



Muzio, Federico Matías

Identificación de genes y moléculas involucradas en el antagonismo de hongos fitopatógenos en el aislamiento probiótico vegetal *Pseudomonas donghuensis* SVBP6



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.
Atribución - No Comercial 2.5
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.5/ar/>

Documento descargado de RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes de la Universidad Nacional de Quilmes

Cita recomendada:

Muzio, F. M. (2025). *Identificación de genes y moléculas involucradas en el antagonismo de hongos fitopatógenos en el aislamiento probiótico vegetal Pseudomonas donghuensis SVBP6. (Tesis de doctorado). Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina. Disponible en RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes*
<http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/5025>

Puede encontrar éste y otros documentos en: <https://ridaa.unq.edu.ar>

Identificación de genes y moléculas involucradas en el antagonismo de hongos fitopatógenos en el aislamiento probiótico vegetal *Pseudomonas donghuensis* SVBP6

TESIS DOCTORAL

Federico Matías Muzio

federico.m.muzio@gmail.com

Resumen

Un ecosistema que, en particular, ha requerido de un acercamiento más comprensivo y holístico de los organismos que lo componen y las relaciones entre ellos, es el suelo terrestre. El suelo se define como la capa o capas de material mineral y/o orgánico, conteniendo líquidos, gases y biota, que son afectadas por procesos físicos, químicos y/o biológicos en la superficie planetaria (o cerca de ella), y que proporciona soporte para la vida vegetal (Van Es 2017). El suelo es reconocido como el hábitat más complejo de la Tierra, ya que se estima que contiene un tercio de todos los organismos vivos y modula la actividad de los organismos responsables del funcionamiento y la evolución de los ecosistemas terrestres (Paul et al. 2015). Asimismo, su impacto en el desarrollo de mayoría de las civilizaciones humanas a lo largo de la historia, como consecuencia de la agricultura, ha sido un factor clave en el desarrollo y sostenibilidad de las poblaciones humanas (Mazoyer et al. 2006, Fuller et al. 2019).

Sin embargo, en los inicios del estudio del suelo, su composición y capacidad de sustentar el crecimiento vegetal era entendido sólo desde los componentes abióticos que lo componen y sus características geológicas, dejando de lado el rol de sus habitantes y las relaciones entre ellos. El enfoque comienza a variar a principios de los 90's dónde, en paralelo el desarrollo de la hipótesis Gaia, los primeros estudios del efecto de los organismos asociados al suelo en su totalidad y la interacción entre ellos comienza a tomar relevancia. Inspirado por el enfoque de Lovelock, Nico van Breemen discute en el artículo "Soils as Biotic Constructs Favouring Net Primary Productivity" (Van Breemen 1993) cómo la conjunción de interacciones bióticas juega un papel crucial en la fertilidad de los suelos, mejorando el soporte y la sostenibilidad de la vida vegetal. Van Breemen describe cómo las actividades

biológicas dentro del suelo, incluyendo la interacción entre plantas, microorganismos y otros organismos del suelo, pueden influir en la productividad primaria neta y analiza su efecto sobre la propia viabilidad de la comunidad biótica, en concordancia con la hipótesis Gaia. Este trabajo contribuyó al inicio de la comprensión más profunda de los suelos no solo como medios pasivos de crecimiento de plantas, sino como ecosistemas dinámicos con interacciones biológicas complejas que afectan su salud y productividad. De esta forma, independientemente del impacto que las interacciones biológicas en el suelo puedan tener sobre la sostenibilidad de sus propias comunidades, analizar estas interacciones en su conjunto y su efecto sobre la composición, estructura y comunidad del suelo ha resultado vital para el estudio de este ecosistema complejo y vital para la actividad humana (Brussaard 1997, Freckman et al. 1997, Rillig et al. 2006, Maestre et al. 2010).

"Identificación de genes y moléculas involucradas en el antagonismo de hongos fitopatógenos en el aislamiento probiótico vegetal *Pseudomonas donghuensis* SVBP6"

Autor:

Lic. Federico Matías Muzio

Director:

Dr. Claudio Valverde

Co-directora:

Dra. Betina Cecilia Agaras

Tesis para optar por el título de

Doctor en Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Quilmes

Agradecimientos

El trabajo aquí presente es fruto, por sobre todo, de las personas que me acompañaron en el camino. Ningún experimento o palabra que compone esta tesis fue hecha sin el apoyo de los seres con los que afortunadamente he podido cruzarme. El aporte académico, técnico, moral y personal de todas las personas mencionadas en estos agradecimientos es indivisible este trabajo y su breve mención no pretende siquiera comenzar a transmitir el enorme sentimiento de aprecio y humilde agradecimiento que me habita luego de estos años de doctorado.

En primer lugar, es mi deseo agradecer a toda las personas que conforman o conformaron el LFGBBP. La bibliografía entera de esta tesis en su conjunto y cualquier otro texto académico que pueda adicionar no alcanza a recopilar una infinitésima parte de lo que pude aprender de mis compañeros y directores durante estos años. Asimismo, me gustaría agradecer especialmente:

A Andy, por ser el excelente compañero y amigo que es. No hay forma de medir la cantidad de cosas con las que me ayudó y lo mucho que disfruté de su compañía todos estos años. Desde electroporar células, pasando por hacer 20 km de bicicleta a diario, hasta no quedarnos sin tema de conversación en horas de viaje juntos.

A Mel, con quien arranqué mi carrera de grado y desde entonces nunca nos separamos. No comprendo mi vida académica o laboral sin ella como compañera y amiga. La pera la comés ahora y esa banana estaba negra desde que la agarraste, no mientas.

A Meli (o Mini-Fede), en quien encontré una amiga que, lamentablemente para ella, me veo cada vez más reflejado. SVBP6 *team*. Lo que tenés que lavar en la bacha son tus Erlemeyers.

A Bel, por ser mi amiga en los mejores y peores momentos. Por su incansable capacidad de escuchar y comprender. Gracias por dejarme cargar una plancha de madera por todo Quilmes. Y a Pampa por ser el mejor murciélago del mundo.

A Juli, promotora nro. 1 de la productividad, gracias por las largas discusiones científicas del más alto nivel.

A Pato, por su incondicional ayuda en lo que sea que necesitara, sin importar lo absurdo. De última siempre podía culpar al profesor de microbiología.

A Ari, por sus indispensables y únicos mates, así como las tardes de helado y café.

A Yani, por nuestras charlas de recatada solemnidad.

A Beti, no sólo por el enorme aporte a las bases de esta tesis, sino por su apoyo como co-directora todos estos años. Gracias por cada uno de tus mails así como por tu apoyo para la docencia y sus charlas. ¡Y por supuesto los postres!

Y por último, a Claudio, por su inagotable paciencia y su predisposición a dedicarme un rato en cualquier momento. No hay reunión de la que no me haya ido sintiéndome mejor con mi trabajo, con nuevas ideas o sin nada aprendido. Gracias nuevamente por la paciencia, especialmente durante la última parte de mi doctorado, donde si no fuese por él hubiese perdido el rumbo.

Más allá del hermoso grupo de trabajo del que fui parte, me gustaría agradecer:

A mis amigos del Functional Metabolomics lab, en Tübinguen: Paolo, Alicia, Sibgha, Abzer, Albert, Stelio y Nike. Por darme un hogar del otro lado del mundo y por todo lo que pasamos (y sobrevivimos) juntos.

Quiero agradecer a Nani, cuya mención es doble y con intereses; su paso por mi vida es innegable e invaluable. Gracias por todo el cariño y por ser mi compañera tantos años.

Gracias Romi por todo el apoyo emocional durante la escritura de esta tesis, sin tu apoyo y constante soporte moral, no hubiese sido posible.

Gracias Nado y Lauti por la ayuda en la portada de esta tesis y por hacer de su casa un segundo hogar y ser mis amigos incondicionales.

Gracias a mis compañeros de cursada y amigos de mi paso por la UNQ, Chechu, Agus, Leti, Javi, Vale y Juli.

Gracias al resto de mis amigos, que afortunadamente son muchos para nombrarlos a todos. Pero cada uno de ustedes sabe lo mucho que aprecio que me acompañen con su amistad y lo importantes que fueron para todo esto. Entre muchos otros: Catri, Joaco, Tomi, mis amigos de la pirámide (Ferpa, Agus, Gordo), María, Cler, Mel y todos los que estuvieron antes, ahora y después.

Gracias a mis mascotas de toda la vida, Ema y Lucy, cuya lealtad y amor nunca muere dentro mío. También a Betún, con el que ambos aprendimos a habitar nuestro propio espacio. Aunque su paso fue corto, no había momento en el que yo estuviese solo si él estaba cerca de mí esperando por una caricia, con una mirada cómplice que sólo sucedía entre nosotros dos.

Por último, me gustaría agradecer a mi familia, que me ha dado su apoyo incondicional no sólo en esta, sino en todas las etapas de mi vida. Gracias mamá por inculcarme un profundo interés en la naturaleza y el estudio de ella. Gracias papá por nunca decir que no, por tu complicidad y por todo lo que siempre me enseñaste. Gracias Eugenia por ser mi primer y mejor enemiga.

A mis abuelos, Beba y Eduardo. No hay ni va a haber nada como ellos en mi vida. Gracias por darme todo y más, incluido el infinito amor que me dieron todos y cada uno de los 30 años de mi vida. Es mi más profundo deseo que no sea necesaria ni una palabra para que entiendan lo mucho que los amo y lo que les agradezco. Que aunque sea en la infinidad de un instante la tormenta del tiempo que se cierne sobre sus vidas, amaine para que puedan recordarlo.

Y el final de las palabras es ALMSIVI

Índice de contenidos

Agradecimientos	3
Introducción general.....	8
El suelo: Un ejemplo de la interconectividad e interdependencia de la vida.....	8
Orígenes biológicos del suelo y el suelo como hábitat.	9
La rizósfera, <i>hot spot</i> de actividades e interacciones biológicas.	12
Interacciones planta-microorganismo en la rizósfera.	16
Mecanismos de promoción directa del crecimiento vegetal.....	17
Mecanismos de promoción indirecta del crecimiento vegetal.....	19
Los fitopatógenos y el microbioma del suelo	22
El biocontrol de enfermedades en el suelo	25
Metabolitos secundarios o especializados como mecanismo de biocontrol	27
El género <i>Pseudomonas</i> y el biocontrol.....	28
Metabolitos de <i>Pseudomonas</i> relevantes para el biocontrol de fitopatógenos	31
Organización y control de la expresión de genes asociados a la biosíntesis de metabolitos de actividad antimicrobiana en <i>Pseudomonas</i>	39
La cascada regulatoria Gac-Rsm	40
<i>Pseudomonas donghuensis</i> : Fuente de actividades biológicas de interés potencial biocontrolador y captador de hierro.	43
El aislamiento de suelos agronómicos <i>P. donghuensis</i> SVBP6.....	44
Hipótesis y objetivos:	47
Capítulo 1: “Determinación del componente principal del antagonismo antifúngico de <i>P. donghuensis</i> SVBP6”	48
Introducción.....	49
Hipótesis de trabajo	52
Objetivos específicos	52
Materiales y Métodos	53
Conservación y crecimiento de cepas bacterianas	53
Conservación y crecimiento de aislamientos fúngicos	54
Herramientas <i>in silico</i> para el análisis de secuencias de ADN y función génica	54
Ensayos de antagonismo <i>in vitro</i>	55
Evaluación del espectro UV-Visible de sobrenadantes y extractos	55

Extracción de sobrenadantes de espectro compatible con 7HT	55
Evaluación de cinéticas de cultivo y producción de 7HT	56
Cuantificación de la actividad antifúngica de sobrenadantes y extractos.....	56
Análisis químico del extracto de SVBP6.....	58
Preparación de 2,3- y 2,7-dimetoxi-tropolona	59
Obtención de cristales de 7HT	59
Resultados y discusión	60
Identificación y descripción <i>in silico</i> de un cluster génico biosintético hipotéticamente vinculado a la actividad antifúngica de <i>P. donghuensis</i> SVBP6.....	60
Confirmación del antagonismo a hongos fitopatógenos <i>in vitro</i> de mutantes de <i>P. donghuensis</i> SVBP6.	63
Señales espectrofotométricas compatibles con 7-hidroxitropolona en el sobrenadante libre de células de <i>P. donghuensis</i> SVBP6 y mutantes en estudio	65
Extracción de moléculas con señales espectrales compatibles con 7-hidroxitropolona a partir de sobrenadante de cultivo de SVBP6.	69
Actividad antifúngica de extractos del sobrenadante de cultivo de <i>P. donghuensis</i> SVBP6.	70
Confirmación de la identidad del factor bioquímico con actividad antifúngica mayoritaria del extracto del sobrenadante de <i>P. donghuensis</i> SVBP6: 7-hidroxitropolona.....	74
Actividad antifúngica de 7-hidroxitropolona.	76
La biosíntesis de 7-hidroxitropolona y su actividad antifúngica son afectadas marginalmente por la presencia de Fe ⁺²	82
La inhibición de hongos fitopatógenos por <i>P. donghuensis</i> SVBP6 a través de la biosíntesis de 7-hidroxitropolona, un metabolito antifúngico independiente de la disponibilidad de hierro.....	84
Conclusiones	88
Anexo A	89
Capítulo 2: “Análisis multi-ómico comparativo de nuevos BGCs y metabolitos especializados en <i>P. donghuensis</i> SVBP6”	92
Introducción.....	93
Hipótesis de trabajo	99
Objetivos específicos	99
Materiales y Métodos	100
Conservación y crecimiento de cepas bacterianas	100
Conservación y crecimiento de aislamientos fúngicos	101
Transformación de pME7402 en SVBP6 por electroporación	101
Extracción de “señal Gac” a partir de cultivos de SVBP6.....	101

Expresión de P_{rsmZ} - <i>gfp</i> para el monitoreo de la actividad de GacS.	102
Determinación y toma de muestras para el análisis multi-ómico.	102
Re-secuenciación del genoma de la cepa SVBP6	104
Análisis transcriptómico del impacto de la mutación <i>gacS</i>	104
Análisis proteómico del impacto de la mutación <i>gacS</i>	105
Análisis metabolómico del impacto de la mutación <i>gacS</i>	106
Resultados y discusión	108
GacS regula la actividad antimicrobiana en la cepa <i>P. donghuensis</i> SVBP6.	108
Impacto transcriptómico global de la pérdida de función de <i>gacS</i> en SVBP6.	111
Impacto proteómico global de la pérdida de función de <i>gacS</i> en SVBP6.	116
Impacto metabolómico de la pérdida de función de <i>gacS</i> en SVBP6.	122
GacS controla la expresión de BGCs novedosos y la abundancia de sus correspondientes metabolitos especializados en SVBP6.	127
Conclusiones	131
Anexo B	133
Conclusiones y perspectivas	137
Bibliografía	138

Introducción general

El suelo: Un ejemplo de la interconectividad e interdependencia de la vida

“El rango completo de la materia viva en la Tierra, desde las ballenas hasta los virus y desde los robles hasta las algas, podría considerarse como constituyendo una única entidad viva capaz de mantener la atmósfera de la Tierra para adaptarse a sus necesidades generales y dotada de facultades y poderes mucho más allá de los de sus partes constituyentes.” (Lovelock 1979)

En 1972, James Lovelock propuso la hipótesis de "Gaia", basada en estudios sobre la composición de la atmósfera y su relación con la materia viva. Junto con la microbióloga Lynn Margulis, Lovelock acuñó este concepto para referirse a la noción de la biósfera como un sistema de control activo y adaptativo capaz de mantener la Tierra en homeostasis con la vida misma. Gaia describe a la biósfera y a todas las partes de la Tierra con las que interactúa como una entidad hipotética con propiedades emergentes que no pueden predecirse a partir de la suma de sus partes. Esencialmente, el concepto sugiere que la evolución de la vida en nuestro planeta modifica factores abióticos para crear condiciones progresivamente más favorables para sí misma (Lovelock *et al.* 1974). Esta hipótesis ha enfrentado numerosas críticas a lo largo de los años, citando ejemplos con evidencia geológica y paleontológica en los que la vida misma ha tenido un efecto "biocida". Por ejemplo, la aparición de oxígeno en la atmósfera (la "Gran Oxidación") durante la era Paleoproterozoica, causada por los primeros organismos fotosintéticos oxigénicos (Holland 2006), y las consecuentes eras glaciales asociadas al mismo fenómeno (Hoffman *et al.* 1998). Esto ha llevado incluso a causar la proposición de hipótesis opuestas a Gaia (como la hipótesis "Medea"), donde el desarrollo de la vida conduce a su propia desaparición (Ward 2009). Sin embargo, a pesar de señalar las deficiencias de la hipótesis de Lovelock y Margulis, el consenso continúa reconociendo el valor de Gaia como perspectiva holística sobre la biósfera, generadora de nuevas y mejores concepciones acerca de la naturaleza y las interconexiones que la componen. La hipótesis de Gaia abrió las puertas a una comprensión más integrada de la biósfera, concibiéndola como un sistema adaptativo con un intrincado conjunto de interrelaciones entre la biota y el entorno abiótico (Kirchner 2002, Lenton *et al.* 2002, Tyrrell 2013).

Un ecosistema que, en particular, ha requerido de un acercamiento más comprensivo y holístico de los organismos que lo componen y las relaciones entre ellos, es el suelo terrestre. El **suelo** se define como la capa o capas de material mineral y/o orgánico, conteniendo líquidos, gases y biota, que son afectadas por procesos físicos, químicos y/o biológicos en la superficie planetaria (o cerca de ella), y que proporciona soporte para la vida vegetal (Van Es 2017). El suelo es reconocido como el hábitat más complejo de la Tierra, ya que se estima que contiene un tercio de todos los organismos vivos y modula la actividad de los organismos responsables del funcionamiento y la evolución de los ecosistemas terrestres (Paul *et al.* 2015). Asimismo, su impacto en el desarrollo de mayoría de las civilizaciones humanas a lo largo de la historia, como consecuencia de la agricultura, ha sido un factor clave en el desarrollo y sostenibilidad de las poblaciones humanas (Mazoyer *et al.* 2006, Fuller *et al.* 2019).

Sin embargo, en los inicios del estudio del suelo, su composición y capacidad de sustentar el crecimiento vegetal era entendido sólo desde los componentes abióticos que lo componen y sus características

geológicas, dejando de lado el rol de sus habitantes y las relaciones entre ellos. El enfoque comienza a variar a principios de los 90's dónde, en paralelo el desarrollo de la hipótesis Gaia, los primeros estudios del efecto de los organismos asociados al suelo en su totalidad y la interacción entre ellos comienza a tomar relevancia. Inspirado por el enfoque de Lovelock, Nico van Breemen discute en el artículo "*Soils as Biotic Constructs Favours Net Primary Productivity*" (Van Breemen 1993) cómo la conjunción de interacciones bióticas juega un papel crucial en la fertilidad de los suelos, mejorando el soporte y la sostenibilidad de la vida vegetal. Van Breemen describe cómo las actividades biológicas dentro del suelo, incluyendo la interacción entre plantas, microorganismos y otros organismos del suelo, pueden influir en la productividad primaria neta y analiza su efecto sobre la propia viabilidad de la comunidad biótica, en concordancia con la hipótesis Gaia. Este trabajo contribuyó al inicio de la comprensión más profunda de los suelos no solo como medios pasivos de crecimiento de plantas, sino como ecosistemas dinámicos con interacciones biológicas complejas que afectan su salud y productividad. De esta forma, independientemente del impacto que las interacciones biológicas en el suelo puedan tener sobre la sostenibilidad de sus propias comunidades, analizar estas interacciones en su conjunto y su efecto sobre la composición, estructura y comunidad del suelo ha resultado vital para el estudio de este ecosistema complejo y vital para la actividad humana (Brussaard 1997, Freckman *et al.* 1997, Rillig *et al.* 2006, Maestre *et al.* 2010).

Orígenes biológicos del suelo y el suelo como hábitat.

El conjunto de hábitats determinado por el suelo en el que vive la comunidad de organismos asociados a él está constituido por una interacción compleja de geología, clima, actividad microbiana y vegetación. Debido a que los suelos proporcionan una amplia gama de condiciones y nichos biológicos, estos son capaces de sostener una enorme biomasa y biodiversidad (Voroney 2007). La formación del suelo tiene tanto orígenes abióticos, como la erosión de rocas por exposición al sol, agua y variaciones de temperatura como orígenes ligados al desarrollo de los organismos habitando en él, siendo las plantas el principal arquitecto determinante de las condiciones que definen sus hábitats (Lambers *et al.* 2009). En concordancia con el estudio de sus comunidades, existe evidencia de que la formación primigenia del suelo tiene sus orígenes en la acción de diversos tipos de organismos interaccionando entre sí, responsables de la colonización de los ambientes terrestres. Incluso los primeros fósiles de raíces descubiertos hasta la fecha poseen evidencia de interacción entre las raíces y la microbiota del suelo (Brundrett 2002). Sin embargo, la relación entre los ecosistemas biológicos y la formación del suelo se remonta a tiempos aún más lejanos. Sintéticamente, se pueden trazar los orígenes biológicos del suelo a los eones pre-cámbricos cuando, en los albores de la vida, grandes "alfombras" microbianas compuestas por bacterias y algas dominaban los ecosistemas acuáticos tempranos. Estas esteras eran altamente productivas, contribuyendo significativamente al total de la biomasa terrestre, así como a la oxigenación de la atmósfera. La acumulación y sedimentación en tierra firme de la materia orgánica de estas esteras llevó a la formación de depósitos estratificados que, aunque no podía ser considerados suelos verdaderos, proporcionaron la base necesaria para la formación futura del suelo. Posteriormente, a medida que la vida en la Tierra se complejizaba, la llegada de gusanos y artrópodos durante el período Cámbrico tuvo como consecuencia el mezclado de los depósitos biológicos con los minerales, así como una mejor oxigenación del pre-suelo, promoviendo el desarrollo de las comunidades microbianas asociadas a él. Finalmente, la formación de lo que entendemos como suelo moderno, viene de la mano de la evolución

y establecimiento de plantas vasculares en el período Devónico tardío. Las plantas vasculares contribuyeron a la formación del suelo al producir detrito biológico, como celulosa y lignina, que se descomponían lentamente y facilitaban la formación de estructuras de suelo más complejas, que promovieron la actividad microbiana en él. Asimismo, una vez que estas plantas desarrollaron raíces, el proceso de disgregado de las rocas fue acelerado por su crecimiento y las actividades de la microbiota asociada. Las raíces permitieron, adicionalmente, retener el sedimento, protegiendo el suelo de la erosión. Así, el desarrollo de las plantas vasculares no solo transformó la dinámica de los ecosistemas terrestres, sino que también estableció las condiciones necesarias para la proliferación de una biodiversidad compleja y resiliente. En resumen, la evolución del suelo como hábitat biológico está íntimamente ligada a la coevolución de la biota terrestre y la geología del planeta. Desde los orígenes primitivos y microbianos de la vida, hasta la complejización de los ecosistemas terrestres con la aparición de las plantas vasculares, el suelo ha sido tanto un producto como un motor del desarrollo de la vida en la Tierra, que constituiría la base de los ecosistemas terrestres modernos (Ponomarenko 2015, Lyons *et al.* 2024).

