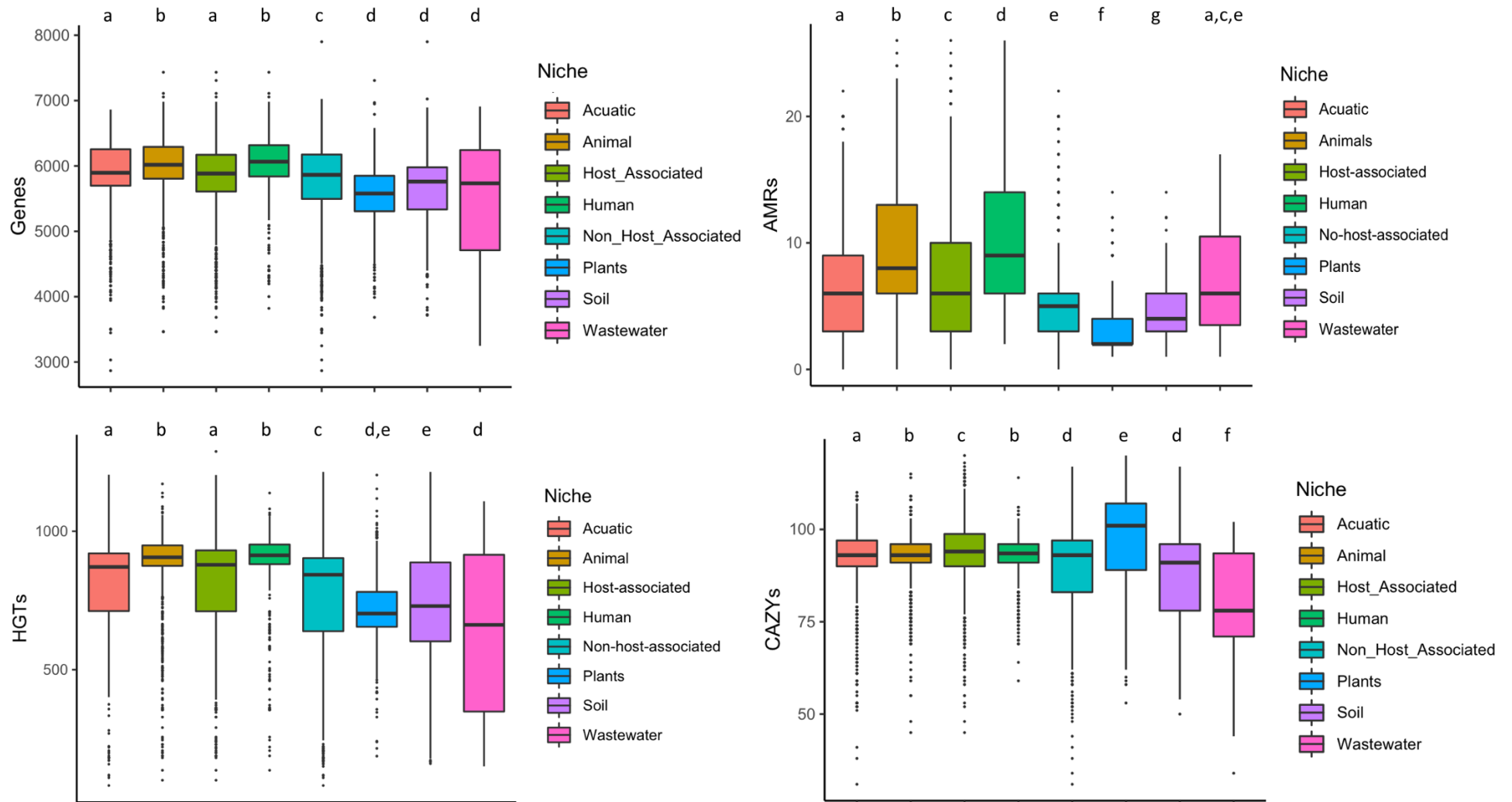


Figura 49. Número de genes, de tipos de genes AMR, de genes adquiridos mediante HGT y de CAZyS por genoma, organizados por grupos según los principales nichos de aislamiento. Las letras en la parte superior representan grupos con diferencias estadísticamente significativas (Tukey,  $p < 0.05$ ).

### Distribución de CAZys en los genomas de los distintos nichos de aislamiento de *Pseudomonas*

La posibilidad de utilizar los distintos carbohidratos de un determinado hábitat es determinante para la adaptación bacteriana. Sin embargo, cada nicho u hospedador tiene una cantidad, variedad y complejidad distinta de carbohidratos, por lo que el repertorio metabólico que necesitan las bacterias para aprovechar los carbohidratos de los distintos ambientes ha de ser diferencial. Con el propósito de investigar la capacidad de utilizar carbohidratos de bacterias de los distintos nichos, las proteínas de todos los genomas en estudio se anotaron según la base de datos de CAZY. En total se han obtenido 305.915 proteínas con alguna anotación de CAZys. Los resultados muestran que las *Pseudomonas* asociadas a plantas, hospedadores con gran cantidad de carbohidratos complejos, son las que más CAZys distintas tienen en cada genoma (>100 CAZys de media) (Figura 49). En contraposición, las *Pseudomonas* aisladas de aguas residuales son las que menos CAZys poseen.

Sin embargo, las CAZys pueden ser de relevancia no sólo para la célula bacteriana en cuestión, sino también para el ecosistema en sí mismo, las interacciones entre microorganismos, la formación de biopelículas bacterianas y las interacciones con hospedadores. Para llevar a cabo estas funciones, muchas veces estas enzimas han de ser excretadas o, al menos, estar localizadas en la membrana externa de la bacteria. Los péptidos señal son un marcador de que las enzimas entran en distintas rutas de secreción, por lo que su localización puede ser o bien extracelular o bien asociada a la membrana externa bacteriana. Se buscó la presencia de péptidos señal en todas las CAZys detectadas en el pangenoma. En total, 87.311 CAZys tienen algún péptido señal, lo que supone el 28,5% de todas las CAZys detectadas entre todos los genomas. Atendiendo a la distribución de CAZys con péptidos señal (Figura 50), podemos observar tendencias contrarias a las de la distribución de CAZys totales por genoma. A pesar de que las *Pseudomonas* asociadas a plantas son las que más CAZys totales tienen, éstas están entre las que menos péptidos señales portan. En este caso, las *Pseudomonas* asociadas a animales son las que más CAZys excretarían o tendrían localizadas en su membrana externa.

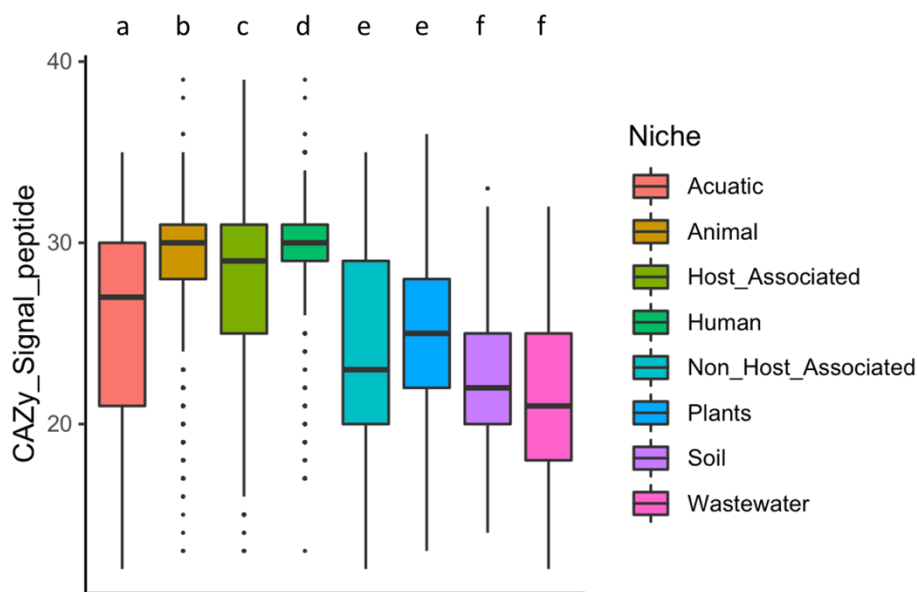
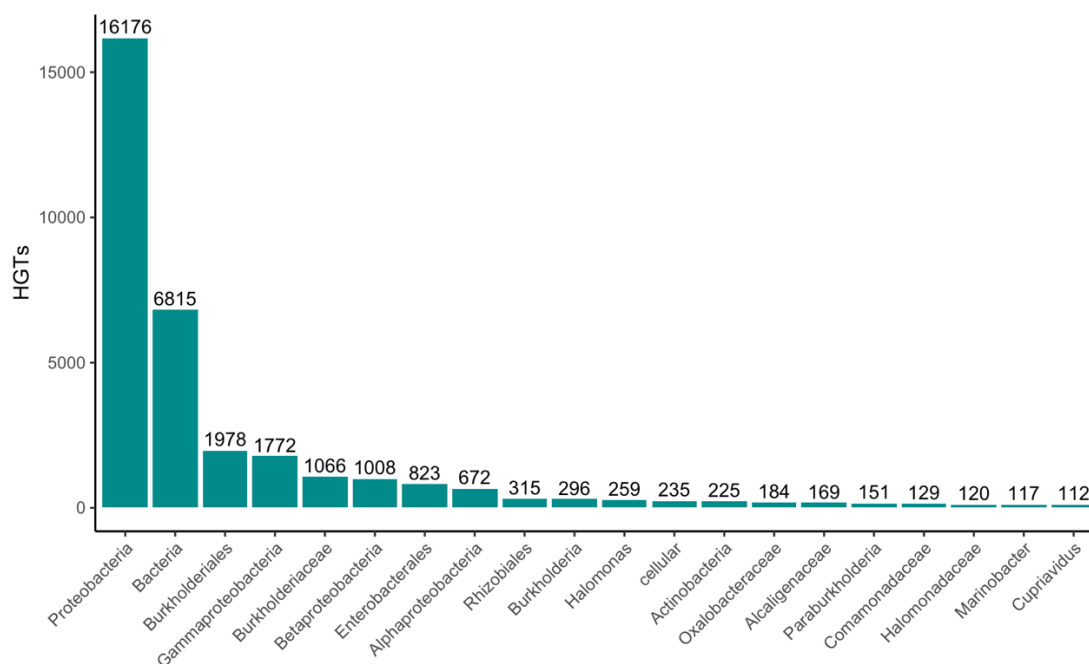


Figura 50. Distribución de CAZys con péptidos señal por genoma agrupados según los principales nichos de aislamiento de las distintas *Pseudomonas*.

### Evolución y adaptación a través de eventos de transferencia horizontal de genes y regiones de plasticidad genética

La adaptabilidad de las bacterias para sobrevivir en los distintos ambientes suele estar muy influenciada por la adquisición de genes de otros organismos y/o por las reorganizaciones genéticas dentro de un mismo genoma. Los resultados de la anotación de las proteínas representativas del pangenoma de *Pseudomonas* muestran que el 11,5% de éstas (37.704 proteínas) podrían haber sido recibidas de otros organismos a través de la adquisición de genes por HGT. De estas, la mayor parte tendrían su origen en bacterias, sobre todo proteobacterias (Figura 51), aunque también habrían recibido genes de virus, de arqueas, del superfilo de bacterias *Terrabacteria* y del filo *Firmicutes*, entre otros muchos taxones bacterianos.

En referencia a la distribución de HGTs por grupos de genomas según su nicho de aislamiento, los resultados muestran una mayor adquisición de HGTs en genomas asociados a hospedador que en no asociados a hospedador (Figura 49). La diferencia entre *Pseudomonas* aisladas de animales y las *Pseudomonas* aisladas de plantas es bastante notoria. En los grupos de *Pseudomonas* aisladas de aguas residuales y de suelos el número de HGTs es muy variable, al contrario que en el caso de *Pseudomonas* aisladas de humanos o de cualquier animal.



**Figura 51.** Representación de los 20 taxones (a distintos niveles) mayoritarios de origen de los eventos de HGT detectados.

En cuanto a la anotación de las proteínas HGTs, 134 de las proteínas representativas han sido anotadas como AMRs (el 53,4% de las 251 AMRs totales). En cuanto a las CAZys, de un total de 3.245 en las proteínas representativas, 850 derivarían de HGT. Adicionalmente, se ha realizado una anotación de todas las proteínas HGTs con eggNOG-mapper y se han agrupado según las categorías de COGs (Figura 52). En estas anotaciones vemos que gran parte de las proteínas no tendrían una función asignada; respecto a aquellas con funciones conocidas, los grupos de funciones mayoritarias estarían implicados en procesos de transcripción, del metabolismo y transporte de aminoácidos, energético y lipídico.

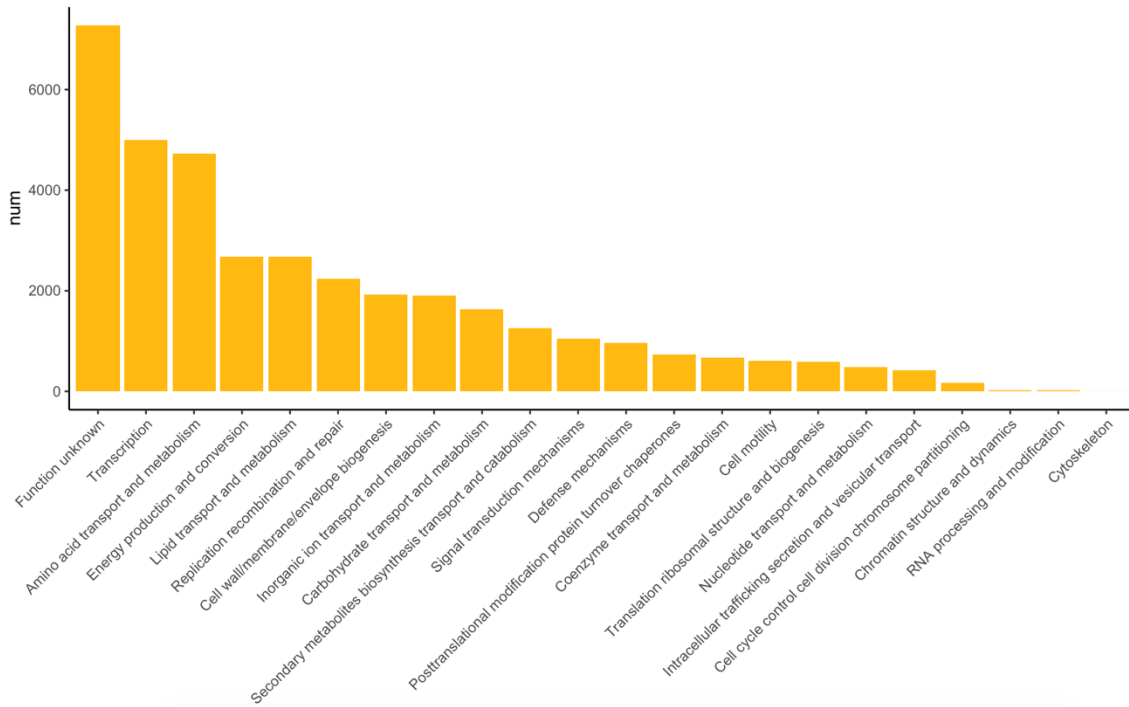


Figura 52. Número de proteínas derivadas de HGTs anotadas según las categorías de COGs.

En cuanto a las regiones de plasticidad genómica (RPGs), se han encontrado 499.509 en total, lo que se traduce en una media de 152,6 RPGs por genoma. Sin embargo, los genomas de los distintos grupos tienen un promedio distinto de RPGs (Figura 53). Los genomas de *Pseudomonas* aisladas de suelo tienen el menor número de RPGs por genoma, los de humanos tienen el mayor número de RPGs y los de plantas tienen la mayor variabilidad según el número de RPGs, aunque la distribución de medias es bastante similar entre todos los grupos del análisis.

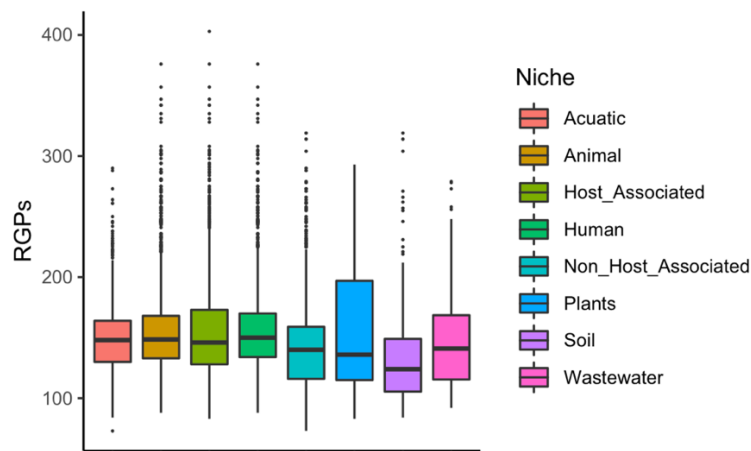


Figura 53. Distribución de RPGs entre los distintos grupos de genomas.

### **Miles de proteínas y funciones están relacionadas con la adaptación de *Pseudomonas* a su nicho biológico u hospedador**

Los distintos micro-ambientes donde habitan las *Pseudomonas* tienen diferentes características fisicoquímicas, el repertorio de moléculas disponibles para la nutrición bacteriana es distinto y, en el caso de hospedadores superiores, los mecanismos de defensa frente a estas bacterias pueden ser muy específicos. Para poder adaptarse a esta variedad de condiciones, las *Pseudomonas*, al igual que cualquier bacteria, han necesitado desarrollar o adquirir variaciones genéticas que les faciliten sobrevivir en cada hábitat en el que se desarrollan.

Con el objetivo de estudiar estos procesos de variación genética relacionados con la adaptación a su hábitat, se compararon los genomas de las bacterias aisladas de distintos nichos u hospedadores para buscar proteínas o funciones que pudieran estar enriquecidas en alguno de los distintos grupos de genomas. La premisa del análisis es que las distintas *Pseudomonas* hayan sufrido eventos de adaptación a sus micro-hábitats y que sus genes accesorios hayan evolucionado de manera que las bacterias tengan alguna ventaja en su supervivencia. De esta manera, se podrán encontrar genes/proteínas/funciones que sean de relevancia en las interacciones *Pseudomonas*-hospedador o *Pseudomonas*-nicho. Para identificar estos casos, se ha llevado a cabo análisis estadísticos que tienen en cuenta, no sólo la abundancia de alguna proteína o función en algún grupo del análisis, sino también que no sea abundante en otros grupos. De esta manera, se han encontrado miles de proteínas y/o funciones asociadas a los distintos nichos u hospedadores (Tabla 17). En el caso de la comparación de secuencias proteicas, CAZys y AMRs se han tomado las secuencias/anotaciones de las proteínas representantes de cada *cluster*. Debido a que distintas proteínas pueden tener anotaciones compartidas, también se ha realizado un estudio de asociación de funciones COGs en el cual se ha comparado la presencia/ausencia de estas funciones en cada genoma.

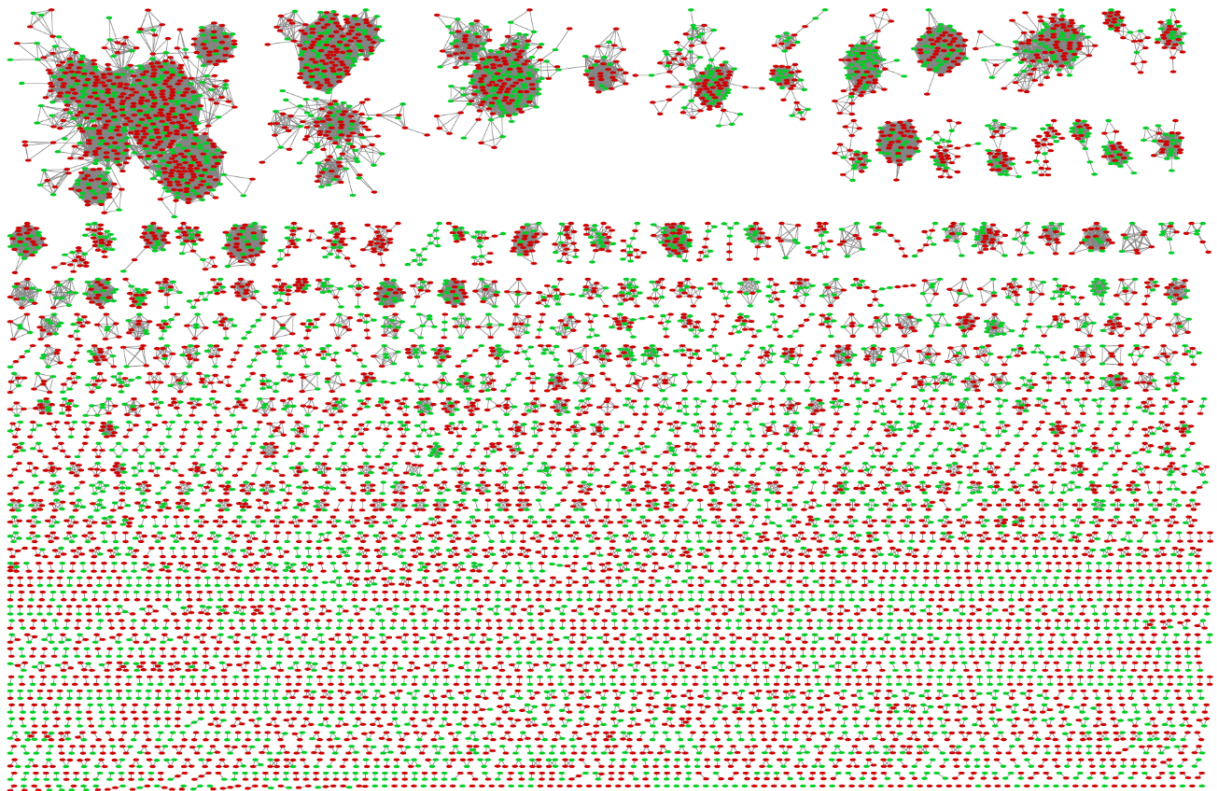


**Tabla 17.** Número de funciones o proteínas asociados con los distintos grupos de nichos u hospedadores de los que han sido aisladas las *Pseudomonas* utilizadas en este trabajo. PH = proteínas hipotéticas.

<b>Grupo</b>	<b>Proteínas* (PH)</b>	<b>COGs*</b>	<b>AMRs**</b>	<b>CAZys**</b>
<b>Ambiente acuático</b>	4.841 (3.327)	93	16	145
<b>Peces</b>	663 (472)	3	1	34
<b>Hongos</b>	263 (115)	7	4	53
<b>Humanos</b>	7.060 (4.308)	465	58	108
<b>Mamíferos no humanos</b>	2.563 (1.337)	81	6	64
<b>Nematodos</b>	677 (409)	24	2	54
<b>Plantas</b>	10.916 (7.214)	211	12	344
<b>Suelo</b>	3.476 (1.767)	142	13	254
<b>Insectos</b>	77 (19)	-	2	96
<b>Aguas residuales</b>	524 (283)	17	7	70
<b>Animales</b>	6.837 (4.202)	431	55	107
<b>Asociados a hospedador</b>	6.975 (4.173)	315	34	162
<b>No asociados a hospedador</b>	9.099 (5.382)	225	20	309

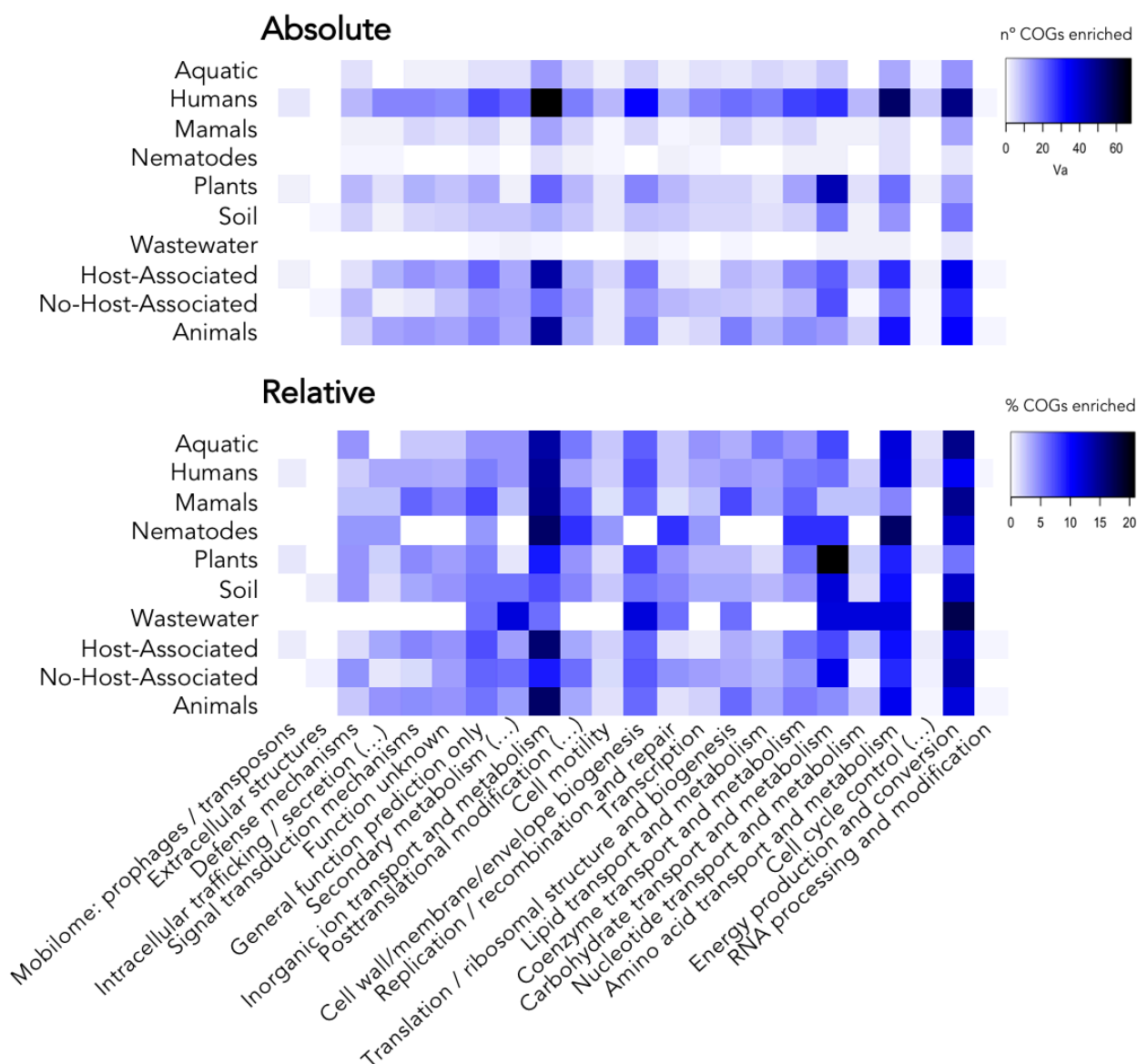
\*valor p (corrección B-H) < 10<sup>-6</sup>; \*\*valor p (corrección B-H) < 10<sup>-2</sup>.

En la tabla anterior se observa que existen miles de genes asociados a los distintos nichos del estudio. Entre todos estos, una gran proporción permanecen sin anotación (proteínas hipotéticas). Al considerar las categorías de grupos de genomas en su nivel superior, se observa que hay más proteínas asociadas al grupo “no asociados a hospedadores”, pero la cantidad y diversidad de funciones COGs y AMRs asociadas a hospedador es más alta. Sin embargo, a nivel individual, los genomas de *Pseudomonas* aisladas de plantas componen el grupo con mayor cantidad de proteínas asociados a sus nichos. De la misma manera, el grupo con mayor cantidad de AMRs y COGs asociados es el de humanos. Al comparar la similitud de las proteínas asociadas a hospedadores y de las asociadas al grupo “no asociados a hospedador”, se observa que existe gran interconectividad entre nodos (Figura 54), lo cual indica que ambos conjuntos de proteínas no son muy distantes entre sí. Los grupos de bacterias asociadas a plantas, suelos y ambientes acuáticos son los que tienen mayor cantidad de enzimas CAZy asociadas a sus ambientes.



**Figura 54.** Red de similitud de proteínas (SSN) asociadas (nodos verdes) y no asociadas (nodos rojos) a hospedador.

Si atendemos a las rutas metabólicas en las que se clasifican los COGs asociados a distintos nichos (Figura 55), se puede observar que el metabolismo de carbohidratos está especialmente enriquecido en las bacterias asociadas a planta y que en *Pseudomonas* asociadas a humanos y ambientes acuáticos hay altos porcentajes de COGs relacionadas con el metabolismo de iones inorgánicos. En general, la mayor proporción de COGs asociados a hospedador se relacionan con el metabolismo de iones inorgánicos, de aminoácidos y con el metabolismo energético.



**Figura 55.** Representación de las distintas categorías de COGs enriquecidas en genomas de *Pseudomonas*. En la parte superior se muestra el número en forma absoluta. En la imagen inferior, se ha relativizado cada recuento de COGs con el número total de COGs asociados con cada hospedador o nicho.

Entre las proteínas asociadas a los distintos grupos de genomas, se han encontrado algunas cuyas funciones ya son conocidas para la interacción entre *Pseudomonas* y ese determinado nicho u hospedador. Por ejemplo, el operón HCN-ABC aparece asociado a humanos, proteínas relacionadas con la síntesis de vitamina B 12 aparecen asociadas a insectos, la proteína metapirocatecasa (implicada en la degradación de tolueno) asociada a aguas residuales y la ACC desaminasa aparece asociada a plantas, entre muchas otras.

## *Discusión*

No cabe duda de que los distintos miembros de cada microbioma juegan unos roles de suma importancia para los distintos ecosistemas de la Tierra y, además, son de vital importancia para la salud de sus hospedadores superiores (Inkpen et al., 2017). Entre ellos, las *Pseudomonas* aparecen de manera ubicua en multitud de hábitats, animales y plantas (Peix et al., 2018).

La comprensión de las funciones que llevan a cabo estas bacterias en sus distintos nichos biológicos es de vital importancia y puede llegar a ser muy provechosa para el estudio de enfermedades, bien de seres humanos, de otros animales o de plantas, también para el desarrollo de biofertilizantes eficaces, agentes de biorremediación de suelos y aguas contaminadas, etc (Kordes et al., 2019; Tremblay et al., 2019; Levy et al., 2018a; Jiménez-Gómez et al., 2020; Saati-Santamaría et al., 2021).

En este trabajo se ha creado una colección de 3.274 genomas de *Pseudomonas* de calidad con información sobre el nicho de aislamiento de cada bacteria. Se han estudiado las anotaciones de todos estos genomas y se han comparado tanto las secuencias proteicas como las distintas anotaciones para encontrar funciones asociadas a los distintos nichos u hospedadores. La metodología empleada ha permitido descubrir miles de genes implicados en esta adaptabilidad de *Pseudomonas*, muchos de los cuales permanecen sin anotación. Los resultados de este trabajo servirán de base para el estudio de las interacciones bacteria-hospedador, o incluso para el desarrollo u optimización de procesos biotecnológicos.

Los resultados muestran que las *Pseudomonas* asociadas a planta tienen un genoma de menor tamaño que el resto de *Pseudomonas*, lo cual puede sugerir la existencia de un proceso más íntimo de simbiosis y especialización dentro de estos hospedadores (Fisher et al., 2017). Numerosos estudios sugieren que los endosimbiontes estrictos u obligados tienen genomas más reducidos, puesto que aprovechan la maquinaria genética o metabólica de sus hospedadores superiores, lo cual deriva en un menor gasto energético celular, sobre todo relativo a la síntesis de proteínas (Fisher et al., 2017; Ankrah et al., 2018). Sin embargo, esta tendencia no es tan clara cuando comparamos genomas asociados a hospedador y no asociados a hospedador.

En cuanto a los genes de resistencia a antimicrobianos y otros estreses, los genomas de *Pseudomonas* asociadas a humanos son los que poseen una mayor cantidad; no obstante, este dato puede estar sesgado por las bases de datos existentes, ya que en estas se refleja una mayor cantidad de genes de resistencia a antimicrobianos que aparecen en bacterias patógenas humanas, como *P. aeruginosa*, que genes de resistencias de bacterias con menor impacto clínico.

Los resultados muestran que las *Pseudomonas* asociadas a planta tienen enriquecido el metabolismo de carbohidratos, lo cual concuerda con una mayor prevalencia de CAZys en estos genomas. Esto es explicable debido a la gran cantidad de carbohidratos que existen en las plantas (Carro y Menéndez, 2020). Levy y colaboradores (2018b) llegaron a la misma conclusión tras comparar genomas asociados y no asociados a plantas, no solo de *Pseudomonas*, sino de muchos

otros taxones. La presencia de péptidos señal en las proteínas CAZy puede indicar que las funciones de estas enzimas en *Pseudomonas* de animales (mayor número de CAZys con péptidos señal) puedan tener un rol más relacionado con la dinámica de las biopelículas y/o con la degradación de tejidos de su hospedador que las de *Pseudomonas* aisladas de plantas. Es posible, por lo tanto, que los genomas de *Pseudomonas* aisladas de plantas tengan más CAZys porque necesiten llevar a cabo más procesos implicados en la degradación de carbohidratos en el interior celular.

El enriquecimiento del metabolismo de iones inorgánicos en *Pseudomonas* de humanos es debido principalmente al enriquecimiento de proteínas relacionadas con el transporte de protones ( $H^+$ ), potasio ( $K^+$ ) y con el metabolismo del hierro ( $Fe^{2+}$ ). La mayor abundancia de proteínas transportadoras de  $H^+$  puede ser explicada por las condiciones fisicoquímicas de la superficie pulmonar, tejido en el que *P. aeruginosa* suele generar infecciones (Bhagirath et al., 2016). Las reacciones metabólicas ácido-base producidas tras el intercambio gaseoso pulmonar generan condiciones con altas variaciones en los niveles de  $H^+$  (Hopkins et al., 2020). De esta manera, las células bacterianas allí presentes necesitarían lidiar con continuos cambios de pH, por lo que la presencia de estos transportadores les ayudaría en la homeostasis celular, lo cual podría estar relacionado con la adaptación a este micro-ambiente. El incremento de funciones relacionadas con el metabolismo del hierro puede ser explicado por la competición bacteria-hospedador por este elemento durante el proceso de neumonía aguda (Damron et al., 2016). De hecho, la producción de sideróforos se considera un mecanismo indirecto de antagonismo celular (Page, 2019). En este sentido, Damron et al. (2016) mostraron que *P. aeruginosa* sobreexpresa genes relacionados con la adquisición de grupos hemo, el transporte de enterobacterina férrica y con la biosíntesis de sideróforos durante el proceso de infección en neumonía aguda.

Las predicciones de procesos de HGT permiten identificar aproximadamente entre un 10% y un 20% de genes de cada genoma de *Pseudomonas* como elementos obtenidos de otras bacterias. Los genomas con mayor número de HGTs coinciden con aquellos con mayor número de genes. De la misma manera, los genomas con menor número de HGTs de *Pseudomonas* tienen menor tamaño. Teniendo en cuenta que todas las *Pseudomonas* habrán evolucionado de un único ancestro común, esto podría indicar que dicho ancestro tuviese el genoma más pequeño y que los eventos de HGT hayan tenido una gran relevancia en la evolución genómica de los genomas asociados a humanos y otros animales. De la misma manera, se podría hipotetizar que el ancestro común de *Pseudomonas* habitase en un ambiente relacionado con las plantas. De esta manera, las especies que ocupan este tipo de nicho no han necesitado tantas ganancias de genes para adaptarse al ambiente (Zhong et al., 2018). Esta idea, por tanto, sería parcialmente contraria a la sugerida anteriormente sobre una disminución del tamaño del genoma debida a la adaptación simbiótica, ya que en este caso, el ancestro común debería tener un genoma mayor. Para tener certeza de estos procesos, habría que llevar a cabo estudios evolutivos más detallados. A pesar de estos matices, todos los genomas del estudio tienen un alto ratio de procesos de HGT en comparación con otras bacterias (Zhu et al., 2014; Zhong et al., 2018). Freschi et al. (2018) mostraron que estos eventos de HGT podrían explicar gran parte de la ganancia de mecanismos

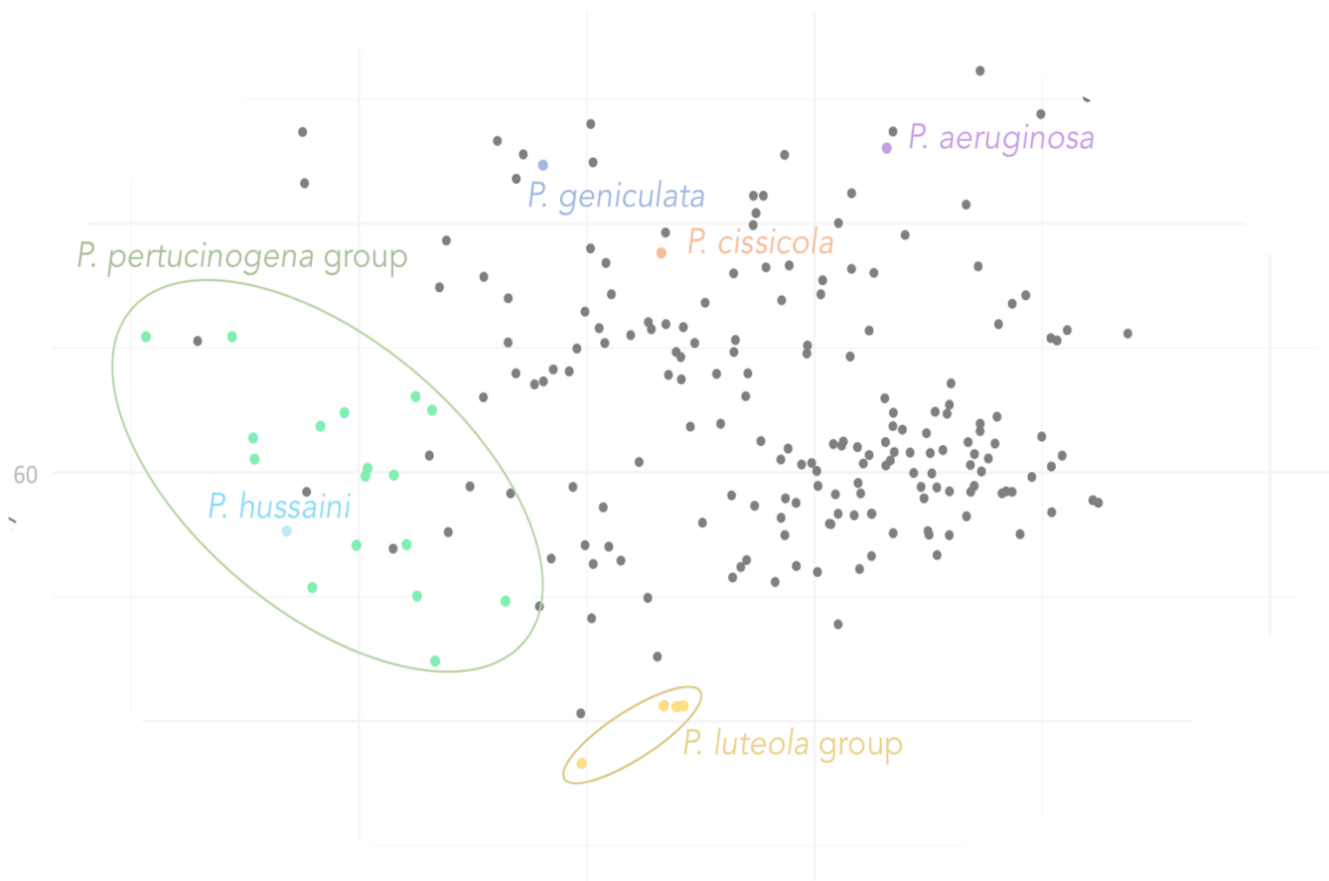
de resistencia a antibióticos y virulencia de *P. aeruginosa*. Los resultados revelan que la mayor parte de estas transferencias genéticas derivan de bacterias filogenéticamente próximas a *Pseudomonas*, lo cual no es de extrañar, puesto que la adaptabilidad de los procesos metabólicos y el uso de codones será más similar, lo cual incrementa la probabilidad de éxito del proceso de transferencia de genes. Además, las proteobacterias suponen un alto porcentaje de las bacterias de los microbiomas de los distintos nichos estudiados y son un grupo de los que mayor diversidad de genes portan, lo cual también aumenta estas probabilidades (Louca et al., 2016; Bradley y Pollard, 2017; Degli y Martínez, 2017; Bahram et al., 2018; Jiménez-Gómez et al., 2020; Singh et al., 2020).

Debido a todo lo expuesto en el párrafo anterior, cabría imaginar procesos de especialización dentro de cada nicho biológico de *Pseudomonas*, lo cual se ratifica al visualizar el árbol filogenético obtenido con todos los genomas incluidos en este estudio. En él se perciben dos grandes linajes: uno de *Pseudomonas* asociadas a personas y otro de *Pseudomonas* asociadas a plantas. Sin embargo, embebidos en este último grupo aparecen grupos alternos de genomas de bacterias asociadas a suelos y aguas. Es posible que algunas de estas bacterias hayan sido muestreadas por serendipia y que su principal hospedador fuese una planta, lo cual no es fácil de determinar *a posteriori*. No obstante, la proximidad física de ambos hábitats puede haber dado lugar a procesos de especialización cruzada que expliquen estos sucesos. Por otro lado, entre ambos súper-clados aparece otro menor con muchas de las *Pseudomonas* aisladas de otros animales, por lo que también se podrían deducir relaciones estrechas entre dichas especies. Estos procesos de especialización ya han sido encontrados en otros grupos de bacterias (Saw et al., 2020; Wirth et al., 2020).

En conclusión, los resultados de este estudio reflejan una adaptabilidad genómica diferencial de las distintas *Pseudomonas* según su nicho de aislamiento. Los datos presentados podrán ser de utilidad para el estudio microbiológico de procesos evolutivos, ecológicos, biotecnológicos y clínicos. Además, la información obtenida sobre genes o funciones asociadas a los distintos nichos podrá ser aplicada para la diagnosis y tratamiento de infecciones, principalmente humanas o de plantas, e incluso para el desarrollo de aplicaciones biotecnológicas en base a cepas de este género.

# Capítulo V

Organización filogenética y taxonómica del género *Pseudomonas* basada en herramientas genómicas.







TREE OF LIFE



ORIGIN OF LIFE

*Introducción*



## ***Introducción***

Las bacterias del género *Pseudomonas* representan uno de los grupos procariotas más diversos y adaptables de la naturaleza (Silby et al., 2011; Saati-Santamaría et al., en revisión). La versatilidad metabólica de las *Pseudomonas* permite sobrevivir a estas bacterias en una amplia variedad de nichos. La presencia de bacterias del género *Pseudomonas* ha sido descrita en humanos (Schroth et al., 2018; Milivojevic et al., 2018; Janvier et al., 2021), plantas (Li et al., 2019; Menéndez et al., 2020; Jiménez-Gómez et al., 2020), suelos (Frasson et al., 2017; Prakash et al., 2021), ríos (Mulet et al., 2020), profundidades marinas (Sun et al., 2018), ambientes psicrófilos (Kosina et al., 2013) o insectos (Fabryová et al., 2018; Poveda et al., 2019; Saati-Santamaría et al., 2021), entre muchos otros nichos y hospedadores. Debido a su gran adaptabilidad y a su capacidad para evolucionar en esta gran diversidad de ambientes, las especies de *Pseudomonas* han dado lugar a uno de los géneros bacterianos más amplios, dentro del cual muchas nuevas especies son descubiertas cada año (Peix et al., 2018). Debido a este elevado número de especies, la organización taxonómica de *Pseudomonas* se torna compleja, y no es de extrañar que los taxones y linajes filogenéticos de este género se estén modificando constantemente.

La correcta clasificación taxonómica de las especies bacterianas es relevante, ya que permite a los investigadores obtener unas conclusiones adecuadas sobre los microorganismos estudiados (Inkpen et al., 2017). Un claro ejemplo lo constituyen las especies de *Pseudomonas* asociadas a hospedadores superiores, donde unas especies pueden tener efectos beneficiosos para el hospedador y otras efectos perjudiciales (Panichikkal et al., 2019; Nahar et al., 2020; Sawa et al., 2020; Durán et al., 2021) –. Así pues, se debe realizar una correcta organización taxonómica que permita investigar las funciones y la evolución de *Pseudomonas*. De no ser así, se pueden asumir funciones en taxones que no las tienen, dando lugar a esfuerzos infructuosos en investigación (Bortolus, 2008).

Durante las últimas dos décadas, la taxonomía sistemática en *Pseudomonas* se ha basado en comparaciones del gen ribosómico 16S, complementadas con la filogenia de árboles basados en los genes “housekeeping” *rpoB*, *rpoD* y *gyrB* (Mulet et al., 2010; Menéndez et al., 2016). Recientemente, los estudios taxonómicos se han beneficiado del uso de la Genómica, siendo empleadas técnicas basadas en el estudio de genomas completos en la descripción de diversos nuevos taxones (González-Dominici et al., 2020; Hilgarth et al., 2021; Li et al., 2021b), incluyendo a nuevas especies de *Pseudomonas* (Furmanczyk et al., 2018; Saati-Santamaría et al., 2018; Sun et al., 2018; Peral-Aranega et al., 2020). En estos trabajos, los valores de ANIB y dDDH han sido empleados para validar y confirmar las relaciones taxonómicas existentes entre distintas cepas, siempre siguiendo los estándares para la delimitación de especies sugeridos por Ritcher y Rosselló-Mora en 2009. Estos conceptos derivan de dos métodos distintos para evaluar la similitud existente entre dos genomas. En el caso del ANI, cuyas siglas derivan del inglés *Average Nucleotide Identity*, el algoritmo utilizado se basa en el alineamiento entre dos genomas de manera que se identifiquen regiones solapantes. Tras ello, se realiza el cálculo del porcentaje de nucleótidos compartidos por estas regiones y se calcula la media de todos ellos. La realización de

estos cálculos es posible a través de diversas herramientas, como MUMmer (ANIm), BLASTN+ (ANiB), legacy BLASTN (ANiBblastall) o TETRA, siendo el ANiB el más preciso, pero también el más computacionalmente costoso (Ritcher et al., 2016). Existe un umbral de referencia situado entre el 95 y 96% para el ANiB que se suele utilizar para delimitar el nivel de especie (Ritcher y Rosselló-Mora, 2009). En lo referente al dDDH, cuyas siglas derivan de *digital DNA-DNA Hybridization*, es un valor calculado *in silico* que trata de sustituir a la hibridación DNA-DNA (DDH) *in vitro*. El DDH es un valor empírico que se basa en el grado de asociaciones híbridas entre dos genomas y la estabilidad térmica de estas. Sin embargo, el dDDH hace uso de las secuencias nucleotídicas de los genomas a través de procesos bioinformáticos. Para ello, aplica un proceso de alineamiento similar al del ANI, pero después realiza un cálculo en el que tiene en cuenta el número, longitud y similitud de las regiones alineadas (HSPs, *High-Scoring Segment Pairs*) (Auch et al., 2010). En el caso del dDDH, se sugiere que dos cepas pertenecen a la misma especie cuando tienen un valor mayor al 70% de similitud (Ritcher y Rosselló-Mora, 2009).

La relevancia del auge de la genómica es tal, que hoy en día suele exigirse la secuencia del genoma para la comparación de especies en la descripción de un nuevo taxón (Chun et al., 2018). Esto ha dado lugar a la creación del concepto “filogenómica”, el cual hace referencia a la construcción de árboles filogenéticos basados en procesos realizados a nivel genómico. Además de los índices de relación genómica (OGRI, por sus siglas en inglés *Overall Genome Related Indexes*), los cuales comprenden principalmente a los índices ANI y dDDH, en los últimos años se han desarrollado diversos algoritmos con aplicaciones filogenómicas (Chun et al., 2018; Lee, 2019). De hecho, estas implementaciones se han aplicado ya en numerosos trabajos para organizar y clasificar taxones a través de estrategias basadas en secuencias genómicas (Hahnke et al., 2016; Carro et al., 2018; Nouioui et al., 2018; Wittouck et al., 2019).

En lo relativo a *Pseudomonas*, recientemente Hesse y colaboradores (2018) secuenciaron los genomas de decenas de especies tipo del género y las utilizaron, junto con otras ya publicadas, para estudiar la historia evolutiva de estas bacterias (Figura 56). Más tarde, Lalucat et al. (2020) realizaron otras aproximaciones filogenómicas que también comprendieron a todas las especies del género *Pseudomonas*. Ambos trabajos organizaron los linajes de *Pseudomonas* adecuadamente, pero ninguno sugirió la exclusión de ninguna especie de este género.

Debido a lo expuesto anteriormente, el objetivo del presente capítulo es fijar correctamente los límites del género *Pseudomonas* a través de métodos filogenómicos, empleando genomas públicos de las especies tipo del género *Pseudomonas* y otros géneros relacionados. En base a los resultados obtenidos, se sugieren nuevos géneros bacterianos y nuevas sinonimias que podrán facilitar la definición del género *Pseudomonas*.

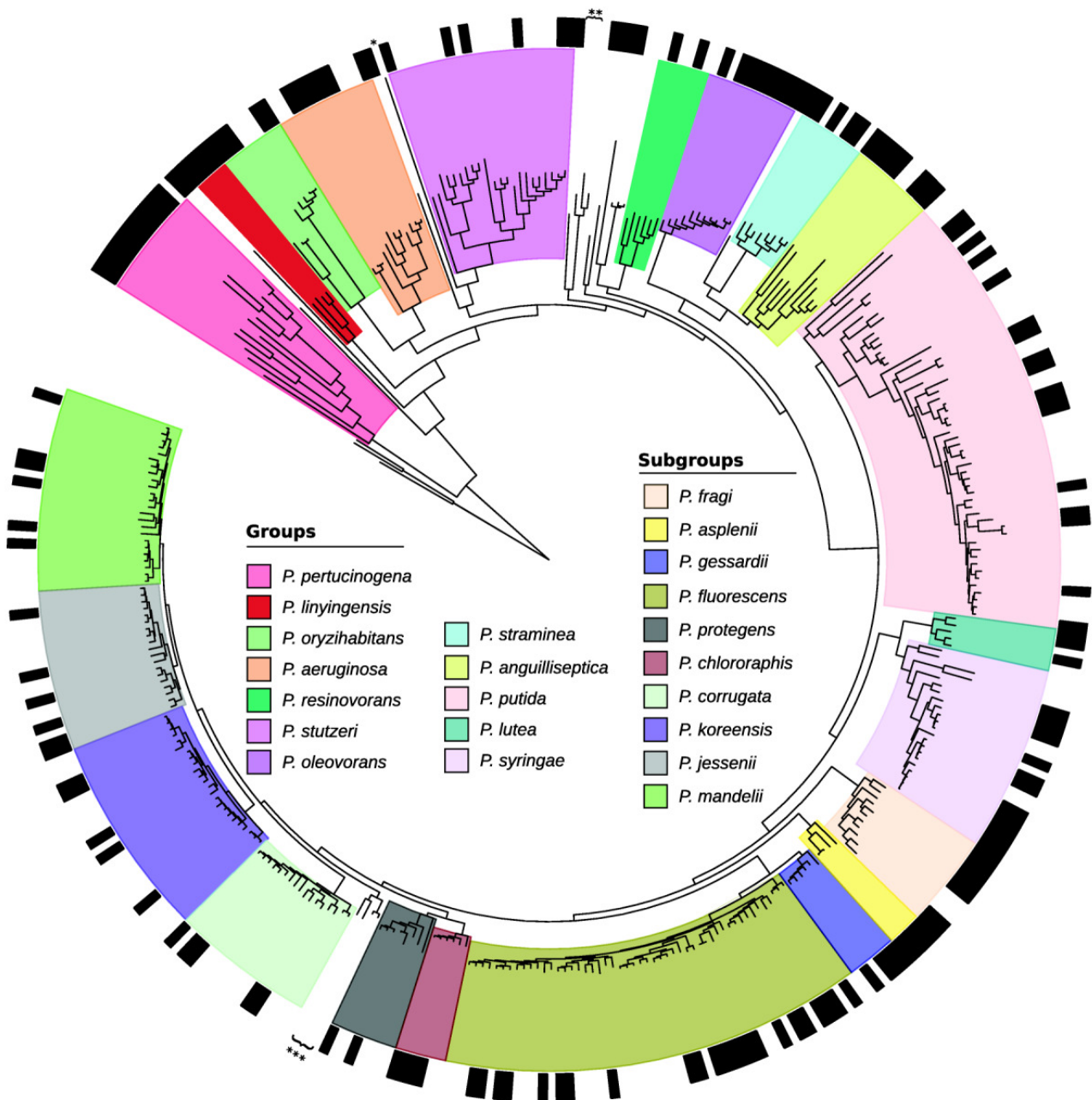
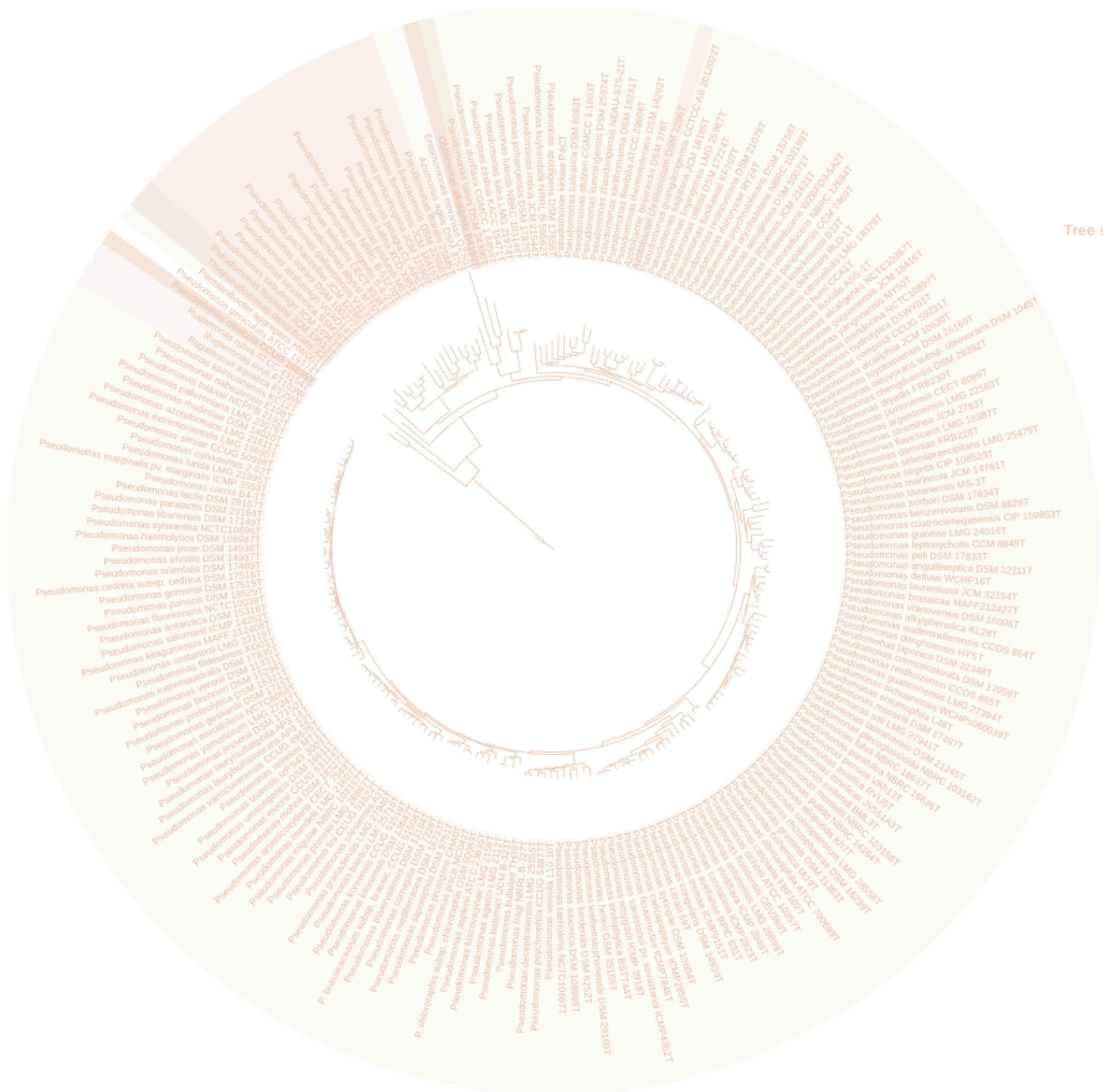


Figura 56: Filogenia del género *Pseudomonas*. Imagen tomada de Hesse et al., 2018.





Tree :

# Resultados y discusión





## Resultados

### Filogenómica en la familia *Pseudomonadaceae*

Las secuencias de genomas bacterianos han mostrado una gran utilidad para la inferencia de relaciones taxonómicas. Por ello, para tener una imagen de la organización taxonómica del género *Pseudomonas*, se descargaron 227 genomas de la familia *Pseudomonadaceae*, de los cuales 217 pertenecen al género *Pseudomonas* y el resto a cepas tipo de otros géneros de la misma familia. Los datos genómicos de estas cepas y los números de acceso de los genomas aparecen resumidos en la Tabla Suplementaria 3 del Anexo I.

Se creó y se investigó un árbol filogenómico con los genomas de las cepas tipo de la familia *Pseudomonadaceae*. Este árbol distingue algunos clados de *Pseudomonas* que se diferencian claramente de la mayoría de las cepas tipo de *Pseudomonas*, incluyendo la especie tipo del género, *P. aeruginosa*, y que están localizados cerca de cepas tipo de otros géneros de la familia *Pseudomonadaceae* (Figura 57). Además, algunas de estas cepas parecen tener un tamaño de genoma y contenido en G+C divergentes del resto de cepas (Figura 58).

Debido a su clara diferenciación filogenética, se investigó el verdadero emplazamiento taxonómico de las especies *P. cissicola*, *P. geniculata*, *P. caeni*, *P. hussaini* y de las especies pertenecientes a los clados de *P. pertucinogena* (*P. pertucinogena*, *P. neustonica*, *P. sabulinigri*, *P. oceani*, *P. aestusnigri*, *P. pachastrellae*, *P. abyssi*, *P. gallaeciensis*, *P. phragmitis*, *P. salegens*, *P. litoralis*, *P. bauzanensis*, *P. formosensis*, *P. pertucinogena*, *P. pelagia*, *P. salina*, *P. profundus* y *P. xinjiangensis*) y *P. luteola* (*P. luteola*, *P. lutea*, *P. asuensis*, *P. zeshuii* y *P. duriflava*).

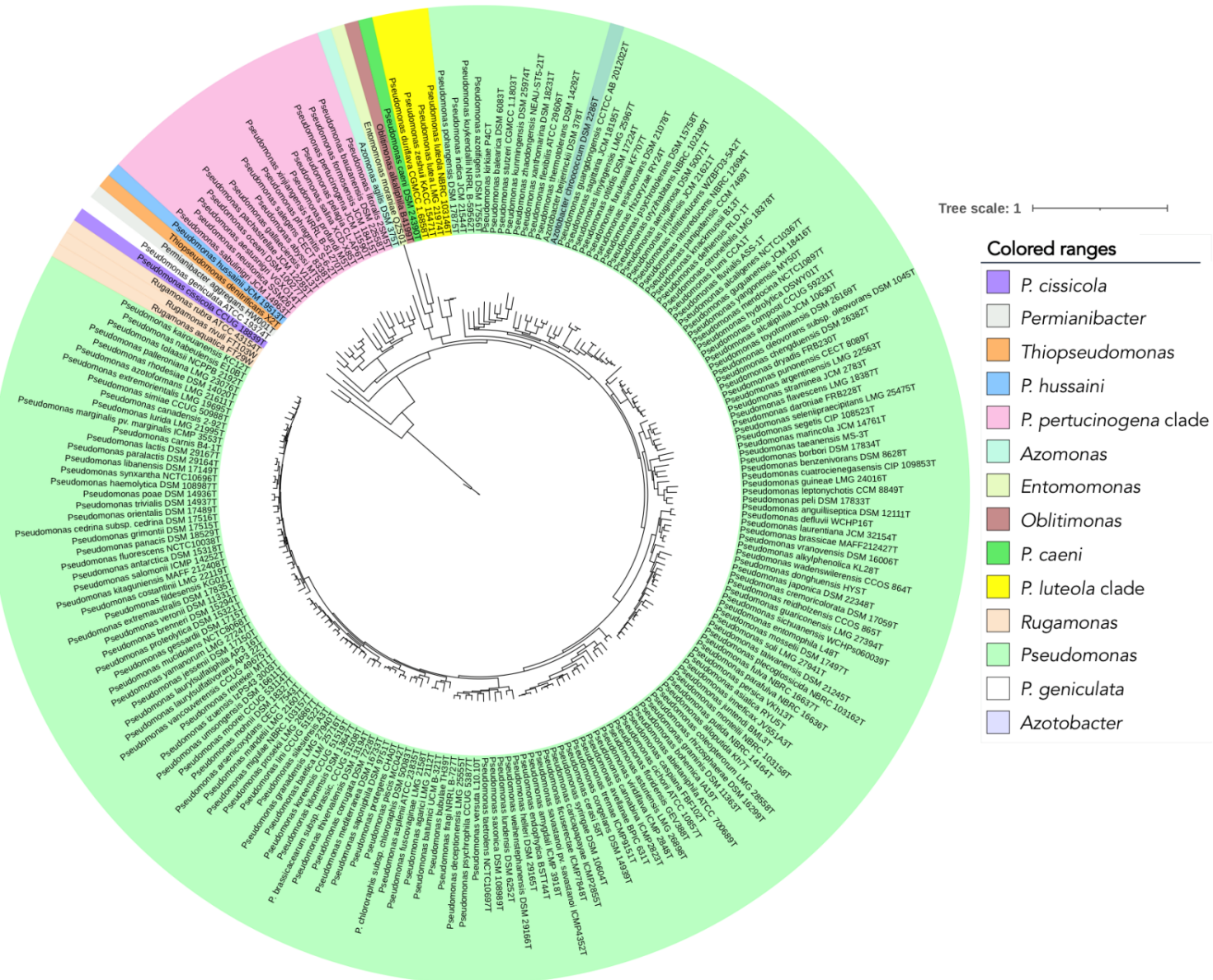
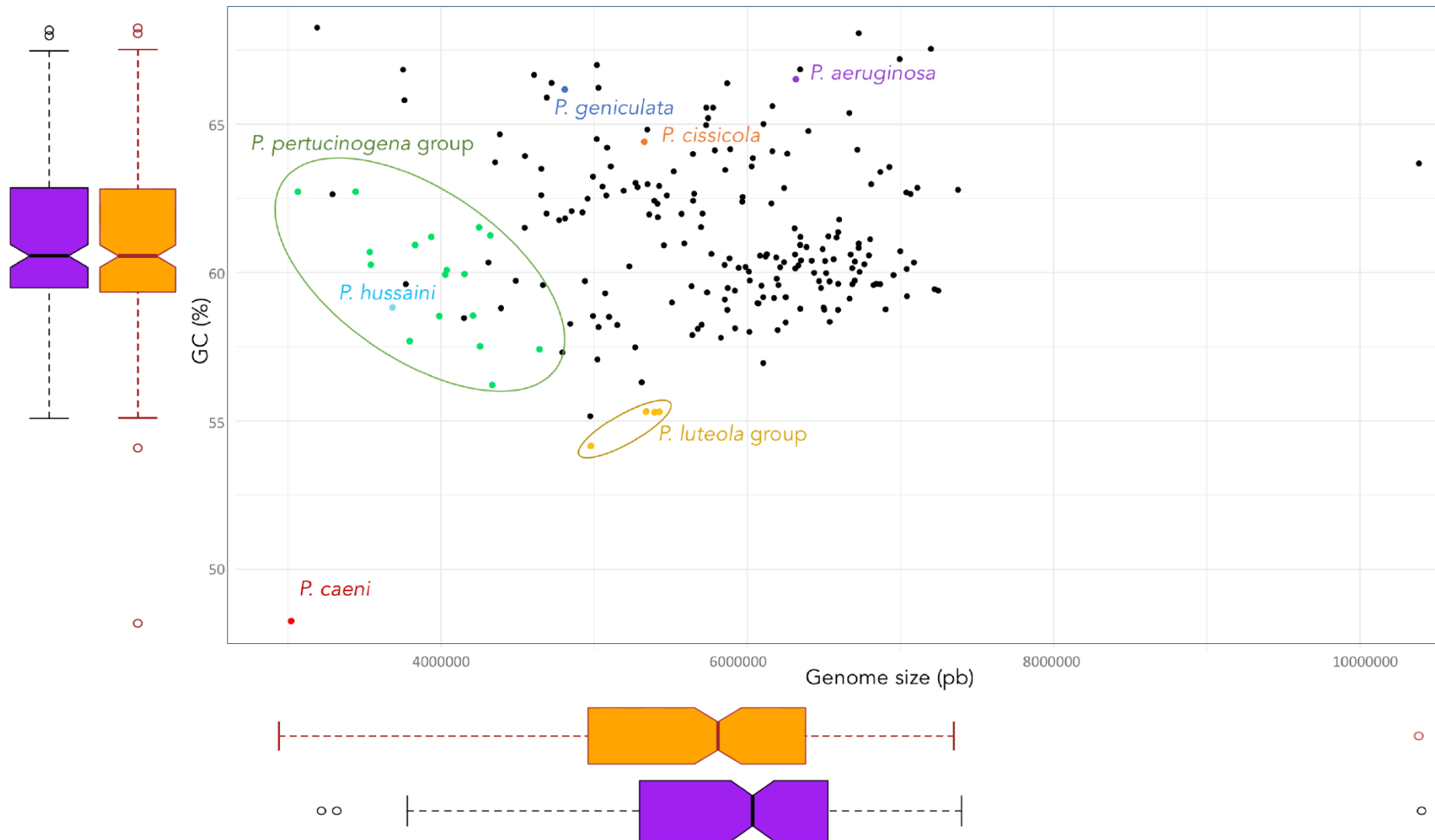


Figura 57: Árbol filogenómico construido con 92 genes “housekeeping” extraídos de los 227 genomas de cepas tipo de la familia *Pseudomonadaceae*.



**Figura 58:** Representación del tamaño y contenido en G+C mol% de los genomas de cepas tipo del género *Pseudomonas*. En el lado izquierdo y en la parte inferior se representan *boxplots* de estas dos características genómicas en el género (naranja) y las que resultarían si se reclasificaran fuera de *Pseudomonas* los genomas de las cepas tipo de *P. hussaini*, *P. caeni*, *P. geniculata*, *P. cissicola* y las comprendidas en los grupos de *P. luteola* y *P. pertucinogena*.

### El caso de *P. geniculata*

El nodo de *P. geniculata* ATCC 19374<sup>T</sup> en el árbol filogenómico (Figura 57) es extremadamente divergente, con una rama larga que separa a esta cepa del resto de cepas de *Pseudomonas* y géneros relacionados. Por ello, se comparó la secuencia nucleotídica de su gen 16S ARNr frente a la base de datos del NCBI, encontrando una similitud mayor con especies del género *Stenotrophomonas* que con el resto de las especies del género *Pseudomonas*. Teniendo esto en cuenta, se llevaron a cabo diversas aproximaciones para asignar su correcto lugar taxonómico a esta cepa y especie. La filogenia del gen 16S ARNr localiza a la cepa tipo de *P. geniculata* dentro del género *Stenotrophomonas*, agrupándose en una rama junto con *S. maltophilia* NCTC 10257<sup>T</sup> y *S. pavanii* LMG 25348<sup>T</sup> (Fig. 59a), cepas cuyas secuencias de nucleótidos del gen 16S ARNr comparten un 99,57 y 99,79% de similitud, respectivamente, con *P. geniculata*. Estos resultados concuerdan con el análisis filogenético de MLSA (concatenación de genes 16S ARNr y *gyrB*) (Fig. 59b) y con el árbol filogenómico de UBCG (Fig. 59c).

*P. geniculata* ATCC 19374<sup>T</sup> comparte su ácido graso mayoritario (*iso* C<sub>15:0</sub>) con las cepas más cercanas de *Stenotrophomonas*, lo cual la diferencia de la cepa tipo de *P. aeruginosa*, cuyo ácido graso mayoritario es C<sub>18:1</sub> ω7c (Xiao et al., 2009; Ramos et al., 2011). De la misma manera, *P. geniculata* es oxidasa negativa, al igual que las *Stenotrophomonas* más cercanas, lo cual la diferencia del resultado positivo para *P. aeruginosa*. Por otro lado, *P. geniculata* ATCC 19374<sup>T</sup> difiere en otros muchos test fenotípicos con respecto a *S. maltophila* y *S. pavanii*, lo cual la diferencia de estas especies: a diferencia de *S. maltophila*, *P. geniculata* no es capaz de asimilar lactosa, sacarosa y gentobiosa, mientras que, al contrario que *S. pavanii*, puede asimilar débilmente D-glucosa, D-manosa, maltosa, D-fructosa y celobiosa. Además, los valores de ANIb y dDDH compartidos entre *P. geniculata* ATCC 19374<sup>T</sup> y las cepas de *Stenotrophomonas* están por debajo los umbrales utilizados típicamente para la delimitación de especies (Tabla 18) (Richter y Rosselló-Mora, 2009), aunque estos valores son más altos que los compartidos con cualquier *Pseudomonas*.

### El caso de *P. cissicola*

La cepa tipo de *P. cissicola* también se diferencia claramente de las especies de *Pseudomonas sensu stricto*.

La identificación de esta cepa en base a su secuencia nucleotídica del gen 16S ARNr la localiza en el género *Xanthomonas*. Tanto el árbol filogenético del 16S ARNr como el de los genes *housekeeping* (*gyrB*, *rpoD*, *dnaK* y *fyuA*) colocan a *P. cissicola* CCUG 18839<sup>T</sup> junto con *Xanthomonas citri* LMG9322<sup>T</sup> (Figura 60). De hecho, comparten valores de dDDH y de ANIb del 86,70% y 98,30%, respectivamente, los cuales están por encima del límite sugerido para diferenciación de especies (Tabla 19) (Richter y Rosselló-Mora, 2009), lo cual sugiere que ambas cepas pertenecen a la misma especie.

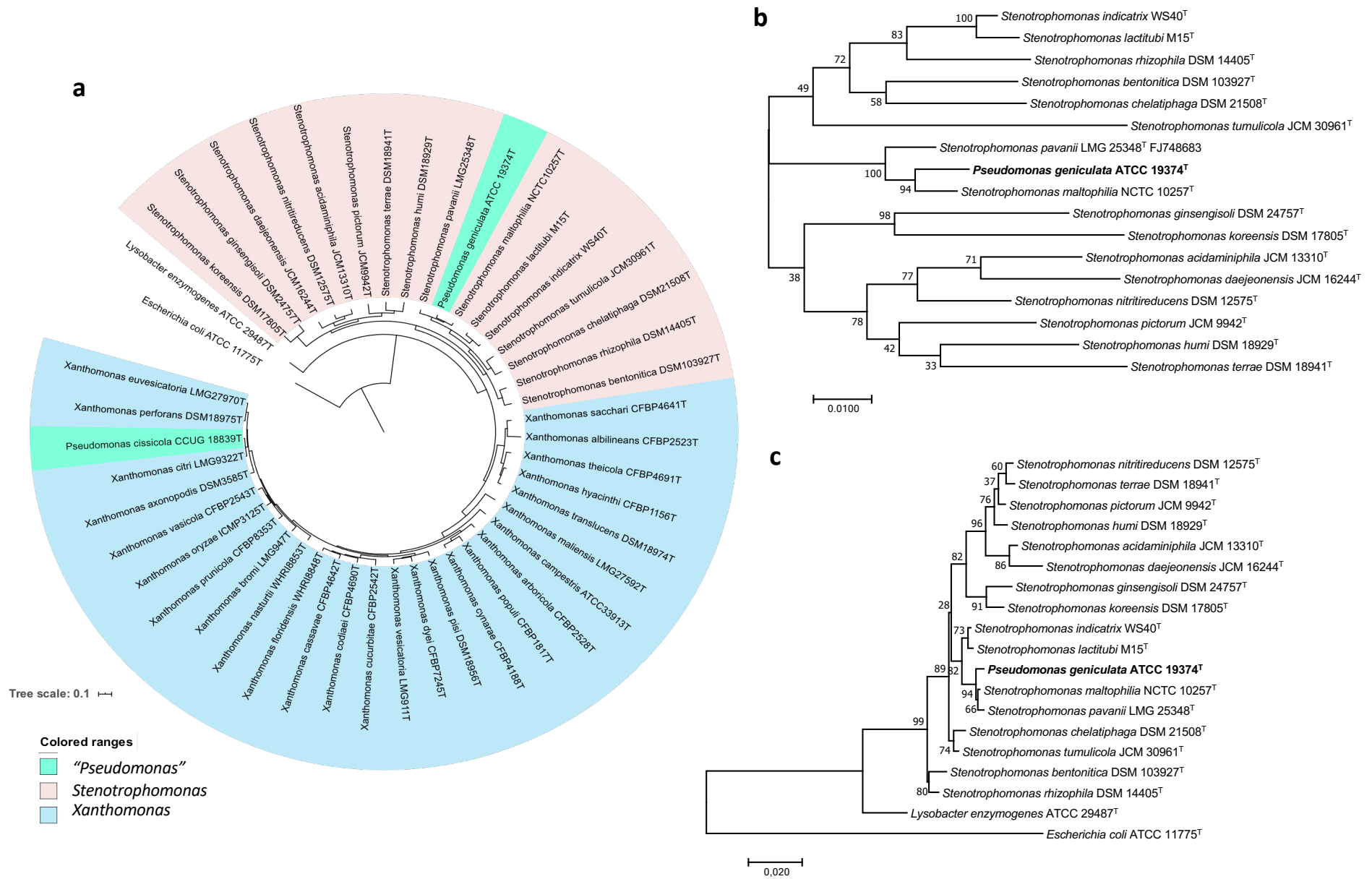
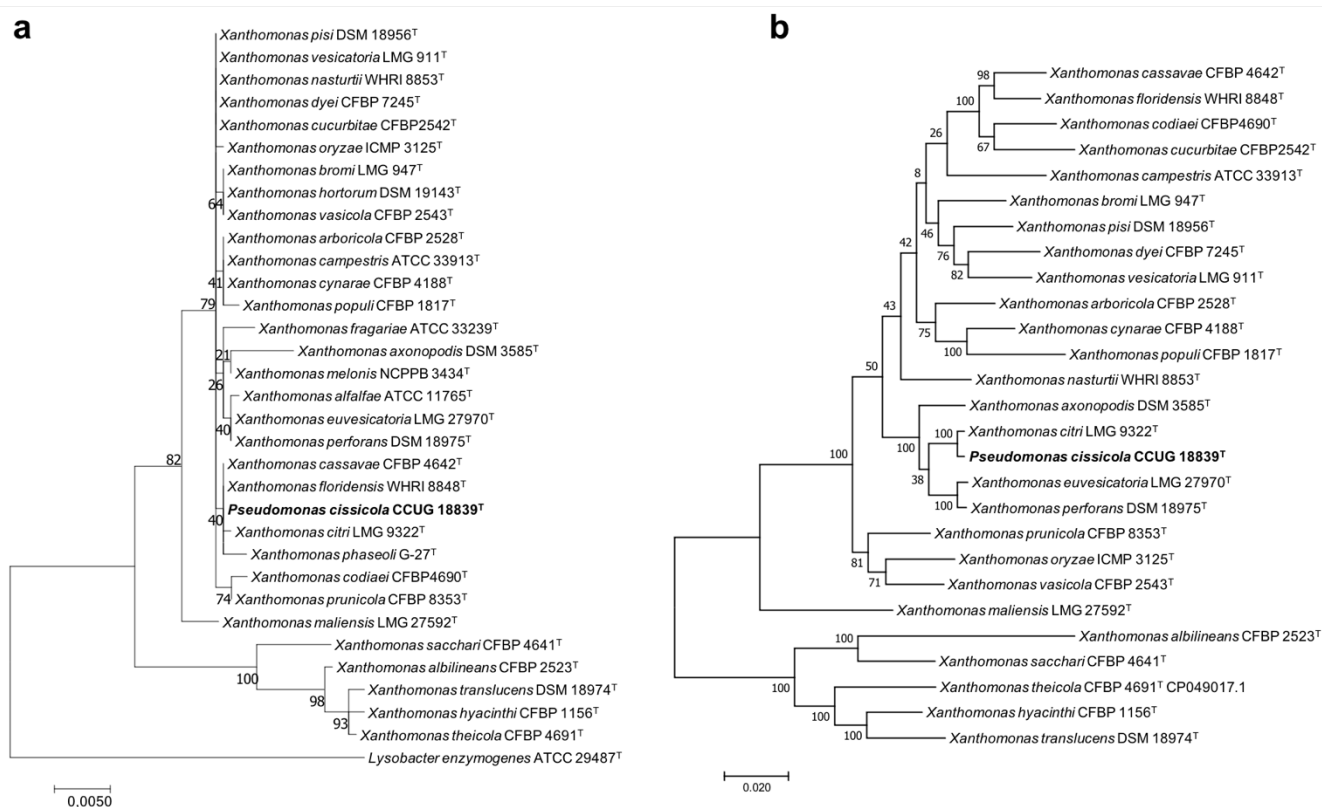


Figura 59: árboles filogenéticos construidos para el estudio del emplazamiento filogenético de *P. geniculata* ATCC 19374<sup>T</sup> en base (a) 92 genes “housekeeping”, (b) concatenación de genes 16S ARNr y *gyrB* y (c) el gen 16S ARNr. Las escalas hacen referencia al número de sustituciones por 100 nucleótidos.



**Figura 60:** Árboles filogenéticos utilizados para el estudio de la cepa *P. cissicola* CCUG 18839<sup>T</sup> en base a **(a)** las secuencias de los genes 16S ARNr y **(b)** a la concatenación de las secuencias de los genes 16S ARNr, *gyrB*, *rpoD*, *dnaK* y *fyuA*. Las escalas hacen referencia al número de sustituciones por 100 nucleótidos.

En lo referente a las pruebas fenotípicas, *P. cissicola* CCUG 18839<sup>T</sup> tiene un perfil metabólico más similar a sus especies filogenéticamente más cercanas (*X. campestris*, *X. citri*, *X. euvesicatoria* y *X. perforans*) que a las cepas tipo de *Pseudomonas* (Gabriel et al., 1989; Hu et al., 1991; 1997; Finkman et al., 2000; Gardan et al., 2000; Busse et al., 2002; Jones et al., 2004; Clark et al., 2006; Xiao et al., 2009; Palleroni, 2015; Saddler y Bradbury, 2015; Triplett et al., 2015). Además, la secuencia del gen ribosómico 16S ARNr comparte más del 99,93% de similitud con 12 cepas tipo del género *Xanthomonas*. El ácido graso principal en *P. cissicola* y las especies más próximas de *Xanthomonas* es *iso* C<sub>15:0</sub>, el cual no es el ácido graso principal de la cepa tipo de *P. aeruginosa* (C<sub>18:1</sub> ω7c) (Xiao et al., 2009). *P. cissicola* CCUG 18839<sup>T</sup> se diferencia también de esta última cepa en su capacidad para metabolizar distintos nutrientes, puesto que, a diferencia de *P. aeruginosa* KCTC 1750<sup>T</sup>, es capaz de utilizar D-galactosa, sacarosa, celobiosa, gentibiosa y trehalosa, pero no de usar D-manitol.