La co-evolución de microorganismos, plantas y animales ha sido fundamental en el establecimiento de las condiciones de los hábitats que conforman el suelo moderno. Esta interrelación compleja y multifacética propone la siguiente pregunta: ¿Qué factores conforman las condiciones de los hábitats del suelo? Los suelos son ensamblajes complejos de hábitats extremadamente diversos, lo que ciertamente se explica por la biodiversidad presente en ellos (Ramette *et al.* 2007). El hábitat del suelo está influenciado por una combinación de factores abióticos y bióticos (también llamados edáficos). Entre los factores abióticos más importantes se encuentran la disponibilidad de nutrientes, la humedad, la aireación y la temperatura, los cuales a su vez, afectan de manera determinante la actividad biológica y los procesos bioquímicos en el suelo, que componen los factores bióticos. Resulta vital, entonces, considerar la abundancia y disponibilidad de sustancias clave para el desarrollo de la biota asociada al suelo: agua, materia orgánica, sustancias inorgánicas relevantes para la biología, y oxígeno.

La biogeoquímica de la solución del suelo está determinada principalmente por reacciones ácido-base y redox. Es decir, el flujo de protones y electrones en la solución del suelo definen el entorno químico que controla la actividad biótica. Conceptualmente, ambos pueden considerarse como flujos desde regiones de alta concentración hacia regiones de baja concentración, con la actividad microbiana del suelo teniendo un efecto profundo en la regulación de este flujo (Paul *et al.* 2015, Wilpiseski Regina *et al.* 2019). La actividad metabólica de los organismos del suelo produce electrones durante la oxidación de la materia orgánica, que deben ser transferidos a un aceptor de electrones, siendo el oxígeno el más relevante en suelos bien drenados (aeróbicos). El oxígeno contenido en el aire del suelo y disuelto en solución acuosa se consume dependiendo de la actividad de los organismos y se repone mediante la difusión dependiente de su porosidad. Si las tasas de consumo de oxígeno son altas debido a una abundante oferta de materia orgánica fácilmente descomponible, o si la difusión de O₂ en el suelo se ve impedida por anegamiento o tamaños de poros restringidos debido a la textura arcillosa o compactación del suelo, las concentraciones de O₂ en solución continuarán agotándose. Cuando se ha utilizado todo el O₂ disuelto disponible, la actividad biológica del suelo cambia de aeróbica a anaeróbica, dependiendo del movimiento de electrones hacia aceptores de electrones alternativos (Paul *et al.* 2015).

Por otro lado, la temperatura afecta de maneras muy distintas a los procesos físicos, químicos y biológicos que ocurren en el suelo. Mientras que las tasas de difusión molecular siempre aumentan con el incremento de la temperatura, la solubilidad de los gases en la solución del suelo no lo hace y puede

incluso disminuir. La relación entre la temperatura y los procesos biológicos es compleja, ya que las especies individuales difieren en su respuesta óptima a la temperatura. Diferentes comunidades microbianas están activas a medida que cambian las temperaturas y los microorganismos son capaces de adaptarse alterando su fisiología y mecanismos celulares, como la fluidez y permeabilidad de la membrana, y la flexibilidad estructural de enzimas y proteínas.

Otro factor determinante en el suelo, así como para el resto de los ecosistemas biológicos, es la presencia de agua. Químicamente, el agua actúa como un solvente y reactivo de reacciones químicas y biológicas claves para la biología del suelo. Por lo cual, la humedad disponible para los organismos es determinante, definiendo además estado de aireación del suelo, el estado químico y concentración de materiales solubles, la presión osmótica y el pH de la solución del suelo. Adicionalmente, el agua actúa físicamente como un agente de transporte por flujo de masa y como un medio a través del cual los reactivos se difunden hacia y desde los sitios de mayor actividad biológica. De especial importancia en el sistema del suelo, y para las células microbianas en particular, es el hecho de que el agua se adsorbe fuertemente a las superficies de las partículas del suelo mediante enlaces de hidrógeno e interacciones dipolares, determinado su estructura.

Los agregados del suelo, que son pequeñas agrupaciones de minerales y carbono orgánico, juegan un papel fundamental en la estructura espacial del suelo y en la facilitación de los procesos biogeoquímicos. Estos agregados proporcionan micro hábitats para los microorganismos, permitiendo la coexistencia de diferentes comunidades microbianas que interactúan entre sí y con el entorno abiótico. La estructura de los agregados influye en la retención de agua, la disponibilidad de nutrientes y la aireación del suelo, todos factores críticos para la actividad microbiana y la salud general del suelo (Wilpiszeski Regina *et al.* 2019).

Un componente central en la biología del suelo es la materia orgánica (SOM, sigla de la expresión en inglés *Soil Organic Matter*). La materia orgánica del suelo desempeña un papel fundamental en el sostenimiento de las comunidades microbianas, dado que constituye la fuente de carbono y energía esencial para los microorganismos, determinando directamente su actividad y diversidad. Los microorganismos, a su vez, son responsables de la descomposición de la SOM, liberando nutrientes que son vitales para el crecimiento de las plantas y otros organismos. Además, la calidad y cantidad de la SOM pueden determinar la estructura de la comunidad microbiana y sus funciones dentro del suelo. Se ha demostrado que cambios en la SOM, ya sea por prácticas de manejo del suelo o por adiciones de residuos orgánicos, pueden alterar significativamente la composición y actividad de las comunidades microbianas (Condrón *et al.* 2010). Por ejemplo, la adición de abonos orgánicos a largo plazo puede aumentar la cantidad de SOM y promover la formación de agregados del suelo, lo que a su vez favorece la diversidad y abundancia microbiana (Bending *et al.* 2002). Esto resalta la importancia de la SOM no solo como un reservorio de nutrientes, sino también como un factor clave en la promoción de un suelo saludable y productivo a través del mantenimiento de comunidades microbianas robustas y funcionales (Paul 2016).

Por otro lado, otros nutrientes de especial importancia para la actividad biológica son: Nitrógeno, Fósforo, Potasio, Calcio, Magnesio y Azufre, junto con micronutrientes de menor relevancia biológica. El nitrógeno es fundamental para la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos. La principal forma de nitrógeno disponible para las plantas es el nitrato (NO_3^-) y el amonio (NH_4^+). La mineralización del nitrógeno orgánico por microorganismos del suelo transforma la materia orgánica en estas formas inorgánicas biodisponibles. La disponibilidad de nitrógeno está influenciada por factores como el contenido de materia orgánica, la actividad microbiana, las condiciones de humedad y temperatura del suelo.

Por otro lado, el fósforo es crucial para la transferencia de energía y la síntesis de ácidos nucleicos. En el suelo, el fósforo se encuentra en formas orgánicas e inorgánicas, y su disponibilidad está frecuentemente limitada por la fijación a minerales del suelo. Las raíces de las plantas y microorganismos liberan ácidos orgánicos y fosfatasas que ayudan a movilizar el fósforo, haciéndolo disponible para su absorción. La biodisponibilidad del fósforo también depende del pH del suelo, con una mayor disponibilidad en suelos ligeramente ácidos.

El potasio es esencial para la regulación osmótica y la activación de enzimas. A diferencia del nitrógeno y el fósforo, el potasio no se integra en compuestos orgánicos de plantas. La disponibilidad de potasio está influenciada por la capacidad de intercambio catiónico del suelo y la presencia de minerales arcillosos que pueden fijar potasio en formas no disponibles para los organismos.

El calcio, magnesio y azufre son importantes para diversas funciones estructurales y metabólicas en las plantas y otros organismos. El calcio es fundamental para la integridad de las paredes celulares vegetales, el magnesio es el núcleo de la molécula de clorofila, y el azufre es parte de aminoácidos esenciales como la cisteína y la metionina. La disponibilidad de estos nutrientes depende de la mineralización de la materia orgánica, la disolución de minerales del suelo y la capacidad de intercambio iónico del suelo.

Con respecto a los micronutrientes, elementos como hierro (Fe), manganeso (Mn), zinc (Zn), cobre (Cu), molibdeno (Mo) y boro (B) son necesarios en pequeñas cantidades, pero son cruciales para el funcionamiento de enzimas y otros procesos metabólicos. La disponibilidad de micronutrientes está altamente influenciada por el pH del suelo, la presencia de materia orgánica y las interacciones con otros nutrientes (Comerford 2005).

La rizósfera, *hot spot* de actividades e interacciones biológicas.

A pesar de la gran biodiversidad de la microbiota presente en el suelo (10^7 - 10^{12} células por gramo de suelo, Watt *et al.* (2006)) y su rol central en los procesos biogeoquímicos, su localización se encuentra restringida a hábitats microscópicos, que representan el 1% total del volumen del suelo (Young *et al.* 2008). Debido al dinamismo de factores determinantes de las condiciones del suelo y la consecuente heterogeneidad de la distribución de nutrientes en él (particularmente el carbono aportado por la SOM (Hodge *et al.* 2000)), los microorganismos se encuentran mayoritariamente en inactividad debido a limitaciones nutricionales (Blagodatskaya *et al.* 2013). Sin embargo, existen microambientes cubriendo pequeños volúmenes de suelo con intensidades de interacción y actividad biológicas mayores al resto del suelo, denominados "*hot spots*" de actividad microbiana. Asimismo, aún dentro de estos microambientes, las condiciones pueden ser altamente dinámicas, conllevando una variabilidad de intensidad y velocidad de procesos biológicos a lo largo del tiempo. Es por eso, que a aquellos eventos a corto plazo o secuencias de eventos que conllevan un aumento en los parámetros biológicos por dentro o por fuera de los *hot spots*, se los denomina "*hot moments*". Los instantes de alta actividad biológica pueden determinar la formación de un *hot spot* o no estar relacionados con uno, sin embargo, los *hot spots* se mantienen aún por fuera de los *hot moments* (Kuzakov *et al.* 2015).

Cómo se menciona previamente, uno de los factores determinantes de *hot spots* de alta actividad microbiana es la materia orgánica (carbono orgánico) biodisponible de un momento o sitio específico. Es

por eso que algunos de los *hot spots* más relevantes que dependen de la abundancia y distribución de la SOM en el suelo. Los principales ejemplos de estos son:

Detritósfera: Consiste en el depósito de residuos de materia orgánica recalcitrante sobre la base mineral del suelo, cómo la acumulación de material vegetal muerto, y la consecuente actividad microbiana aumentada. (Kögel-Knabner 2002).

Bioporos: Definidos por el aumento de actividad microbiana consecuencia del aporte de material orgánico asociado a las deposiciones de animales y al material orgánico procesado en el aparato digestivo de lombrices (Tiunov *et al.* 2004, Schrader *et al.* 2007).

Superficie de los agregados: La superficie de los agregados recibe un flujo de material orgánico de otros ambientes del suelo (como la rizósfera o el detritósfera) proveniente de la humedad que cumple el rol de transportar estos nutrientes, determinando una mayor actividad biológica (Kaiser *et al.* 2012).

Rizósfera: Se define como la porción del suelo inmediatamente circundante a las raíces vegetales e influenciada por el crecimiento de estas, determinando uno de los *hot spots* de mayor actividad y relevancia para el suelo (Hinsinger *et al.* 2009).

La diversidad bacteriana en el suelo es alta, con estimaciones que sugieren que más de 2,000 especies habitan en 0,5 g de suelo, lo que constituye una diversidad tres órdenes de magnitud mayor que en todos los demás compartimentos ambientales de los ecosistemas de la Tierra combinados (Curtis *et al.* 2002, Crawford *et al.* 2005, Schloss *et al.* 2006, Hinsinger *et al.* 2009). Sin embargo, esta riqueza de especies disminuye gradualmente, a medida que se avanza hacia las proximidades de las raíces (entorno rizosférico, o **rizósfera**), a pesar de un significativo aumento en la densidad de la comunidad (Figura 1) (Hacquard *et al.* 2015). La etimología de la palabra rizósfera proviene del griego “*rhiza*” (raíz) y “*phera*” (esfera), haciendo alusión al espacio tridimensional del suelo directamente influenciado por las raíces. La misma fue definida inicialmente por el científico alemán Lorenz Hiltner (Hiltner 1904) como “la zona de suelo inmediatamente adyacente a las raíces de las leguminosas que respalda altos niveles de actividad bacteriana”. A lo largo del tiempo, su definición ha evolucionado para incluir también partes de tejidos radiculares y el suelo circundante más allá del inmediatamente adyacente a la raíz, sin embargo, en esencia, la rizósfera representa el área influenciada por el crecimiento de las raíces vegetales y los exudados asociados a ellas, donde ocurren interacciones vitales entre las plantas y los microorganismos del suelo (Pinton 2007). En base a esta última definición, se define al resto del suelo carente de influencia por la raíz como suelo “a granel” (*bulk soil*) y se clasifican, entre otras, tres regiones diferentes en la rizósfera, listadas a continuación (Figura 1):

Endorizósfera: Tejido perteneciente a las raíces de la planta, incluyendo la endodermis y las capas corticales, en dónde comunidades de microorganismos pueden establecerse.

Rizoplano: Consiste en la superficie de las raíces donde las partículas de suelo y microorganismos se adhieren. Contiene a la capa de polisacáridos exudados por la raíz, las células que las recubren (epidermis).

Ectorizósfera (a veces llamada simplemente, rizósfera): Comprende el suelo inmediatamente adyacente a la raíz, por fuera del rizoplano, pero bajo la influencia de las raíces de las plantas y sus exudados (Edwards *et al.* 2015).

Como se menciona previamente, el efecto que ejerce la raíz sobre la zona circundante y el suelo en la misma es lo que define la rizósfera y la establece como un *hot spot* de actividad microbiana. ¿Cómo es la influencia de las raíces sobre la vida microbiana y través de que sustancias ejerce este efecto sobre el suelo circundante? Las plantas y sus raíces conforman la base de la biodiversidad, siendo de vital importancia su aporte de carbono a los ecosistemas terrestres tanto debajo como encima del suelo (Hinsinger *et al.* 2009). El depósito de carbono orgánico de las plantas al suelo se denomina rizodeposición y es realizado a través de tres mecanismos principales: El aporte de la propia masa de las raíces, muertas o vivas; la liberación de dióxido de carbono, resultado de la respiración de las raíces o de la flora asociada a ellas; la liberación de mucílago y los exudados radiculares, que se definen como las secreciones de compuestos orgánicos de las raíces de la planta hacia la rizósfera y son de especial relevancia para la microflora rizosférica (Cheng *et al.* 2007).

El suministro de exudados al suelo es de particular interés, dado que constituyen el principal aporte nutricional de la planta a la microbiota del suelo y son consideradas las interacciones planta-microorganismo de mayor relevancia y complejidad (Raaijmakers *et al.* 2009). Durante los distintos estadios del desarrollo de las plantas, las plantas son capaces de liberar una variedad de compuestos orgánicos a través de sus raíces (Nguyen 2009, Prashar *et al.* 2014). La descarga de estas sustancias alcanza el equivalente del 15 al 60 % de la producción fotosintética total, acumulando reservas sustanciales de carbono y energía que constituyen a la rizósfera como un ambiente rico en nutrientes, al compararlo con el *bulk soil*, para el desarrollo de la microflora (Lynch *et al.* 1990). Los exudados radiculares actúan como fuerza promotora de comunidades prósperas de microorganismos, convirtiendo la rizósfera en un *hot spot* de actividades biológicas llevadas a cabo por dichas comunidades (Prashar *et al.* 2014). La naturaleza bioquímica de los compuestos liberados por las raíces posee una gran diversidad, dada la variedad de procesos de los cuales provienen: azúcares simples y complejos, aminoácidos, ácidos orgánicos, fenoles, alcoholes, polipéptidos, proteínas, hormonas y enzimas (Prashar *et al.* 2014). De estos compuestos, los principales tipos liberados pasivamente son los azúcares, aminoácidos y ácidos orgánicos. Estos últimos son de particular relevancia, ya que se ha observado que son la fuente de carbono de preferencia de bacterias rizosféricas (Oburger *et al.* 2009, Zhelnina *et al.* 2018). Las moléculas presentes en exudados pueden difundir pasivamente desde el citoplasma de las células vegetales, que contiene concentraciones de tres órdenes de magnitud mayores a las soluciones en el suelo circundante (mM vs μ M, respectivamente) (Neumann *et al.* 2000). Asimismo, también se conocen transportadores específicos para estos compuestos en la epidermis vegetal (Bai *et al.* 2015). Sin embargo, todavía existen grandes incógnitas acerca de los mecanismos a través de los cuales algunas moléculas son capaces de ser exudadas en la rizósfera (Korenblum *et al.* 2022).

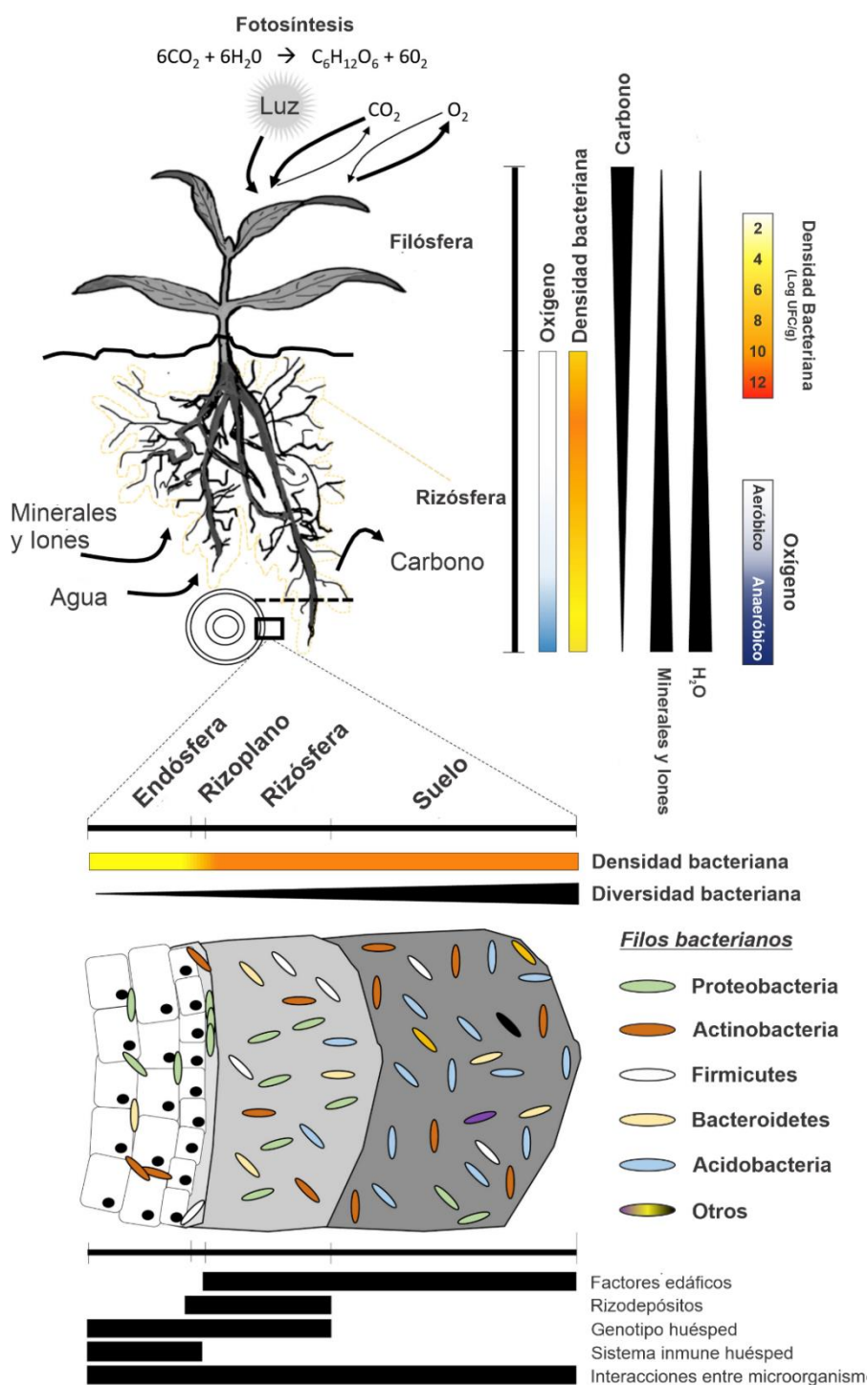


Figura 1: Segmentación espacial de la microbiota de la raíz de la planta. En este esquema, se indican los principales flujos de nutrientes, así como del oxígeno, en relación con la densidad bacteriana. Abajo, se muestran la distribución de la microbiota a lo largo del continuo suelo-endósfera en la raíz. Para cada compartimento, se ilustran la densidad bacteriana, la diversidad bacteriana y los principales filos representativos. Los principales factores que impulsan el establecimiento de la comunidad en estos compartimentos distintos se representan con barras negras. Adaptado de (Hacquard et al., 2015).

Las plantas son capaces de modificar la composición y cantidad de exudados en función de condiciones ambientales. Por ejemplo, en respuesta al estrés de deficiencia de fósforo o hierro, las células son capaces de aumentar el eflujo de carboxilatos (malato, citrato y oxalato) a través de proteínas de canal aniónico presentes en el plasmalema, permitiendo la captación de estos nutrientes gracias a la capacidad de formar complejos de estas moléculas (Neumann *et al.* 2000). Las propiedades quelantes de los ácidos orgánicos también son relevantes para la detoxificación de la rizósfera, por ejemplo, en plantas resistentes al aluminio (Barceló *et al.* 2002).

Asimismo, esta capacidad de secretar moléculas en función de condiciones ambientales variables también es capaz de modificar la composición de la microbiota de la rizósfera. La planta en sí misma es un factor determinante de la microbiota de la rizósfera. Las raíces seleccionan poblaciones microbianas específicas y moldean la composición del microbioma en su entorno y en los tejidos internos (Bulgarelli *et al.* 2012, Bai *et al.* 2015, Uroz *et al.* 2019). Características relacionadas con la planta, como los cultivares, la edad de la planta y las propiedades de las raíces, han demostrado influir en la diversidad de las especies microbianas predominantes en la rizósfera (Prashar *et al.* 2014). Los participantes de estas comunidades asociadas a la rizósfera incluyen bacterias, hongos, nematodos, protozoos, algas y microartrópodos. Dado el efecto rizosférico de las raíces en el suelo, las composiciones, abundancias e interacciones entre dichas poblaciones evidencian estar altamente influenciados por la presencia y estado de las plantas (Raaijmakers 2001, Raaijmakers *et al.* 2009). Por ejemplo, la edad y la etapa de desarrollo de la planta desempeñan un papel crítico en la estructura de la comunidad bacteriana en la rizósfera. La rizósfera de una planta joven está habitada principalmente por bacterias de estrategia *r* (es decir, especies bacterianas que tienen tasas de crecimiento rápidas y utilizan sustratos simples proporcionados por la rizodeposición). Sin embargo, a medida que el proceso de envejecimiento continúa, la dominancia se desplaza hacia comunidades bacterianas con tasas de crecimiento relativamente lentas (estrategas *k*) y la capacidad de degradar sustratos más complejos a medida que la planta altera sus exudados (Prashar *et al.* 2014).