Tabla 18. Valores de ANIb compartidos entre cepas tipo de especies filogenéticamente cercanas a *P. geniculata* ATCC 19374<sup>T</sup>

	<i>S. rhizophila</i> DSM14405 <sup>T</sup>	<i>S. pavanii</i> LMG25348 <sup>T</sup>	<i>S. nitritireducens</i> DSM12575 <sup>T</sup>	<i>S. koreensis</i> DSM17805 <sup>T</sup>	<i>P. geniculata</i> ATCC 19374 <sup>T</sup>	<i>S. pictorum</i> JCM9942 <sup>T</sup>	<i>S. ginsengisoli</i> DSM24757 <sup>T</sup>	<i>S. daejeonensis</i> JCM16244 <sup>T</sup>	<i>S. bentonitica</i> DSM103927 <sup>T</sup>	<i>S. indicatrix</i> WS40 <sup>T</sup>	<i>S. acidaminiphila</i> JCM13310 <sup>T</sup>	<i>S. humi</i> DSM18929 <sup>T</sup>	<i>S. lactitubi</i> M15 <sup>T</sup>	<i>S. chelatiphaga</i> DSM21508 <sup>T</sup>	<i>S. maltophilia</i> NCTC10257 <sup>T</sup>	<i>S. terrae</i> DSM18941 <sup>T</sup>	<i>S. tumulicola</i> JCM30961 <sup>T</sup>
<i>S. rhizophila</i> DSM14405 <sup>T</sup>	100	81,9	81,1	77,9	81,9	80,3	78,1	81,1	85,5	82,0	81,0	79,9	81,8	81,7	81,9	79,9	81,2
<i>S. pavanii</i> LMG25348 <sup>T</sup>	81,9	100	80,8	77,7	90,9	79,7	77,8	80,8	81,9	86,8	80,8	79,3	86,8	82,5	91,0	79,5	82,1
<i>S. nitritireducens</i> DSM12575 <sup>T</sup>	81,1	81,0	100	78,8	80,9	83,9	78,8	86,8	81,5	80,7	89,8	82,6	80,6	80,4	81,1	82,7	79,9
<i>S. koreensis</i> DSM17805 <sup>T</sup>	78,0	77,9	78,9	100	77,9	78,2	84,5	78,8	77,8	77,8	78,8	77,7	77,7	77,6	78,0	78,1	77,2
<i>P. geniculata</i> ATCC 19374 <sup>T</sup>	81,7	90,8	80,8	77,9	100	79,9	77,9	80,7	81,9	86,8	80,6	79,4	86,9	82,3	92,4	79,4	82,1
<i>S. pictorum</i> JCM9942 <sup>T</sup>	80,1	79,8	84,0	78,0	79,8	100	78,2	83,1	80,2	79,7	83,1	82,9	79,5	79,3	79,9	83,4	79,1
<i>S. ginsengisoli</i> DSM24757 <sup>T</sup>	78,2	78,1	78,9	84,5	78,1	78,2	100	78,8	77,9	77,9	78,7	77,7	77,8	77,7	78,0	78,1	77,4
<i>S. daejeonensis</i> JCM16244 <sup>T</sup>	81,1	81,0	86,9	78,9	80,8	83,1	78,8	100	81,1	80,6	86,5	82,7	80,5	80,4	80,8	82,6	80,0
<i>S. bentonitica</i> DSM103927 <sup>T</sup>	85,5	81,9	81,5	77,6	81,9	80,2	77,8	81,0	100	81,8	81,2	79,6	81,9	81,4	81,8	79,7	81,0
<i>S. indicatrix</i> WS40 <sup>T</sup>	81,9	86,8	80,6	77,7	86,9	79,6	77,7	80,6	81,6	100	80,5	79,4	93,5	82,5	86,8	79,5	82,0
<i>S. acidaminiphila</i> JCM13310 <sup>T</sup>	80,8	80,8	89,8	78,7	80,6	83,0	78,6	86,4	81,2	80,5	100	82,4	80,7	80,1	80,8	82,3	79,7
<i>S. humi</i> DSM18929 <sup>T</sup>	79,8	79,4	82,7	77,6	79,4	83,0	77,7	82,5	79,6	79,4	82,4	100	79,3	79,1	79,5	83,5	78,8
<i>S. lactitubi</i> M15 <sup>T</sup>	81,7	86,8	80,4	77,5	86,9	79,5	77,6	80,3	81,8	93,4	80,5	79,2	100	82,5	86,8	79,4	82,1
<i>S. chelatiphaga</i> DSM21508 <sup>T</sup>	81,7	82,5	80,4	77,7	82,4	79,4	77,7	80,4	81,5	82,6	80,3	79,1	82,5	100	82,5	79,2	84,9
<i>S. maltophilia</i> NCTC10257 <sup>T</sup>	81,9	91,0	81,0	78,0	92,5	80,2	78,0	80,9	82,0	86,8	80,9	79,5	86,8	82,6	100	79,7	82,3
<i>S. terrae</i> DSM18941 <sup>T</sup>	79,9	79,6	82,8	78,0	79,6	83,4	77,9	82,5	79,7	79,6	82,4	83,4	79,5	79,2	79,6	100	78,7
<i>S. tumulicola</i> JCM30961 <sup>T</sup>	81,0	82,1	80,0	77,4	82,0	79,1	77,3	79,8	81,0	82,0	79,7	78,7	82,0	84,7	82,2	78,8	100

Tabla 19. Valores de ANIb compartidos entre cepas tipo de especies filogenéticamente cercanas a *P. cissicola* CCUG 18839<sup>T</sup>

	<i>X. oryzae</i> ICMP3125 <sup>T</sup>	<i>X. codiae</i> CFBP4690 <sup>T</sup>	<i>X. maliensis</i> LMG27592 <sup>T</sup>	<i>X. cassavae</i> CFBP4642 <sup>T</sup>	<i>X. bromi</i> LMG947 <sup>T</sup>	<i>X. cucurbitae</i> CFBP2542 <sup>T</sup>	<i>X. dyei</i> CFBP7245 <sup>T</sup>	<i>X. prunicola</i> CFBP8353 <sup>T</sup>	<i>X. hyacinthi</i> CFBP1156 <sup>T</sup>	<i>X. albilineans</i> CFBP2523 <sup>T</sup>	<i>X. citri</i> LMG9322 <sup>T</sup>	<i>X. campestris</i> ATCC33913 <sup>T</sup>	<i>X. cynarae</i> CFBP4188 <sup>T</sup>	<i>X. euvesicatoria</i> LMG27970 <sup>T</sup>	<i>X. floridensis</i> WHRI8848 <sup>T</sup>	<i>X. vasicola</i> CFBP2543 <sup>T</sup>	<i>X. arboricola</i> CFBP2528 <sup>T</sup>	<i>X. translucens</i> DSM18974 <sup>T</sup>	<i>X. sacchari</i> CFBP4641 <sup>T</sup>	<i>X. axonopodis</i> DSM3585 <sup>T</sup>	<i>X. nasturtii</i> WHRI8853 <sup>T</sup>	<i>Pseudomonas cissicola</i> CCUG 18839 <sup>T</sup>	<i>X. pisi</i> DSM18956 <sup>T</sup>	<i>X. perforans</i> DSM18975 <sup>T</sup>	<i>X. theicola</i> CFBP4691 <sup>T</sup>	<i>X. vesicatoria</i> LMG911 <sup>T</sup>	<i>X. populi</i> CFBP1817 <sup>T</sup>
<i>X. oryzae</i> ICMP3125 <sup>T</sup>	100	86,3	82,6	86,6	89,2	85,6	86,2	91,1	79,6	77,9	90,0	84,9	86,5	89,9	86,4	91,2	86,9	80,0	79,4	89,6	88,8	89,8	86,4	90,0	79,6	86,0	85,6
<i>X. codiae</i> CFBP4690 <sup>T</sup>	86,1	100	83,2	91,6	86,5	89,2	87,1	86,2	80,7	78,4	86,2	85,5	86,2	86,5	91,4	86,0	87,0	80,7	80,3	86,2	87,0	86,3	87,4	86,4	80,5	87,2	85,7
<i>X. maliensis</i> LMG27592 <sup>T</sup>	82,6	83,1	100	82,9	82,4	82,5	82,5	82,2	79,9	77,8	82,6	82,8	82,6	82,9	82,9	82,5	83,3	79,9	79,7	82,8	82,8	82,5	82,7	83,0	79,7	82,4	82,1
<i>X. cassavae</i> CFBP4642 <sup>T</sup>	86,4	91,6	83,0	100	86,8	89,2	87,4	86,5	80,4	78,1	86,8	85,7	86,6	87,1	93,1	86,3	87,7	80,4	80,2	86,5	87,2	86,8	87,8	87,1	80,2	87,4	85,9
<i>X. bromi</i> LMG947 <sup>T</sup>	89,3	86,6	82,6	86,8	100	86,0	86,9	89,5	80,0	77,9	89,2	85,2	86,7	89,2	86,9	89,4	87,0	80,1	79,6	89,2	88,8	89,2	86,9	89,1	79,8	86,9	86,0
<i>X. cucurbitae</i> CFBP2542 <sup>T</sup>	85,5	89,2	82,8	89,1	86,1	100	86,5	85,5	80,1	77,9	85,7	85,1	85,6	85,9	89,5	85,5	86,3	80,3	80,0	85,6	86,2	85,7	86,9	85,9	79,9	86,7	85,0
<i>X. dyei</i> CFBP7245 <sup>T</sup>	86,1	87,0	82,5	87,3	86,8	86,4	100	86,5	79,9	77,9	86,2	85,5	86,8	86,4	88,0	86,0	86,9	80,2	79,6	86,0	87,3	86,2	91,1	86,2	79,8	90,3	86,2
<i>X. prunicola</i> CFBP8353 <sup>T</sup>	91,0	86,1	82,3	86,4	89,3	85,4	86,5	100	79,6	77,4	89,6	85,0	86,6	89,7	86,6	90,9	87,0	79,7	89,3	88,7	89,6	87,6	89,6	79,3	86,3	86,0	86,0
<i>X. hyacinthi</i> CFBP1156 <sup>T</sup>	79,6	80,7	80,0	80,3	79,9	80,2	79,9	79,6	100	83,6	79,9	80,1	80,0	80,0	80,4	79,4	80,6	92,3	87,6	79,8	80,1	79,9	80,1	80,0	90,5	79,8	79,6
<i>X. albilineans</i> CFBP2523 <sup>T</sup>	78,0	78,5	78,0	78,3	77,9	78,0	78,0	77,6	83,8	100	78,0	78,1	78,0	78,0	78,2	77,8	78,4	83,5	84,2	78,0	78,1	78,0	78,1	78,0	83,3	78,0	77,7
<i>X. citri</i> LMG9322 <sup>T</sup>	89,8	86,3	82,7	86,8	89,1	85,7	86,3	89,6	79,9	77,9	100	85,0	86,5	93,9	86,4	89,8	87,0	79,9	79,6	92,8	88,7	98,3	86,5	94,0	79,7	86,0	86,0
<i>X. campestris</i> ATCC33913 <sup>T</sup>	84,9	85,5	82,8	85,6	85,1	85,0	85,5	85,1	80,1	78,0	85,1	100	85,9	85,2	85,6	84,9	86,2	80,4	79,8	84,9	85,5	85,2	85,5	85,2	79,9	85,3	85,1
<i>X. cynarae</i> CFBP4188 <sup>T</sup>	86,4	86,2	82,6	86,5	86,6	85,6	86,8	86,6	80,0	77,9	86,5	85,8	100	86,5	86,5	86,3	89,4	80,2	79,6	86,3	87,4	86,6	87,0	86,4	79,8	86,3	90,7
<i>X. euvesicatoria</i> LMG27970 <sup>T</sup>	90,0	86,6	83,2	86,9	89,2	85,9	86,4	89,7	80,2	78,2	93,9	85,3	86,7	100	86,7	89,9	87,1	80,4	80,0	92,7	88,7	94,0	86,7	98,5	80,1	86,2	86,1
<i>X. floridensis</i> WHRI8848 <sup>T</sup>	86,2	91,5	83,0	93,1	86,8	89,5	88,0	86,6	80,4	78,2	86,5	85,6	86,5	86,7	100	86,1	87,2	80,5	80,1	86,2	87,2	86,4	88,9	86,6	80,1	87,9	85,8
<i>X. vasicola</i> CFBP2543 <sup>T</sup>	91,2	86,1	82,6	86,3	89,4	85,4	86,1	91,0	79,5	77,7	89,9	84,9	86,4	90,0	86,2	100	86,7	79,8	79,3	89,4	88,7	89,9	86,3	90,0	79,3	86,0	85,8
<i>X. arboricola</i> CFBP2528 <sup>T</sup>	86,7	86,9	83,2	87,7	86,9	86,3	87,0	87,1	80,6	78,3	86,9	86,1	89,4	87,0	87,2	86,7	100	80,7	80,2	86,6	87,6	87,0	87,8	86,9	80,3	86,8	88,5
<i>X. translucens</i> DSM18974 <sup>T</sup>	79,8	80,6	80,1	80,3	79,9	80,2	80,1	79,9	92,2	83,5	79,9	80,2	80,0	80,3	80,4	79,8	80,7	100	87,0	79,9	80,2	80,2	80,2	79,9	89,8	80,0	79,7
<i>X. sacchari</i> CFBP4641 <sup>T</sup>	79,4	80,3	79,9	80,1	79,5	79,9	79,6	79,4	87,4	84,2	79,7	79,8	79,6	80,0	80,0	79,2	80,3	87,0	100	79,5	79,7	79,7	79,9	79,8	86,7	79,4	79,2
<i>X. axonopodis</i> DSM3585 <sup>T</sup>	89,5	86,2	82,9	86,5	89,1	85,5	86,1	89,3	79,7	77,9	92,8	84,9	86,3	92,8	86,3	89,4	86,7	80,0	79,5	100	88,5	92,7	86,3	92,8	79,7	86,0	85,7
<i>X. nasturtii</i> WHRI8853 <sup>T</sup>	88,7	87,0	82,8	87,1	88,9	86,3	87,4	88,7	80,1	78,0	88,7	85,7	87,4	88,7	87,2	88,7	87,6	80,4	79,7	88,6	100	88,7	87,7	88,7	79,9	87,4	86,7
<i>P. cissicola</i> CCUG 18839 <sup>T</sup>	89,8	86,2	82,6	86,7	89,1	85,7	86,2	89,7	79,9	77,8	98,3	85,1	86,6	94,0	86,5	90,0	87,0	80,3	79,7	92,7	88,6	100	86,5	94,0	79,9	86,0	86,0
<i>X. pisi</i> DSM18956 <sup>T</sup>	86,3	87,4	82,8	87,7	86,9	86,9	91,1	87,6	80,1	77,9	86,5	85,5	87,0	86,6	89,0	86,2	87,8	80,2	79,7	86,5	87,6	86,6	100	86,6	80,0	90,1	86,3
<i>X. perforans</i> DSM18975 <sup>T</sup>	89,9	86,5	83,1	87,0	89,1	85,9	86,3	89,7	80,0	78,0	94,0	85,2	86,5	98,6	86,6	89,9	86,9	80,1	79,7	92,9	88,8	94,0	86,6	100	79,9	86,2	86,0
<i>X. theicola</i> CFBP4691 <sup>T</sup>	79,8	80,6	79,9	80,4	79,8	80,0	79,9	79,6	90,4	83,3	79,8	80,0	79,7	80,1	80,5	79,5	80,5	90,0	87,0	80,0	80,2	79,9	80,3	80,1	100	79,8	79,6
<i>X. vesicatoria</i> LMG911 <sup>T</sup>	85,9	87,2	82,5	87,4	86,8	86,5	90,4	86,3	79,8	77,8	86,1	85,2	86,3	86,1	87,9	85,9	86,8	80,0	79,4	85,9	87,3	86,1	90,1	86,1	79,6	100	85,7
<i>X. populi</i> CFBP1817 <sup>T</sup>	85,8	85,7	82,2	85,9	85,9	85,0	86,1	86,0	79,6	77,7	85,9	85,1	90,8	86,1	85,8	85,8	88,5	79,8	79,2	85,7	86,7	86,1	86,3	86,0	79,6	85,7	100



### El caso de *P. caeni*

*P. caeni* DMS 24390<sup>T</sup> está localizada en una rama propia bien diferenciada del resto de especies de los distintos géneros incluidas en los árboles filogenéticos llevados a cabo en este trabajo (Figura 57y Figura 61). Sus cepas tipo más cercanas son *Entomomonas moraniae* QZS01<sup>T</sup> y *Oblitimonas alkaliphila* B4199<sup>T</sup>. Sin embargo, la longitud de la rama de *P. caeni* sugiere una distancia evolutiva muy grande frente a las especies más próximas. Esto es reflejado también en la baja similitud encontrada entre la secuencia de nucleótidos de su gen 16S ARNr y el de otras cepas tipo, siendo *P. oleovorans* subsp. *oleovorans* DSM1045<sup>T</sup> la cepa con la que guarda una mayor similitud (95,82%).

El análisis de los valores OGRI también indica una gran distancia respecto a otros genomas secuenciados de la familia *Pseudomonadaceae* (ANIb 73,44%; dDDH < 33,70%).

Por otro lado, existen muchas diferencias entre las pruebas fenotípicas de *P. caeni* DMS 24390<sup>T</sup> y los géneros más próximos, las cuales residen en la diferenciada asimilación o hidrólisis de nutrientes, la composición de los principales ácidos grasos de la membrana y de las quinonas respiratorias mayoritarias y el tamaño celular, entre otras (Tabla 20).

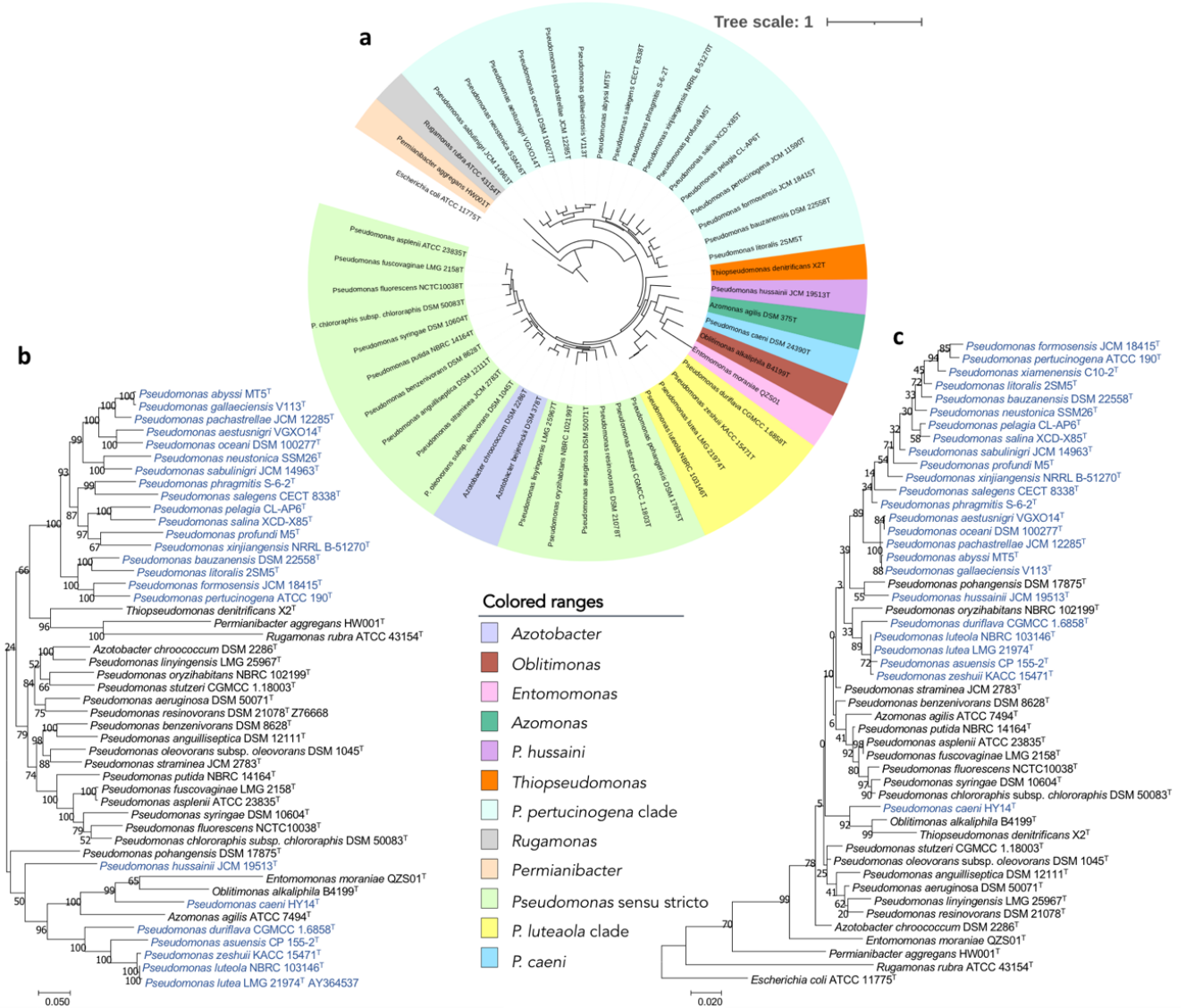
### El caso del clado de *P. pertucinogena*

Tal y como ha sido reseñado anteriormente, las especies pertenecientes al clado de *P. pertucinogena* (*P. neustonica*, *P. sabulinigri*, *P. oceani*, *P. aestusnigri*, *P. pachastrellae*, *P. abyssi*, *P. gallaeciensis*, *P. phragmitis*, *P. salegens*, *P. litoralis*, *P. bauzanensis*, *P. formosensis*, *P. pertucinogena*, *P. pelagia*, *P. salina*, *P. profundus* y *P. xinjiangensis*) se diferencian claramente de otras *Pseudomonas* y géneros próximos. En consecuencia, se ha estudiado en profundidad su emplazamiento filogenético dentro de la familia *Pseudomonadaceae*. Los árboles filogenéticos basados en las secuencias genómicas, en los genes 16S ARNr y *housekeeping* concatenados (16S ARNr, *gyrB*, *rpoB*, *rpoD*) concuerdan en localizar a las cepas tipo de estas especies en un clado diferenciado de cualquier género de la familia *Pseudomonadaceae* (Figura 61).

Las similitudes entre las secuencias genómicas de las cepas tipo de las especies del clado de *P. pertucinogena* con los genomas de las cepas tipo de especies de los géneros relacionados fueron analizadas, encontrándose una divergencia sustancial con todos ellos en lo relativo a los valores ANIb y dDDH. Todos los valores de ANIb compartidos entre *P. pertucinogena* JCM 1159<sup>T</sup> y los clados externos son menores del 75%, mientras que en el caso del dDDH salvo el caso de *Oblitimonas alkaliphila* B4199<sup>T</sup> (28,9%), el resto de los valores son menores al 24,5%.

En cuanto a la secuencia del gen 16S ARNr, ninguna cepa tipo de otros géneros ni de otros clados de *Pseudomonas* comparte más del 95% de similitud con *P. pertucinogena* JCM 1159<sup>T</sup>.

Además, en base a búsquedas bibliográficas, se han comparado los perfiles fenotípicos y quimiotaxonómicos de las cepas tipo de este clado filogenético con los de las cepas tipo de géneros distintos de la familia *Pseudomonadaceae*. Se han encontrado diferencias relevantes que han sido resumidas en la Tabla 20, las cuales incluyen diferencias en actividades enzimáticas, asimilación o hidrólisis de nutrientes, así como en los ácidos grasos de membrana mayoritarios o en las quinonas respiratorias principales.



**Figura 61:** Árboles filogenéticos utilizados para estudiar el emplazamiento taxonómico de las cepas tipo más distantes del género *Pseudomonas* en base a (a) 92 genes “housekeeping”, (b) la concatenación de las secuencias de los genes 16S ARNr, *gyrB*, *rpoB* y *rpoD* y (c) las secuencias de los genes 16S ARNr. Las escalas hacen referencia al número de sustituciones por 100 nucleótidos.

**Tabla 20.** Diferencias fenotípicas entre los nuevos géneros descritos y sus las especies tipo de los géneros más próximos. Cepas **1.** *Entomomonas moraniae* QZS01T (Wang et al., 2020); **2.** *Oblitimonas alkaliphila* B4199T (Drobish et al., 2016) ; **3.** *Permianibacter aggregans* HW001T (Wang et al., 2014); **4.** *Pseudomonas aeruginosa* RH 815<sup>T</sup> (Lin et al., 2013; Wang et al., 2014; Palleroni et al., 2015; Wang et al., 2020); **5.** *Rugamonas rubra* ATCC 43154<sup>T</sup> (Austin y Moss, 1986; Moss y Austin, 2015; Gu et al., 2017); **6.** *Thiopseudomonas denitrificans* X2<sup>T</sup> (Tan et al., 2015); **7.** *Azomonas agilis* DSM 375<sup>T</sup> (Kennedy y Rudnick, 2015); **8.** *Azotobacter chroococcum* DSM 2286<sup>T</sup> (Page y Shivprasad, 1991; Kenedy et al., 2015; Liu et al., 2019); **9.** *Azorhizophilus paspali* ATCC 23833<sup>T</sup> (Kenedy et al., 2015; Liu et al., 2019); **10.** *Mesophilobacter marinus* 14S-4<sup>T</sup> (Nishimura et al., 1989; Editorial Board, 2015); **11.** Consenso del clado de *P. pertucinogena* (Kawai and Yabuuchi, 1975; Hwang et al., 2009; Kim et al., 2009; Zang et al., 2011; Pascual et al., 2012; Lin et al., 2013; Amoozegar et al., 2014; Sánchez et al., 2014; Zhong et al., 2015; Wang et al., 2016; Mulet et al., 2018; Sun et al., 2018; Wei et al., 2018; Jang et al., 2020); **12.** *P. caeni* DMS 24390<sup>T</sup>; **13.** Consenso del clado de *Pseudomonas luteola* (Peix et al., 2004; Romanenko et al., 2005; Liu et al., 2008; Feng et al., 2012; Palleroni, 2015); **14.** *Pseudomonas hussaini* CC-AMH-11<sup>T</sup> (Hameed et al., 2014). ND = Sin datos. Los valores entre paréntesis indican que existen resultados positivos o negativos entre distintas cepas. \*Valores variables entre cepas. En los casos posibles, los valores de G+C mol (%) han sido obtenidos de las secuencias de sus genomas.

	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>
G+C (%)	38,05	47,4	55,4	66,5	67,0	59,0	51,8	66,1	63.2-65.6	45.0	56,2-62,7	48.2	55,3-54,1	58,8
Catalasa	ND	+	-	+	+	+	+	+	ND	+	+	+	+	+
Anaerobio facultativo	+	-	-	-	-	+	-**	ND	ND	-	ND	-	-	+
Tamaño (µm)	0.5-1.5	1-2	1.6-2.7	ND	2.4-4	1.0-1.5	2.4	3-5	5-10	0.8-15	0.3-2.6	1.0-2.0	0.7-3.2	1.3-1.9
Crecimiento:														
Temperatura (°C)	15-40	10-42	25-45	7-42	4-30	10-37	9-37	14-37	14-37	5-37	4-50	4-37	5-42*	15-40
pH	5-9	6-11	6-10	5-10	5-9	6-10	ND	6.2-9.0	6-8		4-11	6-10	5-9	6-8
Salinidad (%)	0-3	0-8	2-8	0-6	0-0.5	0-3	ND	0-2%	ND	-7	0-18	0-3	0-6.5*	0-5
Actividades enzimáticas:														
Nitratos a nitritos	+	-	ND	+	+	+	-	+	-	+	(-)	+	(+)	+
Ureasa	+	-	-	+	+	-	ND	+	+	w	(-)	-	(-)	ND
Producción de indol	-	-	ND	ND	-	-	ND	ND	ND	w	-	-	-	-
Hidrólisis de:														
L-Arginina	-	ND	ND	+	-	-	ND	ND	ND	ND	-	-	(+)	-
Gelatina	-	-	ND	+	+	+	ND	-	ND	w	-	-	-	+
Aesculina	-	-	ND	ND	+	-	ND	ND	ND	ND	ND	-	+	-
Asimilación de:														
D-Glucosa	-	+	+	+	+	-	ND	+	+	+	-	-	+	+
L-Arabinosa	-	+	-	-	+	-	ND	+	ND	ND	-	-	+	-
D-Arabinosa	ND	+	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	-	+	ND
D-Manosa	-	+	-	-	+	-	ND	-	ND	ND	-	-	(+)	-
D-Manitol	-	-	-	+	ND	-	-	+	-	+	-	-	(+)	-
L-Triptófano	-	ND	ND	w	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	-	ND	ND
N-Acetil-glucosamina	-	-	ND	+	-	-	ND	-	ND	ND	-	-	ND	-
Maltosa	-	-	+	-	+	-	w	+	+	+	-	-	+	+
Gluconato potásico	-	-	+	+	+	-	ND	ND	ND	ND	-	-	+	-
Caprato	-	ND	ND	+	ND	-	ND	+	-	ND	(+)	+	+	+
Adipato	-	ND	+	+	ND	-	ND	ND	ND	ND	(+)	-	ND	+
Malato	-	ND	-	+	ND	+	+	+	+	ND	(+)	+	+	-
Citrato de trisodio	-	-	-	+	+	-	ND	ND	ND	ND	(-)	ND	+	-
D-Galactosa	ND	+	ND	-	+	ND	-	-	ND	ND	-	ND	+	ND
D-Ribosa	ND	+	ND	+	+	ND	ND	ND	ND	+	-	ND	+	ND

L-Rhamnosa	ND	+	ND	-	ND	ND	ND	-	-	ND	-	ND	(+)	ND
Lactosa	-	-	ND	-	+/-	ND	ND	+	+	ND	-	ND	-	ND
Sacarosa	ND	-	+	-	+	ND	+	+	+	+	-	ND	-	ND
D-fructosa	ND	-	-	+	+	ND	+	+	-	+	-	ND	(+)	ND
Celobiosa	ND	-	+	-	+	ND	ND	+	ND	+	-	ND	+/-	ND
Almidón	ND	-	+	-	-	ND	-	+	-	ND	-	-	(-)	ND
Ácido graso mayoritario(%)	C <sub>18:1 w7c</sub> (28,2)	C <sub>18:1 w7c</sub> (34,5)	C <sub>15:0</sub> (29,2)	C <sub>18:1 w7c</sub> (38,9)	C <sub>16:1w7c/</sub> C <sub>16:1w6c</sub> (52,1)	C <sub>16:0</sub> (29,1)	ND	C <sub>16:1w9c</sub> (27,1)	ND	ND	Summed feature 8+	C <sub>16:1w7c/</sub> C <sub>16:1w6c</sub> (38,3)	C <sub>18:1 w7c</sub> *	C <sub>16:0</sub> (15,3)
Quinona respiratoria mayoritaria	Q-8	Q-9	Q-8	ND	ND	Q-8	ND	Q-9	ND	Q-8	Q-9	Q-9	Q-9	Q-9

### El caso del clado de *P. luteola*

Las filogenias basadas en el gen 16S ARNr, en el MLSA (16S ARNr, *gyrB*, *rpoB*, *rpoD*) y de los 92 genes seleccionados por el programa UBCG localizan a las cepas tipo de las especies *P. luteola*, *P. lutea*, *P. zeshuii* y *P. duriflava* en un clado diferenciado de cualquiera de los géneros restantes de la familia *Pseudomonadaceae* (Figuras 57 y 61).

Los valores de ANIb compartidos entre los genomas de las cepas tipo de las especies de este clado, con los de las cepas tipo de los clados filogenéticamente más próximos, son menores al 75%.

Además, la especie más cercana a este clado, *P. benzenivorans* DSM 8628<sup>T</sup>, solo comparte un 97,05% de similitud de secuencia del gen 16S ARNr, seguida por *P. capeferrum* WCS358<sup>T</sup> (96,98%).

Asimismo, estas especies muestran diferencias fenotípicas con otros géneros incluidos en la familia *Pseudomonadaceae* (Tabla 20), entre los que destacan sus resultados negativos para la prueba de la oxidasa.

Por otro lado, tres de las especies incluidas en este clado, *P. lutea* LMG 21974<sup>T</sup>, *P. zeshuii* KACC 15471<sup>T</sup> y *P. luteola* NBRC 103146<sup>T</sup>, aparecen en ramas muy próximas en los árboles filogenéticos realizados, por lo que se calcularon sus valores de OGRI para confirmar si pudieran representar una misma especie. Los valores obtenidos superan a los establecidos para delimitar especies:

- *P. lutea* – *P. luteola*: ANIb 99,99%, dDDH 100%
- *P. luteola* – *P. zeshuii*: ANIb 97,86%, dDDH 92,03%
- *P. lutea* – *P. zeshuii*: ANIb 97,86%, dDDH 91,96%

### El caso de *P. hussaini*

Al igual que en los casos anteriores, la cepa *P. hussaini* JMC 19513<sup>T</sup> se distancia claramente de los taxones más próximos en todos los árboles filogenéticos o filogenómicos creados (Figuras 57 y 61).

Las cepas tipo más cercanas en lo relativo a la similitud de secuencia del gen 16S ARNr son *P. mangrovi* TC11<sup>T</sup> (97,12%) y *P. guariconensis* LMG 27394<sup>T</sup> (96,16%).

Los valores de ANIb compartidos entre el genoma de *P. hussaini* JMC 19513<sup>T</sup> y los genomas de las cepas tipo de *Pseudomonas* y géneros próximos son todos inferiores al 75,3%.

Finalmente, sus características fenotípicas también diferencian a esta especie de sus géneros cercanos (Tabla 20).

### Casos de sinonimias

El estudio de los distintos árboles filogenéticos de este trabajo mostró diversos pares de nodos con muy baja divergencia entre especies (Figuras 57, 59, 60 y 61).

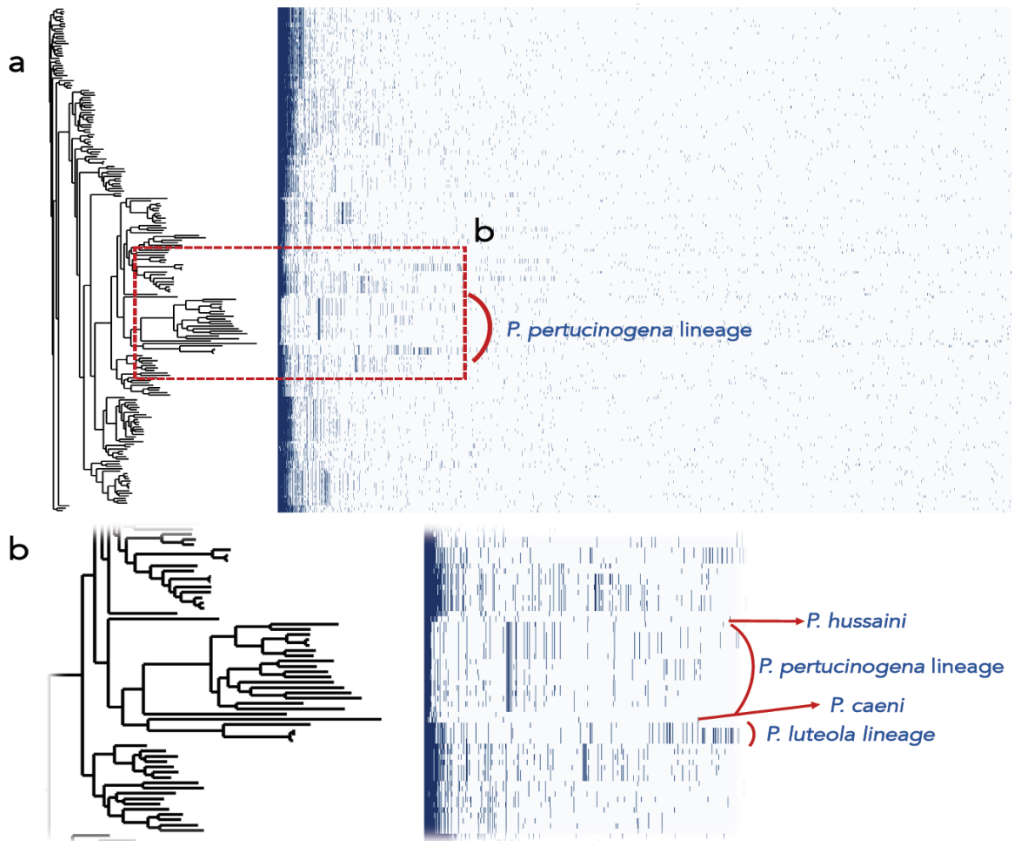
Así pues, para resolver la clasificación taxonómica de las especies incluidas en estos nodos, se han calculado los valores de ANIb y de dDDH de sus genomas, siendo superiores a los definidos para la delimitación de especies los siguientes casos:

- *P. abyssi* MT5<sup>T</sup> – *P. gallaeciensis* V113<sup>T</sup>: ANIb 97,57%, dDDH 80,10%
- *X. perforans* DSM18975<sup>T</sup> – *X. euvesicatoria* LMG27970<sup>T</sup>: ANIb 98,53%, dDDH 94,94%

### Genómica comparativa para el estudio de clados divergentes

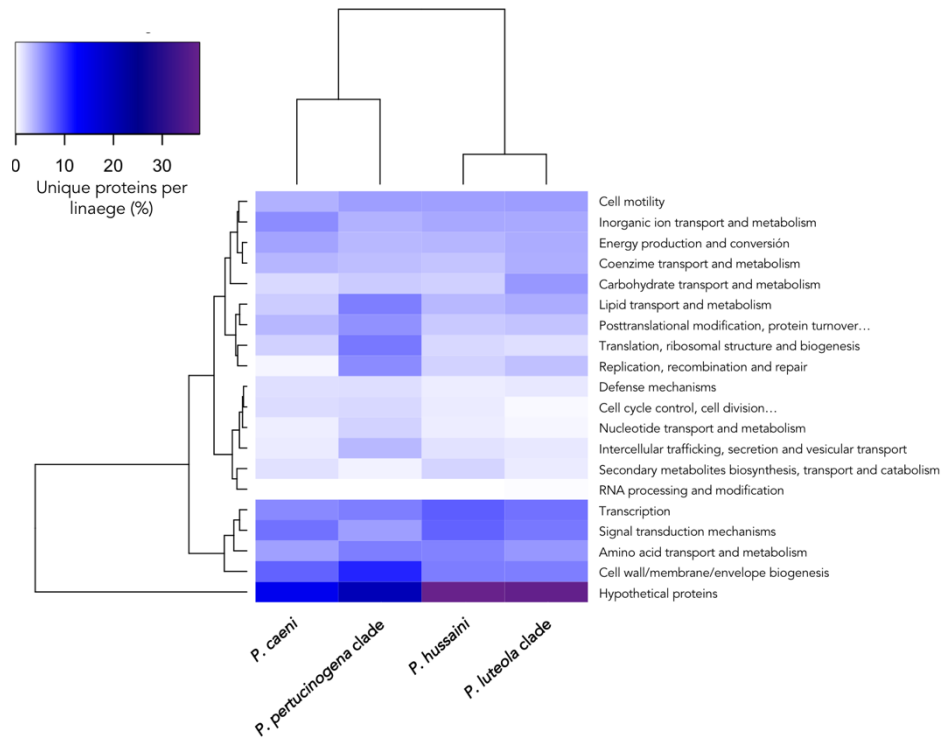
Con la finalidad de comparar las funciones (proteínas) codificadas por los genomas de distintas especies de *Pseudomonas*, se realizó un análisis de GWAS sobre *P. caeni*, *P. hussaini*, y de taxones pertenecientes a los clados de *P. pertucinogena* y de *P. luteola* frente a las *Pseudomonas sensu stricto*.

La construcción del pangenoma de estas especies detecta 164.714 familias proteicas (similitud de aminoácidos  $\geq 70\%$ ), para las cuales solo 327 proteínas estuvieron presentes en todos los taxones (genoma *core*). De estos grupos proteicos, el clado de *P. pertucinogena* tiene 316 que son únicos de su linaje, estando ausentes en otras *Pseudomonas* (Figura 62). *P. caeni* DSM 24390<sup>T</sup> tiene 1.462 proteínas únicas, *P. hussaini* JMC 19513<sup>T</sup> 1.784 y el linaje de *P. luteola* tiene 708 familias de proteínas exclusivas (Figura 62).



**Figura 7:** **a** Perfil de presencia/ausencia de funciones COGs en los genomas de las cepas tipo de *Pseudomonas* organizados según la filogenia de estas. **b** Ampliación que muestra los perfiles de los linajes que son sugeridos como nuevos taxones.

Estas proteínas únicas fueron asignadas a funciones COG, siendo muchas de ellas proteínas hipotéticas o anotadas en categorías relacionadas con el metabolismo de componentes de la membrana celular, de aminoácidos, de mecanismos de transducción o de transcripción (Figura 63). De manera opuesta, tal y como se ve en la Figura 62, hay bastantes familias de proteínas que están ausentes en los clados investigados, pero que están presentes en el resto de los genomas de este pangenoma.



**Figura 63:** *Heatmap* representando la cantidad de proteínas únicas, organizadas por categoría metabólica, en el pan-genoma de las cepas tipo de *Pseudomonas* de cada taxón o linaje que ha sido sugerido como nuevo taxón.



## Discusión

El género *Pseudomonas* es uno de los géneros bacterianos más diversos y ubicuos de la naturaleza. Sin embargo, muchas de sus especies han sido asignadas a este género exclusivamente en base a pruebas fenotípicas o a unas pocas secuencias génicas que no siempre han sido concluyentes a la hora de resolver de forma eficaz un emplazamiento taxonómico correcto.

En este trabajo, han sido utilizados como guía los datos genómicos de más de doscientos genomas de la familia *Pseudomonadaceae* para realizar una reorganización polifásica de la taxonomía en *Pseudomonas*. Los resultados presentados desvelan varios linajes de *Pseudomonas* que deberían ser considerados como taxones distintos.

Los casos más notorios de los resultados de este capítulo recaen en las especies *P. cissicola* y *P. geniculata*, las cuales están muy alejadas de las especies de *Pseudomonas sensu stricto*. Las aproximaciones filogenéticas y filogenómicas aquí presentadas localizan a ambas especies en los géneros *Xanthomonas* y *Stenotrophomonas*, respectivamente, los cuales no están tan si quiera en el orden *Pseudomonadales*, sino en otro orden de la clase de las *Gammaproteobacteria*, el orden *Lysobacterales*. Además, los datos fenotípicos y quimiotaxonómicos apoyan su cercanía con las especies de su entorno filogenético. Anteriormente, Anzai et al. (2000) notificaron que estas especies deberían pertenecer a un género distinto. Once años después, Ramos y colaboradores (2011) sugirieron que *P. geniculata* estaba mal clasificada y que debería estar localizada en el género *Stenotrophomonas*. En el caso de *P. cissicola*, Hu y col. reportaron en 1997 muchas similitudes fenotípicas y quimiotaxonómicas entre esta especie y el género *Xanthomonas*. Sin embargo, los autores declararon que se deberían investigar las secuencias genómicas de estos taxones para solucionar este problema taxonómico. Más tarde, en Parkinson et al. (2009) se realizaron estudios filogenéticos en los que *P. cissicola* fue localizada en el clado de *X. citri* subsp. *citri*. Al igual que para las especies de *Xanthomonas*, se ha reportado fitopatogenicidad para *P. cissicola*, la cual se transfirió desde *Aplanobacter cissicola* por Bulkholder en 1948 (Goto y Makino, 1977), especie que fue considerada como el agente causal de la enfermedad de la mancha foliar (*leaf spot disease*) en *Cayratia japonica*. En los resultados del presente capítulo, tanto los análisis del OGRI como los de los árboles filogenéticos basados en las secuencias genómicas, los genes 16S ARNr y *housekeeping* concatenados concuerdan con estas hipótesis. En base a lo expuesto, se sugiere una reclasificación efectiva de *P. geniculata* en *Stenotrophomonas geniculata* comb. nov. Además, debido a la gran similitud existente entre *P. cissicola* CCUG 18839<sup>T</sup> y *Xanthomonas citri* LMG9322<sup>T</sup> y debido a los valores encontrados de OGRI por encima de los límites del nivel de especie (Richter y Rosselló-Mora, 2009), también se sugiere que *P. cissicola* CCUG 18839<sup>T</sup> se considere como un sinónimo de la especie *X. citri*.

Respecto a *P. caeni* DMS 24390<sup>T</sup>, todos los resultados obtenidos distanciaron a esta cepa del resto de *Pseudomonas*, colocándola en un lugar independiente de cualquier género de la familia *Pseudomonadaceae*. De hecho, el tamaño de su genoma y su contenido en G+C son

extremadamente distantes de cualquiera de las otras cepas tipo del género *Pseudomonas*, un hecho que se ha reportado recientemente (Hesse et al., 2018). Dadas las diferencias genéticas, genómicas y fenotípicas mencionadas en los resultados del trabajo, se sugiere que *P. caeni* debe representar un género nuevo dentro de la familia *Pseudomonadaceae*, para el cual se propone el nombre *Denitrifimonas* siendo *Denitrifimonas caeni* gen. nov. comb. nov. su única especie y, a la vez, su especie tipo.

Los resultados presentados también sugieren la conformación de un género más amplio dentro de la familia *Pseudomonadaceae*, puesto que las especies *P. neustonica*, *P. sabulinigri*, *P. oceani*, *P. aestusnigri*, *P. pachastrellae*, *P. abyssi*, *P. gallaeciensis*, *P. phragmitis*, *P. salegens*, *P. litoralis*, *P. bauzanensis*, *P. formosensis*, *P. pertucinogena*, *P. pelagia*, *P. salina*, *P. profundus* y *P. xinjiangensis* aparecen claramente diferenciadas de los verdaderos clados de *Pseudomonas* en todos los árboles filogenéticos creados (16S ARNr, MLSA y 92 genes de UBCG). Además, sus valores de ANIb y de dDDH no apoyan la inclusión de estos taxones dentro de ningún otro género, puesto que muestran los mismos bajos valores de OGRI que los existentes entre otros géneros diferentes de la familia *Pseudomonadaceae*. Esta apreciación también aparece en el trabajo publicado por Lalucat y colaboradores (2020), quienes, basándose en sus estudios filogenéticos, también sugieren que el linaje de *P. pertucinogena* debería ser considerado como un género distinto dentro de la misma familia. Por lo tanto, en vista de los datos filogenómicos y fenotípicos presentados, junto con reportes previos, se sugiere la reclasificación de estas especies como un nuevo género de la familia *Pseudomonadaceae*, para el cual se propone el nombre *Neopseudomonas*, siendo *Neopseudomonas pertucinogena* la cepa tipo del género.

Al igual que en el caso de *Neopseudomonas*, las especies pertenecientes al clado de *P. luteola* deberían representar un nuevo género. Ni la filogenia ni los valores de OGRI emplazan a ninguna de sus cepas tipo (*P. duriflava* CGMCC 1.6858<sup>T</sup>, *P. lutea* LMG 21974<sup>T</sup>, *P. zeshuii* KACC 15471<sup>T</sup> y *P. luteola* NBRC 103146<sup>T</sup>) dentro de ningún género descrito, siendo también diferenciadas sus características fenotípicas. En 1986, *P. luteola* se renombró como *Chryseomonas luteola*, tras revelarse que era una especie sinónima de *C. polytricha* (Holmes et al., 1986). Puesto que *P. luteola* fue descrita un año antes (Kodama et al., 1985) que *C. polytricha* (Holmes et al., 1986), se preservó el primer nombre de especie para la sinonimia: *C. luteola*. Sin embargo, un año después, los mismos autores realizaron otros árboles filogenéticos con las secuencias del gen 16S ARNr y encontraron que *C. luteola* estaba inmersa entre clados del género *Pseudomonas* (Holmes et al., 1987), por lo que se reclasificó el género *Chryseomonas*, cuya única especie era *C. luteola*, como *Pseudomonas*, siendo así renombrada la especie como *P. luteola* de nuevo. En vista de los datos presentados en esta tesis doctoral, generados con secuencias completas de genes y haciendo uso de la genómica, tanto *P. luteola* como las especies próximas comentadas anteriormente, aparecen claramente diferenciadas del género *Pseudomonas*. Así pues, se sugiere restaurar el nombre del género *Chryseomonas* para agrupar a estas cinco especies de bacterias (*C. luteola*, *C. lutea*, *C. zeshuii*, *C. duriflava* y *C. asuensis*), siendo *Chryseomonas luteola* propuesta como la especie tipo del género.

El último caso relativo a la definición de un nuevo género recae en *P. hussaini* JMC 19513<sup>T</sup>, el cual, al igual que en los casos anteriores, representa claramente un género diferenciado de las *Pseudomonas* y géneros próximos. Todas las filogenias, índices genómicos y similitudes génicas apoyan este hecho. Por lo tanto, se propone el nombre *Parapseudomonas* para un nuevo género al que se transfiere *P. hussaini* JMC 19513<sup>T</sup>, siendo por tanto renombrado como *Parapseudomonas hussaini*, representado por su única especie, que es, por tanto, especie tipo del género.

La genómica comparativa realizada entre *Pseudomonas* y los linajes que han sido propuestos como nuevos géneros describen la gran distancia existente en lo relativo a la distribución de proteínas. Muchos de los genes *core* presentes en *Pseudomonas sensu stricto* no aparecen ni en *Denitrifimonas caeni* ni en los taxones englobados en los géneros propuestos *Neopseudomonas*, *Chryseomonas* y *Parapseudomonas*. Estos nuevos taxones portan bastantes nuevas funcionalidades proteicas exclusivas de sus linajes que no tienen ninguna descripción o anotación publicada (proteínas hipotéticas).

Finalmente, a lo largo de los análisis realizados, se han encontrado casos en los que algunos pares de taxones aparecen filogenéticamente unidos en todos los árboles creados. En estos casos, los valores compartidos de ANIb y de dDDH están por encima de los límites sugeridos para la delimitación de especies (Richter y Rosselló-Mora, 2009). Algunos de los resultados propuestos estaban recientemente sugeridos por Lalucat et al. (2020), como los casos de las sinonimias de *P. lutea* - *P. zeshuii* - *P. luteola*, *P. abyssi* – *P. gallaeciensis* y *X. perforans* - *X. euvesicatoria*. Debido a lo anteriormente expuesto, se sugiere la inclusión de *P. lutea* y de *P. zeshuii* en la especie *P. luteola*, la inclusión de *X. perforans* en *X. euvesicatoria* y de *P. abyssi* en *P. gallaeciensis*. Sin embargo, en base a las reclasificaciones de géneros propuestas en este trabajo, *P. gallaeciensis* deberá ser llamado *Neopseudomonas gallaeciensis* y *P. luteola* como *Chryseomonas luteola*.

De acuerdo con los resultados del estudio se han encontrado algunos valores límite que están conservados para la delimitación a nivel de género dentro de la familia *Pseudomonadaceae*: todos los géneros tienen menos de un 75-76% de valores de ANIb compartidos entre otros géneros de la familia y, por lo general, la similitud del 16S ARNr entre especies de distintos géneros no tiene valores superiores al 97%.

En resumen, esta investigación muestra la relevancia del uso de la Genómica en la Taxonomía de procariotas. La base de este trabajo es un único árbol filogenómico en el cual las especies o linajes más distantes han sido detectados. Desde este punto de partida, se han realizado pruebas que han dado lugar a la definición de taxones. Tal y como se ha mostrado, los índices de similitud genómicos y las filogenias basadas en genomas coinciden de forma sistemática con los árboles filogenéticos de los genes *housekeeping* o 16S ARNr. En este capítulo, la Genómica ha permitido reclasificar especies que habían sido asignadas al género *Pseudomonas* en base a datos fenotípicos, quimiotaxonómicos y de un número limitado de genes. Esta nueva organización filogenética de taxones próximos a *Pseudomonas* será de gran utilidad para futuros estudios

ecológicos, clínicos o biotecnológicos en los que aparezcan o se estudien los taxones reclasificados.

# *Conclusiones*



## Conclusiones

De acuerdo con los resultados obtenidos en la presente tesis doctoral se puede concluir lo siguiente:

1. Las distintas especies del género *Pseudomonas* codifican un amplio repertorio de metabolitos secundarios aún por descubrir, la mayor parte de los cuales estarían constituidos por NRPs, bacteriocinas, NAGGNs y  $\beta$ -lactonas.
2. Los resultados del presente trabajo indican que algunas de las expansiones de genes derivados del metabolismo de los lípidos en *Pseudomonas* constituyen nuevas vías de síntesis de metabolitos secundarios, lo cual indica que el análisis de las expansiones de genes del metabolismo primario en *Pseudomonas* puede constituir el punto de partida para el descubrimiento de nuevas sustancias de interés.
3. La maquinaria genética relacionada con la síntesis de metabolitos secundarios de bacterias del género *Pseudomonas* sigue la misma dirección evolutiva que la evolución taxonómica de sus especies.
4. En base al estudio del metabolismo secundario del género *Pseudomonas*, las especies *P. constantinii*, *P. extremorientalis*, *P. batumici*, *P. cichorii* y *P. jinjuensis* pueden ser consideradas como candidatas relevantes para la búsqueda de nuevas moléculas bioactivas.
5. La microbiota de los escarabajos de la corteza incluye especies de *Pseudomonas* con capacidad para antagonizar a otros microorganismos, constituyendo así un interesante nicho para la búsqueda de nuevos metabolitos con potencial antimicrobiano.
6. Los estudios taxonómicos de las cepas bacterianas aisladas a partir de los escarabajos de la madera de este estudio han permitido describir dos nuevas especies de *Pseudomonas*, *P. bohémica* y *P. fuscus*, así como una nueva especie del género *Arthrobacter*, *A. ipsi*, lo cual indica que la diversidad de la microbiota asociada a estos escarabajos constituye un nicho aún por explorar para el descubrimiento de nuevas especies bacterianas.
7. La cepa *Pseudomonas brassicacearum* CDVBN10 promueve el crecimiento de *Brassica napus* en condiciones de campo sin alterar las comunidades bacterianas endofíticas de las raíces, lo que indica que su capacidad para promover el cultivo se debe a mecanismos diferentes a la modificación de la microbiota de este.
8. La cepa *Pseudomonas brassicacearum* CDVBN10 tiene capacidad para proteger a *Brassica napus* de uno de sus principales fitopatógenos, el hongo *Leptosphaeria maculans*, tanto de forma directa, inhibiendo el desarrollo del hongo, como de forma indirecta, induciendo un efecto *priming* en la planta, constituyendo así un agente de biocontrol interesante para el cultivo.

9. Los datos del transcriptoma de la cepa *Pseudomonas brassicacearum* CDVBN10 permiten concluir que esta bacteria regula la expresión de gran parte de su genoma en respuesta a su interacción con *B. napus*, incluyendo mecanismos de defensa, nutrición, producción de hormonas vegetales, formación de *biofilm* y promoción del crecimiento de la planta, entre otros.
10. Las bacterias del género *Pseudomonas* tienen miles de genes y funciones asociadas con su fuente de aislamiento, los cuales se pueden relacionar con la interacción o adaptabilidad bacteriana al entorno u hospedador.
11. Existen muchas especies de *Pseudomonas* mal clasificadas dentro del género; por lo tanto, en base a los resultados obtenidos en este estudio se propone la definición de *Denitrifimonas* gen. nov. comb. nov., *Neopseudomonas* gen. nov. comb. nov., *Chryseomonas* gen. nov. comb. nov., *Parapseudomonas* gen. nov. comb. nov., *Stenotrophomonas geniculata* comb. nov., y las siguientes reclasificaciones: *Pseudomonas cissicola* como sinónimo de *Xanthomonas citri*, *Pseudomonas lutea* y *Pseudomonas zeshuii* como sinónimos de *Pseudomonas luteola*, *Pseudomonas abyssii* como sinónimo de *Pseudomonas gallaeciensis*, y *Xanthomonas perforans* como sinónimo de *Xanthomonas euvesicatoria*.



# *Conclusions*



## Conclusions

The following conclusions can be established according to the results obtained in this thesis:

1. The different *Pseudomonas* species encode a vast repertory of secondary metabolites yet to be discovered, being NRPs, bacteriocins, NAGGNs and  $\beta$ -lactones the most abundant.
2. Some expansions of gene families with functional origins in the lipid metabolism of *Pseudomonas* belongs to new secondary metabolites producing pathways, which denotes that the analysis of gene expansions in the *Pseudomonas* primary metabolism may represent the starting point for the discovery of novel useful molecules.
3. The Biosynthetic Gene Clusters in *Pseudomonas* evolve in the same direction that their species taxonomic evolution.
4. Based on the analysis of the secondary metabolism of the genus *Pseudomonas*, the type strains of the species *P. constantinii*, *P. extremorientalis*, *P. batumici*, *P. cichorii* and *P. jinjuensis* are suggested as promising strains for the discovery of novel bioactive molecules.
5. There are *Pseudomonas* species in the bark beetles' microbiome with the capability to inhibit other microbes, which suggest this as an interesting niche for the search of new antimicrobial molecules.
6. Taxonomic studies on bacterial strains isolated from bark beetles led to the description of two new *Pseudomonas* species, *P. bohémica* sp. nov. and *P. fuscus* sp. nov., and a novel species from the genus *Arthrobacter*, *A. ipsi* sp. nov., which indicates that the bark beetles' microbial diversity represents an environment yet to be explored for the discovery of novel bacterial taxa.
7. *Pseudomonas brassicacearum* CDVBN10 promote *Brassica napus* growth in field conditions without shifting the endophytic bacterial root communities, which indicates that its ability to promote the growth of this crop is due to mechanisms not related with changes in this microbiome.
8. *P. brassicacearum* CDVBN10 can protect *B. napus* against the phytopathogen fungus *Leptosphaeria maculans*, both directly, inhibiting fungal growth, and indirectly, exerting a priming effect in the plant, suggesting this strain as a promising biocontrol agent for the rapeseed crop.
9. *P. brassicacearum* CDVBN10 transcriptomic data allow to conclude that this bacterial strain synchronizes its genomic expression in response to its interaction with *B. napus*,

including genes involved in defense mechanisms, nutrition, plant hormone production, biofilm formation and plant growth promotion, amongst others.

10. Bacteria belonging to the genus *Pseudomonas* harbor thousands of genes and functions associated with its isolation source, which can be linked with the bacterial interaction or adaptability to its environment or host.
11. There are many *Pseudomonas* species wrongly classified within this genus; thus, according to the results achieved with this thesis, the following definitions are proposed: *Denitrifimonas* gen. nov. comb. nov., *Neopseudomonas* gen. nov. comb. nov., *Chryseomonas* gen. nov. comb. nov., *Parapseudomonas* gen. nov. comb. nov., *Stenotrophomonas geniculata* comb. nov. Moreover, the following reclassifications are also proposed: *Pseudomonas cissicola* as a later synonym of *Xanthomonas citri*, *Pseudomonas lutea* and *Pseudomonas zeshuii* as later synonyms of *Pseudomonas luteola*, *Pseudomonas abyssii* as a later synonym of *Pseudomonas gallaeciensis*, and *Xanthomonas perforans* as a later synonym of *Xanthomonas euvesicatoria*.

# *Referencias*



## Referencias

- Achouak, W., Sutra, L., Heulin, T., Meyer, J. M., Fromin, N., Degraeve, S., ... & Gardan, L. (2000). *Pseudomonas brassicacearum* sp. nov. and *Pseudomonas thivervalensis* sp. nov., two root-associated bacteria isolated from Brassica napus and Arabidopsis thaliana. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50(1), 9-18.
- Adamek, M., Alanjary, M., & Ziemert, N. (2019). Applied evolution: phylogeny-based approaches in natural products research. *Natural product reports*, 36(9), 1295-1312.
- Adamek, M., Alanjary, M., Sales-Ortells, H., Goodfellow, M., Bull, A. T., Winkler, A., ... & Ziemert, N. (2018). Comparative genomics reveals phylogenetic distribution patterns of secondary metabolites in Amycolatopsis species. *BMC genomics*, 19(1), 1-15.
- Adams, A. S., Aylward, F. O., Adams, S. M., Erbilgin, N., Aukema, B. H., Currie, C. R., ... & Raffa, K. F. (2013). Mountain pine beetles colonizing historical and naive host trees are associated with a bacterial community highly enriched in genes contributing to terpene metabolism. *Applied and environmental microbiology*, 79(11), 3468-3475.
- Adams, A. S., Boone, C. K., Bohlmann, J., & Raffa, K. F. (2011). Responses of bark beetle-associated bacteria to host monoterpenes and their relationship to insect life histories. *Journal of chemical ecology*, 37(8), 808-817.
- Adams, A. S., Currie, C. R., Cardoza, Y., Klepzig, K. D., & Raffa, K. F. (2009). Effects of symbiotic bacteria and tree chemistry on the growth and reproduction of bark beetle fungal symbionts. *Canadian Journal of Forest Research*, 39(6), 1133-1147.
- Afshinneko, E., Meydan, C., Chowdhury, S., Jaroudi, D., Boyer, C., Bernstein, N., ... & Mason, C. E. (2015). Geospatial resolution of human and bacterial diversity with city-scale metagenomics. *Cell systems*, 1(1), 72-87.
- Agrawal, S., Acharya, D., Adholeya, A., Barrow, C. J., & Deshmukh, S. K. (2017). Nonribosomal peptides from marine microbes and their antimicrobial and anticancer potential. *Frontiers in pharmacology*, 8, 828.
- Ahmad, V., Khan, M. S., Jamal, Q. M. S., Alzohairy, M. A., Al Karaawi, M. A., & Siddiqui, M. U. (2017). Antimicrobial potential of bacteriocins: in therapy, agriculture and food preservation. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 49(1), 1-11.
- Ahmet, K. A. T. I., & Hatice, K. A. T. I. (2013). Isolation and identification of bacteria from *Xylosandrus germanus* (Blandford) (Coleoptera: Curculionidae). *African Journal of Microbiology Research*, 7(47), 5288-5299.
- Albarano, L., Esposito, R., Ruocco, N., & Costantini, M. (2020). Genome Mining as New Challenge in Natural Products Discovery. *Marine Drugs*, 18(4), 199.
- Alizon, S., & Méthot, P. O. (2018). Reconciling Pasteur and Darwin to control infectious diseases. *PLoS biology*, 16(1), e2003815.
- Amoozegar, M. A., Shahinpei, A., Sepahy, A. A., Makhdoumi-Kakhki, A., Seyedmahdi, S. S., Schumann, P., & Ventosa, A. (2014). *Pseudomonas salegens* sp. nov., a halophilic member of the genus *Pseudomonas* isolated from a wetland. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 64(10), 3565-3570.
- Andreeva, N. A., Melnikov, V. V., & Snarskaya, D. D. (2020). The Role of Cyanobacteria in Marine Ecosystems. *Russian Journal of Marine Biology*, 46(3), 154-165.

- Andrews, M., & Andrews, M. E. (2017). Specificity in legume-rhizobia symbioses. *International journal of molecular sciences*, 18(4), 705.
- Anjum, R., Afzal, M., Baber, R., Khan, M. A. J., Kanwal, W., Sajid, W., & Raheel, A. (2019). Endophytes: as potential biocontrol agent—review and future prospects. *J Agric Sci*, 11, 113.
- Ankenbauer, A., Nitschel, R., Teleki, A., Müller, T., Favilli, L., Blombach, B., & Takors, R. (2021). Micro-aerobic production of isobutanol with engineered *Pseudomonas putida*. *Engineering in Life Sciences*.
- Ankrah, N. Y., Chouaia, B., & Douglas, A. E. (2018). The Cost of Metabolic Interactions in Symbioses Between Insects and Bacteria With Reduced Genomes. *mBio*, 9(5), e01433-18.
- Anzai, Y., Kim, H., Park, J. Y., Wakabayashi, H., & Oyaizu, H. (2000). Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 50(4), 1563-1589.
- Aramaki, T., Blanc-Mathieu, R., Endo, H., Ohkubo, K., Kanehisa, M., Goto, S., & Ogata, H. (2020). KofamKOALA: KEGG ortholog assignment based on profile HMM and adaptive score threshold. *Bioinformatics*, 36(7), 2251-2252.
- Archer, S., Lee, K., Caruso, T., Leung, M., Tong, X., Hinchliffe, G., ... & Pointing, S. B. (2021). Diverse recruitment to a globally structured atmospheric microbiome. Preprint available in <https://www.researchsquare.com/article/rs-244923/v1>
- Argimón, S., Abudahab, K., Goater, R. J., Fedosejev, A., Bhai, J., Glasner, C., ... & Spratt, B. G. (2016). Microreact: visualizing and sharing data for genomic epidemiology and phylogeography. *Microbial genomics*, 2(11).
- Aristimuño Ficoseco, C., Mansilla, F. I., Maldonado, N. C., Miranda, H., Fátima Nader-Macias, M. E., & Vignolo, G. M. (2018). Safety and growth optimization of lactic acid bacteria isolated from feedlot cattle for probiotic formula design. *Frontiers in microbiology*, 9, 2220.
- Armenteros, J. J. A., Tsirigos, K. D., Sønderby, C. K., Petersen, T. N., Winther, O., Brunak, S., ... & Nielsen, H. (2019). SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. *Nature biotechnology*, 37(4), 420-423.
- Auch, A. F., von Jan, M., Klenk, H. P., & Göker, M. (2010). Digital DNA-DNA hybridization for microbial species delineation by means of genome-to-genome sequence comparison. *Standards in genomic sciences*, 2(1), 117-134.
- Austin, D. A., & Moss, M. O. (1986). Numerical taxonomy of red-pigmented bacteria isolated from a lowland river, with the description of a new taxon, *Rugamonas rubra* gen. nov., sp. nov. *Microbiology*, 132(7), 1899-1909.
- Aylward, F. O., Suen, G., Biedermann, P. H., Adams, A. S., Scott, J. J., Malfatti, S. A., ... & Currie, C. R. (2014). Convergent bacterial microbiotas in the fungal agricultural systems of insects. *MBio*, 5(6).
- Aziz, R. K., Bartels, D., Best, A. A., DeJongh, M., Disz, T., Edwards, R. A., ... & Zagnitko, O. (2008). The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC genomics*, 9(1), 1-15.
- Babadi, Z. K., Sudarman, E., Ebrahimipour, G. H., Primahana, G., Stadler, M., & Wink, J. (2020). Structurally diverse metabolites from the rare actinobacterium *Saccharothrix xinjiangensis*. *The Journal of antibiotics*, 73(1), 48-55.
- Backer, R., Rokem, J. S., Ilangumaran, G., Lamont, J., Praslickova, D., Ricci, E., ... & Smith, D. L. (2018). Plant growth-promoting rhizobacteria: context, mechanisms of action, and roadmap to commercialization of biostimulants for sustainable agriculture. *Frontiers in plant science*, 9, 1473.



- Bahram, M., Hildebrand, F., Forslund, S. K., Anderson, J. L., Soudzilovskaia, N. A., Bodegom, P. M., ... & Bork, P. (2018). Structure and function of the global topsoil microbiome. *Nature*, 560(7717), 233-237.
- Balsanelli, E., Tadra-Sfeir, M. Z., Faoro, H., Pankiewicz, V. C., de Baura, V. A., Pedrosa, F. O., ... & Monteiro, R. A. (2015). Molecular adaptations of *Herbaspirillum seropedicae* during colonization of the maize rhizosphere. *Environmental microbiology*, 18(8), 2343-2356.
- Baquero, F., Coque, T. M., Galán, J. C., & Martínez, J. L. (2021). The Origin of Niches and Species in the Bacterial World. *Frontiers in Microbiology*, 12, 566.
- Barahona, E., Navazo, A., Garrido-Sanz, D., Muriel, C., Martínez-Granero, F., Redondo-Nieto, M., ... & Rivilla, R. (2016). *Pseudomonas fluorescens* F113 can produce a second flagellar apparatus, which is important for plant root colonization. *Frontiers in microbiology*, 7, 1471.
- Baria, D., Shah, U., Egbuna, C., & Mtewa, A. G. (2020). Secondary Metabolites and Toxins of Microbial Origin for the Treatment of Diseases. *Poisonous Plants and Phytochemicals in Drug Discovery*, 225-248.
- Bashiardes, S., Zilberman-Schapira, G., & Elinav, E. (2016). Use of metatranscriptomics in microbiome research. *Bioinformatics and biology insights*, 10, BBI-S34610.
- Basu, S., Kumar, G., Chhabra, S., & Prasad, R. (2021). Role of soil microbes in biogeochemical cycle for enhancing soil fertility. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering* (pp. 149-157). Elsevier.
- Beedessee, G., Hisata, K., Roy, M. C., Van Dolah, F. M., Satoh, N., & Shoguchi, E. (2019). Diversified secondary metabolite biosynthesis gene repertoire revealed in symbiotic dinoflagellates. *Scientific reports*, 9(1), 1-12.
- Belknap, K. C., Park, C. J., Barth, B. M., & Andam, C. P. (2020). Genome mining of biosynthetic and chemotherapeutic gene clusters in *Streptomyces* bacteria. *Scientific reports*, 10.
- Benjamini, Y., & Hochberg, Y. (1995). Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal statistical society: series B (Methodological)*, 57(1), 289-300.
- Berasategui, A., Axelsson, K., Nordlander, G., Schmidt, A., Borg-Karlson, A. K., Gershenzon, J., ... & Kaltenpoth, M. (2016). The gut microbiota of the pine weevil is similar across Europe and resembles that of other conifer-feeding beetles. *Molecular ecology*, 25(16), 4014-4031.
- Berg, J. S., Duverger, A., Cordier, L., Laberty-Robert, C., Guyot, F., & Miot, J. (2020). Rapid pyritization in the presence of a sulfur/sulfate-reducing bacterial consortium. *Scientific reports*, 10(1), 1-13.
- Beszterda, M., & Nogala-Kałucka, M. (2019). Current research developments on the processing and improving the nutritional quality of rapeseed (*Brassica napus* L.): a review. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 1800045.
- Bhagirath, A. Y., Li, Y., Somayajula, D., Dadashi, M., Badr, S., & Duan, K. (2016). Cystic fibrosis lung environment and *Pseudomonas aeruginosa* infection. *BMC pulmonary medicine*, 16(1), 1-22.
- Bi, J., & Wang, Y. F. (2020). The effect of the endosymbiont *Wolbachia* on the behavior of insect hosts. *Insect science*, 27(5), 846-858.
- Biedermann, P. H., Müller, J., Grégoire, J. C., Gruppe, A., Hagge, J., Hammerbacher, A., ... & Bässler, C. (2019). Bark beetle population dynamics in the Anthropocene: challenges and solutions. *Trends in ecology & evolution*, 34(10), 914-924.
- Biessy, A., & Filion, M. (2018). Phenazines in plant-beneficial *Pseudomonas* spp.: biosynthesis, regulation, function and genomics. *Environmental microbiology*, 20(11), 3905-3917.

- Blin, K., Pascal Andreu, V., de los Santos, E. L. C., Del Carratore, F., Lee, S. Y., Medema, M. H., & Weber, T. (2019). The antiSMASH database version 2: a comprehensive resource on secondary metabolite biosynthetic gene clusters. *Nucleic acids research*, 47(D1), D625-D630.
- Blin, K., Shaw, S., Steinke, K., Villebro, R., Ziemert, N., Lee, S. Y., ... & Weber, T. (2019). antiSMASH 5.0: updates to the secondary metabolite genome mining pipeline. *Nucleic acids research*, 47(W1), W81-W87.
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114-2120.
- Boolchandani, M., D'Souza, A. W., & Dantas, G. (2019). Sequencing-based methods and resources to study antimicrobial resistance. *Nature Reviews Genetics*, 20(6), 356-370.
- Boone, C. K., Keefover-Ring, K., Mapes, A. C., Adams, A. S., Bohlmann, J., & Raffa, K. F. (2013). Bacteria associated with a tree-killing insect reduce concentrations of plant defense compounds. *Journal of Chemical Ecology*, 39(7), 1003-1006.
- Bortolus, A. (2008). Error cascades in the biological sciences: the unwanted consequences of using bad taxonomy in ecology. *AMBIO: A journal of the human environment*, 37(2), 114-118.
- Bradley, P. H., & Pollard, K. S. (2017). Proteobacteria explain significant functional variability in the human gut microbiome. *Microbiome*, 5(1), 1-23.
- Briones-Roblero, C. I., Hernández-García, J. A., Gonzalez-Escobedo, R., Soto-Robles, L. V., Rivera-Orduña, F. N., & Zúñiga, G. (2017). Structure and dynamics of the gut bacterial microbiota of the bark beetle, *Dendroctonus rhizophagus* (Curculionidae: Scolytinae) across their life stages. *PLoS one*, 12(4), e0175470.
- Briones-Roblero, C. I., Rodríguez-Díaz, R., Santiago-Cruz, J. A., Zúñiga, G., & Rivera-Orduña, F. N. (2017). Degradation capacities of bacteria and yeasts isolated from the gut of *Dendroctonus rhizophagus* (Curculionidae: Scolytinae). *Folia microbiologica*, 62(1), 1-9.
- Brittingham, A., Hren, M. T., & Hartman, G. (2017). Microbial alteration of the hydrogen and carbon isotopic composition of n-alkanes in sediments. *Organic Geochemistry*, 107, 1-8.
- Brockmann, M., Aupperle-Lellbach, H., Gentil, M., Heusinger, A., Müller, E., Marschang, R. E., & Pees, M. (2020). Challenges in microbiological identification of aerobic bacteria isolated from the skin of reptiles. *PLoS one*, 15(10), e0240085.
- Brown, J. M., & Hazen, S. L. (2017). Targeting of microbe-derived metabolites to improve human health: The next frontier for drug discovery. *Journal of biological chemistry*, 292(21), 8560-8568.
- Browne, P., Tamaki, H., Kyrpides, N., Woyke, T., Goodwin, L., Imachi, H., ... & Cadillo-Quiroz, H. (2017). Genomic composition and dynamics among Methanomicrobiales predict adaptation to contrasting environments. *The ISME journal*, 11(1), 87-99.
- Brynildsrud, O., Bohlin, J., Scheffer, L., & Eldholm, V. (2016). Rapid scoring of genes in microbial pan-genome-wide association studies with Scoary. *Genome biology*, 17(1), 1-9.
- Busse, H. J., Kämpfer, P., Moore, E. R. B., Nuutinen, J., Tsitko, I. V., Denner, E. B. M., ... & Salkinoja-Salonen, M. S. (2002). *Thermomonas haemolytica* gen. nov., sp. nov., a gamma-proteobacterium from kaolin slurry. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 52(2), 473-483.
- Byers, J. A. (1995). Host-tree chemistry affecting colonization in bark beetles. In *Chemical ecology of insects 2* (pp. 154-213). Springer, Boston, MA.
- Camara, B., Strömpl, C., Verburg, S., Spröer, C., Pieper, D. H., & Tindall, B. J. (2007). *Pseudomonas reinekei* sp. nov., *Pseudomonas moorei* sp. nov. and *Pseudomonas mohnii* sp. nov., novel species capable of

degrading chlorosalicylates or isopimaric acid. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 57(5), 923-931.

Campos, V. L., Valenzuela, C., Yarza, P., Kämpfer, P., Vidal, R., Zaror, C., ... & Rosselló-Móra, R. (2010). *Pseudomonas arsenicoxydans* sp nov., an arsenite-oxidizing strain isolated from the Atacama desert. *Systematic and Applied Microbiology*, 33(4), 193-197.

Canganella, F., Papparatti, B., & Natali, V. (1994). Microbial species isolated from the bark beetle *Anisandrus dispar* F. *Microbiological research*, 149(2), 123-128.

Cantarel, B. L., Coutinho, P. M., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V., & Henrissat, B. (2009). The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZY): an expert resource for glycogenomics. *Nucleic acids research*, 37(suppl\_1), D233-D238.

Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D., Costello, E. K., ... & Knight, R. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature methods*, 7(5), 335-336.

Cardoza, Y. J., Klepzig, K. D., & Raffa, K. F. (2006). Bacteria in oral secretions of an endophytic insect inhibit antagonistic fungi. *Ecological Entomology*, 31(6), 636-645.

Cardoza, Y. J., Vasanthakumar, A., Suazo, A., & Raffa, K. F. (2009). Survey and phylogenetic analysis of culturable microbes in the oral secretions of three bark beetle species. *Entomologia experimentalis et applicata*, 131(2), 138-147.

Carro, L., & Menéndez, E. (2020). Knock, knock-let the bacteria in: enzymatic potential of plant associated bacteria. In *Molecular Aspects of Plant Beneficial Microbes in Agriculture* (pp. 169-178). Academic Press.

Carro, L., Nouioui, I., Sangal, V., Meier-Kolthoff, J. P., Trujillo, M. E., del Carmen Montero-Calasanz, M., ... & Goodfellow, M. (2018). Genome-based classification of micromonosporae with a focus on their biotechnological and ecological potential. *Scientific reports*, 8(1), 1-23.

Carroll, D., Holden, N., Gifford, M. L., & Dupuy, L. X. (2020). Framework for quantification of the dynamics of root colonization by *Pseudomonas fluorescens* isolate SBW25. *Frontiers in Microbiology*, 11, 2403.

Catinot, J., Buchala, A., Abou-Mansour, E., & Métraux, J. P. (2008). Salicylic acid production in response to biotic and abiotic stress depends on isochorismate in *Nicotiana benthamiana*. *FEBS letters*, 582(4), 473-478.

Ceja-Navarro, J. A., Vega, F. E., Karaoz, U., Hao, Z., Jenkins, S., Lim, H. C., ... & Brodie, E. L. (2015). Gut microbiota mediate caffeine detoxification in the primary insect pest of coffee. *Nature communications*, 6(1), 1-9.

Chakraborty, A., Ashraf, M. Z., Modlinger, R., Synek, J., Schlyter, F., & Roy, A. (2020). Unravelling the gut bacteriome of *Ips* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae): Identifying core bacterial assemblage and their ecological relevance. *Scientific reports*, 10(1), 1-17.

Chandrangsu, P., Rensing, C., & Helmann, J. D. (2017). Metal homeostasis and resistance in bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 15(6), 338.

Chaudhari, B. L., Patil, S. N., Paradeshi, J. S., Chaudhari, M. A., & Chaudhari, C. S. (2017). Premier biocontrol traits of Pseudomonads: Siderophores, Phenazines or What Else?. In *Microorganisms for Green Revolution* (pp. 351-390). Springer, Singapore

Chaudhry, V., & Patil, P. B. (2020). Evolutionary insights into adaptation of *Staphylococcus haemolyticus* to human and non-human niches. *Genomics*, 112(2), 2052-2062.

- Chen, B., Zhang, N., Xie, S., Zhang, X., He, J., Muhammad, A., ... & Shao, Y. (2020). Gut bacteria of the silkworm *Bombyx mori* facilitate host resistance against the toxic effects of organophosphate insecticides. *Environment International*, *143*, 105886.
- Chen, G. Q., & Jiang, X. R. (2018). Next generation industrial biotechnology based on extremophilic bacteria. *Current opinion in biotechnology*, *50*, 94-100.
- Chen, L., Garmeva, S., Zhernakova, A., Fu, J., & Wijmenga, C. (2018). A system biology perspective on environment–host–microbe interactions. *Human molecular genetics*, *27*(R2), R187-R194.
- Chen, M. Y., Teng, W. K., Zhao, L., Hu, C. X., Zhou, Y. K., Han, B. P., ... & Shu, W. S. (2021). Comparative genomics reveals insights into cyanobacterial evolution and habitat adaptation. *The ISME Journal*, *15*(1), 211-227.
- Chevrette, M. G., Carlson, C. M., Ortega, H. E., Thomas, C., Ananiev, G. E., Barns, K. J., ... & Currie, C. R. (2019). The antimicrobial potential of *Streptomyces* from insect microbiomes. *Nature communications*, *10*(1), 1-11.
- Chevrette, M. G., Gutiérrez-García, K., Selem-Mojica, N., Aguilar-Martínez, C., Yáñez-Olvera, A., Ramos-Aboites, H. E., ..., & Barona-Gómez, F. (2020). Evolutionary dynamics of natural product biosynthesis in bacteria. *Natural Product Reports*, *37*(4), 566-599.
- Chien, C. F., Liu, C. Y., Lu, Y. Y., Sung, Y. H., Chen, K. Y., & Lin, N. C. (2020). HSI-II gene cluster of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 encodes a functional Type VI secretion system required for interbacterial competition. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 1118.
- Chikindas, M. L., Weeks, R., Drider, D., Chistyakov, V. A., & Dicks, L. M. (2018). Functions and emerging applications of bacteriocins. *Current opinion in biotechnology*, *49*, 23-28.
- Chiniquy, D., Barnes, E. M., Zhou, J., Hartman, K., Li, X., Sheflin, A., ... & Tringe, S. G. (2021). Microbial Community Field Surveys Reveal Abundant *Pseudomonas* Population in Sorghum Rhizosphere Composed of Many Closely Related Phylotypes. *Frontiers in microbiology*, *12*, 349.
- Chomicki, G., Kiers, E. T., & Renner, S. S. (2020). The evolution of mutualistic dependence. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, *51*, 409-432.
- Christaki, E., Marcou, M., & Tofarides, A. (2020). Antimicrobial resistance in bacteria: mechanisms, evolution, and persistence. *Journal of molecular evolution*, *88*(1), 26-40.
- Chun, J., Oren, A., Ventosa, A., Christensen, H., Arahal, D. R., da Costa, M. S., ... & Trujillo, M. E. (2018). Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, *68*(1), 461-466.
- Chung, B. S., Aslam, Z., Kim, S. W., Kim, G. G., Kang, H. S., Ahn, J. W., & Chung, Y. R. (2008). A bacterial endophyte, *Pseudomonas brassicacearum* YC5480, isolated from the root of *Artemisia* sp. producing antifungal and phytotoxic compounds. *The Plant Pathology Journal*, *24*(4), 461-468.
- Chung, M., Adkins, R. S., Mattick, J. S., Bradwell, K. R., Shetty, A. C., Sadzewicz, L., ... & Hotopp, J. C. D. (2021). FADU: a Quantification Tool for Prokaryotic Transcriptomic Analyses. *Msystems*, *6*(1).
- Ciufo, S., Kannan, S., Sharma, S., Badretdin, A., Clark, K., Turner, S., ... & DiCuccio, M. (2018). Using average nucleotide identity to improve taxonomic assignments in prokaryotic genomes at the NCBI. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, *68*(7), 2386.
- Clark, L. L., Dajcs, J. J., McLean, C. H., Bartell, J. G., & Stroman, D. W. (2006). *Pseudomonas otitidis* sp. nov., isolated from patients with otic infections. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, *56*(4), 709-714.