A modo de síntesis, las plantas son el organismo determinante del carbono orgánico en el suelo, el cual constituye uno de los parámetros más importantes para los organismos asociados a este ambiente. Este rol es llevado a cabo principalmente por la deposición en forma de exudados los cuales, a su vez, son herramientas adaptativas de la planta hacia diversas condiciones, otorgándole la capacidad de influenciar los ecosistemas de microorganismos asociados a ella.

Interacciones planta-microorganismo en la rizósfera.

Se estima que el número de células de microorganismos colonizando las plantas es más alto que la suma de las células vegetales en ellas, particularmente debido a aquellas que colonizan la rizósfera (Mendes *et al.* 2013). La liberación de exudados de bajo peso molecular fácilmente aprovechables de parte de las raíces atraen ciertos microorganismos a la rizósfera, donde proliferan hasta densidades que pueden ser varios órdenes de magnitud mayores que en el *bulk soil* (Marschner 2012). Muchos miembros de esta comunidad tienen un efecto neutro en la planta, pero son parte de la compleja red alimentaria que utiliza la gran cantidad de carbono que es fijado por la planta y liberado en la rizósfera. Asimismo, la comunidad microbiana en la rizósfera también alberga miembros que ejercen efectos perjudiciales o beneficiosos en la planta. Los microorganismos que afectan negativamente el crecimiento y la salud de las plantas incluyen hongos, oomicetes, bacterias y nematodos fitopatógenos, mientras que los microorganismos que son

beneficiosos incluyen hongos micorrízicos y rizobacterias promotoras del crecimiento de plantas (conocidos como **PGPR**, sigla de la expresión en inglés *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria*) (Raaijmakers *et al.* 2009).

El número y la diversidad de microorganismos perjudiciales y beneficiosos están relacionados con la cantidad y calidad de los rizodepósitos que, a su vez, determinan las interacciones microbianas que también moldean el ambiente rizosférico (Figura 2) (Somers *et al.* 2004). Por ejemplo, la exudación de ácidos orgánicos (ácido málico y fumárico) liberados por las raíces de plátano son cruciales para la colonización de *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 en las raíces del hospedador. Se ha demostrado que *B. amyloliquefaciens* NJN-6, originalmente aislado de la rizósfera de las plantas de plátano, protege estas plantas contra dos especies de hongos del género *Fusarium* y promueve su crecimiento (Yuan *et al.* 2015). Asimismo, otro ácido orgánico liberado en los exudados radiculares que ejerce una presión selectiva sobre las poblaciones rizosféricas, es el oxalacetato. El oxalatrofismo (la habilidad de utilizar oxalacetato como fuente de carbono), demostró ser una propiedad exclusiva de cepas benéficas del género *Burkholderia* de una colección de 41 especies, estando ausente en cepas patogénicas como *Burkholderia plantari* o *Burkholderia glumae* (Kost *et al.* 2014). Como se mencionó previamente, el aporte de carbono de la planta a la rizósfera puede alcanzar el equivalente del 15 al 60 % de la producción fotosintética total de la planta (Lynch *et al.* 1990). La selección por parte de la evolución de las plantas de este enorme aporte de su propio sustento para modificar la microbiota rizosférica se explica por los variados y sustanciales beneficios que a su vez obtienen las plantas por ello. Por ejemplo, la variedad de tomate “Hawaii 7996” es capaz de enriquecer su rizósfera de la bacteria *Flavobacterium* TRM1, la cual es capaz de suprimir la infección por la bacteria *Ralstonia solanacearum* en plantas de laboratorio. Se demostró que, en contraste con la variante de tomate “Moneymaker”, las plantas de “Hawaii 7996” son resistentes a la enfermedad causada por *R. solanacearum*, cualidad que permanece en el suelo al reemplazarla por la variedad susceptible (Kwak *et al.* 2018). Esto constituye un ejemplo de cómo estas interacciones pueden llegar a ser incluso variedad-específicas, dónde existen pequeñas pero determinantes variantes en el diálogo bioquímico planta-microbiota.

Mecanismos de promoción directa del crecimiento vegetal

¿A través de qué mecanismos contribuyen estos microorganismos “beneficiosos” al crecimiento vegetal? Los mecanismos de promoción del crecimiento de las plantas se han agrupado tradicionalmente en mecanismos directos e indirectos (Figura 2), aunque la diferencia entre los dos no siempre es evidente. Los mecanismos indirectos, como regla general, son aquellos que ocurren fuera de la planta, mientras que los mecanismos directos son los que ocurren dentro de la planta y/o afectan directamente el metabolismo de la planta (Glick 1995). En función del contexto de este trabajo, en esta sección se mencionarán los principales mecanismos de promoción del crecimiento vegetal directos e indirectos, haciendo hincapié en aquellos reportados para bacterias asociadas a la rizósfera. Sin embargo, cabe mencionar el importante papel que tienen los hongos micorrízicos que poseen actividades de biofertilización, que incluyen, por ejemplo: Facilitación de la absorción de fósforo (Richardson *et al.* 2009, Miransari 2011), translocación de nutrientes del suelo a la planta (Koltai *et al.* 2010, Adeleke *et al.* 2012), estructuración del suelo circundante y formación de agregados (Kwak *et al.* 2018).

Uno de los mecanismos de promoción del crecimiento vegetal directo por parte de los organismos beneficiosos, consiste en la contribución a las necesidades nutricionales de la planta. Como se detalló previamente, el crecimiento y la productividad de las plantas dependen considerablemente de la disponibilidad de nutrientes en la interfaz suelo-raíz, que a su vez está influenciada por una amplia gama de factores, como el tipo de suelo, sus características químico-físicas y las condiciones ambientales. En este contexto, las actividades biológicas de los microorganismos pueden desempeñar un papel importante, denominado “**biofertilización**” (Lugtenberg *et al.* 2009), que le confiere la etiqueta de “beneficiosos” a algunos de ellos. Uno de los mecanismos más relevantes de biofertilización, es llevado a cabo por las bacterias fijadoras de N_2 , como *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*, que pueden formar nódulos en las raíces de plantas leguminosas como la soja, la arveja, el maní y la alfalfa, en los cuales convierten el N_2 en amoníaco, que a diferencia del N_2 , puede ser utilizado por la planta como una fuente de nitrógeno (van Rhijn *et al.* 1995, Spaink *et al.* 2012). Asimismo, existen fijadores de N_2 de vida libre, no asociados a nódulos, que incluyen bacterias de los géneros *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Burkholderia*, *Herbaspirillum*, *Bacillus* y *Paenibacillus* (Goswami *et al.* 2016). Incluso se ha logrado modificar *P. protegens* Pf-5, con los genes codificantes para una nitrogenasa (Setten *et al.* 2013), con la finalidad de que contribuya fijando nitrógeno para la nutrición de plantas de trigo y maíz (Fox *et al.* 2016). Otro ejemplo de biofertilización es la capacidad de algunos microorganismos de aumentar el fósforo biodisponible para ser absorbido por las plantas, a partir de especies químicas incapaces de ser aprovechadas. Aunque existen grandes reservas de fósforo en el suelo, las mismas no se encuentran disponibles para las plantas, dado que estas sólo pueden incorporarlo como fosfato mono- y di- básico (Jha *et al.* 2015). Estas bacterias poseen la capacidad de transformar el fosfato de fuentes orgánicas e inorgánicas, facilitando así el crecimiento de las plantas (Lugtenberg *et al.* 2009). Fuentes minerales como fosfato tricálcico, fosfato de roca y fosfato de aluminio son capaces de ser solubilizadas por la microbiota, facilitando la disponibilidad de fosfato soluble para las plantas. El mecanismo principal de solubilización de fosfato se basa en la secreción de ácidos orgánicos por los microorganismos debido al metabolismo de azúcares. Las bacterias que residen en la rizósfera utilizan los azúcares de los exudados de las raíces, los cuales metabolizan para producir ácidos orgánicos, como el ácido acético, láctico, málico, succínico, tartárico, glucónico, 2-cetoglucónico, oxálico y cítrico. Estos ácidos liberados por los microorganismos actúan como buenos quelantes de los cationes divalentes de Ca^{+2} que acompañan la liberación de fosfatos de compuestos fosfáticos insolubles (Goswami *et al.* 2016). Asimismo, la producción de varias enzimas por parte de microorganismos benéficos, como fosfatasas no específicas, fitasas, fosfonatasas y C-P liasas, los vuelve capaces de aumentar de fósforo disponible para las raíces a partir de compuestos orgánicos en el suelo. Por ejemplo, las C-P liasas son capaces de aportar fósforo biodisponible a partir del clivaje de las uniones carbono-fósforo de moléculas organofosforadas presentes en la materia orgánica del suelo (Lugtenberg *et al.* 2009).

Paralelamente, otro mecanismo involucrado a la promoción directa del crecimiento vegetal en bacterias es la **fitoestimulación**. Algunas bacterias producen sustancias que estimulan el crecimiento de las plantas en ausencia de patógenos, siendo el ejemplo mejor entendido la producción de fitohormonas, como las auxinas. Asimismo, las bacterias PGPR son capaces de sintetizar otras hormonas, así como ciertos volátiles y el cofactor pirroloquinolina quinona (PQQ) que les otorgan la capacidad de estimular el crecimiento vegetal (Lugtenberg *et al.* 2009). Por ejemplo, las auxinas son sintetizadas generalmente a partir del aminoácido triptófano de los exudados en los cuales se desarrollan las bacterias PGPR (Korenblum *et al.* 2022). Es así como diversas especies bacterianas producen auxinas como parte de su metabolismo, incluyendo ácido indol-3-acético (IAA), ácido indol-3-butírico (IBA) o sus precursores. Estas auxinas afectan principalmente el sistema radicular, aumentando su tamaño y peso, el número de ramificaciones

y la superficie en contacto con el suelo. Todos estos cambios llevan a un aumento en su capacidad de explorar el suelo para el intercambio de nutrientes, mejorando así la nutrición y la capacidad de crecimiento de la planta (Gutierrez Manero *et al.* 1996, Jha *et al.* 2015).

Algunas bacterias promotoras del crecimiento de las plantas poseen la capacidad de contribuir en la respuesta a estrés abiótico de las plantas. Las plantas están expuestas a una amplia gama de estrés ambiental, como altas temperaturas, frío, sequía, salinidad, alcalinidad y radiación UV (Goswami *et al.* 2016). El ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) es el precursor de la fitohormona etileno. El etileno se produce naturalmente en las plantas; sin embargo, sus niveles aumentan dramáticamente bajo estrés abiótico, como sequía, salinidad o inundaciones. El etileno, conocido como la hormona del estrés en las plantas, tiene un efecto perjudicial sobre ellas, causando abscisión foliar, senescencia foliar, clorosis, y marchitamiento de flores. Varias bacterias promotoras del crecimiento vegetal poseen la capacidad de producir la enzima ACC deaminasa, que degrada el ACC en amoníaco y α -cetobutirato, lo que impide su conversión a etileno. De esta manera, las PGPR productoras de ACC deaminasa protegen a las plantas bajo estrés abiótico de los efectos perjudiciales del etileno (Mayak *et al.* 2004, Lugtenberg *et al.* 2009, Goswami *et al.* 2016).

Mecanismos de promoción indirecta del crecimiento vegetal

Los términos “control biológico” y su sinónimo abreviado “biocontrol” se han utilizado en diferentes campos de la biología (Pal *et al.* 2006). Para la fitopatología, el **biocontrol** implica la utilización de microorganismos que suprimen enfermedades para mejorar la salud de las plantas. La supresión de enfermedades por agentes de biocontrol es una manifestación sostenida a lo largo del tiempo de las interacciones entre la planta, el patógeno, el agente de biocontrol, la comunidad microbiana en y alrededor de la planta, y su entorno físico (Handelsman *et al.* 1996). Los mecanismos que subyacen al biocontrol contribuyen indirectamente a la salud de la planta, afectando el *fitness* competitivo de los fitopatógenos (Lugtenberg *et al.* 2009). Se pueden destacar las siguientes categorías principales de mecanismos de biocontrol: La producción de sideróforos, la secreción de enzimas degradadoras de componentes celulares, la inducción de la resistencia sistémica de las plantas y la producción de antimicrobianos (Goswami *et al.* 2016).

Los sideróforos son compuestos de bajo peso molecular, generalmente por debajo de 1 kDa, que contienen grupos funcionales capaces de unir hierro de manera reversible. Sus grupos funcionales más frecuentes son hidroxamatos y catecoles, en los que las distancias entre los grupos involucrados son óptimas para unir hierro. Las bacterias productoras de sideróforos generalmente pertenecen al género *Pseudomonas*, siendo *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas aeruginosa* los organismos más estudiados, los cuales liberan tipos de sideróforos como pioquelina y pioverdina (Haas *et al.* 2005). Las bacterias de la rizósfera también liberan estos compuestos para aumentar su potencial competitivo, obstaculizando el crecimiento de patógenos al limitar el hierro disponible para estos (particularmente, en suelos pobres en este nutriente), generalmente hongos, que son incapaces de absorber el complejo hierro-sideróforo (Glick 1995).

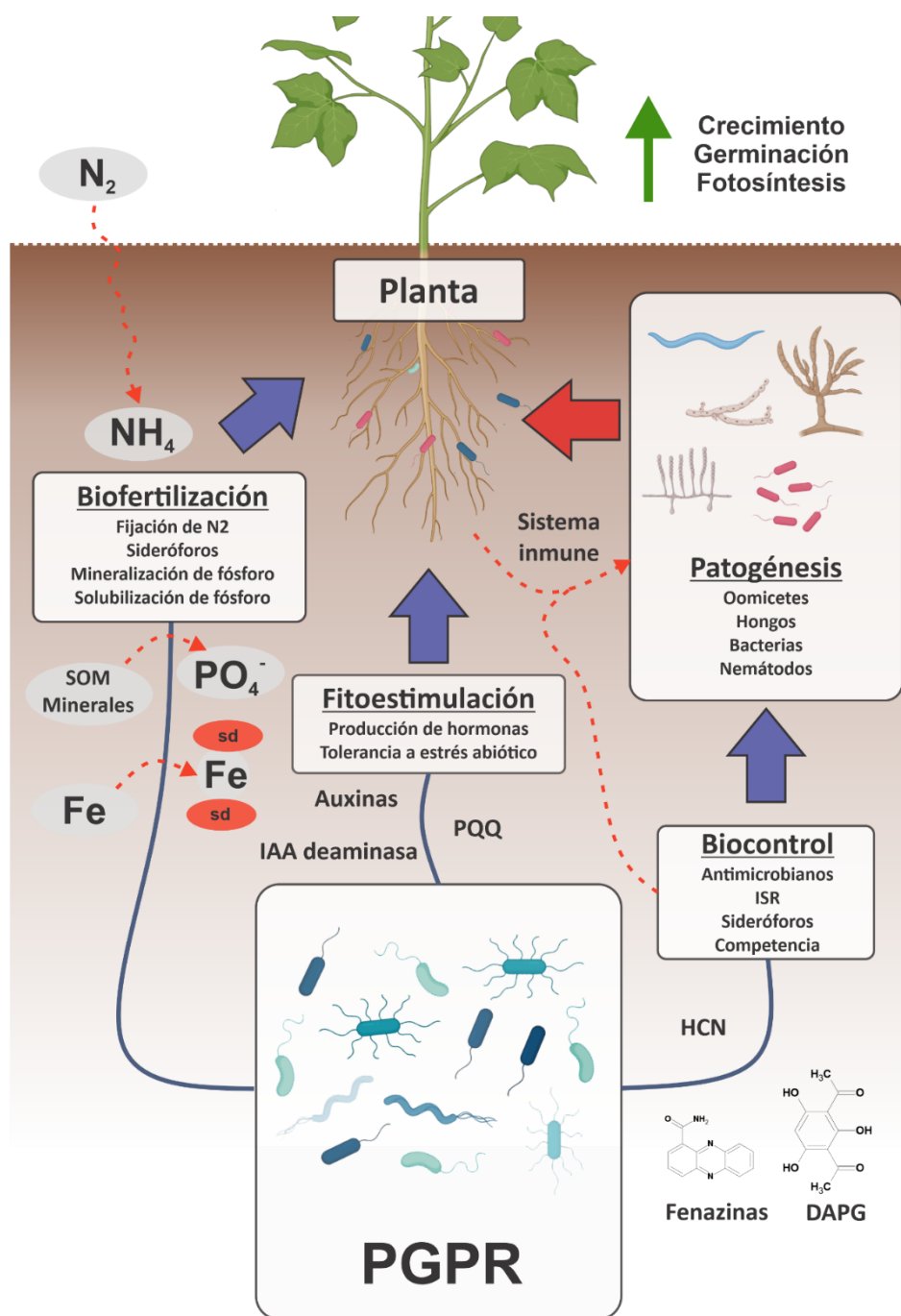


Figura 2: Mecanismos de promoción del crecimiento vegetal en el suelo. Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) facilitan el desarrollo de las plantas a través de varios mecanismos: la biofertilización, que incluye la fijación de nitrógeno (N_2), la solubilización y mineralización de fósforo (PO_4) y la producción de sideróforos para la asimilación de hierro (Fe); la fitoestimulación, mediante la producción de hormonas y la mejora en la tolerancia al estrés abiótico; y el biocontrol, donde las PGPR actúan liberando compuestos antimicrobianos además de inducir resistencia sistémica (ISR) en las plantas. Estos procesos contribuyen en conjunto a un mejor crecimiento, germinación y fotosíntesis en la planta. Información recopilada de (Lugtenberg *et al.* 2009).

Otro de los principales mecanismos utilizados por bacterias para antagonizar hongos del suelo implica la producción de enzimas degradadoras de la pared celular. Estas enzimas, como la β -1,3-glucanasa, quitinasa, celulasa y distintos tipos de proteasas, secretadas por cepas biocontroladoras de PGPR, ejercen un efecto inhibitorio directo sobre el crecimiento de las hifas de los patógenos fúngicos al degradar su pared celular. Por ejemplo, la quitinasa degrada la quitina, un polímero insoluble lineal de β -1, 4-N-acetilglucosamina, que es el componente principal de la pared celular fúngica. Se ha informado que la β -1,3-glucanasa sintetizada por cepas de *Paenibacillus* y *Streptomyces spp.* puede degradar fácilmente las paredes celulares de los patógenos fúngicos *Fusarium oxysporum* (Compant *et al.* 2005). De manera similar, *Burkholderia cepacia* sintetiza β -1,3-glucanasa, que destruye las paredes celulares de los patógenos del suelo *Rhizoctonia solani*, *Pythium ultimum* y *Sclerotium rolfsii* (Compant *et al.* 2005). Los agentes de biocontrol potenciales con actividades quitinolíticas incluyen *Bacillus licheniformis*, *B. cereus*, *B. circulans*, *B. subtilis* y *B. thuringiensis* (Sadfi *et al.* 2001). Entre las bacterias Gram-negativas, *Serratia marcescens*, *Enterobacter agglomerans*, *P. aeruginosa* y *P. fluorescens* han demostrado poseer actividades quitinolíticas (Neiendam Nielsen *et al.* 1999). Otros ejemplos, en particular del género *Pseudomonas*, incluyen *P. stutzeri* YPL-1 (Lim *et al.* 1991), productora de quitinasas y laminarinasas, y *P. aeruginosa* C 32a, productora de β -1,3-glucanasa (Fridlender *et al.* 1993, Suryadi *et al.* 2014).

Por otro lado, ciertas bacterias PGPR ofrecen una estrategia alternativa para proteger a las plantas de enfermedades mediante la inducción de resistencia sistémica (ISR, sigla de la expresión en inglés *induced systemic resistance*). Este proceso, en el cual la presencia de bacterias PGPR provoca una defensa del huésped, se manifiesta mediante la reducción en la severidad o incidencia de enfermedades causadas por patógenos que están espacialmente separados del agente inductor. La resistencia inducida, en su mayoría de carácter no específico, constituye un aumento en el nivel de resistencia basal a varios patógenos simultáneamente. Esto es beneficioso bajo condiciones naturales donde múltiples patógenos están presentes (Van Loon *et al.* 2005, Thakker *et al.* 2011). Cepas de *Pseudomonas*, por ejemplo, son conocidas por inducir resistencia sistémica en clavel, rábano y *Arabidopsis*. En estos casos, la cadena lateral O antigénica de los lipopolisacáridos de la membrana externa de la bacteria actúa como un determinante inductor. Asimismo, los sideróforos del tipo pseudobactina producidos por cepas de *Pseudomonas* inducen resistencia sistémica en tabaco y *Arabidopsis* (Meziane *et al.* 2005), mientras que el sideróforo pseudomonina, induce la producción de ácido salicílico en el rábano, lo que finalmente mejora la defensa de la planta (Raaijmakers *et al.* 1995). Así, las rizobacterias inductoras en las raíces de las plantas producen una señal que se propaga sistémicamente dentro de la planta, aumentando la capacidad defensiva de los tejidos distantes ante la infección subsecuente por patógenos (Van Loon *et al.* 2005).

Muchas bacterias patógenas sólo expresan factores de patogenicidad/virulencia a una alta densidad celular, percibida cuando el nivel de moléculas señal, como acil homoserino lactonas (AHLs), se acumulan en el medio. A este mecanismo se lo denomina “*quorum sensing*” (Bassler 1999). Las AHLs son necesarias, por ejemplo, para la síntesis de enzimas degradadoras de la pared celular vegetal por parte del patógeno *Erwinia carotovora* (Shepherd *et al.* 2009). La interferencia de señales es un mecanismo de biocontrol basado en la degradación de las AHL, por ejemplo, por lactonasas de AHL de cepas de *B. thuringiensis* que hidrolizan el anillo de lactona o por acilasas de AHL que rompen el enlace amida. Recientemente, se ha demostrado que las acilasas de AHL desempeñan un papel en la formación de *biofilms*. La falta de formación de *biofilms* probablemente facilita la inhibición del crecimiento de estos patógenos (Lin *et al.* 2003).