- Compant, S., Samad, A., Faist, H., & Sessitsch, A. (2019). A review on the plant microbiome: ecology, functions, and emerging trends in microbial application. *Journal of advanced research*, 19, 29-37.
- Contreras-Moreira, B., & Vinuesa, P. (2013). GET\_HOMOLOGUES, a versatile software package for scalable and robust microbial pangenome analysis. *Applied and environmental microbiology*, 79(24), 7696-7701.
- Conway, J. R., Lex, A., & Gehlenborg, N. (2017). UpSetR: an R package for the visualization of intersecting sets and their properties. *Bioinformatics*, 33(18), 2938-2940.
- Cornforth, D. M., & Foster, K. R. (2013). Competition sensing: the social side of bacterial stress responses. *Nature Reviews Microbiology*, 11(4), 285-293.
- Cotter, P. A., Chepuri, V., Gennis, R. B., & Gunsalus, R. P. (1990). Cytochrome o (cyoABCDE) and d (cydAB) oxidase gene expression in *Escherichia coli* is regulated by oxygen, pH, and the fnr gene product. *Journal of bacteriology*, 172(11), 6333-6338.
- Cotter, P. D., Ross, R. P., & Hill, C. (2013). Bacteriocins—a viable alternative to antibiotics? *Nature Reviews Microbiology*, 11(2), 95-105.
- Crone, S., Vives-Flórez, M., Kvich, L., Saunders, A. M., Malone, M., Nicolaisen, M. H., ..., & Whiteley, M. (2020). The environmental occurrence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Apmis*, 128(3), 220-231
- Crusoe, M. R., Alameldin, H. F., Awad, S., Boucher, E., Caldwell, A., Cartwright, R., ... & Zhang, Q. (2015). The khmer software package: enabling efficient nucleotide sequence analysis. *F1000Research*, 4.
- Cruz-Morales, P., Kopp, J. F., Martínez-Guerrero, C., Yáñez-Guerra, L. A., Selem-Mojica, N., Ramos-Aboites, H., ... & Barona-Gómez, F. (2016). Phylogenomic analysis of natural products biosynthetic gene clusters allows discovery of arseno-organic metabolites in model streptomycetes. *Genome biology and evolution*, 8(6), 1906-1916.
- Dada, N., Sheth, M., Liebman, K., Pinto, J., & Lenhart, A. (2018). Whole metagenome sequencing reveals links between mosquito microbiota and insecticide resistance in malaria vectors. *Scientific reports*, 8(1), 1-13.
- Daliri, E. B. M., Ofosu, F. K., Chelliah, R., Lee, B. H., & Oh, D. H. (2021). Challenges and Perspective in Integrated Multi-Omics in Gut Microbiota Studies. *Biomolecules*, 11(2), 300.
- Damron, F. H., Oglesby-Sherrouse, A. G., Wilks, A., & Barbier, M. (2016). Dual-seq transcriptomics reveals the battle for iron during *Pseudomonas aeruginosa* acute murine pneumonia. *Scientific reports*, 6(1), 1-12.
- Das, D., Mawlong, G. T., Sarki, Y. N., Singh, A. K., Chikkaputtaiah, C., & Boruah, H. P. D. (2020). Transcriptome analysis of crude oil degrading *Pseudomonas aeruginosa* strains for identification of potential genes involved in crude oil degradation. *Gene*, 755, 144909.
- David, B. V., Chandrasehar, G., & Selvam, P. N. (2018). *Pseudomonas fluorescens*: a plant-growth-promoting rhizobacterium (PGPR) with potential role in biocontrol of pests of crops. In *Crop improvement through microbial biotechnology* (pp. 221-243). Elsevier.
- Davies, J. (2013). Specialized microbial metabolites: functions and origins. *The Journal of Antibiotics*, 66(7), 361-364.
- Degli, M. E., & Martínez, E. R. (2017). The functional microbiome of arthropods. *PLoS one*, 12(5), e0176573-e0176573.
- Dekkers, L. C., van der Bij, A. J., Mulders, I. H., Phoelich, C. C., Wentwoord, R. A., Glandorf, D. C., ... & Lugtenberg, B. J. (1998). Role of the O-antigen of lipopolysaccharide, and possible roles of growth rate and

of NADH: ubiquinone oxidoreductase (nuo) in competitive tomato root-tip colonization by *Pseudomonas fluorescens* WCS365. *Molecular plant-microbe interactions*, 11(8), 763-771.

Delalibera Jr, I., Vasanthakumar, A., Burwitz, B. J., Schloss, P. D., Klepzig, K. D., Handelsman, J., & Raffa, K. F. (2007). Composition of the bacterial community in the gut of the pine engraver, *Ips pini* (Say)(Coleoptera) colonizing red pine. *Symbiosis*. Vol. 43: 97-104.

Delaux, P. M., & Schornack, S. (2021). Plant evolution driven by interactions with symbiotic and pathogenic microbes. *Science*, 371(6531).

Des Essarts, Y. R., Cigna, J., Quêtu-Laurent, A., Caron, A., Munier, E., Beury-Cirou, A., ... & Faure, D. (2016). Biocontrol of the potato blackleg and soft rot diseases caused by *Dickeya dianthicola*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 82(1), 268-278.

DeSantis, T. Z., Hugenholtz, P., Larsen, N., Rojas, M., Brodie, E. L., Keller, K., ... & Andersen, G. L. (2006). Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Applied and environmental microbiology*, 72(7), 5069-5072.

Desmond, H. (2021). Adapting to Environmental Heterogeneity: Selection and Radiation. *Biological Theory*, 1-14.

Didelot, X., Méric, G., Falush, D., & Darling, A. E. (2012). Impact of homologous and non-homologous recombination in the genomic evolution of *Escherichia coli*. *BMC genomics*, 13(1), 1-15.

Dieppois, G., Opoa, O., Lalucat, J., & Lemaitre, B. (2015). *Pseudomonas entomophila*: a versatile bacterium with entomopathogenic properties. In *Pseudomonas* (pp. 25-49). Springer, Dordrecht.

Díez-Méndez, A., & Menéndez, E. (2020). Rhizobium Presence and Functions in Microbiomes of Non-leguminous Plants. In *Symbiotic Soil Microorganisms* (pp. 241-266). Springer, Cham.

Díez-Méndez, A., García-Fraile, P., Solano, F., & Rivas, R. (2019). The ant *Lasius niger* is a new source of bacterial enzymes with biotechnological potential for bleaching dye. *Scientific reports*, 9(1), 1-11.

Ding, T., Yang, L. J., Zhang, W. D., & Shen, Y. H. (2019). The secondary metabolites of rare actinomycetes: chemistry and bioactivity. *RSC advances*, 9(38), 21964-21988.

Dirksen, P., Marsh, S. A., Braker, I., Heitland, N., Wagner, S., Nakad, R., ... & Schulenburg, H. (2016). The native microbiome of the nematode *Caenorhabditis elegans*: gateway to a new host-microbiome model. *BMC biology*, 14(1), 1-16.

Dobritsa, A. P., Linardopoulou, E. V., & Samadpour, M. (2017). Transfer of 13 species of the genus *Burkholderia* to the genus *Caballeronia* and reclassification of *Burkholderia jirisanensis* as *Paraburkholderia jirisanensis* comb. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 67(10), 3846-3853.

Doetsch, R. N. (1981). "Determinative methods of light microscopy," in *Manual of Methods for General Bacteriology*, eds P. Gerhardt, R. G. E. Murray, R. N. Costilow, E. W. Nester, W. A. Wood, N. R. Krieg, and G. B. Phillips (Washington, DC: American Society for Microbiology), 21–33.

Douglas, G. M., Beiko, R. G., & Langille, M. G. (2018). Predicting the functional potential of the microbiome from marker genes using PICRUSt. In *Microbiome Analysis* (pp. 169-177). Humana Press, New York, NY.

Drobish, A. M., Emery, B. D., Whitney, A. M., Lauer, A. C., Metcalfe, M. G., & McQuiston, J. R. (2016). *Oblitimonas alkaliphila* gen. nov., sp. nov., in the family Pseudomonadaceae, recovered from a historical collection of previously unidentified clinical strains. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 66(8), 3063.

- Dubey, A. K., Baker, C. S., Suzuki, K., Jones, A. D., Pandit, P., Romeo, T., & Babitzke, P. (2003). CsrA regulates translation of the *Escherichia coli* carbon starvation gene, *cstA*, by blocking ribosome access to the *cstA* transcript. *Journal of bacteriology*, *185*(15), 4450-4460.
- Duijff, B. J., GIANINAZZI-PEARSON, V. I. V. I. E. N. N. E., & Lemanceau, P. (1997). Involvement of the outer membrane lipopolysaccharides in the endophytic colonization of tomato roots by biocontrol *Pseudomonas fluorescens* strain WCS417r. *New Phytologist*, *135*(2), 325-334.
- Durán, D., Bernal, P., Vazquez-Arias, D., Blanco-Romero, E., Garrido-Sanz, D., Redondo-Nieto, M., ... & Martín, M. (2021). *Pseudomonas fluorescens* F113 type VI secretion systems mediate bacterial killing and adaptation to the rhizosphere microbiome. *Scientific reports*, *11*(1), 1-13.
- Durand, A. A., Bergeron, A., Constant, P., Buffet, J. P., Déziel, E., & Guertin, C. (2015). Surveying the endomicrobiome and ectomicrobiome of bark beetles: The case of *Dendroctonus simplex*. *Scientific reports*, *5*(1), 1-11.
- Eberl, L., & Vandamme, P. (2016). Members of the genus *Burkholderia*: good and bad guys. *F1000Research*, *5*.
- Edgar, R. (2018). Taxonomy annotation and guide tree errors in 16S rRNA databases. *PeerJ*, *6*, e5030.
- Edgar, R. C., Haas, B. J., Clemente, J. C., Quince, C., & Knight, R. (2011). UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics*, *27*(16), 2194-2200.
- Editorial Board. (2015). Mesophilobacter. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1-2.
- Eren, A. M., Esen, Ö. C., Quince, C., Vineis, J. H., Morrison, H. G., Sogin, M. L., & Delmont, T. O. (2015). Anvi'o: an advanced analysis and visualization platform for 'omics data. *PeerJ*, *3*, e1319.
- Fabryová, A., Kostovčík, M., Díez-Méndez, A., Jiménez-Gómez, A., Celador-Lera, L., Saati-Santamaría, Z., ... & García-Fraile, P. (2018). On the bright side of a forest pest-the metabolic potential of bark beetles' bacterial associates. *Science of the Total Environment*, *619*, 9-17.
- Fadiji, A. E., & Babalola, O. O. (2020). Metagenomics methods for the study of plant-associated microbial communities: A review. *Journal of microbiological methods*, *170*, 105860.
- Falodun, O. I., & Musa, I. B. (2020). *Pseudomonas* species from cattle dung producing extended spectrum and metallo beta-lactamases. *European Journal of Biological Research*, *10*(1), 1-10.
- Feng, Z., Zhang, J., Huang, X., Zhang, J., Chen, M., & Li, S. (2012). *Pseudomonas zeshuii* sp. nov., isolated from herbicide-contaminated soil. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, *62*(11), 2608-2612.
- Finkmann, W., Altendorf, K., Stackebrandt, E., & Lipski, A. (2000). Characterization of N<sub>2</sub>O-producing Xanthomonas-like isolates from biofilters as *Stenotrophomonas nitritireducens* sp. nov., *Luteimonas mephitis* gen. nov., sp. nov. and *Pseudoxanthomonas broegbernensis* gen. nov., sp. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, *50*(1), 273-282.
- Fisher, R. M., Henry, L. M., Cornwallis, C. K., Kiers, E. T., & West, S. A. (2017). The evolution of host-symbiont dependence. *Nature Communications*, *8*(1), 1-8.
- Flissi, A., Ricart, E., Campart, C., Chevalier, M., Dufresne, Y., Michalik, J., ... & Pupin, M. (2020). Norine: update of the nonribosomal peptide resource. *Nucleic acids research*, *48*(D1), D465-D469.
- Flury, P., Aellen, N., Ruffner, B., Péchy-Tarr, M., Fataar, S., Metla, Z., ... & Maurhofer, M. (2016). Insect pathogenicity in plant-beneficial pseudomonads: phylogenetic distribution and comparative genomics. *The ISME journal*, *10*(10), 2527-2542.

Fontaine, S. S., & Kohl, K. D. (2020). Optimal integration between host physiology and functions of the gut microbiome. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 375(1808), 20190594.

Frasson, D., Opoku, M., Picozzi, T., Torossi, T., Balada, S., Smits, T. H., & Hilber, U. (2017). *Pseudomonas wadenswilerensis* sp. nov. and *Pseudomonas reidholzensis* sp. nov., two novel species within the *Pseudomonas putida* group isolated from forest soil. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 67(8), 2853-2861.

Freschi, L., Vincent, A. T., Jeukens, J., Emond-Rheault, J. G., Kukavica-Ibrulj, I., Dupont, M. J., ... & Levesque, R. C. (2019). The *Pseudomonas aeruginosa* pan-genome provides new insights on its population structure, horizontal gene transfer, and pathogenicity. *Genome biology and evolution*, 11(1), 109-120.

Friedt, W., Tu, J., & Fu, T. (2018). Academic and economic importance of *Brassica napus* rapeseed. In *The Brassica napus Genome* (pp. 1-20). Springer, Cham.

Fu, J., Momčilović, I., & Prasad, P. V. (2012). Roles of protein synthesis elongation factor EF-Tu in heat tolerance in plants. *Journal of Botany*, 2012.

Furmanczyk, E. M., Kaminski, M. A., Lipinski, L., Dziembowski, A., & Sobczak, A. (2018). *Pseudomonas laurylsulfatorans* sp. nov., sodium dodecyl sulfate degrading bacteria, isolated from the peaty soil of a wastewater treatment plant. *Systematic and applied microbiology*, 41(4), 348-354.

Gabriel, D. W., Kingsley, M. T., Hunter, J. E., & Gottwald, T. (1989). Reinstatement of *Xanthomonas citri* (ex Hasse) and *X. phaseoli* (ex Smith) to species and reclassification of all *X. campestris* pv. *citri* strains. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 39(1), 14-22.

Gadhve, K. R., Devlin, P. F., Ebertz, A., Ross, A., & Gange, A. C. (2018). Soil inoculation with *Bacillus* spp. modifies root endophytic bacterial diversity, evenness, and community composition in a context-specific manner. *Microbial ecology*, 76(3), 741-750.

García-Fraile, P., Chudíčková, M., Benada, O., Pikula, J., & Kolařík, M. (2015a). *Serratia myotis* sp. nov. and *Serratia vespertilionis* sp. nov., isolated from bats hibernating in caves. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 65(1), 90-94.

García-Fraile, P., Menéndez, E., Celador-Lera, L., Díez-Méndez, A., Jiménez-Gómez, A., Marcos-García, M., ... & Rivas, R. (2017). Bacterial probiotics: a truly green revolution. In *Probiotics and plant health* (pp. 131-162). Springer, Singapore.

García-Fraile, P., Rivas, R., Willems, A., Peix, A., Martens, M., Martínez-Molina, E., ... & Velázquez, E. (2007). *Rhizobium cellulosityticum* sp. nov., isolated from sawdust of *Populus alba*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 57(4), 844-848.

García-Fraile, P., Seaman, J. C., Karunakaran, R., Edwards, A., Poole, P. S., & Downie, J. A. (2015b). Arabinose and protocatechuate catabolism genes are important for growth of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* in the pea rhizosphere. *Plant and soil*, 390(1), 251-264.

García-Fraile, P. (2018). Roles of bacteria in the bark beetle holobiont—how do they shape this forest pest?. *Annals of Applied Biology*, 172(2), 111-125.

Gardan, L., Dauga, C., Prior, P., Gillis, M., & Saddler, G. S. (2000). *Acidovorax anthurii* sp. nov., a new phytopathogenic bacterium which causes bacterial leaf-spot of anthurium. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 50(1), 235-246.

Garrido-Sanz, D., Arrebola, E., Martínez-Granero, F., García-Méndez, S., Muriel, C., Blanco-Romero, E., ... & Redondo-Nieto, M. (2017). Classification of isolates from the *Pseudomonas fluorescens* complex into phylogenomic groups based in group-specific markers. *Frontiers in microbiology*, 8, 413.



- Gautreau, G., Bazin, A., Gachet, M., Planel, R., Burlot, L., Dubois, M., ... & Vallenet, D. (2020). PPanGGOLiN: Depicting microbial diversity via a partitioned pangenome graph. *PLoS computational biology*, *16*(3), e1007732.
- Ginz, M., & Engelhardt, U. H. (2000). Identification of proline-based diketopiperazines in roasted coffee. *Journal of agricultural and food chemistry*, *48*(8), 3528-3532.
- Glare, T. R., Jurat-Fuentes, J. L., & O'callaghan, M. (2017). Basic and applied research: entomopathogenic bacteria. In *Microbial control of insect and mite pests* (pp. 47-67). Academic press.
- González-Dominici, L. I., Saati-Santamaría, Z., & García-Fraile, P. (2020). Genome Analysis and Genomic Comparison of the Novel Species *Arthrobacter ipsi* Reveal Its Potential Protective Role in Its Bark Beetle Host. *Microbial Ecology*, 1-12.
- Goto, M., & Makino, T. (1977). Emendation of *Pseudomonas cissicola*, the causal organism of bacterial leaf spot of *Cayratia japonica* (Thunb.) Gagn. and designation of the neotype strain. *Japanese Journal of Phytopathology*, *43*(1), 40-45.
- Gregory, K., Salvador, L. A., Akbar, S., Adaikpoh, B. I., & Stevens, D. C. (2019). Survey of biosynthetic gene clusters from sequenced myxobacteria reveals unexplored biosynthetic potential. *Microorganisms*, *7*(6), 181.
- Gross, H., & Loper, J. E. (2009). Genomics of secondary metabolite production by *Pseudomonas* spp. *Natural product reports*, *26*(11), 1408-1446.
- Großkinsky, D. K., Tafner, R., Moreno, M. V., Stenglein, S. A., De Salamone, I. E. G., Nelson, L. M., ... & Roitsch, T. (2016). Cytokinin production by *Pseudomonas fluorescens* G20-18 determines biocontrol activity against *Pseudomonas syringae* in Arabidopsis. *Scientific reports*, *6*(1), 1-11.
- Gu, X., Ding, J., Liu, W., Yang, X., Yao, L., Gao, X., ... & Wen, J. (2020). Comparative genomics and association analysis identifies virulence genes of *Cercospora sojae* in soybean. *BMC genomics*, *21*(1), 1-17.
- Gu, Z., Liu, Y., Xu, B., Wang, N., Jiao, N., Shen, L., ... & Sun, J. (2017). *Massilia glaciei* sp. nov., isolated from the Muztagh Glacier. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, *67*(10), 4075-4079.
- Guo, H., Chen, C., Lee, D. J., Wang, A., & Ren, N. (2015). Denitrifying sulfide removal by *Pseudomonas* sp. C27 at excess carbon supply: mechanisms. *Bioresource technology*, *180*, 381-385.
- Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N., & Tesler, G. (2013). QUASt: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*, *29*(8), 1072-1075.
- Gutiérrez-García, K., Neira-González, A., Pérez-Gutiérrez, R. M., Granados-Ramírez, G., Zarraga, R., Wrobel, K., ... & Flores-Cotera, L. B. (2017). Phylogenomics of 2, 4-Diacetylphloroglucinol-producing *pseudomonas* and novel antiglycation endophytes from *Piper auritum*. *Journal of natural products*, *80*(7), 1955-1963.
- Hahnke, R. L., Meier-Kolthoff, J. P., García-López, M., Mukherjee, S., Huntemann, M., Ivanova, N. N., ... & Göker, M. (2016). Genome-based taxonomic classification of *Bacteroidetes*. *Frontiers in microbiology*, *7*, 2003.
- Hall, S., McDermott, C., Anoopkumar-Dukie, S., McFarland, A. J., Forbes, A., Perkins, A. V., ... & Grant, G. D. (2016). Cellular effects of pyocyanin, a secreted virulence factor of *Pseudomonas aeruginosa*. *Toxins*, *8*(8), 236.
- Hameed, A., Shahina, M., Lin, S. Y., Liu, Y. C., & Young, C. C. (2014). *Pseudomonas hussainii* sp. nov., isolated from droppings of a seashore bird, and emended descriptions of *Pseudomonas pohangensis*, *Pseudomonas benzenivorans* and *Pseudomonas segetis*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, *64*(7), 2330-2337.

- Han, H., Wang, Q., He, L. Y., & Sheng, X. F. (2018). Increased biomass and reduced rapeseed Cd accumulation of oilseed rape in the presence of Cd-immobilizing and polyamine-producing bacteria. *Journal of hazardous materials*, 353, 280-289.
- Harding, C. J., Sutherland, E., Hanna, J. G., Houston, D. R., & Czekster, C. M. (2021). Bypassing the requirement for aminoacyl-tRNA by a cyclodipeptide synthase enzyme. *RSC Chemical Biology*, 2, 230-240
- Harper, L., Balasubramanian, D., Ohneck, E. A., Sause, W. E., Chapman, J., Mejia-Sosa, B., ... & Torres, V. J. (2018). *Staphylococcus aureus* responds to the central metabolite pyruvate to regulate virulence. *MBio*, 9(1).
- Harrington, T. (2005). Ecology and evolution of mycophagous bark beetles and their fungal partners. *Insect-fungal associations*, 257-291.
- Hellman, S. (1997). Darwin's clinical relevance. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, 79(12), 2275-2281.
- Henkes, G. J., Kandeler, E., Marhan, S., Scheu, S., & Bonkowski, M. (2018). Interactions of mycorrhiza and protists in the rhizosphere systemically alter microbial community composition, plant shoot-to-root ratio and within-root system nitrogen allocation. *Frontiers in Environmental Science*, 6, 117.
- Hernández-García, J. A., Briones-Roblero, C. I., Rivera-Orduña, F. N., & Zúñiga, G. (2017). Revealing the gut bacteriome of *Dendroctonus* bark beetles (Curculionidae: Scolytinae): diversity, core members and co-evolutionary patterns. *Scientific reports*, 7(1), 1-12.
- Hesse, C., Schulz, F., Bull, C. T., Shaffer, B. T., Yan, Q., Shapiro, N., ... & Loper, J. E. (2018). Genome-based evolutionary history of *Pseudomonas* spp. *Environmental microbiology*, 20(6), 2142-2159.
- Hilgarth, M., Redwitz, J., Ehrmann, M. A., Vogel, R. F., & Jakob, F. (2021). *Bombella favorum* sp. nov. and *Bombella mellum* sp. nov., two novel species isolated from the honeycombs of *Apis mellifera*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 004633.
- Hoagland, D. R., & Arnon, D. I. (1950). The water-culture method for growing plants without soil. *Circular. California agricultural experiment station*, 347(2nd edit).
- Hoffmann, T., Krug, D., Bozkurt, N., Duddela, S., Jansen, R., Garcia, R., ... & Müller, R. (2018). Correlating chemical diversity with taxonomic distance for discovery of natural products in myxobacteria. *Nature communications*, 9(1), 1-10.
- Holmberg, A. I. J., Melin, P., Levenfors, J. P., & Sundh, I. (2009). Development and evaluation of SCAR markers for a *Pseudomonas brassicacearum* strain used in biological control of snow mould. *Biological Control*, 48(2), 181-187.
- Holmes, B., Steigerwalt, A. G., Weaver, R. E., & Brenner, D. J. (1987). *Chryseomonas luteola* comb. nov. and *Flavimonas oryzihabitans* gen. nov., comb. nov., *Pseudomonas*-like species from human clinical specimens and formerly known, respectively, as groups Ve-1 and Ve-2. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 37(3), 245-250.
- Holmes, B., Steigerwalt, A. G., Weaver, R. E., & Brenner, D. J. (1986). *Chryseomonas polytricha* gen. nov., sp. nov., a *Pseudomonas*-like organism from human clinical specimens and formerly known as group Ve-1. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 36(2), 161-165.
- Hooper, L. V., & Gordon, J. I. (2001). Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science*, 292(5519), 1115-1118.
- Hopkins, E., Sanvictores, T., & Sharma, S. (2020). Physiology, acid base balance. *StatPearls [Internet]*.

- Hosokawa, T., & Fukatsu, T. (2020). Relevance of microbial symbiosis to insect behavior. *Current opinion in insect science*, 39, 91-100.
- Houwenhuysse, S., Stoks, R., Mukherjee, S., & Decaestecker, E. (2021). Locally adapted gut microbiomes mediate host stress tolerance. *The ISME Journal*, 1-14.
- Hu, F. P., Young, J. M., & Triggs, C. M. (1991). Numerical analysis and determinative tests for nonfluorescent plant-pathogenic *Pseudomonas* spp. and genomic analysis and reclassification of species related to *Pseudomonas avenae* Manns 1909. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 41(4), 516-525.
- Hu, F. P., Young, J. M., Stead, D. E., & Goto, M. (1997). Transfer of *Pseudomonas cissicola* (Takimoto 1939) Burkholder 1948 to the genus *Xanthomonas*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 47(1), 228-230.
- Hu, X., Yu, J., Wang, C., & Chen, H. (2014). Cellulolytic bacteria associated with the gut of *Dendroctonus armandi* larvae (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). *Forests*, 5(3), 455-465.
- Huang, X., Shen, S., & Lin, Y. H. (2021). Biodegradation of catechol by *Pseudomonas fluorescens* isolated from petroleum-impacted soil. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 99(1), 135-141.
- Huerta-Cepas, J., Szklarczyk, D., Heller, D., Hernández-Plaza, A., Forslund, S. K., Cook, H., ... & von Mering, C. (2019). eggNOG 5.0: a hierarchical, functionally and phylogenetically annotated orthology resource based on 5090 organisms and 2502 viruses. *Nucleic acids research*, 47(D1), D309-D314.
- Hug, J. J., Krug, D., & Müller, R. (2020). Bacteria as genetically programmable producers of bioactive natural products. *Nature Reviews Chemistry*, 1-22.
- Hug, L. A., Baker, B. J., Anantharaman, K., Brown, C. T., Probst, A. J., Castelle, C. J., ... & Banfield, J. F. (2016). A new view of the tree of life. *Nature microbiology*, 1(5), 1-6.
- Huson, D. H., Richter, D. C., Rausch, C., DeZulian, T., Franz, M., & Rupp, R. (2007). Dendroscope: An interactive viewer for large phylogenetic trees. *BMC bioinformatics*, 8(1), 460.
- Hwang, C. Y., Zhang, G. I., Kang, S. H., Kim, H. J., & Cho, B. C. (2009). *Pseudomonas pelagia* sp. nov., isolated from a culture of the Antarctic green alga *Pyramimonas gelidicola*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 59(12), 3019-3024.
- Ibarra-Juarez, L. A., Burton, M. A. J., Biedermann, P. H. W., Cruz, L., Desgarenes, D., Ibarra-Laclette, E., ... & Lamelas, A. (2020). Evidence for Succession and Putative Metabolic Roles of Fungi and Bacteria in the Farming Mutualism of the Ambrosia Beetle *Xyleborus affinis*. *Msystems*, 5(5).
- Ibarra-Juarez, L. A., Desgarenes, D., Vázquez-Rosas-Landa, M., Villafan, E., Alonso-Sánchez, A., Ferrera-Rodríguez, O., ... & Lamelas, A. (2018). Impact of rearing conditions on the ambrosia beetle's microbiome. *Life*, 8(4), 63.
- Imran, M., Shahzad, S. M., Arif, M. S., Yasmeen, T., Ali, B., & Tanveer, A. (2020). Inoculation of potassium solubilizing bacteria with different potassium fertilization sources mediates maize growth and productivity. *Pak. J. Agric. Sci*, 57, 1045-1055.
- Inkpen, S. A., Douglas, G. M., Brunet, T. D. P., Leuschen, K., Doolittle, W. F., & Langille, M. G. (2017). The coupling of taxonomy and function in microbiomes. *Biology & Philosophy*, 32(6), 1225-1243.
- Isoda, R., Yoshinari, A., Ishikawa, Y., Sadoine, M., Simon, R., Frommer, W. B., & Nakamura, M. (2021). Sensors for the quantification, localization and analysis of the dynamics of plant hormones. *The Plant Journal*, 105(2), 542-557.

- Jacques, I. B., Moutiez, M., Witwinowski, J., Darbon, E., Martel, C., Seguin, J., ... & Belin, P. (2015). Analysis of 51 cyclodipeptide synthases reveals the basis for substrate specificity. *Nature chemical biology*, *11*(9), 721-727.
- Jain, C., Rodriguez-R, L. M., Phillippy, A. M., Konstantinidis, K. T., & Aluru, S. (2018). High throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries. *Nature communications*, *9*(1), 1-8.
- Jan, S., Abbas, N., Ashraf, M., & Ahmad, P. (2019). Roles of potential plant hormones and transcription factors in controlling leaf senescence and drought tolerance. *Protoplasma*, *256*(2), 313-329.
- Jang, G. I., Lee, I., Ha, T. T., Yoon, S. J., Hwang, Y. J., Yi, H., ... & Hwang, C. Y. (2020). *Pseudomonas neustonica* sp. nov., isolated from the sea surface microlayer of the Ross Sea (Antarctica). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *70*(6), 3832-3838.
- Janvier, X., Boukerb, A. M., Feuilloley, M. G., & Groboillot, A. (2021). Draft Genome Sequences of Four Commensal Strains of *Staphylococcus* and *Pseudomonas* Isolated from Healthy Human Skin. *Microbiology Resource Announcements*, *10*(1).
- Javanmardi, F., Emami, A., Pirbonyeh, N., Keshavarzi, A., & Rajaei, M. (2019). A systematic review and meta-analysis on Exo-toxins prevalence in hospital acquired *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Infection, Genetics and Evolution*, *75*, 104037.
- Jia, J., Wang, X., Deng, P., Ma, L., Baird, S. M., Li, X., & Lu, S. E. (2020). *Pseudomonas glycinae* sp. nov. isolated from the soybean rhizosphere. *MicrobiologyOpen*, *9*(9), e1101.
- Jiménez-Gómez, A., Saati-Santamaría, Z., Igual, J. M., Rivas, R., Mateos, P. F., & García-Fraile, P. (2019). Genome insights into the novel species *Microvirga brassicacearum*, a rapeseed endophyte with biotechnological potential. *Microorganisms*, *7*(9), 354.
- Jiménez-Gómez, A., Saati-Santamaría, Z., Kostovcik, M., Rivas, R., Velázquez, E., Mateos, P. F., ... & García-Fraile, P. (2020). Selection of the Root Endophyte *Pseudomonas brassicacearum* CDVBN10 as Plant Growth Promoter for *Brassica napus* L. *Crops. Agronomy*, *10*(11), 1788.
- Jing, T. Z., Qi, F. H., & Wang, Z. Y. (2020). Most dominant roles of insect gut bacteria: digestion, detoxification, or essential nutrient provision?. *Microbiome*, *8*(1), 1-20.
- Jones, J. B., Lacy, G. H., Bouzar, H., Stall, R. E., & Schaad, N. W. (2004). Reclassification of the xanthomonads associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. *Systematic and applied microbiology*, *27*(6), 755-762.
- Jones, P., Binns, D., Chang, H. Y., Fraser, M., Li, W., McAnulla, C., ... & Hunter, S. (2014). InterProScan 5: genome-scale protein function classification. *Bioinformatics*, *30*(9), 1236-1240.
- Kai, M. (2020). Diversity and distribution of volatile secondary metabolites throughout *Bacillus subtilis* isolates. *Frontiers in microbiology*, *11*, 559.
- Kakumanu, M. L., DeVries, Z. C., Barbarin, A. M., Santangelo, R. G., & Schal, C. (2020). Bed bugs shape the indoor microbial community composition of infested homes. *Science of The Total Environment*, *743*, 140704.
- Kang, H. S. (2017). Phylogeny-guided (meta) genome mining approach for the targeted discovery of new microbial natural products. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, *44*(2), 285-293.
- Kang, X., Dong, F., Shi, C., Liu, S., Sun, J., Chen, J., ... & Zheng, H. (2019). DRAMP 2.0, an updated data repository of antimicrobial peptides. *Scientific data*, *6*(1), 1-10.

- Kati, A., & Kati, H. (2013). Isolation and identification of bacteria from *Xylosandrus germanus* (Blandford)(Coleoptera: Curculionidae). *African Journal of Microbiology Research*, 7(47), 5288-5299.
- Kautsar, S. A., Blin, K., Shaw, S., Navarro-Muñoz, J. C., Terlouw, B. R., van der Hooft, J. J., ... & Selem-Mojica, N. (2020). MIBiG 2.0: a repository for biosynthetic gene clusters of known function. *Nucleic acids research*, 48(D1), D454-D458.
- Kautsar, S. A., Blin, K., Shaw, S., Weber, T., & Medema, M. H. (2021). BiG-FAM: the biosynthetic gene cluster families database. *Nucleic acids research*, 49(D1), D490-D497.
- Kawai, Y., & Yabuuchi, E. (1975). *Pseudomonas pertucinogena* sp. nov., an organism previously misidentified as *Bordetella pertussis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 25(4), 317-323.
- Kelly, L. W., Haas, A. F., & Nelson, C. E. (2018). Ecosystem microbiology of coral reefs: linking genomic, metabolomic, and biogeochemical dynamics from animal symbioses to reefscape processes. *Msystems*, 3(2).
- Kennedy, C., & Rudnick, P. (2015). *Azomonas*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1-10.
- Kennedy, C., Rudnick, P., MacDonald, M. L., & Melton, T. (2015). *Azotobacter*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1-33.
- Kenshole, E., Herisse, M., Michael, M., & Pidot, S. J. (2021). Natural product discovery through microbial genome mining. *Current Opinion in Chemical Biology*, 60, 47-54.
- Kim, B., Wang, Y. C., Hespén, C. W., Espinosa, J., Salje, J., Rangan, K. J., ... & Hang, H. C. (2019). *Enterococcus faecium* secreted antigen A generates muropeptides to enhance host immunity and limit bacterial pathogenesis. *Elife*, 8, e45343.
- Kim, D. H., & Flavell, S. W. (2020). Host-microbe interactions and the behavior of *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Neurogenetics*, 34(3-4), 1-10.
- Kim, K. H., Roh, S. W., Chang, H. W., Nam, Y. D., Yoon, J. H., Jeon, C. O., ... & Bae, J. W. (2009). *Pseudomonas sabulinigri* sp. nov., isolated from black beach sand. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 59(1), 38-41.
- Klapper, M., Arp, J., Guenther, M., & Stallforth, P. (2018). The role of bacterial natural products in predator defense. *Synlett*, 29(05), 537-541.
- Kodama, K., Kimura, N., & Komagaya, K. (1985). Two new species of *Pseudomonas*: *P. oryzihabitans* isolated from rice paddy and clinical specimens and *P. luteola* isolated from clinical specimens. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 35(4), 467-474.
- Kordes, A., Preusse, M., Willger, S. D., Braubach, P., Jonigk, D., Haverich, A., ... & Häussler, S. (2019). Genetically diverse *Pseudomonas aeruginosa* populations display similar transcriptomic profiles in a cystic fibrosis explanted lung. *Nature communications*, 10(1), 1-10.
- Kosina, M., Barták, M., Mašlaňová, I., Pascutti, A. V., Šedo, O., Lexa, M., & Sedláček, I. (2013). *Pseudomonas prosekii* sp. nov., a novel psychrotrophic bacterium from Antarctica. *Current microbiology*, 67(6), 637-646.
- Kovacs, N. (1956). Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. *Nature* 178, 703. doi: 10.1038/178703a0
- Kraemer, S. A., & Boynton, P. J. (2017). Evidence for microbial local adaptation in nature. *Molecular Ecology*, 26(7), 1860-1876.

- Krause, K. M., Serio, A. W., Kane, T. R., & Connolly, L. E. (2016). Aminoglycosides: an overview. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(6), a027029.
- Kuiper, I., Bloemberg, G. V., Noreen, S., Thomas-Oates, J. E., & Lugtenberg, B. J. (2001). Increased uptake of putrescine in the rhizosphere inhibits competitive root colonization by *Pseudomonas fluorescens* strain WCS365. *Molecular plant-microbe interactions*, 14(9), 1096-1104.
- Kulkarni, P. R., Jia, T., Kuehne, S. A., Kerkering, T. M., Morris, E. R., Searle, M. S., ... & Kulkarni, R. V. (2014). A sequence-based approach for prediction of CsrA/RsmA targets in bacteria with experimental validation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nucleic acids research*, 42(11), 6811-6825.
- Kumar, M., Kumar, A., Sahu, K. P., Patel, A., Reddy, B., Sheoran, N., ... & Rathour, R. (2021). Deciphering core-microbiome of rice leaf endosphere: Revelation by metagenomic and microbiological analysis of aromatic and non-aromatic genotypes grown in three geographical zones. *Microbiological Research*, 246, 126704.
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and evolution*, 33(7), 1870-1874.
- Kunze, G., Zipfel, C., Robatzek, S., Niehaus, K., Boller, T., & Felix, G. (2004). The N terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in *Arabidopsis* plants. *The Plant Cell*, 16(12), 3496-3507.
- Kwon, S. W., Kim, J. S., Park, I. C., Yoon, S. H., Park, D. H., Lim, C. K., & Go, S. J. (2003). *Pseudomonas koreensis* sp. nov., *Pseudomonas umsongensis* sp. nov. and *Pseudomonas jinjuensis* sp. nov., novel species from farm soils in Korea. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 53(1), 21-27.
- Lalucat, J., Mulet, M., Gomila, M., & García-Valdés, E. (2020). Genomics in bacterial taxonomy: impact on the genus *Pseudomonas*. *Genes*, 11(2), 139.
- Langmead, B., & Salzberg, S. L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature methods*, 9(4), 357.
- Lanteigne, C., Gadkar, V. J., Wallon, T., Novinscak, A., & Fillion, M. (2012). Production of DAPG and HCN by *Pseudomonas* sp. LBUM300 contributes to the biological control of bacterial canker of tomato. *Phytopathology*, 102(10), 967-973.
- Lebre, P. H., De Maayer, P., & Cowan, D. A. (2017). Xerotolerant bacteria: surviving through a dry spell. *Nature Reviews Microbiology*, 15(5), 285-296
- Lechner, M., Findeiß, S., Steiner, L., Marz, M., Stadler, P. F., & Prohaska, S. J. (2011). Proteinortho: detection of (co-) orthologs in large-scale analysis. *BMC bioinformatics*, 12(1), 1-9.
- Lee, J. Y., Han, G. G., Kim, E. B., & Choi, Y. J. (2017). Comparative genomics of *Lactobacillus salivarius* strains focusing on their host adaptation. *Microbiological research*, 205, 48-58.
- Lee, M. D. (2019). GToTree: a user-friendly workflow for phylogenomics. *Bioinformatics*, 35(20), 4162-4164.
- Lee, S., Kim, S. G., & Park, C. M. (2010). Salicylic acid promotes seed germination under high salinity by modulating antioxidant activity in *Arabidopsis*. *New Phytologist*, 188(2), 626-637.
- Lemanceau, P., Blouin, M., Muller, D., & Moënne-Loccoz, Y. (2017). Let the core microbiota be functional. *Trends in Plant Science*, 22(7), 583-595.
- Letunic, I., & Bork, P. (2019). Interactive Tree Of Life (iTOL) v4: recent updates and new developments. *Nucleic acids research*, 47(W1), W256-W259.

- Levenfors, J. P., Eberhard, T. H., Levenfors, J. J., Gerhardson, B., & Hökeberg, M. (2008). Biological control of snow mould (*Microdochium nivale*) in winter cereals by *Pseudomonas brassicacearum*, MA250. *BioControl*, 53(4), 651-665.
- Levy, A., Conway, J. M., Dangl, J. L., & Woyke, T. (2018a). Elucidating bacterial gene functions in the plant microbiome. *Cell host & microbe*, 24(4), 475-485.
- Levy, A., Gonzalez, I. S., Mittelviehhaus, M., Clingenpeel, S., Paredes, S. H., Miao, J., ... & Dangl, J. L. (2018b). Genomic features of bacterial adaptation to plants. *Nature genetics*, 50(1), 138-150.
- Lewis, K. (2020). The science of antibiotic discovery. *Cell*. 1077-1092.
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., ... & Durbin, R. (2009). The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics*, 25(16), 2078-2079.
- Li, J., & Ye, B. C. (2021a). Metabolic engineering of *Pseudomonas putida* KT2440 for high-yield production of protocatechuic acid. *Bioresource Technology*, 319, 124239.
- Li, J., Zheng, B., Hu, R., Liu, Y., Jing, Y., Xiao, Y., ... & Zhou, Q. (2019). *Pseudomonas* species isolated from tobacco seed promote root growth and reduce lead contents in *Nicotiana tabacum* K326. *Canadian journal of microbiology*, 65(3), 214-223.
- Li, K. B. (2003). ClustalW-MPI: ClustalW analysis using distributed and parallel computing. *Bioinformatics*, 19(12), 1585-1586.
- Li, M., Ma, Q., Kong, D., Han, X., Che, J., Zhou, Y., ... & Zhang, Q. (2021b). *Pseudomonas nicosulfuronedens* sp. nov., a nicosulfuron degrading bacterium, isolated from a microbial consortium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 004632.
- Li, N., Han, X., Feng, D., Yuan, D., & Huang, L. J. (2019). Signaling crosstalk between salicylic acid and ethylene/jasmonate in plant defense: do we understand what they are whispering?. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(3), 671.
- Li, W., Rokni-Zadeh, H., De Vleeschouwer, M., Ghequire, M. G., Sinnaeve, D., Xie, G. L., ... & De Mot, R. (2013). The antimicrobial compound xantholysin defines a new group of *Pseudomonas* cyclic lipopeptides. *PloS one*, 8(5), e62946.
- Liang, G., & Bushman, F. D. (2021). The human virome: assembly, composition and host interactions. *Nature Reviews Microbiology*, 1-14.
- Lin, S. Y., Hameed, A., Liu, Y. C., Hsu, Y. H., Lai, W. A., & Young, C. C. (2013). *Pseudomonas formosensis* sp. nov., a gamma-proteobacteria isolated from food-waste compost in Taiwan. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 63(9), 3168-3174.
- Lin, W., Pan, Y., & Bazylinski, D. A. (2017). Diversity and ecology of and biomineralization by magnetotactic bacteria. *Environmental microbiology reports*, 9(4), 345-356.
- Lind, H., Sjögren, J., Gohil, S., Kenne, L., Schnürer, J., & Broberg, A. (2007). Antifungal compounds from cultures of dairy propionibacteria type strains. *FEMS microbiology letters*, 271(2), 310-315.
- Lindgren, B. S., & Raffa, K. F. (2013). Evolution of tree killing in bark beetles (Coleoptera: Curculionidae): trade-offs between the maddening crowds and a sticky situation. *The Canadian Entomologist*, 145(5), 471-495.
- Lindgren, Veselská, T., Skelton, J., Kostovčík, M., Hulcr, J., Baldrian, P., Chudíčková, M., ... & Kolařík, M. (2019). Adaptive traits of bark and ambrosia beetle-associated fungi. *Fungal Ecology*, 41, 165-176.

- Liu, J., Yu, H., & Li, S. M. (2018). Expanding tryptophan-containing cyclodipeptide synthase spectrum by identification of nine members from *Streptomyces* strains. *Applied microbiology and biotechnology*, 102(10), 4435-4444.
- Liu, L., Yuan, T., An, Q., Yang, M., Mao, X., Mo, C., ... & Peng, G. (2019). *Azotobacter bryophylli* sp. nov., isolated from the succulent plant *Bryophyllum pinnatum*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 69(7), 1986-1992.
- Liu, R., Liu, H., Feng, H., Wang, X., Zhang, C. X., Zhang, K. Y., & Lai, R. (2008). *Pseudomonas duriflava* sp. nov., isolated from a desert soil. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 58(6), 1404-1408.
- Liu, Z., Beskrovnaya, P., Melnyk, R. A., Hossain, S. S., Khorasani, S., O'Sullivan, L. R., ... & Haney, C. H. (2018). A genome-wide screen identifies genes in rhizosphere-associated *Pseudomonas* required to evade plant defenses. *MBio*, 9(6).
- Lok, C. (2015). Mining the microbial dark matter. *Nature*, 522(7556), 270.
- Lombardi, C., Tolchard, J., Bouillot, S., Signor, L., Gebus, C., Liebl, D., ... & Job, V. (2019). Structural and functional characterization of the type three secretion system (T3SS) needle of *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in microbiology*, 10, 573.
- Loper, J. E., Hassan, K. A., Mavrodi, D. V., & Davis, E. W. (2012). Comparative genomics of plant-associated *Pseudomonas* spp.: insights into diversity and inheritance of traits involved in multitrophic interactions. *PLoS genetics*, 8(7).
- López-Mondéjar, R., Kostovčík, M., Lladó, S., Carro, L., & García-Fraile, P. (2017). Exploring the plant microbiome through multi-omics approaches. In *Probiotics in Agroecosystem* (pp. 233-268). Springer, Singapore.
- Louca, S., Mazel, F., Doebeli, M., & Parfrey, L. W. (2019). A census-based estimate of Earth's bacterial and archaeal diversity. *PLoS biology*, 17(2), e3000106.
- Louca, S., Parfrey, L. W., & Doebeli, M. (2016). Decoupling function and taxonomy in the global ocean microbiome. *Science*, 353(6305), 1272-1277.
- Lunak, Z. R., & Noel, K. D. (2015a). A quinol oxidase, encoded by *cyoABCD*, is utilized to adapt to lower O<sub>2</sub> concentrations in *Rhizobium etli* CFN42. *Microbiology*, 161(Pt 1), 203.
- Lunak, Z. R., & Noel, K. D. (2015b). Quinol oxidase encoded by *cyoABCD* in *Rhizobium etli* CFN42 is regulated by ActSR and is crucial for growth at low pH or low iron conditions. *Microbiology*, 161(Pt 9), 1806.
- MacLean, A., Michel, A. M. B., & Appanna, V. P. (2020). Metabolic manipulation by *Pseudomonas fluorescens*: a powerful stratagem against oxidative and metal stress. *Journal of medical microbiology*, 69(3), 339-346.
- Madigan, M. T., Bender, K. S., Buckley, D. H., Sattley, W. M., & Stahl, D. A. (2017). *Brock Biology of Microorganisms 15 edn*.
- Malard, F., Dore, J., Gaugler, B., & Mohty, M. (2020). Introduction to host microbiome symbiosis in health and disease. *Mucosal Immunology*, 1-8.
- Mandal, S., Bhattacharya, S., Roy, C., Rameez, M. J., Sarkar, J., Mapder, T., ... & Ghosh, W. (2020). Cryptic roles of tetrathionate in the sulfur cycle of marine sediments: microbial drivers and indicators. *Biogeosciences*, 17(18), 4611-4631.



- Männle, D., McKinnie, S. M., Mantri, S. S., Steinke, K., Lu, Z., Moore, B. S., ... & Kaysser, L. (2020). Comparative Genomics and Metabolomics in the Genus *Nocardia*. *Msystems*, 5(3).
- Marahiel, M. A. (2016). A structural model for multimodular NRPS assembly lines. *Natural product reports*, 33(2), 136-140.
- Martin-Rivilla, H., Gutierrez-Mañero, F. J., Gradillas, A., P Navarro, M. O., Andrade, G., & Lucas, J. A. (2020). Identifying the compounds of the metabolic elicitors of *Pseudomonas fluorescens* N 21.4 responsible for their ability to induce plant resistance. *Plants*, 9(8), 1020.
- Martin, D. (2017). Investigation of the biocontrol activity *in vitro* and *in planta* of different *Pseudomonas* species against important crown, stem, foliar and root pathogens of ornamental crops (Doctoral dissertation, The Ohio State University).
- Martin, W., Baross, J., Kelley, D., & Russell, M. J. (2008). Hydrothermal vents and the origin of life. *Nature Reviews Microbiology*, 6(11), 805-814.
- Martínez-Espinosa, R. M. (2020). Microorganisms and their metabolic capabilities in the context of the biogeochemical nitrogen cycle at extreme environments. *International journal of molecular sciences*, 21(12), 4228.
- Martins, N. B., Ferreira, L. A. R., Queiroz, C. L., Buiatte, A. B. G., Lima, A. M. C., de Souza, R. R., ... & Santos, A. L. Q. (2021). Caseous Stomatitis Caused by *Pseudomonas aeruginosa* in *Boa constrictor* amarali. *Acta Scientiae Veterinariae*, 49.
- Mattoo, A. K., Fatima, T., Upadhyay, R. K., & Handa, A. K. (2015). Polyamines in plants: Biosynthesis from arginine, and metabolic, physiological and stress-response roles. *Amino Acids in Higher Plants; D'Mello, JPF, Ed.; CABI: Wallingford, UK*, 177-194.
- Medema, M. H., Blin, K., Cimermancic, P., de Jager, V., Zakrzewski, P., Fischbach, M. A., ... & Breitling, R. (2011). antiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. *Nucleic acids research*, 39(suppl\_2), W339-W346.
- Medema, M. H., Kottmann, R., Yilmaz, P., Cummings, M., Biggins, J. B., Blin, K., ... & Cruz-Morales, P. (2015). Minimum information about a biosynthetic gene cluster. *Nature chemical biology*, 11(9), 625-631.
- Meier-Kolthoff, J. P., Auch, A. F., Klenk, H. P., & Göker, M. (2013). Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. *BMC bioinformatics*, 14(1), 60.
- Meleshko, D., Mohimani, H., Tracanna, V., Hajirasouliha, I., Medema, M. H., Korobeynikov, A., & Pevzner, P. A. (2019). BiosyntheticSPAdes: reconstructing biosynthetic gene clusters from assembly graphs. *Genome research*, 29(8), 1352-1362.
- Meliani, A., Bensoltane, A., Benidire, L., & Oufdou, K. (2017). Plant growth-promotion and IAA secretion with *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*. *Research & Reviews: Journal of Botanical Sciences*, 6(2), 16-24.
- Melnyk, R. A., Beskrovnaya, P., Liu, Z., Song, Y., & Haney, C. H. (2019). Bacterially produced spermidine induces plant systemic susceptibility to pathogens. *bioRxiv*, 517870.
- Menendez, E., & Garcia-Fraile, P. (2017). Plant probiotic bacteria: solutions to feed the world. *AIMS microbiology*, 3(3), 502.
- Menéndez, E., & Paço, A. (2020). Is the application of plant probiotic bacterial consortia always beneficial for plants? Exploring synergies between rhizobial and non-rhizobial bacteria and their effects on agro-economically valuable crops. *Life*, 10(3), 24.

- Menéndez, E., Martínez-Hidalgo, P., Silva, L. R., Velázquez, E., Mateos, P. F., & Peix, A. (2017). Recent advances in the active biomolecules involved in rhizobia-legume symbiosis. *Microbes for Legume Improvement*, 45-74.
- Menendez, E., Ramírez-Bahena, M. H., Fabryova, A., Igual, J. M., Benada, O., Mateos, P. F., ... & García-Fraile, P. (2015). *Pseudomonas coleopterorum* sp. nov., a cellulase-producing bacterium isolated from the bark beetle *Hylesinus fraxini*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 65(9), 2852-2858.
- Menéndez, E., Robledo, M., Jiménez-Zurdo, J. I., Velázquez, E., Rivas, R., Murray, J. D., & Mateos, P. F. (2019). Legumes display common and host-specific responses to the rhizobial cellulase CelC2 during primary symbiotic infection. *Scientific reports*, 9(1), 1-10.
- Merda, D., Briand, M., Bosis, E., Rousseau, C., Portier, P., Barret, M., ... & Fischer-Le Saux, M. (2017). Ancestral acquisitions, gene flow and multiple evolutionary trajectories of the type three secretion system and effectors in *Xanthomonas* plant pathogens. *Molecular ecology*, 26(21), 5939-5952.
- Meunier, L., Tocquin, P., Cornet, L., Sirjacobs, D., Leclère, V., Pupin, M., ... & Baurain, D. (2020). Palantir: a springboard for the analysis of secondary metabolite gene clusters in large-scale genome mining projects. *Bioinformatics*, 36(15), 4345-4347.
- Milivojevic, D., Šumonja, N., Medić, S., Pavic, A., Moric, I., Vasiljevic, B., ... & Nikodinovic-Runic, J. (2018). Biofilm-forming ability and infection potential of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from animals and humans. *Pathogens and disease*, 76(4), fty041.
- Miravet-Verde, S., Ferrar, T., Espadas-García, G., Mazzolini, R., Gharrab, A., Sabido, E., ... & Lluch-Senar, M. (2019). Unraveling the hidden universe of small proteins in bacterial genomes. *Molecular systems biology*, 15(2), e8290.
- Mishra, A. K., Choi, J., Choi, S. J., & Baek, K. H. (2017). Cyclodipeptides: An overview of their biosynthesis and biological activity. *Molecules*, 22(10), 1796.
- Mishra, J., & Arora, N. K. (2018). Secondary metabolites of fluorescent pseudomonads in biocontrol of phytopathogens for sustainable agriculture. *Applied soil ecology*, 125, 35-45.
- Molloy, E. M., & Hertweck, C. (2017). Antimicrobial discovery inspired by ecological interactions. *Current opinion in microbiology*, 39, 121-127.
- Morales-Jiménez, J., de León, A. V. P., García-Domínguez, A., Martínez-Romero, E., Zúñiga, G., & Hernández-Rodríguez, C. (2013). Nitrogen-fixing and uricolytic bacteria associated with the gut of *Dendroctonus rhizophagus* and *Dendroctonus valens* (Curculionidae: Scolytinae). *Microbial ecology*, 66(1), 200-210.
- Moreau, C. S. (2020). Symbioses among ants and microbes. *Current opinion in insect science*, 39, 1-5.
- Moreno-Indias, I., Lahti, L., Nedyalkova, M., Elbere, I., Roshchupkin, G., Adilovic, M., ... & Claesson, M. J. (2021). Statistical and machine learning techniques in human microbiome studies: contemporary challenges and solutions. *Frontiers in Microbiology*, 12, 277.
- Morens, D. M., & Fauci, A. S. (2020). Emerging pandemic diseases: How we got to COVID-19. *Cell*.
- Moriyama, M., Nikoh, N., Hosokawa, T., & Fukatsu, T. (2015). Riboflavin provisioning underlies *Wolbachia*'s fitness contribution to its insect host. *MBio*, 6(6).
- Moss, M. O., & Austin, D. A. (2015). *Rugamonas*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1-3.

- Mulet, M., Gomila, M., Lemaitre, B., Lalucat, J., & García-Valdés, E. (2012). Taxonomic characterisation of *Pseudomonas* strain L48 and formal proposal of *Pseudomonas entomophila* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 35(3), 145-149.
- Mulet, M., Lalucat, J., & García-Valdés, E. (2010). DNA sequence-based analysis of the *Pseudomonas* species. *Environmental Microbiology*, 12(6), 1513-1530.
- Mulet, M., Montaner, M., Román, D., Gomila, M., Kittinger, C., Zarfel, G., ... & García-Valdés, E. (2020). *Pseudomonas* Species Diversity Along the Danube River Assessed by rpoD Gene Sequence and MALDI-TOF MS Analyses of Cultivated Strains. *Frontiers in microbiology*, 11, 2114.
- Mulet, M., Sánchez, D., Lalucat, J., Lee, K., & García-Valdés, E. (2015). *Pseudomonas alkylphenolica* sp. nov., a bacterial species able to form special aerial structures when grown on p-cresol. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 65(11), 4013-4018.
- Mulet, M., Sánchez, D., Rodríguez, A. C., Nogales, B., Bosch, R., Busquets, A., ... & García-Valdés, E. (2018). *Pseudomonas gallaeciensis* sp. nov., isolated from crude-oil-contaminated intertidal sand samples after the Prestige oil spill. *Systematic and applied microbiology*, 41(4), 340-347.
- Mullish, B. H., Quraishi, M. N., Segal, J. P., Ianiro, G., & Iqbal, T. H. (2021). The gut microbiome: what every gastroenterologist needs to know. *Frontline Gastroenterology*, 12(2), 118-127.
- Na, S. I., Kim, Y. O., Yoon, S. H., Ha, S. M., Baek, I., & Chun, J. (2018). UBCG: Up-to-date bacterial core gene set and pipeline for phylogenomic tree reconstruction. *Journal of Microbiology*, 56(4), 280-285.
- Nahar, K., Mukaihara, T., Taguchi, F., Matsui, H., Yamamoto, M., Toyoda, K., ... & Ichinose, Y. (2020). HopH1 effectors of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 and pv. *syringae* B728a induce HR cell death in nonhost eggplant *Solanum torvum*. *Journal of General Plant Pathology*, 1-6.
- Navarro-Muñoz, J. C., Selem-Mojica, N., Mullowney, M. W., Kautsar, S. A., Tryon, J. H., Parkinson, E. I., ... & Roeters, A. (2020). A computational framework to explore large-scale biosynthetic diversity. *Nature chemical biology*, 16(1), 60-68.
- Nazli, F., Khan, M. Y., Jamil, M., Nadeem, S. M., & Ahmad, M. (2020). Soil microbes and plant health. In *Plant Disease Management Strategies for Sustainable Agriculture through Traditional and Modern Approaches* (pp. 111-135). Springer, Cham.
- Nguyen, D. D., Melnik, A. V., Koyama, N., Lu, X., Schorn, M., Fang, J., ... & Cheng, T. L. (2016). Indexing the *Pseudomonas* specialized metabolome enabled the discovery of poaeamide B and the bananamides. *Nature microbiology*, 2(1), 1-10.
- Nguyen, M., Wemheuer, B., Laffy, P. W., Webster, N. S., & Thomas, T. (2021). Taxonomic, functional and expression analysis of viral communities associated with marine sponges. *PeerJ*, 9, e10715.
- Nguyen, T., Sedghi, L., Ganther, S., Malone, E., Kamarajan, P., & Kapila, Y. L. (2020). Host-microbe interactions: Profiles in the transcriptome, the proteome, and the metabolome. *Periodontology 2000*, 82(1), 115-128.
- Nishimura, Y., Kinpara, M., & Iizuka, H. (1989). *Mesophilobacter marinus* gen. nov., sp. nov.: an aerobic coccobacillus isolated from seawater. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 39(4), 378-381.
- Nivina, A., Yuet, K. P., Hsu, J., & Khosla, C. (2019). Evolution and Diversity of Assembly-Line Polyketide Synthases: Focus Review. *Chemical reviews*, 119(24), 12524-12547.

- Nobori, T., Velásquez, A. C., Wu, J., Kvitko, B. H., Kremer, J. M., Wang, Y., ... & Tsuda, K. (2018). Transcriptome landscape of a bacterial pathogen under plant immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(13), E3055-E3064.
- Nogales, J., Mueller, J., Gudmundsson, S., Canalejo, F. J., Duque, E., Monk, J., ... & Palsson, B. O. (2020). High-quality genome-scale metabolic modelling of *Pseudomonas putida* highlights its broad metabolic capabilities. *Environmental microbiology*, 22(1), 255-269.
- Nonaka, S., Salim, E., Kamiya, K., Hori, A., Nainu, F., Asri, R. M., ... & Kuraishi, T. (2020). Molecular and functional analysis of pore-forming toxin Monalysin from entomopathogenic bacterium *Pseudomonas entomophila*. *Frontiers in immunology*, 11, 520.
- Nouioui, I., Carro, L., García-López, M., Meier-Kolthoff, J. P., Woyke, T., Kyrpides, N. C., ... & Göker, M. (2018). Genome-based taxonomic classification of the phylum Actinobacteria. *Frontiers in microbiology*, 9, 2007.
- Novinscak, A., Gadkar, V. J., Joly, D. L., & Fillion, M. (2016). Complete genome sequence of *Pseudomonas brassicacearum* LBUM300, a disease-suppressive bacterium with antagonistic activity toward fungal, oomycete, and bacterial plant pathogens. *Genome Announc.*, 4(1), e01623-15.
- O'hara, G. W., Goss, T. J., Dilworth, M. J., & Glenn, A. R. (1989). Maintenance of intracellular pH and acid tolerance in *Rhizobium meliloti*. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(8), 1870-1876.
- Oldroyd, G.E., Murray, J.D., Poole, P.S. & Downie, J.A., (2011). The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. *Annual review of genetics*, 45, pp.119-144.
- Oliveira, A., Oliveira, L. C., Aburjaile, F., Benevides, L., Tiwari, S., Jamal, S. B., ... & Wattam, A. R. (2017). Insight of genus *Corynebacterium*: ascertaining the role of pathogenic and non-pathogenic species. *Frontiers in microbiology*, 8, 1937.
- Opota, O., Vallet-Gély, I., Vincentelli, R., Kellenberger, C., Iacovache, I., Gonzalez, M. R., ... & Lemaitre, B. (2011). Monalysin, a novel  $\beta$ -pore-forming toxin from the *Drosophila* pathogen *Pseudomonas entomophila*, contributes to host intestinal damage and lethality. *PLoS Pathog*, 7(9), e1002259.
- Otieno, N., Lally, R. D., Kiwanuka, S., Lloyd, A., Ryan, D., Germaine, K. J., & Dowling, D. N. (2015). Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic *Pseudomonas* isolates. *Frontiers in microbiology*, 6, 745.
- Page, A. J., Cummins, C. A., Hunt, M., Wong, V. K., Reuter, S., Holden, M. T., ... & Parkhill, J. (2015). Roary: rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. *Bioinformatics*, 31(22), 3691-3693.
- Page, M. G. (2019). The role of iron and siderophores in infection, and the development of siderophore antibiotics. *Clinical Infectious Diseases*, 69(Supplement\_7), S529-S537.
- Page, W. J., & Shivprasad, S. (1991). *Azotobacter salinestris* sp. nov., a sodium-dependent, microaerophilic, and aeroadaptive nitrogen-fixing bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 41(3), 369-376.
- Palazzotto, E., & Weber, T. (2018). Omics and multi-omics approaches to study the biosynthesis of secondary metabolites in microorganisms. *Current opinion in microbiology*, 45, 109-116.
- Palleroni, N. J. (2015). *Pseudomonas*. *Bergey's manual of systematics of archaea and bacteria*, 1-1.
- Panichikkal, J., Thomas, R., John, J. C., & Radhakrishnan, E. K. (2019). Biogenic gold nanoparticle supplementation to plant beneficial *Pseudomonas monteilii* was found to enhance its plant probiotic effect. *Current microbiology*, 76(4), 503-509.

- Pankievicz, V. C. S., Camilios-Neto, D., Bonato, P., Balsanelli, E., Tadra-Sfeir, M. Z., Faoro, H., ... & Souza, E. M. (2016). RNA-seq transcriptional profiling of *Herbaspirillum seropedicae* colonizing wheat (*Triticum aestivum*) roots. *Plant molecular biology*, *90*(6), 589-603.
- Park, A. R., Jeong, S. I., Jeon, H. W., Kim, J., Kim, N., Ha, M. T., ... & Kim, J. C. (2020). A Diketopiperazine, Cyclo-(L-Pro-L-Ile), Derived From *Bacillus thuringiensis* JCK-1233 Controls Pine Wilt Disease by Elicitation of Moderate Hypersensitive Reaction. *Frontiers in plant science*, *11*, 1023.
- Pascual, J., Lucena, T., Ruvira, M. A., Giordano, A., Gambacorta, A., Garay, E., ... & Macián, M. C. (2012). *Pseudomonas litoralis* sp. nov., isolated from Mediterranean seawater. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, *62*(2), 438-444.
- Paulussen, C., Hallsworth, J. E., Álvarez-Pérez, S., Nierman, W. C., Hamill, P. G., Blain, D., ... & Lievens, B. (2017). Ecology of aspergillosis: insights into the pathogenic potency of *Aspergillus fumigatus* and some other *Aspergillus* species. *Microbial biotechnology*, *10*(2), 296-322.
- Paungfoo-Lonhienne, C., Lonhienne, T. G., Yeoh, Y. K., Donose, B. C., Webb, R. I., Parsons, J., ... & Ragan, M. A. (2016). Crosstalk between sugarcane and a plant-growth promoting *Burkholderia* species. *Scientific reports*, *6*(1), 1-14.
- Pavez, P., Castillo, J. L., González, C., & Martínez, M. (2009). Poly- $\beta$ -hydroxyalkanoate exert a protective effect against carbon starvation and frozen conditions in *Sphingopyxis chilensis*. *Current microbiology*, *59*(6), 636-640.
- Peix, A., Ramírez-Bahena, M. H., & Velázquez, E. (2018). The current status on the taxonomy of *Pseudomonas* revisited: an update. *Infection, Genetics and Evolution*, *57*, 106-116.
- Peix, A., Rivas, R., Santa-Regina, I., Mateos, P. F., Martínez-Molina, E., Rodríguez-Barrueco, C., & Velazquez, E. (2004). *Pseudomonas lutea* sp. nov., a novel phosphate-solubilizing bacterium isolated from the rhizosphere of grasses. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *54*(3), 847-850.
- Peix, A., Rivas, R., Santa-Regina, I., Mateos, P. F., Martínez-Molina, E., Rodríguez-Barrueco, C., & Velazquez, E. (2004). *Pseudomonas lutea* sp. nov., a novel phosphate-solubilizing bacterium isolated from the rhizosphere of grasses. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *54*(3), 847-850.
- Peixoto, R. S., Harkins, D. M., & Nelson, K. E. (2020). Advances in Microbiome Research for Animal Health. *Annual Review of Animal Biosciences*, *9*.
- Pel, M. J., & Pieterse, C. M. (2013). Microbial recognition and evasion of host immunity. *Journal of experimental botany*, *64*(5), 1237-1248.
- Penn, D. J. (2003). The evolutionary roots of our environmental problems: Toward a Darwinian ecology. *The quarterly review of biology*, *78*(3), 275-301.
- Pennington, M. J., Rothman, J. A., Jones, M. B., McFrederick, Q. S., Gan, J., & Trumble, J. T. (2017). Effects of contaminants of emerging concern on *Megaselia scalaris* (Lowe, Diptera: Phoridae) and its microbial community. *Scientific reports*, *7*(1), 1-12.
- Peral-Aranega, E., Saati-Santamaría, Z., Kolařík, M., Rivas, R., & García-Fraile, P. (2020). Bacteria belonging to *Pseudomonas typographi* sp. nov. from the bark beetle *Ips typographus* have genomic potential to aid in the host ecology. *Insects*, *11*(9), 593.
- Pereira, J. R., Araújo, D., Freitas, P., Marques, A. C., Alves, V. D., Sevrin, C., ... & Freitas, F. (2021). Production of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca*: Cultivation on fruit pulp waste and polymer characterization. *International Journal of Biological Macromolecules*, *167*, 85-92.

- Pfeilmeier, S., Saur, I. M. L., Rathjen, J. P., Zipfel, C., & Malone, J. G. (2016). High levels of cyclic-di-GMP in plant-associated *Pseudomonas* correlate with evasion of plant immunity. *Molecular plant pathology*, 17(4), 521-531.
- Philippot, L., Andersson, S. G., Battin, T. J., Prosser, J. I., Schimel, J. P., Whitman, W. B., & Hallin, S. (2010). The ecological coherence of high bacterial taxonomic ranks. *Nature Reviews Microbiology*, 8(7), 523-529.
- Phukon, L. C., Chourasia, R., Kumari, M., Godan, T. K., Sahoo, D., Parameswaran, B., & Rai, A. K. (2020). Production and characterisation of lipase for application in detergent industry from a novel *Pseudomonas helmanticensis* HS6. *Bioresource technology*, 309, 123352.
- Pishchany, G., & Kolter, R. (2020). On the possible ecological roles of antimicrobials. *Molecular Microbiology*, 113(3), 580-587.
- Poveda, J., Jiménez-Gómez, A., Saati-Santamaría, Z., Usategui-Martín, R., Rivas, R., & García-Fraile, P. (2019). Mealworm frass as a potential biofertilizer and abiotic stress tolerance-inductor in plants. *Applied Soil Ecology*, 142, 110-122.
- Prakash, A. A., Rajasekar, A., Sarankumar, R. K., AlSalhi, M. S., Devanesan, S., Aljaafreh, M. J., ... & Sayed, S. R. (2021). Metagenomic analysis of microbial community and its role in bioelectrokinetic remediation of tannery contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials*, 125133.
- Pritchard L, Glover RH, Humphris S, Elphinstone JG, Toth IK (2016) Genomics and taxonomy in diagnostics for food security: soft-rotting enterobacterial plant pathogens. *Anal Methods* 8(1):12–24
- Pulschen, A. A., Bendia, A. G., Fricker, A. D., Pellizari, V. H., Galante, D., & Rodrigues, F. (2017). Isolation of uncultured bacteria from Antarctica using long incubation periods and low nutritional media. *Frontiers in microbiology*, 8, 1346.
- R Core Team (2020). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>
- Raffa, K. F., Gregoire, J. C., & Lindgren, B. S. (2015). Natural history and ecology of bark beetles. In *Bark beetles* (pp. 1-40). Academic Press.
- Ramette, A., Frapolli, M., Défago, G., & Moëgne-Loccoz, Y. (2003). Phylogeny of HCN synthase-encoding *hcnBC* genes in biocontrol fluorescent pseudomonads and its relationship with host plant species and HCN synthesis ability. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 16(6), 525-535.
- Ramos, P. L., Van Trappen, S., Thompson, F. L., Rocha, R. C., Barbosa, H. R., De Vos, P., & Moreira-Filho, C. A. (2011). Screening for endophytic nitrogen-fixing bacteria in Brazilian sugar cane varieties used in organic farming and description of *Stenotrophomonas pavanii* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61(4), 926-931.
- Rangan, K. J., Pedicord, V. A., Wang, Y. C., Kim, B., Lu, Y., Shaham, S., ... & Hang, H. C. (2016). A secreted bacterial peptidoglycan hydrolase enhances tolerance to enteric pathogens. *Science*, 353(6306), 1434-1437.
- Rapicavoli, J. N., Blanco-Ulate, B., Muszyński, A., Figueroa-Balderas, R., Morales-Cruz, A., Azadi, P., ... & Roper, M. C. (2018). Lipopolysaccharide O-antigen delays plant innate immune recognition of *Xylella fastidiosa*. *Nature communications*, 9(1), 1-12.
- Rawat, P., Das, S., Shankhdhar, D., & Shankhdhar, S. C. (2020). Phosphate-Solubilizing Microorganisms: Mechanism and Their Role in Phosphate Solubilization and Uptake. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 1-20.

- Ren, S., Ma, W., Xu, T., Lin, X., Yin, H., Yang, B., ... & Liu, Y. (2010). Two novel alkaloids from the South China Sea marine sponge *Dysidea* sp. *The Journal of antibiotics*, 63(12), 699-701.
- Repka, L. M., Chekan, J. R., Nair, S. K., & Van Der Donk, W. A. (2017). Mechanistic understanding of lanthipeptide biosynthetic enzymes. *Chemical reviews*, 117(8), 5457-5520.
- Richter, M., & Rosselló-Móra, R. (2009). Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(45), 19126-19131.
- Richter, M., Rosselló-Móra, R., Oliver Glöckner, F., & Peplies, J. (2016). JSpeciesWS: a web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison. *Bioinformatics*, 32(6), 929-931.
- Rieusset, L., Rey, M., Muller, D., Vacheron, J., Gerin, F., Dubost, A., ... & Prigent-Combaret, C. (2020). Secondary metabolites from plant-associated *Pseudomonas* are overproduced in biofilm. *Microbial biotechnology*, 13(5), 1562-1580.
- Rimmer, P. B., & Shorttle, O. (2019). Origin of life's building blocks in carbon-and nitrogen-rich surface hydrothermal vents. *Life*, 9(1), 12.
- Riquelme, S. A., Liimatta, K., Lung, T. W. F., Fields, B., Ahn, D., Chen, D., ... & Prince, A. (2020). *Pseudomonas aeruginosa* utilizes host-derived itaconate to redirect its metabolism to promote biofilm formation. *Cell Metabolism*, 31(6), 1091-1106.
- Ritter, S. P., Lewis, A. C., Vincent, S. L., Lo, L. L., Cunha, A. P. A., Chamot, D., ... & Owttrim, G. W. (2020). Evidence for convergent sensing of multiple abiotic stresses in cyanobacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1864(1), 129462.
- Robbins, S. J., Song, W., Engelberts, J. P., Glasl, B., Slaby, B. M., Boyd, J., ... & Webster, N. S. (2021). A genomic view of the microbiome of coral reef demosponges. *The ISME Journal*, 1-14.
- Robledo, M., Jiménez-Zurdo, J. I., Velázquez, E., Trujillo, M. E., Zurdo-Piñero, J. L., Ramírez-Bahena, M. H., ... & Mateos, P. F. (2008). *Rhizobium* cellulase CelC2 is essential for primary symbiotic infection of legume host roots. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(19), 7064-7069.
- Rogers, J. S., & Swofford, D. L. (1998). A fast method for approximating maximum likelihoods of phylogenetic trees from nucleotide sequences. *Systematic biology*, 47(1), 77-89.
- Romanenko, L. A., Uchino, M., Falsen, E., Frolova, G. M., Zhukova, N. V., & Mikhailov, V. V. (2005). *Pseudomonas pachastrellae* sp. nov., isolated from a marine sponge. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 55(2), 919-924.
- Romanenko, L. A., Uchino, M., Falsen, E., Frolova, G. M., Zhukova, N. V., & Mikhailov, V. V. (2005). *Pseudomonas pachastrellae* sp. nov., isolated from a marine sponge. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 55(2), 919-924.
- Roquigny, R., Arseneault, T., Gadkar, V. J., Novinscak, A., Joly, D. L., & Filion, M. (2015). Complete genome sequence of biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* LBUM223. *Genome announcements*, 3(3).
- Ross, P. A., Turelli, M., & Hoffmann, A. A. (2019). Evolutionary ecology of *Wolbachia* releases for disease control. *Annual review of genetics*, 53, 93-116.
- Ruiz-Perez, C. A., Conrad, R. E., & Konstantinidis, K. T. (2021). MicrobeAnnotator: a user-friendly, comprehensive functional annotation pipeline for microbial genomes. *BMC bioinformatics*, 22(1), 1-16.
- Saati-Santamaría et al. (*En preparación*). Comparative genomics allows the discovery of thousands of genes and functions related with *Pseudomonas* adaptation to different environments.

Saati-Santamaría et al. (*En preparación*). Transcriptomics insights into the adaptation and plant growth promotion mechanisms of *P. brassicacearum* CDVBN10 in *B. napus* roots.

Saati-Santamaría, Z., López-Mondéjar, R., Jiménez-Gómez, A., Díez-Méndez, A., Větrovský, T., Igual, J. M., ... & García-Fraile, P. (2018). Discovery of phloeophagus beetles as a source of *Pseudomonas* strains that produce potentially new bioactive substances and description of *Pseudomonas bohémica* sp. nov. *Frontiers in microbiology*, 9, 913.

Saati-Santamaría, Z., Peral-Aranega, E. Rivas, R., García-Fraile, P. Phylogenomics in *Pseudomonas* guides a deep taxonomic reorganization: description of *Denitrifimonas* gen. nov. comb. nov., *Neopseudomonas* gen. nov. comb. nov., *Chryseomonas* gen. nov. comb. nov., *Luteomonas* gen. nov. comb. nov., *Parapseudomonas* gen. nov. comb. nov., *Stenotrophomonas geniculata* comb. nov., reclassification of *Pseudomonas cissicola* as a later synonym of *Xanthomonas citri*, *Pseudomonas lutea* and *Pseudomonas zeshuii* as later synonyms of *Pseudomonas luteola*, *Pseudomonas abyssi* as a later synonym of *Pseudomonas gallaeciensis*, and *Xanthomonas perforans* as a later synonym of *Xanthomonas euvesicatoria*. *Genomics*. (*Under review*)

Saati-Santamaría, Z., Rivas, R., Kolarik, M., García-Fraile, P. (2021). A New Perspective of *Pseudomonas* – Host Interactions: Distribution and Potential Ecological Functions of the Genus *Pseudomonas* Within the Bark Beetle Holobiont. *Biology*. 10(2), 164. doi: 10.3390/biology10020

Saati-Santamaría, Z., Selem-Mojica, N., Peral-Aranega, E. Rivas, R., García-Fraile, P. Unveiling the Genomic Potential of *Pseudomonas* type Strains for Discovering New Natural Products. *Journal of Advanced Research*. (*Under review*).

Saddler, G. S., & Bradbury, J. F. (2015). *Xanthomonas*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1-53.

Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution*, 4(4), 406-425.

Salomon, M. V., Bottini, R., de Souza Filho, G. A., Cohen, A. C., Moreno, D., Gil, M., & Piccoli, P. (2014). Bacteria isolated from roots and rhizosphere of *Vitis vinifera* retard water losses, induce abscisic acid accumulation and synthesis of defense-related terpenes in in vitro cultured grapevine. *Physiologia plantarum*, 151(4), 359-374.

Sanaei, E., Charlat, S., & Engelstädter, J. (2021). *Wolbachia* host shifts: routes, mechanisms, constraints and evolutionary consequences. *Biological Reviews*, 96(2), 433-453.

Sánchez, D., Mulet, M., Rodríguez, A. C., David, Z., Lalucat, J., & García-Valdés, E. (2014). *Pseudomonas aestusnigri* sp. nov., isolated from crude oil-contaminated intertidal sand samples after the Prestige oil spill. *Systematic and applied microbiology*, 37(2), 89-94.

Santos-Junior, C. D., Pan, S., Zhao, X. M., & Coelho, L. P. (2020). MACREL: antimicrobial peptide screening in genomes and metagenomes. antimicrobial peptide screening in genomes and metagenomes. *PeerJ*, 8, e10555.

Sarma, S. J., Lei, Z., Rosenfeld, C. S., Ericsson, A., & Sumner, L. W. (2020). Nontargeted fecal metabolomics: an emerging tool to probe the role of the gut microbiome in host health. *Bioanalysis*, 351-353.

Sass, P. (2017). *Antibiotics. Methods and Protocols*. Springer.

Sauer, M., Russmayer, H., Grabherr, R., Peterbauer, C. K., & Marx, H. (2017). The efficient clade: lactic acid bacteria for industrial chemical production. *Trends in biotechnology*, 35(8), 756-769.

Savchuk, S., & Dilantha Fernando, W. G. (2004). Effect of timing of application and population dynamics on the degree of biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* by bacterial antagonists. *FEMS microbiology ecology*, 49(3), 379-388



- Saw, J. H., Nunoura, T., Hirai, M., Takaki, Y., Parsons, R., Michelsen, M., ... & Giovannoni, S. J. (2020). Pangenomics analysis reveals diversification of enzyme families and niche specialization in globally abundant SAR202 bacteria. *MBio*, 11(1).
- Sawa, T., Momiyama, K., Mihara, T., Kainuma, A., Kinoshita, M., & Moriyama, K. (2020). Molecular epidemiology of clinically high-risk *Pseudomonas aeruginosa* strains: Practical overview. *Microbiology and immunology*, 64(5), 331-344.
- Schiessl, K. T., Hu, F., Jo, J., Nazia, S. Z., Wang, B., Price-Whelan, A., ... & Dietrich, L. E. (2019). Phenazine production promotes antibiotic tolerance and metabolic heterogeneity in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature communications*, 10(1), 1-10.
- Schleifer, K. H. (2009). Classification of Bacteria and Archaea: past, present and future. *Systematic and applied microbiology*, 32(8), 533-542.
- Schoonbeek, H. J., Wang, H. H., Stefanato, F. L., Craze, M., Bowden, S., Wallington, E., ... & Ridout, C. J. (2015). Arabidopsis EF-Tu receptor enhances bacterial disease resistance in transgenic wheat. *New Phytologist*, 206(2), 606-613.
- Schroth, M. N., Cho, J. J., Green, S. K., & Kominos, S. D. (2018). Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* in agricultural areas. *Journal of medical microbiology*, 67(8), 1191-1201.
- Schultz, J. E., & Matin, A. (1991). Molecular and functional characterization of a carbon starvation gene of *Escherichia coli*. *Journal of molecular biology*, 218(1), 129-140.
- Schulz, F., Eloe-Fadrosch, E. A., Bowers, R. M., Jarett, J., Nielsen, T., Ivanova, N. N., ... & Woyke, T. (2017). Towards a balanced view of the bacterial tree of life. *Microbiome*, 5(1), 1-6.
- Schwanemann, T., Otto, M., Wierckx, N., & Wynands, B. (2020). *Pseudomonas* as versatile aromatics cell factory. *Biotechnology Journal*, 15(11), 1900569.
- Scott, J. J., Oh, D. C., Yuceer, M. C., Klepzig, K. D., Clardy, J., & Currie, C. R. (2008). Bacterial protection of beetle-fungus mutualism. *Science*, 322(5898), 63-63.
- Seemann, T. (2014). Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*, 30(14), 2068-2069.
- Sélem-Mojica, N., Aguilar, C., Gutiérrez-García, K., Martínez-Guerrero, C. E., & Barona-Gómez, F. (2019). EvoMining reveals the origin and fate of natural product biosynthetic enzymes. *Microbial genomics*, 5(12).
- Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D., ... & Ideker, T. (2003). Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome research*, 13(11), 2498-2504.
- Sheppard, S. K., Guttman, D. S., & Fitzgerald, J. R. (2018). Population genomics of bacterial host adaptation. *Nature Reviews Genetics*, 19(9), 549-565.
- Shevyakova, N. I., Il'ina, E. N., Stetsenko, L. A., & Kuznetsov, V. V. (2011). Nickel accumulation in rape shoots (*Brassica napus* L.) increased by putrescine. *International journal of phytoremediation*, 13(4), 345-356.
- Shiro, Y. (2012). Structure and function of bacterial nitric oxide reductases: nitric oxide reductase, anaerobic enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1817(10), 1907-1913.
- Silby, M. W., Winstanley, C., Godfrey, S. A., Levy, S. B., & Jackson, R. W. (2011). *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable. *FEMS microbiology reviews*, 35(4), 652-680.