Finalmente, un mecanismo de tipo indirecto particularmente relevante para el presente trabajo es la producción y secreción de moléculas con actividad antimicrobiana en la rizósfera. Metabolitos extracelulares liberados al medio rizosférico por parte de la microbiota benéfica suprimen los patógenos de las plantas, incluso en pequeñas concentraciones. Dos grupos PGPR que son particularmente prolíficos en la biosíntesis de antimicrobianos son las bacterias de los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas*, que poseen un diverso repertorio de moléculas bioactivas en su arsenal a la hora de enfrentarse a fitopatógenos del suelo circundante a las raíces (Goswami *et al.* 2016). A grandes rasgos, estos se pueden categorizar en lipopéptidos, policétidos, péptidos ribosomales y compuestos volátiles (Wang *et al.* 2024). Para el género *Pseudomonas* y otros Gram negativos, algunos de los metabolitos con actividad antimicrobiana más destacados, son el ácido cianhídrico, las fenazinas, el 2,4-diacetil floroglucinol (Phl), la pioluteorina y pirrolnitrina (Lugtenberg *et al.* 2009). Ejemplos de metabolitos liberados por *Bacillus* incluyen compuestos de síntesis ribosomal como la subtilina, subtilisina A y subblancina. Otros, como bacilisina, clorotetaina, micobacilina, rhizotocinas, bacillaene, difficidina y lipopéptidos pertenecientes a las familias surfactina, iturina y fengicina, son formados por sintetasas de péptidos no ribosomales (NRPS) y/o sintetasas de policétidos (PKS) (Leclerc *et al.* 2005). Más detalles acerca de este método de promoción del crecimiento vegetal serán discutidos posteriormente en esta introducción.

Los fitopatógenos y el microbioma del suelo

Las enfermedades de las plantas son la causa de importantes pérdidas económicas para los agricultores en todo el mundo. La *Food and Agriculture Organization* (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura) estima que las plagas y enfermedades son responsables de aproximadamente el 25% de las pérdidas de cultivos (Martinelli *et al.* 2015). Aunque existen diferencias regionales, se estima que las enfermedades reducen típicamente los rendimientos de los cultivos en un 10% cada año en áreas más desarrolladas mientras que, en áreas menos desarrolladas, a menudo supera el 20%. El control de enfermedades es razonablemente exitoso para la mayoría de los cultivos y puede lograrse mediante el uso de plantas que han sido criadas para tener una resistencia adecuada contra muchas enfermedades, mediante enfoques de manejo agronómico como la rotación de cultivos, el uso de semillas libres de patógenos, la fecha y densidad de plantación adecuadas, y mediante el control químico y biológico. La mayoría de estos métodos de protección de plantas pueden influir en el microbioma de las plantas y, por lo tanto, se deben tener en cuenta nuevos conocimientos para mejorar las estrategias de protección de plantas. En muchos casos, las enfermedades están asociadas con desequilibrios o cambios en el microbioma, lo que hace que la explotación y estudio del microbioma sea un objetivo deseable. Analizar el microbioma de las plantas, así como la interacción metabólica con la planta huésped, abre nuevas puertas para tecnologías avanzadas de biocontrol de organismos fitopatógenos (Berg 2015).

Los microorganismos que generalmente son capaces de provocar enfermedades en las plantas se denominan colectivamente patógenos de plantas, o **fitopatógenos**. Las enfermedades de plantas más comunes son causadas por hongos, oomicetes, bacterias, virus, viroides (organismos similares a virus), fitoplasmas, nematodos y plantas parásitas. Entre ellos, se destacan los hongos y bacterias como los grupos más grandes de patógenos de plantas. Una definición clásica de los patógenos de plantas asume que, para cumplir con los postulados de Koch, los microorganismos patógenos deben estar caracterizados

por factores de patogenicidad/virulencia. La patogenicidad se define como la capacidad de un patógeno para infectar y causar enfermedad en una planta huésped particular, mientras que la virulencia, como propiedad cuantitativa, se define como el grado de daño causado al huésped (Sacristán *et al.* 2008). La gravedad de una enfermedad es indirectamente proporcional a la salud de la planta hospedadora (d'Arcy *et al.* 2001). Los patógenos pueden interactuar con una amplia variedad de plantas independientemente del modo de vida (biótrofo, necrótrofo; obligado o facultativo). El rango hospedador de los fitopatógenos puede variar desde unas pocas hasta varios cientos de especies de plantas. En particular, la infección con hongos fitopatógenos ocurre cuando estos ingresan a las plantas a través de aberturas naturales (por ejemplo, estomas), heridas o por penetración directa del tejido vegetal. En contraste, las bacterias solo pueden ingresar a las plantas a través de heridas o aberturas naturales (Berg *et al.* 2017). Además de un estilo de vida patogénico endofítico en una planta huésped, los patógenos fúngicos, pueden adoptar un estilo de vida no patogénico cuando crecen sobre plantas no huéspedes (Freeman *et al.* 2001, Berg *et al.* 2013). Por ejemplo, el hongo *Rhizoctonia solani* puede causar síntomas graves en diversos cultivos, aunque mantiene cierta especificidad de huésped que lo hace inocuo a plantas fuera de su rango hospedador (Gonzalez Garcia *et al.* 2006).

Los hongos y oomicetes son reconocidos como los patógenos del suelo más importantes. Los hongos son organismos eucariotas, filamentosos, multicelulares y heterotróficos que producen una red de hifas llamada micelio y absorben nutrientes del sustrato circundante (Alexopoulos *et al.* 1996). Los oomicetes tienen una morfología similar a los hongos, pero filogenéticamente están más estrechamente relacionados con las algas pardas. Producen esporas nadadoras (zoosporas) y contienen celulosa en sus paredes celulares, a diferencia de la quitina en los hongos verdaderos. No obstante, los mecanismos de parasitismo y las enfermedades que causan son similares a los hongos verdaderos y, por lo tanto, se suelen considerar en conjunto. Un ejemplo de un oomicete fitopatógeno de relevancia, son los miembros del género *Pythium*, los cuales son responsables de marchitez en plántulas de diversos vegetales (Parveen *et al.* 2015). Por ejemplo, *P. ultimum* causa la marchitez de plántulas de zinnia, algodón y repollo (Zagade *et al.* 2012). La mayoría de los hongos del suelo son necrótrofos, lo que significa que matan el tejido del huésped con enzimas y toxinas previo al avance de las hifas y no requieren una célula viva para obtener nutrientes. En contraste, la mayoría de los patógenos biotrófos, como las royas y los mildius polvorientos, se encuentran en las partes aéreas de las plantas y si requieren una célula viva para obtener nutrientes. Llamativamente, pocos patógenos de raíces son biotrófos. Algunos ejemplos son los hongos zooespóricos inferiores y oomicetes, como *Plasmodiophora brassicae* y *Plasmopara halstedii*. También existen patógenos de raíz semi-biotróficos, como por ejemplo *Phytophthora sojae*. La mayoría de los patógenos necrótrofos son generalistas con un amplio rango de hospedadores, a diferencia de los patógenos biotrófos con rangos de hospedadores estrechos que han co-evolucionado con la planta. Por lo tanto, generalmente no hay estructura de razas dentro de las poblaciones de patógenos necrótrofos ni resistencias específicas de un solo gen en las plantas (Raaijmakers *et al.* 2009).

Uno de los fitopatógenos de mayor impacto agronómico son los hongos del género *Fusarium*. El *Fusarium head blight* (FHB) es una de las enfermedades fúngicas más importantes que afectan a los granos de cereales. Originalmente considerada como una enfermedad secundaria, su ocurrencia ha aumentado debido al uso de sistemas de labranza cero (reducción de la perturbación del suelo), el uso de genotipos susceptibles y la baja rotación de cultivos. Hoy en día, FHB es considerada una de las enfermedades más devastadoras que reducen la calidad y el rendimiento de los cereales (Dinolfo *et al.* 2017). FHB ha sido responsable de grandes pérdidas económicas a nivel mundial. Por ejemplo: En 1993, la producción de

trigo en Minnesota, Estados Unidos, mostró una reducción del 33%, con pérdidas económicas estimadas en 1 billón de dólares (Dill-Macky 1997). En Uruguay, un brote serio en 1977 mostró una disminución del 50% en la producción de trigo (de Ackermann *et al.* 1997). En Argentina, las pérdidas de rendimiento fueron estimadas entre 20-30% en los años 1945-1946, 1978, 1985 y 1993 (De Galich 1996). El género *Fusarium* comprende un gran número de hongos con capacidad reconocida para ser patógenos de plantas de cereales como la cebada, el trigo y la avena. Se ha detectado la presencia de diferentes especies de *Fusarium* colonizando diversos sustratos. Una de ellas, *Fusarium graminearum*, es el principal agente causal de la enfermedad FHB y ha sido aislado de cebada (Leslie *et al.* 2006), trigo (Gilbert *et al.* 2004), soja (Pioli *et al.* 2004), papas (Ali *et al.* 2005), maíz (Leslie *et al.* 2006), sorgo (Menkir *et al.* 1996) y arroz (Nyvall *et al.* 1999). Además del complejo de FHB, existen otras especies de *Fusarium* que causan daños significativos en varios cultivos. *F. oxysporum* es un componente importante de la microflora del suelo y es responsable de pérdidas a nivel mundial. Considerado uno de los patógenos de plantas transmitidos por el suelo más importantes, los aislamientos patógenos de *F. oxysporum* producen enfermedades de marchitez y pudrición mediante la proliferación del hongo en los sistemas radiculares de plantas de importancia económica como el tomate, el algodón y el banano (Leslie *et al.* 2006, Laurence *et al.* 2012). Otro ejemplo de un *Fusarium* fitopatógeno es *Fusarium semitectum*, el cual se encuentra ampliamente distribuido en suelos y partes aéreas de plantas en regiones subtropicales y tropicales. *F. semitectum* es causante del podredumbre y marchitez en plantas de frijoles, melones, bananas y alfalfa (Latiffah *et al.* 2013).

Otra enfermedad que afecta gravemente en cultivos de relevancia agronómica es la “podredumbre carbonosa” (*charcoal rot*), causada por el hongo fitopatógeno *Macrophomina phaseolina*. La podredumbre causada por *Macrophomina* es una de las 5 enfermedades más importantes para el cultivo de soja, causando enormes pérdidas económicas en los principales países productores (Estados Unidos, Brasil, Argentina, China, India, Paraguay, Canadá, Indonesia, Bolivia e Italia en 1998 (Kaur *et al.* 2012)). *M. phaseolina* puede infectar a más de 500 familias de plantas, causando la podredumbre carbonosa, llamada así debido a la coloración oscura que se imparte a los tejidos vegetales colonizados. Este patógeno es principalmente transmitido a través del suelo, con una especificidad de huésped heterogénea, es decir, la capacidad de infectar tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas y una distribución no uniforme en el suelo (Mayék-Pérez *et al.* 2001, Su *et al.* 2001). La infección por *Macrophomina* causa mortalidad de plantas tanto antes como después de su emergencia. Los síntomas característicos después de la emergencia incluyen el desarrollo de lesiones en forma de huso con un borde oscuro y un centro gris claro cubierto de pequeños microesclerocios y, ocasionalmente, picnidios. Los esclerocios permiten que el hongo sobreviva durante períodos prolongados en el suelo (Baird *et al.* 2003).

La presencia ubicua de patógenos potenciales en el suelo plantea la incógnita de si el brote de ciertas "enfermedades del microbioma" no siempre depende de la diversidad microbiana simplemente. Se conoce que la resistencia de la comunidad microbiana a la invasión de patógenos está relacionada con su nivel de diversidad (Jousset *et al.* 2011, Van Elsas *et al.* 2012, Mallon *et al.* 2015) y que la ausencia de ciertos microorganismos del suelo pueden apoyar los brotes de enfermedades (Blaser 2014). El microbioma de cada planta forma una red, de la cual se pueden analizar patrones de co-ocurrencia de microorganismos. La fuerza y la conexión de la red son cruciales para el éxito o fracaso de la invasión de patógenos y también para el establecimiento de agentes de biocontrol, lo que vuelve al estudio del microbioma del suelo y sus participantes una clave en el desarrollo de mejores prácticas agrícolas (Berg 2015, Cardinale *et al.* 2015).

El biocontrol de enfermedades en el suelo

Originalmente, se definieron los suelos supresivos como aquellos en los que el patógeno no se establece ni persiste, se establece pero causa poco o ningún daño, o se establece y causa enfermedad por un tiempo, pero luego la enfermedad se vuelve menos importante, aunque el patógeno pueda persistir en el suelo (Baker *et al.* 1974). En contraste, la enfermedad ocurre fácilmente en suelos no supresivos (o conducentes) donde las condiciones abióticas y bióticas son favorables para el patógeno. Los suelos supresivos de enfermedades son ejemplos destacados de la protección mediada por el microbioma contra infecciones de raíces causadas por patógenos transmitidos del suelo. La base microbiológica de los suelos supresores de enfermedades fue abordada por primera vez por (Henry 1931) y posteriormente ampliamente demostrada en otros estudios a través de la pasteurización del suelo, la aplicación de biocidas y el trasplante de suelos (Gómez Expósito *et al.* 2017). Además, se han detectado diversidades microbianas más altas en suelos supresores de enfermedades que en suelos propensos a enfermedades (Garbeva *et al.* 2004, Garbeva *et al.* 2006). A partir de estas observaciones y enfoques, se propusieron y, en varios casos, se identificaron diversos microorganismos y mecanismos subyacentes involucrados en la supresión específica de enfermedades. Se distinguen dos tipos de supresividad de enfermedades:

Supresividad General: Se atribuye a la actividad de la comunidad microbiana colectiva y está a menudo asociada con la competencia por los recursos disponibles. La supresividad general de los suelos puede ser potenciada por la adición de materia orgánica.

Supresividad Específica: Es resultado de las actividades concertadas de grupos específicos de microorganismos que interfieren con alguna etapa del ciclo de vida del patógeno transmitido por el suelo. A diferencia de la supresividad general, la supresividad específica puede ser transferida a suelos conducentes mezclando pequeñas cantidades (1-10% p/p) del suelo supresivo con el suelo conducente (Gómez Expósito *et al.* 2017).

Históricamente, la rotación de cultivos es uno de los métodos de protección de plantas más antiguos, citado incluso en enseñanzas bíblicas. La rotación de cultivos es un método altamente eficiente para controlar muchas enfermedades, y esto se puede explicar por la gran especificidad del microbioma de las plantas, que mejora la diversidad microbiana general en el suelo. Una multitud diversa de patógenos existiendo como miembros normales de una comunidad microbiana en el suelo tienen un bajo potencial de brote. Sin embargo, en monocultivos, un aumento de la densidad de patógenos resulta en una enfermedad grave seguida de un aumento de microorganismos antagonistas que, en el mejor de los casos, causan supresividad (Mazzola 2004). Este fenómeno se identifica como una respuesta inmune del suelo a los fitopatógenos (Raaijmakers *et al.* 2016). Una vez descrita la base microbiana de la supresividad de enfermedades en los suelos mediante tratamientos térmicos, biocidas y/o trasplantes de suelo, los siguientes pasos tomados en estudios generalmente comprenden el aislamiento a gran escala y sin objetivos específicos de microorganismos del suelo en general, la rizósfera o el endosfera de plantas cultivadas en suelos supresores de enfermedades, seguido de la prueba de sus actividades contra el patógeno objetivo tanto *in vitro* como *in vivo*. Siguiendo esta línea de investigación, se han propuesto varios géneros microbianos como contribuyentes a la supresividad específica de enfermedades. Estos incluyen *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Enterobacter*, *Alcaligenes*, *Pantoea*, *F. oxysporum* no patógeno, *Trichoderma*, *Penicillium janczewskii*, *Verticillium biguttatum*, *Pochonia chlamydosporia*, *Clonostachys/Gliocadium* y *Pythium oligandrum* (Gómez Expósito *et al.* 2017).

La mayoría de los patógenos transmitidos por el suelo están adaptados para crecer y sobrevivir en el *bulk soil*, pero la rizósfera es el campo de juego y el tribunal de infección donde el patógeno establece una relación parasitaria con la planta. La rizósfera también es un campo de batalla donde la compleja comunidad, tanto la microflora como la microfauna, interactúan con los patógenos e influyen en el resultado de la infección del patógeno (Raaijmakers *et al.* 2009). La rizósfera de suelos caracterizados por su supresividad transferible puede ser una buena fuente de PGPR, aunque los suelos conducentes también contienen PGPR. El rasgo deseable de una buena colonización de raíces puede seleccionarse aislando bacterias que permanezcan adheridas a la superficie de la raíz o que incluso hayan penetrado en los espacios intercelulares entre la epidermis de la raíz y la corteza, después de un lavado exhaustivo de las raíces (Stutz *et al.* 1986). También se pueden usar técnicas de enriquecimiento para obtener colonizadores de raíces competitivos (Hallmann *et al.* 1997). Otro ejemplo de una metodología orientada al aislamiento de buenos colonizadores de raíz consiste en la inoculación de semillas con cepas candidatas, su germinación y desarrollo en un sistema axénico, y posterior aislamiento de las bacterias de la punta de las raíces obtenidas. Este ciclo puede repetirse y debe validarse en suelo natural (Kuiper *et al.* 2002).

Los PGPR biocontroladores deben estar presentes en las raíces en números suficientes para tener un efecto beneficioso en la planta. Por ejemplo, se ha estimado que el nivel crucial de colonización que debe alcanzarse es de 10^5 - 10^6 UFC (Unidades Formadoras de Colonias) g^{-1} de raíz en el caso de *Pseudomonas spp.*, que protegen las plantas de *Gaeumannomyces tritici* o *Pythium spp.* Por lo tanto, suponiendo que las raíces están colonizadas por 10^8 - 10^9 bacterias aeróbicas cultivables, se puede estimar que las *Pseudomonas* biocontroladoras representan normalmente el 0.1–1% de las poblaciones cultivables aeróbicas de rizobacterias en condiciones naturales (Bull *et al.* 1991). Los PGPR introducidos artificialmente pueden colonizar inicialmente las raíces a 10^7 - 10^8 UFC g^{-1} , pero estos niveles siempre disminuyen en unas pocas semanas (Haas *et al.* 2005). Adicionalmente, cabe destacar que estos valores pueden ser especie-específicos, o incluso, cepa-específicos, como es el caso para cepas de *Pseudomonas* reportadas en (Lorch *et al.* 2024). Como ejemplo de la importancia de la capacidad de colonizar las raíces, estudios en *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 demostraron que mutantes defectuosos en actividades asociadas a la colonización perdían su capacidad de antagonizar a *F. oxysporum* (Dekkers *et al.* 2000).

El biocontrol mediado por organismos PGPR puede afectar negativamente la densidad de población, la dinámica (temporal y espacial) y las actividades metabólicas de los patógenos del suelo principalmente a través de tres tipos de interacciones: competencia, antagonismo e hiperparasitismo (Raaijmakers *et al.* 2009). En la rizósfera, la competencia ocurre por espacio en la superficie de las raíces y por nutrientes, especialmente aquellos liberados como exudados de semillas o raíces. Como se mencionó previamente, la colonización competitiva de la rizósfera y el establecimiento exitoso en la zona de las raíces es un requisito previo para un biocontrol efectivo, independientemente del mecanismo involucrado. En el caso de las bacterias PGPR, esto está relacionado adicionalmente, con la regulación de la síntesis de compuestos antagonísticos a través de la densidad celular, a través del *quorum sensing* y otros mecanismos de control de la expresión génica (Blumer *et al.* 1999, Haas *et al.* 2005, Pierson III *et al.* 2007, Babitzke *et al.* 2019). Los mismos serán abordados posteriormente en este trabajo (Blumer *et al.* 1999, Haas *et al.* 2005, Pierson III *et al.* 2007, Babitzke *et al.* 2019). Asimismo, el mecanismo PGPR de liberación de sideróforos ya descrito, puede ser en sí mismo un mecanismo de competencia y biocontrol. Siendo de particular relevancia en suelos calcáreos donde el pH alto conduce a una baja solubilidad del hierro (Raaijmakers *et al.* 2009).

Los efectos directos de biocontrol en patógenos de plantas del suelo pueden resultar del hiperparasitismo. Esto se documenta principalmente para *Trichoderma* y *Gliocladium*, y afecta a varios patógenos fúngicos, como *Rhizoctonia*, *Sclerotinia*, *Verticillium* y *Gaeumannomyces* (Harman *et al.* 2004). El hiperparasitismo por *Trichoderma* implica la secreción de quitinasas y celulasas, que liberan moléculas pequeñas del patógeno objetivo y provocan quimiotropismo hacia el mismo (Zeilinger *et al.* 1999). El contacto se sigue de un enrollamiento de las hifas alrededor de las hifas del patógeno, una digestión enzimática adicional de su pared celular y la penetración por parte de *Trichoderma* (Djonović *et al.* 2007, Vinale *et al.* 2008).

Por último, el biocontrol puede estar mediado por el antagonismo ligado a la producción de metabolitos antimicrobianos secundarios, enzimas líticas y/o efectores. Como se menciona en la sección de mecanismos indirectos de promoción del crecimiento vegetal, la integridad de la pared celular de los patógenos puede ser afectada por enzimas secretadas por PGPR, incluyendo quitinasas, celulasas y proteasas (Mishra *et al.* 2020, Panchal 2022, Malik *et al.* 2023). Los efectores son biomoléculas clave en el biocontrol de fitopatógenos, ya que permiten a las bacterias reducir la virulencia de patógenos y modular la respuesta de las plantas. Un claro ejemplo es la secreción de efectores a través del sistema de secreción tipo III. Este sistema, inicialmente descubierto en bacterias patógenas, permite la introducción directa de efectores en las células huésped eucariotas, donde pueden suprimir la inmunidad de las plantas, manipular su fisiología y favorecer la colonización patógena (Zboralski *et al.* 2022b, Zhang *et al.* 2022).

Metabolitos secundarios o especializados como mecanismo de biocontrol

A pesar del uso común e histórico del término “secundario” para referirse a todo metabolito natural no ligado al crecimiento, el término es digno de controversia, como propone Julian Davies (Davies 2013). En la naturaleza, los microorganismos tienen mayormente tasas de crecimiento lentas y existen principalmente en fase estacionaria, muy lejanos a las condiciones artificiales que definen los metabolitos como “primarios” o “secundarios”. En contraste con lo rutinario en laboratorios de microbiología, la condición en donde los microorganismos se encuentran en “fase de crecimiento” y en cultivos puros, son extremadamente limitadas en los ecosistemas. En condiciones ambientales, prima el desarrollo de comunidades complejas, con dinámicas de crecimiento dependientes de factores de variación continua y errática, así como de las interacciones intra-comunitarias que son definidas justamente por la producción de metabolitos especializados en competir por cada nicho del consorcio microbiano. En este contexto, el uso de metabolitos secundarios resulta antropocentrista y artificial, siendo el término metabolitos “especializados” más adecuado. En este manuscrito se utilizará este término para referirse a aquellos metabolitos que utilizan los microorganismos para adaptarse a su entorno, no ligados directamente con el crecimiento de los mismos, en concordancia con lo expuesto en (Davies 2013).

En las últimas cuatro décadas, numerosos estudios han demostrado que los metabolitos especializados, incluidos los antibióticos, las enzimas y los volátiles producidos por bacterias asociadas al suelo y a las plantas, son factores clave en la supresión de patógenos vegetales. A menudo, los microorganismos antagonistas pueden producir una variedad de metabolitos antimicrobianos especializados diferentes, como los ya mencionados 2,4-diacetilfloroglucinol (DAPG), pirrolnitrina, pioluteorina, fenazinas, lipopéptidos cíclicos y ácido cianhídrico en el caso de ciertas *Pseudomonas*. Los metabolitos antimicrobianos especializados también están involucrados en los efectos antagonistas de hongos como

Trichoderma y *Gliocladium*. La concentración a la que estos compuestos son tóxicos para bacterias patógenas, hongos y nematodos depende del compuesto y del objetivo. En los patógenos fúngicos, pueden afectar la cadena de transporte de electrones (fenazinas, pirrolnitrina), la actividad de metaloenzimas como las oxidasas de citocromo c que contienen cobre (ácido cianhídrico), la integridad de la membrana (biosurfactantes) o la membrana celular y los zoosporos (DAPG, biosurfactantes) (Haas *et al.* 2005, Raaijmakers *et al.* 2006, Kennedy *et al.* 2015). El papel de varios metabolitos antimicrobianos secundarios en la protección de las plantas se ha demostrado mediante la comparación de cepas tipo salvaje y derivados mutantes incapaces de producirlos. Los resultados de estos estudios han indicado que múltiples metabolitos antimicrobianos pueden jugar un papel importante en el mismo patosistema (Haas *et al.* 2005). Por ejemplo, tanto las habilidades de *Pseudomonas protegens* CHAO para producir ácido cianhídrico como DAPG contribuyen a la supresión de la podredumbre negra de la raíz del tabaco mediada por *Thielaviopsis basicola*. Sin embargo, las comparaciones a nivel de población de cepas de biocontrol indicaron que algunos de estos compuestos juegan un papel más significativo que otros en la protección de las plantas. Los metabolitos especializados de tipo antimicrobiano han recibido una atención investigativa extensa, en parte porque se piensa que contribuyen en gran medida a la supresión de enfermedades en el suelo (Nandi *et al.* 2015).

El género *Pseudomonas* y el biocontrol

Pseudomonas fue uno de los primeros géneros procarióticos en ser descritos (Migula 1897). Por ello, está íntimamente ligado a la historia de la bacteriología desde los albores de la ciencia moderna. El género *Pseudomonas* pertenece a las *Gammaproteobacteria*, una clase de bacterias que emergió de los *Hydrobacteria* hace 1,75 mil millones de años, previo a la colonización de la tierra por parte de las plantas (Battistuzzi *et al.* 2009). La historia evolutiva del género *Pseudomonas* se basa en cientos de millones de años medrados principalmente en hábitats acuáticos en ausencia de plantas superiores (Morris *et al.* 2013). Actualmente, es uno de los géneros más ubicuos en el mundo. Las especies de *Pseudomonas* forman un grupo taxonómica y genéticamente diverso de bacterias aeróbicas, Gram-negativas, quimioheterotróficas, móviles y en forma de bacilo (Mercado-Blanco *et al.* 2007). El género se divide en varios grupos filogenéticos con más de 330 especies validadas científicamente, aunque constantemente se describen nuevas especies, incluso durante la escritura del presente trabajo (Liao *et al.* 2024). Muchas de ellas viven en asociación con plantas y animales, principalmente como saprófitas, pero algunas son patógenas para ambos grupos. Las bacterias del género *Pseudomonas* tienen aplicaciones útiles en biotecnología como la promoción directa del crecimiento de plantas, biorremediación y el biocontrol (Peix *et al.* 2009). La mayoría de los agentes de biocontrol de *Pseudomonas* han sido aislados del suelo, la rizósfera de las plantas o del agua. Son buenos colonizadores de raíces y son bien conocidos por su capacidad para controlar patógenos del suelo. Algunas cepas también pueden proteger contra patógenos de las hojas al inducir resistencia sistémica en las plantas. Por lo general, no sobreviven bien en las partes aéreas de las plantas, excepto por algunas cepas de biocontrol de *Pseudomonas* del grupo *Pseudomonas syringae* (Höfte 2021).

Las especies y los grupos filogenéticos de *Pseudomonas* se han delineado en base a análisis de secuencias de múltiples loci (MLSA) utilizando genes “housekeeping” como 16S ARNr (ARN ribosomal), *gyrB*, *rpoB*, *rpoD*, *gltX* y *pepN* (Mulet *et al.* 2010, Gomila *et al.* 2015, Lalucat *et al.* 2020, Garavaglia *et al.* 2023) y

secuencias de genomas completos (Garrido-Sanz *et al.* 2016, Hesse *et al.* 2018). El gen 16S ARNr permite la diferenciación del género *Pseudomonas*, pero no siempre a nivel de especie, por lo que para la discriminación de muchas especies son particularmente útiles los genes *rpoD*, *gyrB* y *rpoB* (Mulet *et al.* 2010), o *rpoD*, *pepN* y *gltX* (Garavaglia *et al.* 2023).

Las *Pseudomonas* que interactúan con plantas incluyen fitopatógenos agrupados en el grupo *P. syringae* que son los agentes etiológicos de manchas foliares, tizones y marchitamientos en plantas huésped susceptibles. Otros miembros (por ejemplo, ciertas cepas de *P. fluorescens*, *P. putida* o *P. aeruginosa*) son conocidos por ser beneficiosos para las plantas (Mercado-Blanco *et al.* 2007). Muchas cepas de *Pseudomonas* pueden promover el crecimiento de las plantas directamente en ausencia de patógenos al aumentar la disponibilidad y absorción de nutrientes minerales. Actividades de solubilización de fosfatos se han reportado en aislamientos taxonómicamente cercanos a las especies *P. chlororaphis*, *P. putida*, *P. aeruginosa*, *P. monteilii*, *P. plecoglossicida*, *P. fluorescens*, *P. fulva* y *P. mosselii* (Pathma *et al.* 2011a, Agaras *et al.* 2015). Se han reportado *Pseudomonas* que poseen un rol crucial en la respuesta vegetal frente a diferentes tipos de estrés. Por ejemplo, ante el estrés por metales pesados, *P. koreensis* AGB-1 aumenta la actividad de las enzimas antioxidantes catalasas y superóxido dismutasa y reduce la actividad del malondialdehído, mejorando la estabilidad y el crecimiento de las plantas en suelos contaminados. Asimismo, en condiciones de sequía, *P. putida* MTCC5279 incrementa la biosíntesis de prolina y disminuye la acumulación de malondialdehído, favoreciendo la germinación y el crecimiento vegetal (Rajkumar *et al.* 2017). (Meyer 2000). En el mismo sentido, distintas especies de *Pseudomonas* han mostrado ser productores de fitohormonas, como el ácido indol-3-acético (IAA) (reportado originalmente para *P. putida*) y citoquininas (*P. fluorescens*), así como la enzima ACC deaminasa (*P. stutzeri*, *P. putida*, *P. fluorescens*). El conjunto de estas actividades vuelve al género *Pseudomonas* una cuantiosa fuente de características de promoción del crecimiento, sin embargo, cómo ya se mencionó previamente, existen aún más cualidades que establecen a las *Pseudomonas* como uno de los géneros bacterianos más relevantes para la búsqueda de actividades de promoción del crecimiento vegetal, que son aquellas asociadas al biocontrol (Pathma *et al.* 2011a, Rajkumar *et al.* 2017). (Pathma *et al.* 2011a, Rajkumar *et al.* 2017, Schalk *et al.* 2020).

Las *Pseudomonas* fluorescentes son un grupo extensamente estudiado de PGPR que ha mostrado ser efectivo en la protección de plantas cultivadas contra importantes patógenos de raíces, mayormente fúngicos, destacando su potencial en estrategias de control biológico en la agricultura (Haas *et al.* 2005). Las *Pseudomonas* fluorescentes son el grupo más estudiado dentro del género *Pseudomonas*. Este grupo incluye especies como *P. aeruginosa*, que es la especie tipo del género; y los grupos taxonómicos de cepas de las especies *P. aureofaciens*, *P. chlororaphis*, *P. putida*, *P. fluorescens*, así como las especies patógenas de plantas *P. cichorii* y *P. syringae*. Respecto al biocontrol, se destaca el grupo conformado por *P. chlororaphis*, *P. protegens* y *P. corrugata*, denominado grupo CPC, por ser especialmente rico en aislamientos con actividades ligadas a la promoción indirecta del crecimiento vegetal (Vacheron *et al.* 2016). Las *Pseudomonas* fluorescentes deben su nombre a la pioverdina, la cual gran parte de las cepas pueden sintetizar (Meyer 2000), así como otros sideróforos, incluyendo las pseudobactinas. Adicionalmente, se han reportado más tipos de sideróforos en el género con menor afinidad por Fe⁺³, como por ejemplo, la pioquelina producida por *P. aeruginosa* o la pseudomonina (isoxazolidona) reportada para *P. fluorescens*, *P. stutzeri* y *P. putida* (Pathma *et al.* 2011a). Otros sideróforos producidos por cepas de *Pseudomonas* incluyen a la enantio-pioquelina, achromobactina, corrugatina y la (tio)quinolobactina (Schalk *et al.* 2020). Cómo se describió previamente, los sideróforos no sólo poseen la

capacidad de ser absorbidos por las plantas para contribuir a su nutrición, sino que pueden servir de molécula biocontroladora mediante la competición de hierro en la rizósfera. En suelos aireados, neutros o alcalinos, el Fe^{+3} es poco soluble; el total de las especies de Fe^{+3} solubles representan aproximadamente 10^{-10} M en equilibrio con el hierro del suelo. En medios empobrecidos de hierro *in vitro*, las *Pseudomonas* spp. que producen pioverdina inhiben el crecimiento de bacterias y hongos con sideróforos menos potentes. Por lo tanto, bajo ciertas condiciones, los sideróforos funcionan como un antibiótico bacteriostático o fungistático difusible. Por ejemplo, bajo condiciones de invernadero, la cepa *P. putida* B10 suprimió la marchitez por *Fusarium* (Elad *et al.* 1985, Keel *et al.* 1989). Esta supresión es perdida al enmendar el suelo con hierro lo que, a su vez, reprime la producción de sideróforos en esta cepa. Sin embargo, esta actividad parece depender fuertemente de las condiciones del suelo (Loper *et al.* 1991), como para la cepa *P. protegens* CHA0 (Keel *et al.* 1989). En síntesis, la evidencia indica que los sideróforos de *Pseudomonas* podrían contribuir a la supresión de enfermedades en algunas situaciones, pero por sí solos no son suficientes para explicar la supresión (Haas *et al.* 2005).

Otros mecanismos de biocontrol también se han reportado para cepas PGPR de *Pseudomonas*. Existen numerosos ejemplos de ISR, como por ejemplo la producción de DAPG por *P. protegens* CHA0, que demostró ser un activador de ISR determinante para plantas de tomate frente a *P. syringae* (Rezzonico *et al.* 2007) y de producción de enzimas degradantes de la pared, como para cepas de *P. fluorescens* (Pierson III *et al.* 1992, Neiendam Nielsen *et al.* 1999). Más ejemplos fueron presentados en la sección de mecanismos de promoción indirecta del crecimiento vegetal de esta Introducción.

Ya sea en estado planctónico o establecidas en un *biofilm*, las especies de *Pseudomonas* beneficiosas para las plantas deben competir contra otros microorganismos que habitan en la rizósfera para acceder a los rizodepósitos y nichos presentes en la cercanía a la raíz. Para este fin, una de las estrategias presentes en el género es la biosíntesis y secreción de moléculas que les confieren competitividad al enfrentarse a otros microorganismos y defensas de las plantas. Dado el amplio rango de ambientes y asociaciones a distintas especies de plantas en las que podemos encontrar a las *Pseudomonas*, este panorama demuestra la importancia de la diversidad de compuestos de actividad antimicrobiana que pueden sintetizar (Zboralski *et al.* 2020). La producción de la amplia variedad de metabolitos antimicrobianos por *Pseudomonas* fluorescentes se considera una de las características más importantes de su biocontrol. Desde la llegada de las tecnologías de ADN (Ácido desoxirribonucleico) recombinante, se ha demostrado la importancia de la producción de antibióticos en el biocontrol de *Pseudomonas* fluorescentes utilizando mutantes deficientes en su producción y se han hecho esfuerzos concertados para estudiar la gran diversidad de compuestos con actividad antimicrobiana resultante de la gran diversidad y adaptabilidad del género (Höfte 2021). La primera demostración experimental clara de que un antibiótico de *Pseudomonas* puede suprimir enfermedades de las plantas en un ecosistema fue en 1988, en la que se identificó un antibiótico del grupo de las fenazinas, el ácido fenazina-1-carboxílico (PCA), como un factor de biocontrol producido por *P. fluorescens* 2-79 (Thomashow *et al.* 1988). Se encontró que esta cepa, originalmente aislada de la rizósfera del trigo, suprimía la enfermedad de pie negro causada por el patógeno fúngico *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* en trigo. Los mutantes negativos para PCA están parcialmente desprovistos de su capacidad para inhibir el hongo *in vitro* y para suprimir la enfermedad *in vivo*. Con relativamente pocas excepciones, las cepas efectivas de biocontrol de *Pseudomonas* producen antibióticos difusibles y/o volátiles que inhiben patógenos (Haas *et al.* 2003).

La notable diversidad ecológica y metabólica de las especies de *Pseudomonas* se refleja en los genomas de estas bacterias. Esto es particularmente evidente por el tamaño relativamente pequeño del genoma central que se comparte entre las especies de *Pseudomonas*. El genoma central típicamente incluye genes de mantenimiento y ARN (Ácido ribonucleico) que son esenciales para la supervivencia del organismo, pero la mayoría de los genes en una *Pseudomonas* sp. individual son específicos de la especie o compartidos por un subconjunto de especies. Estos genes comprenden el genoma flexible de *Pseudomonas*, que refleja la adaptación de cepas individuales a un estilo de vida específico. Los genes que confieren la biosíntesis de metabolitos especializados son un componente de este repertorio genético, que media las interacciones de la bacteria con huéspedes de plantas o animales, sus co-inquilinos microbianos o depredadores en el ambiente. Los metabolitos especializados desempeñan roles importantes en los diversos estilos de vida de las especies de *Pseudomonas*, funcionando en la adquisición de nutrientes, la virulencia y la defensa contra competidores y depredadores enfrentados en hábitats naturales (Gross et al. 2009, Pathma et al. 2011, Höfte 2021).

Metabolitos de *Pseudomonas* relevantes para el biocontrol de fitopatógenos

Los antibióticos abarcan un grupo químicamente heterogéneo de compuestos orgánicos de bajo peso molecular producidos por microorganismos que son perjudiciales para el crecimiento o las actividades metabólicas de otros microorganismos (Thomashow *et al.* 1988). Generalmente, los antibióticos actúan sobre varios procesos vitales en los microorganismos, incluyendo la biosíntesis de la pared celular y la síntesis de ADN, ARN y proteínas. Los componentes estructurales de los antibióticos parecen haber existido en la biosfera durante miles de millones de años, como lo demuestra el número de derivados primordiales de aminoácidos (muchos de ellos componentes de péptidos no ribosomales) encontrados en meteoritos y productos de condiciones de reacción "prebióticas" (Davies 1990). Se ha calculado que la vía biosintética de una molécula de policétido, como la eritromicina, puede haber evolucionado hace unos 800 millones de años, y la vía biosintética de la estreptomicina tendría al menos 600 millones de años (Baltz 2008). Se piensa que probablemente las moléculas similares a los antibióticos modernos jugaron un papel importante en los inicios de la evolución bioquímica como efectores o como catalizadores en una variedad de reacciones de condensación, como la transcripción y la traducción. Además, se especula que, con el tiempo, estas moléculas conservaron su capacidad de interactuar con los sitios receptores en los ácidos nucleicos y las proteínas, lo que les confiere su actividad como antibióticos (Davies *et al.* 2010).

La evidencia de que los antibióticos juegan un papel en la supresión de enfermedades radicales se basa en alguno o varios de los siguientes argumentos y/o experimentos, originalmente propuestos por (Haas *et al.* 2003):

- 1) El compuesto antimicrobiano de interés es producido *in vitro* por la cepa de biocontrol, se identifica químicamente e inhibe microorganismos fitopatógenos *in vitro*. La inhibición puede ocurrir por difusión en el medio de crecimiento o, en el caso de compuestos volátiles como el HCN, en la fase gaseosa.
- 2) Se identifican los genes estructurales y regulatorios más importantes necesarios para producir el antibiótico, aislando mutantes no productores o cepas super-productoras y caracterizando los genes involucrados.

- 3) El antibiótico se detecta en la rizósfera. Esto puede ser una tarea compleja, porque los antibióticos comúnmente se adsorben a la materia orgánica del suelo y a los minerales inorgánicos del suelo (Gottlieb 1976). Usualmente, los antibióticos se recuperan por extracción con solventes orgánicos, se purifican mediante extracción en fase sólida y HPLC en fase reversa. La identificación química se basa luego en el tiempo de retención en HPLC y en las propiedades espectrales (absorción UV/visible, fluorescencia cuando sea apropiado, y espectrometría de masas).
- 4) Los mutantes negativos para antibióticos pueden ofrecer una protección reducida a las plantas en sistemas de ensayo que consisten en suelo estéril o natural, una planta huésped y un patógeno, en comparación con la cepa de biocontrol de tipo silvestre. En cepas de biocontrol que producen múltiples antibióticos, los mutantes que carecen de un antibiótico pueden no perder la capacidad supresora porque los mecanismos reguladores homeostáticos pueden compensar la pérdida de un antibiótico sobre-produciendo otro, manteniendo así la producción total de antibióticos y el biocontrol (Schnider-Keel *et al.* 2000b). Por lo tanto, puede ser útil transferir los genes estructurales del antibiótico a una cepa que normalmente no produce este antibiótico. Si la cepa transgénica manifiesta propiedades de biocontrol superiores a las de la cepa receptora, entonces hay un buen argumento para que el antibiótico sea un factor de biocontrol.
- 5) La expresión de genes biosintéticos de antibióticos puede ser monitoreada *in situ*, fusionando el(los) gen(es) estructural(es) del antibiótico a un gen reportero y monitoreando su expresión, por ejemplo, *lacZ* (β -galactosidasa), *luxAB* (luciferasa), *inaZ* (proteína de nucleación de hielo) o *gfp* (GFP). Las bacterias que llevan la construcción reportera se recuperan de la rizósfera y se analizan para detectar actividad reportera. Alternativamente, se recolectan exudados de raíces y semillas y se prueban para la estimulación de la expresión reportera *in vitro*.
- 6) Un criterio final es si la producción de antibióticos en la rizósfera es relevante para la capacidad ecológica de la cepa productora. Si es así, esto reforzaría el concepto de un papel ecológico de los antibióticos. La aptitud ecológica es el criterio más delicado de evaluar y quizás no sea decisivo en términos de capacidad de biocontrol.

El amplio interés en las especies de *Pseudomonas* se debe, en parte, a la diversidad química de compuestos producidos con actividad antimicrobiana. La primera secuencia genómica de un agente de biocontrol del género *Pseudomonas*, correspondiente a la cepa *P. protegens* Pf-5, se publicó en 2005 (Paulsen *et al.* 2005) y, desde entonces, se han secuenciado numerosas otras especies y cepas de *Pseudomonas* en búsqueda de más metabolitos antimicrobianos. Los grupos de metabolitos antibióticos más estudiados en el género son: las fenazinas, los pirroles, los policétidos (principalmente pioluteorina y DAPG), los péptidos de actividad antibiótica (también llamadas bacteriocinas), los lipopéptidos y ramnolípidos con actividad surfactante y los compuestos volátiles (principalmente HCN) (Haas *et al.* 2003, Haas *et al.* 2005, Gross *et al.* 2009, Pathma *et al.* 2011b, Raaijmakers *et al.* 2012, Zboralski *et al.* 2020, Höfte 2021). A continuación, se detallará más información acerca de cada familia de moléculas relevantes para el género (Figura 3).

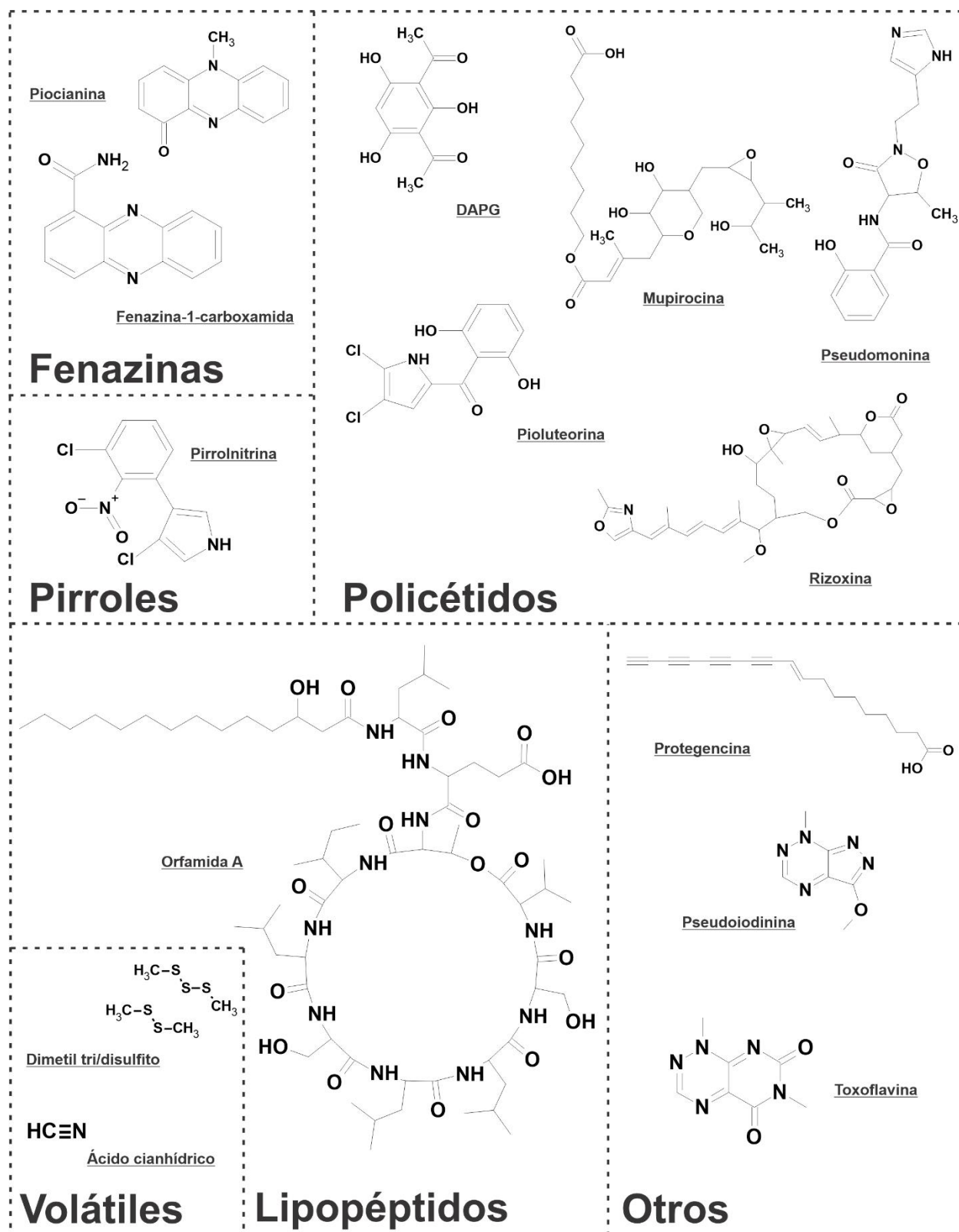


Figura 3: Principales compuestos con actividad antimicrobiana de *Pseudomonas* (fenazinas, pirroles, policétidos, lipopéptidos, volátiles y otros).