- Simão, F. A., Waterhouse, R. M., Ioannidis, P., Kriventseva, E. V., & Zdobnov, E. M. (2015). BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. *Bioinformatics*, 31(19), 3210-3212.
- Singh, S., Kumar, V., Singh, S., Dhanjal, D. S., Datta, S., & Singh, J. (2020). Global scenario of plant–microbiome for sustainable agriculture: current advancements and future challenges. In *Plant Microbiomes for Sustainable Agriculture* (pp. 425-443). Springer, Cham.
- Six, D. L. (2013). The bark beetle holobiont: why microbes matter. *Journal of Chemical Ecology*, 39(7), 989-1002.
- Smith, W. P., Vettiger, A., Winter, J., Ryser, T., Comstock, L. E., Basler, M., & Foster, K. R. (2020). The evolution of the type VI secretion system as a disintegration weapon. *PLoS biology*, 18(5), e3000720.
- Soudek, P., Ursu, M., Petrová, Š., & Vaněk, T. (2016). Improving crop tolerance to heavy metal stress by polyamine application. *Food chemistry*, 213, 223-229.
- Starke, R., Mondéjar, R. L., Human, Z. R., Navrátilová, D., Štursová, M., Větrovský, T., ... & Baldrian, P. (2021). Niche differentiation of bacteria and fungi in carbon and nitrogen cycling of different habitats in a temperate coniferous forest: A metaproteomic approach. *Soil Biology and Biochemistry*, 155, 108170.
- Steinegger, M., & Söding, J. (2017). MMseqs2 enables sensitive protein sequence searching for the analysis of massive data sets. *Nature biotechnology*, 35(11), 1026-1028.
- Stressmann, F. A., Bernal-Bayard, J., Pérez-Pascual, D., Audrain, B., Rendueles, O., Briolat, V., ... & Ghigo, J. M. (2021). Mining zebrafish microbiota reveals key community-level resistance against fish pathogen infection. *The ISME Journal*, 15(3), 702-719.
- Sun, J., Wang, W., Ying, Y., Zhu, X., Liu, J., & Hao, J. (2018). *Pseudomonas profundus* sp. nov., isolated from deep-sea water. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 68(5), 1776-1780.
- Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., Monnet, D. L., ... & Zorzet, A. (2018). Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *The Lancet Infectious Diseases*, 18(3), 318-327.
- Takai, K. (2019). Limits of terrestrial life and biosphere. In *Astrobiology* (pp. 323-344). Springer, Singapore.
- Takimoto, S. (1939). Bacterial leaf spot of *Cissus japonica* Willd. *Japanese Journal of Phytopathology*, 9(1), 41-43.
- Tan, J., Kerstetter, J. E., & Turcotte, M. M. (2021). Eco-evolutionary interaction between microbiome presence and rapid biofilm evolution determines plant host fitness. *Nature Ecology & Evolution*, 1-7.
- Tan, W. B., Jiang, Z., Chen, C., Yuan, Y., Gao, L. F., Wang, H. F., ... & Wang, A. J. (2015). *Thiopseudomonas denitrificans* gen. nov., sp. nov., isolated from anaerobic activated sludge. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 65(1), 225-229.
- Teixidó, M., Zurita, E., Malakoutikhah, M., Tarragó, T., & Giralt, E. (2007). Diketopiperazines as a tool for the study of transport across the blood– brain barrier (BBB) and their potential use as BBB-shuttles. *Journal of the American Chemical Society*, 129(38), 11802-11813.
- Telke, A. A., Joshi, S. M., Jadhav, S. U., Tamboli, D. P., & Govindwar, S. P. (2010). Decolorization and detoxification of Congo red and textile industry effluent by an isolated bacterium *Pseudomonas* sp. SU-EBT. *Biodegradation*, 21(2), 283-296.
- Teoh, M. C., Furusawa, G., & Singham, G. V. (2021). Multifaceted interactions between the pseudomonads and insects: mechanisms and prospects. *Archives of Microbiology*, 1-25.

- Therrien, J., Mason, C. J., Cale, J. A., Adams, A., Aukema, B. H., Currie, C. R., ... & Erbilgin, N. (2015). Bacteria influence mountain pine beetle brood development through interactions with symbiotic and antagonistic fungi: implications for climate-driven host range expansion. *Oecologia*, *179*(2), 467-485.
- Thompson, J. P., & Skerman, V. B. D. (1979). *Azotobacteraceae: the taxonomy and ecology of the aerobic nitrogen-fixing bacteria*. Academic Press Inc.(London) Ltd..
- Tremblay, J., Fortin, N., Elias, M., Wasserscheid, J., King, T. L., Lee, K., & Greer, C. W. (2019). Metagenomic and metatranscriptomic responses of natural oil degrading bacteria in the presence of dispersants. *Environmental microbiology*, *21*(7), 2307-2319.
- Trienens, M., & Beukeboom, L. W. (2019). Symbionts in insect biology and pest control—an introduction. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, *167*(3), 153-155.
- Trivedi, P., Leach, J. E., Tringe, S. G., Sa, T., & Singh, B. K. (2020). Plant–microbiome interactions: From community assembly to plant health. *Nature Reviews Microbiology*, *18*(11), 607-621.
- Tyc, O., Song, C., Dickschat, J. S., Vos, M., & Garbeva, P. (2017). The ecological role of volatile and soluble secondary metabolites produced by soil bacteria. *Trends in microbiology*, *25*(4), 280-292.
- Vaishnav, P., & Demain, A. L. (2011). Unexpected applications of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, *29*(2), 223-229.
- Vallet-Gely, I., Novikov, A., Augusto, L., Liehl, P., Bolbach, G., Péchy-Tarr, M., ... & Lemaitre, B. (2010). Association of hemolytic activity of *Pseudomonas entomophila*, a versatile soil bacterium, with cyclic lipopeptide production. *Applied and environmental microbiology*, *76*(3), 910-921.
- Van Arnam, E. B., Ruzzini, A. C., Sit, C. S., Horn, H., Pinto-Tomás, A. A., Currie, C. R., & Clardy, J. (2016). Selvamycin, an atypical antifungal polyene from two alternative genomic contexts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *113*(46), 12940-12945.
- van Santen, J. A., Kautsar, S. A., Medema, M. H., & Lington, R. G. (2020). Microbial natural product databases: moving forward in the multi-omics era. *Natural Product Reports*, *38*, 264-278
- Vargas, P., Farias, G. A., Nogales, J., Prada, H., Carvajal, V., Barón, M., ... & Gallegos, M. T. (2013). Plant flavonoids target *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC 3000 flagella and type III secretion system. *Environmental microbiology reports*, *5*(6), 841-850.
- Varjani, S. J., & Upasani, V. N. (2016). Biodegradation of petroleum hydrocarbons by oleophilic strain of *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 5514. *Bioresource technology*, *222*, 195-201.
- Vasanthakumar, A., Delalibera Jr, I., Handelsman, J., Klepzig, K. D., Schloss, P. D., & Raffa, K. F. (2006). Characterization of gut-associated bacteria in larvae and adults of the southern pine beetle, *Dendroctonus frontalis* Zimmermann. *Environmental Entomology*, *35*(6), 1710-1717.
- Velázquez, E., García-Fraile, P., Ramírez-Bahena, M. H., Rivas, R., & Martínez-Molina, E. (2017). Current status of the taxonomy of bacteria able to establish nitrogen-fixing legume symbiosis. In *Microbes for legume improvement* (pp. 1-43). Springer, Cham.
- Verhille, S., Baida, N., Dabboussi, F., Izard, D., & Leclerc, H. (1999). Taxonomic study of bacteria isolated from natural mineral waters: proposal of *Pseudomonas jessenii* sp. nov. and *Pseudomonas mandelii* sp. nov. *Systematic and applied microbiology*, *22*(1), 45-58.
- Veselská, T., Skelton, J., Kostovčík, M., Hulcr, J., Baldrian, P., Chudíčková, M., ... & Kolařík, M. (2019). Adaptive traits of bark and ambrosia beetle-associated fungi. *Fungal Ecology*, *41*, 165-176.

- Vesga, P., Flury, P., Vacheron, J., Keel, C., Croll, D., & Maurhofer, M. (2020). Transcriptome plasticity underlying plant root colonization and insect invasion by *Pseudomonas protegens*. *The ISME Journal*, 14(11), 2766-2782.
- Vlot, A. C., Dempsey, D. M. A., & Klessig, D. F. (2009). Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annual review of phytopathology*, 47, 177-206.
- Vodovar, N., Vallenet, D., Cruveiller, S., Rouy, Z., Barbe, V., Acosta, C., ... & Boccoard, F. (2006). Complete genome sequence of the entomopathogenic and metabolically versatile soil bacterium *Pseudomonas entomophila*. *Nature biotechnology*, 24(6), 673-679.
- Vyas, P., & Gulati, A. (2009). Organic acid production in vitro and plant growth promotion in maize under controlled environment by phosphate-solubilizing fluorescent *Pseudomonas*. *BMC microbiology*, 9(1), 1-15.
- Wagner, E., Zaiser, A., Leitner, R., Quijada, N. M., Pracser, N., Pietzka, A., ... & Rychli, K. (2020). Virulence characterization and comparative genomics of *Listeria monocytogenes* sequence type 155 strains. *BMC genomics*, 21(1), 1-18.
- Wang, C., Zhao, J., Zhang, H., Lee, Y. K., Zhai, Q., & Chen, W. (2020). Roles of intestinal bacteroides in human health and diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-19.
- Wang, G., Li, X., & Wang, Z. (2016). APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education. *Nucleic acids research*, 44(D1), D1087-D1093.
- Wang, H., Zheng, T., Hill, R. T., & Hu, X. (2014). *Permianibacter aggregans* gen. nov., sp. nov., a bacterium of the family Pseudomonadaceae capable of aggregating potential biofuel-producing microalgae. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 64(10), 3503-3507.
- Wang, J., Su, Q., Zhang, X., Li, C., Luo, S., Zhou, X., & Zheng, H. (2020). *Entomomonas moraniae* gen. nov., sp. nov., a member of the family Pseudomonadaceae isolated from Asian honey bee gut, possesses a highly reduced genome. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 70(1), 165-171.
- Wang, L., Tomas, F., & Mueller, R. S. (2020). Nutrient enrichment increases size of *Zostera marina* shoots and enriches for sulfur and nitrogen cycling bacteria in root-associated microbiomes. *FEMS microbiology ecology*, 96(8), fiae129.
- Wang, M. Q., & Sun, L. (2016). *Pseudomonas oceani* sp. nov., isolated from deep seawater. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 66(10), 4250-4255.
- Wang, S., Zhou, F., Wang, B., Xu, D., Cao, Q., Lu, M., & Sun, J. (2017). Volatiles produced by bacteria alleviate antagonistic effects of one associated fungus on *Dendroctonus valens* larvae. *Science China Life Sciences*, 60(8), 924-926.
- Wei, Y., Mao, H., Xu, Y., Zou, W., Fang, J., & Blom, J. (2018). *Pseudomonas abyssi* sp. nov., isolated from the abyssopelagic water of the Mariana Trench. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 68(8), 2462-2467.
- Weijland, A., & Parmeggiani, A. (1994). Why do two EF-Tu molecules act in the elongation cycle of protein biosynthesis?. *Trends in biochemical sciences*, 19(5), 188-193.
- Westermann, A. J., & Vogel, J. (2021). Cross-species RNA-seq for deciphering host-microbe interactions. *Nature Reviews Genetics*, 1-18.
- Westfall, C. S., Sherp, A. M., Zubieta, C., Alvarez, S., Schraft, E., Marcellin, R., ... & Jez, J. M. (2016). *Arabidopsis thaliana* GH3.5 acyl acid amido synthetase mediates metabolic crosstalk in auxin and salicylic acid homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(48), 13917-13922.

- Westoby, M., Nielsen, D. A., Gillings, M. R., Litchman, E., Madin, J. S., Paulsen, I. T., & Tetu, S. G. (2021). Cell size, genome size, and maximum growth rate are near-independent dimensions of ecological variation across bacteria and archaea. *Ecology and Evolution*.
- Wickham, H. (2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York.
- Windels, E. M., Van den Bergh, B., & Michiels, J. (2020). Bacteria under antibiotic attack: Different strategies for evolutionary adaptation. *PLoS pathogens*, *16*(5), e1008431.
- Winder, R. S., Macey, D. E., & Cortese, J. (2010). Dominant bacteria associated with broods of mountain pine beetle, *Dendroctonus ponderosae* (Coleoptera: Curculionidae, Scolytinae). *Journal of the Entomological Society of British Columbia*, *107*, 43-56.
- Wirth, T., Bergot, M., Rasigade, J. P., Pichon, B., Barbier, M., Martins-Simoes, P., ... & Laurent, F. (2020). Niche specialization and spread of *Staphylococcus capitis* involved in neonatal sepsis. *Nature microbiology*, *5*(5), 735-745.
- Wittouck, S., Wuyts, S., & Lebeer, S. (2019). Towards a genome-based reclassification of the genus *Lactobacillus*. *Applied and environmental microbiology*, *85*(3).
- Wodzanowski, K. A., Cassel, S. E., Grimes, C. L., & Kloxin, A. M. (2020). Tools for probing host-bacteria interactions in the gut microenvironment: From molecular to cellular levels. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, *30*(10), 127116.
- Wohlleben, W., Mast, Y., Stegmann, E., & Ziemert, N. (2016). Antibiotic drug discovery. *Microbial biotechnology*, *9*(5), 541-548.
- Wortham, B. W., Oliveira, M. A., & Patel, C. N. (2007). Polyamines in bacteria: pleiotropic effects yet specific mechanisms. *The genus Yersinia*, 106-115.
- Xiao, Y. P., Hui, W., Wang, Q., Roh, S. W., Shi, X. Q., Shi, J. H., & Quan, Z. X. (2009). *Pseudomonas caeni* sp. nov., a denitrifying bacterium isolated from the sludge of an anaerobic ammonium-oxidizing bioreactor. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, *59*(10), 2594-2598.
- Xin, X. F., Kvitko, B., & He, S. Y. (2018). *Pseudomonas syringae*: what it takes to be a pathogen. *Nature Reviews Microbiology*, *16*(5), 316.
- Xu, L., Lou, Q., Cheng, C., Lu, M., & Sun, J. (2015). Gut-associated bacteria of *Dendroctonus valens* and their involvement in verbenone production. *Microbial ecology*, *70*(4), 1012-1023.
- Xu, L., Sun, L., Zhang, S., Wang, S., & Lu, M. (2019). High-resolution profiling of gut bacterial communities in an invasive beetle using PacBio smrt sequencing system. *Insects*, *10*(8), 248.
- Xu, Q., Rawlings, N. D., Chiu, H. J., Jaroszewski, L., Klock, H. E., Knuth, M. W., ... & Wilson, I. A. (2011b). Structural analysis of papain-like NlpC/P60 superfamily enzymes with a circularly permuted topology reveals potential lipid binding sites. *PLoS One*, *6*(7), e22013.
- Xu, Z., Zhang, Y., Fu, H., Zhong, H., Hong, K., & Zhu, W. (2011a). Antifungal quinazolinones from marine-derived *Bacillus cereus* and their preparation. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, *21*(13), 4005-4007.
- Yao, T., Liu, J., Liu, Z., Li, T., Li, H., Che, Q., ... & Li, W. (2018). Genome mining of cyclodipeptide synthases unravels unusual tRNA-dependent diketopiperazine-terpene biosynthetic machinery. *Nature communications*, *9*(1), 1-12.
- Yilmax, H., Sezen, K., Kati, H., & Demirbağ, Z. (2006). The first study on the bacterial flora of the European spruce bark beetle, *Dendroctonus micans* (Coleoptera: Scolytidae). *Biologia*, *61*(6), 679-686.

- Yu, C. S., Chen, Y. C., Lu, C. H., & Hwang, J. K. (2006). Prediction of protein subcellular localization. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 64(3), 643-651.
- Zachow, C., Müller, H., Monk, J., & Berg, G. (2017). Complete genome sequence of *Pseudomonas brassicacearum* strain L13-6-12, a biological control agent from the rhizosphere of potato. *Standards in genomic sciences*, 12(1), 1-7.
- Zallot, R., Oberg, N., & Gerlt, J. A. (2019). The EFI web resource for genomic enzymology tools: leveraging protein, genome, and metagenome databases to discover novel enzymes and metabolic pathways. *Biochemistry*, 58(41), 4169-4182.
- Zaynab, M., Fatima, M., Abbas, S., Sharif, Y., Umair, M., Zafar, M. H., & Bahadar, K. (2018). Role of secondary metabolites in plant defense against pathogens. *Microbial pathogenesis*, 124, 198-202.
- Zerbino, D. R., & Birney, E. (2008). Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome research*, 18(5), 821-829.
- Zhai, Y., Shao, Z., Cai, M., Zheng, L., Li, G., Yu, Z., & Zhang, J. (2019). Cyclo (l-Pro–l-Leu) of *Pseudomonas putida* MCCC 1A00316 isolated from Antarctic soil: Identification and characterization of activity against *Meloidogyne incognita*. *Molecules*, 24(4), 768.
- Zhan, Y., Yan, Y., Deng, Z., Chen, M., Lu, W., Lu, C., ... & Lin, M. (2016). The novel regulatory ncRNA, NfiS, optimizes nitrogen fixation via base pairing with the nitrogenase gene nifK mRNA in *Pseudomonas stutzeri* A1501. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(30), E4348-E4356.
- Zhang, D. C., Liu, H. C., Zhou, Y. G., Schinner, F., & Margesin, R. (2011). *Pseudomonas bauzanensis* sp. nov., isolated from soil. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 61(10), 2333-2337.
- Zhang, H., Yohe, T., Huang, L., Entwistle, S., Wu, P., Yang, Z., ... & Yin, Y. (2018). dbCAN2: a meta server for automated carbohydrate-active enzyme annotation. *Nucleic acids research*, 46(W1), W95-W101.
- Zhang, Q., Zhang, L., Ross, P., Zhao, J., Zhang, H., & Chen, W. (2020). Comparative Genomics of *Lactobacillus crispatus* from the Gut and Vagina Reveals Genetic Diversity and Lifestyle Adaptation. *Genes*, 11(4), 360.
- Zhao, F., Yuan, M., Lei, L., Li, C., & Xu, X. (2021). Enhanced production of mono-rhamnolipid in *Pseudomonas aeruginosa* and application potential in agriculture and petroleum industry. *Bioresource Technology*, 323, 124605.
- Zhong, C., Han, M., Yu, S., Yang, P., Li, H., & Ning, K. (2018). Pan-genome analyses of 24 *Shewanella* strains re-emphasize the diversification of their functions yet evolutionary dynamics of metal-reducing pathway. *Biotechnology for biofuels*, 11(1), 1-13.
- Zhong, Z. P., Liu, Y., Hou, T. T., Liu, H. C., Zhou, Y. G., Wang, F., & Liu, Z. P. (2015). *Pseudomonas salina* sp. nov., isolated from a salt lake. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 65(9), 2846-2851.
- Zhou, F., Lou, Q., Wang, B., Xu, L., Cheng, C., Lu, M., & Sun, J. (2016). Altered carbohydrates allocation by associated bacteria-fungi interactions in a bark beetle-microbe symbiosis. *Scientific Reports* 6: 20135.
- Zhou, F., Xu, L., Wang, S., Wang, B., Lou, Q., Lu, M., & Sun, J. (2017). Bacterial volatile ammonia regulates the consumption sequence of d-pinitol and d-glucose in a fungus associated with an invasive bark beetle. *The ISME journal*, 11(12), 2809-2820.
- Zhou, T., Chen, D., Li, C., Sun, Q., Li, L., Liu, F., ... & Shen, B. (2012). Isolation and characterization of *Pseudomonas brassicacearum* J12 as an antagonist against *Ralstonia solanacearum* and identification of its antimicrobial components. *Microbiological research*, 167(7), 388-394.

Zhu, Q., Kosoy, M., & Dittmar, K. (2014). HGTector: an automated method facilitating genome-wide discovery of putative horizontal gene transfers. *BMC genomics*, 15(1), 1-18.

Ziemert, N., Alanjary, M., & Weber, T. (2016). The evolution of genome mining in microbes—a review. *Natural product reports*, 33(8), 988-1005.

Ziemert, N., Weber, T., & Medema, M. H. (2020). Genome Mining Approaches to Bacterial Natural Product Discovery. *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*, 6, 19-33.

Zolfo, M., Asnicar, F., Manghi, P., Pasolli, E., Tett, A., & Segata, N. (2018). Profiling microbial strains in urban environments using metagenomic sequencing data. *Biology direct*, 13(1), 1-13.





# *Anexos*



## Anexo I: Tablas suplementarias

Tabla Suplementaria 1: Características genómicas de las cepas de *Pseudomonas* utilizadas en este trabajo para estudiar el metabolismo secundario.

Cepa	Número de acceso del genoma	Nº de CDSs	Num. contigs	contigs (>= 1000 pb)	contigs (>= 5000 pb)	contigs (>= 10000 pb)	contigs (>= 25000 pb)	contigs (>= 50000 pb)	Longitud total	Longitud total(>= 1000 pb)	Longitud total(>= 5000 pb)	Longitud total(>= 10000 pb)	Longitud total(>= 25000 pb)	Longitud total(>= 50000 pb)	Contig más largo	GC (%)	N50	N75	L50	L75	N's por 100 kpb	Complejidad según BUSCO (%)	Parcial BUSCO (%)
<i>Pseudomonas abietaniphila</i> ATCC 700689T	GCF_900100795.1	6941	54	54	40	35	32	26	7222451	7222451	7193199	7159194	7099990	6855048	805289	59,44	357714	192020	7	14	0	100	0
<i>Pseudomonas abyssii</i> MT5T	GCF_002307495.1	4094	79	61	44	33	25	21	4322744	4312793	4270802	4191247	4044569	3914673	473601	61,25	236029	109619	7	13	0	99,32	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DSM 50071T	GCF_001045685.1	5927	1	1	1	1	1	1	6317050	6317050	6317050	6317050	6317050	6317050	6317050	66,52	6317050	6317050	1	1	0	98,65	0
<i>Pseudomonas aestuans</i> VGXO14T	GCF_002197985.1	3587	30	30	29	23	21	17	3829769	3829769	3827356	3781955	3742671	3605895	867618	60,94	316895	132902	4	10	337,44	98,65	0
<i>Pseudomonas agarici</i> LMG 2112T	GCF_900109755.1	5232	77	77	51	46	40	34	5508099	5508099	5453307	5409597	5314557	5117920	381542	58,99	165334	106543	11	21	76,92	99,32	0
<i>Pseudomonas alcaligenes</i> NCTC10367T	GCF_900455475.1	4783	2	2	2	2	1	1	5016483	5016483	5016483	5016483	4998752	4998752	4998752	64,5	4998752	4998752	1	1	0	99,32	0
<i>Pseudomonas alcaliphila</i> JCM 10630T	GCF_900101755.1	4966	26	26	17	16	15	14	5283714	5283714	5259703	5254334	5237950	5192629	1877148	62,88	596080	281379	3	6	20,31	99,32	0
<i>Pseudomonas alkylphenolica</i> KL28T	GCF_000746525.1	5367	1	1	1	1	1	1	5764622	5764622	5764622	5764622	5764622	5764622	5764622	60,63	5764622	5764622	1	1	0	100	0
<i>Pseudomonas amygdali</i> ICMP 3918T	GCF_002699855.1	5576	331	279	203	166	78	28	5710863	5685782	5476741	5211664	3762533	2017344	116137	58,24	35791	19475	49	102	3,21	98,65	0,68
<i>Pseudomonas anguilliseptica</i> DSM 12111T	GCF_900105355.1	5276	3	3	2	2	2	2	5229617	5229617	5226238	5226238	5226238	5226238	5020146	60,21	5020146	5020146	1	1	0	100	0
<i>Pseudomonas antarctica</i> DSM 15318T	GCF_900624995.1	6022	271	255	195	127	53	28	6205254	6197033	6016507	5513588	4257695	3435427	374021	59,58	65347	20673	23	71	0	100	0
<i>Pseudomonas argentinensis</i> LMG 22563T	GCF_900113905.1	4727	15	15	10	10	9	7	5108022	5108022	5096401	5096401	5080112	4986184	1881468	63,58	1308850	706881	2	3	10,18	100	0
<i>Pseudomonas arsenicoxydans</i> CECT 7543T	GCF_900103875.1	6107	1	1	1	1	1	1	6502978	6502978	6502978	6502978	6502978	6502978	6502978	58,75	6502978	6502978	1	1	1,54	100	0
<i>Pseudomonas asiatica</i> RYU5T	GCF_009932335.1	5600	3	3	3	3	3	3	5969036	5969036	5969036	5969036	5969036	5969036	4196743	62,55	4196743	1086018	1	2	0	100	0
<i>Pseudomonas asplenii</i> ATCC 23835T	GCF_900105475.1	5786	1	1	1	1	1	1	6529636	6529636	6529636	6529636	6529636	6529636	6529636	61,22	6529636	6529636	1	1	1,53	99,32	0
<i>Pseudomonas asturiensis</i> LMG 26898T	GCF_900143095.1	5759	42	42	34	31	30	26	6174096	6174096	6154049	6131650	6109998	5958419	679903	59,14	320220	157409	7	14	110,64	99,32	0
<i>Pseudomonas avellanae</i> BPIC 631T	GCF_000302915.1	6734	297	159	125	109	83	51	6625623	6572382	6488162	6379809	5961525	4757199	234505	58,74	79356	46561	28	55	11805,81	97,97	1,35
<i>Pseudomonas azotifigens</i> DSM 17556T	GCF_000425625.1	4744	59	59	55	52	40	32	5017423	5017423	5009091	4989361	4787299	4500398	420612	67	171594	84523	11	21	398,59	100	0
<i>Pseudomonas azotoformans</i> LMG 21611T	GCF_900624915.1	6057	1	1	1	1	1	1	6727386	6727386	6727386	6727386	6727386	6727386	6727386	60,98	6727386	6727386	1	1	1,49	100	0
<i>Pseudomonas baetica</i> LMG 25716T	GCF_002813455.1	6438	1	1	1	1	1	1	6902809	6902809	6902809	6902809	6902809	6902809	6902809	58,76	6902809	6902809	1	1	0	99,32	0

<i>Pseudomonas balearica</i> DSM 6083T	GCF_000818015.1	4168	1	1	1	1	1	1	1	4383480	4383480	4383480	4383480	4383480	4383480	64,66	4383480	4383480	1	1	0	99,32	0
<i>Pseudomonas batumici</i> UCM B-321T	GCF_000820515.1	6092	126	97	74	62	56	44	6606796	6593132	6537747	6448581	6360320	5933415	468112	61,79	133994	91601	16	31	0	99,32	0
<i>Pseudomonas bauzanensis</i> DSM 22558T	GCF_900111225.1	3305	16	16	13	12	11	10	3542729	3542729	3534157	3524443	3508700	3459147	1379517	60,26	414199	302805	2	5	41,66	98,65	0
<i>Pseudomonas benzenivorans</i> DSM 8628T	GCF_900100495.1	5364	44	44	40	35	27	24	5743144	5743144	5728852	5692178	5548046	5439074	673158	65,21	318602	151444	7	13	5,22	99,32	0
<i>Pseudomonas bohemica</i> IA19T	GCF_002934685.1	6207	121	93	79	70	57	36	6486653	6476344	6440909	6378585	6168855	5418640	574247	59,48	149954	70635	13	28	9,6	99,32	0
<i>Pseudomonas borbori</i> DSM 17834T	GCF_900115555.1	4923	96	96	73	61	45	35	5270473	5270473	5205826	5120186	4874442	4545050	298140	63,02	159007	85050	13	26	48,67	100	0
<i>Pseudomonas brassicacearum</i> subsp. <i>brassicacearum</i> CCUG 51508T	GCF_008801605.1	6218	61	36	28	28	27	25	6733367	6720293	6701340	6701340	6691075	6637484	1279703	60,83	355434	219051	6	12	0	100	0
<i>Pseudomonas brenneri</i> DSM 15294T	GCF_007858285.1	5523	31	28	25	24	23	19	5987712	5985761	5982192	5975702	5962491	5811608	742328	60,19	504582	282972	5	9	0	100	0
<i>Pseudomonas bubulae</i> TH39T	GCF_900618535.1	4656	22	17	11	9	9	8	5028902	5026472	5012430	4996775	4996775	4956312	1489380	58,16	750140	582861	3	5	0	100	0
<i>Pseudomonas caeni</i> DSM 24390T	GCF_000421765.1	2913	24	24	19	17	13	12	3022325	3022325	3009627	2995360	2929984	2904554	612766	48,26	312453	185233	4	7	0	100	0
<i>Pseudomonas canadensis</i> 2-92T	GCF_000503215.1	5887	19	19	17	16	15	15	6419614	6419614	6414892	6409566	6394047	6394047	1349399	60,4	622148	407387	4	6	0,45	100	0
<i>Pseudomonas cannabina</i> ICMP2823T	GCF_001400175.1	6051	702	477	249	180	73	17	5916539	5808809	5299516	4789979	3060682	1118885	90292	58,74	26272	12754	69	147	17,5	98,65	0
<i>Pseudomonas caricapapayae</i> ICMP2855T	GCF_001400735.1	6057	193	159	131	113	76	45	6257670	6244177	6171865	6034587	5414214	4335239	227563	58,32	78662	40649	26	53	2,45	97,97	0
<i>Pseudomonas caspiana</i> FBF102T	GCF_002158995.1	5749	49	49	49	48	42	33	6103762	6103762	6103762	6096436	6012572	5661720	530585	56,95	194944	124360	10	20	819,61	99,32	0
<i>Pseudomonas cedrina</i> subsp. <i>cedrina</i> DSM 17516T	GCF_900625035.1	6005	55	43	32	32	28	25	6494424	6488313	6468778	6468778	6401998	6286774	639712	60,79	363467	220156	7	13	0	100	0
<i>Pseudomonas cerasi</i> 58T	GCF_900074915.1	6022	7	7	7	7	6	6	6345256	6345256	6345256	6345256	6333942	6333942	5891735	58,78	5891735	5891735	1	1	0,03	99,32	0
<i>Pseudomonas chengduensis</i> DSM 26382T	GCF_900102635.1	5194	43	43	34	34	26	24	5413065	5413065	5394597	5394597	5279227	5215098	1013045	62,32	248272	198995	7	13	15,26	99,32	0
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> subsp. <i>aurantiaca</i> DSM 19603T	GCF_003851835.1	6499	1	1	1	1	1	1	7109779	7109779	7109779	7109779	7109779	7109779	7109779	62,86	7109779	7109779	1	1	0	100	0
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> subsp. <i>aureofaciens</i> DSM 6698T	GCF_003851905.1	6474	1	1	1	1	1	1	7037850	7037850	7037850	7037850	7037850	7037850	7037850	62,7	7037850	7037850	1	1	0	100	0
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> subsp. <i>chlororaphis</i> DSM 50083T	GCF_003945765.1	6224	1	1	1	1	1	1	6808187	6808187	6808187	6808187	6808187	6808187	6808187	62,98	6808187	6808187	1	1	0	100	0
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> subsp. <i>piscium</i> DSM 21509T	GCF_003850345.1	6443	1	1	1	1	1	1	7065155	7065155	7065155	7065155	7065155	7065155	7065155	62,65	7065155	7065155	1	1	0	100	0
<i>Pseudomonas cichorii</i> ATCC 10857T	GCF_900104015.1	5213	55	55	40	30	25	24	5920059	5920059	5886674	5817670	5732412	5698029	808481	58,12	343756	181654	6	13	20,61	98,65	0
<i>Pseudomonas cissicola</i> CCUG 18839T	GCF_008801575.1	5460	314	202	132	98	63	32	5353039	5301624	5122449	4890881	4284396	3155899	198223	64,41	70530	30353	24	54	0	94,59	0
<i>Pseudomonas citronellolis</i> LMG 18378T	GCF_900112375.1	6679	76	76	64	63	55	45	7198503	7198503	7167887	7162131	7014627	6640122	386725	67,54	157758	108761	16	29	38,9	99,32	0
<i>Pseudomonas coleopterorum</i> LMG 28558T	GCF_900105555.1	4438	2	2	2	2	2	2	4922895	4922895	4922895	4922895	4922895	4922895	4857115	62,03	4857115	4857115	1	1	0	99,32	0,68

<i>Pseudomonas composti</i> CCUG 59231T	GCF_900115475.1	5016	28	28	24	24	22	20	5392494	5392494	5381627	5381627	5352838	5267512	841801	62,42	425534	197756	5	11	38,2	99,32	0
<i>Pseudomonas congelans</i> DSM 14939T	GCF_900103225.1	5140	23	23	19	17	14	13	5737059	5737059	5727838	5708524	5659170	5622610	1636184	59,33	740022	329263	3	6	88,46	99,32	0
<i>Pseudomonas corrugata</i> DSM 7228T	GCF_001269905.1	5517	31	30	26	25	23	17	6126732	6126078	6117821	6112049	6082956	5843100	1211577	60,62	374457	284006	5	10	0,23	100	0
<i>Pseudomonas costantinii</i> LMG 22119T	GCF_001870435.1	6575	66	61	54	53	43	33	7247216	7244451	7231929	7224988	7072484	6741214	699084	59,39	302172	150398	10	18	0,03	99,32	0
<i>Pseudomonas cremoricolorata</i> DSM 17059T	GCF_000425745.1	4205	26	26	22	19	18	18	4655082	4655082	4648541	4630209	4613227	4613227	561759	63,5	416153	239423	5	9	28,25	99,32	0
<i>Pseudomonas cuatrocienegasensis</i> CIP 109853T	GCF_900110925.1	4950	50	50	41	35	31	24	5358739	5358739	5335788	5290950	5232425	4956399	604798	61,96	246774	142711	7	15	190,83	99,32	0
<i>Pseudomonas deceptionensis</i> LMG 25555T	GCF_900106095.1	4716	2	2	1	1	1	1	5096762	5096762	5095053	5095053	5095053	5095053	5095053	58,51	5095053	5095053	1	1	0	99,32	0
<i>Pseudomonas delhiensis</i> RLD-1T	GCF_900187975.1	6247	81	81	63	58	53	41	6727430	6727430	6689824	6654489	6573203	6138723	426943	68,07	168606	116543	15	26	0	100	0
<i>Pseudomonas donghuensis</i> HYST	GCF_000259195.1	5277	64	60	56	52	41	31	5646028	5643400	5630740	5596791	5406101	4989920	503710	62,42	188174	102903	10	20	116,06	99,32	0
<i>Pseudomonas duriflava</i> CGMCC 1.6858T	GCF_007830155.1	4949	65	65	46	39	29	20	4976003	4976003	4933449	4887908	4730971	4440189	518277	54,15	274898	202290	7	12	0	99,32	0
<i>Pseudomonas endophytica</i> BSTT44T	GCF_001411475.1	4863	241	233	177	139	64	18	4973838	4967615	4806147	4524209	3344803	1748937	212307	55,16	35704	18789	36	82	0	98,65	0
<i>Pseudomonas entomophila</i> L48T	GCF_000026105.1	5209	1	1	1	1	1	1	5888780	5888780	5888780	5888780	5888780	5888780	5888780	64,16	5888780	5888780	1	1	0	100	0
<i>Pseudomonas extremaustralis</i> DSM 17835T	GCF_900102035.1	6262	1	1	1	1	1	1	6674429	6674429	6674429	6674429	6674429	6674429	6674429	60,61	6674429	6674429	1	1	1,5	100	0
<i>Pseudomonas extremorientalis</i> LMG 19695T	GCF_001870465.1	5761	63	56	42	37	34	26	6345609	6341420	6300225	6264758	6223361	5918491	750285	60,93	312925	163992	8	15	0,11	100	0
<i>Pseudomonas ficuserectae</i> ICMP7848T	GCF_001400815.1	5837	624	522	330	191	49	6	5655086	5597354	5095326	4071433	1791755	381571	92007	57,89	18060	9209	99	208	247,93	96,62	0
<i>Pseudomonas flavescens</i> LMG 18387T	GCF_900100535.1	5476	51	51	44	38	35	31	5855660	5855660	5841269	5800056	5743339	5573575	447237	63,46	207737	125133	9	18	4,7	100	0
<i>Pseudomonas flexibilis</i> ATCC 29606T	GCF_900155995.1	3584	42	42	35	35	27	22	3760855	3760855	3746083	3746083	3596024	3426225	426711	65,81	174376	114202	8	15	78,49	99,32	0
<i>Pseudomonas floridensis</i> GEV388T	GCF_002087235.1	5872	287	222	139	118	87	44	6103707	6056896	5885233	5728721	5209638	3690521	273720	59,17	60718	34028	33	66	1,29	96,62	0,68
<i>Pseudomonas fluorescens</i> NCTC10038T	GCF_900475215.1	6176	1	1	1	1	1	1	6515171	6515171	6515171	6515171	6515171	6515171	6515171	59,98	6515171	6515171	1	1	0	100	0
<i>Pseudomonas fluvialis</i> ASS-1T	GCF_002234375.1	3136	69	48	38	34	25	22	3291143	3276292	3258424	3227942	3062479	2955596	275424	62,64	155410	87883	8	16	0	98,65	0
<i>Pseudomonas formosensis</i> JCM 18415T	GCF_900115905.1	3201	28	28	22	21	18	16	3443471	3443471	3430331	3420774	3378793	3285179	673023	62,73	287163	157852	4	8	104,02	99,32	0
<i>Pseudomonas fragi</i> NRRL B-727T	GCF_900105835.1	4655	1	1	1	1	1	1	5072304	5072304	5072304	5072304	5072304	5072304	5072304	59,3	5072304	5072304	1	1	1,97	100	0
<i>Pseudomonas fulva</i> NBRC 16637T	GCF_000621265.1	4446	48	48	37	33	30	26	4770636	4770636	4736618	4707805	4659918	4483159	568280	61,77	178183	120154	8	16	93,95	100	0
<i>Pseudomonas furukawaii</i> KF707T	GCF_002355475.1	6422	229	164	117	95	53	32	6678055	6645988	6544869	6383464	5696913	4992115	597931	65,38	123949	46403	14	33	0,84	99,32	0
<i>Pseudomonas fuscovaginae</i> LMG 2158T	GCF_900108595.1	5898	1	1	1	1	1	1	6592354	6592354	6592354	6592354	6592354	6592354	6592354	61,36	6592354	6592354	1	1	1,52	99,32	0

Pseudomonas gallaeciensis V113T	GCF_003444685.1	3979	18	18	18	14	12	12	4246542	4246542	4246542	4215289	4183878	4183878	1749682	61,53	509657	433084	2	4	467,67	99,32	0
Pseudomonas geniculata ATCC 19374T	GCA_001431625.1	4616	170	146	124	111	67	32	4809792	4792829	4731505	4637845	3950726	2664254	188579	66,18	55144	32777	27	56	0	93,92	0
Pseudomonas gessardii DSM 1715T	GCF_009671285.1	6046	149	137	94	84	68	41	6508266	6499861	6406052	6327673	6063177	5021666	554093	60,39	114356	55589	18	39	0	100	0
Pseudomonas graminis DSM 11363T	GCF_900111735.1	5563	98	98	76	68	55	37	5852045	5852045	5803901	5743641	5520122	4867495	398862	60,26	130494	68969	15	30	112,11	99,32	0
Pseudomonas granadensis LMG 27940T	GCF_900105485.1	5367	1	1	1	1	1	1	5943170	5943170	5943170	5943170	5943170	5943170	5943170	60,16	5943170	5943170	1	1	1,68	99,32	0
Pseudomonas grimontii DSM 17515T	GCF_007858185.1	6597	57	53	48	46	41	34	7040197	7036700	7030579	7015217	6918598	6637176	870260	60,12	251569	115464	10	18	0,01	100	0
Pseudomonas guangdongensis CCTCC AB 2012022T	GCF_900105885.1	2980	1	1	1	1	1	1	3191154	3191154	3191154	3191154	3191154	3191154	3191154	68,26	3191154	3191154	1	1	3,13	99,32	0
Pseudomonas guariconensis LMG 27394T	GCF_900102675.1	4697	29	29	25	23	19	18	5079034	5079034	5070153	5056948	5001963	4968382	657213	62,6	313298	221885	6	10	3,15	100	0
Pseudomonas guguanensis JCM 18416T	GCF_900104265.1	4678	26	26	23	22	22	20	5084171	5084171	5074538	5068560	5068560	4974709	511368	64,21	291442	197852	7	12	124,11	99,32	0
Pseudomonas guineae LMG 24016T	GCF_900113745.1	3901	10	10	10	9	7	7	4149587	4149587	4149587	4144337	4105532	4105532	1979549	58,47	579936	556228	2	3	3,86	100	0
Pseudomonas haemolytica DSM 108987T	GCF_009659625.1	5429	21	19	14	13	12	11	6009977	6008425	6002075	5996503	5979186	5939752	1342989	60,03	639786	602668	4	6	0	100	0
Pseudomonas helleri DSM 29165T	GCF_001043025.1	5198	37	36	30	28	25	23	5676287	5675733	5664106	5649589	5606432	5521271	623802	58,1	336668	166604	6	12	0	100	0
Pseudomonas humi CCA1T	GCF_001748265.1	6419	24	21	5	1	1	1	6993992	6991489	6960339	6935186	6935186	6935186	6935186	67,2	6935186	6935186	1	1	0	99,32	0
Pseudomonas hussainii JCM 19513T	GCF_900109735.1	3486	45	45	31	27	22	21	3682314	3682314	3659339	3634285	3551178	3523166	359612	58,82	215245	157754	7	12	42,53	99,32	0
Pseudomonas indica JCM 21544T	GCF_900100285.1	5334	64	64	53	49	40	32	5786922	5786922	5766529	5742378	5596425	5298825	633505	64,12	192612	92639	9	19	39	97,97	0,68
Pseudomonas inefficax JV551A3T	GCF_900277125.1	6108	248	248	80	73	51	37	6240036	6240036	5907871	5855772	5512937	5015904	396851	62,85	134841	66810	15	31	2	100	0
Pseudomonas japonica DSM 22348T	GCF_900188455.1	5911	61	61	50	48	43	36	6718608	6718608	6691816	6677981	6600460	6356537	532373	64,14	196010	131836	11	21	7,16	89,19	0
Pseudomonas jessenii DSM 17150T	GCF_002236115.1	6188	13	13	10	10	10	10	6537206	6537206	6528139	6528139	6528139	6528139	1016250	59,7	779324	637839	4	6	0	100	0
Pseudomonas jinjuensis JCM 21621T	GCF_900103845.1	5349	31	31	28	28	27	27	5868669	5868669	5863950	5863950	5848399	5848399	547603	66,38	308266	186054	8	14	20,7	99,32	0,68
Pseudomonas juntendi BML3T	GCF_009932375.1	5629	625	316	222	160	75	27	5731217	5606861	5366039	4927566	3515559	1829234	121068	62,66	33458	16431	52	111	0	97,97	0
Pseudomonas kilonensis DSM 13647T	GCF_001269885.1	6011	44	41	37	34	32	27	6385813	6383230	6374262	6352735	6318550	6141454	1140939	60,86	281474	158577	6	15	0,06	100	0
Pseudomonas knackmussii B13T	GCF_000689415.1	5883	1	1	1	1	1	1	6162905	6162905	6162905	6162905	6162905	6162905	6162905	65,61	6162905	6162905	1	1	0	99,32	0
Pseudomonas koreensis CCUG 51519T	GCF_008801535.1	5647	33	26	20	18	17	16	6084671	6082148	6067983	6052826	6028689	5990503	827161	60,57	483184	286548	5	9	0	98,65	0
Pseudomonas kunmingensis DSM 25974T	GCF_900114065.1	4452	33	33	26	22	18	14	4654543	4654543	4642575	4607841	4551142	4396429	889916	62,61	480906	240698	4	7	6,02	100	0
Pseudomonas kuykendallii NRRL B-59562T	GCF_900106975.1	4426	15	15	14	11	10	9	4690373	4690373	4687243	4668932	4653199	4627062	1112858	65,9	700257	445240	3	5	13,96	100	0

Pseudomonas lactis DSM 29167T	GCF_001439845.1	6239	42	40	31	27	25	23	6733097	6732008	6708404	6681281	6646609	6585724	670499	60,02	392630	320185	8	12	0	100	0
Pseudomonas laurentiana JCM 32154T	GCF_010671685.1	5782	509	407	260	168	55	7	4939362	4870791	4510077	3841196	2108719	426746	82652	59,71	20771	11152	71	156	0	89,86	3,38
Pseudomonas laurylsulfatiphila AP3 16T	GCF_002934665.1	6154	13	13	13	13	12	10	6684644	6684644	6684644	6684644	6670289	6586839	1297429	60,15	786146	573651	4	6	0	100	0
Pseudomonas laurylsulfatorans AP3 22T	GCF_002906155.1	6224	30	30	25	24	21	21	6686052	6686052	6676534	6671208	6615255	6615255	1428571	59,61	593348	219353	4	9	0	100	0
Pseudomonas leptonychotis CCM 8849T	GCF_004920405.1	4133	29	14	10	10	7	6	4394381	4390070	4381441	4381441	4339032	4307046	2322232	58,8	2322232	496239	1	3	0	100	0
Pseudomonas libanensis DSM 17149T	GCF_001439685.1	5639	43	42	34	31	30	25	6214234	6213641	6200081	6173426	6150158	5981156	640011	60,18	326504	195941	7	14	0	100	0
Pseudomonas lini CCUG 51522T	GCF_008801525.1	6070	45	29	20	19	19	17	6501740	6495476	6480368	6472357	6472357	6403355	805400	58,82	506634	294930	5	10	0	100	0
Pseudomonas linyingensis LMG 25967T	GCF_900109175.1	4471	43	43	34	31	29	25	4721122	4721122	4703481	4681215	4646906	4511710	467980	66,39	231539	124068	7	14	65,11	100	0
Pseudomonas litoralis 2SM5T	GCF_900105005.1	3867	1	1	1	1	1	1	3987942	3987942	3987942	3987942	3987942	3987942	3987942	58,54	3987942	3987942	1	1	2,51	97,3	0,68
Pseudomonas lundensis DSM 6252T	GCF_001042985.1	4780	92	78	54	49	44	30	4992502	4983429	4927298	4895124	4803582	4297412	393880	58,54	148083	88261	12	23	0	99,32	0
Pseudomonas lurida LMG 21995T	GCF_002563895.1	5785	1	1	1	1	1	1	6311648	6311648	6311648	6311648	6311648	6311648	6311648	60,61	6311648	6311648	1	1	0	99,32	0
Pseudomonas lutea LMG 21974T	GCF_900110795.1	5340	53	53	35	29	23	19	5421602	5421602	5387896	5340583	5245246	5113603	512669	55,31	322783	211128	7	11	0	99,32	0
Pseudomonas luteola NBRC 103146T	GCF_002091675.1	5336	104	87	57	51	39	28	5395279	5383534	5320057	5277693	5057237	4685758	511089	55,3	170627	96186	9	19	0	99,32	0
Pseudomonas mandelii LMG 21607T	GCF_900106065.1	6560	1	1	1	1	1	1	7041758	7041758	7041758	7041758	7041758	7041758	7041758	59,2	7041758	7041758	1	1	1,42	100	0
Pseudomonas marginalis pv. marginalis ICMP 3553T	GCA_003700725.1	6144	318	275	215	174	84	34	6571914	6549928	6402534	6087541	4536594	2758318	161549	60,45	42336	22349	46	101	16,59	99,32	0
Pseudomonas marincola JCM 14761T	GCF_900116605.1	4799	33	33	29	27	24	22	5020984	5020984	5014163	5000456	4944254	4886796	973986	57,07	331565	154918	6	11	7,77	100	0
Pseudomonas mediterranea DSM 16733T	GCF_900106005.1	5734	1	1	1	1	1	1	6346235	6346235	6346235	6346235	6346235	6346235	6346235	61,2	6346235	6346235	1	1	1,58	100	0
Pseudomonas mendocina NCTC10897T	GCF_900636545.1	4851	1	1	1	1	1	1	5192837	5192837	5192837	5192837	5192837	5192837	5192837	62,76	5192837	5192837	1	1	0	98,65	0,68
Pseudomonas migulae NBRC 103157T	GCF_002091715.1	6298	101	97	85	79	61	46	6667355	6664737	6639777	6595279	6317058	5751794	463301	59,12	121489	76609	18	35	0	100	0
Pseudomonas mohnii DSM 18327T	GCF_900105115.1	6210	2	2	2	2	2	2	6592588	6592588	6592588	6592588	6592588	6592588	6476037	59,62	6476037	6476037	1	1	0	99,32	0
Pseudomonas monteilii NBRC 103158T	GCF_000621245.1	6132	85	85	61	53	44	32	6308713	6308713	6249490	6191511	6057379	5612671	542100	61,49	204302	115717	10	20	4,52	99,32	0
Pseudomonas moorei CCUG 53114T	GCF_008801475.1	6139	59	44	34	32	27	24	6472558	6467180	6443892	6430293	6353011	6229756	593577	59,71	381195	225570	7	12	0	100	0
Pseudomonas mosselii DSM 17497T	GCF_000621225.1	5934	55	55	49	44	36	30	6260844	6260844	6248219	6213719	6077511	5844638	633234	64,01	242165	127010	9	18	90,88	100	0
Pseudomonas mucidolens NCTC8068T	GCA_900475945.1	5452	1	1	1	1	1	1	5853060	5853060	5853060	5853060	5853060	5853060	5853060	59,09	5853060	5853060	1	1	0	100	0
Pseudomonas nitritireducens WZBFD3-5A2T	GCA_010994165.1	5951	12	12	10	9	9	9	6397936	6397936	6395224	6389867	6389867	6389867	1669081	64,77	932199	502769	3	5	0	100	0

<i>Pseudomonas nitroreducens</i> NBRC 12694T	GCF_002091755.1	5701	40	33	27	26	23	21	6105137	6100325	6086350	6076456	6024949	5944756	1231025	65,01	537643	198456	4	10	0	100	0
<i>Pseudomonas oceani</i> DSM 100277T	GCF_002903165.1	3865	64	60	44	39	30	20	4155021	4151385	4115131	4081262	3939024	3588045	449228	59,94	175826	92148	7	15	0	99,32	0
<i>Pseudomonas oleovorans</i> subsp. <i>oleovorans</i> DSM 1045T	GCF_002197815.1	4854	109	94	72	67	54	34	4852859	4842878	4797793	4761771	4545553	3820963	211992	62,07	104148	57445	16	31	0	99,32	0
<i>Pseudomonas orientalis</i> DSM 17489T	GCA_001439815.1	5668	39	29	20	19	18	18	6188637	6183076	6167140	6157389	6133506	6133506	1019307	60,51	465046	291526	5	9	0	100	0
<i>Pseudomonas oryzihabitans</i> NBRC 102199T	GCF_000730625.1	4653	34	34	32	30	24	21	5027590	5027590	5025315	5012305	4910573	4812801	953810	66,23	433363	135345	4	9	0	97,97	0
<i>Pseudomonas otitidis</i> DSM 17224T	GCF_900111835.1	5980	50	50	42	40	33	28	6344741	6344741	6328142	6313173	6193542	6000901	556124	66,85	271825	185555	10	17	40,84	99,32	0
<i>Pseudomonas pachastrellae</i> JCM 12285T	GCF_900114765.1	3735	55	55	41	34	29	25	3934694	3934694	3899717	3850576	3786024	3643347	326956	61,2	153272	115222	10	17	34,28	99,32	0
<i>Pseudomonas palleroniana</i> LMG 23076T	GCA_003031675.1	5555	91	82	71	64	51	40	6120652	6115460	6091685	6036777	5793316	5400367	350723	60,54	134607	89264	14	29	0,05	100	0
<i>Pseudomonas panacis</i> DSM 18529T	GCA_007858175.1	6258	46	35	26	25	24	20	6801396	6795073	6775794	6768583	6752650	6613863	931687	61,12	435348	261255	5	10	0	100	0
<i>Pseudomonas panipatensis</i> CCM 7469T	GCF_900099785.1	5452	34	34	24	24	20	18	5775530	5775530	5755831	5755831	5687014	5623252	850239	65,56	442758	271524	5	9	8,4	100	0
<i>Pseudomonas parafulva</i> NBRC 16636T	GCF_000425765.1	4557	32	32	29	28	23	20	4956622	4956622	4949869	4940580	4864295	4737306	990909	62,49	295916	175643	6	11	113,83	100	0
<i>Pseudomonas paralactis</i> DSM 29164T	GCA_001439735.1	5522	37	34	23	21	19	18	6015212	6013552	5993319	5978502	5942396	5892616	884981	59,73	652815	301939	4	8	0	100	0
<i>Pseudomonas pelagia</i> CL-AP6T	GCF_000410875.1	4373	81	72	50	43	32	25	4642307	4635346	4588971	4539969	4364711	4106253	492049	57,41	186161	89996	9	17	0	99,32	0
<i>Pseudomonas peli</i> DSM 17833T	GCF_900099645.1	4328	20	20	15	14	11	8	4487120	4487120	4469919	4463975	4412326	4315145	1822137	59,72	1227061	545019	2	3	3,45	100	0
<i>Pseudomonas plecoglossicida</i> NBRC 103162T	GCA_000730665.1	5006	58	58	51	47	39	31	5347571	5347571	5330537	5304556	5168313	4871060	466409	62,98	172824	93122	10	20	0,56	100	0
<i>Pseudomonas poae</i> DSM 14936T	GCA_001439785.1	5414	56	51	40	34	32	30	5883893	5879840	5845206	5805343	5764748	5679834	456710	60,48	226253	135401	9	17	0	100	0
<i>Pseudomonas pohangensis</i> DSM 17875T	GCF_900105995.1	3568	1	1	1	1	1	1	3769689	3769689	3769689	3769689	3769689	3769689	3769689	59,61	3769689	3769689	1	1	2,65	98,65	0,68
<i>Pseudomonas profunda</i> MST	GCF_008638305.1	4013	56	42	32	27	23	18	4212028	4204154	4184343	4152526	4088244	3942387	662940	58,55	278124	146999	6	11	1,71	98,65	0
<i>Pseudomonas prosekii</i> LMG 26867T	GCF_900105155.1	5596	1	1	1	1	1	1	6092055	6092055	6092055	6092055	6092055	6092055	6092055	59,56	6092055	6092055	1	1	1,64	100	0
<i>Pseudomonas protegens</i> CHA0T	GCF_900560965.1	6259	1	1	1	1	1	1	6868303	6868303	6868303	6868303	6868303	6868303	6868303	63,39	6868303	6868303	1	1	0	100	0
<i>Pseudomonas proteolytica</i> DSM 15321T	GCA_007858275.1	5943	107	90	77	75	61	45	6350040	6339631	6313054	6302503	6053251	5486697	308391	60,41	129095	72974	18	34	0	100	0
<i>Pseudomonas psychrophila</i> CCUG 53877T	GCF_008801485.1	4905	36	31	25	24	23	22	5269270	5267362	5256424	5251241	5236809	5198368	865787	57,48	361652	174319	5	11	0	100	0
<i>Pseudomonas psychrotolerans</i> DSM 15758T	GCF_900102665.1	5468	61	61	49	44	31	24	5731800	5731800	5708601	5672343	5446769	5129287	652501	65,56	304226	117837	7	15	16,84	97,97	0
<i>Pseudomonas punonensis</i> CECT 8089T	GCF_900142655.1	4538	20	20	18	17	16	15	4809638	4809638	4805025	4799325	4783761	4736692	1476884	61,83	594113	222854	3	7	26,72	99,32	0
<i>Pseudomonas putida</i> NBRC 14164T	GCF_000412675.1	5555	1	1	1	1	1	1	6156701	6156701	6156701	6156701	6156701	6156701	6156701	62,33	6156701	6156701	1	1	0	100	0



Pseudomonas reidholzensis CCOS 865T	GCF_900536025.1	5562	45	44	42	38	34	26	6162601	6161977	6156658	6126855	6067847	5787745	822324	64,09	261911	178904	7	14	0	99,32	0
Pseudomonas reinekei MT1T	GCA_001945365.1	5875	63	53	36	34	33	29	6249573	6242895	6207232	6189933	6176195	6032126	592223	59,17	325950	118360	7	15	0	100	0
Pseudomonas resinovorans DSM 21078T	GCF_000423545.1	5652	53	53	47	47	36	32	6027681	6027681	6012926	6012926	5818090	5669840	564385	63,58	197842	121283	10	20	63,13	99,32	0
Pseudomonas rhizoryzae RY24T	GCF_005250615.1	4928	45	45	32	29	25	20	5346010	5346010	5312697	5296812	5219197	5043399	552998	64,82	368693	226952	7	11	0	98,65	0
Pseudomonas rhizosphaerae DSM 16299T	GCF_000761155.1	4208	1	1	1	1	1	1	4688635	4688635	4688635	4688635	4688635	4688635	4688635	61,99	4688635	4688635	1	1	0	99,32	0,68
Pseudomonas rhodesiae DSM 14020T	GCF_007858255.1	5911	82	77	55	49	44	34	6333130	6330135	6293288	6245844	6160537	5830555	523635	60,24	239322	88253	8	19	0	100	0
Pseudomonas sabulinigri JCM 14963T	GCF_900105255.1	3692	1	1	1	1	1	1	4030203	4030203	4030203	4030203	4030203	4030203	4030203	59,92	4030203	4030203	1	1	2,48	99,32	0
Pseudomonas sagittaria JCM 18195T	GCF_900115715.1	4372	44	44	35	33	30	20	4607575	4607575	4586553	4571410	4522717	4146845	464453	66,66	208187	128937	7	13	7,27	99,32	0
Pseudomonas salegens CECT 8338T	GCF_900105655.1	3512	1	1	1	1	1	1	3796105	3796105	3796105	3796105	3796105	3796105	3796105	57,69	3796105	3796105	1	1	2,63	98,65	0
Pseudomonas salina XCD-X85T	GCF_008641105.1	3932	45	38	22	22	18	16	4256268	4251275	4219197	4219197	4146544	4068501	752206	57,51	355961	182085	5	9	41,84	99,32	0
Pseudomonas salomonii ICMP 14252T	GCF_900107155.1	6471	39	39	30	29	26	22	6954378	6954378	6932770	6925166	6859559	6712192	871456	59,91	447140	259510	6	11	73,26	100	0
Pseudomonas saponiphila DSM 9751T	GCF_900105185.1	7098	4	4	4	4	4	4	7375852	7375852	7375852	7375852	7375852	7375852	4645227	62,79	4645227	2273410	1	2	0	100	0
Pseudomonas savastanoi pv. savastanoi ICMP4352T	GCF_001401285.1	5935	321	256	158	123	80	38	6023336	5988753	5753088	5496016	4816013	3250176	206343	58	55596	32970	34	70	6,25	97,97	0
Pseudomonas saxonica DSM 108989T	GCF_007858365.1	5006	40	36	23	23	20	16	5310198	5307273	5284278	5284278	5230629	5094263	1547637	56,3	551817	239327	3	8	0	99,32	0
Pseudomonas segetis CIP 108523T	GCF_900188155.1	4506	16	16	12	11	10	10	4725422	4725422	4715921	4705978	4690462	4690462	1281898	56,71	1179970	320967	2	5	46,03	99,32	0
Pseudomonas seleniipraecipitans LMG 25475T	GCF_900102335.1	4297	18	18	15	15	14	13	4546163	4546163	4541100	4541100	4525583	4489714	1021635	61,51	402243	240754	4	7	14,34	100	0
Pseudomonas sichuanensis WCHPs060039T	GCF_003231305.1	5704	180	130	100	93	71	48	6048361	6028344	5947000	5893242	5544857	4696879	222205	63,86	86627	55156	23	45	0	99,32	0
Pseudomonas silesiensis A3T	GCF_001661075.1	6338	1	1	1	1	1	1	6823539	6823539	6823539	6823539	6823539	6823539	6823539	59,58	6823539	6823539	1	1	0,01	100	0
Pseudomonas simiae CCUG 50988T	GCF_900111895.1	5782	23	23	18	18	16	16	6239853	6239853	6227195	6227195	6203609	6203609	1238362	60,35	750639	330815	4	7	53,69	100	0
Pseudomonas soli LMG 27941T	GCF_900110655.1	5187	34	34	29	28	22	18	5644909	5644909	5635897	5629424	5524156	5396638	991515	64	357163	209683	5	9	74,47	99,32	0
Pseudomonas straminea JCM 2783T	GCF_900112645.1	4648	21	21	19	17	16	15	4992198	4992198	4987715	4974014	4958417	4909617	926042	63,23	548417	217057	4	7	3,91	100	0
Pseudomonas stutzeri CGMCC 1.1803T	GCF_000219605.1	4286	1	1	1	1	1	1	4547930	4547930	4547930	4547930	4547930	4547930	4547930	63,93	4547930	4547930	1	1	0	100	0
Pseudomonas synxantha NCTC10696T	GCF_901482615.1	6306	1	1	1	1	1	1	6841780	6841780	6841780	6841780	6841780	6841780	6841780	59,62	6841780	6841780	1	1	0	100	0
Pseudomonas syringae DSM 10604 T	GCF_000597765.1	5417	84	76	67	63	52	42	6072447	6065924	6043407	6011846	5832783	5462655	422665	58,96	142141	77899	14	28	0	98,65	0
Pseudomonas syringae pv. helianthi ICMP4531T	GCF_001400835.1	6087	277	222	171	136	82	46	6208545	6183844	6058246	5801354	4902215	3563894	205915	58,06	54333	30184	38	74	4,05	98,65	0

<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> ICMP3023T	GCF_001401075.1	5488	179	149	124	110	75	44	6073080	6060396	5986626	5887636	5333048	4197919	200069	58,97	76745	42536	26	52	2,26	99,32	0
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000T	GCF_000007805.1	6132	3	3	3	3	3	3	6538260	6538260	6538260	6538260	6538260	6538260	6397126	58,34	6397126	6397126	1	1	0	99,32	0
<i>Pseudomonas taeanensis</i> MS-3T	GCF_000498575.2	5059	18	18	14	13	12	12	5454863	5454863	5444856	5439257	5423889	5423889	1851393	60,92	1007976	485884	2	4	1,92	100	0
<i>Pseudomonas taetrolens</i> NCTC10697T	GCF_900475285.1	4464	1	1	1	1	1	1	4843871	4843871	4843871	4843871	4843871	4843871	4843871	58,27	4843871	4843871	1	1	0	100	0
<i>Pseudomonas taiwanensis</i> DSM 21245T	GCF_000425785.1	5104	67	67	48	43	37	32	5415134	5415134	5382035	5347815	5239135	5008785	633911	61,87	174759	116039	10	19	44,25	100	0
<i>Pseudomonas thermotolerans</i> DSM 14292T	GCF_000364625.1	3617	75	75	45	39	30	25	3752096	3752096	3683773	3639570	3513180	3336784	310662	66,84	159554	84058	9	18	89,74	99,32	0
<i>Pseudomonas thivervalensis</i> DSM 13194T	GCF_001269655.1	6099	25	23	21	20	19	18	6581995	6580491	6577962	6572241	6549252	6507397	910081	61,18	444792	337665	5	9	0,03	100	0
<i>Pseudomonas tolaasii</i> NCPPB 2192T	GCF_002813445.1	6202	1	1	1	1	1	1	6792797	6792797	6792797	6792797	6792797	6792797	6792797	60,58	6792797	6792797	1	1	0	100	0
<i>Pseudomonas toyotomiensis</i> DSM 26169T	GCF_002741095.1	5230	61	61	34	28	26	22	5474114	5474114	5414757	5377736	5338044	5167251	640995	62,6	291276	187340	7	13	1,88	99,32	0
<i>Pseudomonas tremae</i> ICMP9151T	GCF_001401155.1	6079	510	110	66	59	50	39	5929145	5751454	5654860	5603540	5471180	5072231	364705	57,8	140769	73135	14	28	3,31	99,32	0
<i>Pseudomonas trivialis</i> DSM 14937T	GCF_001439805.1	5094	46	43	32	30	28	24	5587907	5585542	5566848	5551631	5522990	5371736	738396	60,98	288356	182705	7	14	0	100	0
<i>Pseudomonas umsongensis</i> DSM 16611T	GCF_002236105.1	6209	14	14	13	13	12	11	6701403	6701403	6696543	6696543	6679681	6635505	2245851	59,73	1353286	456846	2	5	0	100	0
<i>Pseudomonas vancouverensis</i> CCUG 49675T	GCF_008801375.1	6065	214	22	18	18	16	16	6492809	6392790	6384963	6384963	6352920	6352920	891762	59,99	467803	354176	5	9	0	99,32	0
<i>Pseudomonas veronii</i> DSM 11331T	GCF_001439695.1	6464	95	87	60	54	50	40	6997867	6991668	6930888	6884819	6819440	6409640	559297	60,72	176093	91089	11	24	0	99,32	0
<i>Pseudomonas versuta</i> L10.10T	GCF_001294575.1	4768	1	1	1	1	1	1	5149788	5149788	5149788	5149788	5149788	5149788	5149788	58,23	5149788	5149788	1	1	0	98,65	0
<i>Pseudomonas viridiflava</i> ICMP 2848T	GCF_001642795.1	5420	48	48	29	27	26	22	5918918	5918918	5887515	5872105	5862100	5699928	573694	59,39	453916	164709	6	11	20,04	98,65	0
<i>Pseudomonas vranovensis</i> DSM 16006T	GCF_000425805.1	5325	36	36	30	29	24	19	5697807	5697807	5687282	5677827	5602490	5426026	769681	61,53	325087	223858	6	11	26,5	100	0
<i>Pseudomonas wadenswilerensis</i> CCOS 864T	GCF_900497695.1	5538	18	17	14	13	13	13	5966738	5966371	5956716	5950032	5950032	5950032	944637	62,39	532738	494253	5	7	0	98,65	0,68
<i>Pseudomonas weihenstephanensis</i> DSM 29166T	GCF_001043055.1	4556	32	24	16	15	13	13	4792107	4786022	4770225	4764426	4738763	4738763	855826	57,31	571018	258145	4	7	0	100	0
<i>Pseudomonas xanthomarina</i> DSM 18231T	GCF_900129835.1	4111	17	17	14	13	11	11	4308853	4308853	4305181	4299754	4260266	4260266	981939	60,34	627751	380598	3	5	0	100	0
<i>Pseudomonas xinjiangensis</i> NRRL B-51270T	GCF_900104945.1	3322	1	1	1	1	1	1	3537092	3537092	3537092	3537092	3537092	3537092	3537092	60,69	3537092	3537092	1	1	2,83	99,32	0
<i>Pseudomonas yamanorum</i> LMG 27247T	GCF_900105735.1	6473	1	1	1	1	1	1	7087525	7087525	7087525	7087525	7087525	7087525	7087525	60,34	7087525	7087525	1	1	1,41	99,32	0
<i>Pseudomonas zeshuii</i> KACC 15471T	GCF_900141925.1	5247	33	33	30	30	27	22	5339831	5339831	5331643	5331643	5288888	5115516	690911	55,32	262608	170232	6	12	16,76	99,32	0
<i>Pseudomonas zhaodongensis</i> NEAU-ST5-21T	GCF_003696365.1	4460	27	17	15	12	11	11	4668208	4663246	4658649	4640851	4625484	4625484	1820931	59,58	1235615	309980	2	4	0,09	100	0

**Tabla suplementaria 2:** Resultado de la búsqueda de péptidos antimicrobianos (AMPs) crípticos encontrados en los genomas de las cepas tipo de *Pseudomonas* con el programa MACREL. CDP = Péptido Catiónico con Puente disulfuro; CLP = Péptido Catiónico Lineal; Hemo = Hemolítico; NoHemo = No hemolítico.

Strain	Secuencia de aminoácidos	Tipo de AMP	Probabilidad de ser AMP	Hemolítico	Probabilidad de ser hemolítico
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. tomato DC3000T	RGCIGLFASKRSVARLAPTYYNYRATPRVGMPEWTLCVRS	CDP	0,515	Hemo	0,574
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. tomato DC3000T	FKFKFKHKSQRQAGWILFTTLLIVPNLNLRFGL	CLP	0,564	Hemo	0,792
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. tomato DC3000T	LRKKTLELRKRLRIFPIYNAYKIII	CLP	0,535	Hemo	0,802
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. tomato DC3000T	LSKSYVPIDLAKKVRQVLEGPNGVR	CLP	0,564	NoHemo	0,297
<i>Pseudomonas entomophila</i> L48T	SLIRKLLSLFKRKKRGGSIYPLR	CLP	0,683	Hemo	0,98
<i>Pseudomonas entomophila</i> L48T	KLGNCFYIGGLARLICVVKRQSGYLKTHFHGLAKKMOV	CDP	0,564	Hemo	0,812
<i>Pseudomonas entomophila</i> L48T	SKQTRNHTNHTGRTARPVLAVAGRNAVASFYFGYWFSH	CLP	0,505	NoHemo	0,426
<i>Pseudomonas putida</i> NBRC 14164T	PKHTRNHANHTGRNLRPVLAVAGCVAPASYFYFGYWFSH	CDP	0,604	Hemo	0,594
<i>Pseudomonas furukawaii</i> KF707T	LCAVMGIAALSRLRFGMRR	CDP	0,683	Hemo	0,911
<i>Pseudomonas furukawaii</i> KF707T	LLISLLEASRMMSGAKVKICLYPKLDAS	CDP	0,703	Hemo	0,822
<i>Pseudomonas furukawaii</i> KF707T	SIIAKPCKGPNAPSPRASNPAAATHGPPFS	CDP	0,584	Hemo	0,505
<i>Pseudomonas pelagia</i> CL-AP6T	AAIVGDSPVHEKLSVKSRTAHVKRCLNMGGPSSKAKYS	CDP	0,535	NoHemo	0,436
<i>Pseudomonas cremoricolorata</i> DSM 17059T	LYRRLIKKLDLTLHL	CLP	0,525	Hemo	0,733
<i>Pseudomonas cremoricolorata</i> DSM 17059T	GLLSFPGSIGVTSYLYQMVMKSPKHLRGLYKQS	CLP	0,703	Hemo	0,812
<i>Pseudomonas vranovensis</i> DSM 16006T	ILLPIAAPLYMAWMIWKGPRP	CLP	0,554	Hemo	0,842
<i>Pseudomonas vranovensis</i> DSM 16006T	NEQTCACPGCNCKVGANAVMREGKAYCCQACADHHPGPKCTASGCGCASGKAAG	CDP	0,515	NoHemo	0,327
<i>Pseudomonas taeanensis</i> MS-3 T	VSVRADAVLGYAALGSLFRLRSDGMRR	CLP	0,505	NoHemo	0,129
<i>Pseudomonas taeanensis</i> MS-3 T	ISGKFFYMAHWGVGNFVKY	CLP	0,673	Hemo	0,812

Pseudomonas oryzihabitans NBRC 102199T	GLTRVRQLWQWLRPHLYRLCEVRAGRYGYRGKR	CDP	0,802	Hemo	0,921
Pseudomonas luteola NBRC 103146T	ASLSFKPVTRGMSRFQTIGQHSYLFGLLIRLAYEQEFKKLFT	CLP	0,515	Hemo	0,653
Pseudomonas luteola NBRC 103146T	RHRVLLATTLAVSLLSGCCGWWGPHGGHGGPGGPGFEQGHGRP	CDP	0,574	Hemo	0,594
Pseudomonas luteola NBRC 103146T	ALNNSAIAIHMYYYRNSIINHGVSHA	CLP	0,515	Hemo	0,614
Pseudomonas luteola NBRC 103146T	ILLTRSLVSAMHYCLVTRHMAVFSSVKQVNAFSS	CDP	0,525	Hemo	0,693
Pseudomonas migulae NBRC 103157T	GVMKKGSVRGKRARFAGVHEACAKVRGVLN	CDP	0,535	Hemo	0,782
Pseudomonas humi CCA1T	KAALNVVMAKFAYRTTKR	CLP	0,792	Hemo	0,822
Pseudomonas humi CCA1T	AFCRVGSRVRLKSALSLSLKGEGPFGAR	CDP	0,743	Hemo	0,842
Pseudomonas humi CCA1T	VMQNGANACAARPLRPRFAKHLKKNQFF	CDP	0,614	Hemo	0,594
Pseudomonas humi CCA1T	IQLFATAMPGGPKDSSGPGVHAPWRAQRRCDA	CDP	0,614	NoHemo	0,228
Pseudomonas asiatica RYU5T	IALAYMAYLIYRGPR	CLP	0,594	Hemo	0,802
Pseudomonas asiatica RYU5T	PKHTRNHANHTGRTLRLPVLAVAGCVAPASYFYGYWFSH	CDP	0,624	Hemo	0,604
Pseudomonas juntendi BML3T	IALAYMAHLYRGPR	CLP	0,762	Hemo	0,802
Pseudomonas juntendi BML3T	WAGKALYRLIVIIDKVIQTETGAFS	CLP	0,713	NoHemo	0,337
Pseudomonas juntendi BML3T	LLKLAQHRPTMAEFKVLARLAGR	CLP	0,683	Hemo	0,752
Pseudomonas juntendi BML3T	ILPLMYMAYLIYRGPR	CLP	0,653	Hemo	0,842
Pseudomonas juntendi BML3T	ITGGFGALGIATAGLKPVCKPPNY	CDP	0,535	Hemo	0,614
Pseudomonas balearica DSM 6083T	GLMPLRRYLLPLLQARAGLYARWASAHRRPCKRALVR	CDP	0,604	Hemo	0,881
Pseudomonas balearica DSM 6083T	TGIVKHRAADRGVQLKGRLL	CLP	0,554	Hemo	0,604
Pseudomonas balearica DSM 6083T	KARLNQIIWKMAVTLGLVEPPRMQPIPVRAQRAAARPRRR	CLP	0,525	Hemo	0,673
Pseudomonas balearica DSM 6083T	LSLHLIFQKLLAAR	CLP	0,683	Hemo	0,871
Pseudomonas balearica DSM 6083T	LLISLLEASRMMRSGAKVKICLYPKLDAS	CDP	0,703	Hemo	0,822
Pseudomonas balearica DSM 6083T	LWLLIDVLGSLWITRNGLR	CLP	0,505	NoHemo	0,495
Pseudomonas alkylphenolica KL28T	GCVLIGHAAWLEGRLLASLALSRAVEVSQGWGRQP	CDP	0,614	NoHemo	0,248

Pseudomonas rhizosphaerae DSM 16299T	VLGWKVRFMVVTWVFVHNGPEWTFP	CLP	0,564	Hemo	0,515
Pseudomonas aeruginosa DSM 50071T	AGTAKGDAKTLSSGGPHGRRYHEFR	CLP	0,584	NoHemo	0,287
Pseudomonas aeruginosa DSM 50071T	LWKKSVVKRFVVFQDYITKV	CLP	0,703	Hemo	0,634
Pseudomonas versuta L10.10T	LLWDLATSSHKIFAIFLH	CLP	0,653	NoHemo	0,129
Pseudomonas silesiensis A3T	SVLTRTVLPVLLPGSVLTGCASHRRVELHINR	CDP	0,505	NoHemo	0,455
Pseudomonas silesiensis A3T	WLSMIATYKKGCMRGEIGHNPVRIPTSSLYRLAYLLIGARAD	CDP	0,574	Hemo	0,594
Pseudomonas silesiensis A3T	SLGIMLKDVLNTIQGKGPVNTPTNLPKGEQLA	CLP	0,515	NoHemo	0,168
Pseudomonas chlororaphis subsp. piscium DSM 21509T	SYIKSLFQRLFQGGKKKKKPDSSIYPMF	CLP	0,525	Hemo	0,822
Pseudomonas chlororaphis subsp. piscium DSM 21509T	ILLSLPALLFIGWNIYRGPKR	CLP	0,792	Hemo	0,911
Pseudomonas chlororaphis subsp. piscium DSM 21509T	AACLTHRVAWIASKLGSYGSGAIEHAACPGRVM	CDP	0,792	Hemo	0,733
Pseudomonas chlororaphis subsp. piscium DSM 21509T	IYSKRLWNLYPTQLLRGYAAPVVL	CLP	0,584	Hemo	0,802
Pseudomonas chlororaphis subsp. piscium DSM 21509T	AVCLTQRVACIASKFRSYKPGYFFSSAAQAVLYASC	CDP	0,723	Hemo	0,842
Pseudomonas chlororaphis subsp. chlororaphis DSM 50083T	SYIKSLFQRLFQGGKKKKKPDSSIYPMF	CLP	0,525	Hemo	0,822
Pseudomonas chlororaphis subsp. chlororaphis DSM 50083T	ILPILYMAWLIYTGPKR	CLP	0,545	Hemo	0,772
Pseudomonas chlororaphis subsp. aureofaciens DSM 6698T	SYIKSLFQRLFQGGKKKKKPDSSIYPMF	CLP	0,525	Hemo	0,822
Pseudomonas chlororaphis subsp. aureofaciens DSM 6698T	IFAPLYMAWLIYRGPKR	CLP	0,782	Hemo	0,812
Pseudomonas chlororaphis subsp. aureofaciens DSM 6698T	IYSKRLWNLYPTQLLRGYAAPVVL	CLP	0,584	Hemo	0,802
Pseudomonas chlororaphis subsp. aurantiaca DSM 19603T	SYIKSLFQRLFQGGKKKKKPDSSIYPMF	CLP	0,525	Hemo	0,822
Pseudomonas chlororaphis subsp. aurantiaca DSM 19603T	VAGAITDGLVGRLLKVISNSTYKLLLMGAQGLQGHALSS	CLP	0,535	Hemo	0,842

Pseudomonas chlororaphis subsp. aurantiaca DSM 19603T	FRRITRLIPLLAMLTLSGCIHPNGGWHHHHYHGGPGYYYHR	CDP	0,584	Hemo	0,802
Pseudomonas chlororaphis subsp. aurantiaca DSM 19603T	IMLSLPALLFIGWNIYRGPKR	CLP	0,703	Hemo	0,861
Pseudomonas chlororaphis subsp. aurantiaca DSM 19603T	IYSKRLWNLYPTQLLRGYAAPVVL	CLP	0,584	Hemo	0,802
Pseudomonas psychrotolerans DSM 15758T	GLTRVRQLWQWLRPHLYRLCEVRAGRYGYRGKR	CDP	0,802	Hemo	0,921
Pseudomonas psychrotolerans DSM 15758T	AAILLVIAAMGRSYGKHSPPGKQQT	CLP	0,564	Hemo	0,802
Pseudomonas psychrotolerans DSM 15758T	AAILSKLPVSAIGKHLKPQETP	CLP	0,644	NoHemo	0,495
Pseudomonas psychrotolerans DSM 15758T	VNVTNGAHVQVRVTFTEFFFSHEIKPLVKALIKLVS	CLP	0,624	Hemo	0,802
Pseudomonas guariconensis LMG 27394T	KPGGSFPQVGKKLREWGAIVIYNYNFPNQ	CLP	0,604	NoHemo	0,465
Pseudomonas alcaliphila JCM 10630T	RLALTYLRCAQRAANAIRGPQQRATQLGITPH	CDP	0,614	Hemo	0,545
Pseudomonas seleniipraecipitans LMG 25475T	RLLVLGSKARRKR	CLP	0,505	Hemo	0,733
Pseudomonas benzenivorans DSM 8628T	LEKKLHHFHFFHFFHFFCCGLGGDKGFNRARPVVSINVQAR	CDP	0,515	Hemo	0,762
Pseudomonas benzenivorans DSM 8628T	SCQAPRRALHEPCARRATLPGGAG	CDP	0,554	NoHemo	0,297
Pseudomonas benzenivorans DSM 8628T	AAMGFAGMARSYSKRNSP	CLP	0,545	NoHemo	0,416
Pseudomonas benzenivorans DSM 8628T	LQGNHKKHYGPGGLGGLYLLSGWQRGRG	CLP	0,644	Hemo	0,723
Pseudomonas flavescens LMG 18387T	GFWAIIRTRLRTDICVPPKTAIRLLNTDVGSCF	CDP	0,733	NoHemo	0,485
Pseudomonas flavescens LMG 18387T	LWGAAVVAKPQKAAIKAAFFIPAFPKCSQELGYSAEHP	CDP	0,554	NoHemo	0,416
Pseudomonas indica JCM 21544T	ESACYPWVRGRRGEGGLMETAAAFSDCWPSDASNRQWRMSQICK	CDP	0,554	NoHemo	0,069
Pseudomonas jinjuensis JCM 21621T	AAFARFIGPRRGKDELRRILEAPVIPANAGNQ	CLP	0,545	NoHemo	0,277
Pseudomonas jinjuensis JCM 21621T	GAIVAGMARSYRYGARIRLWEVLEKR	CLP	0,653	NoHemo	0,436