Fenazinas

Las fenazinas son una gran clase de metabolitos especializados conocidos por su potencial redox y que son producidos por muchas bacterias Gram-positivas (por ejemplo, *Streptomyces*) y Gram-negativas (por ejemplo, *Pseudomonas*), o por especies de arqueas como *Methanosarcina* (Abken *et al.* 1998). La estructura central de las fenazinas es un anillo de pirazina (1,4-diazabenceno) con dos bencenos anulares. Su descubrimiento temprano a mediados del siglo XIX se facilitó por el hecho de que las fenazinas son compuestos intensamente coloridos (Blankenfeldt *et al.* 2014). En 1859, Fordos describió la extracción de un pigmento azul, responsable de la coloración del "pus azul" observado en pacientes que sufrían de heridas purulentas graves, y nombró al pigmento azul "piocianina" (PYO) (Figura 3), a partir de las palabras griegas para "pus" y "azul". Desde entonces, se han descrito más de 180 productos naturales del grupo de las fenazinas en la literatura (Guttenberger *et al.* 2017). Se ha demostrado que algunas fenazinas exhiben actividades antibióticas, antifúngicas, insecticidas, antitumorales, quimiopreventivas contra el cáncer, antiplasmodiales, antimaláricas y antiparasitarias. Las fenazinas se producen en etapas tardías del crecimiento a altas densidades celulares y se ha demostrado que los organismos productores de fenazinas tienen una mayor longevidad en el medio ambiente natural que sus contrapartes no productoras de fenazinas (Mavrodi *et al.* 2013). Las fenazinas están entre los metabolitos especializados más abundantes producidos por las *Pseudomonas* fluorescentes, debido en parte a la presencia en el operón de fenazina del gen *phzC*, que codifica una enzima tipo II 3-desoxi-D-arabinoheptulosonato-7-fosfato sintasa que, una vez alcanzado el tamaño de población umbral para la detección de *quorum* y activada la expresión del operón, es capaz de desviar metabolitos de carbono hacia la vía del shikimato para la síntesis de fenazinas (Mavrodi *et al.* 2013). Se han identificado varios modos de acción de las fenazinas, que incluyen la reducción del oxígeno molecular a especies reactivas de oxígeno (ROS), la facilitación de la generación de energía, la participación en la homeostasis del hierro mediante la reducción de Fe(III), la participación como moléculas señalizadoras mediante la activación del factor de transcripción asociado a hierro SoxR, la interacción y entrelazado de ADN π - π , y la morfogénesis de *biofilms* a través de la influencia sobre el estado redox intracelular (Guttenberger *et al.* 2017). Prácticamente todas las fenazinas producidas por *P. fluorescens*, *P. chlororaphis* y *P. aeruginosa* inhiben a los fitopatógenos fúngicos, incluidos *G. graminis* var. *tritici*, *Fusarium oxysporum*, *Pythium* spp., *R. solani*, *Gibberella avenacea*, *Alternaria* spp. y *Drechslera graminea* (Mavrodi *et al.* 2006). La mayoría de las fenazinas producidas por *Pseudomonas* spp. son derivados simples sustituidos con carboxilo e hidroxilo, pero sus propiedades físicas y, en consecuencia, su actividad antibiótica, difieren según la naturaleza y la posición de los sustituyentes en el anillo heterocíclico. De las fenazinas mencionadas, el ácido 2-hidroxifenazina-1-carboxílico de *P. aureofaciens*, la 1-hidroxifenazina y la fenazina-1-carboxamida (Figura 3) de *P. aeruginosa* tienen la mayor actividad antifúngica global *in vitro* (Mavrodi *et al.* 2006).

Pirroles

La pirrolnitrina (3-cloro-4-(2'-nitro-3'-clorofenil) pirrol) (Figura 3) es un metabolito antifúngico derivado del triptófano de amplio espectro cuya actividad ha sido comprobada contra hongos *Ascomycetes*, *Deuteromycetes* y *Basidiomycetes* (Ligon *et al.* 2000). Por lo tanto, la pirrolnitrina se utiliza ampliamente como fungicida en la agricultura (Pathma *et al.* 2011b). El grupo de cuatro genes biosintéticos *prnABCD*, fue descrito por primera vez en *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* BL915, que sintetizan pirrolnitrina a partir de L-triptófano como sustrato (Hill *et al.* 1994, Kirner *et al.* 1998) y está altamente conservado en

cepas productoras de pirrolnitrina, entre las que se encuentran cepas del subgrupo *P. protegens* y *P. chlororaphis*. Las cepas de *Pseudomonas* pueden haber obtenido este grupo de genes mediante transferencia horizontal de genes (Costa *et al.* 2009). Cabe destacar que a partir de la pirrolnitrina se han podido sintetizar los fungicidas fenilpirroles, fenciclonil y fludioxonil, que se han descrito como antimicrobianos contra múltiples enfermedades fúngicas de cultivos para tratamiento de semillas o foliar (Kilani *et al.* 2016).

Policétidos

Los policétidos son una clase estructural y funcionalmente diversa de metabolitos secundarios producidos por bacterias y hongos, con propiedades antimicrobianas, terapéuticas y fitotóxicas. La biosíntesis de policétidos es similar a la biosíntesis de ácidos grasos y está mediada por las policétido-sintasas, que son capaces de producir compuestos más diversos que las sintasas de ácidos grasos. En *Pseudomonas* beneficiosas para las plantas, los principales policétidos descritos son la pioluteorina, la mupirocina, las rizoxinas y el 2,4-diacetilfloroglucinol (2,4-DAPG), la mupirocina y la pioluteorina (Höfte 2021). La pioluteorina (Figura 3) es un producto híbrido derivado de la actividad de una sintetasa de péptidos no ribosomales y una sintetasa de policétidos, que consiste en un anillo de resorcinol unido a una porción de pirrol diclorada y su biosíntesis es exclusiva del género *Pseudomonas*. La pioluteorina es producida por cepas de *Pseudomonas* pertenecientes al subgrupo de *P. protegens* (Ramette *et al.* 2011) y algunos aislados de *P. aeruginosa* (HU *et al.* 2005). Se ha encontrado que pioluteorina es particularmente eficaz contra el oomicete *Pythium ultimum* causante de la enfermedad de *damping-off* en algodón y berro (Maurhofer *et al.* 1992). El mecanismo por el cual impide el crecimiento de oomicetes es actualmente desconocido (Zboralski *et al.* 2020, Clough *et al.* 2022, Leclère *et al.* 2022), aunque puede estar ligado a su capacidad de regular la biosíntesis de 2,4-diacetilfloroglucinol, otro metabolito de actividad antimicrobiana (Bennett *et al.* 1999, Luo *et al.* 2024). El *cluster* de genes biosintéticos de pioluteorina fue descrito por primera vez en *P. protegens* Pf-5. Comprende 17 genes e incluye genes estructurales (*pltABCDEFGHIJLM*) y genes involucrados en el eflujo (*pltIJKNOP*) y la regulación (*pltZ* y *pltR*) (Gross *et al.* 2009). Otro ejemplo de policétido, la mupirocina (Figura 3), también conocida como ácido pseudomónico, es un antibiótico policetídico natural de *Pseudomonas* fluorescentes. La mupirocina producida por *P. fluorescens* NCIMB 10586 es altamente activa contra *Staphylococcus aureus* y una variedad de organismos Gram-positivos (El-Sayed *et al.* 2003). La 2,3-deepoxi-2,3-didehidrorhizoxina (DDR) es otro ejemplo de policétido, producido por *P. chlororaphis* MA342, el cual es eficaz contra varios hongos fitopatógenos, incluyendo la mancha de red de cebada causada por el hongo *Drechslera teres* (Tombolini *et al.* 1999).

Las rizoxinas, producidas por algunas cepas del subgrupo *P. protegens* (D'aes *et al.* 2010, Takeuchi *et al.* 2015) y *P. chlororaphis* MA342 (Ligon *et al.* 2000), tienen actividad contra hongos y oomicetes. Son macrólidos policétidos y deben sus propiedades antifúngica a su afinidad por la β -tubulina. Los genes de biosíntesis de rizoxina fueron descritos por primera vez en el endosimbionte de *Rhizopus*, *Burkholderia rhizoxina*, y son ortólogos a los genes de biosíntesis encontrados en *P. protegens* Pf-5. La principal rizoxina producida por Pf-5 inhibe el crecimiento del hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum* (Brendel *et al.* 2007).

Finalmente, el 2,4-diacetilfloroglucinol (DAPG) (Figura 3) es un antibiótico policetídico producido por cepas de *Pseudomonas* que pertenecen predominantemente a los subgrupos *P. protegens* y *P. corrugata* y por algunas cepas aisladas en otros grupos taxonómicos (Almario *et al.* 2017). Juega un papel clave en

el biocontrol de enfermedades de raíces y plántulas, y es activo contra hongos, oomicetes, nematodos y bacterias. DAPG es fitotóxico a altas concentraciones. Las cepas de *Pseudomonas* productoras de DAPG se han aislado típicamente de suelos supresivos del *take-all*, una enfermedad importante de las raíces del trigo causada por *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (Weller *et al.* 2007). El clúster de genes DAPG está altamente conservado y comprende nueve genes involucrados en la biosíntesis (*phlACB* y *phlD*), el eflujo (*phlEI*), la degradación (*phlG*) y la regulación (*phlH* y *phlF*). Además de su papel en la antibiosis directa, el compuesto puede inducir resistencia sistémica en *Arabidopsis* contra los fitopatógenos *Hyaloperonospora parasitica* (Iavicoli *et al.* 2003) y *Botrytis cinerea* (Chae *et al.* 2020), y contra *P. syringae* en tomate (Weller *et al.* 2012), al desencadenar respuestas de defensa mediadas por jasmonato y etileno. El DAPG puede promover la exudación de aminoácidos desde las raíces de las plantas al bloquear la entrada de aminoácidos y estimula la ramificación de raíces en tomate al interactuar con la vía de señalización dependiente de auxina (Brazelton *et al.* 2008).

Bacteriocinas

Las bacteriocinas son péptidos y proteínas secretadas que incluyen una amplia gama de compuestos estructural y funcionalmente diversos. Son perjudiciales para bacterias que están estrechamente relacionadas con aquellas que las producen, en contraste con la mayoría de otros compuestos antimicrobianos producidos por *Pseudomonas* biocontroladoras, los cuales son efectivos contra microorganismos filogenéticamente distantes y raramente afectan a bacterias del mismo género. Por lo tanto, las bacteriocinas juegan un papel importante en el control de bacterias estrechamente relacionadas en la rizósfera, especialmente *Pseudomonas spp.* (Bruce *et al.* 2017). La primera identificación de una bacteriocina en *Pseudomonas* data de 1954, en *P. pyocyanea* (ahora conocido como *P. aeruginosa*), quien denominó la sustancia descubierta como “pyocin”, por analogía con las colicinas, que son bacteriocinas descritas en *E. coli* (Jacob 1954). Desde entonces, se han descrito muchas bacteriocinas en el género *Pseudomonas*, lo que ha generado la categorización de las piocinas en diferentes familias: S-, R- y F- (Chavan *et al.* 2007). El género *Pseudomonas* alberga también otras bacteriocinas, como proteínas de punto de reordenamiento (Rhs), bacteriocinas similares a lectinas, microcinas, y el sistema de inhibición dependiente del contacto (Cdi). Las bacteriocinas afectan la supervivencia celular a través de modos de acción distintos, como la actividad nucleasa contra ADN, ARNt (ARN de transferencia) y ARNr, desorganización de la pared celular o despolarización de la membrana mediante formación de poros (Ghequire *et al.* 2014).

Lipopéptidos

Los lipopéptidos no ribosomales (NRLP, sigla de la expresión en inglés *non-ribosomal lipopeptide*) son productos naturales peptídicos que contienen una porción lipídica y son producidos por sintetasas de péptidos no ribosomales (NRPS, sigla de la expresión en inglés *non-ribosomal peptide synthetase*) o sintetasas híbridas de policétidos-péptidos no ribosomales (PKS-NRPS). Muchos NRLPs tienen propiedades anfifílicas, lo que los convierte en biosurfactantes eficientes. Permiten que el organismo productor realice *swarming*, una forma de movilidad sobre superficies dependiente de flagelos, e influyen en la formación o degradación de *biofilms* al alterar la tensión superficial del entorno. Además, los NRLPs son capaces de lisar biomembranas y, por lo tanto, muestran actividades antimicrobianas y citotóxicas (Götze *et al.* 2020a). Las *Pseudomonas* también biosintetizan lipopéptidos NRLPs, que consisten en un oligopéptido (8-25 aminoácidos) que está acilado en el extremo N-terminal con un ácido graso lineal (C5-C16). La porción lipídica suele ser un ácido β -hidroxilado con una configuración R del centro estérico que

también pueden ser bis-hidroxilados, insaturados, o contener un segundo grupo carboxilo. La parte oligopeptídica puede consistir en una mezcla de aminoácidos proteinogénicos, modificados o no, y no proteinogénicos. Estos incluyen aminoácidos deshidratados (ácido 2,3-dehidroaminobutírico), clorados (4-cloro-treonina), configuraciones D-/allo, acilados (N5-acetil-N5-hidroxi-ornitina) o hidroxilados (ácido 3-hidroxi-aspartico o la rara α -hidroxi-ornitina). A pesar de su diversidad estructural, los lipopéptidos de *Pseudomonas*, con la excepción del grupo de la siringomicina, la corrugatina y las ferrocinas, comparten la característica de que al menos la mitad de todos los aminoácidos utilizados para construir el oligopéptido son hidrofóbicos (Ala, Val, Leu, Ile, Phe). Curiosamente, la gran mayoría de los lipopéptidos de *Pseudomonas* no son lineales, sino que presentan un anillo de macrolactona que se forma entre el C-terminal del péptido y un grupo hidroxilo de una serina o treonina. Todos los lipopéptidos cíclicos (CLPs) conocidos de *Pseudomonas* se pueden dividir en dos categorías: CLPs cortos (8-14 aminoácidos) y CLPs largos (18-25 aminoácidos). Las propiedades fisicoquímicas de los lipopéptidos de *Pseudomonas* influyen directamente en sus diversas actividades biológicas. Los CLPs y LLPs (lipopéptidos lineales) pueden integrarse en las membranas plasmáticas y cambiar la fluidez de los microdominios, aunque el mecanismo exacto para la mayoría de los lipopéptidos es desconocido y es fuente de controversia. Esto puede llevar a una reorganización de la arquitectura de la membrana plasmática que potencialmente desencadena la despolarización y la fuga o el influjo de iones, lo que puede causar la muerte celular o una proliferación celular deficiente. Por lo tanto, la mayoría de los CLPs muestran propiedades antimicrobianas, citotóxicas y fitotóxicas (Götze *et al.* 2020b).

Otro lipopéptido relevante es la viscosinamida, un CLP producido por *P. fluorescens* DR54 (Nielsen *et al.* 1999), muestra propiedades antifúngicas y tensioactivas prominentes (Nielsen *et al.* 2000). Este compuesto ha demostrado ser altamente efectivo contra *Rhizoctonia solani* (Thrane *et al.* 2001). Por otro lado, la tensina, un lipodecapéptido cíclico producido por *P. fluorescens* 96.578, también ha mostrado efectividad inhibiendo *R. solani* en remolacha azucarera (Nielsen *et al.* 2000). Estos lipopéptidos resaltan por su capacidad para controlar patógenos fúngicos en aplicaciones agrícolas, subrayando su potencial como agentes biocontroladores en la protección de cultivos (Pathma *et al.* 2011a). Otro ejemplo de CLPs son las orfamidas (Figura 3), identificadas en primera instancia en *P. protegens* Pf-5, y determinantes importantes de la motilidad superficial en la cepa de biocontrol *P. protegens* CHA0 en el suelo (Muzlera *et al.* 2024). Las orfamidas están compuestas por 10 aminoácidos y una cola de ácido 3-hidroxidodecanoico o tetradecanoico y son biosurfactantes involucrados en la lisis de zoosporas de oomicetes, el control biológico de *Rhizoctonia* y la actividad insecticida contra pulgones (Ma *et al.* 2016).

Volátiles

El ácido cianhídrico (HCN) es un compuesto volátil que inhibe la citocromo c oxidasa, el componente terminal de la cadena respiratoria en muchos organismos. En procariotas, la producción de HCN parece estar restringida a las *Proteobacterias* y a ciertas cianobacterias (Blumer *et al.* 1999). Dentro del género *Pseudomonas*, los productores conocidos de HCN se encuentran en el grupo *P. aeruginosa* y en varios subgrupos del grupo *P. fluorescens*. Prácticamente todos los productores de DAPG en el subgrupo *P. corrugata* y *P. protegens* también producen HCN, y esta característica también es común en el subgrupo *P. chlororaphis* (Höfte 2021). El clúster de biosíntesis que es responsable de la producción de HCN a partir del precursor metabólico glicina posee tres genes, *hcnABC*, el cual parece ser ancestral en las cepas de *Pseudomonas* asociadas a raíces (Frapolli *et al.* 2012). La producción de HCN por *P. protegens* CHA0

contribuye a la supresión de la podredumbre negra de raíz en tabaco causada por *Thielaviopsis basicola* (Voisard *et al.* 1989). La producción de HCN por *Pseudomonas* también se ha implicado en la supresión de nematodos de nudos de raíz, áfidos, termitas y otros insectos (Höfte 2021) y es el factor determinante en la muerte de *C. elegans* frente a *P. protegens* CHA0 (Romanowski *et al.* 2011). El HCN, junto con el DAPG, también es responsable de la actividad de biocontrol de *P. brassicacearum* LBUM300 contra la podredumbre bacteriana del tomate causada por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Lanteigne *et al.* 2012, Paulin *et al.* 2017).

Otros metabolitos

Finalmente, cabe destacar otros metabolitos de distribución, al menos por ahora, esporádica en el género *Pseudomonas*. En primer lugar, la toxoflavina (Figura 3) es una toxina de color amarillo caracterizada por su núcleo de 7-azapteridina, originalmente identificada como metabolito de *Burkholderia glumae* y *Burkholderia gladioli*. La toxoflavina tiene actividad antibiótica contra bacterias y hongos, y es fitotóxica contra una amplia gama de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas. Posteriormente fue descrita su síntesis y los genes que la intermedian en *P. protegens* Pf-5. El grupo génico para la biosíntesis de toxoflavina en Pf-5 muestra diferencias sustanciales con los genes *tox* (*toxABCDEFGHJ*) de *Burkholderia*, denotando la falta de *toxI* y *toxJ* y adicionando *toxM* al clúster. La cepa Pf-5 produce cantidades mínimas de toxoflavina con actividad antibiótica contra varias bacterias patógenas de plantas (Philmus *et al.* 2015). Por otro lado, la pseudoiodinina (Figura 3) es una molécula que pertenece a la familia de los pirazolo[4,3-*e*][1,2,4]triazina, identificada originalmente a partir de *P. fluorescens* var. *pseudoiodinine* (Lindner *et al.* 1972). La misma fue recientemente re-identificada como un metabolito producido por *P. mosselii* 923, presente en suelos de campos de arrozales, y comprobada su eficacia en inhibir el crecimiento de diversas especies del patógeno bacteriano *Xanthomonas* y el hongo *Magnaporthe oryzae*. Mediante mutagénesis aleatoria a nivel del genoma, el análisis de transcriptomas y ensayos bioquímicos, se definió el clúster biosintético de la pseudoiodinina como *psdABCDEFG* y se propuso su biosíntesis a partir de guanosina trifosfato, con 1,6-didesmetiltoxoflavina como un intermediario biosintético común a la ruta de producción de toxoflavina (Yang *et al.* 2023). Por último, los poliinos son moléculas con enlaces simples y triples de carbono-carbono alternados, (Ross *et al.* 2014) los cuales se han aislado de diversas fuentes, incluidas plantas, hongos, bacterias e incluso insectos. Los primeros poliinos bacterianos, las cepacinas A y B, que mostraron poseer actividad antibiótica, fueron descubiertos en la bacteria *Burkholderia diffusa* (anteriormente conocida como *P. cepacia*). Recientes estudios en *P. protegens* CHA0 y Pf-5, identificaron la protegencina (Figura 3), junto con su operón biosintético *pgn*, como la primera poliina en *Pseudomonas* (Mullins *et al.* 2021). En otro estudio, la protegencina probó tener capacidades algicidas al enfrentarse *Chlamydomonas reinhardtii*, lo que sugiere, junto con la información ligada a otras poliinas, una posible contribución de la protegencina al fenotipo de biocontrol de *P. protegens* (Ross *et al.* 2014, Hotter *et al.* 2021).

Organización y control de la expresión de genes asociados a la biosíntesis de metabolitos de actividad antimicrobiana en *Pseudomonas*.

Como se menciona para algunos de los ejemplos de metabolitos especializados con actividad antibiótica en la sección anterior, muchos de ellos dependen de la expresión coordinada de un conjunto de genes. Tanto en procariotas como en eucariotas, los genes que codifican las enzimas para la biosíntesis de metabolitos especializados a menudo están agrupados en un paquete genético, lo que se denomina clúster biosintético o grupo génico biosintético (BGC, sigla de la expresión en inglés *biosynthetic gene cluster*). Un BGC consta de genes necesarios para la síntesis de la molécula bioactiva y elementos reguladores, como proteínas regulatorias y promotores. A veces, también incluye genes de transporte para la exportación de el o los metabolitos producidos y genes de resistencia que previenen la autodestrucción en los organismos que sintetizan el metabolito (Ahn *et al.* 1998, Medema *et al.* 2015, Mao *et al.* 2018, Tran *et al.* 2019). La producción coordinada está íntimamente ligada a esta organización en BGCs y resulta una cualidad esencial para la colonización de la rizósfera. El ambiente rizosférico impone una gran presión de selección a sus habitantes debido a la competencia por los nutrientes proporcionados por los exudados, lo que exige una alta eficiencia energética por parte de las bacterias. En este contexto, la producción concertada de antibióticos en *Pseudomonas* rizosféricas se vuelve particularmente vital, no solo por el costo metabólico de la biosíntesis, sino también porque producir demasiados antibióticos podría conducir a la aparición de resistencia en rivales microbianos o, incluso, proporcionar sustratos valiosos para organismos capaces de degradarlos (Zboralski *et al.* 2020). Es por ello que muchos de los rasgos beneficiosos de las especies de *Pseudomonas* en sus interacciones con las plantas están influenciados por importantes sistemas regulatorios.

A nivel transcripcional, en primer lugar, se destaca un patrón en común: los sideróforos y los antibióticos autorregulan positivamente su propia biosíntesis. Tanto pioverdina como pioquelina tienen un efecto positivo sobre la expresión de sus genes biosintéticos; en *P. aeruginosa* esta regulación involucra al factor sigma PvdS y al factor de transcripción PchR, respectivamente, (Reimmann *et al.* 1998, Lamont *et al.* 2002). En *P. protegens*, el 2,4-diacetilfluoroglucinol y la pioluteorina controlan positivamente la expresión de sus genes biosintéticos a través de los reguladores transcripcionales PhlF y PltR, respectivamente (Schnider-Keel *et al.* 2000a, Brodhagen *et al.* 2004). Las señales ambientales abióticas pueden tener una influencia importante en la regulación de genes de biocontrol en las *Pseudomonas*. El ejemplo más conocido es la represión de la biosíntesis de pioverdina y pioquelina por exceso de hierro, que es mediada por el represor Fur (Ferreiro *et al.* 2021).

Algunas especies de *Pseudomonas* promotoras del crecimiento vegetal utilizan autoinductores de tipo N-acil-homoserina lactona (AHL) para la comunicación célula-célula. ¿Qué beneficios obtienen las bacterias de esta autorregulación positiva? Por encima de un cierto umbral de densidad poblacional, las células bacterianas se refuerzan mutuamente la producción de metabolitos extracelulares, mientras que por debajo de un umbral de densidad, las células son más reacias a comprometer recursos celulares sustanciales en el metabolismo secundario (Haas *et al.* 2005). La detección de quórum (*quorum sensing*, QS) es un mecanismo regulador de genes ampliamente extendido e identificado en un gran número de especies bacterianas. El QS juega un papel crucial en la fisiología, desarrollo y comportamiento ambiental de las comunidades bacterianas. Este mecanismo se basa en la producción y utilización de señales específicas llamadas autoinductores (como las AHLs), que permiten a las células bacterianas comunicarse entre sí. Al producir estas señales y "detectar" su acumulación, las bacterias son capaces de monitorear

su densidad poblacional y modificar la expresión de genes objetivo. Esta respuesta puede conferir, por ejemplo, capacidades ambientales adaptadas y defensas mejoradas a toda la comunidad bacteriana. Los sistemas QS regulan procesos como la biosíntesis de antibióticos, la formación de *biofilms*, la bioluminiscencia, la esporulación y la expresión de factores de virulencia, entre otros (Miller *et al.* 2001, Von Bodman *et al.* 2003, Venturi 2006). En los *biofilms* de *Pseudomonas*, la concentración de AHLs aumenta debido a las altas densidades celulares y luego de alcanzar un umbral dado, desencadena la transcripción de genes objetivo, especialmente aquellos responsables de la biosíntesis de metabolitos especializados (Rieusset *et al.* 2020). El QS fue descubierto en dos especies bacterianas marinas luminosas, *Vibrio fischeri* y *Vibrio harveyi*. En ambas especies, las enzimas responsables de la producción de luz están codificadas por el operón estructural de luciferasa *luxCDABE* y se determinó que la emisión de luz ocurre solo a alta densidad de población celular en respuesta a la acumulación de moléculas de señalización autoinductoras secretadas. La mayoría de los sistemas de QS identificados en bacterias Gram-negativas se asemejan al circuito canónico de *quorum sensing* de la bacteria simbiótica *V. fischeri*. Específicamente, estos circuitos contienen, como mínimo, homólogos de dos proteínas regulatorias de *V. fischeri* llamadas LuxI y LuxR. Las proteínas similares a LuxI son responsables de la biosíntesis de una molécula de señalización específica o autoinductor, una AHL. Las proteínas similares a LuxR se unen a los autoinductores afines que han alcanzado una concentración umbral crítica, y los complejos LuxR-autoinductor activan la transcripción de genes objetivo (Miller *et al.* 2001, Waters *et al.* 2005). Por ejemplo, la producción de fenazina en *Pseudomonas* spp. está parcialmente controlada por el *quorum sensing* a través de los homólogos de LuxI/LuxR, PhzI/PhzR. PhzI es una sintasa de AHL que lleva a la acumulación de AHL. Cuando la AHL producida alcanza un umbral de concentración, se une y activa a PhzR, un regulador transcripcional que, a su vez, se une al promotor del operón biosintético de fenazinas para aumentar la transcripción del operón (Biessy *et al.* 2018).

La cascada regulatoria Gac-Rsm

A nivel post-transcripcional, la vía reguladora global Gac-Rsm (Figura 4) es conocida por controlar transiciones importantes en las γ -proteobacterias, como el estilo de vida plantónico/*biofilm*, el metabolismo primario/especializado o el comportamiento replicativo/infectivo (Lapouge *et al.* 2008, Vakulskas *et al.* 2015). La vía Gac-Rsm se encuentra en *Pseudomonas* y muchas otras γ -proteobacterias, como *Azotobacter*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Legionella*, *Pectobacterium*, *Salmonella*, *Vibrio*, *Xanthomonas* o *Yersinia* (Lapouge *et al.* 2008, Sobrero *et al.* 2020). La señalización comienza en un sistema de dos componentes (Figura 4), donde la histidina quinasa (GacS en *Pseudomonas*) ubicada en la membrana plasmática detecta el estímulo (la acumulación de una señal autoinductora de naturaleza química aún desconocida) en el periplasma y posteriormente activa un regulador de respuesta citoplasmático (GacA en *Pseudomonas*) mediante un mecanismo de fosforilación. Este regulador de respuesta actúa como un factor de transcripción, uniéndose a una secuencia de activación conservada (UAS, siendo TGTAAGN₆CTTACA el consenso en *Pseudomonas*, también llamado caja-Gac) y promoviendo la expresión de varios ARNp (ARN pequeños) reguladores cuya función es secuestrar una familia de proteínas que se unen a ARN mensajeros (ARNm), impidiendo su traducción (Sonnleitner *et al.* 2011, Romeo *et al.* 2018). Estas proteínas de unión al ARN, denominadas Rsm en *Pseudomonas* (y CsrA en enterobacterias), poseen estructuras tridimensionales que están conservadas a través de los géneros bacterianos, siendo el complejo funcional estructural un dímero (Gutiérrez *et al.* 2005, Rife *et al.* 2005, Mercante *et al.* 2009).

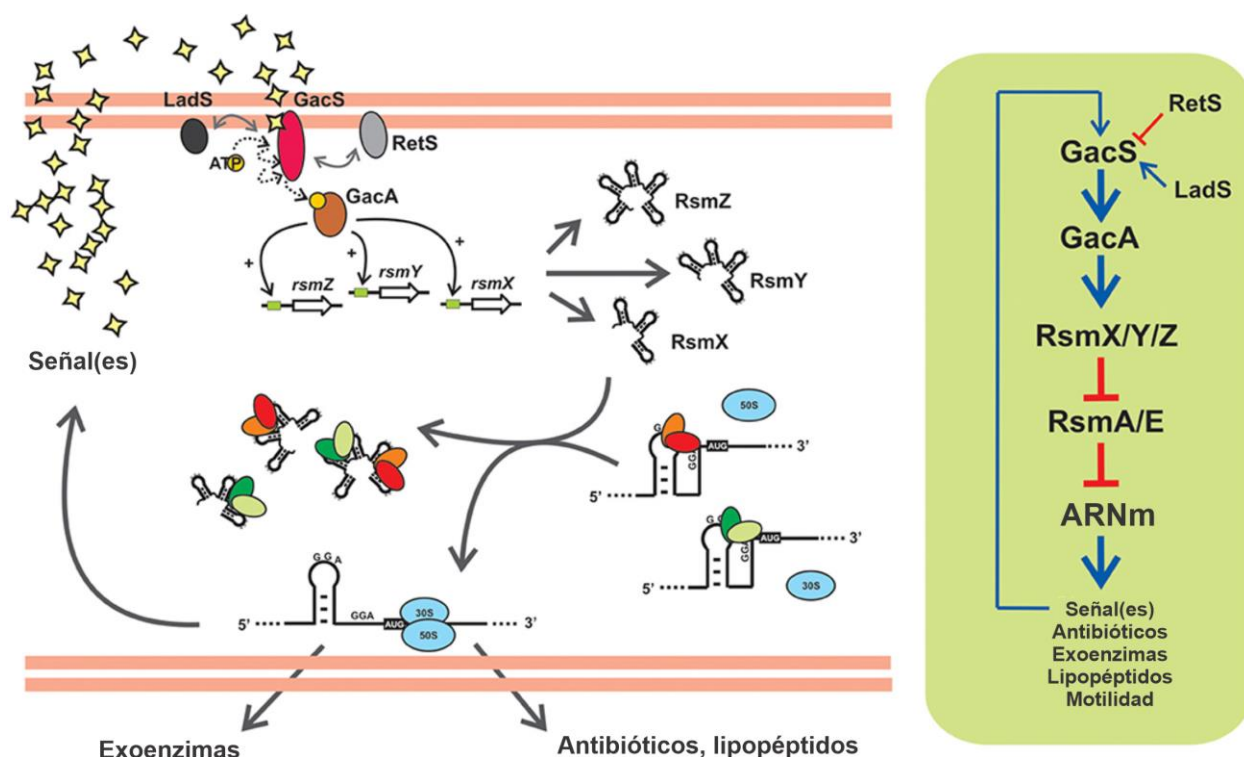


Figura 4: La cascada postranscripcional Gac-Rsm de la cepa CHA0 de *P. protegens*: Una vía de transducción de señales arquetípica de las γ -proteobacterias que controla la actividad de las proteínas Rsm (análogos de CsrA) con ARNp imitadores moleculares o de tipo esponja. (Izquierda) En la cepa CHA0, el sistema de dos componentes GacS-GacA responde a señales autoinductoras no caracterizadas y promueve la traducción de varios ARNp involucrados en la formación de exoproductos y el control de patógenos de la raíz de las plantas (antibióticos, lipopéptidos, enzimas líticas extracelulares), al aliviar el bloqueo traduccional causado por RsmA y RsmE. Esto se logra activando la transcripción de los genes *rsmX*, *rsmY* y *rsmZ*, aumentando así la abundancia intracelular de los tres ARNp esponja RsmX, RsmY y RsmZ, que secuestran a RsmA y RsmE. Dos quinasas sensoriales huérfanas accesorias, RetS y LadS, modulan la actividad de GacS. (Derecha) Representación lineal esquemática de la vía reguladora Gac-Rsm de la cepa CHA0 de *P. protegens*. La biosíntesis de la señal autoinductora difusible también está bajo el control de la cascada, al igual que otros fenotipos que contribuyen a la capacidad antifúngica de esta cepa, y representa una entrada de retroalimentación positiva para la vía. Adaptado de Sobrero & Valverde 2020.

En *Pseudomonas*, los ARNp regulatorios se llaman Rsm y su tamaño típico es de 100 a 130 nucleótidos. En comparación con otros géneros bacterianos, los ARNp Rsm tienen menos sitios de unión para las proteínas Rsm (4-7 sitios) y son más estables que en otros géneros bacterianos (Lapouge *et al.* 2008, Herooven *et al.* 2012, Vakulskas *et al.* 2015). Las bacterias del género *Pseudomonas* suelen tener entre 2 y 7 variantes de ARNp Rsm, con una o más copias y una dependencia variable de GacA. Así, RsmY, RsmZ, RsmV y RsmW se encuentran en *P. aeruginosa*, RsmY y RsmZ en *P. putida*, y RsmX, RsmY y RsmZ en *P. fluorescens*, *P. protegens* y *P. syringae* (Miller *et al.* 2001, Kay *et al.* 2006, Moll *et al.* 2010, Sonnleitner *et al.* 2011, Song *et al.* 2015a, Janssen *et al.* 2018, Huertas-Rosales *et al.* 2021). Cada monómero de las proteínas Rsm reconoce y se une a un solo motivo GGA en la molécula de ARN, siendo el número de estos motivos, así como sus posiciones relativas, los principales determinantes de la afinidad de unión. Los múltiples motivos

GGA ubicados en el lazo de horquillas de los ARNp Rsm constituyen sitios de unión de alta afinidad que les permiten competir exitosamente con los ARNm objetivo por las proteínas Rsm (Dubey *et al.* 2005, Schubert *et al.* 2007, Duss *et al.* 2014a, Duss *et al.* 2014b). Además, las proteínas de la familia Rsm controlan indirectamente múltiples funciones celulares modulando la expresión de ciertos reguladores transcripcionales, lo que aumenta su efecto global en la célula (Brencic *et al.* 2009, Sahr *et al.* 2012, Potts *et al.* 2019).

El descubrimiento de los componentes, la cascada de señalización, y la base molecular de la regulación post-transcripcional ejercida por el sistema Gac-Rsm fue el resultado de estudios fundamentales realizados en *E. coli* y *P. protegens* CHA0 (Sonnleitner *et al.* 2011, Romeo *et al.* 2018). La activación del sistema de dos componentes depende de la presencia y detección de señal(es) específica(s) por la histidina quinasa (GacS) (Figura 4). Sin embargo, el estímulo específico no ha sido determinado en la mayoría de las especies, incluida *Pseudomonas*, aunque se ha demostrado que la(s) molécula(s) señal se acumula(n) en el sobrenadante de cultivos de alta densidad celular, cuando los ARNp Rsm alcanzan niveles máximos, y relajan la represión traduccional de numerosos ARNm lo que resulta en la expresión concertada de una serie de factores de biocontrol (Figura 4) (Heeb *et al.* 2002, Dubuis *et al.* 2006, Kay *et al.* 2006, Dubuis *et al.* 2007, Latour 2020). En *P. protegens* CHA0, un compuesto de bajo peso molecular producido a altas densidades celulares, que no es una molécula de tipo AHL, activa la vía regulatoria (Heeb *et al.* 2002, Zuber *et al.* 2003). No se detecta tal activación con los sobrenadantes de cultivo del mutante GacA, lo que sugiere que la señal actúa como un autoinductor del sistema mediante un bucle de retroalimentación positiva (Kay *et al.* 2006). La acumulación de una molécula autoinductora extraíble con solventes orgánicos y capaz de reducir el umbral de activación de la propia cascada Gac-Rsm (Blumer *et al.* 1999, Heeb *et al.* 2002, Dubuis *et al.* 2006) es una característica reminiscente de un sistema de QS. Se ha especulado que la molécula autoinductora podría estar relacionada con el estado metabólico de la célula, ya que la alteración del ciclo de Krebs influye en los niveles de ARN dependientes de GacA (Takeuchi *et al.* 2009). Sin embargo, ningún intermediario probado hasta ahora interactúa directamente con el dominio de unión del ligando de GacS *in vitro* (Ali-Ahmad *et al.* 2017). Curiosamente, un mutante que carece de este dominio de unión no se comporta como un *knock-out* de *gacS*, que no es capaz de activar la vía, sino que causa su activación constitutiva (Zuber *et al.* 2003). Además de la señal específica, el estado de fosforilación del sistema GacS/GacA en *Pseudomonas* también depende de las quinasas híbridas RetS (regulador de exopolisacáridos y secreción de tipo III) y LadS (sensor de adherencia perdida), que inhiben y activan el sistema, respectivamente, al menos en *P. aeruginosa* PAK y *P. protegens* CHA0. Aunque la señal que desencadena estas interacciones y los detalles del mecanismo no se conocen completamente, hay evidencia de que tanto RetS como LadS interactúan físicamente con GacS y que el calcio estimula la actividad de LadS en *P. aeruginosa* PAO1, pero no en cepas de *P. fluorescens* o *P. protegens* (Ferreiro *et al.* 2021).

La vía Gac-Rsm de *P. protegens* CHA0, la más estudiada y mejor caracterizada en *Pseudomonas*, regula y coordina la producción de DAPG, HCN, pioluteorina, pirrolnitrina enzimas líticas extracelulares (exoproteasa AprA y fosfolipasa C) (Figura 4) y otros elicidores de ISR (Haas *et al.* 2003, Zuber *et al.* 2003). El sistema de dos componentes GacS/GacA funciona como regulador positivo, mientras que se ha demostrado que las proteínas RsmA y RsmE actúan como represores traduccionales del operón *hcn* (para la síntesis de HCN), *aprA* (para la metaloproteasa extracelular A), *phlACBDE* (para el antibiótico DAPG) y *pltA* (parte del operón *plt* para el antibiótico pioluteorina) (Blumer *et al.* 1999, Reimmann *et al.* 2005b, Lapouge *et al.* 2013). Además, GacS/GacA controla positivamente la expresión del factor sigma de estrés

σ^S (RpoS) y, como consecuencia, la resistencia al estrés oxidativo en la fase estacionaria (Heeb *et al.* 2005). Por lo tanto, las mutaciones en *gacS* o *gacA* reducen la actividad de biocontrol en la supresión de varias enfermedades de plantas, la aptitud ecológica y la supervivencia en la fase estacionaria (Valverde *et al.* 2008). Características similares de biocontrol están reguladas por la vía de transducción de señales Gac-Rsm en otras cepas de las especies *P. protegens*, *P. fluorescens*, *P. chlororaphis*, *P. putida*, *P. donghuensis* y *P. brassicacearum* (Valverde *et al.* 2008, Agarar *et al.* 2018, Chen *et al.* 2018a). Además, Gac-Rsm desempeña un papel en la regulación de una amplia gama de funciones biológicas a alta densidad celular, incluyendo la homeostasis del hierro, las respuestas al estrés oxidativo y la motilidad en *P. protegens* Pf-5 (Hassan *et al.* 2010). Controla la producción de diferentes moléculas de AHL, la expresión del sistema de secreción de tipo VI (T6SS), la biosíntesis de alginato y la formación de biopelículas en *P. brassicacearum* NFM421 (Lalaouna *et al.* 2012). En diferentes cepas de *P. putida*, la actividad de GacS/A es necesaria para la producción del antibiótico promysalin y la formación de *biofilms* (Li *et al.* 2011, Martínez-Gil *et al.* 2014, López-Sánchez *et al.* 2016). En *P. chlororaphis* O6, el sistema Gac-Rsm es esencial para la inhibición del crecimiento fúngico, la actividad insecticida contra el gusano de cuerno del tabaco y el nematodo de los nudos de las raíces, y la síntesis de antimicrobianos adicionales, incluyendo resorcinoles dialquilados, pirrolnitrina y HCN. También controla la producción de AHL, sideróforos de tipo pioverdina y ácido indolacético, las respuestas al estrés oxidativo, la formación de *biofilms* y la motilidad. Muchos de estos fenotipos están regulados junto con RpoS, que a su vez depende parcialmente del sistema Gac-Rsm (Anderson *et al.* 2017).

***Pseudomonas donghuensis*: Fuente de actividades biológicas de interés potencial biocontrolador y captador de hierro.**

Pseudomonas donghuensis es una especie relativamente novedosa (fue descrita por primera vez en 2015), con un gran potencial de actividades biológicas de interés humano. El primer aislamiento publicado, denominado inicialmente *Pseudomonas* sp. HYS, fue obtenido a partir de agua del Lago Este de Wuhan (también llamado lago Donghu) en China y se destacaba por su alta capacidad de secretar sideróforos al comparar con otras cepas de *Pseudomonas* (*P. fluorescens* CHA0, *P. putida* ATCC 12633 y *P. aeruginosa* PA14). Este fenómeno apuntaba a que la cepa HYS tenía un sistema particular mediando la homeostasis del hierro (Gao *et al.* 2012). Eventualmente, la cepa *Pseudomonas* sp. HYS fue identificada como una especie novedosa, dado que, al realizar un análisis filogenético combinado de los genes 16S ribosomal, *gyrB*, *rpoD* y *rpoB*, se obtenía un valor de similitud del 95,47% al comparar con la cepa de referencia más cercana al momento, *P. vranovensis* DSM 16006 (Gao *et al.* 2015). En comparación con otras cepas comunes de *Pseudomonas*, la cepa HYS evidenció una mayor actividad de quelación de Fe^{+2} , así como una producción de sideróforos significativamente elevada, acumulados desde la fase exponencial temprana hasta alcanzar un máximo durante la fase exponencial tardía. Asimismo, se demostró que esta actividad se debía tanto a la presencia de sideróforos fluorescentes (pioverdina), como a sideróforos no-fluorescentes, los cuales poseían respuestas diferenciales a las concentraciones de FeSO_4 ensayadas. La pioverdina no constituía la mayor parte de la capacidad quelante de hierro de la cepa y era inhibida fuertemente por concentraciones mínimas de FeSO_4 (1 μM). En contraste, la secreción de sideróforos no fluorescentes mostraba no ser reducida tan drásticamente, al menos hasta alcanzar valores de 5-8 μM de FeSO_4 . De esta forma, la presencia de estos sideróforos no fluorescentes evidenciaban ser el principal responsable de las actividades de interés de la cepa, así como de depender de las proteínas

del sistema de dos componentes GacS/GacA para su secreción (Yu *et al.* 2014). Posteriormente, mediante extracciones con acetato de etilo del sobrenadante de HYS crecido en medio King's B se identificó, mediante resonancia magnética nuclear (NMR), que el sideróforo no fluorescente responsable de la actividad de captación de hierro de la cepa era la molécula 7-hidroxitropolona (7HT), capaz de quelar Fe^{+2} en una relación estequiométrica de 2:1 (7HT:Fe) (Jiang *et al.* 2016). A modo de ser monitoreada, la misma evidenciaba máximos de absorbancia alrededor de 327 nm y 394 nm en solución acuosa a pH=7, así como una relación de 0,6 (327/394) entre ellos (Jiang *et al.* 2016).