Pseudomonas jinjuensis JCM 21621T	VSLVSRKIKGEICHPFLSWK	CDP	0,673	NoHemo	0,475
Pseudomonas jinjuensis JCM 21621T	LAPRRFLTIFRGYEAAGNVPAPVA	CLP	0,564	Hemo	0,574
Pseudomonas jinjuensis JCM 21621T	TAYSTYYAYRSYAWRFSTVAATAPSRKRTLRL	CLP	0,653	NoHemo	0,446
Pseudomonas jinjuensis JCM 21621T	RAIAGMARSYRLRRPAAMVGQV	CLP	0,683	Hemo	0,683
Pseudomonas jinjuensis JCM 21621T	PATGRAQVRSYRSNPRGAD	CLP	0,571	NoHemo	0,238
Pseudomonas jinjuensis JCM 21621T	SLHVLAYNFKRVLNLLGNSALMAAIKA	CLP	0,653	Hemo	0,96
Pseudomonas jinjuensis JCM 21621T	RAIAGMARSYKINGPWP	CLP	0,515	Hemo	0,584
Pseudomonas cichorii ATCC 10857T	IIIQRSIAPRLLKLIPLSKGLTR	CLP	0,703	Hemo	0,97
Pseudomonas cichorii ATCC 10857T	KKVMFAVLLCGFSLNAQAACPVFGPSKDPSCGPVFGPTVCVCP	CDP	0,545	NoHemo	0,455
Pseudomonas cichorii ATCC 10857T	LSKSYVPIDLAKKVRQVLEGPNGVR	CLP	0,564	NoHemo	0,297
Pseudomonas guguanensis JCM 18416T	LLRFEQHHLIA	CLP	0,584	NoHemo	0,158
Pseudomonas guguanensis JCM 18416T	LIYTRKLRFLACFCASAASLTYNLSMEVLR	CDP	0,634	Hemo	0,723
Pseudomonas guguanensis JCM 18416T	LVAVAIVVEQHPAFCAERLYTIAVKVKNYGRGGTIG	CDP	0,693	NoHemo	0,465
Pseudomonas salomonii ICMP 14252T	RYRFFRAKNVLMTAGNYSNAKGKITYG	CLP	0,663	NoHemo	0,465
Pseudomonas mohnii DSM 18327T	CAFIDRAKCPGLFACGLRHRPPDAAVKL	CDP	0,505	NoHemo	0,455
Pseudomonas mohnii DSM 18327T	QKHSLVINRHMAKGNSNKPASGGAKGGPRPTDANRFPGGNWPVKVPGGKSGGNRGQGPKA	CLP	0,614	NoHemo	0,475
Pseudomonas mohnii DSM 18327T	SATFNLNIDVIGLNAKAQGCVAHALKSKKQSLM	CDP	0,545	Hemo	0,644
Pseudomonas anguilliseptica DSM 12111T	FWLAVAADAVVVHLLFIRKRSINRKRINLIYK	CLP	0,505	Hemo	0,772
Pseudomonas anguilliseptica DSM 12111T	ALLFGTLTLVTGPTVIVPMLRVVRPKASVANIALGRHCY	CDP	0,604	Hemo	0,832
Pseudomonas saponiphila DSM 9751T	ILPVLYMAYLIYRGPRP	CLP	0,723	Hemo	0,871
Pseudomonas saponiphila DSM 9751T	IIPILYMAYLIYTGP RP	CLP	0,594	Hemo	0,564
Pseudomonas saponiphila DSM 9751T	SAWVLRAGALLVLATYWGGLSARAIRKGW	CLP	0,594	Hemo	0,901
Pseudomonas saponiphila DSM 9751T	ATGWGLGKRRWTRMAIGLKLSVP	CLP	0,594	Hemo	0,723
Pseudomonas saponiphila DSM 9751T	AGGRGRKPIDLEMHGKKNRQRVWEAMRVIRDGCGFR	CDP	0,644	Hemo	0,673

Pseudomonas saponiphila DSM 9751T	KKTGIGCVKAAKRAAVIR	CDP	0,673	Hemo	0,792
Pseudomonas saponiphila DSM 9751T	LVGLWLYAYQLIPLPRRTSA	CLP	0,634	Hemo	0,505
Pseudomonas saponiphila DSM 9751T	GLNGRKKTGIGAGFFVSEKLMHVFPHFISLGNMHINQ	CLP	0,525	Hemo	0,772
Pseudomonas saponiphila DSM 9751T	VLGWKVRFMVVTFVHNGPEWTPF	CLP	0,564	Hemo	0,515
Pseudomonas deceptionensis LMG 25555T	GALKADLYKIIAKVTVLIVWLYKSVVRYVRIKKI	CLP	0,713	Hemo	0,97
Pseudomonas deceptionensis LMG 25555T	EVRWGFTSRKNKTPVCVSRQGFNSILMTYSHMGKPHHTIGDASFHY	CDP	0,594	NoHemo	0,386
Pseudomonas agarici LMG 2112T	VSIGFAGSGLHQRPTLSVPKPKAHTTTVGTIRPSQNKPS	CLP	0,525	NoHemo	0,485
Pseudomonas agarici LMG 2112T	ALEVLAKTLTAKTSRKIPAWCGFYFFCLVPDR	CDP	0,574	Hemo	0,693
Pseudomonas agarici LMG 2112T	CAFIDRAKCPGLFACGLRHRPPDAAVKL	CDP	0,505	NoHemo	0,455
Pseudomonas soli LMG 27941T	VLIFTPSVKVFTRTAGFSQVPGTPDWLAIN	CLP	0,594	Hemo	0,762
Pseudomonas soli LMG 27941T	ALIAQRVELARNGANDKIICRMQSGWVVMKT	CDP	0,673	NoHemo	0,426
Pseudomonas lutea LMG 21974T	ASLSFKPVTRGMSRFQTIGQHSYFLGLLIRLAYEQEFKLFY	CLP	0,515	Hemo	0,653
Pseudomonas lutea LMG 21974T	RHRVLLATTLAVSLLSGCCGWWGPHGGHHGGPGGPGFEQGHGRP	CDP	0,574	Hemo	0,594
Pseudomonas lutea LMG 21974T	ALNNSAIAIHMYYYRNSIINHGVVRA	CLP	0,515	Hemo	0,614
Pseudomonas lutea LMG 21974T	ILLTRSLVSAMHYCLVTRHMAVFSSVKQVNAFSS	CDP	0,525	Hemo	0,693
Pseudomonas cuatrocienasensis CIP 109853T	TAYTTYQSYRYDWRFTGGRTGQSLMRTPHRIR	CLP	0,535	Hemo	0,525
Pseudomonas bauzanensis DSM 22558T	LGVRAIVRRGAGDQPHIIVAL	CLP	0,604	Hemo	0,574
Pseudomonas bauzanensis DSM 22558T	FFRVAKSHNNHIKSAHFVRPTLVPRAAYVKR	CLP	0,604	Hemo	0,881
Pseudomonas bauzanensis DSM 22558T	QFCAAVLIIRQWRKCHKRNGNGFPVKRGRFIGVNS	CDP	0,683	Hemo	0,624
Pseudomonas graminis DSM 11363T	TAFISRGAAMAKTKRYARESFRMRHRVDYTSRKV	CLP	0,545	Hemo	0,703
Pseudomonas otitidis DSM 17224T	QTHSTIRPAAAWGIGYSDRGIALASGTFMTAGHWCARHTTT	CDP	0,505	NoHemo	0,406
Pseudomonas otitidis DSM 17224T	IRPIHYFPHRARYQNCMDCPND	CDP	0,535	NoHemo	0,089
Pseudomonas simiae CCUG 50988T	GFVAWPRCTAILCTLIGVPIKVTACRAWGEA	CDP	0,604	NoHemo	0,277
Pseudomonas citronellolis LMG 18378T	VMQNGANACAAGPLWPRFAKHLKKNQFF	CDP	0,624	Hemo	0,772



Pseudomonas citronellolis LMG 18378T	DIKVIAFICLAALALELLRVYRSSTDRRRDQRQTGQ	CDP	0,564	NoHemo	0,139
Pseudomonas citronellolis LMG 18378T	IQLFATAMPGGPKDSSGPGVHASRAQRRCDA	CDP	0,574	NoHemo	0,317
Pseudomonas guineae LMG 24016T	RVWRVLRINAVMYKLGIKRAALVLMVAVKRCS	CDP	0,693	Hemo	0,752
Pseudomonas argentinensis LMG 22563T	CAFIVRHKTPGLNGGSIRHRPPDLIGDVFVATQR	CDP	0,614	NoHemo	0,436
Pseudomonas argentinensis LMG 22563T	SYWISKILKVMMSWWVIKHKNLQKDVWFRGSIVRSLTIAQ	CLP	0,554	Hemo	0,723
Pseudomonas argentinensis LMG 22563T	GILSVTIDKTATVYKLSIDLGHKSLQHSLLFKG	CLP	0,663	Hemo	0,624
Pseudomonas argentinensis LMG 22563T	VFRTALLHPSFSAACKLPRSRRS	CDP	0,624	Hemo	0,554
Pseudomonas argentinensis LMG 22563T	RKKKPVDPVRQAEKNRAHRIGWLIALAGIVVGFALVMGK	CLP	0,505	Hemo	0,653
Pseudomonas composti CCUG 59231T	RTSGRFGTKPGKHGAI	CLP	0,535	Hemo	0,703
Pseudomonas borbori DSM 17834T	LIRAAFRDLGASFSLYP	CLP	0,594	NoHemo	0,238
Pseudomonas borbori DSM 17834T	AGILQRDKTAWRQLVLLAYFRDPMGVAVL	CLP	0,545	NoHemo	0,426
Pseudomonas borbori DSM 17834T	GANPAQIKQFGANGLAGPFTHAKRLAWSALGSKQLS	CLP	0,545	Hemo	0,673
Pseudomonas borbori DSM 17834T	PAMRFAGMARSYRSLCRLNVYI	CDP	0,574	Hemo	0,614
Pseudomonas borbori DSM 17834T	AAMGFAGMARSYRKRHNP	CLP	0,624	Hemo	0,842
Pseudomonas borbori DSM 17834T	PAKRIAAMGRSYR	CLP	0,515	Hemo	0,792
Pseudomonas borbori DSM 17834T	QGRVLPFGIFAAAPAGSQYEQNRYYQQWSFHRTPHYR	CLP	0,535	NoHemo	0,436
Pseudomonas sagittaria JCM 18195T	LILAADIGGSRAHLFSRHGRRRERPLSGAGSAFLVGRLIAQAG	CLP	0,535	NoHemo	0,446
Pseudomonas formosensis JCM 18415T	IIKVARGPFARTMLDAVKWPPQNVQRQ	CLP	0,673	Hemo	0,505
Pseudomonas xanthomarina DSM 18231T	ILAKARFTRRLPQSAKFNR	CLP	0,723	Hemo	0,95
Pseudomonas xanthomarina DSM 18231T	LAVGAAQSKSIEMMIGLRIAAGVPTSURLAQLSYGY	CLP	0,505	Hemo	0,871
Pseudomonas zeshuii KACC 15471T	LVLENLNRTHGLRCLVTAGQVGLFSSY	CDP	0,515	NoHemo	0,277
Pseudomonas zeshuii KACC 15471T	RHLYQTKKTSMPMRGQEHFMGIEKLPLGKVMHHQG	CLP	0,634	Hemo	0,545

Pseudomonas punonensis CECT 8089T	AIAAYRNDRRPRLPSVSRPVRGVQVQNEGLPCAC	CDP	0,653	NoHemo	0,446
Pseudomonas punonensis CECT 8089T	FGVRSGGVKALRAHSPIRNLIFPRRQAARAAAYLMAPNSHG	CLP	0,599	Hemo	0,584
Pseudomonas asturiensis LMG 26898T	GLGTTKCKCFYRIGPESVWGIAIASFESKAAFSKWRLMAQSV	CDP	0,594	Hemo	0,594
Pseudomonas asturiensis LMG 26898T	LSKSYVPIDLAKKVRQVLEGPNGVR	CLP	0,564	NoHemo	0,297
Pseudomonas flexibilis ATCC 29606T	AGALLRNNPLGLSNALRTIECGHAQKPAHAGR	CDP	0,515	Hemo	0,505
Pseudomonas flexibilis ATCC 29606T	CAFTVRPKQPGLFGGSIRHRPPDLS	CDP	0,515	NoHemo	0,356
Pseudomonas segetis CIP 108523T	LAAGVKVLNQDLSYPSKLVAVWKVQVSQ	CLP	0,505	Hemo	0,584
Pseudomonas japonica DSM 22348T	FLAIPLYGYVATNRATSQLSTHRFCARA	CDP	0,663	Hemo	0,574
Pseudomonas japonica DSM 22348T	TVVVLFPRAKGYSSNRKINFTYMQRFFR	CLP	0,693	Hemo	0,604
Pseudomonas japonica DSM 22348T	YFLQILKIFLLVARLANELIRLFDHFRPLP	CLP	0,535	Hemo	0,663
Pseudomonas japonica DSM 22348T	ILPLMYMAYLIYRGPR	CLP	0,653	Hemo	0,842
Pseudomonas delhiensis RLD-1T	DIKIIAFICLAALALELLRVYRSSTDRRRGQRETGPQG	CDP	0,554	NoHemo	0,168
Pseudomonas delhiensis RLD-1T	KAALNVVMMAKFAYRTTKR	CLP	0,792	Hemo	0,822
Pseudomonas delhiensis RLD-1T	IQLFATATPGGPKDSSGPGAHAPQRAQRRCDA	CDP	0,584	NoHemo	0,198
Pseudomonas knackmussii B13T	SLSLDHSLPLPGSFAQVCACVAVAKSKKQSLI	CDP	0,535	Hemo	0,693
Pseudomonas knackmussii B13T	AAIRAHGALLQDLSRRGIFADKIRSYGSGRMAV	CLP	0,673	NoHemo	0,376
Pseudomonas knackmussii B13T	AAIARMARSYRGIGAGIFADKVRLYGVRVGTGRGVEGQDPLLQARR	CDP	0,505	Hemo	0,614
Pseudomonas knackmussii B13T	RANRGHGPLLQGGKYRAVRFVSKN	CLP	0,653	Hemo	0,861
Pseudomonas knackmussii B13T	KTAAPRGARPFLSAPLYQR	CLP	0,733	Hemo	0,525
Pseudomonas laurentiana JCM 32154T	GAQWKAKHKEAANAKGIFGKLAKEIQIAARGVPTLT	CLP	0,564	Hemo	0,851
Pseudomonas laurentiana JCM 32154T	IALTYMAYLIWKGPRQ	CLP	0,743	Hemo	0,792
Pseudomonas syringae DSM 10604 T	IKLLMRLKARFDRKSKGQ	CLP	0,584	Hemo	0,851
Pseudomonas syringae DSM 10604 T	TLMAFRLLKHLNSCRLLVHCWHSGFETYARAAERVRN	CDP	0,525	Hemo	0,693
Pseudomonas syringae DSM 10604 T	FGDYTGPFANKFAPTAFGQNPQKTYT	CLP	0,515	NoHemo	0,238
Pseudomonas fulva NBRC 16637T	IAAKEKVVVVRAKLAYDATKG	CLP	0,653	NoHemo	0,347

Pseudomonas monteilii NBRC 103158T	YGVKPLLRKLAKERKNRAPS RNFFRSKVP	CLP	0,594	Hemo	0,832
Pseudomonas monteilii NBRC 103158T	PKHTRNHANHTGRTL RPVLAVAGCVAPASYFYGYWFSH	CDP	0,624	Hemo	0,604
Pseudomonas monteilii NBRC 103158T	IALAYMAYLIYRGPR	CLP	0,594	Hemo	0,802
Pseudomonas mosselii DSM 17497T	GYLTEQLLIPYRYFQRLKNIWMFPHRFLYICNHPRK	CDP	0,683	Hemo	0,693
Pseudomonas mosselii DSM 17497T	IALAYMAYLIYKGRPR	CLP	0,743	Hemo	0,822
Pseudomonas mosselii DSM 17497T	IALAYMAYLIYRGPR	CLP	0,594	Hemo	0,802
Pseudomonas plecoglossicida NBRC 103162T	PKHTRNHANHTGRTL RPVLAVAGCKAAAGSYFYGYWFSH	CDP	0,663	Hemo	0,604
Pseudomonas batumici UCM B-321T	CAFIDRAKCPGLFACGLRHRPPDAAVKL	CDP	0,505	NoHemo	0,455
Pseudomonas batumici UCM B-321T	LKRIRKALGGLFKRKKKAKKNNSSIYPMY	CLP	0,703	Hemo	0,901
Pseudomonas poae DSM 14936T	ITKIKIQGYRIYSRLLLEPGKETKHCV	CDP	0,743	Hemo	0,574
Pseudomonas poae DSM 14936T	ALTDTA VRQAKPSGKNHTLTPIGIAVRDGTLAGS	CLP	0,505	NoHemo	0,297
Pseudomonas poae DSM 14936T	KDARS LFKKNFFTGYKKGHSFEQPFLMFGCGSRI	CDP	0,663	NoHemo	0,485
Pseudomonas trivialis DSM 14937T	IATLWFAYVFIYKGRPR	CLP	0,663	Hemo	0,812
Pseudomonas orientalis DSM 17489T	INSHLLYQLSYRGMRRMLLIKKKSSLL	CLP	0,505	Hemo	0,911
Pseudomonas orientalis DSM 17489T	AVGQSVIGRLIHRYRGPAPSHIYSSPDSKV VRRNKTGIDLLMRS	CLP	0,505	Hemo	0,594
Pseudomonas paralactis DSM 29164T	AVCQLKMYWLIYCYRGQAPSHILTA FILRNCQLQR	CDP	0,525	Hemo	0,703
Pseudomonas paralactis DSM 29164T	KSIKFFQRLF GKKKKPDSSIYPMF	CLP	0,505	Hemo	0,911
Pseudomonas lactis DSM 29167T	GNRGFKPKLRNQLQYSRARKQPSVLAQWVVYNVRCF	CDP	0,545	Hemo	0,594
Pseudomonas lactis DSM 29167T	IATLWFAYVFIYKGRPR	CLP	0,663	Hemo	0,812
Pseudomonas thermotolerans DSM 14292T	SFLHSLPLLACRVVSRVAVLACVRAAAGYFFYGYWFSHRRRA	CDP	0,545	Hemo	0,851
Pseudomonas thermotolerans DSM 14292T	ATLIPNTYRRSGMYARFLPKETLKKTS	CLP	0,525	Hemo	0,673
Pseudomonas thermotolerans DSM 14292T	ALRSHDMRLQLQERRWLSFCGPAGKLRM	CDP	0,525	NoHemo	0,396
Pseudomonas taiwanensis DSM 21245T	FLIPIAAPLLMAYLIYRERR	CLP	0,535	NoHemo	0,495

<i>Pseudomonas canadensis</i> 2-92T	IATLWFAYVFIYKGP	CLP	0,515	Hemo	0,822
<i>Pseudomonas canadensis</i> 2-92T	LAGLQVRPERMRKNFDITQGLIVTEAVRRRPERKISPS	CLP	0,535	NoHemo	0,406
<i>Pseudomonas mosselii</i> DSM 17497T	IAVAYMAYLIWRAPR	CLP	0,614	Hemo	0,792
<i>Pseudomonas thivervalensis</i> DSM 13194T	ELKLARLRRWLFALCQSRSGQCIK	CDP	0,604	Hemo	0,604
<i>Pseudomonas thivervalensis</i> DSM 13194T	PMRARFMTCFHRFKLNRCCKAVNMRMSIMQGKIYEYSF	CDP	0,564	Hemo	0,574
<i>Pseudomonas thivervalensis</i> DSM 13194T	GLIIFFRDLLHYAFNDVWCKKLVFVHKK	CDP	0,782	Hemo	0,743
<i>Pseudomonas thivervalensis</i> DSM 13194T	GATLYPWLRKLPKRIAKRHGVMMLVDYEL	CLP	0,554	NoHemo	0,485
<i>Pseudomonas thivervalensis</i> DSM 13194T	VRLGRPISTIPPNQAGRILQAKIQPFKGL	CLP	0,584	Hemo	0,634
<i>Pseudomonas corrugata</i> DSM 7228T	ILTTDHMLS AEGHCAQACVSVAKSKKQPLI	CDP	0,525	NoHemo	0,396
<i>Pseudomonas caricapapayae</i> ICMP2855T	ALVGRRDGRNFGYGRQLSYAGVQALKDMFGGGHYGTVKAHTDR	CLP	0,683	Hemo	0,564
<i>Pseudomonas caricapapayae</i> ICMP2855T	LVYRGLCQYLGLTGRGYFDVP	CDP	0,535	NoHemo	0,416
<i>Pseudomonas cannabina</i> ICMP2823T	KSIKFFQRLFGKPKKPDSSIYPMF	CLP	0,505	Hemo	0,911
<i>Pseudomonas ficuserectae</i> ICMP7848T	VVGQAVRVAHSMMQTVGHNYEKT	CLP	0,515	NoHemo	0,257
<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> ICMP4352T	SAVRRNAIVPMLRVGMPFWTLCVLS	CDP	0,505	Hemo	0,772
<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> ICMP4352T	IVIPRSIALRAFLNLISGLPSVAALRMYEGSTR	CLP	0,554	Hemo	0,871
<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> ICMP4352T	KNESKPPMFGPSGIFDTTYYRPRSFKTFWMPKLDGIFKMKAGQAEIACA	CDP	0,644	NoHemo	0,257
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> ICMP3023T	FGDYTGPFANKFAPAFGQNPQTYT	CLP	0,515	NoHemo	0,238
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> ICMP3023T	TLMAFRLLKHLNSCRLLVHCWHSGFETYARAAEVRN	CDP	0,525	Hemo	0,693
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> ICMP3023T	RFGTPEEKHNTINMHRNSPQLGLNGASINPFM	CDP	0,545	NoHemo	0,079



<i>Pseudomonas fluorescens</i> NCTC10038T	KSIIKFFQRLFGKKKKPDSSIYPMF	CLP	0,505	Hemo	0,911
<i>Pseudomonas fluorescens</i> NCTC10038T	GGGLLPIAVGQSTNKSLTDCCHRKQAPSHIGLWLL	CDP	0,644	Hemo	0,594
<i>Pseudomonas protegens</i> CHAOT	LSLHLLISRKLLAVRWTO	CLP	0,703	Hemo	0,851
<i>Pseudomonas protegens</i> CHAOT	MRLRMARVLSAKRALASHASIAAPKVLMATTH	CLP	0,502	Hemo	0,653
<i>Pseudomonas protegens</i> CHAOT	AILAMGNLGHYVNRPVTPGSHAVNLVLQILETR	CLP	0,554	Hemo	0,545
<i>Pseudomonas cerasi</i> 58T	RWLG DAGRVALRLLWALRFVLGGMADYLRDHRIEVFQQ	CLP	0,564	NoHemo	0,248
<i>Pseudomonas extremaustralis</i> DSM 17835T	GIRMTPEFFKIRMQINKPWKE	CLP	0,574	NoHemo	0,277
<i>Pseudomonas extremaustralis</i> DSM 17835T	LVASPLSRFLMNGGDNDHPDILSFKLHRWR	CLP	0,515	NoHemo	0,287
<i>Pseudomonas azotoformans</i> LMG 21611T	GLLRSPARGKPAHHIKPAY	CLP	0,515	Hemo	0,931
<i>Pseudomonas arsenicoxydans</i> CECT 7543T	ITAIRALKTG VVVQAKLAYDATKG	CLP	0,644	Hemo	0,792
<i>Pseudomonas prosekii</i> LMG 26867T	CAFIDRAKCPGLFACGLRHRPPDAAVKL	CDP	0,505	NoHemo	0,455
<i>Pseudomonas prosekii</i> LMG 26867T	MFFGVWFSSFERRFTARSFFQARQASH	CLP	0,535	NoHemo	0,416
<i>Pseudomonas sabulinigri</i> JCM 14963T	AILKRIKRSNTPAKTVEQAHPNFWMYQ	CLP	0,554	Hemo	0,554
<i>Pseudomonas mediterranea</i> DSM 16733T	PVRNYTRYAAPLVRYSSVK	CLP	0,554	NoHemo	0,446
<i>Pseudomonas mediterranea</i> DSM 16733T	ILTTDHMLSAGLCAQACACVSVAKKSKKQPLI	CDP	0,564	Hemo	0,792
<i>Pseudomonas yamanorum</i> LMG 27247T	IATLWFAYVFIYKVHRP	CLP	0,723	Hemo	0,842
<i>Pseudomonas mandelii</i> LMG 21607T	CAFIDRAKCPGLFACGLRHRPPDAAVKL	CDP	0,505	NoHemo	0,455
<i>Pseudomonas mandelii</i> LMG 21607T	ELKFARLRRWLFALCQARSGQCLKK	CDP	0,663	Hemo	0,822
<i>Pseudomonas mandelii</i> LMG 21607T	GLGRQRHMKCRGADDFVGAKGSVQKEKLNALPTE	CDP	0,535	NoHemo	0,208
<i>Pseudomonas fuscovaginae</i> LMG 2158T	CAFIDRAKCPGLFACGLRHRPPDAAVKL	CDP	0,505	NoHemo	0,455
<i>Pseudomonas costantinii</i> LMG 22119T	IATLWFAYVFIYKGRPR	CLP	0,663	Hemo	0,812
<i>Pseudomonas extremorientalis</i> LMG 19695T	ILQPMIDKKRKKCLIPIDLMDWLAAF	CDP	0,545	NoHemo	0,238

Pseudomonas extremorientalis LMG 19695T	GVCFQIQAAKGCQTLNMMKVSRRGGAERGARRVALR	CDP	0,762	Hemo	0,594
Pseudomonas extremorientalis LMG 19695T	LPFKKWSQANKEWSRRMFGGAKFYRRHGMVTESNW	CLP	0,614	NoHemo	0,495
Pseudomonas reinekei MT1T	CAFIDRAKCPGLFACGLRHRPPDAAVKL	CDP	0,505	NoHemo	0,455
Pseudomonas reinekei MT1T	GFKNVASGPLVRPSYHADQQLHGGNAGFKP	CLP	0,644	NoHemo	0,465
Pseudomonas reinekei MT1T	GFAQAKKNRGFVTVSPGFYVEKLR	CDP	0,653	Hemo	0,653
Pseudomonas laurylsulfatorans AP3 22T	LANLARVVCKDGFMPYTVQTL	CDP	0,515	NoHemo	0,267
Pseudomonas laurylsulfatorans AP3 22T	SATFDLNTSVIGLIAKAQGCVANTLKSQQSLM	CDP	0,752	Hemo	0,644
Pseudomonas laurylsulfatorans AP3 22T	VIVVAKLTRDHQRMQSNGLPRHIQGYVVNV	CLP	0,564	Hemo	0,574
Pseudomonas aestusnigri VGXO14T	ALAAALFRIDLRHLASIDFFSQAIIP	CLP	0,505	NoHemo	0,089
Pseudomonas toyotomiensis DSM 26169 T	KERALVARFFMARAKENNYRAVMLHELVLAKRV	CLP	0,525	Hemo	0,653
Pseudomonas laurylsulfatiphila AP3 16T	VVNDTGLLIKRGVLKSIASKLAPTGGQVVH	CLP	0,644	NoHemo	0,485
Pseudomonas laurylsulfatiphila AP3 16T	GRMQPYVNASPKTYKGYNYQNKRRLRGAM	CLP	0,703	Hemo	0,673
Pseudomonas laurylsulfatiphila AP3 16T	GKYAVRLAQALKKA	CLP	0,683	Hemo	0,97
Pseudomonas laurylsulfatiphila AP3 16T	ELKLARLRWLFQARSGQCIK	CDP	0,574	Hemo	0,634
Pseudomonas oleovorans subsp. oleovorans DSM 1045T	LLRRLFSRARPMRHFALIDGGICRAL	CDP	0,604	Hemo	0,782
Pseudomonas oleovorans subsp. oleovorans DSM 1045T	QPSQPPSVKFLFRTLHPPRRFWPGLAGFYTGASQAPARQRS	CLP	0,634	NoHemo	0,406
Pseudomonas oleovorans subsp. oleovorans DSM 1045T	LGAQQKGVTSSEVAPGFRKCGKKNVVP	CDP	0,564	NoHemo	0,267
Pseudomonas oleovorans subsp. oleovorans DSM 1045T	GKLLKRLGARGAPYARIEAT	CLP	0,703	Hemo	0,554
Pseudomonas jessenii DSM 17150T	VKAVVDGHKKTGYIRRFYVQKLMHVFVFIILRNM	CLP	0,505	Hemo	0,931
Pseudomonas jessenii DSM 17150T	VANDDAGFLIKRGVFKFIASKLAPTT	CLP	0,574	NoHemo	0,495

Pseudomonas umsongensis DSM 16611T	LAMDVNHNAGIQAAARVIVGPHREHARSYRGSRYSLFLLGL	CLP	0,564	Hemo	0,554
Pseudomonas umsongensis DSM 16611T	YAVNKIPIARQDAIAGKPGSYKKPLQKRLQP	CLP	0,584	NoHemo	0,416
Pseudomonas umsongensis DSM 16611T	LAKNPRTPRGVRLTTTTLATPLARMKLNLYFFMKLKL	CLP	0,743	Hemo	0,703
Pseudomonas umsongensis DSM 16611T	IVYPSKKHQGNVMAQWNFFPELFPFVKKGLHPVAPHSSHG	CLP	0,535	Hemo	0,663
Pseudomonas umsongensis DSM 16611T	CAFIDRAKCPGLFACGLRHRPPDAAVKL	CDP	0,505	NoHemo	0,455
Pseudomonas umsongensis DSM 16611T	SVSVAHKIFLCINIIGFRHVVGALFAMPRW	CDP	0,515	Hemo	0,871
Pseudomonas umsongensis DSM 16611T	PKHTRNHANHTGRTLRPVLAVAGCVAPASYFFGYWFSH	CDP	0,624	Hemo	0,604
Pseudomonas tolaasii NCPPB 2192T	ELKLRQLRQWFLTCQARAGQCLKKQ	CDP	0,545	Hemo	0,812
Pseudomonas tolaasii NCPPB 2192T	ILVGFVILMSKSWGSIYAAVR	CLP	0,752	Hemo	0,931
Pseudomonas tolaasii NCPPB 2192T	GCMVVCGHAMTLTVALKPYPKRDL	CDP	0,723	Hemo	0,545
Pseudomonas tolaasii NCPPB 2192T	YSYGDSIRAVELYIKVGKRIGVTILQLGYSAKNFLKS	CLP	0,673	Hemo	0,683
Pseudomonas baetica LMG 25716T	SIIRKILSLFKRKKKRRGGSYPLR	CLP	0,693	Hemo	0,96
Pseudomonas baetica LMG 25716T	AFSCYFRTLLQKNKHIFSGTYGPSYI	CDP	0,604	Hemo	0,683
Pseudomonas baetica LMG 25716T	GFSTKKNPHISDLKLRFMASFQNLNETSFSKPKPRLRMAPFF	CLP	0,574	NoHemo	0,455
Pseudomonas palleroniana LMG 23076T	ALFYLHTALALAGCRPLPPESDARTLRQYPTKRYI	CDP	0,525	NoHemo	0,327
Pseudomonas sichuanensis WCHPs060039T	QRLSFSLTSGVQYLWERVYPRMGRNGCRWFRRFWSQPNFRYDTAPFLIPQSGDFP	CDP	0,505	NoHemo	0,406
Pseudomonas sichuanensis WCHPs060039T	PKHTCNPANHTGRPAHRVLAVAGRNAVAPFYFGYWFSY	CDP	0,525	Hemo	0,624
Pseudomonas sichuanensis WCHPs060039T	IAIAYMAYLIYRGPR	CLP	0,614	Hemo	0,802
Pseudomonas marginalis pv. marginalis ICMP 3553T	GRKACVGGFFIWRRARALRIMARLHGCPQAKEPLTS	CDP	0,842	Hemo	0,743
Pseudomonas rhizoryzae RY24T	SLGHLSHGREYLPWAYQYFSTKARSIR	CLP	0,574	NoHemo	0,446
Pseudomonas rhizoryzae RY24T	GLSRTRRLWHWLRPRLQRFCELRAGRY	CDP	0,604	Hemo	0,772
Pseudomonas rhizoryzae RY24T	AVQANGSLAFYLGPDLMRRNEAKPKMHLGDCYRCQRKIGWMTFSGT	CDP	0,515	NoHemo	0,495
Pseudomonas alcaligenes NCTC10367T	GLKGLRLWFLRQCQRSGQCLEPTKQSTRTPSPSGRGLG	CDP	0,584	NoHemo	0,426



Pseudomonas wadenswilerensis CCOS 864T	AIAKYMTIYARSVKIVVGIVWRG	CLP	0,822	Hemo	0,921
Pseudomonas reidholzensis CCOS 865T	GLAQAKLLIEAPVNGGRNYNGPKVAKFLVG	CLP	0,851	Hemo	0,861
Pseudomonas reidholzensis CCOS 865T	VLARLPVLGYKVFILDIAPSGA	CLP	0,505	NoHemo	0,267
Pseudomonas antarctica DSM 15318T	AAAHGFKPERGHAEPRRGNEWWGKSPFGYFWLGRHSGLFSKSDPP	CLP	0,545	NoHemo	0,307
Pseudomonas cedrina subsp. cedrina DSM 17516T	VYSLMRKVPLAEFIVLNVR	CLP	0,535	Hemo	0,683
Pseudomonas cedrina subsp. cedrina DSM 17516T	FSVSNLHKAILPVDPTLIGFHWRICFI	CDP	0,545	NoHemo	0,347
Pseudomonas cedrina subsp. cedrina DSM 17516T	RWLG DAGRVALRLRWALRFVLGGMADYLRDNRIEVFQQY	CLP	0,554	NoHemo	0,248
Pseudomonas cedrina subsp. cedrina DSM 17516T	LGSVAILKMRHHGMKMERKTGRHSPMVDFANKLAGFTGFTG	CLP	0,644	Hemo	0,693
Pseudomonas panacis DSM 18529T	ELKLRRLRRWLFALCQSRAGQCIRKQ	CDP	0,644	Hemo	0,861
Pseudomonas grimontii DSM 17515T	IAALWFAYVFIYKGRPR	CLP	0,693	Hemo	0,822
Pseudomonas rhodesiae DSM 14020T	IATLWFAYVFIYKVGRP	CLP	0,752	Hemo	0,851
Pseudomonas rhodesiae DSM 14020T	GAILTVCCVYAAIISTAKAIKEHQRRFMM	CDP	0,762	Hemo	0,713
Pseudomonas gessardii DSM 1715T	ELKLRRLRRWFFALCQSRSGQCLQKP	CDP	0,653	Hemo	0,832
Pseudomonas gessardii DSM 1715T	IAPLWFAYVFIYKGRPR	CLP	0,683	Hemo	0,792
Pseudomonas haemolytica DSM 108987T	WGFFAKASAAQTRAGGNASHGDLFGALIRVAQ	CLP	0,614	NoHemo	0,465
Pseudomonas haemolytica DSM 108987T	INSHLLYQLSYRGMRRMLLIKKKSSFP	CLP	0,564	Hemo	0,901
Pseudomonas haemolytica DSM 108987T	IGSFPTGVRTMHLNHLFNGLLAAYACGK	CDP	0,673	Hemo	0,693
Pseudomonas haemolytica DSM 108987T	AAFLLRWRSIAIGLDNVRMRLASDGIDAVCLLLKAPKKIA	CDP	0,584	Hemo	0,673
Pseudomonas haemolytica DSM 108987T	IWLITSIPKFCIDSSRRMYWNCSATPVILLRRPMDKIWVKPQ	CDP	0,604	Hemo	0,545
Pseudomonas profundus M5T	LVFIWFILWLRGPHLFLMNHSETFI	CLP	0,594	NoHemo	0,406

Pseudomonas profundus M5T	ATSVRTGKGLLLFVAAMKRATDLDTTVAR	CLP	0,545	NoHemo	0,416
Pseudomonas profundus M5T	SLNVLAYNLKRVKIMGTEGLLKAMTA	CLP	0,505	Hemo	0,792
Pseudomonas salina XCD-X85T	VACGMQCTKIKLTGQFRSNTVPVCTREKGFQKQKFR	CDP	0,554	Hemo	0,584
Pseudomonas brassicacearum subsp. brassicacearum CCUG 51508T	PMSARFMTCFHRFKLNRCCKAVNMRMSIMQGIYEYSF	CDP	0,604	Hemo	0,614
Pseudomonas brassicacearum subsp. brassicacearum CCUG 51508T	AALGAWRARRGDPVFRIDRFSYGILFALCFALMRYFFAA	CDP	0,644	Hemo	0,713
Pseudomonas koreensis CCUG 51519T	VSDYAMTKAFRAPGFITLHKSL	CLP	0,574	NoHemo	0,386
Pseudomonas koreensis CCUG 51519T	IFAPLYMAYLIYKGPWR	CLP	0,733	Hemo	0,822
Pseudomonas koreensis CCUG 51519T	IIPIAAPLYMAYLIYKGPWR	CLP	0,653	Hemo	0,891
Pseudomonas lini CCUG 51522T	CAFIDRAKCPGLFACGLRHRPPDAAVKL	CDP	0,505	NoHemo	0,455
Pseudomonas lini CCUG 51522T	VFFEAKNRGFVTVSPGFCYAKKLR	CDP	0,683	Hemo	0,644
Pseudomonas moorei CCUG 53114T	WLLILMIGTFSWILGEAQTKHDSKVPLKHLDMFKKP	CLP	0,535	NoHemo	0,455
Pseudomonas moorei CCUG 53114T	CAFIDRAKCPGLFACGLRHRPPDAAVKL	CDP	0,505	NoHemo	0,455
Pseudomonas moorei CCUG 53114T	SATFYLNIDVIGLNAKAQGCVAHALKSKKQSLM	CDP	0,515	Hemo	0,683
Pseudomonas psychrophila CCUG 53877T	VLIIVRLFLELHKQFGGHGRLIVLLKK	CLP	0,802	Hemo	0,96
Pseudomonas nitritireducens WZBFD3-5A2T	LDIILITLLLP	CLP	0,584	Hemo	0,564
Pseudomonas nitritireducens WZBFD3-5A2T	RAIAGAARSYRFCSDVKKPR	CDP	0,564	Hemo	0,752
Pseudomonas nitritireducens WZBFD3-5A2T	AALRRSKNRLDIIICQPRFSQQQRVMLESSVYNGGWLAQTRI	CDP	0,515	NoHemo	0,455

**Tabla Suplementaria 3:** Características genómicas de cepas tipo de distintas especies bacterianas utilizadas en este trabajo para estudiar su taxonomía y filogenia.

Cepa	Número de acceso	contigs (>= 1000 pb)	contigs (>= 5000 pb)	contigs (>= 10000 pb)	contigs (>= 25000 pb)	contigs (>= 50000 pb)	Longitud total	Longitud total(>= 1000 pb)	Longitud total(>= 5000 pb)	Longitud total(>= 10000 pb)	Longitud total(>= 25000 pb)	Longitud total(>= 50000 pb)	Contig más largo	GC (%)	N50	N75	L50	L75	# N's por 100 kbp
<i>Azomonas agilis</i> DSM 375T	GCF_007830255.1	22	19	19	18	16	3276823	3264991	3264991	3247486	3177292	22	502936	51,78	261193	166359	5	9	49,62
<i>Azotobacter beijerinckii</i> DSM 378T	GCF_900110885.1	182	116	92	51	29	4940163	4786677	4616145	3943864	3202780	182	224508	65,6	84920	29392	18	43	78,84
<i>Azotobacter chroococcum</i> DSM 2286T	GCF_004339665.1	99	74	68	43	25	4859997	4800584	4758580	4306451	3683590	99	443280	66,14	144574	51071	11	25	7,96
<i>Entomomonas moraniae</i> QZS01T	GCF_003991975.1	1	1	1	1	1	3337477	3337477	3337477	3337477	3337477	1	3337477	38,05	3337477	3337477	1	1	0
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11775T	GCF_003697165.2	2	2	2	2	2	5034834	5034834	5034834	5034834	5034834	2	4903501	50,64	4903501	4903501	1	1	0
<i>Lysobacter enzymogenes</i> ATCC 29487T	GCF_900106525.1	23	21	19	17	16	6263953	6260391	6247375	6211988	6168814	23	981555	69,38	630088	350126	4	8	283,78
<i>Oblitimonas alkaliphila</i> B4199T	GCF_001267175.1	1	1	1	1	1	2494031	2494031	2494031	2494031	2494031	1	2494031	47,36	2494031	2494031	1	1	0
<i>Permianibacter aggregans</i> HW001T	GCF_009756665.1	1	1	1	1	1	4266648	4266648	4266648	4266648	4266648	1	4266648	54,42	4266648	4266648	1	1	0
<i>Pseudomonas abietaniphila</i> ATCC 700689T	GCF_900100795.1	54	40	35	32	26	7222451	7193199	7159194	7099990	6855048	54	805289	59,44	357714	192020	7	14	0
<i>Pseudomonas abyssii</i> MT5T	GCF_002307495.1	61	44	33	25	21	4312793	4270802	4191247	4044569	3914673	70	473601	61,25	236029	109619	7	13	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DSM 50071T	GCF_001045685.1	1	1	1	1	1	6317050	6317050	6317050	6317050	6317050	1	6317050	66,52	6317050	6317050	1	1	0
<i>Pseudomonas aestusnigri</i> VGXO14T	GCF_002197985.1	30	29	23	21	17	3829769	3827356	3781955	3742671	3605895	30	867618	60,94	316895	132902	4	10	337,44
<i>Pseudomonas agarici</i> LMG 2112T	GCF_900109755.1	77	51	46	40	34	5508099	5453307	5409597	5314557	5117920	77	381542	58,99	165334	106543	11	21	76,92
<i>Pseudomonas alcaligenes</i> NCTC10367T	GCF_900455475.1	2	2	2	1	1	5016483	5016483	5016483	4998752	4998752	2	4998752	64,5	4998752	4998752	1	1	0
<i>Pseudomonas alcaliphila</i> JCM 10630T	GCF_900101755.1	26	17	16	15	14	5283714	5259703	5254334	5237950	5192629	26	1877148	62,88	596080	281379	3	6	20,31
<i>Pseudomonas alkylphenolica</i> KL28T	GCF_000746525.1	1	1	1	1	1	5764622	5764622	5764622	5764622	5764622	1	5764622	60,63	5764622	5764622	1	1	0
<i>Pseudomonas allopuntida</i> Kh7T	GCA_900291035.1	45	31	30	26	24	5700652	5673835	5668307	5596090	5518858	54	1034092	61,99	253641	174123	6	12	0,65
<i>Pseudomonas amygdali</i> ICMP 3918T	GCF_002699855.1	279	203	166	78	28	5685782	5476741	5211664	3762533	2017344	301	116137	58,24	35791	19475	49	102	3,21
<i>Pseudomonas anguilliseptica</i> DSM 12111T	GCF_900105355.1	3	2	2	2	2	5229617	5226238	5226238	5226238	5226238	3	5020146	60,21	5020146	5020146	1	1	0
<i>Pseudomonas antarctica</i> DSM 15318T	GCF_900624995.1	255	195	127	53	28	6197033	6016507	5513588	4257695	3435427	263	374021	59,58	65347	20673	23	71	0
<i>Pseudomonas argentinensis</i> LMG 22563T	GCF_900113905.1	15	10	10	9	7	5108022	5096401	5096401	5080112	4986184	15	1881468	63,58	1308850	706881	2	3	10,18
<i>Pseudomonas arsenicoxydans</i> CECT 7543T	GCF_900103875.1	1	1	1	1	1	6502978	6502978	6502978	6502978	6502978	1	6502978	58,75	6502978	6502978	1	1	1,54

<i>Pseudomonas asiatica</i> RYU5T	GCF_009932335.1	3	3	3	3	3	5969036	5969036	5969036	5969036	5969036	3	4196743	62,55	4196743	1086018	1	2	0
<i>Pseudomonas asplenii</i> ATCC 23835T	GCF_900105475.1	1	1	1	1	1	6529636	6529636	6529636	6529636	6529636	1	6529636	61,22	6529636	6529636	1	1	1,53
<i>Pseudomonas asturiensis</i> LMG 26898T	GCF_900143095.1	42	34	31	30	26	6174096	6154049	6131650	6109998	5958419	42	679903	59,14	320220	157409	7	14	110,64
<i>Pseudomonas avellanae</i> BPIC 631T	GCF_000302915.1	159	125	109	83	51	6572382	6488162	6379809	5961525	4757199	188	234505	58,74	79356	46561	28	55	11805,81
<i>Pseudomonas azotifigens</i> DSM 17556T	GCF_000425625.1	59	55	52	40	32	5017423	5009091	4989361	4787299	4500398	59	420612	67	171594	84523	11	21	398,59
<i>Pseudomonas azotoformans</i> LMG 21611T	GCF_900624915.1	1	1	1	1	1	6727386	6727386	6727386	6727386	6727386	1	6727386	60,98	6727386	6727386	1	1	1,49
<i>Pseudomonas baetica</i> LMG 25716T	GCF_002813455.1	1	1	1	1	1	6902809	6902809	6902809	6902809	6902809	1	6902809	58,76	6902809	6902809	1	1	0
<i>Pseudomonas balearica</i> DSM 6083T	GCF_000818015.1	1	1	1	1	1	4383480	4383480	4383480	4383480	4383480	1	4383480	64,66	4383480	4383480	1	1	0
<i>Pseudomonas batumici</i> UCM B-321T	GCF_000820515.1	97	74	62	56	44	6593132	6537747	6448581	6360320	5933415	106	468112	61,79	133994	91601	16	31	0
<i>Pseudomonas bauzanensis</i> DSM 22558T	GCF_900111225.1	16	13	12	11	10	3542729	3534157	3524443	3508700	3459147	16	1379517	60,26	414199	302805	2	5	41,66
<i>Pseudomonas benzenivorans</i> DSM 8628T	GCF_900100495.1	44	40	35	27	24	5743144	5728852	5692178	5548046	5439074	44	673158	65,21	318602	151444	7	13	5,22
<i>Pseudomonas bohemica</i> IA19T	GCF_002934685.1	93	79	70	57	36	6476344	6440909	6378585	6168855	5418640	100	574247	59,48	149954	70635	13	28	9,6
<i>Pseudomonas borbori</i> DSM 17834T	GCF_900115555.1	96	73	61	45	35	5270473	5205826	5120186	4874442	4545050	96	298140	63,02	159007	85050	13	26	48,67
<i>Pseudomonas brassicacearum</i> subsp. <i>brassicacearum</i> CCG 51508T	GCF_008801605.1	36	28	28	27	25	6720293	6701340	6701340	6691075	6637484	45	1279703	60,83	355434	219051	6	12	0
<i>Pseudomonas brassicae</i> MAFF212427T	GCA_010671725.1	578	339	186	40	4	5465113	4808838	3725600	1480104	226850	655	64600	63,41	14619	7789	109	233	0
<i>Pseudomonas brenneri</i> DSM 15294T	GCF_007858285.1	28	25	24	23	19	5985761	5982192	5975702	5962491	5811608	31	742328	60,19	504582	282972	5	9	0
<i>Pseudomonas bubulae</i> TH39T	GCF_900618535.1	17	11	9	9	8	5026472	5012430	4996775	4996775	4956312	20	1489380	58,16	750140	582861	3	5	0
<i>Pseudomonas caeni</i> DSM 24390T	GCF_000421765.1	24	19	17	13	12	3022325	3009627	2995360	2929984	2904554	24	612766	48,26	312453	185233	4	7	0
<i>Pseudomonas canadensis</i> 2-92T	GCF_000503215.1	19	17	16	15	15	6419614	6414892	6409566	6394047	6394047	19	1349399	60,4	622148	407387	4	6	0,45
<i>Pseudomonas cannabina</i> ICMP2823T	GCF_001400175.1	477	249	180	73	17	5808809	5299516	4789979	3060682	1118885	561	90292	58,74	26272	12754	69	147	17,5
<i>Pseudomonas caricapapayae</i> ICMP2855T	GCF_001400735.1	159	131	113	76	45	6244177	6171865	6034587	5414214	4335239	169	227563	58,32	78662	40649	26	53	2,45
<i>Pseudomonas carnis</i> B4-1T	GCA_902329575.1	65	48	44	37	28	6185846	6156636	6123400	6010045	5655636	73	656556	59,79	257906	125802	8	16	0
<i>Pseudomonas caspiana</i> FBF102T	GCF_002158995.1	49	49	48	42	33	6103762	6103762	6096436	6012572	5661720	49	530585	56,95	194944	124360	10	20	819,61
<i>Pseudomonas cedrina</i> subsp. <i>cedrina</i> DSM 17516T	GCF_900625035.1	43	32	32	28	25	6488313	6468778	6468778	6401998	6286774	48	639712	60,79	363467	220156	7	13	0
<i>Pseudomonas cerasi</i> 58T	GCF_900074915.1	7	7	7	6	6	6345256	6345256	6345256	6333942	6333942	7	5891735	58,78	5891735	5891735	1	1	0,03

<i>Pseudomonas chengduensis</i> DSM 26382T	GCF_900102635.1	43	34	34	26	24	5413065	5394597	5394597	5279227	5215098	43	1013045	62,32	248272	198995	7	13	15,26
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> subsp. <i>chlororaphis</i> DSM 50083T	GCF_003945765.1	1	1	1	1	1	6808187	6808187	6808187	6808187	6808187	1	6808187	62,98	6808187	6808187	1	1	0
<i>Pseudomonas cichorii</i> ATCC 10857T	GCF_900104015.1	55	40	30	25	24	5920059	5886674	5817670	5732412	5698029	55	808481	58,12	343756	181654	6	13	20,61
<i>Pseudomonas cissicola</i> CCUG 18839T	GCF_008801575.1	202	132	98	63	32	5301624	5122449	4890881	4284396	3155899	239	198223	64,41	70530	30353	24	54	0
<i>Pseudomonas citronellolis</i> LMG 18378T	GCF_900112375.1	76	64	63	55	45	7198503	7167887	7162131	7014627	6640122	76	386725	67,54	157758	108761	16	29	38,9
<i>Pseudomonas coleopterorum</i> LMG 28558T	GCF_900105555.1	2	2	2	2	2	4922895	4922895	4922895	4922895	4922895	2	4857115	62,03	4857115	4857115	1	1	0
<i>Pseudomonas composti</i> CCUG 59231T	GCF_900115475.1	28	24	24	22	20	5392494	5381627	5381627	5352838	5267512	28	841801	62,42	425534	197756	5	11	38,2
<i>Pseudomonas congelans</i> DSM 14939T	GCF_900103225.1	23	19	17	14	13	5737059	5727838	5708524	5659170	5622610	23	1636184	59,33	740022	329263	3	6	88,46
<i>Pseudomonas corrugata</i> DSM 7228T	GCF_001269905.1	30	26	25	23	17	6126078	6117821	6112049	6082956	5843100	31	1211577	60,62	374457	284006	5	10	0,23
<i>Pseudomonas costantinii</i> LMG 22119T	GCF_001870435.1	61	54	53	43	33	7244451	7231929	7224988	7072484	6741214	64	699084	59,39	302172	150398	10	18	0,03
<i>Pseudomonas cremoricolorata</i> DSM 17059T	GCF_000425745.1	26	22	19	18	18	4655082	4648541	4630209	4613227	4613227	26	561759	63,5	416153	239423	5	9	28,25
<i>Pseudomonas cuatrocieneegasensis</i> CIP 109853T	GCF_900110925.1	50	41	35	31	24	5358739	5335788	5290950	5232425	4956399	50	604798	61,96	246774	142711	7	15	190,83
<i>Pseudomonas daroniae</i> FRB228T	GCA_004327275.1	24	21	21	20	16	5569565	5562349	5562349	5549293	5415841	25	1089105	61,98	572561	251486	4	9	0
<i>Pseudomonas deceptionensis</i> LMG 25555T	GCF_900106095.1	2	1	1	1	1	5096762	5095053	5095053	5095053	5095053	2	5095053	58,51	5095053	5095053	1	1	0
<i>Pseudomonas defluvii</i> WCHP16T	GCA_001695625.1	285	190	142	80	33	5606229	5368771	5038545	4057858	2451120	326	123293	59,54	40922	22097	42	88	0
<i>Pseudomonas delhiensis</i> RLD-1T	GCF_900187975.1	81	63	58	53	41	6727430	6689824	6654489	6573203	6138723	81	426943	68,07	168606	116543	15	26	0
<i>Pseudomonas donghuensis</i> HYST	GCF_000259195.1	60	56	52	41	31	5643400	5630740	5596791	5406101	4989920	64	503710	62,42	188174	102903	10	20	116,06
<i>Pseudomonas dryadis</i> FRB230T	GCA_004327225.1	71	60	59	48	42	5723863	5697794	5692204	5487897	5257682	81	275088	64,97	133269	92777	15	28	0
<i>Pseudomonas duriflava</i> CGMCC 1.6858T	GCF_007830155.1	65	46	39	29	20	4976003	4933449	4887908	4730971	4440189	65	518277	54,15	274898	202290	7	12	0
<i>Pseudomonas endophytica</i> BSTT44T	GCF_001411475.1	233	177	139	64	18	4967615	4806147	4524209	3344803	1748937	241	212307	55,16	35704	18789	36	82	0
<i>Pseudomonas entomophila</i> L48T	GCF_000026105.1	1	1	1	1	1	5888780	5888780	5888780	5888780	5888780	1	5888780	64,16	5888780	5888780	1	1	0
<i>Pseudomonas extremaustralis</i> DSM 17835T	GCF_900102035.1	1	1	1	1	1	6674429	6674429	6674429	6674429	6674429	1	6674429	60,61	6674429	6674429	1	1	1,5
<i>Pseudomonas extremorientalis</i> LMG 19695T	GCF_001870465.1	56	42	37	34	26	6341420	6300225	6264758	6223361	5918491	60	750285	60,93	312925	163992	8	15	0,11
<i>Pseudomonas ficuserectae</i> ICMP7848T	GCF_001400815.1	522	330	191	49	6	5597354	5095326	4071433	1791755	381571	578	92007	57,89	18060	9209	99	208	247,93
<i>Pseudomonas fildesensis</i> KG01T	GCA_001050345.1	44	33	29	27	20	6310953	6280558	6245817	6210020	5922412	47	708409	60,14	341169	215096	6	12	0

<i>Pseudomonas flavescens</i> LMG 18387T	GCF_900100535.1	51	44	38	35	31	5855660	5841269	5800056	5743339	5573575	51	447237	63,46	207737	125133	9	18	4,7
<i>Pseudomonas flexibilis</i> ATCC 29606T	GCF_900155995.1	42	35	35	27	22	3760855	3746083	3746083	3596024	3426225	42	426711	65,81	174376	114202	8	15	78,49
<i>Pseudomonas floridensis</i> GEV388T	GCF_002087235.1	222	139	118	87	44	6056896	5885233	5728721	5209638	3690521	287	273720	59,17	60718	34028	33	66	1,29
<i>Pseudomonas fluorescens</i> NCTC10038T	GCF_900475215.1	1	1	1	1	1	6515171	6515171	6515171	6515171	6515171	1	6515171	59,98	6515171	6515171	1	1	0
<i>Pseudomonas fluvialis</i> ASS-1T	GCF_002234375.1	48	38	34	25	22	3276292	3258424	3227942	3062479	2955596	69	275424	62,64	155410	87883	8	16	0
<i>Pseudomonas formosensis</i> JCM 18415T	GCF_900115905.1	28	22	21	18	16	3443471	3430331	3420774	3378793	3285179	28	673023	62,73	287163	157852	4	8	104,02
<i>Pseudomonas fragi</i> NRRL B-727T	GCF_900105835.1	1	1	1	1	1	5072304	5072304	5072304	5072304	5072304	1	5072304	59,3	5072304	5072304	1	1	1,97
<i>Pseudomonas fulva</i> NBRC 16637T	GCF_000621265.1	48	37	33	30	26	4770636	4736618	4707805	4659918	4483159	48	568280	61,77	178183	120154	8	16	93,95
<i>Pseudomonas furukawaii</i> KF707T	GCF_002355475.1	164	117	95	53	32	6645988	6544869	6383464	5696913	4992115	189	597931	65,38	123949	46403	14	33	0,84
<i>Pseudomonas fuscovaginae</i> LMG 2158T	GCF_900108595.1	1	1	1	1	1	6592354	6592354	6592354	6592354	6592354	1	6592354	61,36	6592354	6592354	1	1	1,52
<i>Pseudomonas gallaeciensis</i> V113T	GCF_003444685.1	18	18	14	12	12	4246542	4246542	4215289	4183878	4183878	18	1749682	61,53	509657	433084	2	4	467,67
<i>Pseudomonas geniculata</i> ATCC 19374T	GCA_001431625.1	146	124	111	67	32	4792829	4731505	4637845	3950726	2664254	170	188579	66,18	55144	32777	27	56	0
<i>Pseudomonas gessardii</i> DSM 1715T	GCF_009671285.1	137	94	84	68	41	6499861	6406052	6327673	6063177	5021666	149	554093	60,39	114356	55589	18	39	0
<i>Pseudomonas graminis</i> DSM 11363T	GCF_900111735.1	98	76	68	55	37	5852045	5803901	5743641	5520122	4867495	98	398862	60,26	130494	68969	15	30	112,11
<i>Pseudomonas granadensis</i> LMG 27940T	GCF_900105485.1	1	1	1	1	1	5943170	5943170	5943170	5943170	5943170	1	5943170	60,16	5943170	5943170	1	1	1,68
<i>Pseudomonas grimontii</i> DSM 17515T	GCF_007858185.1	53	48	46	41	34	7036700	7030579	7015217	6918598	6637176	57	870260	60,12	251569	115464	10	18	0,01
<i>Pseudomonas guangdongensis</i> CCTCC AB 2012022T	GCF_900105885.1	1	1	1	1	1	3191154	3191154	3191154	3191154	3191154	1	3191154	68,26	3191154	3191154	1	1	3,13
<i>Pseudomonas guariconensis</i> LMG 27394T	GCF_900102675.1	29	25	23	19	18	5079034	5070153	5056948	5001963	4968382	29	657213	62,6	313298	221885	6	10	3,15
<i>Pseudomonas guguanensis</i> JCM 18416T	GCF_900104265.1	26	23	22	22	20	5084171	5074538	5068560	5068560	4974709	26	511368	64,21	291442	197852	7	12	124,11
<i>Pseudomonas guineae</i> LMG 24016T	GCF_900113745.1	10	10	9	7	7	4149587	4149587	4144337	4105532	4105532	10	1979549	58,47	579936	556228	2	3	3,86
<i>Pseudomonas haemolytica</i> DSM 108987T	GCF_009659625.1	19	14	13	12	11	6008425	6002075	5996503	5979186	5939752	21	1342989	60,03	639786	602668	4	6	0
<i>Pseudomonas helleri</i> DSM 29165T	GCF_001043025.1	36	30	28	25	23	5675733	5664106	5649589	5606432	5521271	37	623802	58,1	336668	166604	6	12	0
<i>Pseudomonas humi</i> CCA1T	GCF_001748265.1	21	5	1	1	1	6991489	6960339	6935186	6935186	6935186	24	6935186	67,2	6935186	6935186	1	1	0
<i>Pseudomonas hussainii</i> JCM 19513T	GCF_900109735.1	45	31	27	22	21	3682314	3659339	3634285	3551178	3523166	45	359612	58,82	215245	157754	7	12	42,53
<i>Pseudomonas hydrolytica</i> DSWY01T	GCA_004123735.1	139	107	101	77	59	10370246	10287326	10245348	9821806	9156335	161	783935	63,68	213825	78248	16	38	0

<i>Pseudomonas indica</i> JCM 21544T	GCF_900100285.1	64	53	49	40	32	5786922	5766529	5742378	5596425	5298825	64	633505	64,12	192612	92639	9	19	39
<i>Pseudomonas inefficax</i> JV551A3T	GCF_900277125.1	248	80	73	51	37	6240036	5907871	5855772	5512937	5015904	248	396851	62,85	134841	66810	15	31	2
<i>Pseudomonas izuensis</i> IzPS43 3003T	GCF_009861505.1	86	65	59	47	35	6863765	6818484	6769035	6592685	6177067	92	486402	59,61	211289	106496	11	22	34,39
<i>Pseudomonas japonica</i> DSM 22348T	GCF_900188455.1	61	50	48	43	36	6718608	6691816	6677981	6600460	6356537	61	532373	64,14	196010	131836	11	21	7,16
<i>Pseudomonas jessenii</i> DSM 17150T	GCF_002236115.1	13	10	10	10	10	6537206	6528139	6528139	6528139	6528139	13	1016250	59,7	779324	637839	4	6	0
<i>Pseudomonas jinjuensis</i> JCM 21621T	GCF_900103845.1	31	28	28	27	27	5868669	5863950	5863950	5848399	5848399	31	547603	66,38	308266	186054	8	14	20,7
<i>Pseudomonas juntendi</i> BML3T	GCF_009932375.1	316	222	160	75	27	5606861	5366039	4927566	3515559	1829234	383	121068	62,66	33458	16431	52	111	0
<i>Pseudomonas kairouanensis</i> KC12T	GCA_004682055.1	105	92	83	63	41	6701087	6670557	6603887	6245680	5363801	107	503235	60,37	112454	70154	17	36	0
<i>Pseudomonas kilonensis</i> DSM 13647T	GCF_001269885.1	41	37	34	32	27	6383230	6374262	6352735	6318550	6141454	44	1140939	60,86	281474	158577	6	15	0,06
<i>Pseudomonas kirikiae</i> P4CT	GCF_004327335.1	74	62	55	45	33	4344830	4316718	4264341	4073785	3637126	84	369899	63,72	103701	60684	13	27	0
<i>Pseudomonas kitaguiensis</i> MAFF 212408T	GCF_004682055.1	232	193	157	87	32	5853489	5742148	5490438	4335227	2401492	259	155986	59,48	42801	24435	44	90	0
<i>Pseudomonas knackmussii</i> B13T	GCF_000689415.1	1	1	1	1	1	6162905	6162905	6162905	6162905	6162905	1	6162905	65,61	6162905	6162905	1	1	0
<i>Pseudomonas koreensis</i> CCUG 51519T	GCF_008801535.1	26	20	18	17	16	6082148	6067983	6052826	6028689	5990503	27	827161	60,57	483184	286548	5	9	0
<i>Pseudomonas kunmingensis</i> DSM 25974T	GCF_900114065.1	33	26	22	18	14	4654543	4642575	4607841	4551142	4396429	33	889916	62,61	480906	240698	4	7	6,02
<i>Pseudomonas kuykendallii</i> NRRL B-59562T	GCF_900106975.1	15	14	11	10	9	4690373	4687243	4668932	4653199	4627062	15	1112858	65,9	700257	445240	3	5	13,96
<i>Pseudomonas lactis</i> DSM 29167T	GCF_001439845.1	40	31	27	25	23	6732008	6708404	6681281	6646609	6585724	42	670499	60,02	392630	320185	8	12	0
<i>Pseudomonas laurentiana</i> JCM 32154T	GCF_010671685.1	407	260	168	55	7	4870791	4510077	3841196	2108719	426746	509	82652	59,71	20771	11152	71	156	0
<i>Pseudomonas laurylsulfatiphila</i> AP3 16T	GCF_002934665.1	13	13	13	12	10	6684644	6684644	6684644	6670289	6586839	13	1297429	60,15	786146	573651	4	6	0
<i>Pseudomonas laurylsulfatorans</i> AP3 22T	GCF_002906155.1	30	25	24	21	21	6686052	6676534	6671208	6615255	6615255	30	1428571	59,61	593348	219353	4	9	0
<i>Pseudomonas leptonychotis</i> CCM 8849T	GCF_004920405.1	14	10	10	7	6	4390070	4381441	4381441	4339032	4307046	17	2322232	58,8	2322232	496239	1	3	0
<i>Pseudomonas libanensis</i> DSM 17149T	GCF_001439685.1	42	34	31	30	25	6213641	6200081	6173426	6150158	5981156	43	640011	60,18	326504	195941	7	14	0
<i>Pseudomonas lini</i> CCUG 51522T	GCF_008801525.1	29	20	19	19	17	6495476	6480368	6472357	6472357	6403355	33	805400	58,82	506634	294930	5	10	0
<i>Pseudomonas linyingensis</i> LMG 25967T	GCF_900109175.1	43	34	31	29	25	4721122	4703481	4681215	4646906	4511710	43	467980	66,39	231539	124068	7	14	65,11
<i>Pseudomonas litoralis</i> 2SM5T	GCF_900105005.1	1	1	1	1	1	3987942	3987942	3987942	3987942	3987942	1	3987942	58,54	3987942	3987942	1	1	2,51
<i>Pseudomonas lundensis</i> DSM 6252T	GCF_001042985.1	78	54	49	44	30	4983429	4927298	4895124	4803582	4297412	92	393880	58,54	148083	88261	12	23	0

<i>Pseudomonas lurida</i> LMG 21995T	GCF_002563895.1	1	1	1	1	1	6311648	6311648	6311648	6311648	6311648	1	6311648	60,61	6311648	6311648	1	1	0
<i>Pseudomonas lutea</i> LMG 21974T	GCF_900110795.1	53	35	29	23	19	5421602	5387896	5340583	5245246	5113603	53	512669	55,31	322783	211128	7	11	0
<i>Pseudomonas luteola</i> NBRC 103146T	GCF_002091675.1	87	57	51	39	28	5383534	5320057	5277693	5057237	4685758	104	511089	55,3	170627	96186	9	19	0
<i>Pseudomonas mandelii</i> LMG 21607T	GCF_900106065.1	1	1	1	1	1	7041758	7041758	7041758	7041758	7041758	1	7041758	59,2	7041758	7041758	1	1	1,42
<i>Pseudomonas marginalis</i> pv. <i>marginalis</i> ICMP 3553T	GCA_003700725.1	275	215	174	84	34	6549928	6402534	6087541	4536594	2758318	294	161549	60,45	42336	22349	46	101	16,59
<i>Pseudomonas marincola</i> JCM 14761T	GCF_900116605.1	33	29	27	24	22	5020984	5014163	5000456	4944254	4886796	33	973986	57,07	331565	154918	6	11	7,77
<i>Pseudomonas mediterranea</i> DSM 16733T	GCF_900106005.1	1	1	1	1	1	6346235	6346235	6346235	6346235	6346235	1	6346235	61,2	6346235	6346235	1	1	1,58
<i>Pseudomonas mendocina</i> NCTC10897T	GCF_900636545.1	1	1	1	1	1	5192837	5192837	5192837	5192837	5192837	1	5192837	62,76	5192837	5192837	1	1	0
<i>Pseudomonas migulae</i> NBRC 103157T	GCF_002091715.1	97	85	79	61	46	6664737	6639777	6595279	6317058	5751794	101	463301	59,12	121489	76609	18	35	0
<i>Pseudomonas mohnii</i> DSM 18327T	GCF_900105115.1	2	2	2	2	2	6592588	6592588	6592588	6592588	6592588	2	6476037	59,62	6476037	6476037	1	1	0
<i>Pseudomonas monteillii</i> NBRC 103158T	GCF_000621245.1	85	61	53	44	32	6308713	6249490	6191511	6057379	5612671	85	542100	61,49	204302	115717	10	20	4,52
<i>Pseudomonas moorei</i> CCUG 53114T	GCF_008801475.1	44	34	32	27	24	6467180	6443892	6430293	6353011	6229756	45	593577	59,71	381195	225570	7	12	0
<i>Pseudomonas mosselii</i> DSM 17497T	GCF_000621225.1	55	49	44	36	30	6260844	6248219	6213719	6077511	5844638	55	633234	64,01	242165	127010	9	18	90,88
<i>Pseudomonas mucidolens</i> NCTC8068T	GCA_900475945.1	1	1	1	1	1	5853060	5853060	5853060	5853060	5853060	1	5853060	59,09	5853060	5853060	1	1	0
<i>Pseudomonas nabeulensis</i> E10BT	GCA_004682045.1	143	131	114	85	50	6758810	6723474	6594492	6107882	4825555	150	294970	60,28	77761	48944	28	55	0
<i>Pseudomonas neustonica</i> SSM26T	GCA_003797945.1	77	54	50	37	28	4334573	4283062	4255626	4042379	3691611	77	471476	56,22	126007	72311	10	22	0
<i>Pseudomonas nitritireducens</i> WZBFD3-5A2T	GCA_010994165.1	12	10	9	9	9	6397936	6395224	6389867	6389867	6389867	12	1669081	64,77	932199	502769	3	5	0
<i>Pseudomonas nitroreducens</i> NBRC 12694T	GCF_002091755.1	33	27	26	23	21	6100325	6086350	6076456	6024949	5944756	40	1231025	65,01	537643	198456	4	10	0
<i>Pseudomonas oceani</i> DSM 100277T	GCF_002903165.1	60	44	39	30	20	4151385	4115131	4081262	3939024	3588045	64	449228	59,94	175826	92148	7	15	0
<i>Pseudomonas oleovorans</i> subsp. <i>oleovorans</i> DSM 1045T	GCF_002197815.1	94	72	67	54	34	4842878	4797793	4761771	4545553	3820963	109	211992	62,07	104148	57445	16	31	0
<i>Pseudomonas orientalis</i> DSM 17489T	GCA_001439815.1	29	20	19	18	18	6183076	6167140	6157389	6133506	6133506	39	1019307	60,51	465046	291526	5	9	0
<i>Pseudomonas oryzihabitans</i> NBRC 102199T	GCF_000730625.1	34	32	30	24	21	5027590	5025315	5012305	4910573	4812801	34	953810	66,23	433363	135345	4	9	0
<i>Pseudomonas otitidis</i> DSM 17224T	GCF_900111835.1	50	42	40	33	28	6344741	6328142	6313173	6193542	6000901	50	556124	66,85	271825	185555	10	17	40,84
<i>Pseudomonas pachastrellae</i> JCM 12285T	GCF_900114765.1	55	41	34	29	25	3934694	3899717	3850576	3786024	3643347	55	326956	61,2	153272	115222	10	17	34,28
<i>Pseudomonas palleroniana</i> LMG 23076T	GCA_003031675.1	82	71	64	51	40	6115460	6091685	6036777	5793316	5400367	87	350723	60,54	134607	89264	14	29	0,05



Pseudomonas panacis DSM 18529T	GCA_007858175.1	35	26	25	24	20	6795073	6775794	6768583	6752650	6613863	46	931687	61,12	435348	261255	5	10	0
Pseudomonas panipatensis CCM 7469T	GCF_900099785.1	34	24	24	20	18	5775530	5755831	5755831	5687014	5623252	34	850239	65,56	442758	271524	5	9	8,4
Pseudomonas parafulva NBRC 16636T	GCF_000425765.1	32	29	28	23	20	4956622	4949869	4940580	4864295	4737306	32	990909	62,49	295916	175643	6	11	113,83
Pseudomonas paralactis DSM 29164T	GCA_001439735.1	34	23	21	19	18	6013552	5993319	5978502	5942396	5892616	37	884981	59,73	652815	301939	4	8	0
Pseudomonas pelagia CL-AP6T	GCF_000410875.1	72	50	43	32	25	4635346	4588971	4539969	4364711	4106253	81	492049	57,41	186161	89996	9	17	0
Pseudomonas peli DSM 17833T	GCF_900099645.1	20	15	14	11	8	4487120	4469919	4463975	4412326	4315145	20	1822137	59,72	1227061	545019	2	3	3,45
Pseudomonas persica VKh13T	GCA_900291015.1	49	40	39	34	29	5421272	5407190	5400190	5307249	5122498	53	394735	62,92	214623	133228	11	18	0,96
Pseudomonas pertucinogena JCM 11590T	GCF_014646575.1	17	11	11	9	9	3060628	3047811	3047811	3011950	3011950	24	1107422	62,72	582132	312095	2	4	13,54
Pseudomonas phragmitis S 6 2T	GCA_002056295.1	1	1	1	1	1	4035153	4035153	4035153	4035153	4035153	1	4035153	60,08	4035153	4035153	1	1	0
Pseudomonas piscis MC042T	GCA_009380155.1	20	14	13	11	9	6927622	6915783	6910115	6882383	6796478	20	2098401	63,56	1496159	654471	2	4	0
Pseudomonas plecglossicida NBRC 103162T	GCA_000730665.1	58	51	47	39	31	5347571	5330537	5304556	5168313	4871060	58	466409	62,98	172824	93122	10	20	0,56
Pseudomonas poae DSM 14936T	GCA_001439785.1	51	40	34	32	30	5879840	5845206	5805343	5764748	5679834	56	456710	60,48	226253	135401	9	17	0
Pseudomonas pohangensis DSM 17875T	GCF_900105995.1	1	1	1	1	1	3769689	3769689	3769689	3769689	3769689	1	3769689	59,61	3769689	3769689	1	1	2,65
Pseudomonas profundus M5T	GCF_008638305.1	42	32	27	23	18	4204154	4184343	4152526	4088244	3942387	49	662940	58,55	278124	146999	6	11	1,71
Pseudomonas prosekii LMG 26867T	GCF_900105155.1	1	1	1	1	1	6092055	6092055	6092055	6092055	6092055	1	6092055	59,56	6092055	6092055	1	1	1,64
Pseudomonas protegens CHA0T	GCF_900560965.1	1	1	1	1	1	6868303	6868303	6868303	6868303	6868303	1	6868303	63,39	6868303	6868303	1	1	0
Pseudomonas proteolytica DSM 15321T	GCA_007858275.1	90	77	75	61	45	6339631	6313054	6302503	6053251	5486697	107	308391	60,41	129095	72974	18	34	0
Pseudomonas psychrophila CCUG 53877T	GCF_008801485.1	31	25	24	23	22	5267362	5256424	5251241	5236809	5198368	32	865787	57,48	361652	174319	5	11	0
Pseudomonas psychrotolerans DSM 15758T	GCF_900102665.1	61	49	44	31	24	5731800	5708601	5672343	5446769	5129287	61	652501	65,56	304226	117837	7	15	16,84
Pseudomonas punonensis CECT 8089T	GCF_900142655.1	20	18	17	16	15	4809638	4805025	4799325	4783761	4736692	20	1476884	61,83	594113	222854	3	7	26,72
Pseudomonas putida NBRC 14164T	GCF_000412675.1	1	1	1	1	1	6156701	6156701	6156701	6156701	6156701	1	6156701	62,33	6156701	6156701	1	1	0
Pseudomonas reidholzensis CCOS 865T	GCF_900536025.1	44	42	38	34	26	6161977	6156658	6126855	6067847	5787745	45	822324	64,09	261911	178904	7	14	0
Pseudomonas reinekei MT1T	GCA_001945365.1	53	36	34	33	29	6242895	6207232	6189933	6176195	6032126	63	592223	59,17	325950	118360	7	15	0
Pseudomonas resinovorans DSM 21078T	GCF_000423545.1	53	47	47	36	32	6027681	6012926	6012926	5818090	5669840	53	564385	63,58	197842	121283	10	20	63,13
Pseudomonas rhizoryzae RY24T	GCF_005250615.1	45	32	29	25	20	5346010	5312697	5296812	5219197	5043399	45	552998	64,82	368693	226952	7	11	0

<i>Pseudomonas rhizosphaerae</i> DSM 16299T	GCF_000761155.1	1	1	1	1	1	4688635	4688635	4688635	4688635	4688635	1	4688635	61,99	4688635	4688635	1	1	0
<i>Pseudomonas rhodesiae</i> DSM 14020T	GCF_007858255.1	77	55	49	44	34	6330135	6293288	6245844	6160537	5830555	82	523635	60,24	239322	88253	8	19	0
<i>Pseudomonas sabulinigri</i> JCM 14963T	GCF_900105255.1	1	1	1	1	1	4030203	4030203	4030203	4030203	4030203	1	4030203	59,92	4030203	4030203	1	1	2,48
<i>Pseudomonas sagittaria</i> JCM 18195T	GCF_900115715.1	44	35	33	30	20	4607575	4586553	4571410	4522717	4146845	44	464453	66,66	208187	128937	7	13	7,27
<i>Pseudomonas salegens</i> CECT 8338T	GCF_900105655.1	1	1	1	1	1	3796105	3796105	3796105	3796105	3796105	1	3796105	57,69	3796105	3796105	1	1	2,63
<i>Pseudomonas salina</i> XCD-X85T	GCF_008641105.1	38	22	22	18	16	4251275	4219197	4219197	4146544	4068501	45	752206	57,51	355961	182085	5	9	41,84
<i>Pseudomonas salomonii</i> ICMP 14252T	GCF_900107155.1	39	30	29	26	22	6954378	6932770	6925166	6859559	6712192	39	871456	59,91	447140	259510	6	11	73,26
<i>Pseudomonas saponiphila</i> DSM 9751T	GCF_900105185.1	4	4	4	4	4	7375852	7375852	7375852	7375852	7375852	4	4645227	62,79	4645227	2273410	1	2	0
<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> ICMP4352T	GCF_001401285.1	256	158	123	80	38	5988753	5753088	5496016	4816013	3250176	290	206343	58	55596	32970	34	70	6,25
<i>Pseudomonas saxonica</i> DSM 108989T	GCF_007858365.1	36	23	23	20	16	5307273	5284278	5284278	5230629	5094263	40	1547637	56,3	551817	239327	3	8	0
<i>Pseudomonas segetis</i> CIP 108523T	GCF_900188155.1	16	12	11	10	10	4725422	4715921	4705978	4690462	4690462	16	1281898	56,71	1179970	320967	2	5	46,03
<i>Pseudomonas seleniipraecipitans</i> LMG 25475T	GCF_900102335.1	18	15	15	14	13	4546163	4541100	4541100	4525583	4489714	18	1021635	61,51	402243	240754	4	7	14,34
<i>Pseudomonas sichuanensis</i> WCHPs060039T	GCF_003231305.1	130	100	93	71	48	6028344	5947000	5893242	5544857	4696879	142	222205	63,86	86627	55156	23	45	0
<i>Pseudomonas silesiensis</i> A3T	GCF_001661075.1	1	1	1	1	1	6823539	6823539	6823539	6823539	6823539	1	6823539	59,58	6823539	6823539	1	1	0,01
<i>Pseudomonas simiae</i> CCUG 50988T	GCF_900111895.1	23	18	18	16	16	6239853	6227195	6227195	6203609	6203609	23	1238362	60,35	750639	330815	4	7	53,69
<i>Pseudomonas soli</i> LMG 27941T	GCF_900110655.1	34	29	28	22	18	5644909	5635897	5629424	5524156	5396638	34	991515	64	357163	209683	5	9	74,47
<i>Pseudomonas straminea</i> JCM 2783T	GCF_900112645.1	21	19	17	16	15	4992198	4987715	4974014	4958417	4909617	21	926042	63,23	548417	217057	4	7	3,91
<i>Pseudomonas stutzeri</i> CGMCC 1.1803T	GCF_000219605.1	1	1	1	1	1	4547930	4547930	4547930	4547930	4547930	1	4547930	63,93	4547930	4547930	1	1	0
<i>Pseudomonas synxantha</i> NCTC10696T	GCF_901482615.1	1	1	1	1	1	6841780	6841780	6841780	6841780	6841780	1	6841780	59,62	6841780	6841780	1	1	0
<i>Pseudomonas syringae</i> DSM 10604T	GCF_000597765.1	76	67	63	52	42	6065924	6043407	6011846	5832783	5462655	84	422665	58,96	142141	77899	14	28	0
<i>Pseudomonas taeanensis</i> MS-3T	GCF_000498575.2	18	14	13	12	12	5454863	5444856	5439257	5423889	5423889	18	1851393	60,92	1007976	485884	2	4	1,92
<i>Pseudomonas taetrolens</i> NCTC10697T	GCF_900475285.1	1	1	1	1	1	4843871	4843871	4843871	4843871	4843871	1	4843871	58,27	4843871	4843871	1	1	0
<i>Pseudomonas taiwanensis</i> DSM 21245T	GCF_000425785.1	67	48	43	37	32	5415134	5382035	5347815	5239135	5008785	67	633911	61,87	174759	116039	10	19	44,25
<i>Pseudomonas thermotolerans</i> DSM 14292T	GCF_000364625.1	75	45	39	30	25	3752096	3683773	3639570	3513180	3336784	75	310662	66,84	159554	84058	9	18	89,74
<i>Pseudomonas thivervalensis</i> DSM 13194T	GCF_001269655.1	23	21	20	19	18	6580491	6577962	6572241	6549252	6507397	25	910081	61,18	444792	337665	5	9	0,03

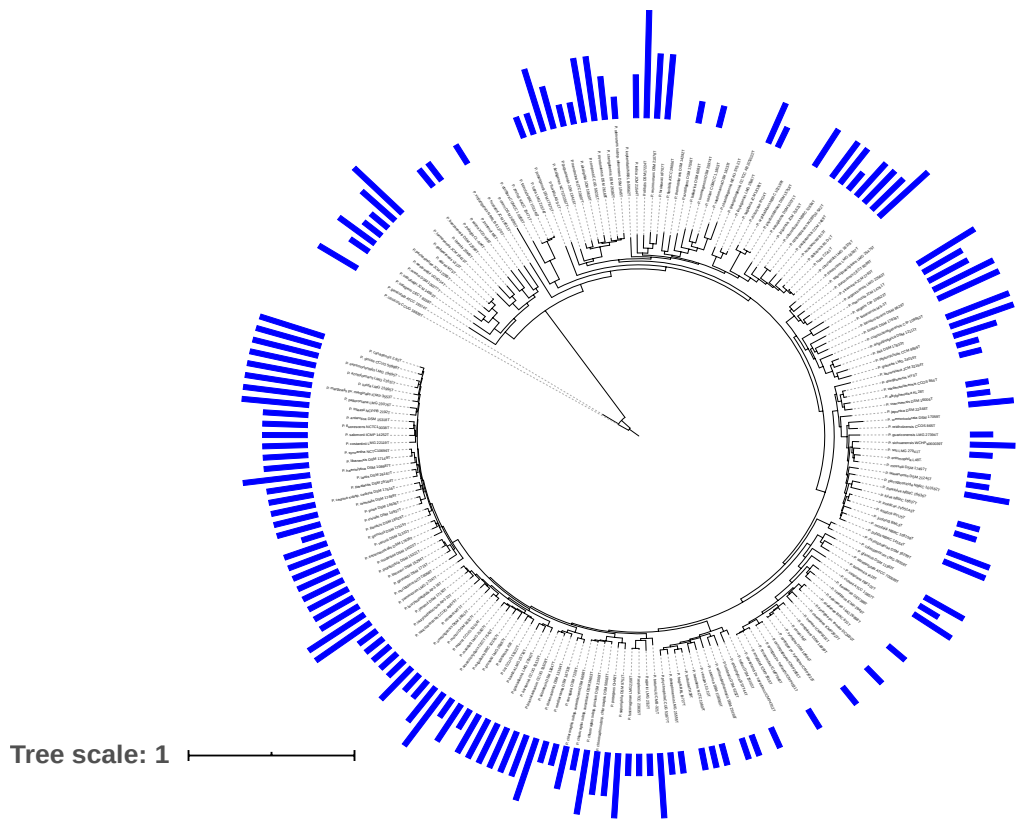
<i>Pseudomonas tolaasii</i> NCPPB 2192T	GCF_002813445.1	1	1	1	1	1	6792797	6792797	6792797	6792797	6792797	1	6792797	60,58	6792797	6792797	1	1	0
<i>Pseudomonas toytomiensis</i> DSM 26169T	GCF_002741095.1	61	34	28	26	22	5474114	5414757	5377736	5338044	5167251	61	640995	62,6	291276	187340	7	13	1,88
<i>Pseudomonas tremae</i> ICMP9151T	GCF_001401155.1	110	66	59	50	39	5751454	5654860	5603540	5471180	5072231	225	364705	57,8	140769	73135	14	28	3,31
<i>Pseudomonas trivialis</i> DSM 14937T	GCF_001439805.1	43	32	30	28	24	5585542	5566848	5551631	5522990	5371736	46	738396	60,98	288356	182705	7	14	0
<i>Pseudomonas umsongensis</i> DSM 16611T	GCF_002236105.1	14	13	13	12	11	6701403	6696543	6696543	6679681	6635505	14	2245851	59,73	1353286	456846	2	5	0
<i>Pseudomonas vancouverensis</i> CCUG 49675T	GCF_008801375.1	22	18	18	16	16	6392790	6384963	6384963	6352920	6352920	87	891762	59,99	467803	354176	5	9	0
<i>Pseudomonas veronii</i> DSM 11331T	GCF_001439695.1	87	60	54	50	40	6991668	6930888	6884819	6819440	6409640	95	559297	60,72	176093	91089	11	24	0
<i>Pseudomonas versuta</i> L10.10T	GCF_001294575.1	1	1	1	1	1	5149788	5149788	5149788	5149788	5149788	1	5149788	58,23	5149788	5149788	1	1	0
<i>Pseudomonas viridiflava</i> ICMP 2848T	GCF_001642795.1	48	29	27	26	22	5918918	5887515	5872105	5862100	5699928	48	573694	59,39	453916	164709	6	11	20,04
<i>Pseudomonas vranovensis</i> DSM 16006T	GCF_000425805.1	36	30	29	24	19	5697807	5687282	5677827	5602490	5426026	36	769681	61,53	325087	223858	6	11	26,5
<i>Pseudomonas wadenswilerensis</i> CCOS 864T	GCF_900497695.1	17	14	13	13	13	5966371	5956716	5950032	5950032	5950032	17	944637	62,39	532738	494253	5	7	0
<i>Pseudomonas weihenstephanensis</i> DSM 29166T	GCF_001043055.1	24	16	15	13	13	4786022	4770225	4764426	4738763	4738763	32	855826	57,31	571018	258145	4	7	0
<i>Pseudomonas xanthomarina</i> DSM 18231T	GCF_900129835.1	17	14	13	11	11	4308853	4305181	4299754	4260266	4260266	17	981939	60,34	627751	380598	3	5	0
<i>Pseudomonas xinjiangensis</i> NRRL B-51270T	GCF_900104945.1	1	1	1	1	1	3537092	3537092	3537092	3537092	3537092	1	3537092	60,69	3537092	3537092	1	1	2,83
<i>Pseudomonas yamanorum</i> LMG 27247T	GCF_900105735.1	1	1	1	1	1	7087525	7087525	7087525	7087525	7087525	1	7087525	60,34	7087525	7087525	1	1	1,41
<i>Pseudomonas yangonensis</i> MY50T	GCA_009932725.1	49	30	28	24	20	5033585	4991097	4978405	4925061	4785289	79	823336	62,9	275993	157072	5	12	0
<i>Pseudomonas zeshuii</i> KACC 15471T	GCF_900141925.1	33	30	30	27	22	5339831	5331643	5331643	5288888	5115516	33	690911	55,32	262608	170232	6	12	16,76
<i>Pseudomonas zhaodongensis</i> NEAU-ST5-21T	GCF_003696365.1	17	15	12	11	11	4663246	4658649	4640851	4625484	4625484	20	1820931	59,58	1235615	309980	2	4	0,09
<i>Rugamonas aquatica</i> FT29W	GCF_009380215.1	41	34	33	27	24	7212680	7195303	7186741	7089350	7000463	46	975668	63,79	506213	180823	5	12	1,36
<i>Rugamonas rivuli</i> FT103W	GCF_009380165.1	20	17	16	13	13	6828333	6820412	6815167	6767876	6767876	22	1216902	63,92	808642	468590	4	6	1,35
<i>Rugamonas rubra</i> ATCC 43154T	GCF_900114705.1	81	56	54	39	33	6829625	6775249	6760186	6534768	6314241	82	575274	66,99	208763	135821	10	20	53,66
<i>Stenotrophomonas acidaminiphila</i> JCM13310T	GCA_001431595.1	97	81	69	53	21	3922967	3879269	3789473	3540168	2399815	122	411365	68,81	71728	36534	15	35	0
<i>Stenotrophomonas bentonitica</i> DSM103927T	GCA_013185915.1	9	7	7	5	5	4406737	4398363	4398363	4371499	4371499	12	2475248	66,47	2475248	1003135	1	2	1,95
<i>Stenotrophomonas chelatiphaga</i> DSM21508T	GCA_001431535.1	121	100	86	54	25	3948246	3899190	3786055	3214875	2183055	148	193045	66,84	51682	32914	22	46	0
<i>Stenotrophomonas_daejeonensis</i> _JCM16244	GCA_001431505.1	115	100	81	48	21	3278093	3237269	3099556	2517566	1577099	124	136087	68,56	46611	25867	23	46	0

Stenotrophomonas ginsengisoli DSM24757T	GCA_001431485.1	70	56	51	35	27	3353931	3327532	3296141	3034053	2726721	98	190491	65,89	85121	57875	13	24	0
Stenotrophomonas humi DSM18929T	GCA_001431415.1	61	45	43	36	27	4100451	4076357	4063675	3955157	3612303	92	275573	64,05	171493	74364	10	19	0
Stenotrophomonas indicatrix WS40T	GCA_002750975.1	3	3	2	2	2	4556449	4556449	4551064	4551064	4551064	3	4130972	66,42	4130972	4130972	1	1	0
Stenotrophomonas koreensis DSM17805T	GCA_001431525.1	39	33	29	24	20	3017429	3006619	2980085	2895833	2725309	57	497147	66,11	188329	77257	6	13	0
Stenotrophomonas lactitubi M15T	GCA_002803515.1	4	4	3	3	3	4870119	4870119	4864712	4864712	4864712	4	4195520	65,88	4195520	4195520	1	1	0
Stenotrophomonas maltophilia NCTC10257T	GCA_900186865.1	1	1	1	1	1	5004261	5004261	5004261	5004261	5004261	1	5004261	66,12	5004261	5004261	1	1	0
Stenotrophomonas nitritireducens DSM12575T	GCA_001431425.1	52	43	40	33	24	3953216	3940349	3921449	3824161	3487067	95	322412	68,34	167790	91642	9	17	0
Stenotrophomonas pavanii LMG25348T	GCA_900101175.1	17	17	17	16	16	4424001	4424001	4424001	4407537	4407537	17	743850	67,24	287499	212395	5	9	73,28
Stenotrophomonas pictorum JCM9942T	GCA_001431585.1	74	62	51	39	27	3501122	3471144	3386742	3206350	2777662	84	228205	66,01	89339	53460	13	25	0
Stenotrophomonas rhizophila DSM14405T	GCA_000661955.1	1	1	1	1	1	4648976	4648976	4648976	4648976	4648976	1	4648976	67,3	4648976	4648976	1	1	54,81
Stenotrophomonas terrae DSM18941T	GCA_001431465.1	101	89	76	50	33	4380386	4359539	4272145	3839042	3283280	143	205645	63,89	96150	49388	17	34	0
Stenotrophomonas tumulicola JCM30961T	GCA_014117215.1	25	22	21	21	14	4335669	4328561	4323007	4323007	4075394	25	1276729	65,61	313801	176023	4	8	2,08
Thiopseudomonas denitrificans X2T	GCF_002866065.1	9	9	9	9	8	2841088	2841088	2841088	2841088	2801457	9	812642	58,98	411115	357185	3	5	12,71
Xanthomonas albilineans CFBP2523T	GCA_002939705.1	75	33	29	25	18	3652383	3544115	3517652	3459513	3208507	96	369347	63,06	168122	120200	7	13	3,19
Xanthomonas arboricola CFBP2528T	GCA_001013475.1	8	8	8	8	7	5084477	5084477	5084477	5084477	5051200	8	1301316	65,47	1293571	527807	2	4	21,65
Xanthomonas axonopodis DSM3585T	GCA_001304695.1	281	208	161	61	10	4448305	4274602	3945959	2303034	599050	325	79564	64,48	25955	15531	59	115	0
Xanthomonas bromi LMG947T	GCA_900092025.1	127	91	74	55	31	4836869	4736426	4623593	4290714	3436054	132	220128	64,06	99846	42118	17	36	0
Xanthomonas campestris ATCC33913T	GCA_000007145.1	1	1	1	1	1	5076188	5076188	5076188	5076188	5076188	1	5076188	65,07	5076188	5076188	1	1	0,32
Xanthomonas cassavae CFBP4642T	GCA_000454545.1	3	3	3	2	2	5267596	5267596	5267596	5257164	5257164	7	5197712	65,23	5197712	5197712	1	1	151
Xanthomonas citri LMG9322T	GCA_002018575.1	134	99	79	59	36	5092051	5011599	4871337	4557108	3769089	206	366657	64,64	84312	44008	17	38	0
Xanthomonas codiaei CFBP4690T	GCA_002939785.1	79	62	55	44	35	5031747	4989125	4936151	4750241	4414162	84	358197	66,04	134676	72382	12	25	0,2
Xanthomonas cucurbitae CFBP2542T	GCA_002939885.1	107	73	63	45	29	4390724	4304957	4235861	3937886	3411807	130	263151	65,45	105102	56526	15	28	2,66
Xanthomonas cynarae CFBP4188T	GCA_002939985.1	78	61	55	49	33	5046659	5002350	4957691	4843681	4256967	86	295703	63,72	145505	69186	13	26	1,5
Xanthomonas dyei CFBP7245T	GCA_002939865.1	109	87	71	55	36	5294912	5241176	5130792	4873973	4232876	122	583700	64,28	112759	56662	15	32	0,75
Xanthomonas euvesicatoria LMG27970T	GCA_001401555.1	743	336	147	12	0	4713027	3669779	2315809	378691	0	989	42983	64,63	9423	5059	160	334	0

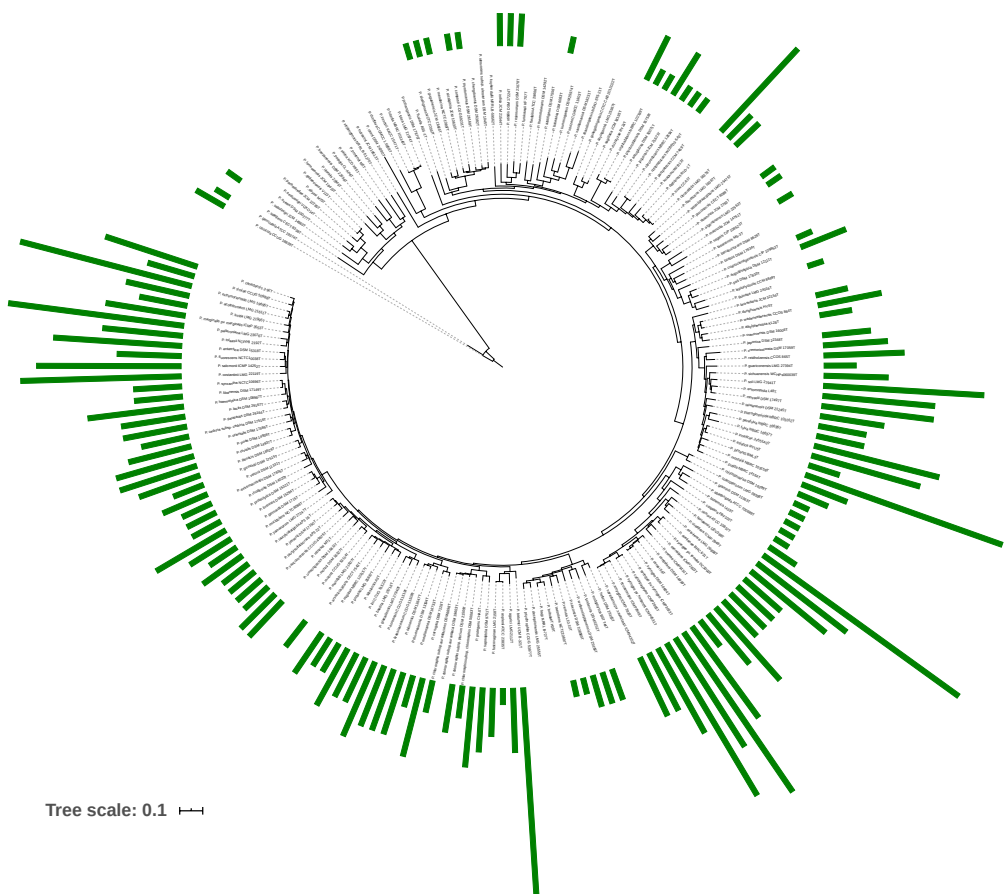
Xanthomonas floridensis WHRI8848T	GCA_001642575.1	58	44	41	38	31	5254357	5220845	5200743	5160980	4883866	58	342870	65,37	150157	117781	12	22	0
Xanthomonas hyacinthi CFBP1156T	GCA_009769165.1	2	2	2	2	1	4963026	4963026	4963026	4963026	4918645	2	4918645	68,03	4918645	4918645	1	1	0
Xanthomonas maliensis LMG27592T	GCA_009192945.1	115	92	83	60	35	5178709	5111961	5044689	4648823	3661175	141	265116	66,18	77591	46293	19	41	0
Xanthomonas nasturtii WHRI8853T	GCA_001660815.1	89	72	63	53	35	4873681	4841738	4781760	4592020	3930877	89	193439	64,47	101995	64856	16	31	0,04
Xanthomonas oryzae ICMP3125T	GCA_004136375.1	1	1	1	1	1	4990672	4990672	4990672	4990672	4990672	1	4990672	63,69	4990672	4990672	1	1	0
Xanthomonas perforans DSM18975T	GCA_013112235.1	3	3	3	2	2	5034532	5034532	5034532	5015717	5015717	3	4914073	64,91	4914073	4914073	1	1	0
Xanthomonas pisi DSM18956T	GCA_001010415.1	122	86	74	57	29	4157519	4087637	3999845	3710435	2684009	179	191614	64,9	66696	38711	20	40	0,67
Xanthomonas populi CFBP1817T	GCA_002940065.1	288	201	138	57	11	4281755	4058342	3601032	2315629	714821	334	89355	63,33	27362	13776	51	107	5,15
Xanthomonas prunicola CFBP8353T	GCA_002846205.1	65	32	28	18	15	5304559	5228529	5193541	5034968	4942243	77	1428588	63,97	767534	161146	3	6	0,11
Xanthomonas sacchari CFBP4641T	GCA_002940085.1	39	34	32	28	23	4908626	4894930	4879962	4830112	4630210	47	482729	69,06	222197	161222	8	14	0,12
Xanthomonas theicola CFBP4691T	GCA_014236795.1	2	2	2	2	1	4785596	4785596	4785596	4785596	4744641	2	4744641	68,17	4744641	4744641	1	1	0
Xanthomonas translucens DSM18974T	GCA_000331775.1	535	289	153	27	1	4450441	3785486	2837670	952582	55714	551	55714	67,68	13041	6901	100	215	0,02
Xanthomonas vasicola CFBP2543T	GCA_002939925.1	95	74	64	45	34	4903118	4855410	4781250	4461706	4051475	110	329505	63,32	135782	60383	13	28	0,12
Xanthomonas vesicatoria LMG911T	GCA_001908725.1	3	3	3	3	2	5349905	5349905	5349905	5349905	5302721	3	5110163	64,06	5110163	5110163	1	1	0

**Anexo II.** Árboles filogenéticos de los 194 genomas de *Pseudomonas* de este trabajo representando la distribución de algunos de los tipos de BGCs mayoritarios

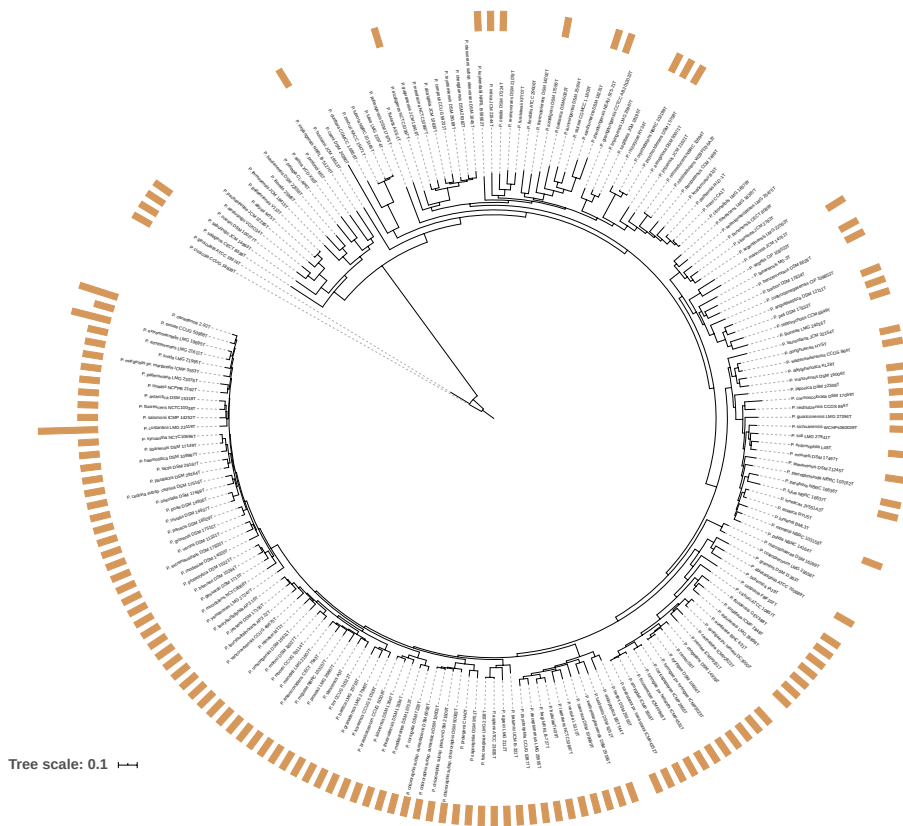
Árbol filogenético de los 194 genomas de *Pseudomonas*. Las barras azules representan el número de BGCs del tipo bacteriocina. Bar, 1 sustitución por posición.



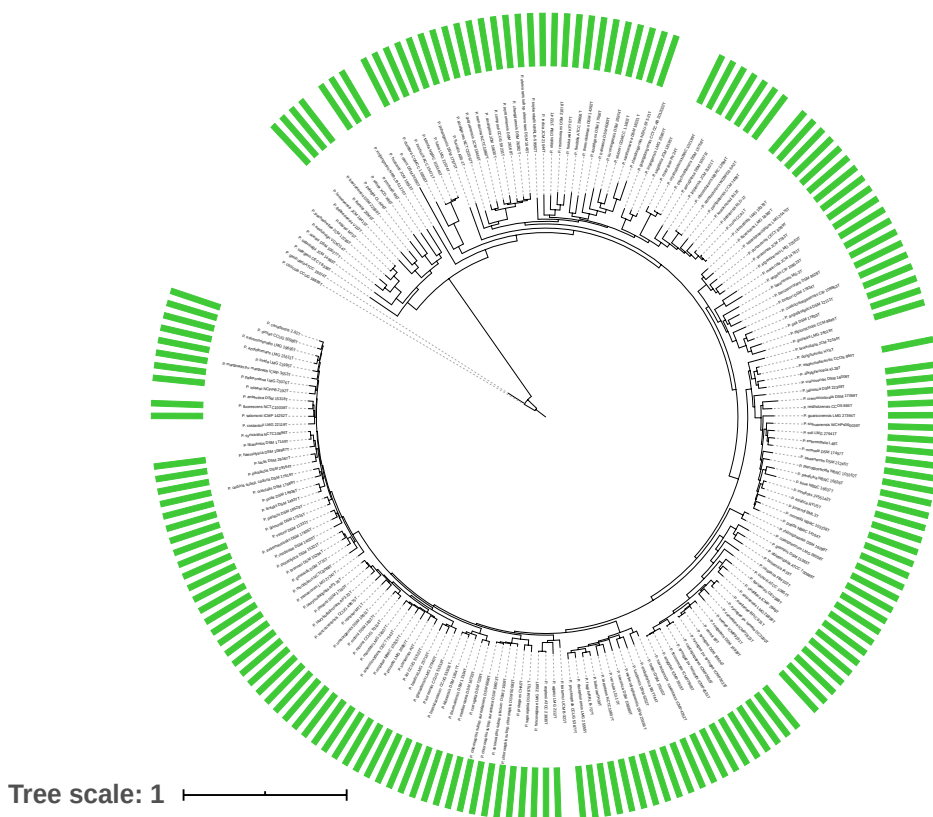
Árbol filogenético de los 194 genomas de *Pseudomonas*. Las barras verdes representan el número de BGCs del tipo NRPS. Bar, 0,1 sustituciones por posición.



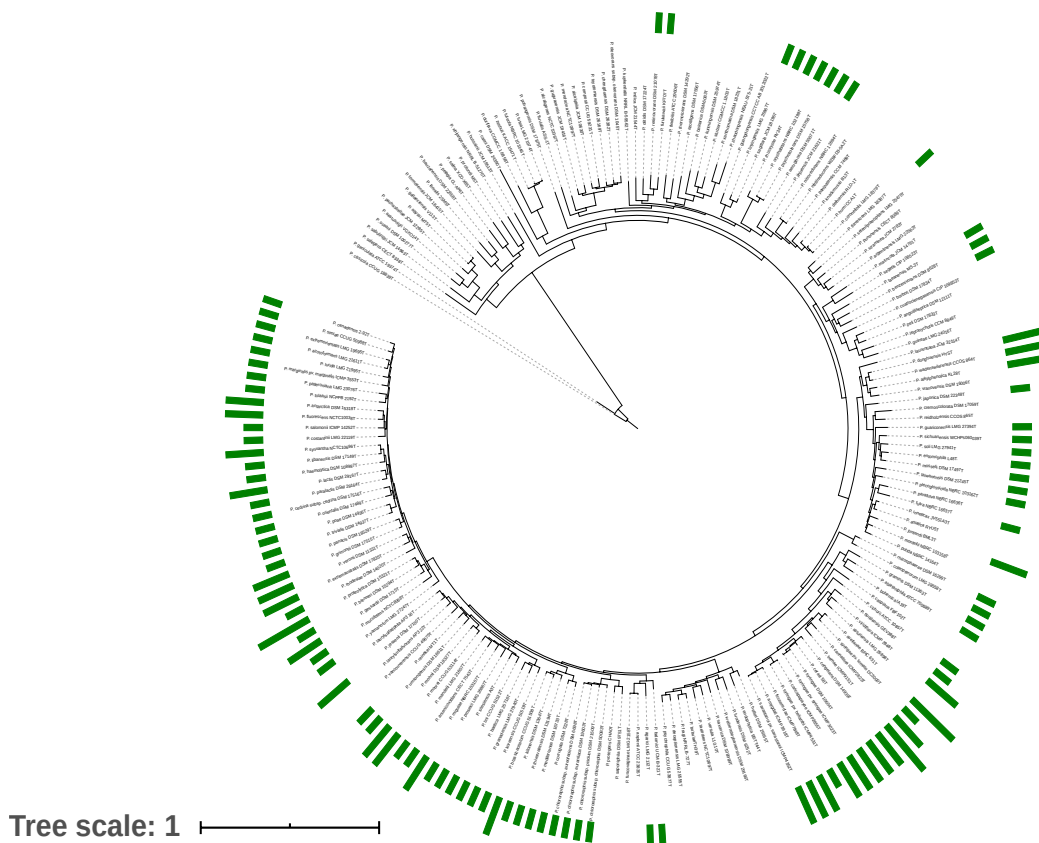
Árbol filogenético de los 194 genomas de *Pseudomonas*. Las barras marrones representan el número de BGCs del tipo arilpolieno. Bar, 0,1 sustituciones por posición.



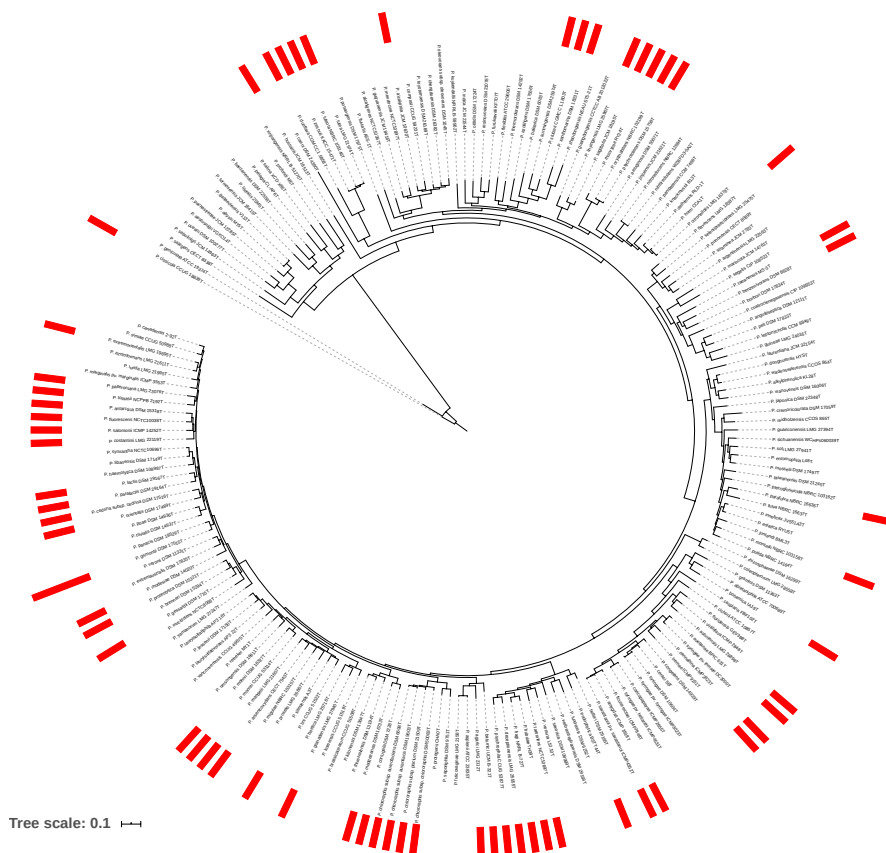
Árbol filogenético de los 194 genomas de *Pseudomonas*. Las barras verdes representan el número de BGCs del tipo NAGGN. Bar, 1 sustitución por posición.



Árbol filogenético de los 194 genomas de *Pseudomonas*. Las barras verdes representan el número de BGCs del tipo NRPS-like. Bar, 1 sustitución por posición.

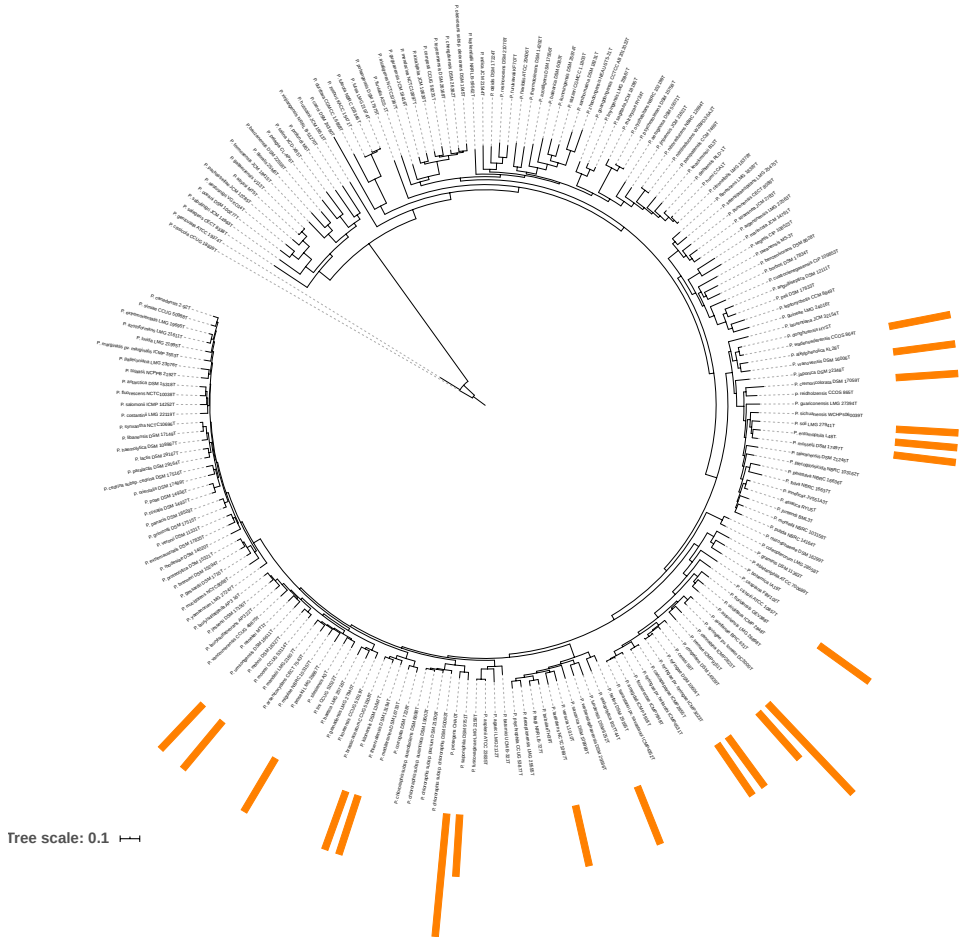


Árbol filogenético de los 194 genomas de *Pseudomonas*. Las barras rojas representan el número de BGCs del tipo sideróforo. Bar, 1 sustitución por posición.





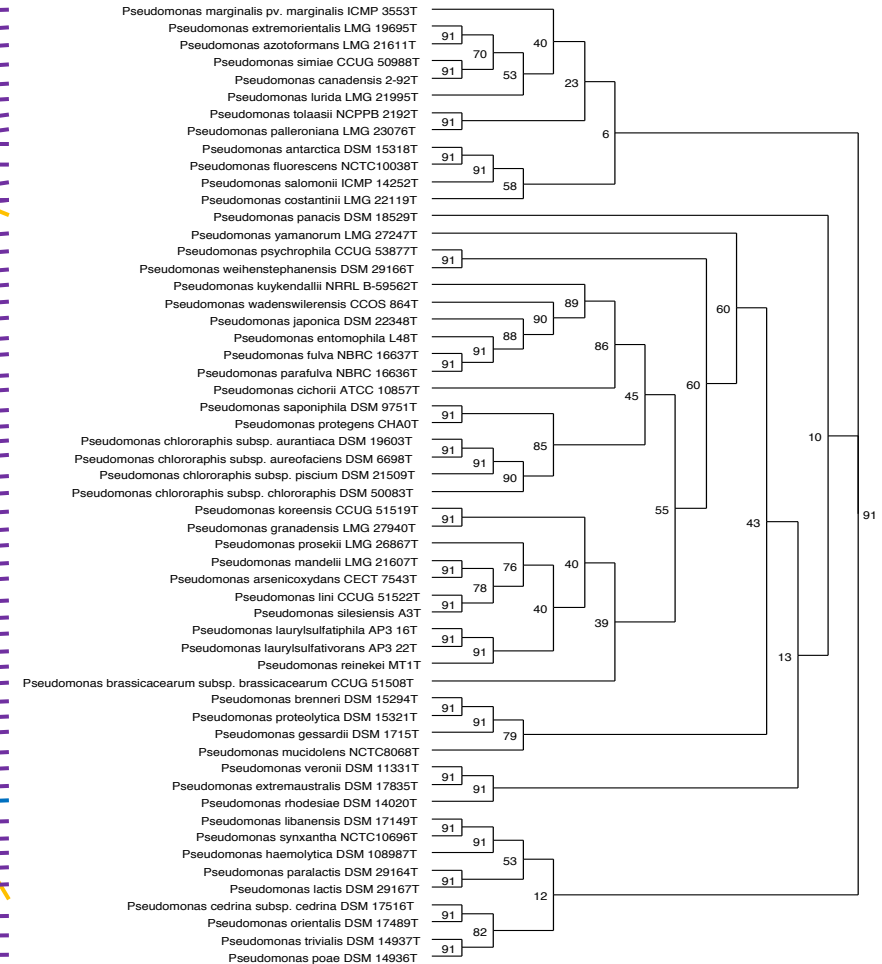
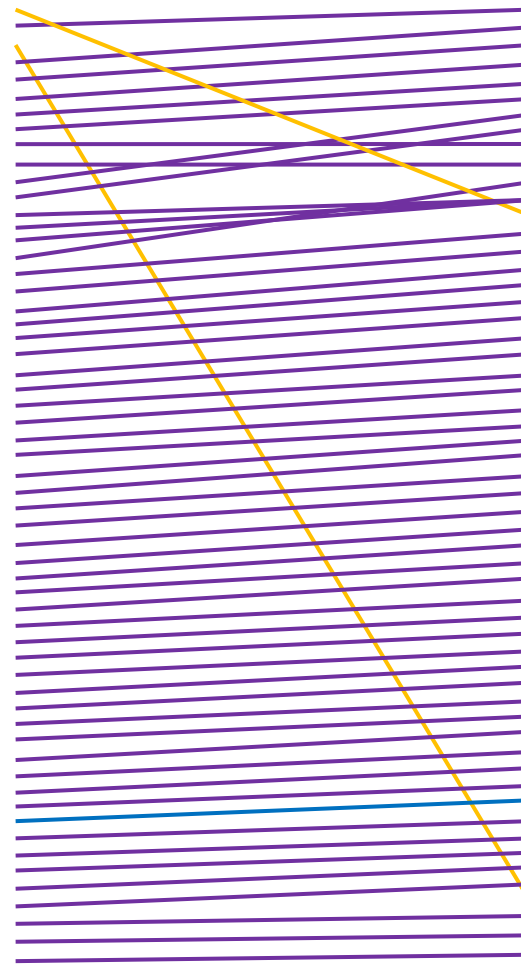
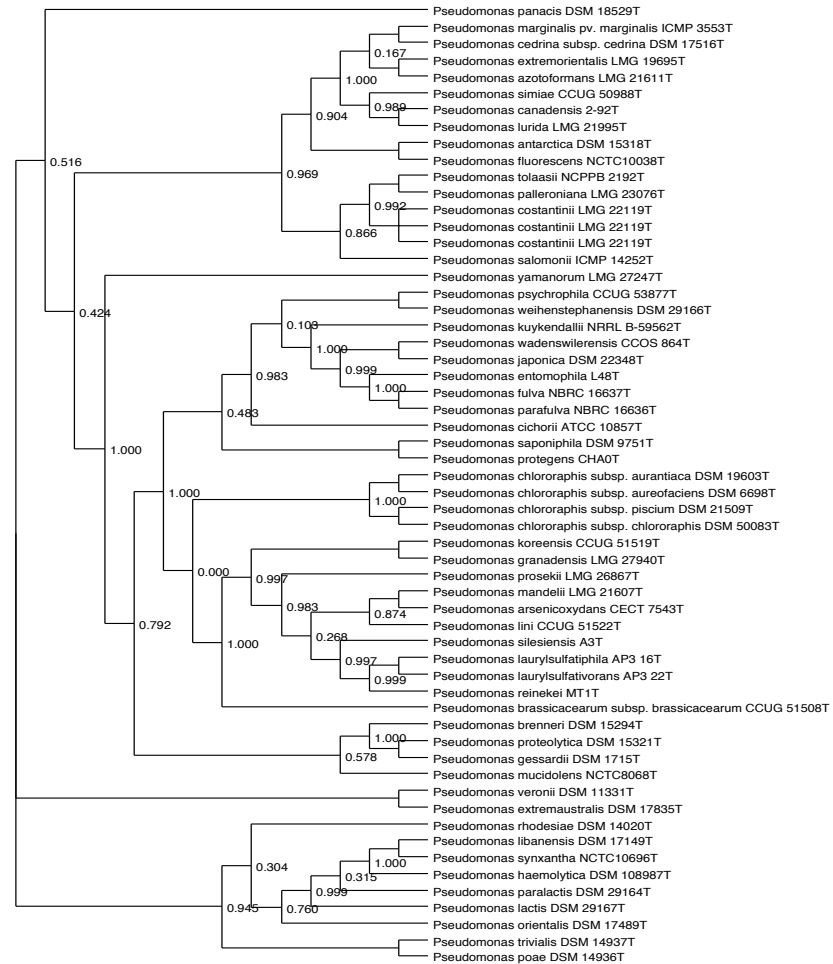
Árbol filogenético de los 194 genomas de *Pseudomonas*. Las barras naranjas representan el número de BGCs del tipo PKSs. Bar, 1 sustitución por posición.



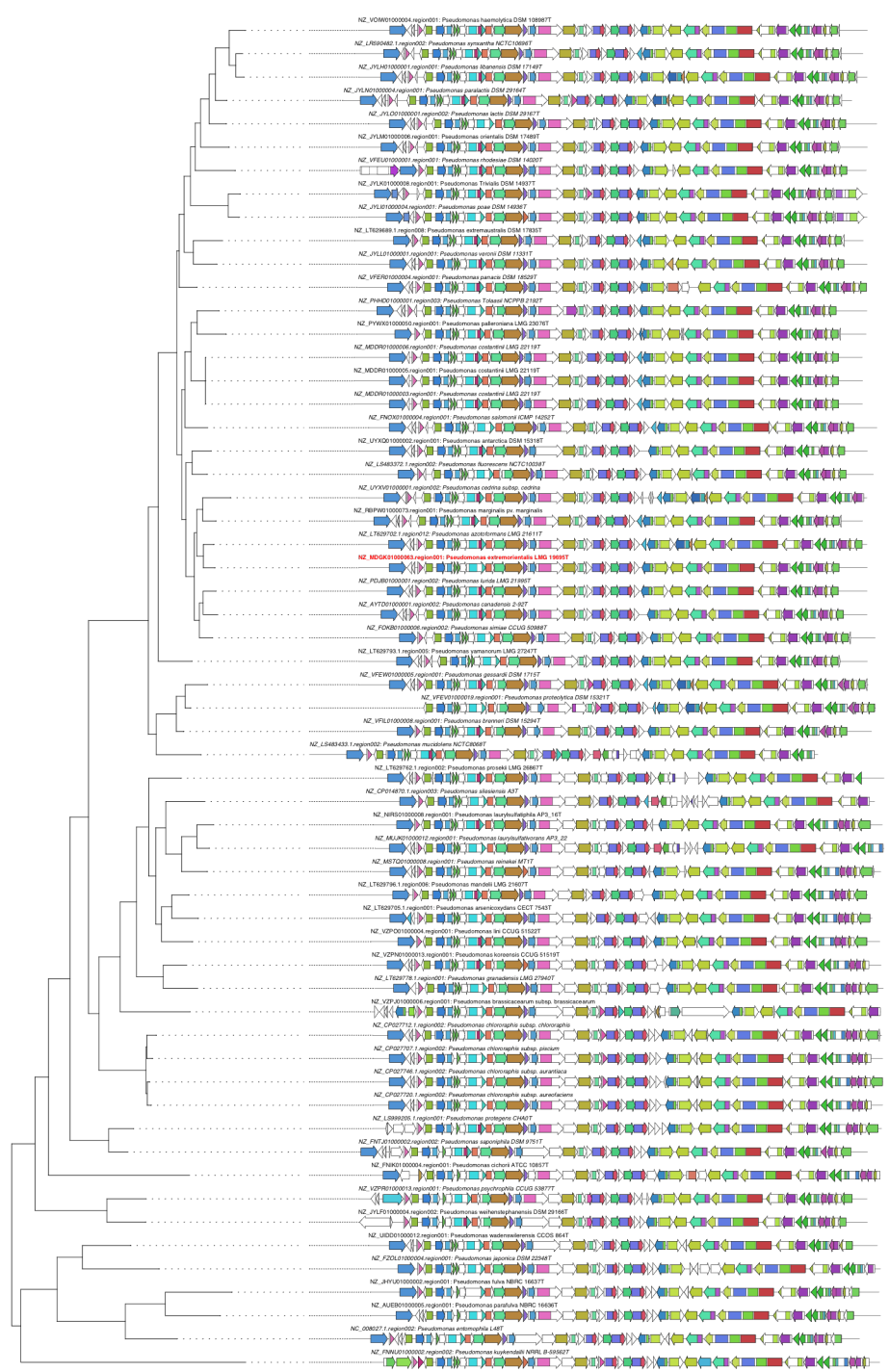
**Anexo III: Árboles filogenéticos de las GCFs mayoritarias.** Primero, se presentan los tanglegramas de los árboles de las GCFs (izquierda) con los árboles filogenéticos (construidos con UBCG; derecha). Las líneas moradas simbolizan co-evolución; las líneas naranjas, reordenamientos evolutivos; las líneas azules, reordenamientos leves. Después de cada tanglegrama se presenta el árbol de la GCF correspondiente con sus diagramas genéticos de los BGCs que la componen.

FAM\_03070

Tipo de BGC: Arilpolieno

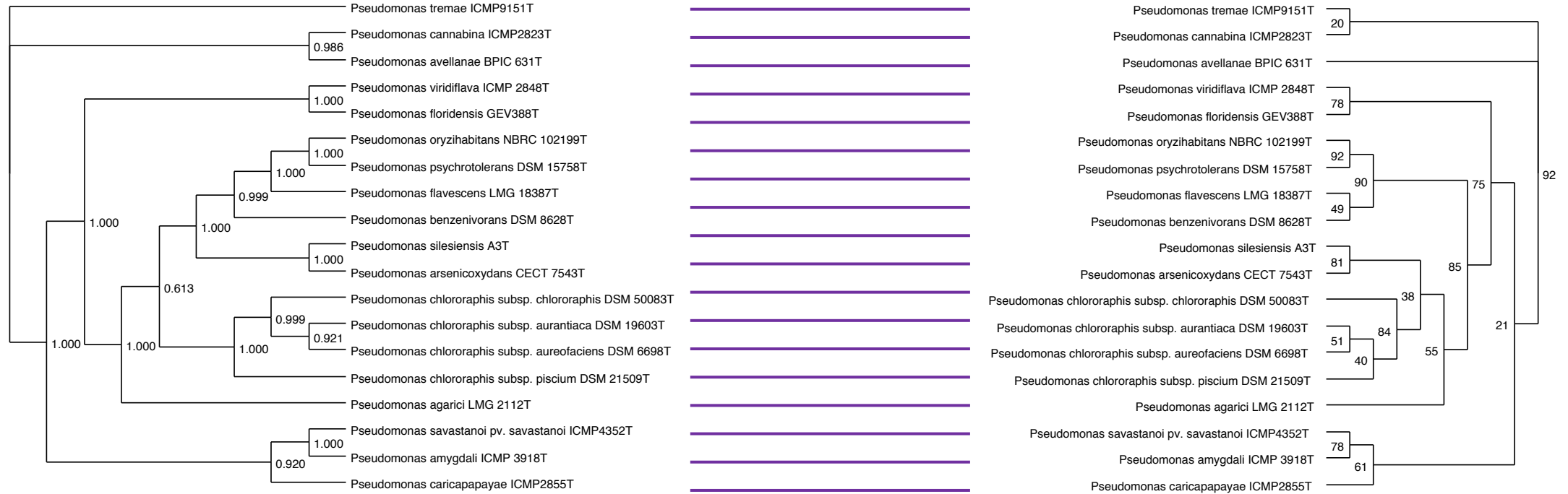


FAM\_03070  
Tipo de BGC: Arilpolieno



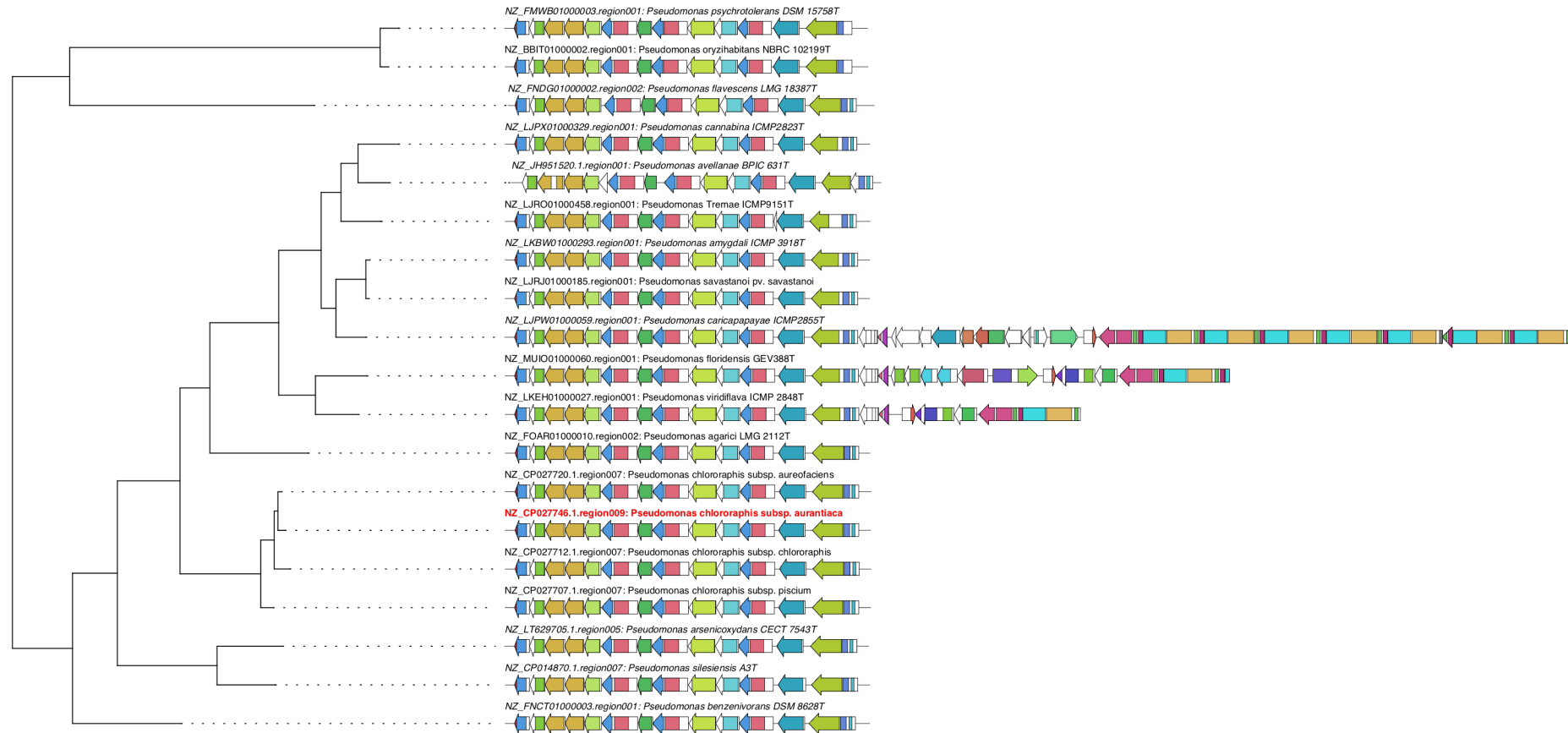
FAM\_02041

Tipo de BGC: Sideróforo



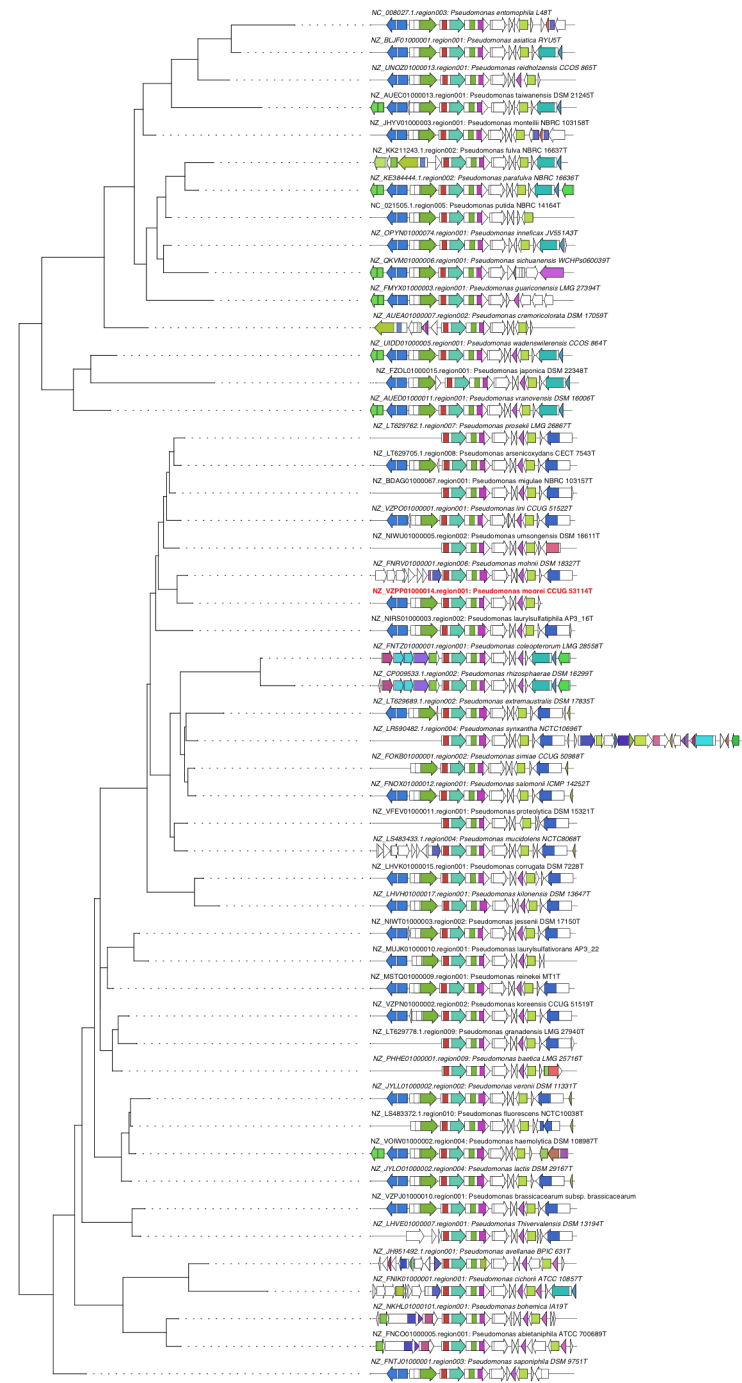
FAM\_02041

Tipo de BGC: Sideróforo



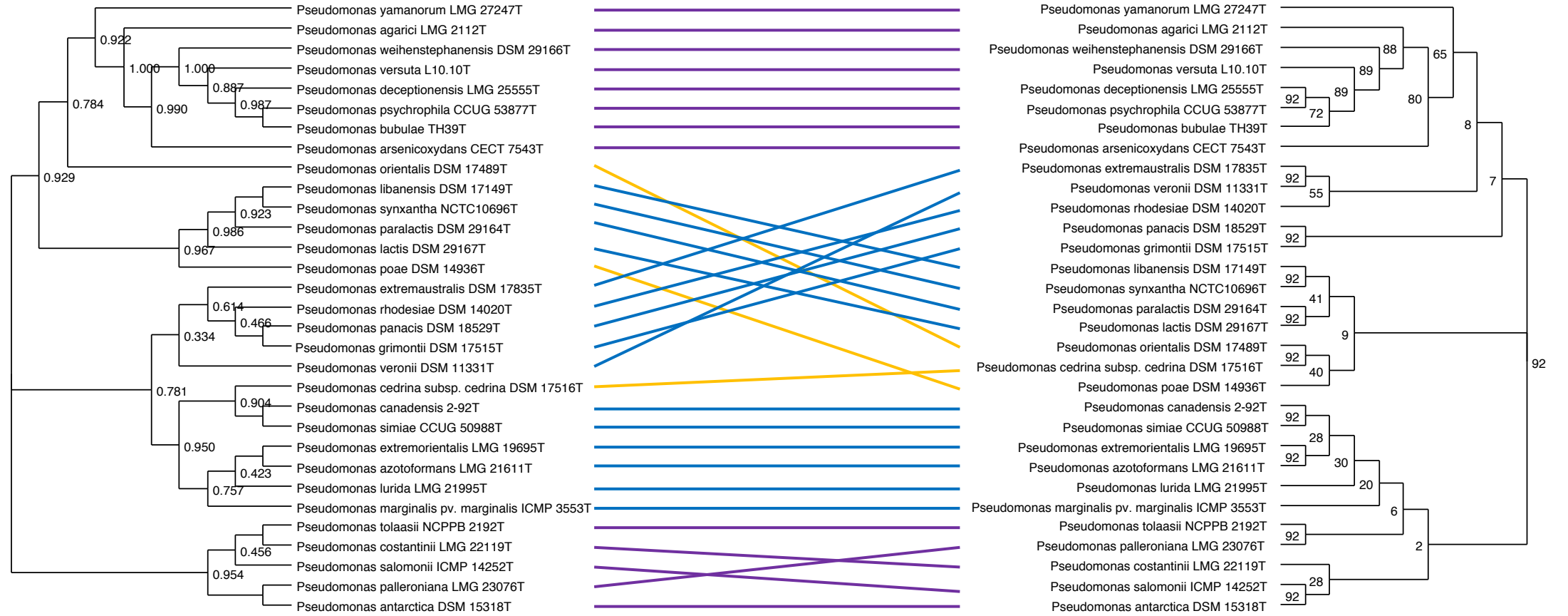


FAM\_03495  
Tipo de BGC: NAGGN



FAM\_02294

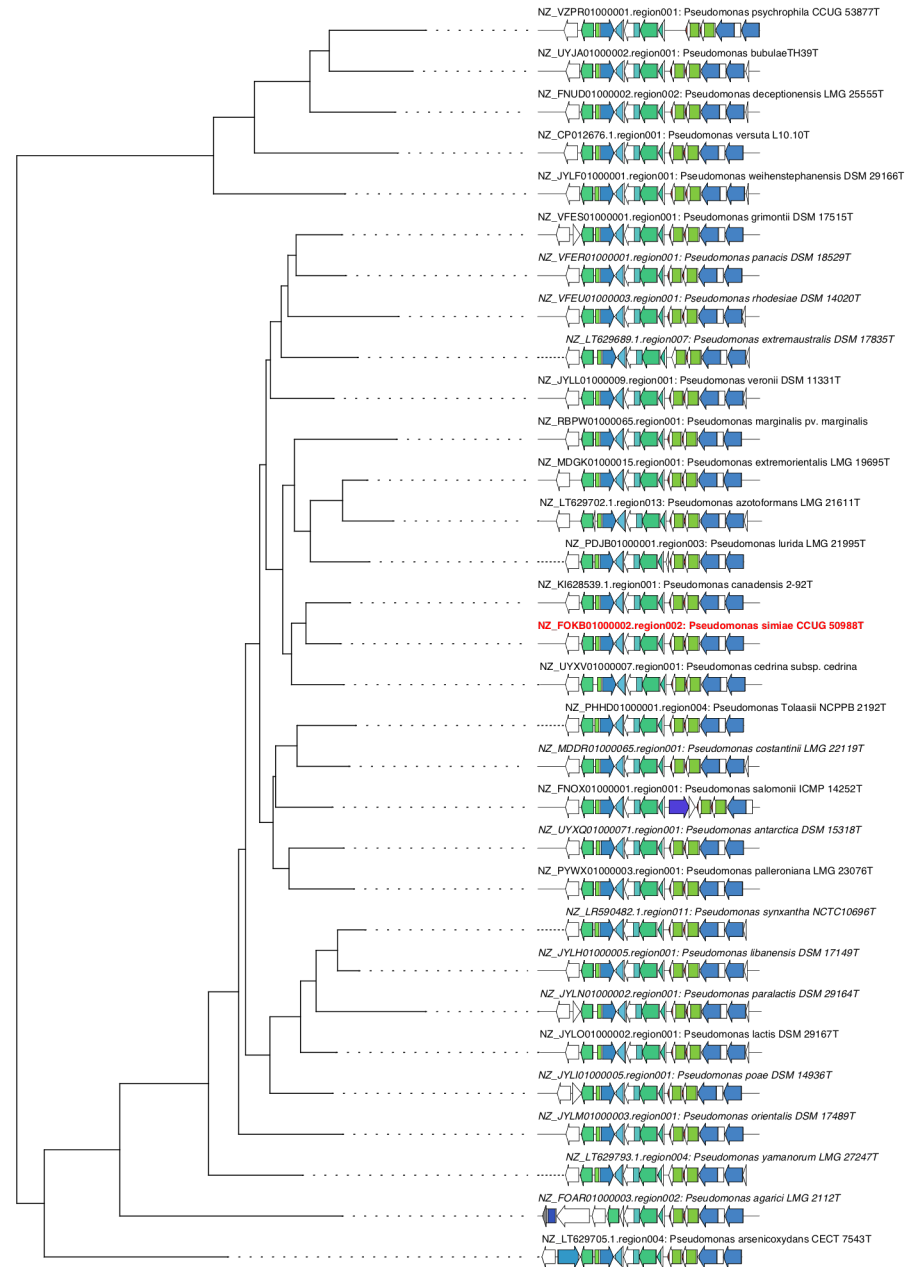
Tipo de BGC: Bacteriocina

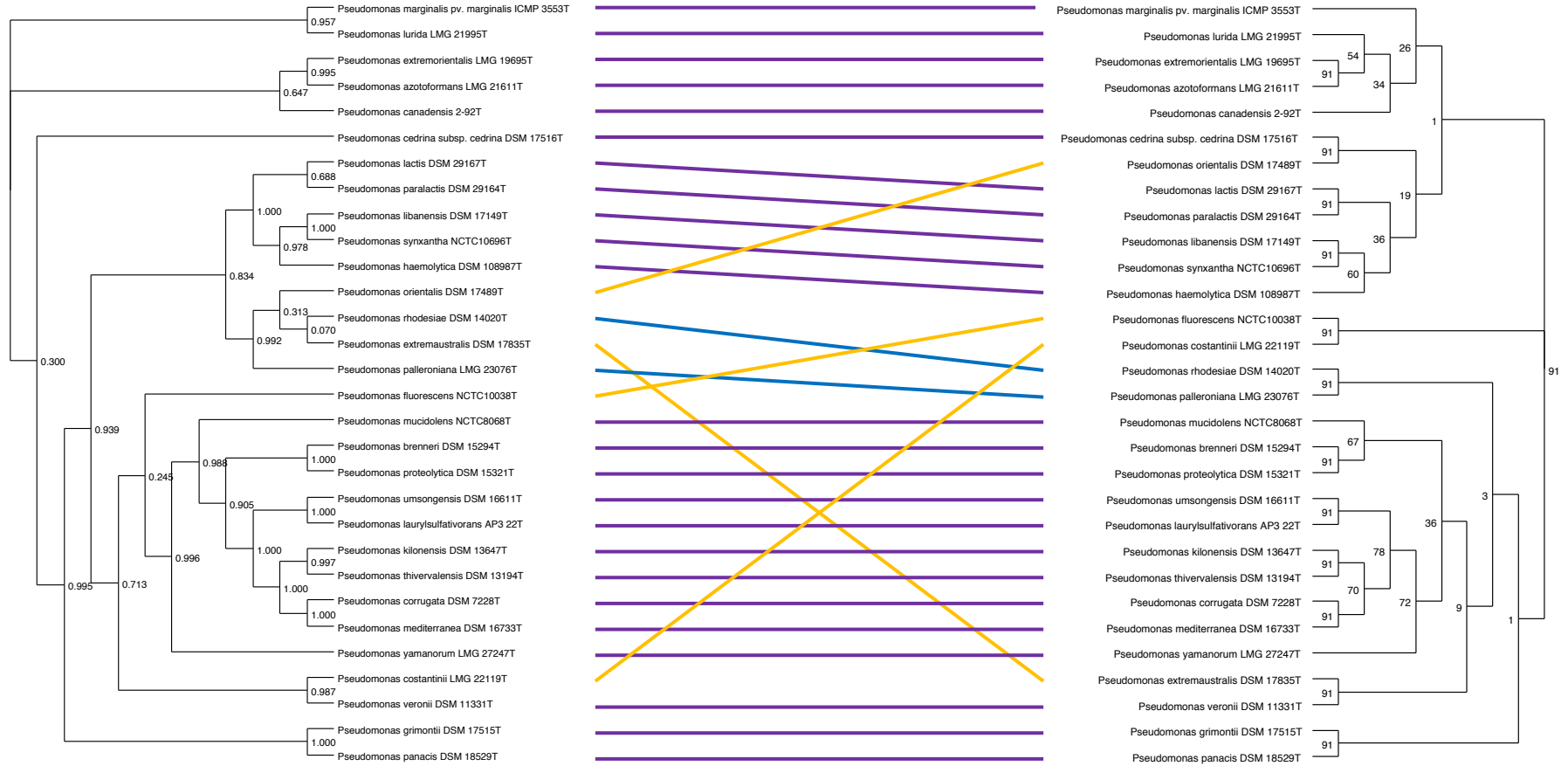




FAM\_02294

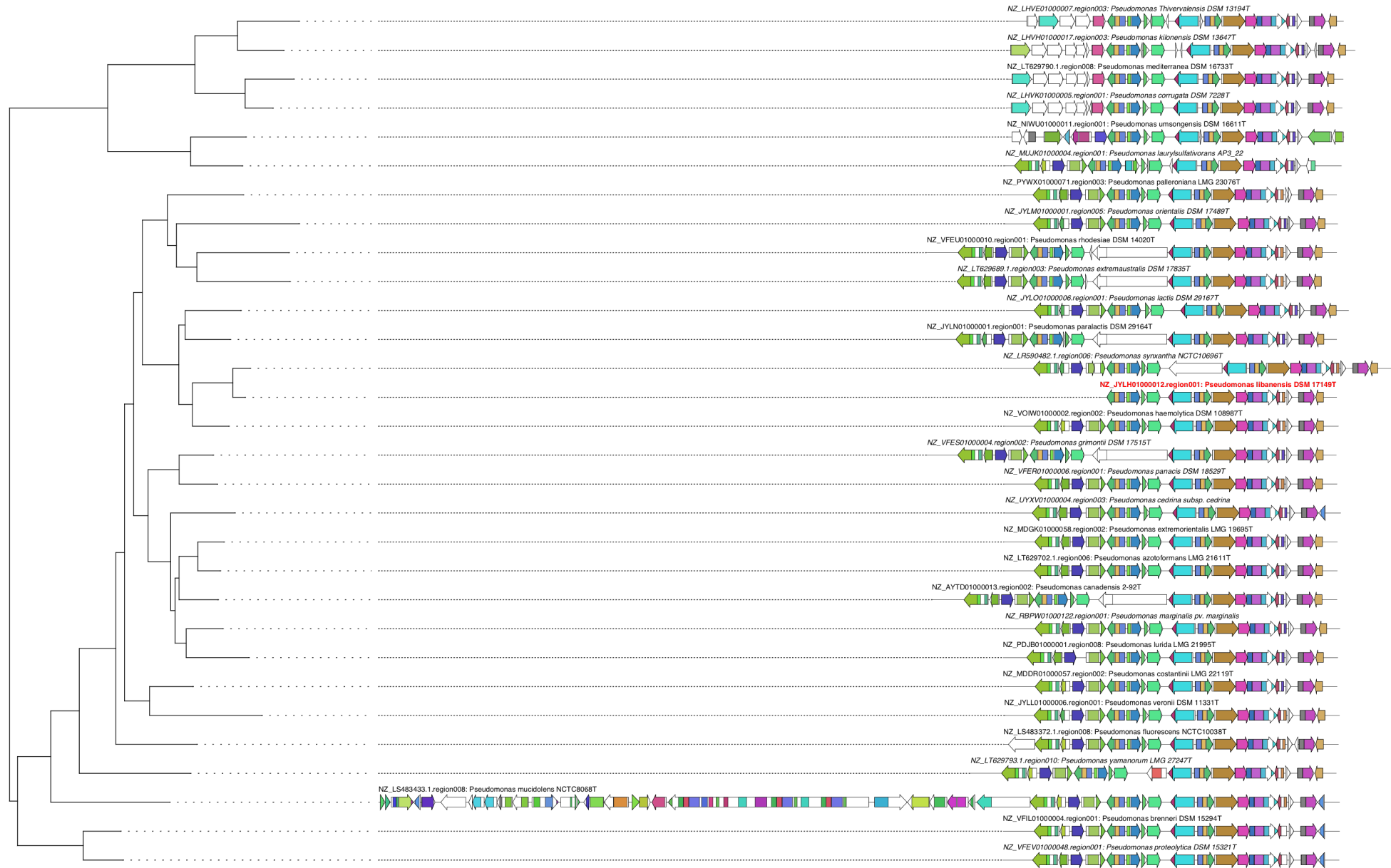
Tipo de BGC: Bacteriocina



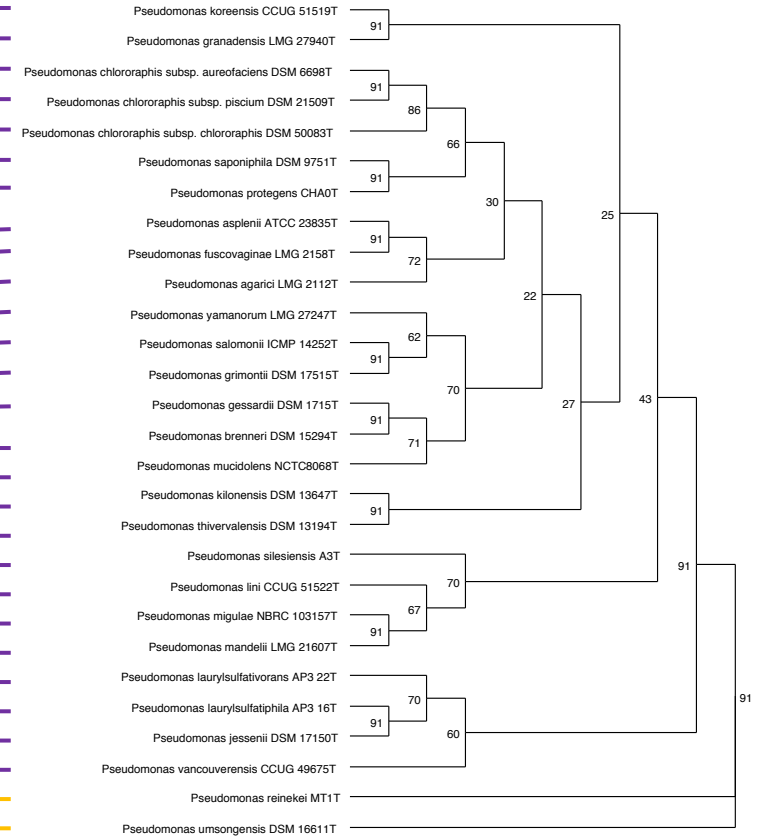
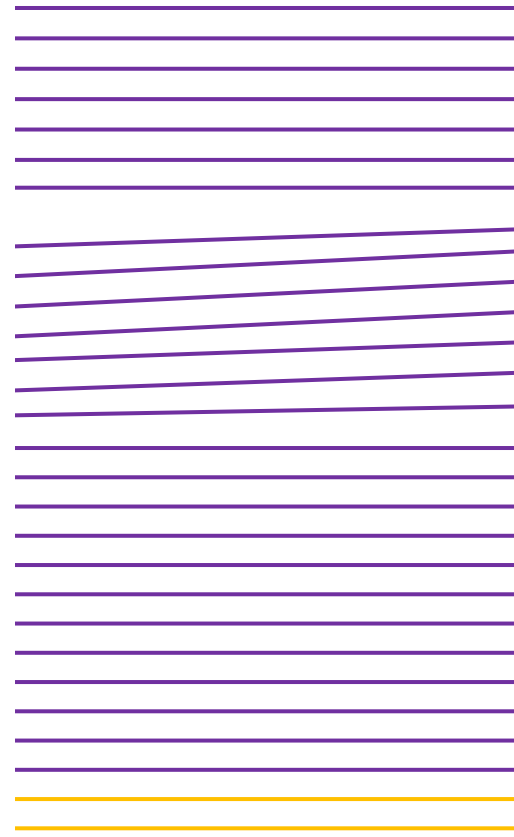
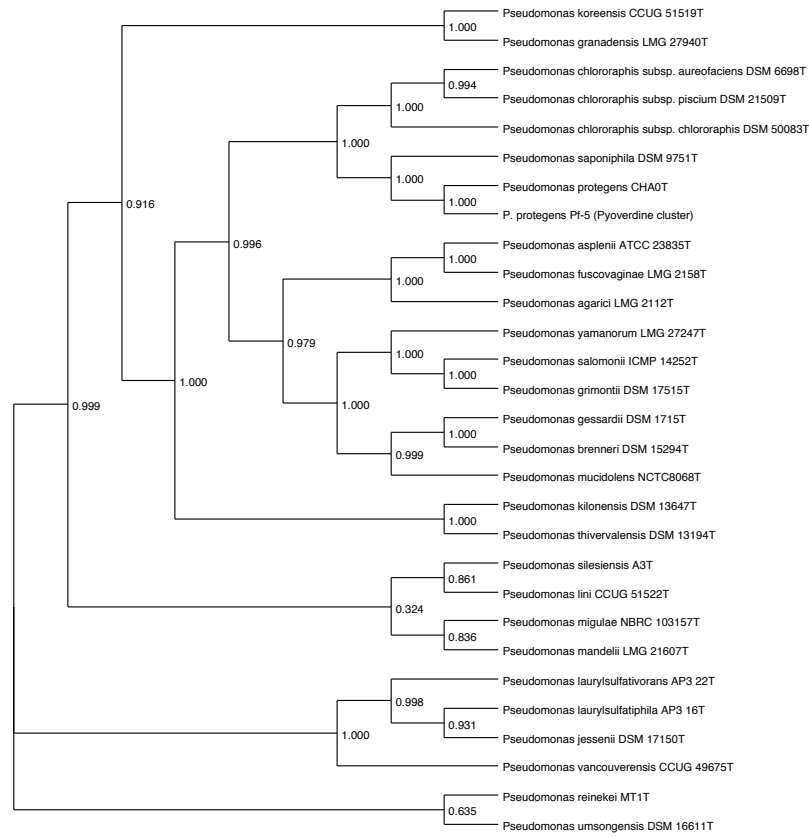


FAM\_02538

Tipo de BGC: Betalactona

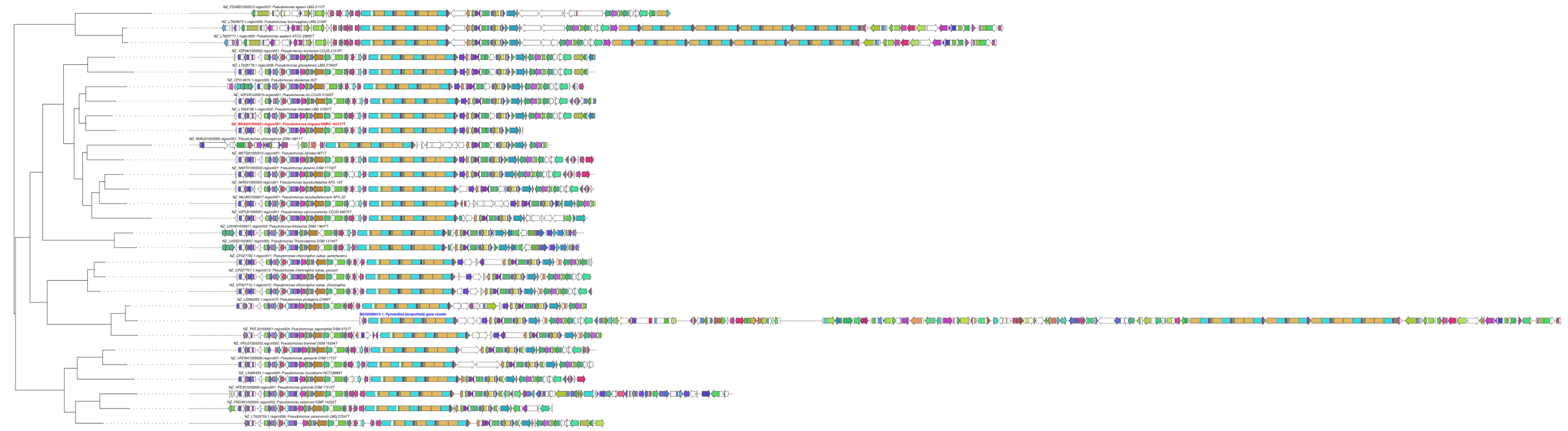


FAM\_01909  
Tipo de BGC: NRPS



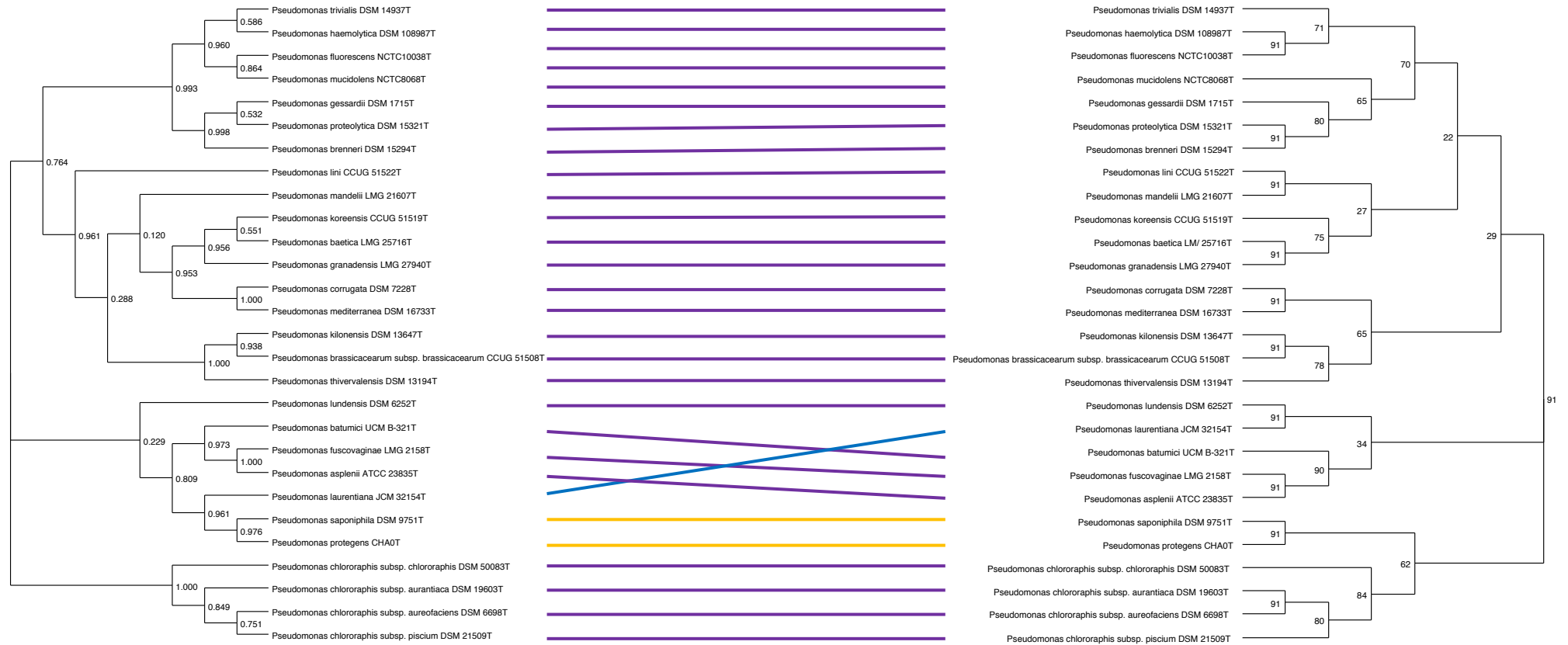
# FAM\_01909

Tipo de BGC: NRPS



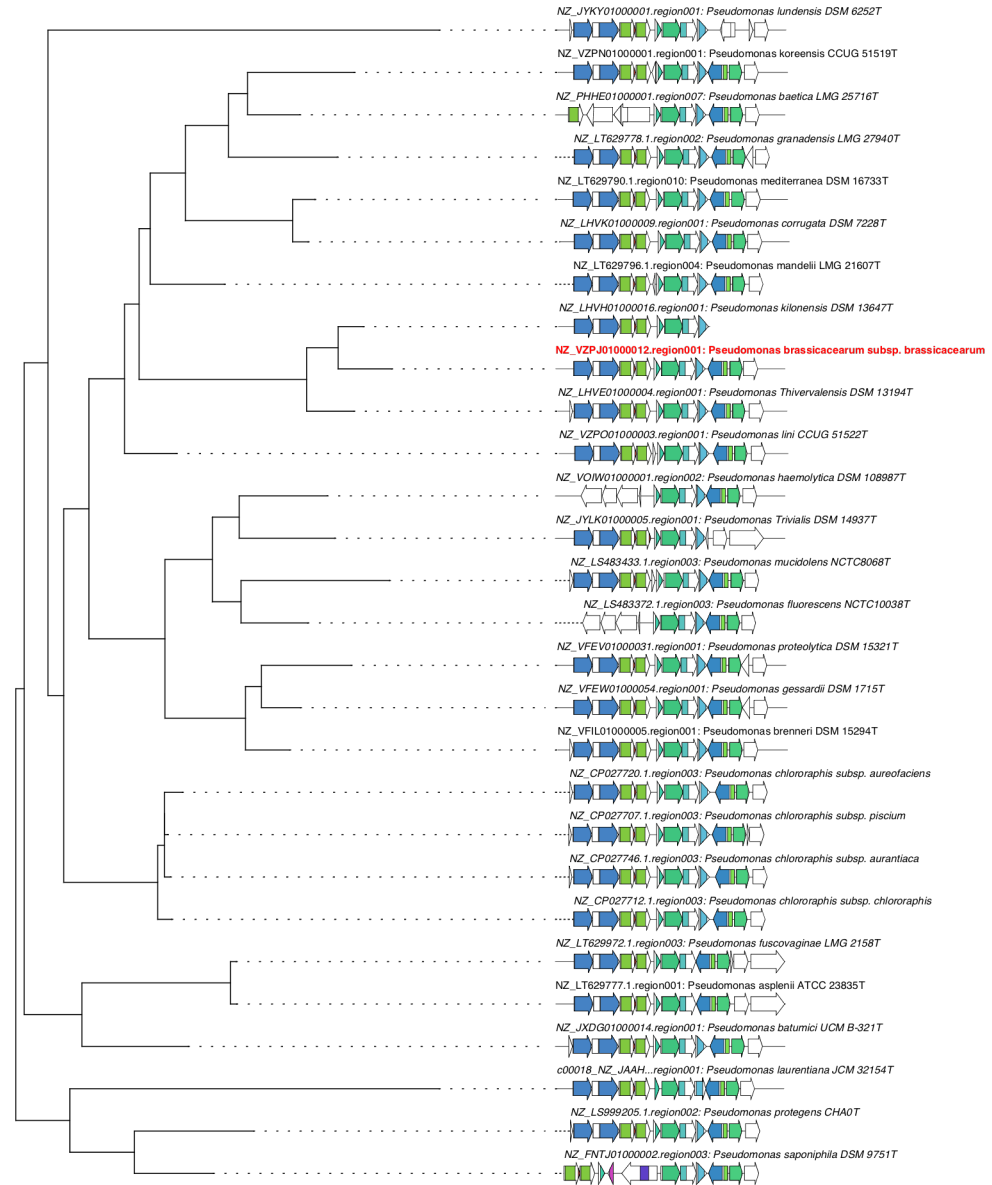
FAM\_03455

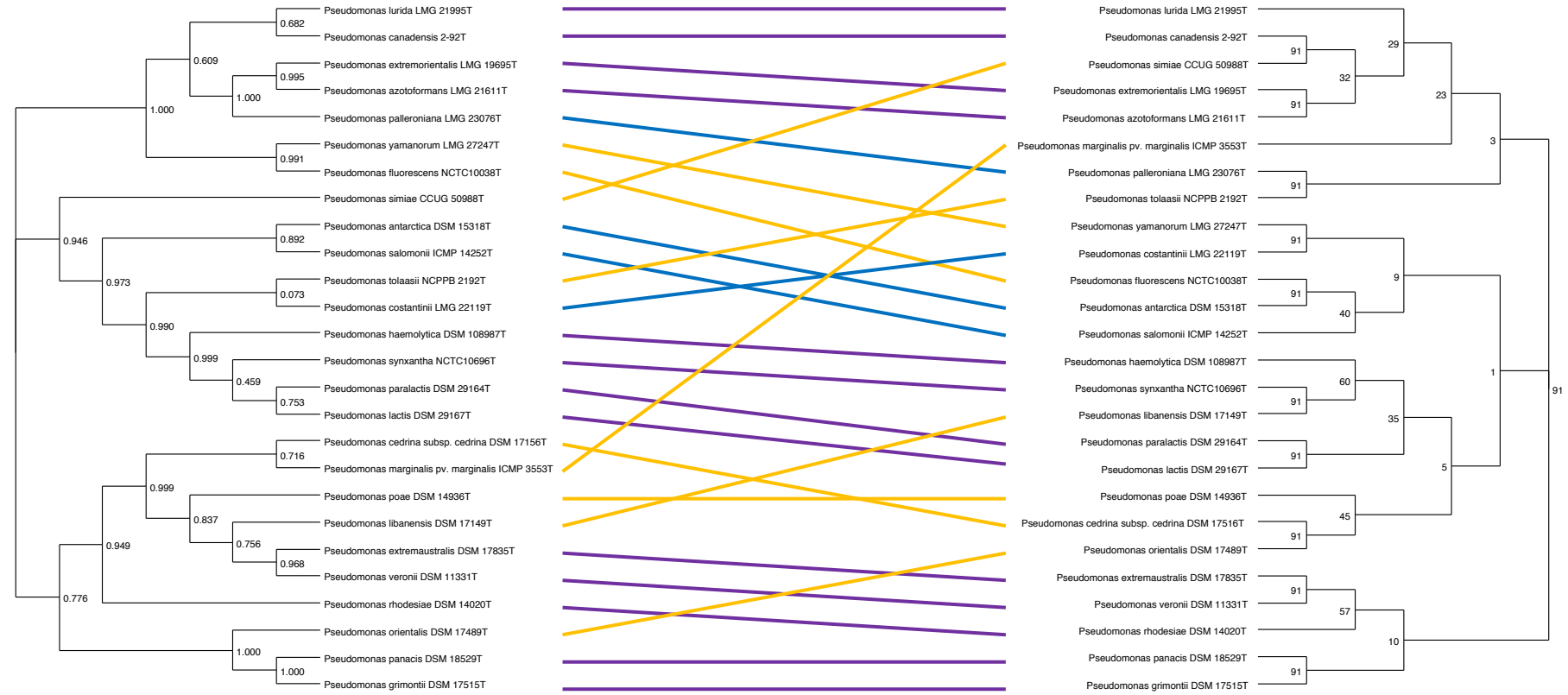
Tipo de BGC: Bacteriocina



FAM\_03455

Tipo de BGC: Bacteriocina

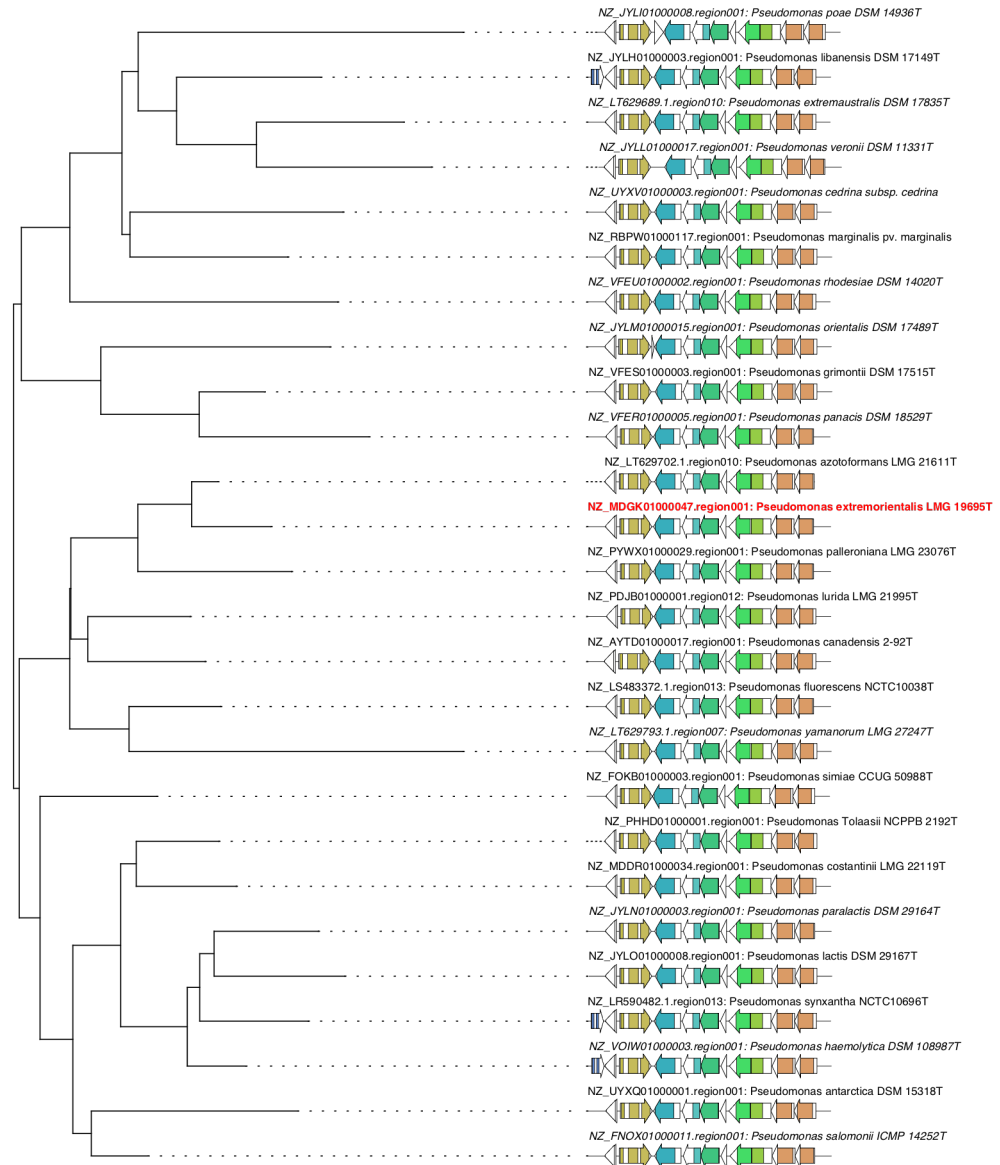






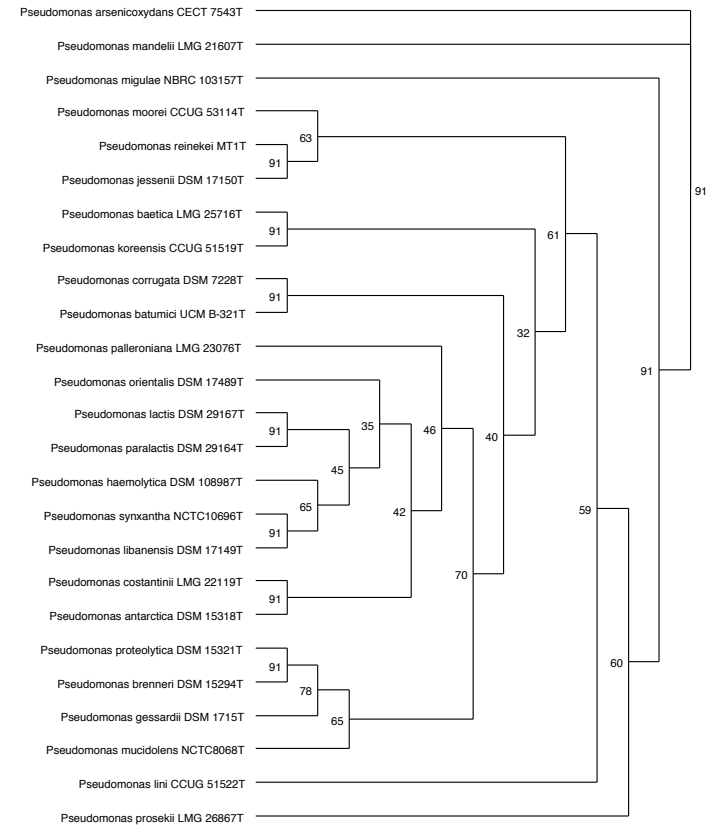
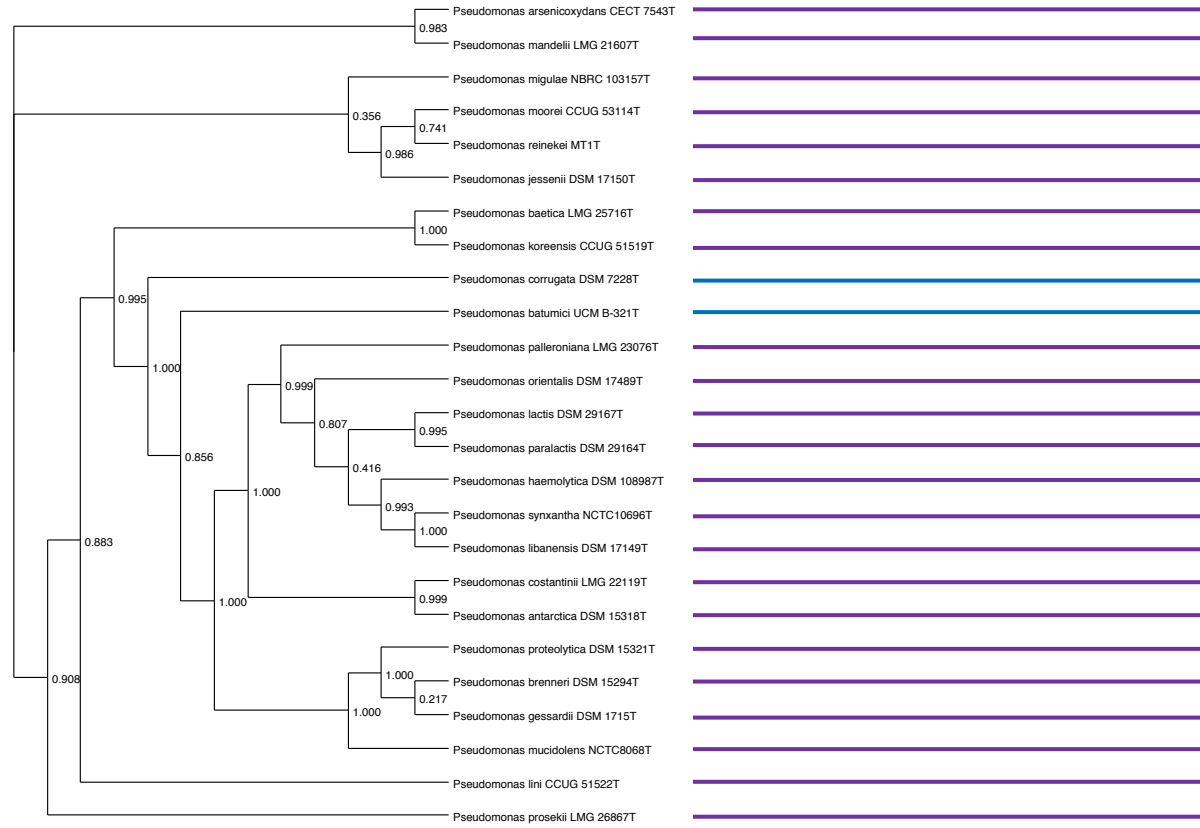
FAM\_03064

Tipo de BGC: Bacteriocina



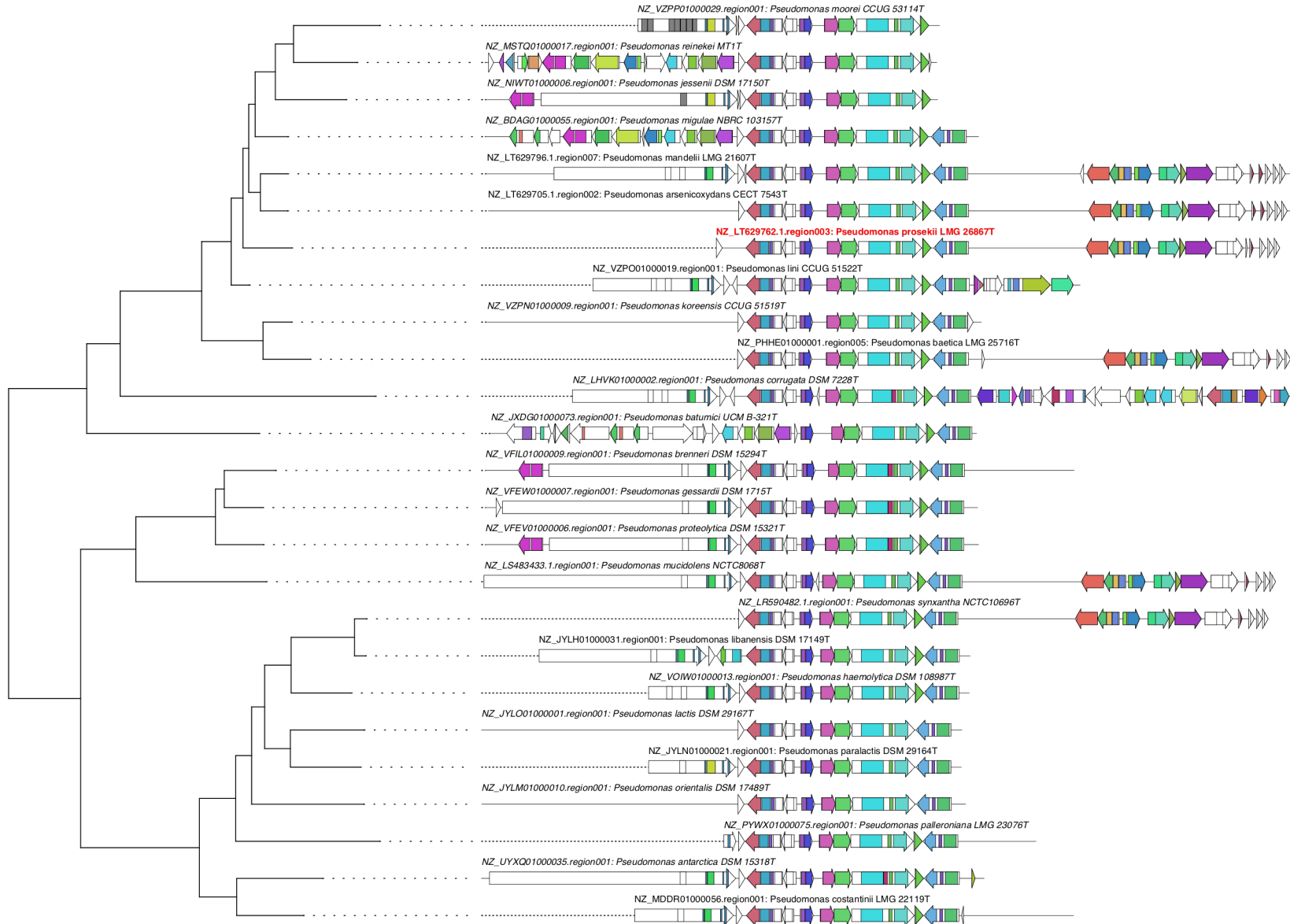
FAM\_02938

Tipo de BGC: NRPS-like



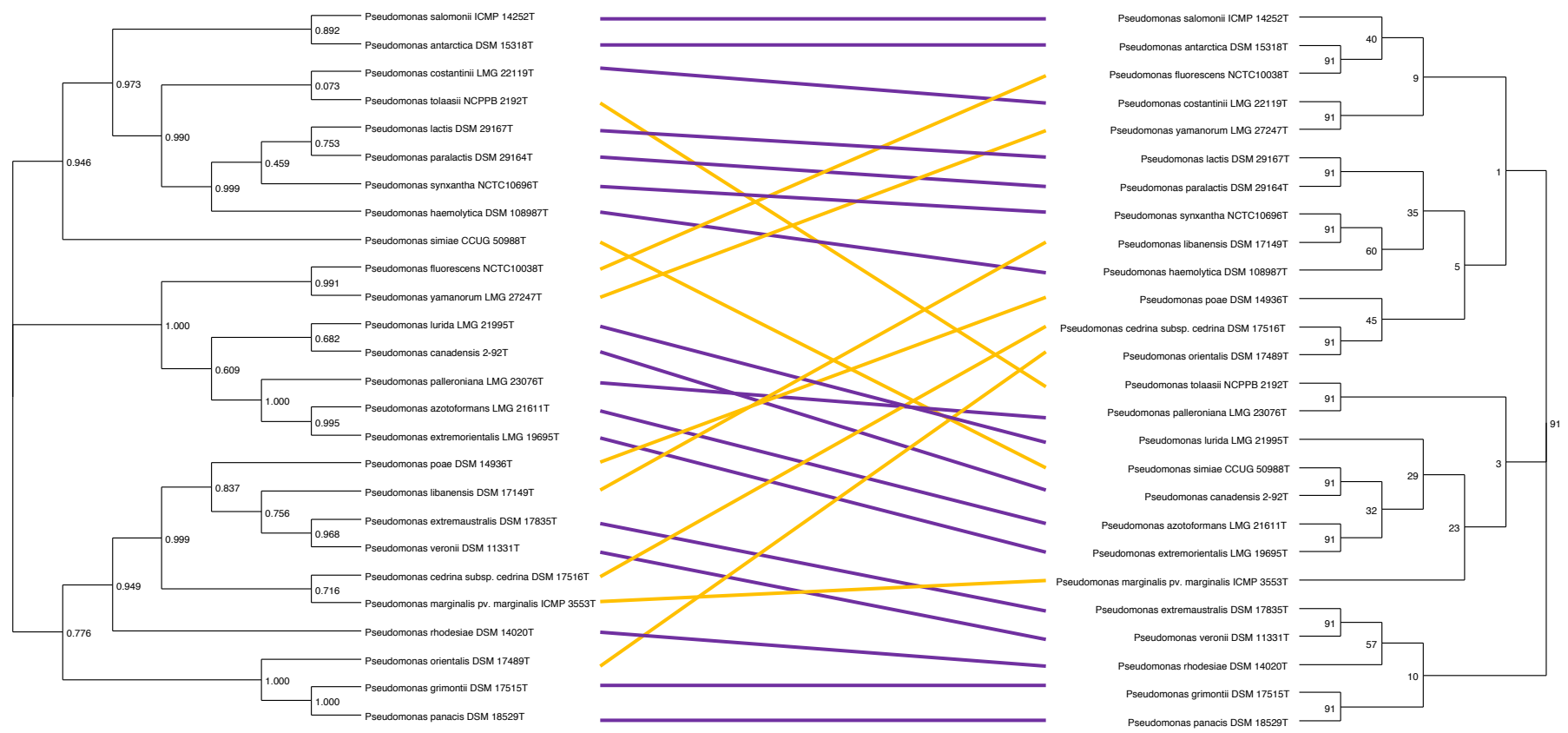
FAM\_02938

Tipo de BGC: NRPS-like



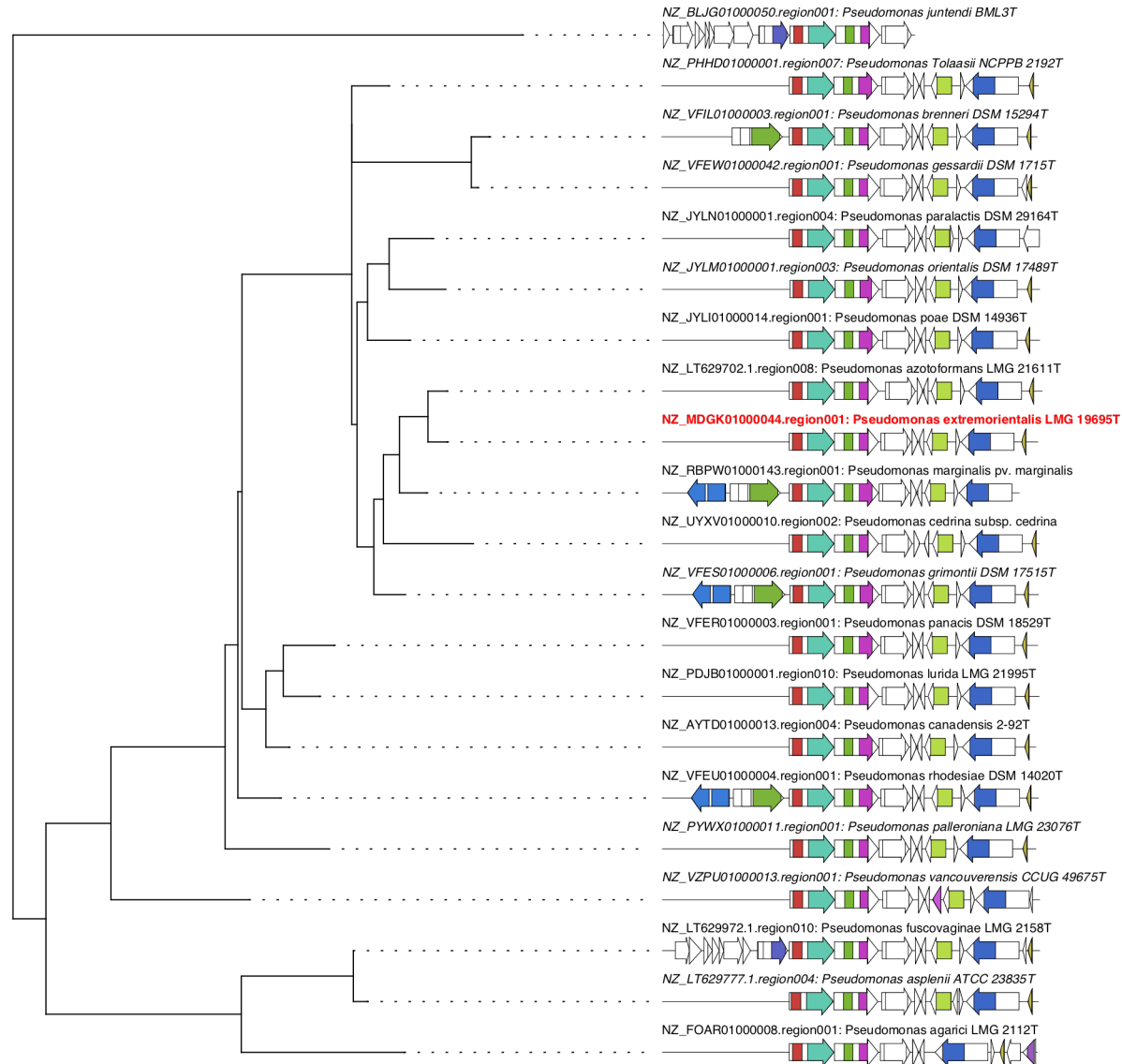
FAM\_03061

Tipo de BGC: Bacteriocina



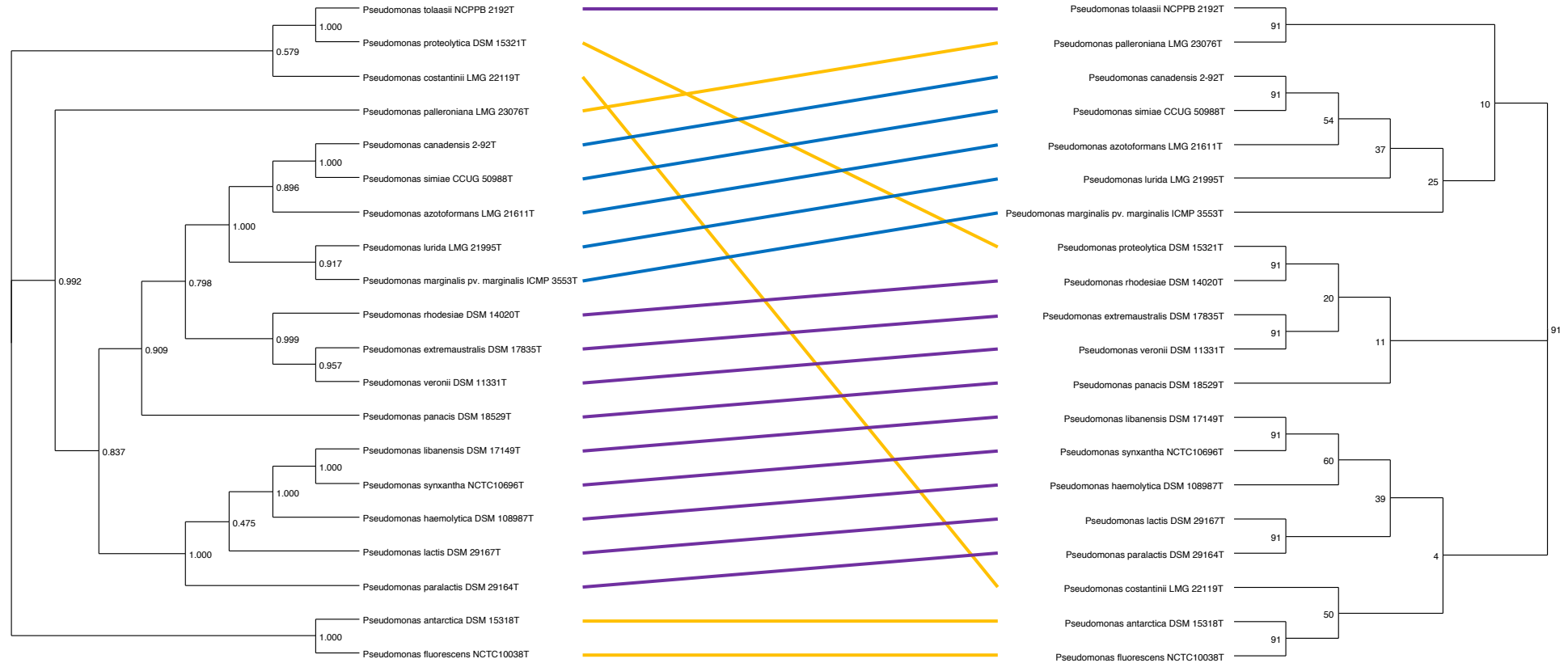
FAM\_03061

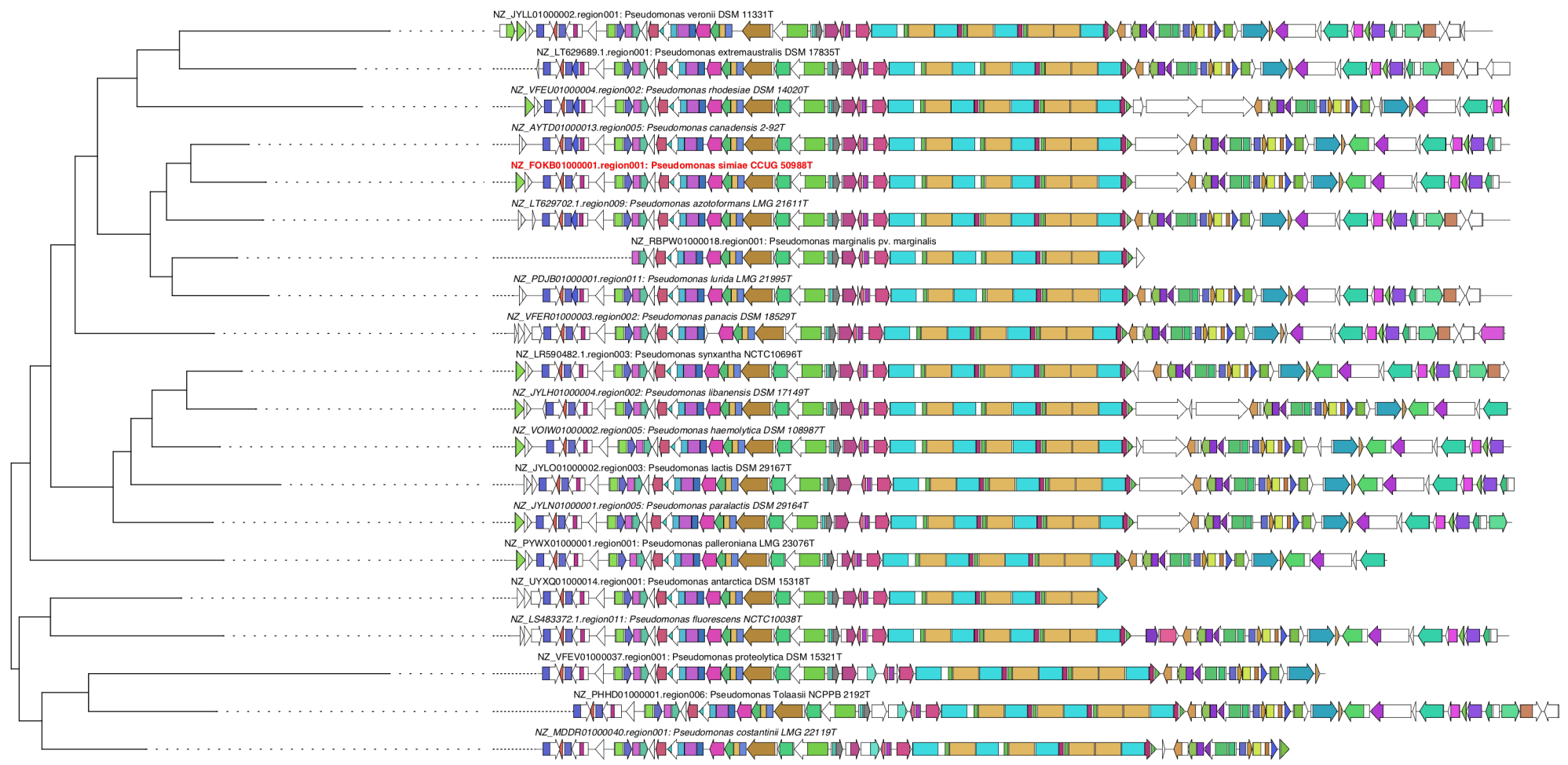
Tipo de BGC: Bacteriocina

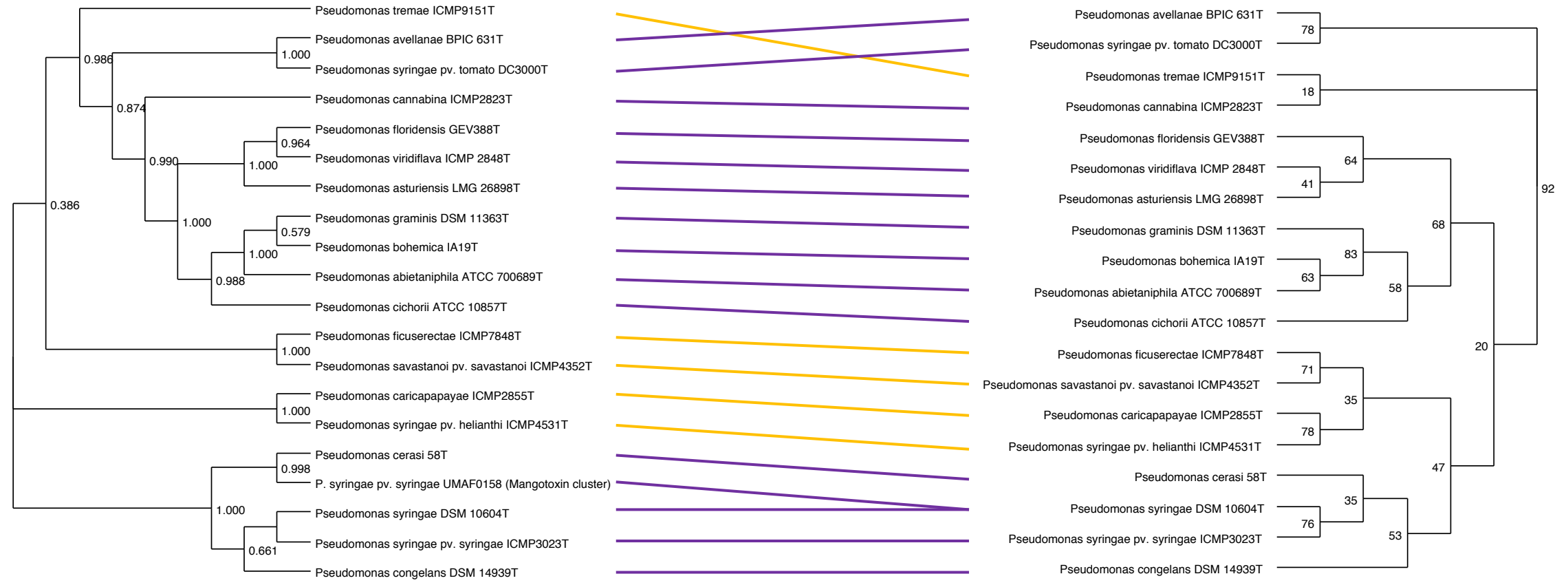


FAM\_02289

Tipo de BGC: NRPS



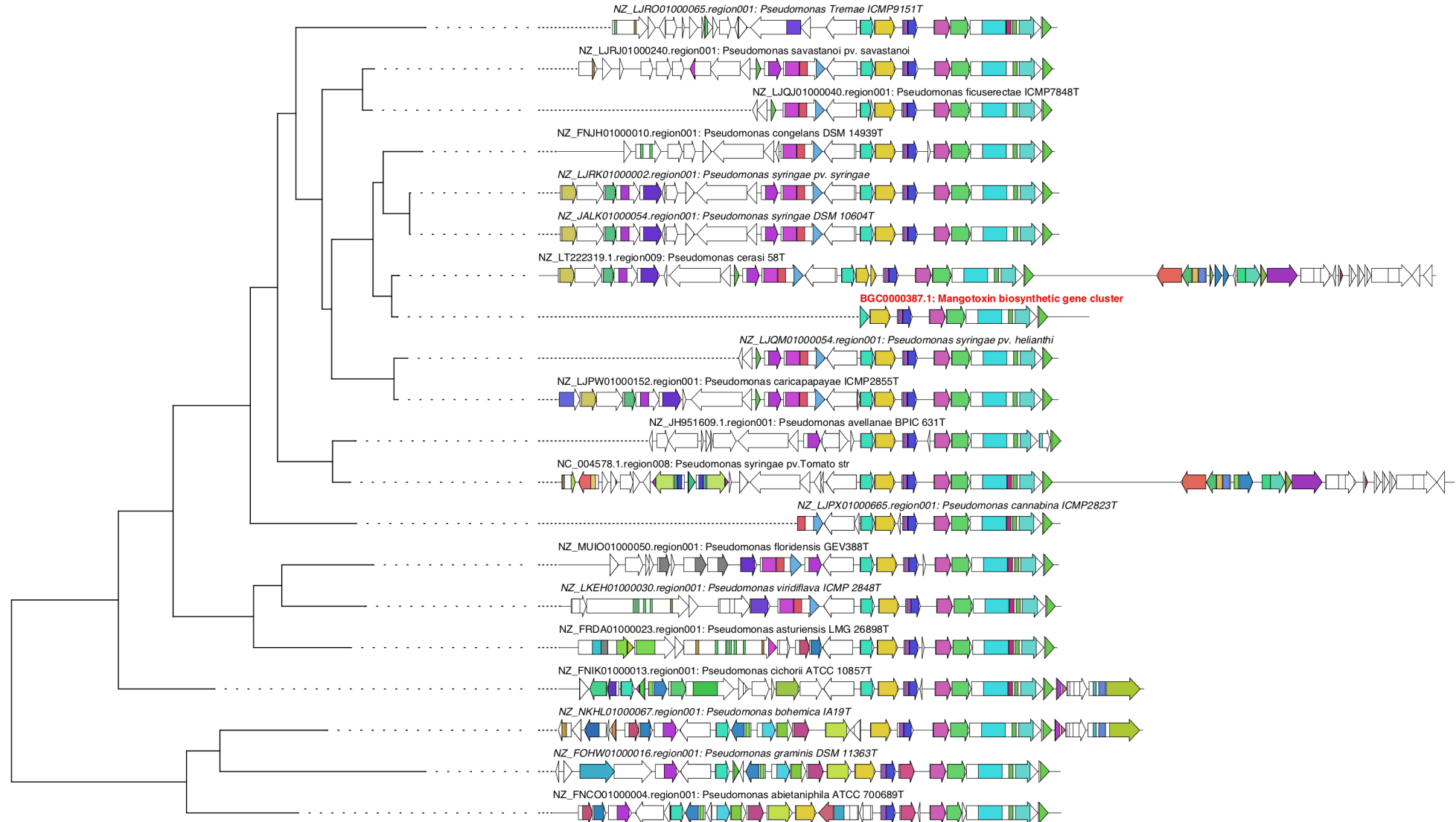






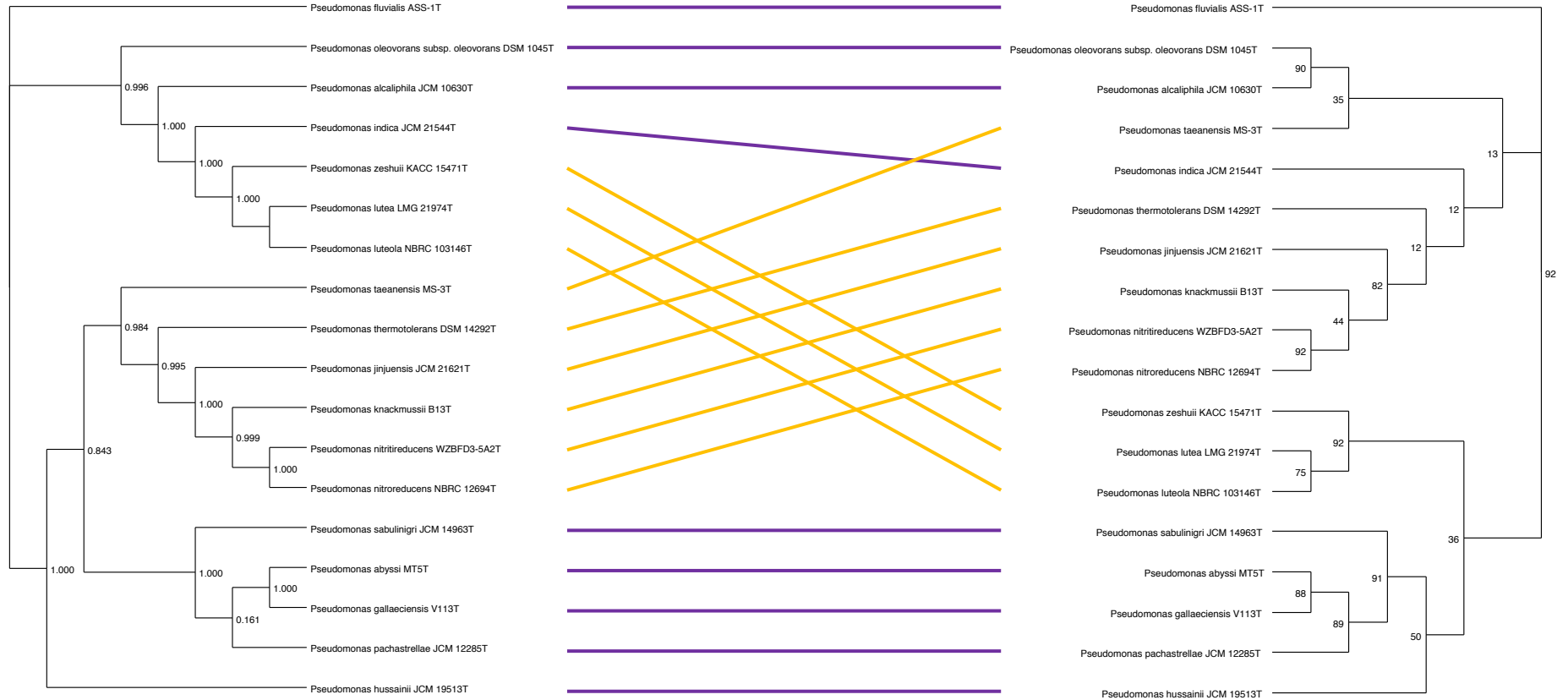
FAM\_00383

Tipo de BGC: NRPS-like



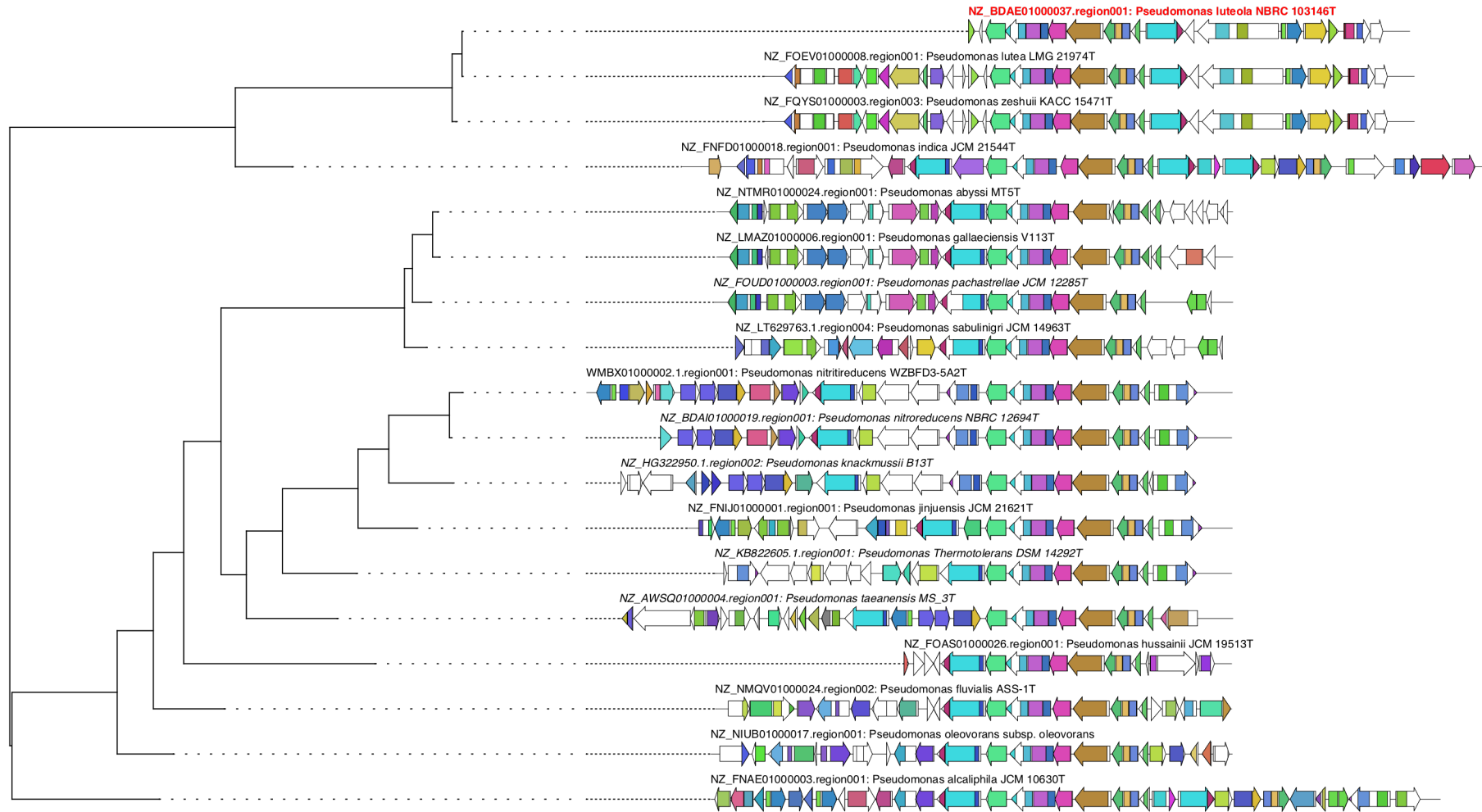
FAM\_01903

Tipo de BGC: Betalactona



FAM\_01903

Tipo de BGC: Betalactona



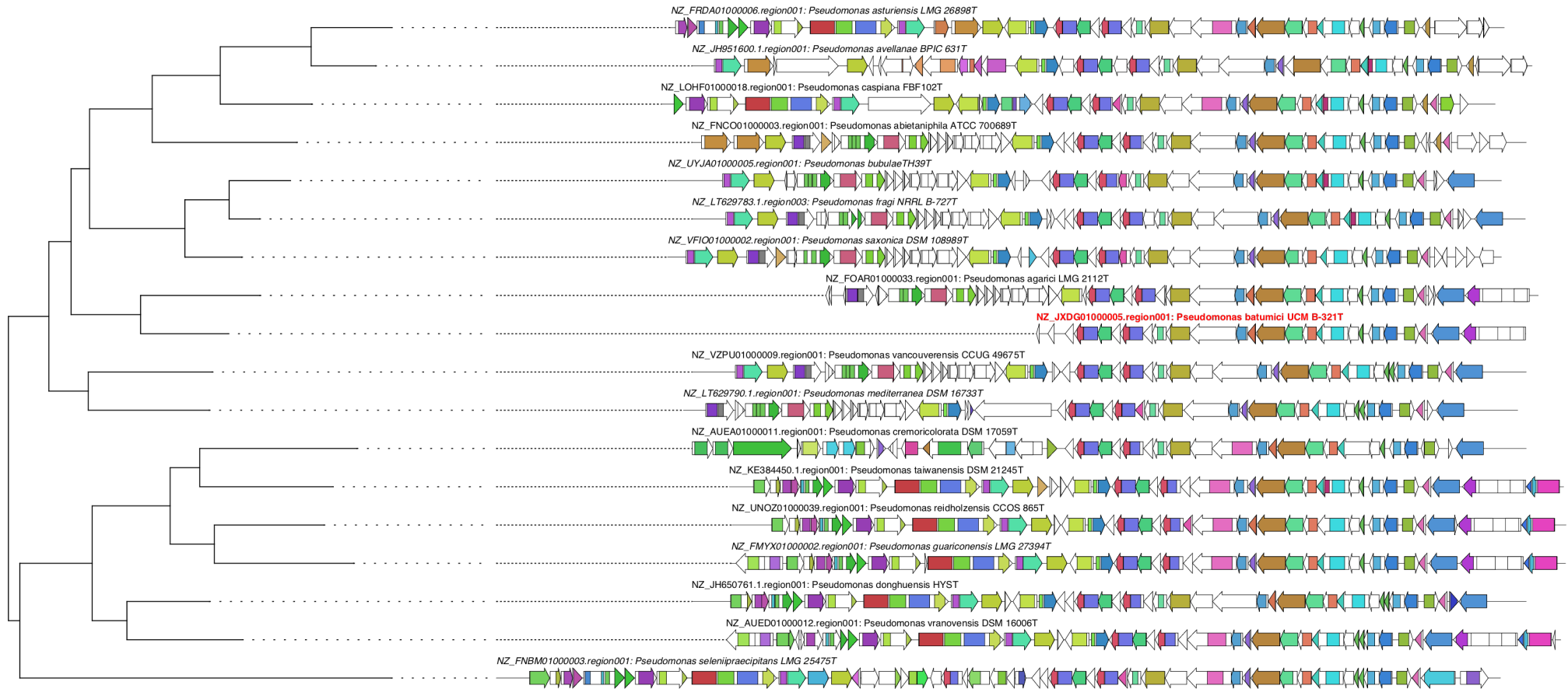
FAM\_02487

Tipo de BGC: Arilpolieno



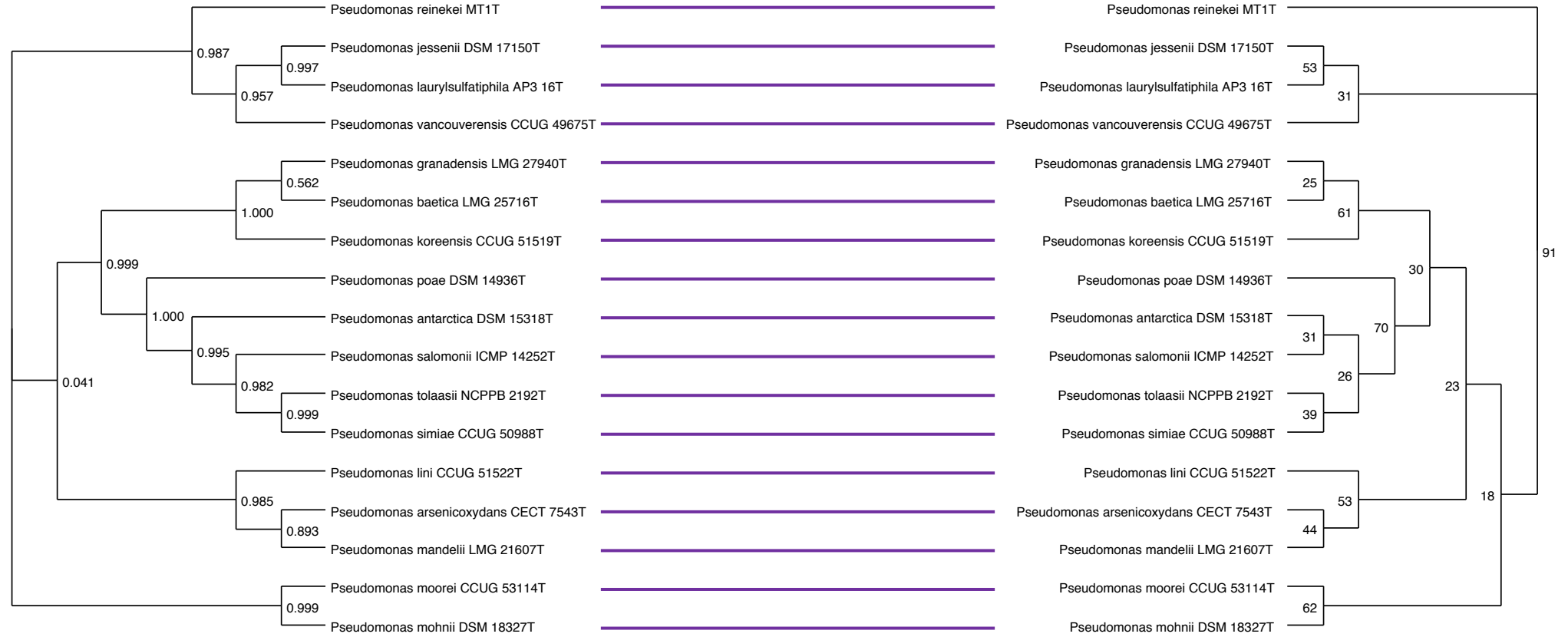
FAM\_02487

Tipo de BGC: Arilpolieno



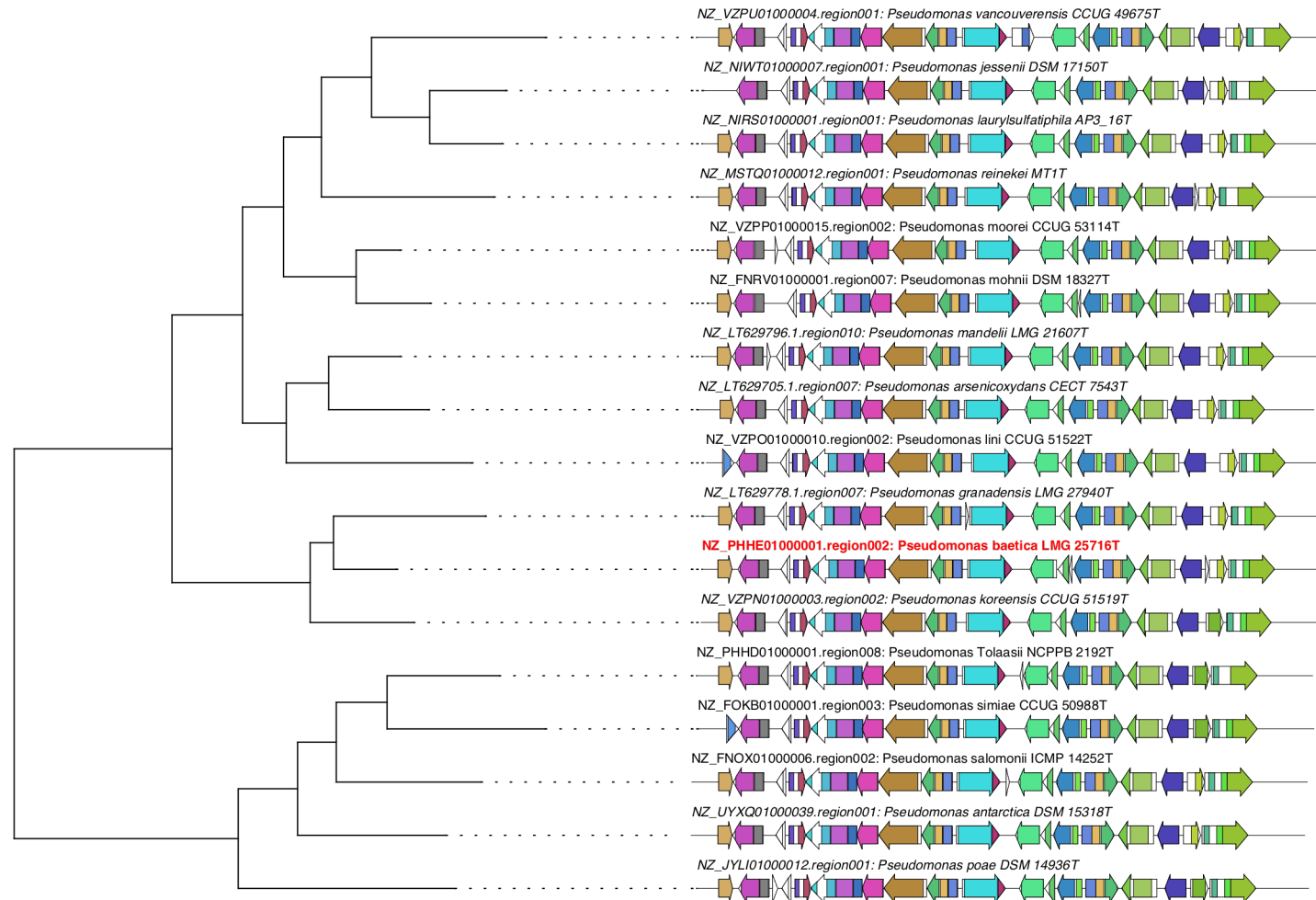
FAM\_03189

Tipo de BGC: Betalactona



FAM\_03189

Tipo de BGC: Betalactona



FAM\_02150

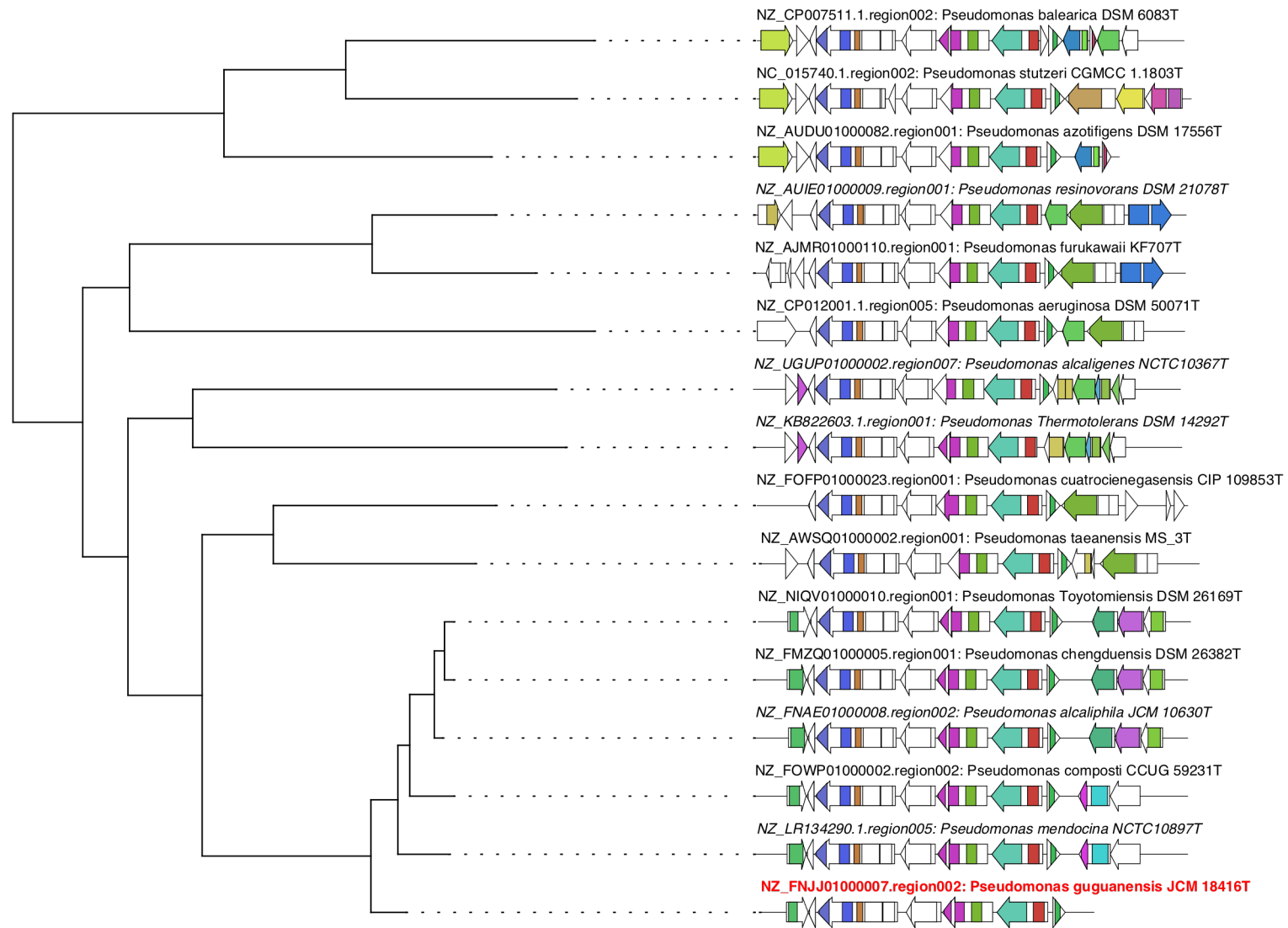
Tipo de BGC: NAGGN





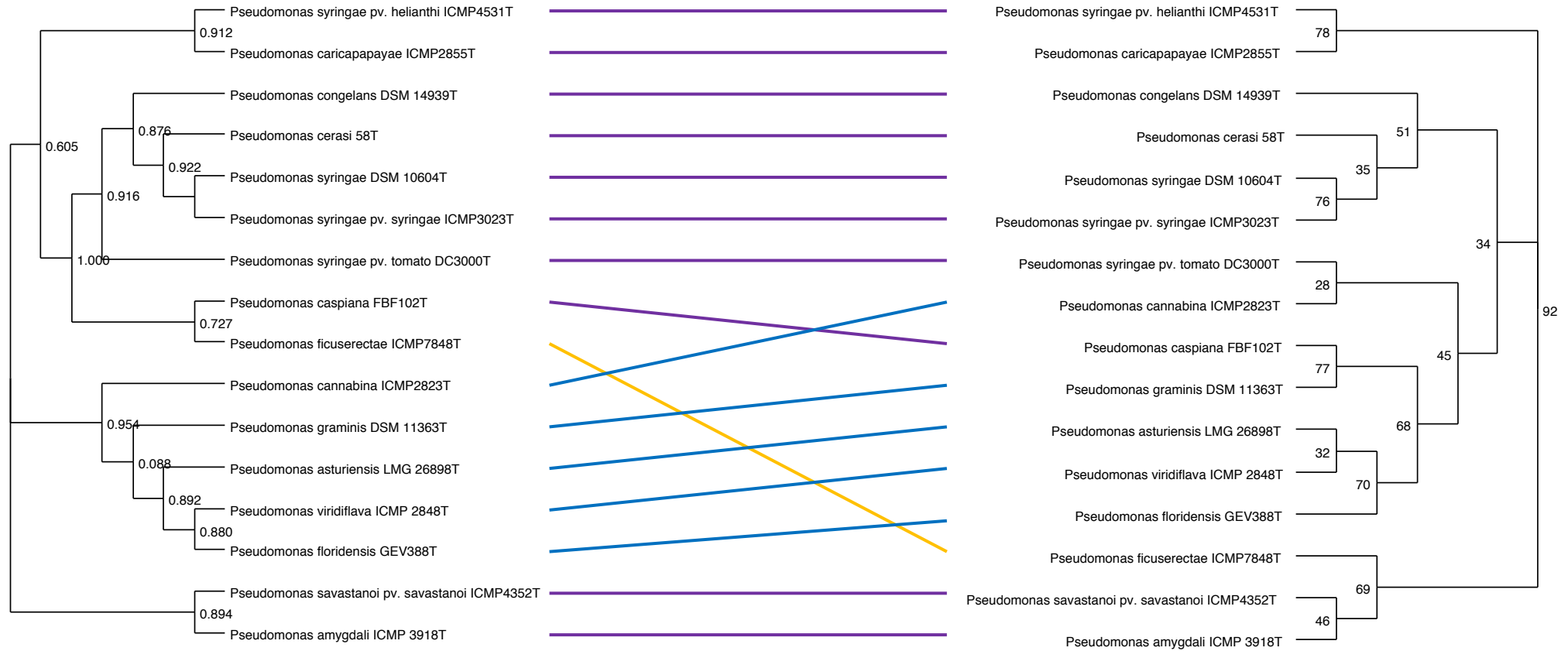
FAM\_02150

Tipo de BGC: NAGGN



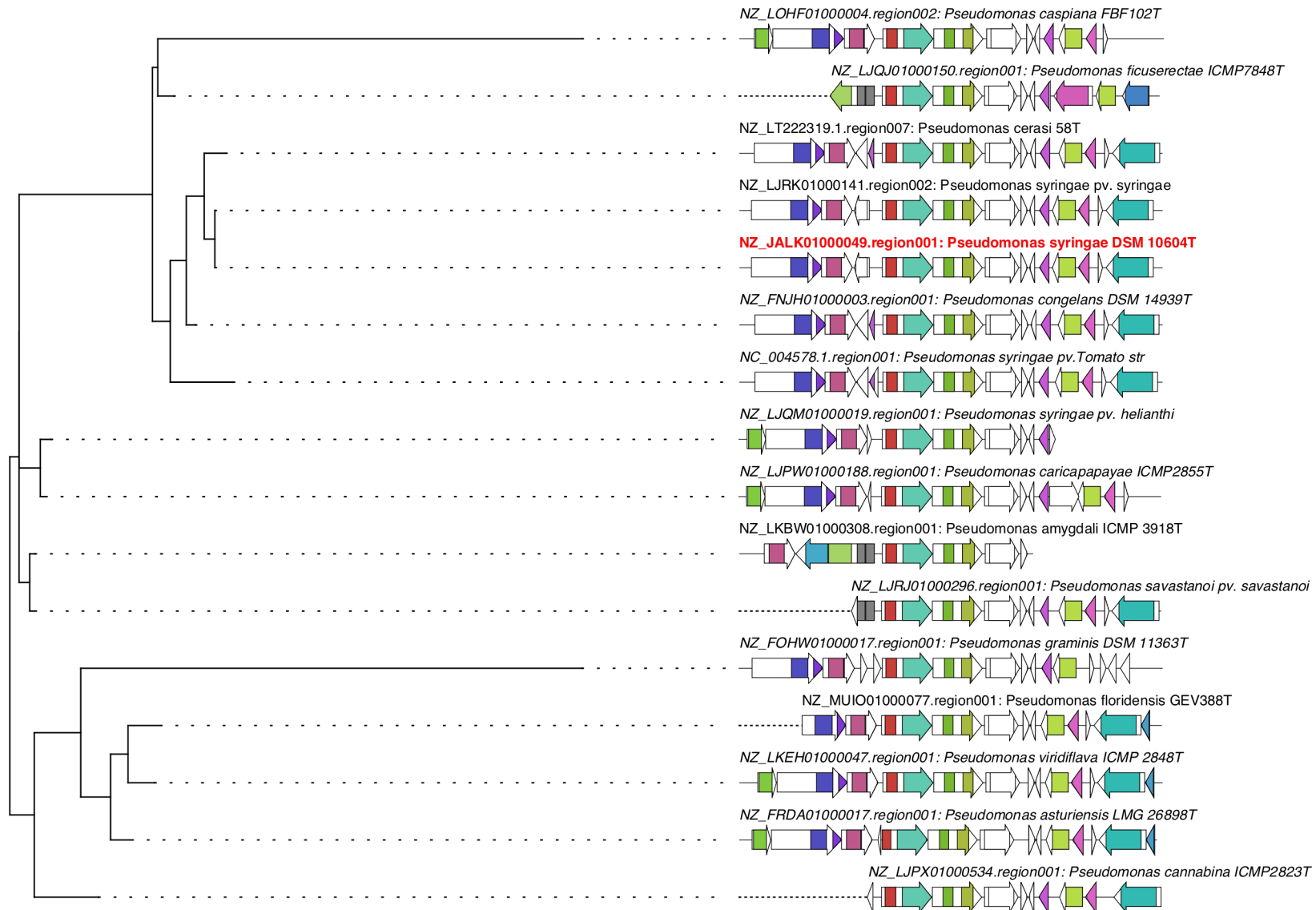
FAM\_02432

Tipo de BGC: NAGGN



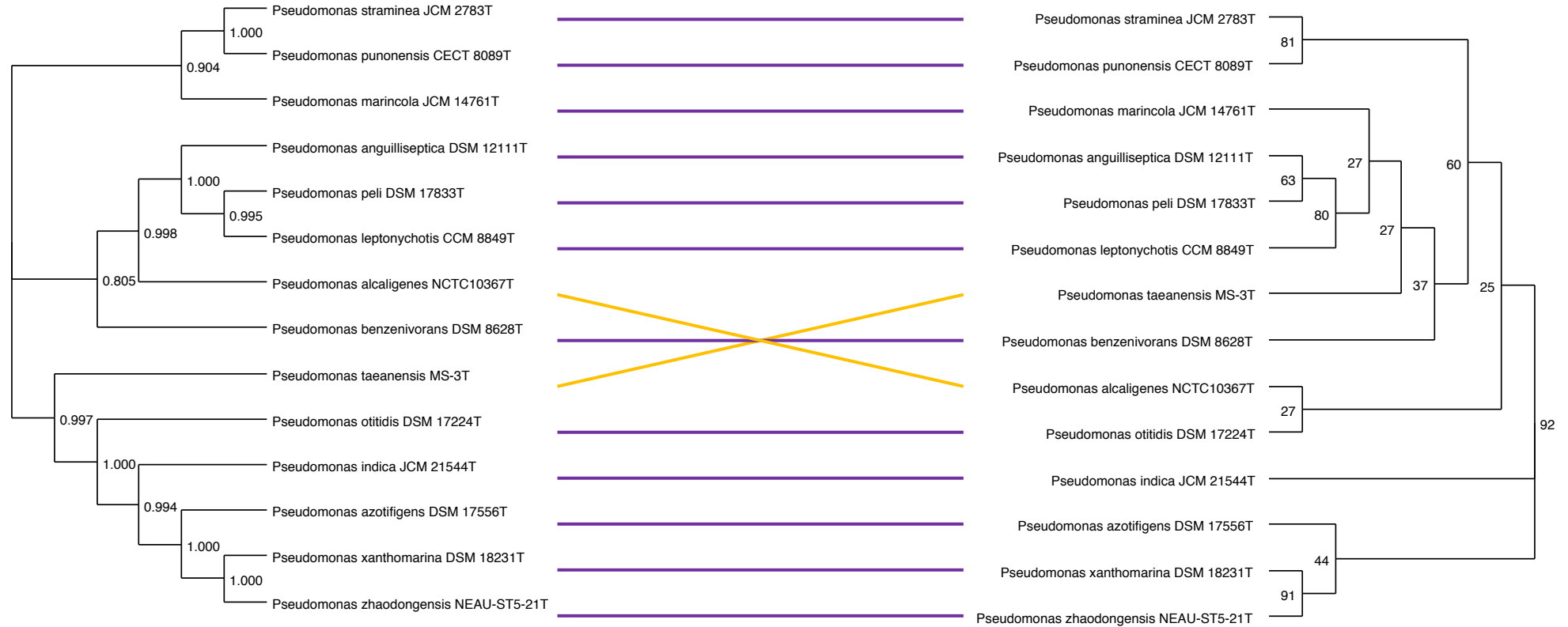
FAM\_02432

Tipo de BGC: NAGGN



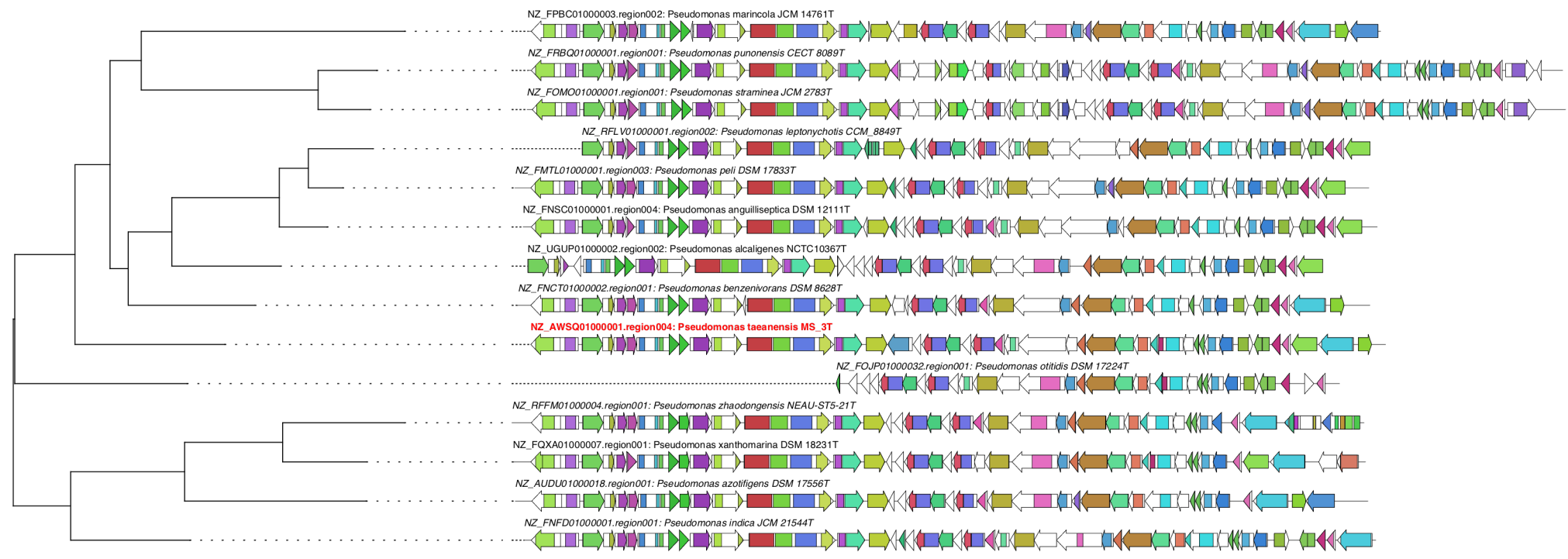
FAM\_01878

Tipo de BGC: Arylpolyene



FAM\_01878

Tipo de BGC: Arylpolyene



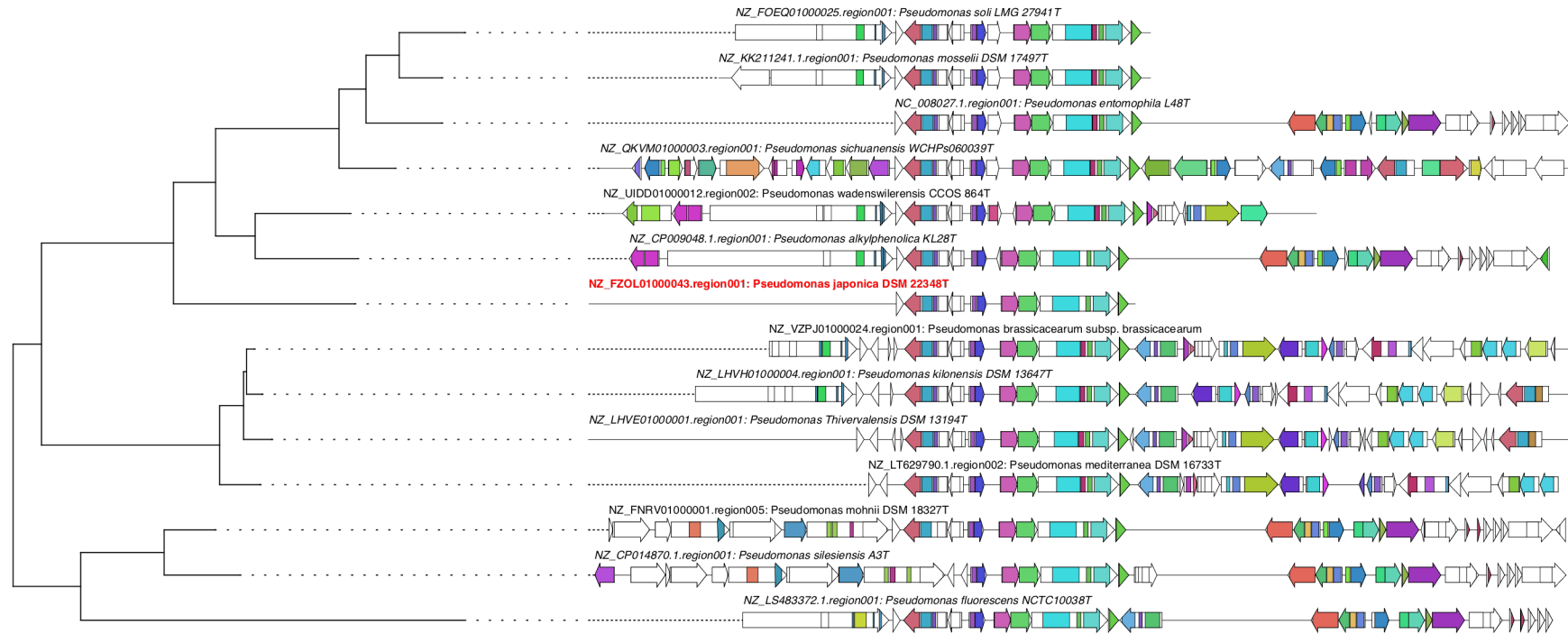
FAM\_02401

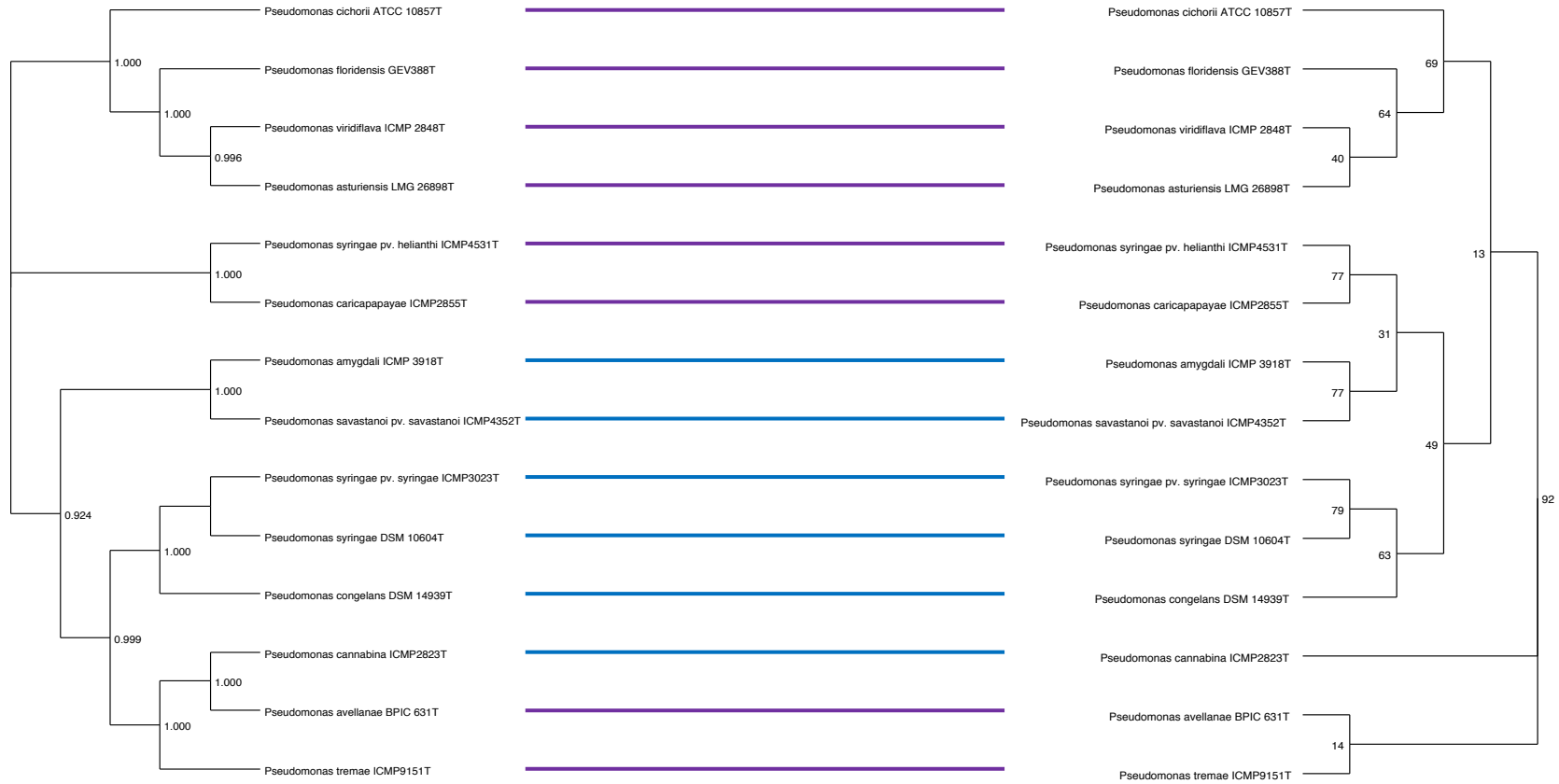
Tipo de BGC: NRPS-like



FAM\_02401

Tipo de BGC: NRPS-like

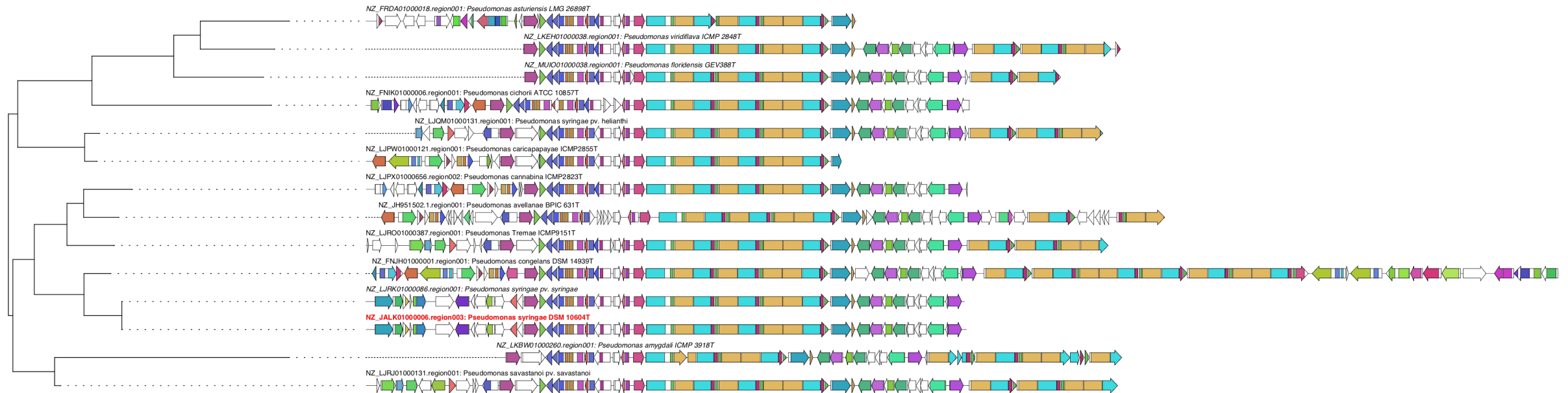






FAM\_02424

Tipo de BGC: NRPS



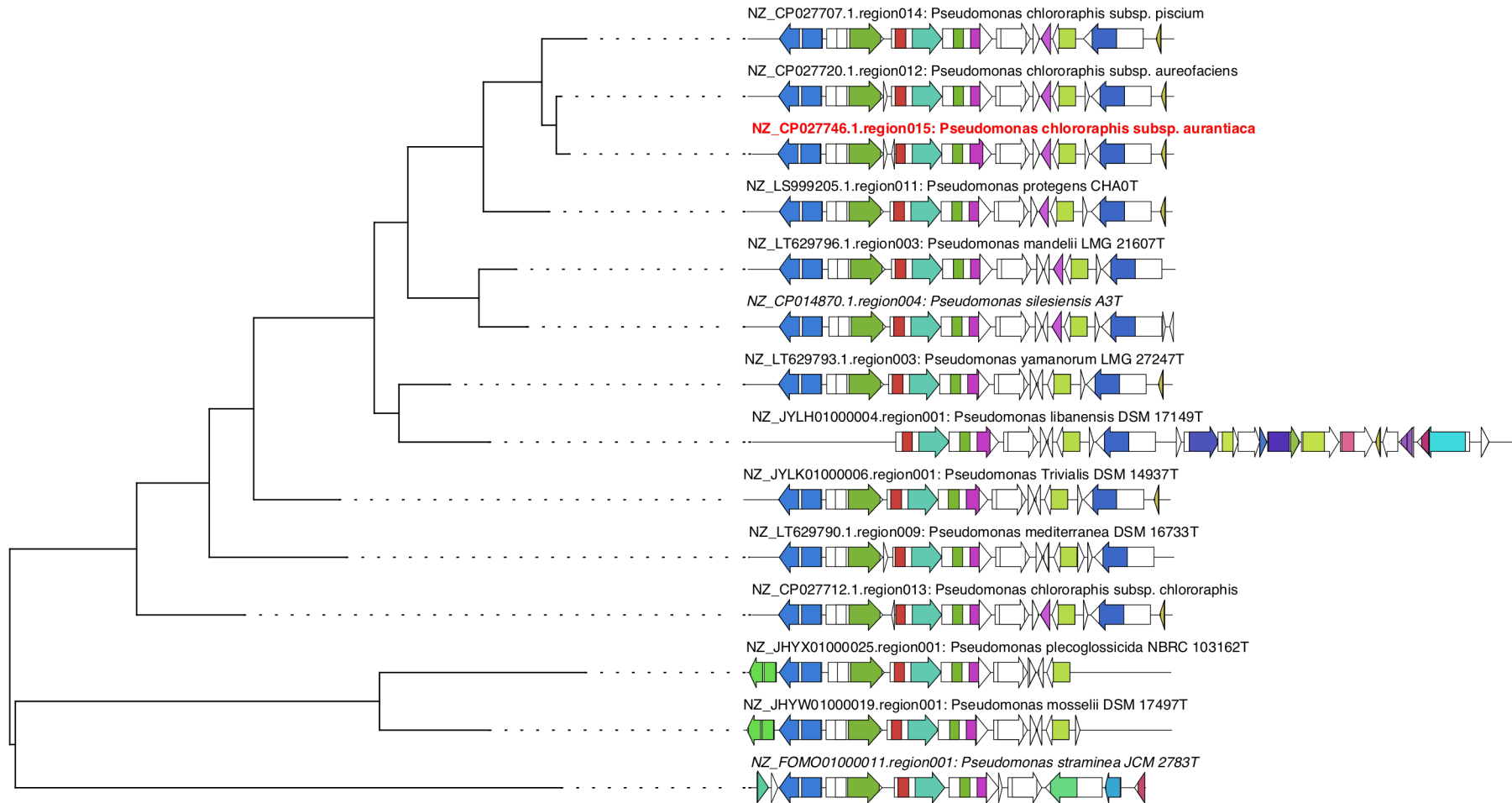
FAM\_02047

Tipo de BGC: NAGGN



FAM\_02047

Tipo de BGC: NAGGN



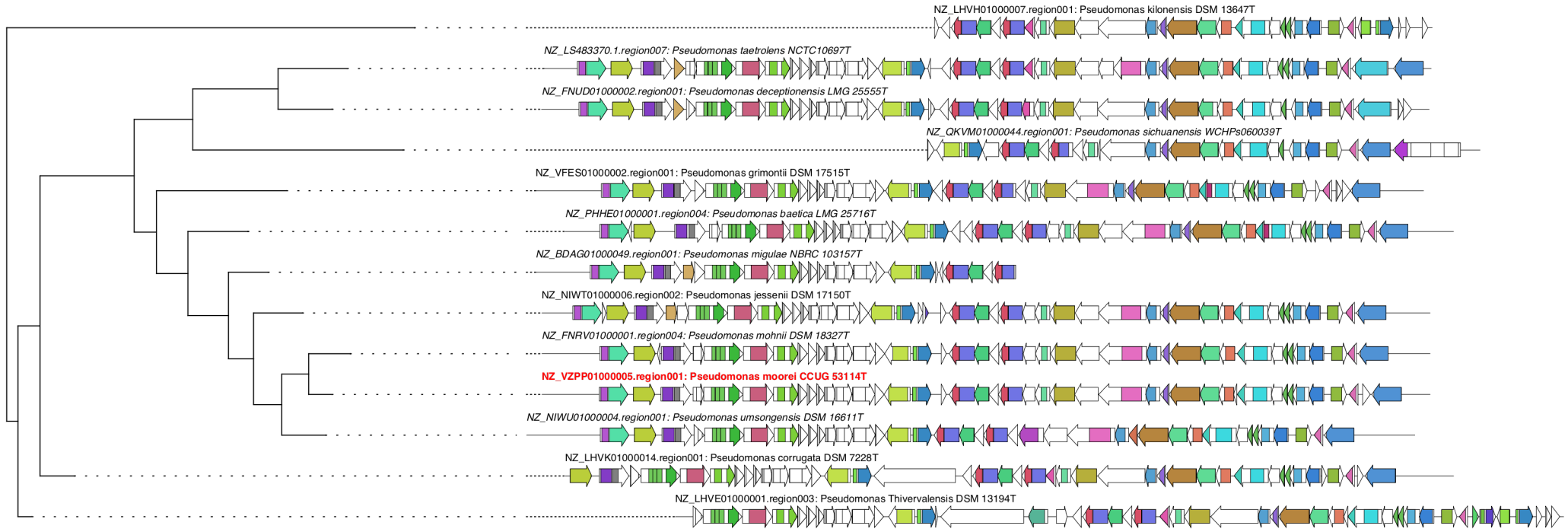
FAM\_03491

Tipo de BGC: Arilpolieno



FAM\_03491

Tipo de BGC: Arilpolieno



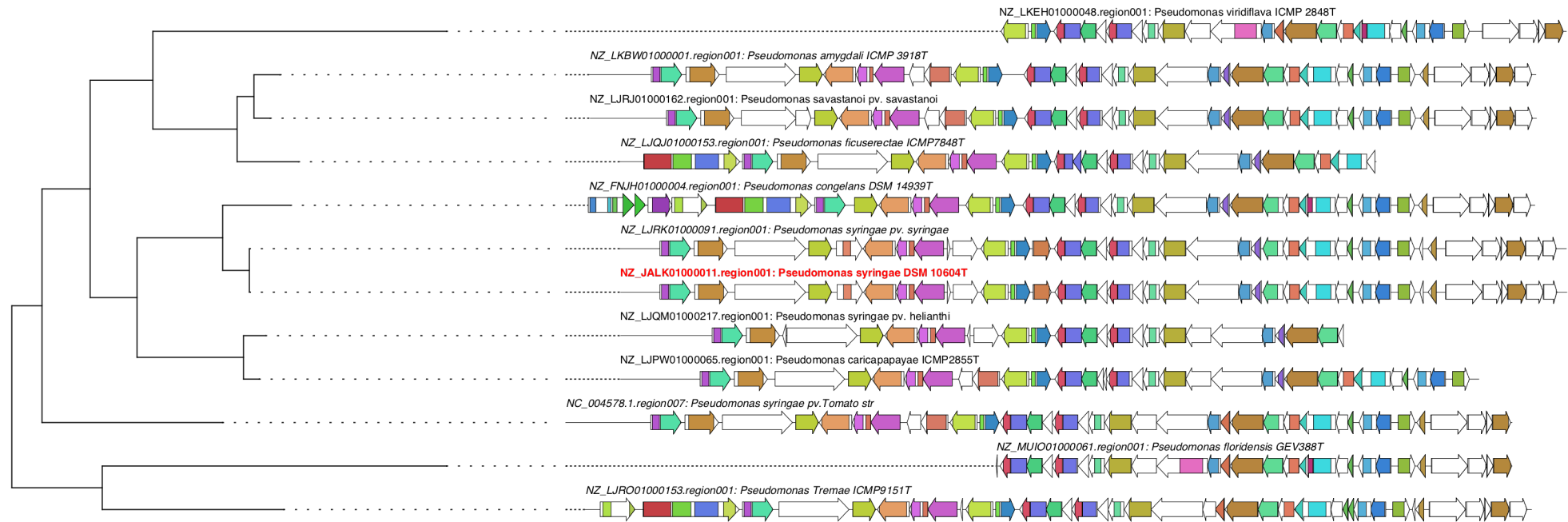
FAM\_02426

Tipo de BGC: Arilpolieno



FAM\_02426

Tipo de BGC: Arilpolieno



FAM\_02589

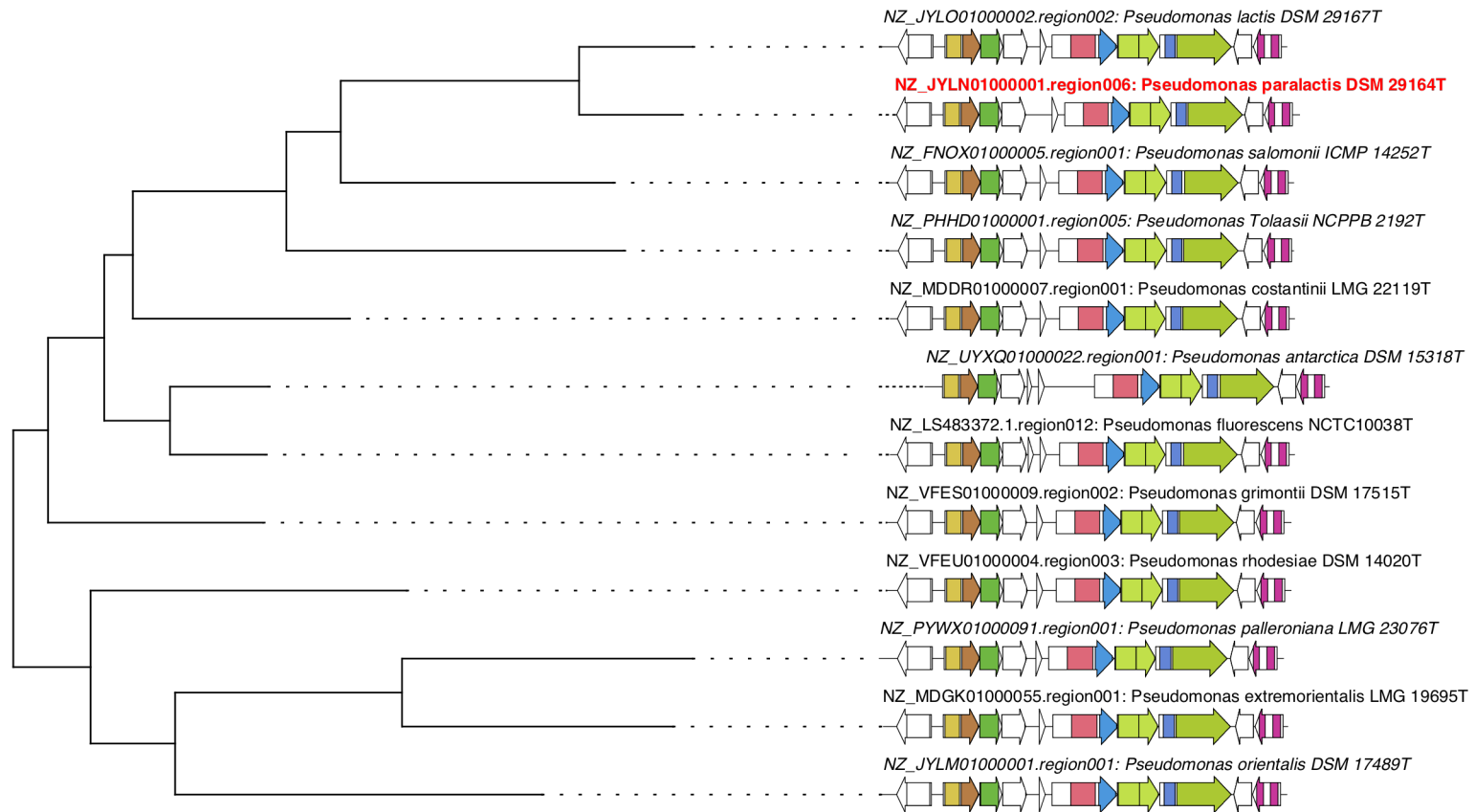
Tipo de BGC: Sideróforo





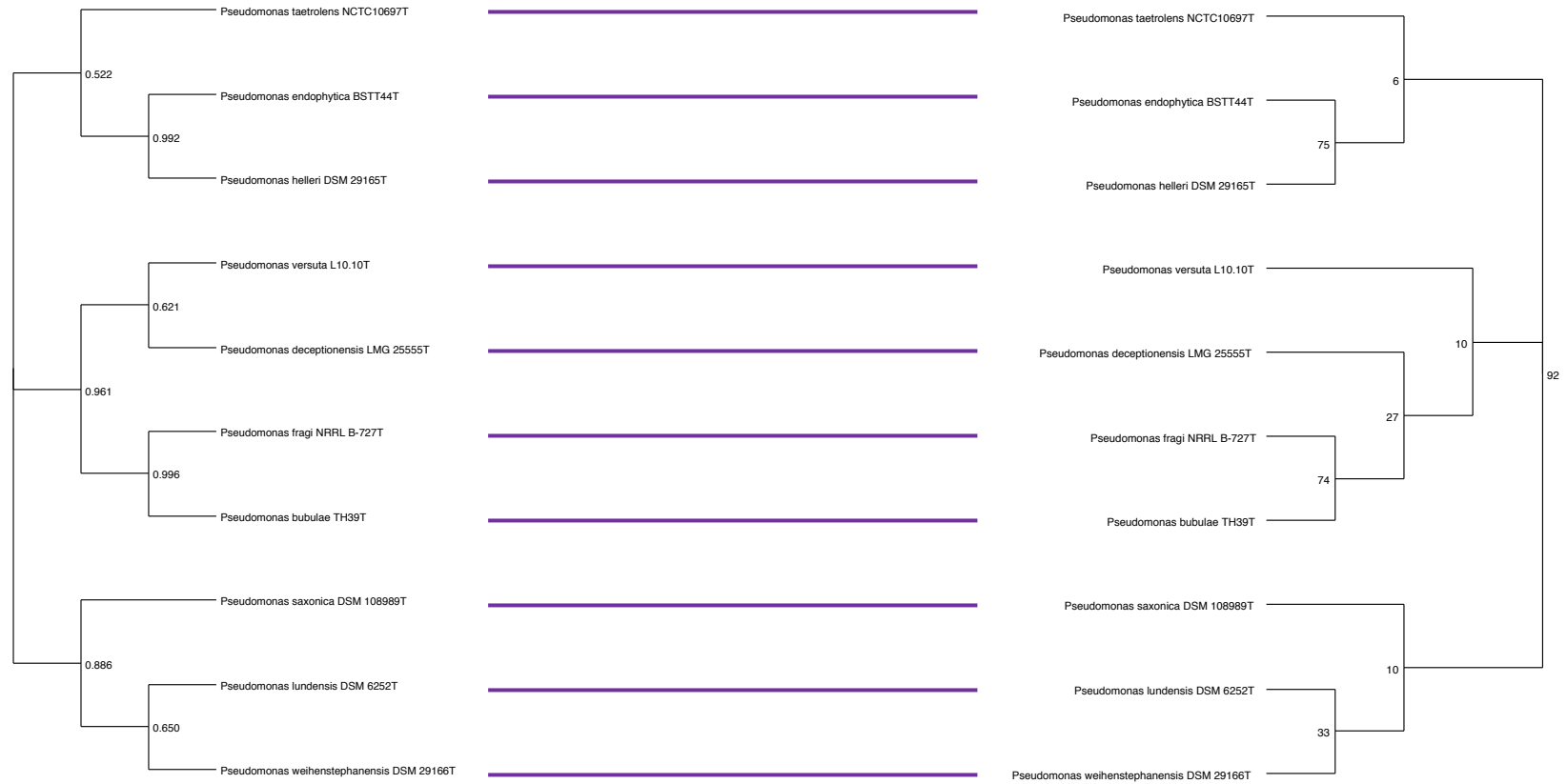
FAM\_02589

Tipo de BGC: Sideróforo



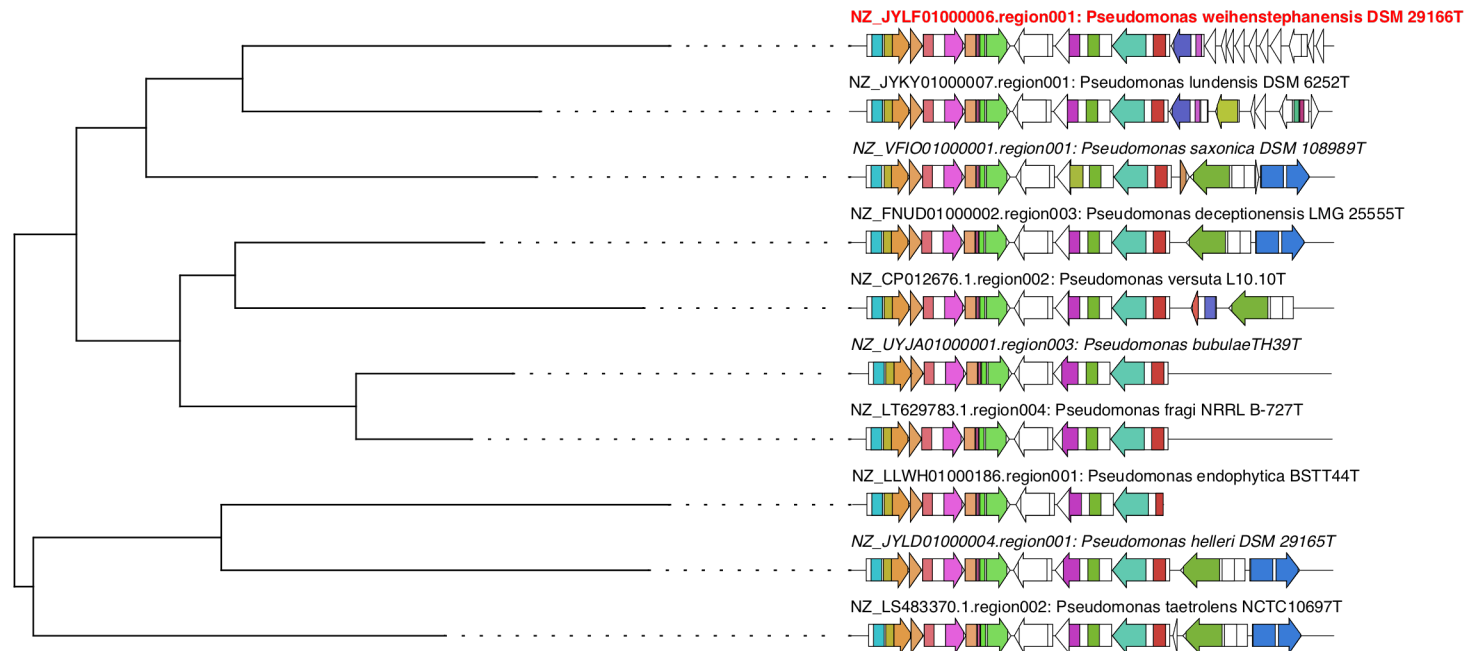
FAM\_02524

Tipo de BGC: NAGGN



FAM\_02524

Tipo de BGC: NAGGN



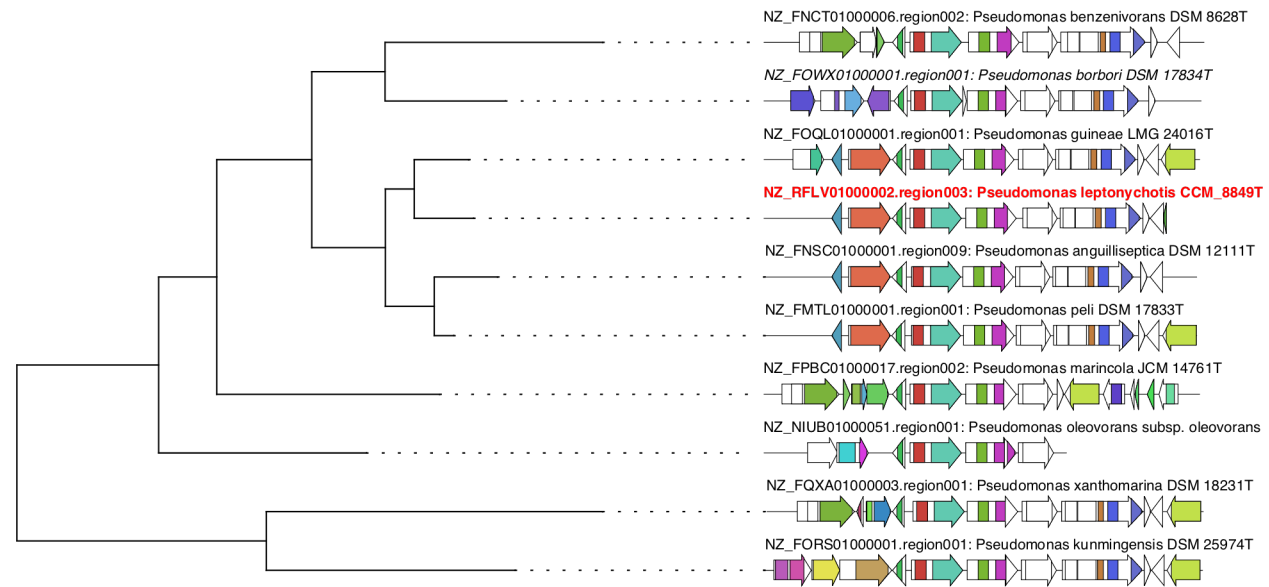
FAM\_03259

Tipo de BGC: NAGGN



FAM\_03259

Tipo de BGC: NAGGN



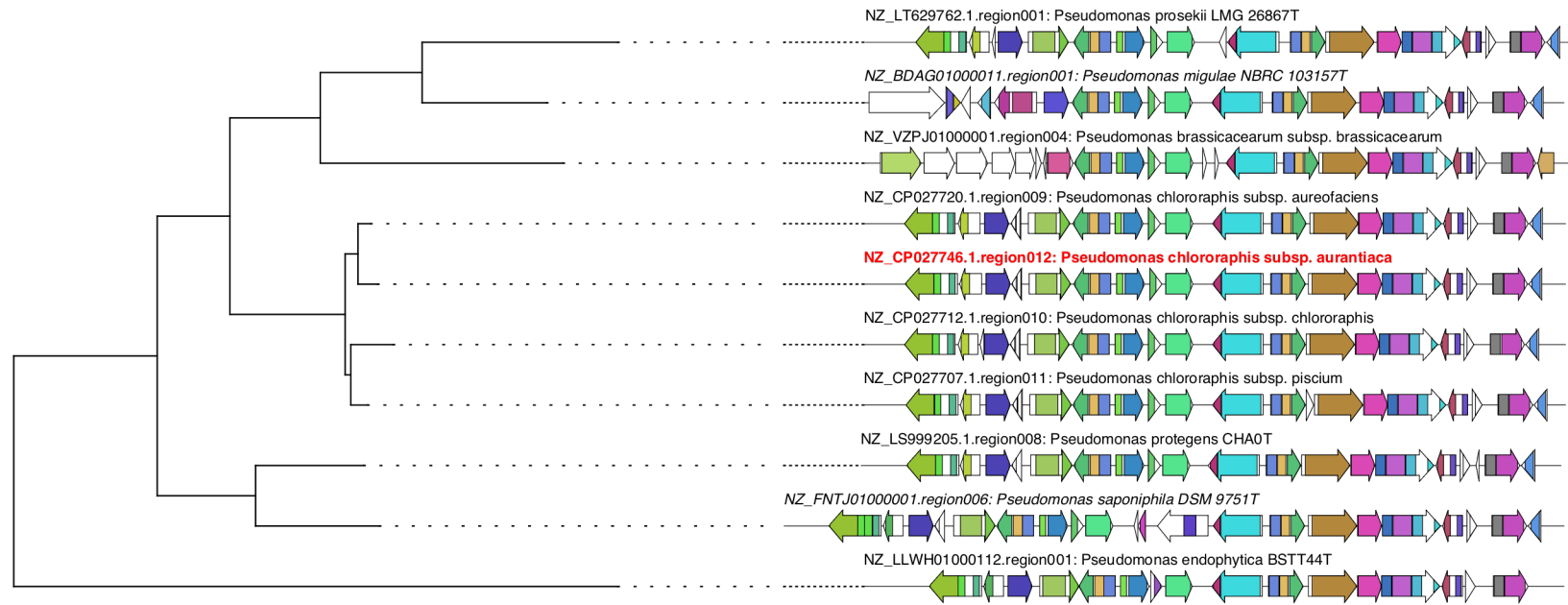
FAM\_02044

Tipo de BGC: Betalactona



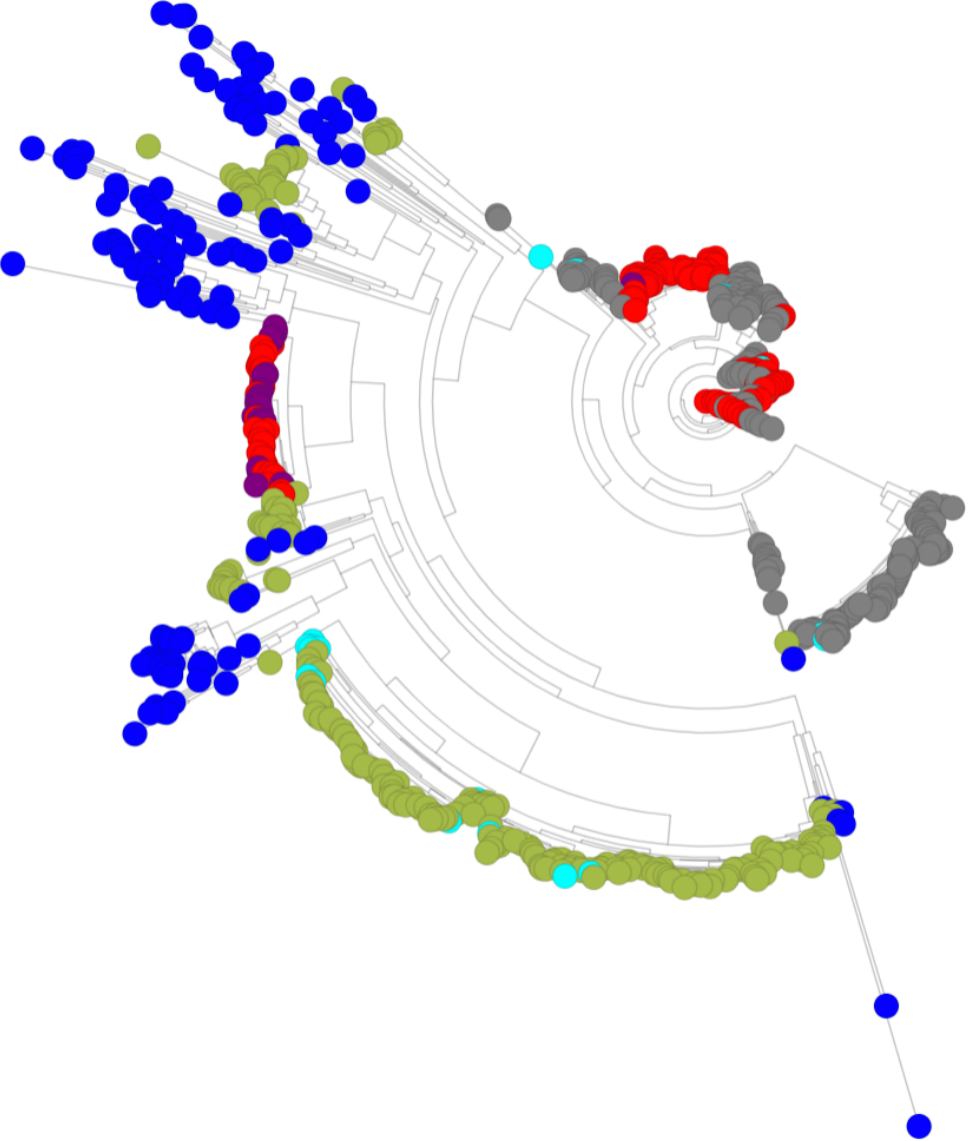
FAM\_02044

Tipo de BGC: Betalactona



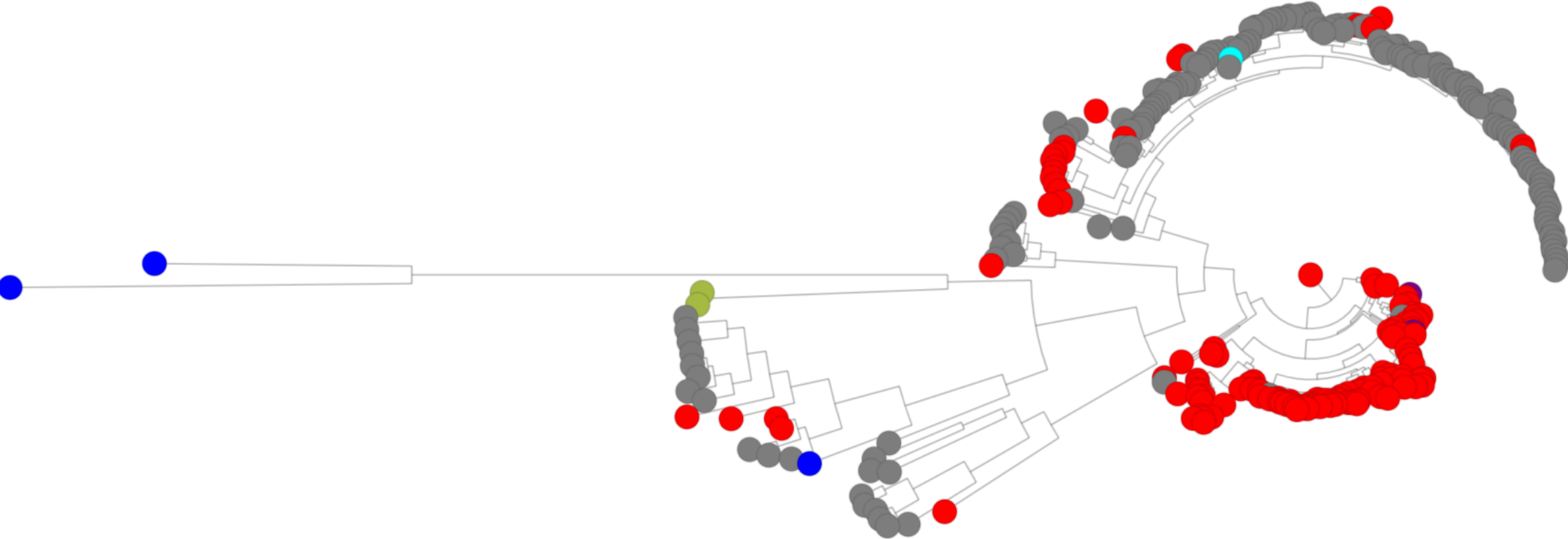
**Anexo IV.** Árboles resultantes del proceso de EvoMining sobre las proteínas seleccionadas de la base de datos del metabolismo central. Los números y códigos representan estas proteínas según lo detallado en la Tabla 1 de este trabajo.

1 acyl-CoADehydrogenase

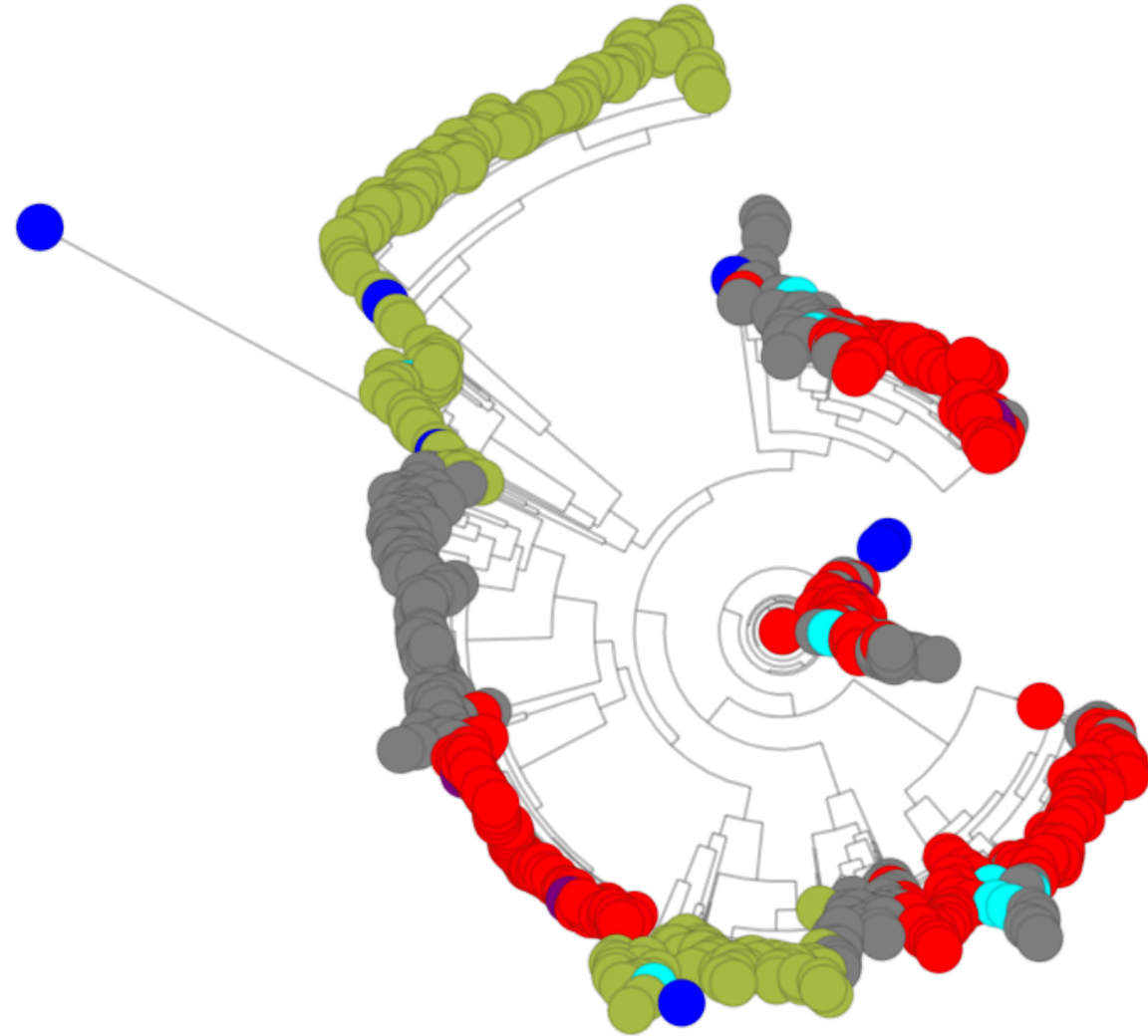




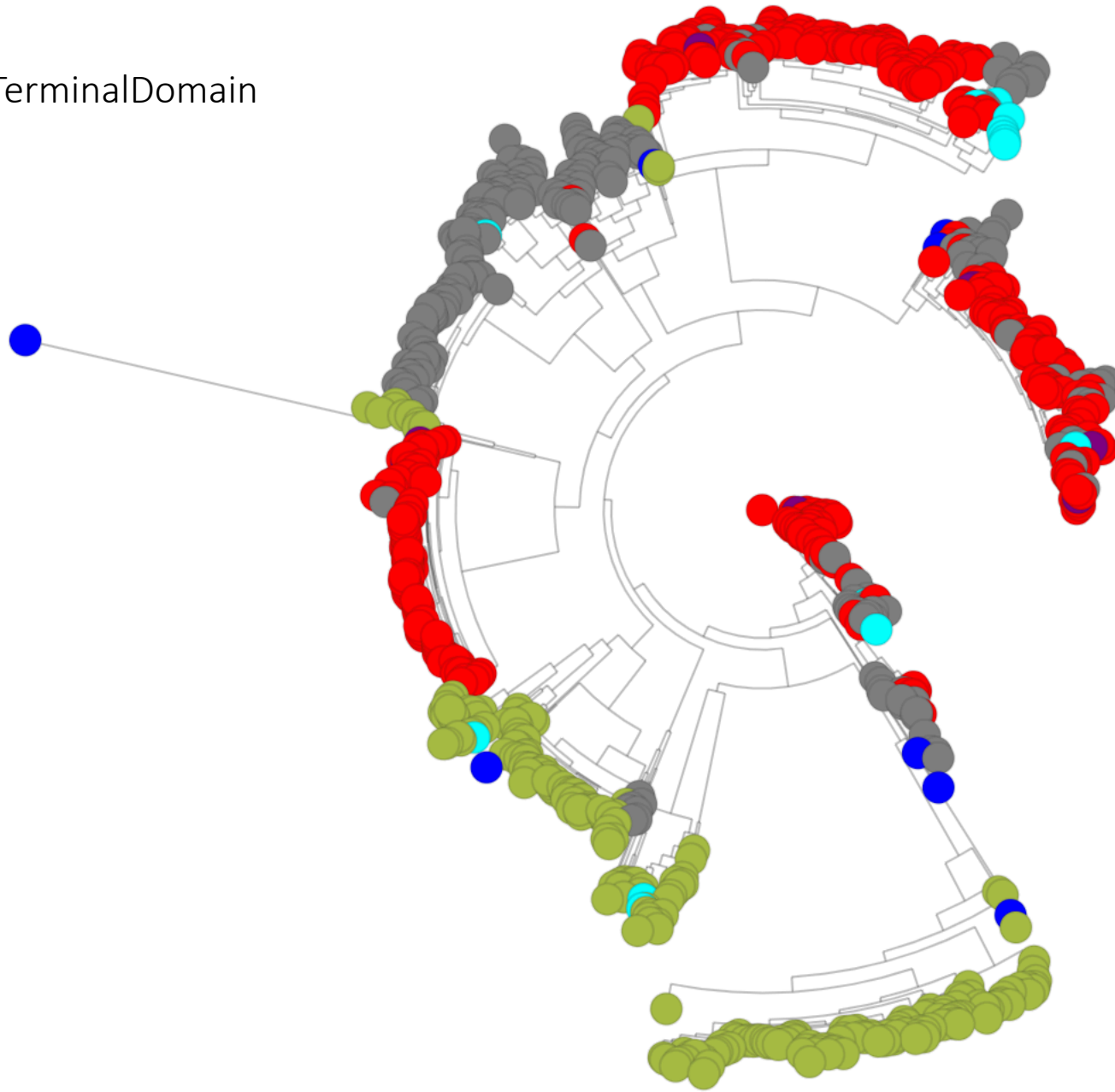
2 PhaCNTerminus



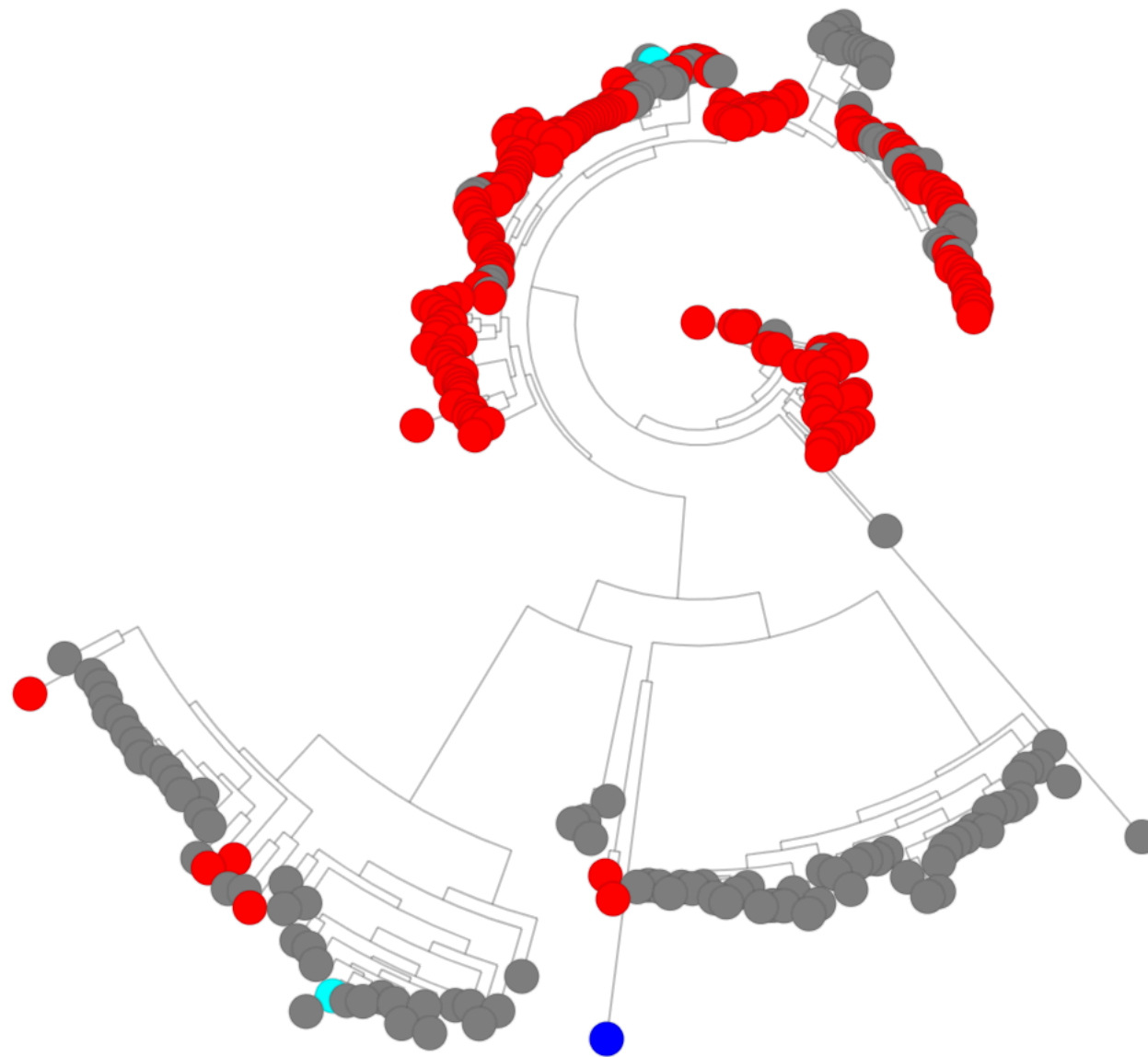
### 3 Thiolase



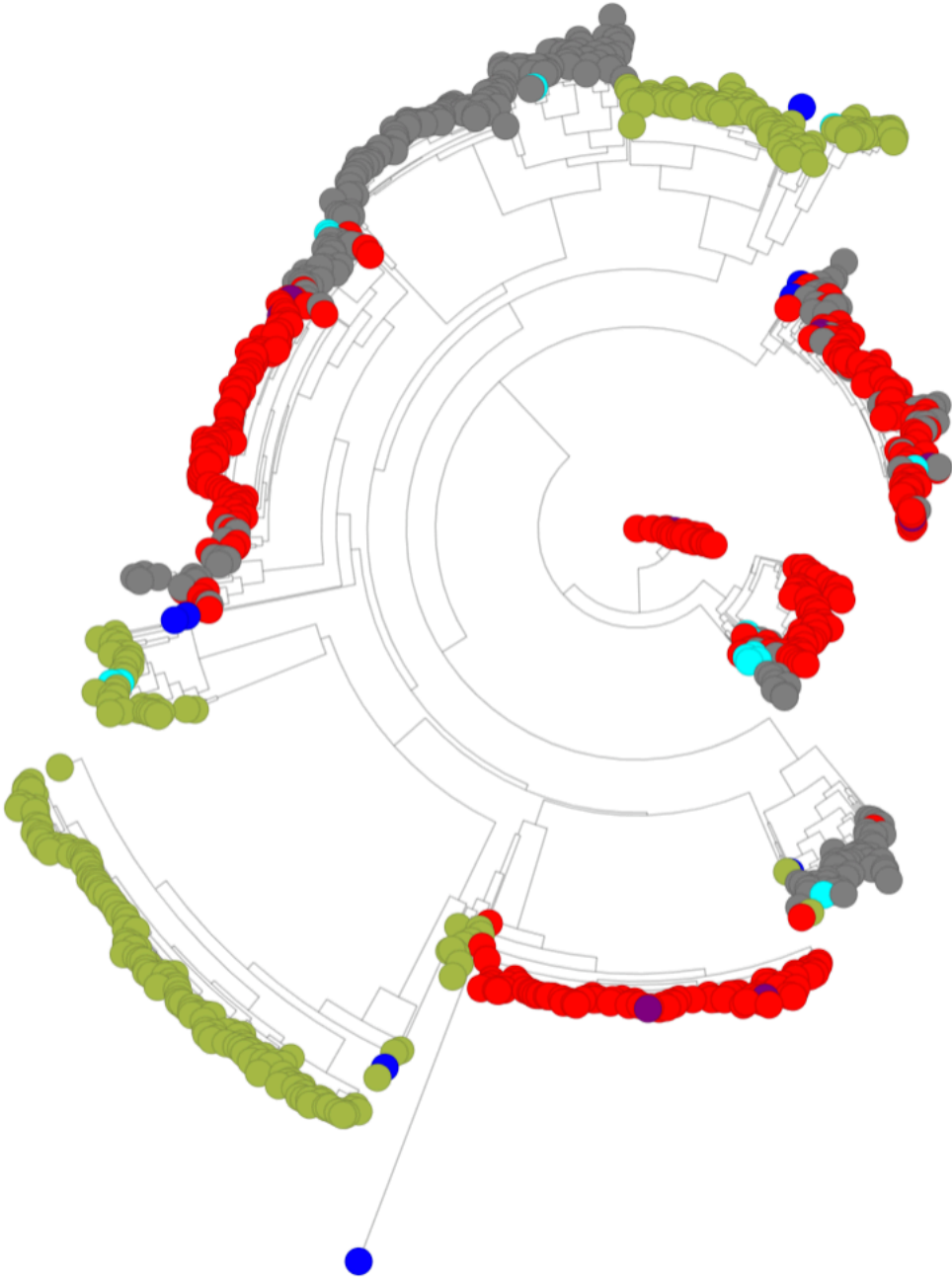
#### 4 ThiolaseNTerminalDomain



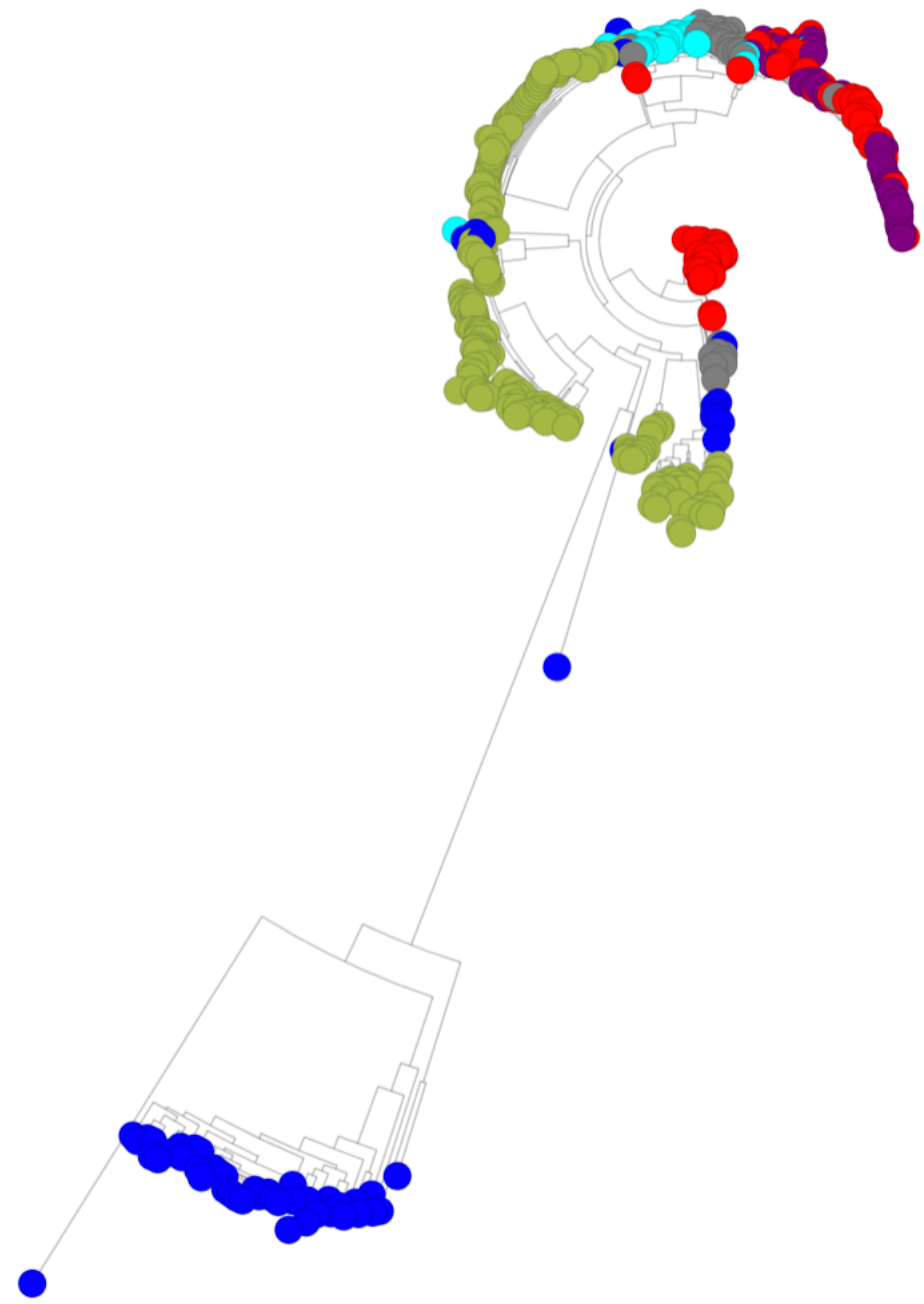
# 5 OMPP1



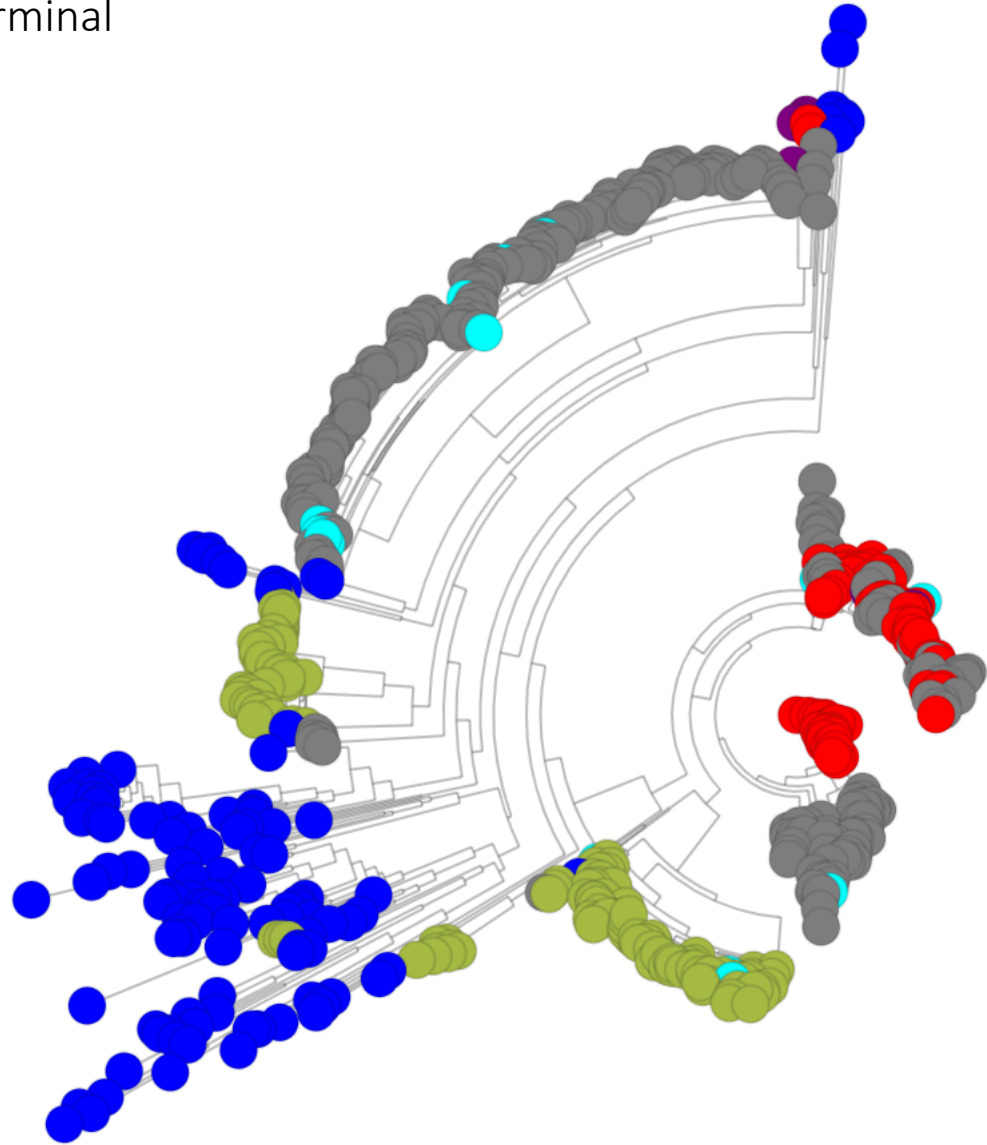
6 syntheAcetoacetylCoA



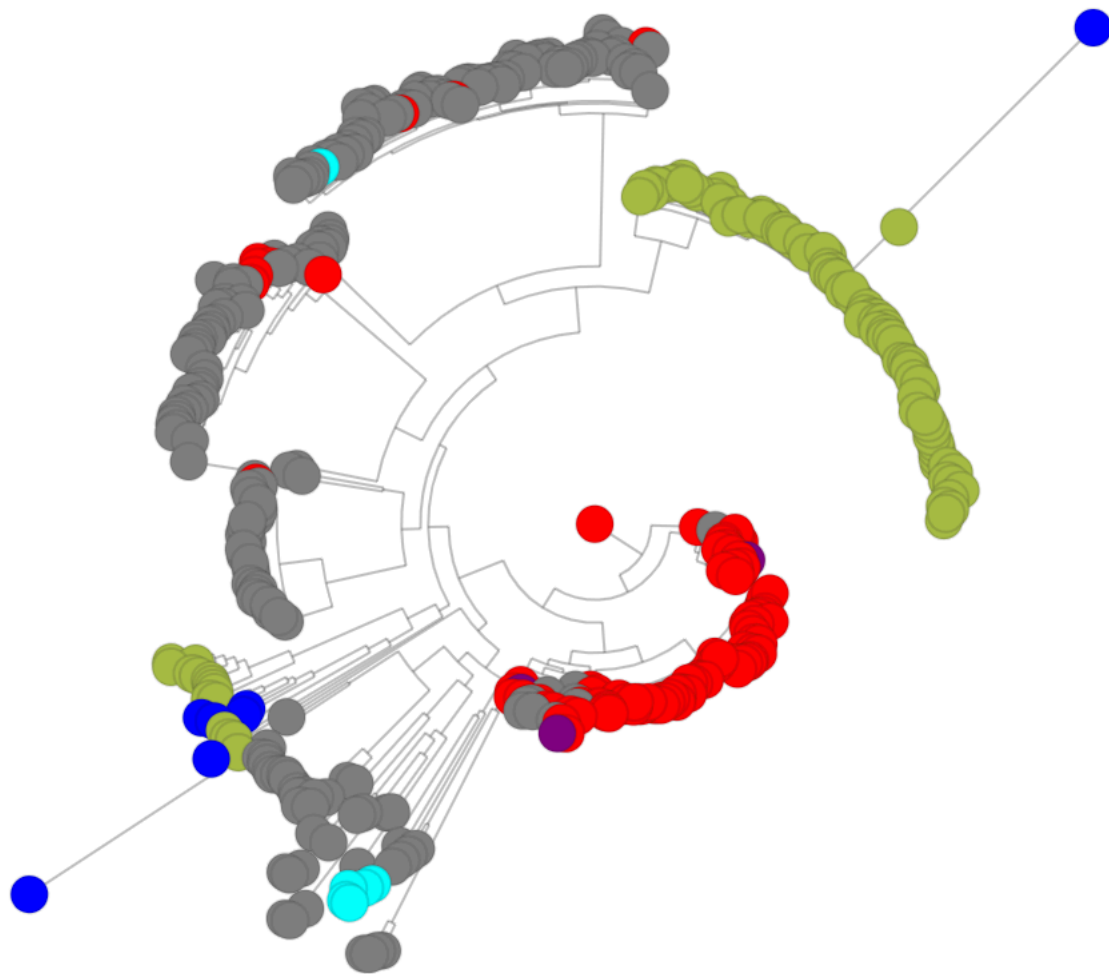
7 AccCHomodimer



## 8 acyl-CoADehydrogenaseNterminal

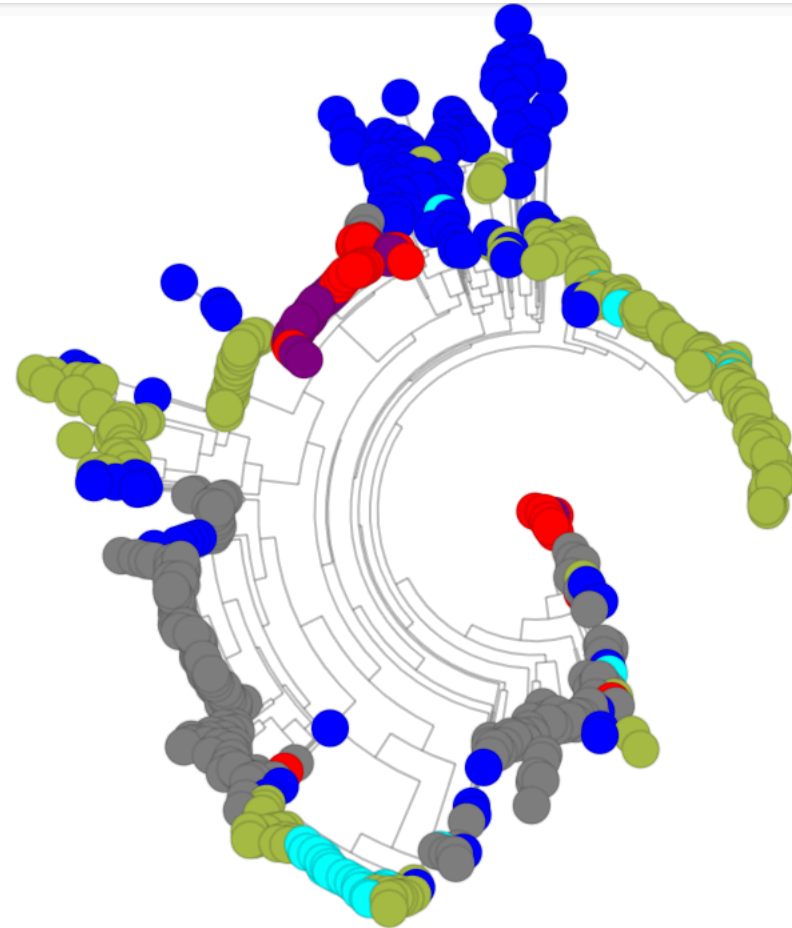


## 9 3-OHisobutyrateDh

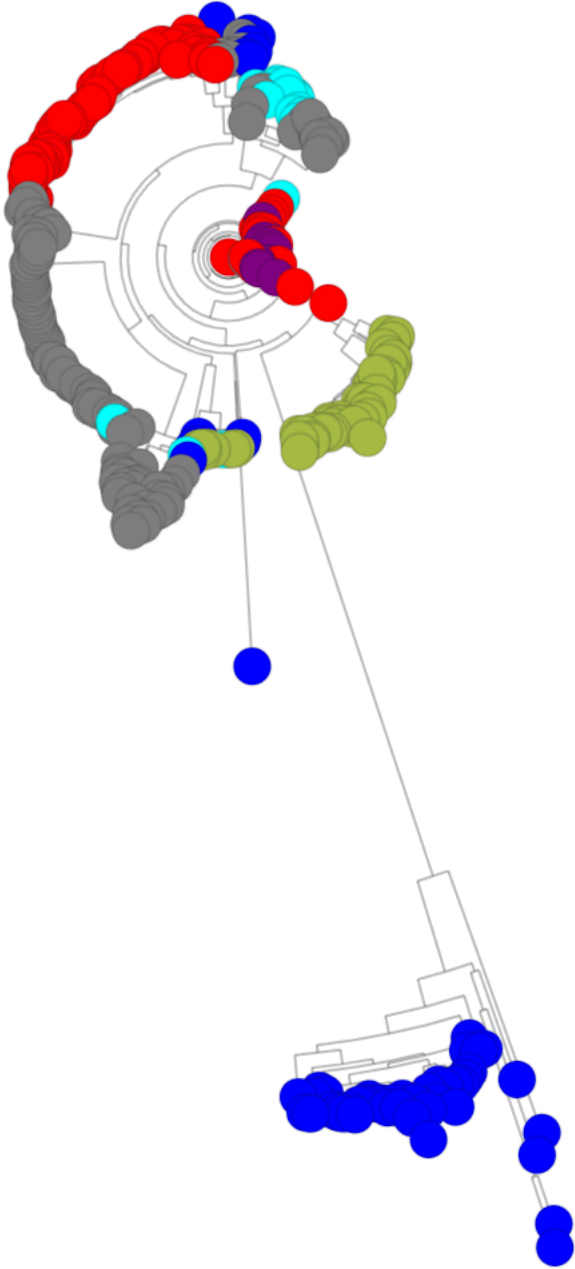




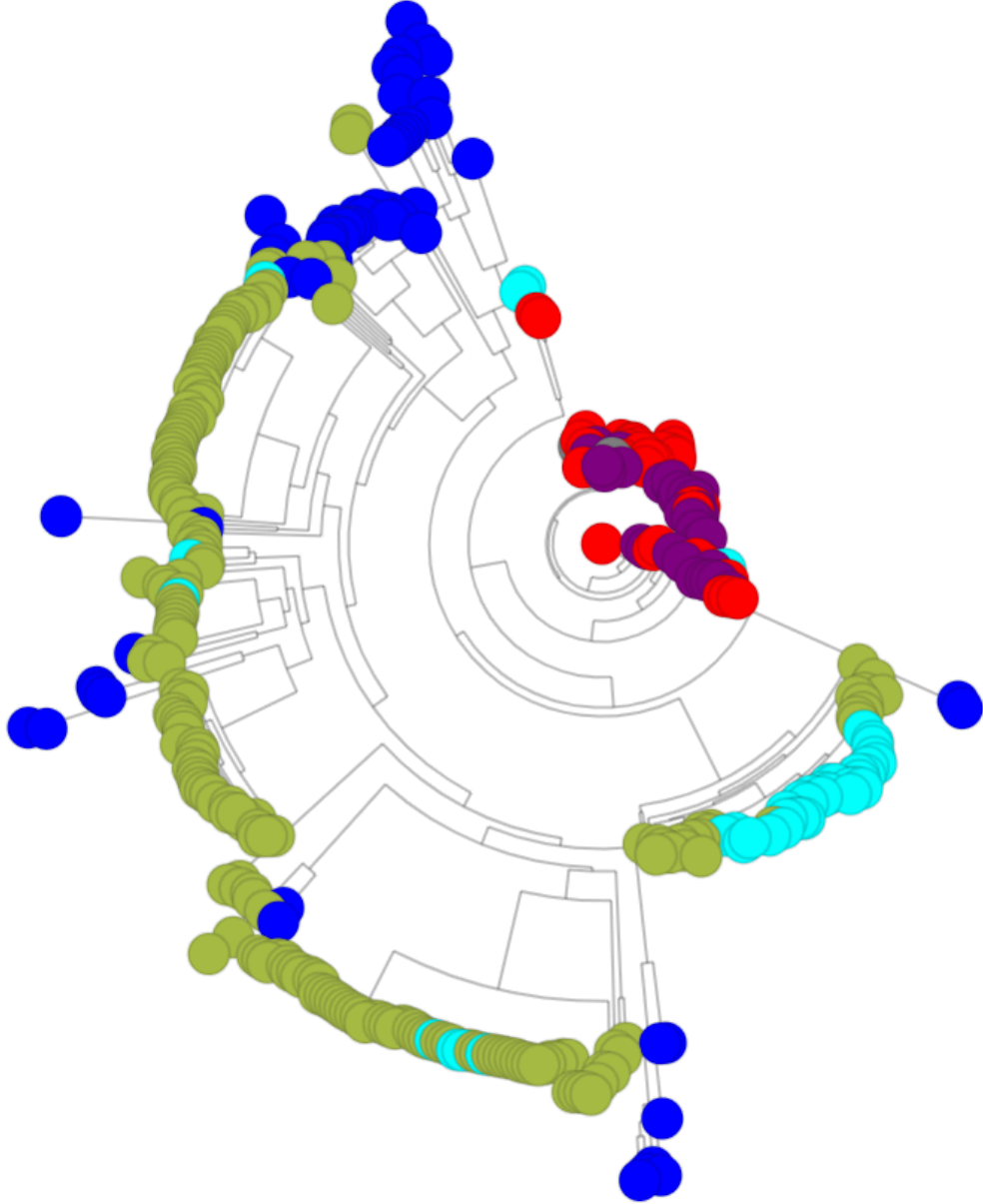
## 10 acyl-CoADehydrogenaseCTerminal



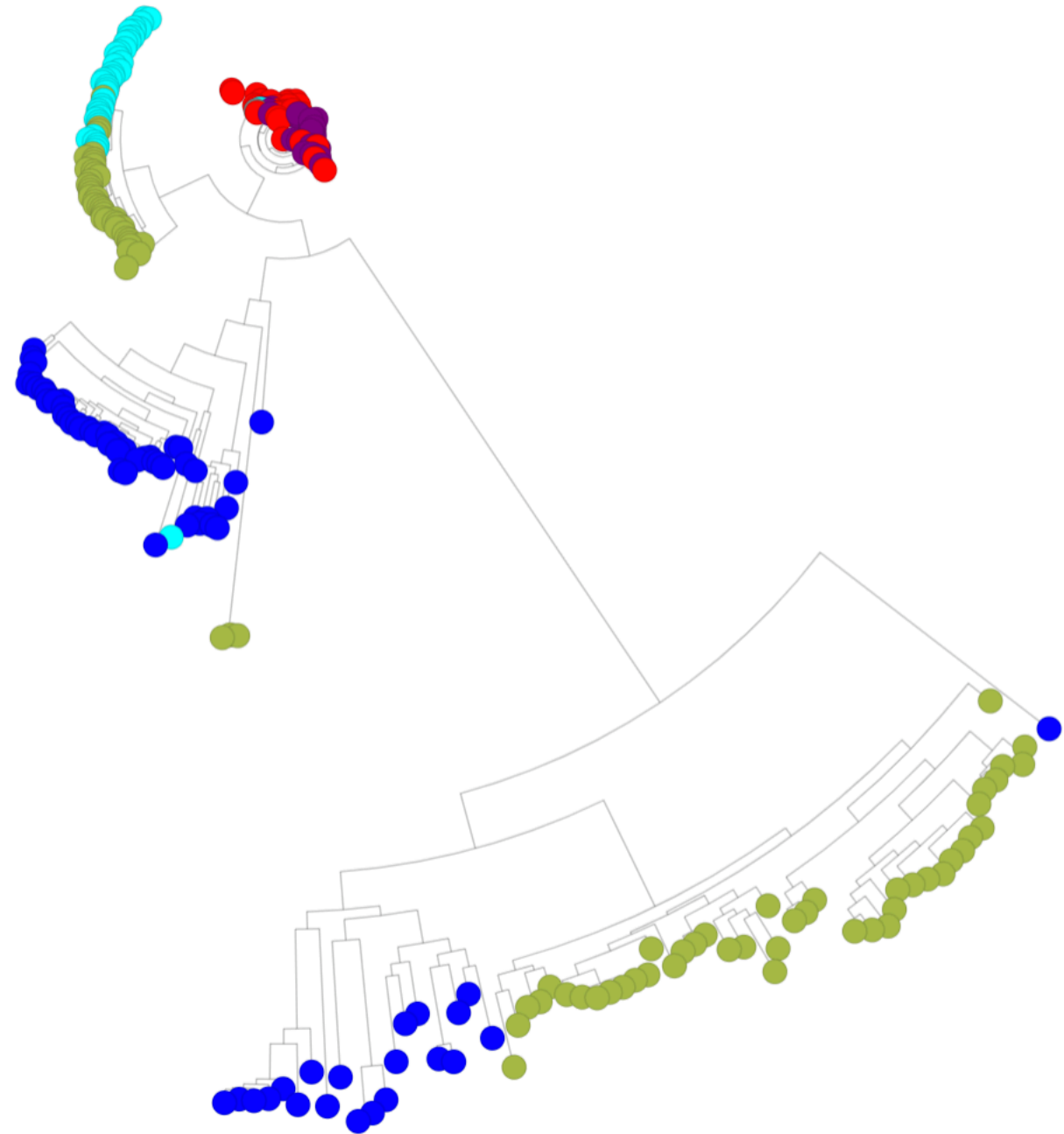
11 BiotinCarboxy



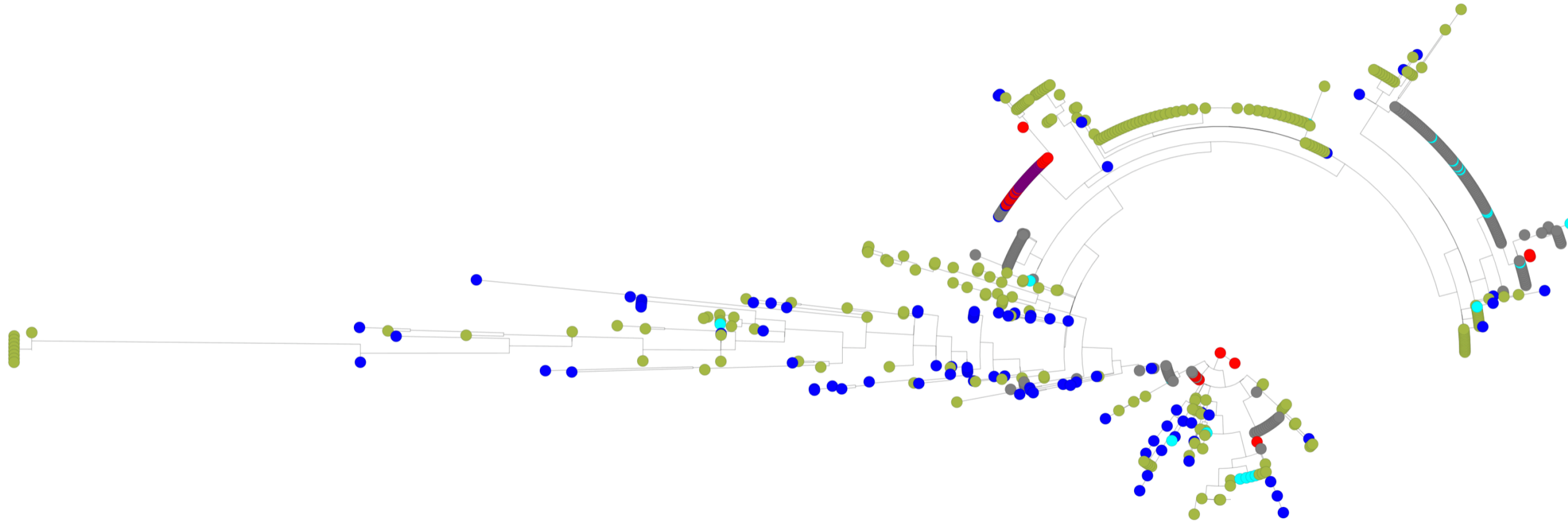
12 Enoyl-CoA Hydratase



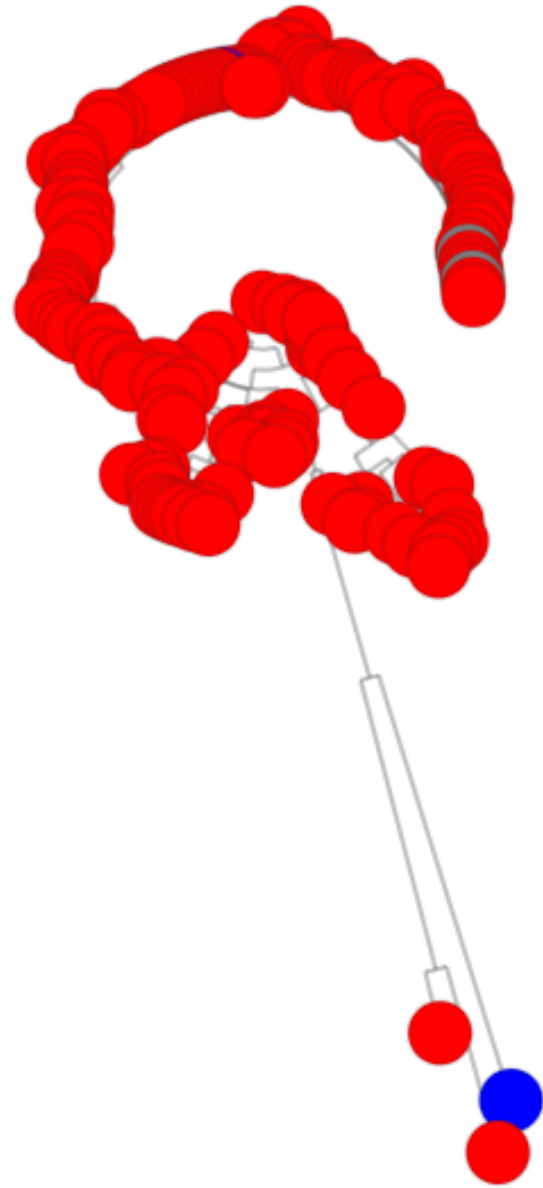
# 13 CarboxylTransf



# 14 Acyl-CoaDeyC-terminusDos



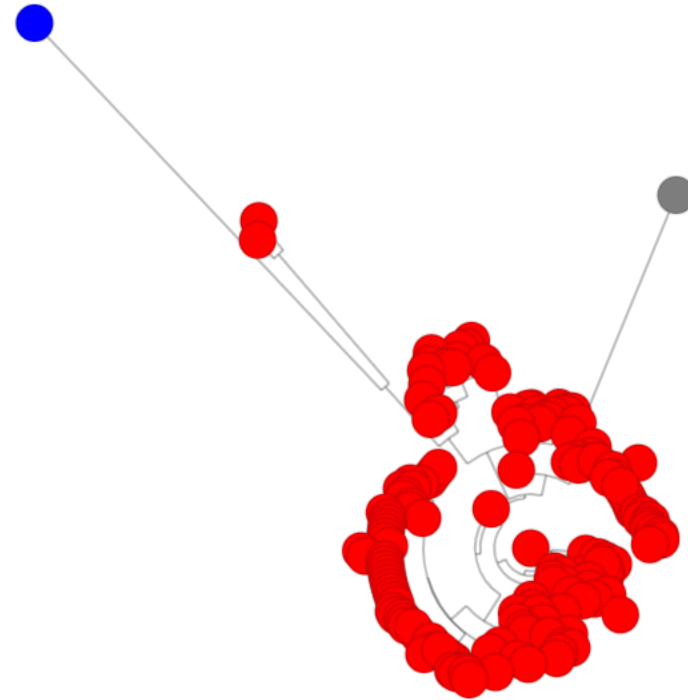
15 CisUnsaturation



16 Glyce3PDehy

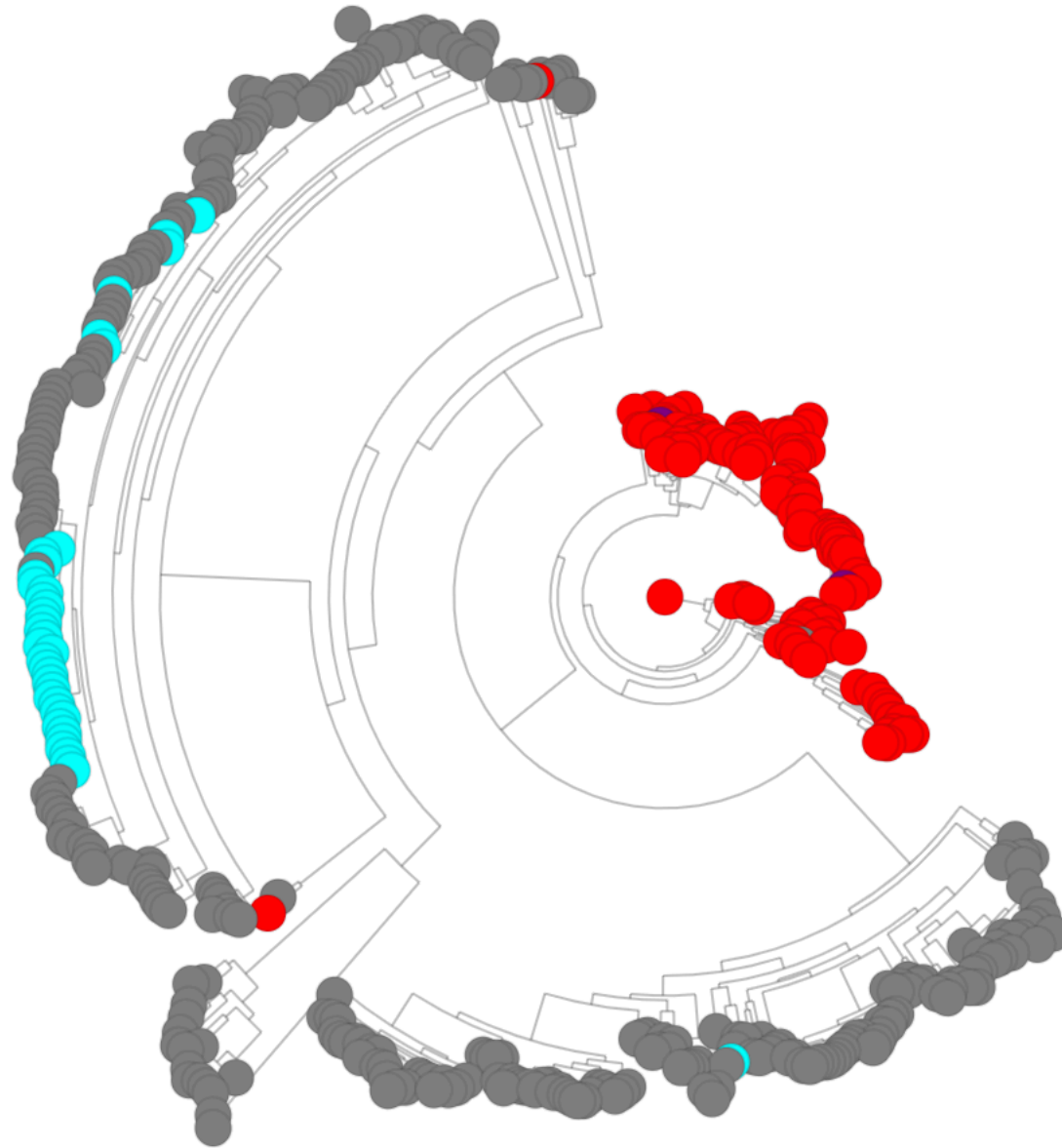


# 17 Malonyl-CoA





## 18 PhospholipaseD



## 20 FAOxidation