Otra cepa de interés de *P. donghuensis* es P482, recuperada a partir de suelo rizosférico de plantas de tomate en Gdynia, Polonia, y catalogada originalmente como representante de la especie *P. putida* (Krzyzanowska *et al.* 2012, Krzyzanowska *et al.* 2014). P482 se destacaba inicialmente por su capacidad de inhibir *in vitro* el crecimiento de los fitopatógenos fúngicos y bacterianos *Dickeya* sp., *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* y *R. solani* (Krzyzanowska *et al.* 2012). Posteriormente, se observó que los volátiles producidos por el crecimiento de *P. donghuensis* P482 eran capaces de inhibir u obstaculizar el crecimiento de los hongos *R. solani* AG2.2IIIB, *Verticillium dahliae* y *F. culmorum* PV, así como el oomicete *P. ultimum*. Asimismo, se observó que esta capacidad de la cepa se perdía en un mutante de la proteína GacA, aludiendo al control de estas actividades por parte del sistema de post-transcripcional Gac-Rsm. Los compuestos volátiles identificados para esta cepa incluían HCN, metil-tiocianato, S-metil tioacetato, dimetil disulfido y dimetiltrisulfido (Krzyzanowska *et al.* 2016, Ossowicki *et al.* 2017).

Además de las cepas HYS, P482, y SVBP6 (objeto de estudio del presente trabajo), que en conjunto son las cepas mejor caracterizadas de la especie *P. donghuensis*, se han descripto recientemente otros aislamientos con rasgos biocontrol. *P. donghuensis* ZF510, aislada a partir de la rizósfera de plantas de lechuga, es capaz de aliviar los síntomas de la podredumbre suave causada por *P. brasiliense* en esa planta (Qin *et al.* 2023). *P. donghuensis* 22G5 fue aislada de rizósfera de planta de algodón en China y demostró la capacidad inhibir el crecimiento de *V. dahliae* *in planta* (Tao *et al.* 2020).

Esta introducción ofrece únicamente la información disponible al inicio del trabajo presentado en este manuscrito. Los avances adicionales en el estudio de las cepas de *P. donghuensis* serán discutidos en secciones posteriores.

El aislamiento de suelos agronómicos *P. donghuensis* SVBP6.

En base al contexto expuesto en esta introducción acerca del gran potencial del género *Pseudomonas* como insumos agrícolas biológicos destinados a estimular el desarrollo de las plantas y/o promover la salud de los cultivos, nuestro laboratorio se propuso aislar y caracterizar *Pseudomonas* a partir de muestras de suelo y de rizósfera de cultivos en lotes agrícolas de la zona núcleo productiva de Argentina. Se buscaron aislamientos que mostraran actividad antagonista *in vitro* contra un conjunto de hongos fitopatógenos obtenidos de plantas de soja y maíz cultivadas en los mismos entornos en donde se aislaron las *Pseudomonas*. De una colección inicial de 128 aislamientos, se seleccionaron 19 por su capacidad *in vitro* de antagonizar a dos o más fitopatógenos fúngicos. Entre ellos, se destacó el aislamiento SVBP6, obtenido a partir de *bulk soil* en un establecimiento cercano a la localidad de Viale (provincia de Entre Ríos), por poseer la mayor potencia antagonista frente a hongos fitopatógenos (Figura 5). Adicionalmente, SVBP6 resultaba un candidato de interés ya que la afiliación taxonómica basada en genes *housekeeping*

indicaba que no pertenecía a una especie descrita al momento de su obtención (Agaras et al 2015). En los experimentos de co-cultivo de hongos fitopatógenos y aislados de *Pseudomonas*, SVBP6 inhibió el crecimiento de 12 patógenos fúngicos, incluidos miembros de los géneros *Fusarium* y *Colletotrichum*, *M. phaseolina*, *Phomopsis* sp. y aislamientos de *Cercospora sojina* (Figura 5). La actividad inhibitoria contra todos estos aislados fúngicos parecía estar asociada a un compuesto difusible soluble en agua, que se irradia en el medio agarizado desde las estrías de SVBP6, y no a un compuesto volátil, ya que SVBP6 no pudo inhibir el crecimiento de los hongos cuando las estrías bacterianas y los inóculos fúngicos se separaron físicamente en la misma placa de Petri dividida (Agaras et al. 2015).

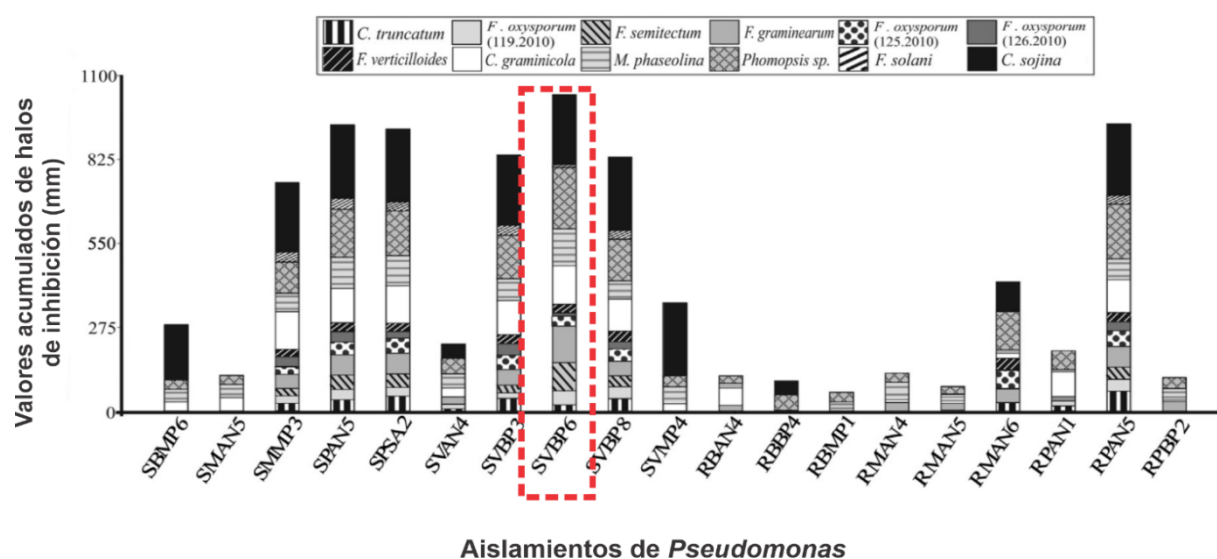


Figura 5: Potencia antifúngica de aislamientos de *Pseudomonas*. El aislamiento SVBP6 se encuentra destacado por un recuadro rojo. El eje vertical muestra los valores acumulados de los halos de inhibición (en mm) que se midieron para cada hongo desafiado con cada uno de los 19 aislamientos de *Pseudomonas* (eje x). La potencia antagonista contra cada patógeno fúngico (es decir, el tamaño del halo de inhibición) está representado por la altura de la barra seccionada asignada para cada hongo. (aclarar la fuente de la figura acá en Agaras et al 2015)

La capacidad de SVBP6 para inhibir una amplia variedad de hongos fitopatógenos indicaba un potencial para mejorar la salud vegetal, quizás con la posibilidad de integrar un producto biológico de aplicación agrícola. Asimismo, los mecanismos que conferían su actividad como antagonista de hongos podían resultar útiles para la identificación de nuevos metabolitos especializados y sumar al amplio arsenal disponible para el género *Pseudomonas*. Por estas razones es que se consideró que SVBP6 era un candidato pertinente para profundizar su caracterización (Agaras et al. 2018).

De manera más holística y considerando los temas abordados hasta ahora, el estudio de las interacciones biológicas, como las que podría establecer SVBP6 en el suelo, resulta fundamental para reconstruir las complejas comunidades de los ecosistemas naturales. Las interacciones entre microorganismos beneficiosos y patógenos en el suelo no solo afectan la salud de las plantas, sino que también reflejan la

diversidad y complejidad de la vida microbiana en estos ecosistemas. Los agentes de biocontrol pueden modificar la estructura y función de las comunidades microbianas del suelo, fomentando un equilibrio que favorece el desarrollo de las plantas y, por ende, sostiene la base de los ecosistemas (Van Elsas *et al.* 2012, Mendes *et al.* 2013). A partir de esta contribución de los biocontroladores a la interconexión de la vida, el estudio de esta bacteria, aunque sea una pieza pequeña en la complejidad de los ambientes naturales, podría ayudar a entender mejor el funcionamiento del mundo natural del que formamos parte y aplicar ese conocimiento para desarrollar prácticas humanas con menor impacto ambiental.

Hipótesis y objetivos:

A pesar de la extensa bibliografía acerca de los diversos y significativos roles que ocupan las especies de *Pseudomonas* en el biocontrol de fitopatógenos, el género continúa siendo una abundante fuente de nuevas actividades PGPR y metabolitos especializados. En este contexto, el aislamiento *P. donghuensis* SVBP6, obtenido por nuestro laboratorio a partir de suelo agronómico, constituía un excelente candidato para la descripción de novedosos mecanismos posiblemente asociados al biocontrol de fitopatógenos en el suelo. La evidencia que se tenía hasta el momento de inicio del trabajo que comprende esta tesis, indicaba que SVBP6 era capaz de producir uno o más metabolitos dependientes de la cascada regulatoria Gac-Rsm, no descritos previamente en el género *Pseudomonas*, que determinaba/n su actividad antagonista ante organismos fitopatógenos.

En función de esta **hipótesis general** es que se plantearon los siguientes **objetivos generales**:

- Identificar los factores presentes en el genoma de SVBP6 asociados a su capacidad de antagonizar *in vitro* fitopatógenos presentes en el suelo.
- Identificar los determinantes bioquímicos, capaces de ser producidos por SVBP6, de su capacidad de antagonizar *in vitro* fitopatógenos presentes en el suelo.
- Determinar la regulación de los determinantes génicos y la producción de los determinantes bioquímicos del antagonismo a fitopatógenos en SVBP6.

Con la finalidad de perseguir estos objetivos, se establecieron los siguientes **objetivos experimentales o específicos**, que serán abordados en los diferentes Capítulos de este trabajo:

- Determinar los factores génicos presentes en el genoma de SVBP6 relacionados con la biosíntesis de uno o más compuestos antifúngicos (Capítulo 1).
- Identificar la/s molécula/s responsables del antagonismo de SVBP6 a hongos fitopatógenos (Capítulo 1).
- Caracterizar la actividad asociada a él/los compuesto/s con actividad antifúngica sintetizado/s por SVBP6 (Capítulo 1).
- Determinar el estado fisiológico óptimo de cultivos de la cepa *P. donghuensis* SVBP6 para la toma de muestras necesaria para los análisis comparativos ómicos vinculados a la función de GacS (Capítulo 2).
- Caracterizar el impacto transcriptómico de la pérdida de función de *gacS* en SVBP6 (Capítulo 2).
- Caracterizar el impacto proteómico de la pérdida de función de *gacS* en SVBP6 (Capítulo 2).
- Caracterizar el impacto metabolómico de la pérdida de función de *gacS* en SVBP6 (Capítulo 2).
- Identificar nuevos BGCs y/o metabolitos antimicrobianos a través de la integración de los distintos análisis ómicos comparativos de la pérdida de función de *gacS* en SVBP6 (Capítulo 2).

Capítulo 1: “Determinación del componente principal del antagonismo antifúngico de *P. donghuensis* SVBP6”

Introducción

SVBP6 es una bacteria Gram-negativa, con forma de bacilo (de entre 1,3-3,2 μm de longitud y 0,5-0,9 μm de ancho) y con flagelo polar (Figura 6A). Posee actividades oxidasa, catalasa y gelatinasa positivas y no forma esporas. SVBP6 puede crecer entre 4°C y 35°C en medios ricos como NA (sigla de la expresión en inglés *Nutrient Agar*; agar nutritivo), aunque la temperatura óptima de crecimiento es 28°C, pertenece al grupo de microorganismos estrategas r (copiótrofos) y su respiración es estrictamente aeróbica. Después de 48 horas en placas de NA, las colonias de SVBP6 son blancas opacas, rugosas (no mucoides) y tienen bordes irregulares (Figura 6A). Además, esta cepa puede crecer en un rango de pH de 6,0 a 10,0 y en un rango de salinidad de 0% a 5% de NaCl en medio nutritivo líquido NYB. La cepa SVBP6 es naturalmente resistente al cloranfenicol (20 $\mu\text{g/ml}$), ampicilina (100 $\mu\text{g/ml}$) y gentamicina (10 $\mu\text{g/ml}$) en medios NYB líquido y NA sólido. Ensayos *in vitro* de actividades de promoción del crecimiento vegetal mostraron que SVBP6 produce enzimas hidrolíticas extracelulares como proteasas, quitinasa y fosfolipasas. Además, SVBP6 produce menor cantidad de cianuro de hidrógeno pero mayor actividad siderófora que la cepa de referencia *P. protegens* CHA0. Además de su potencial como cepa de biocontrol, SVBP6 también mostró *in vitro* actividades probióticas directas para plantas, como la producción de compuestos similares al IAA, ACC desaminasa y la solubilización de fosfato tricálcico (Agaras *et al.* 2018). Por otro lado, en condiciones más cercanas al ambiente natural, SVBP6 ha demostrado ser eficiente en mejorar el crecimiento vegetal. Ensayos *in planta* corroboraron su capacidad de promover el crecimiento de maíz (Lorch *et al.* 2024) y, al ser inoculada sobre granos en ensayos a campo de cultivos de trigo y maíz, la inoculación con SVBP6 aumentó significativamente el rendimiento en grano a cosecha (Agaras *et al.* 2020).

Al obtener un genoma borrador de SVBP6 mediante la tecnología Illumina (Agaras *et al.* 2018), se determinó que el tamaño del genoma de SVBP6 es de 5736632 pares de bases, con un contenido G/C del 62,3%. Se predijeron un total de 5296 genes en su genoma, así como 60 pseudogenes. Se estableció la posición filogenética a partir de una selección de 140 genomas de *Pseudomonas*. SVBP6 se posicionó claramente dentro del complejo *P. putida*. Se seleccionaron nuevamente una colección de 112 genomas estrechamente relacionados para un segundo análisis filogenético y de esa forma se determinó que SVBP6 estaba estrechamente relacionado con *P. donghuensis* HYS y P482 (Figura 6 C). El puntaje ANI respaldó el resultado filogenético, ya que SVBP6 mostró valores de similitud de $99,60\% \pm 0,70$ y $99,52\% \pm 0,99$ con *P. donghuensis* P482 y *P. donghuensis* HYS, respectivamente. Este resultado fue respaldado por un Análisis Filogenético de Múltiples Locus (MLPA) realizado con secuencias concatenadas de 16s ARNr, *gyrB*, *rpoB* y *rpoD*. Mediante una comparación de ORFs de los genomas, se determinó que SVBP6 comparte más ORFs con P482, que HYS y se determinó que SVBP6 posee 284 ORFs (sigla de la expresión en inglés *Open Reading Frame*; marco abierto de lectura,) encontrados solo esta cepa (Figura 6 B, 5,6% del total), entre los cuales se detectaron varios elementos genéticos móviles (9,9%), componentes de membrana (8,2%), elementos secretados putativos (3,4%), genes involucrados en la regulación y/o metabolismo (23,7%) y una cantidad importante de proteínas hipotéticas (54,7%). Llamativamente, al evaluar la presencia de genes y operones relacionados con el antagonismo *in vitro* de patógenos fúngicos (*phlD* para DAPG, *phzF* para fenazinas, *pltB* para pioluteorina y *prnD* para pirrolnitrina), no se detectaron ninguno de los genes involucrados en la síntesis de antibióticos ampliamente caracterizados de *Pseudomonas* de biocontrol. Tampoco se pudo detectar la producción de surfactantes mediante la prueba de colapso de gotas en diferentes medios de cultivo, lo que sugería que la cepa SVBP6 no produce lipopéptidos ni ramnolípidos. Sin embargo, sí se

detectaron un putativo clúster para la producción de bacteriocina, algunos elementos de un sistema de secreción tipo VI (T6SS), un clúster putativo para la biosíntesis de toxoflavina, un gen homólogo de monalisina y un gen *pvdQ* (Agaras *et al.* 2018).

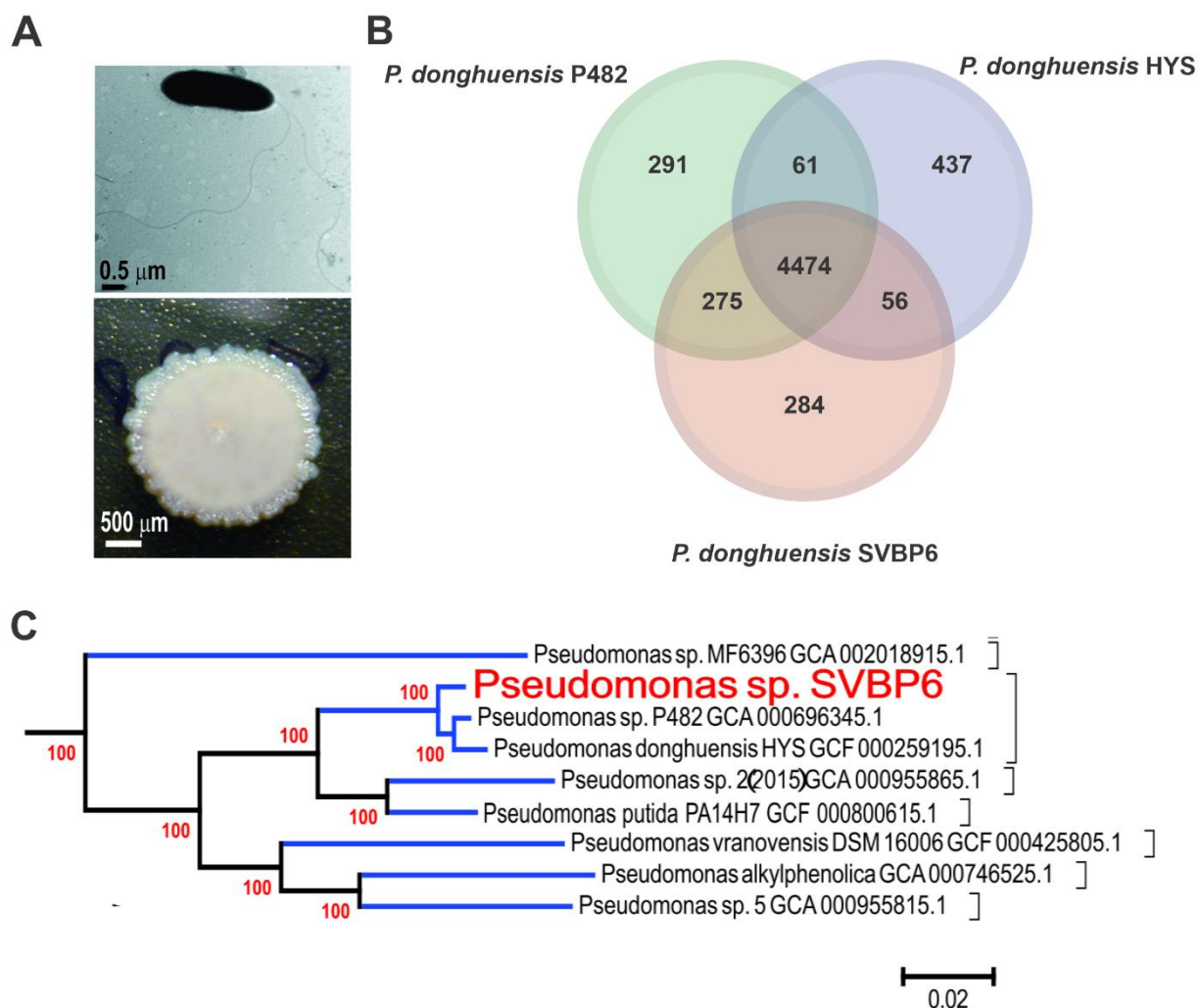


Figura 6: Características del aislamiento *P. donghuensis* SVBP6 (Agaras *et al.* 2018). A) Características morfológicas de la cepa SVBP6. (arriba) Estructura bacilar y flagelos polares de *P. donghuensis* SVBP6 observados con microscopía electrónica. (abajo) Morfología de la colonia de SVBP6 en agar nutritivo después de 48 horas de crecimiento a 28°C. B) Diagrama de Venn de la comparación entre los genes exclusivos de las cepas SVBP6, HYS y P482. C) Sub-sección del árbol filogenético del complejo *P. putida* basado en 676 genes ortólogos putativos generado en Agaras *et al.* 2018. Los genomas de la misma especie según el puntaje ANI bidireccional (> 95%) se indican con corchetes. En este sub-clúster se aprecia la pertenencia de la cepa SVBP6 (en rojo) a la especie *P. donghuensis* y su parentesco relativo a otras especies del grupo *P. putida*.

Con la finalidad de obtener información acerca de elementos genéticos relacionados a su antagonismo, se generó una colección de 2500 mutantes de inserción única Tn5 de SVBP6 y se seleccionaron aquellos clones que habían perdido su potencial antagonista contra el aislado fitopatógeno fúngico *M. phaseolina* 131.2010. Un total de 58 mutantes perdieron su capacidad de inhibir el crecimiento del hongo en condiciones de co-cultivo. Entre ellos, se obtuvieron dos mutantes insercionales independientes en el gen *gacS*, sugiriendo que la actividad antifúngica observada en SVBP6 era dependiente de la cascada regulatoria Gac-Rsm, cómo muchas otras actividades ligadas al biocontrol en *Pseudomonas*. La mutación *gacS*::Tn5 resultó en la incapacidad de producir HCN, exoproteasa y fosfolipasa (Agaras *et al.* 2018).

En su conjunto, el amplio rango de antagonismo de la cepa SVBP6, así como la ausencia de componentes genéticos vinculados a la biosíntesis de un metabolito especializado conocido para especies biocontroladoras de *Pseudomonas*, convertían a SVBP6 en un excelente candidato para el descubrimiento de nuevos elementos genéticos y bioquímicos de actividad antimicrobiana. En este contexto, en este trabajo se planteó identificar los factores bioquímicos responsables de la actividad antimicrobiana de *P. donghuensis* SVBP6, así como caracterizar dicha actividad, con un enfoque particular en el antagonismo frente a hongos fitopatógenos. Además, se propuso identificar los elementos genéticos involucrados en el biocontrol de esta cepa, determinando los componentes biosintéticos y regulatorios que la controlan.

Hipótesis de trabajo

La cepa bacteriana *Pseudomonas donghuensis* SVBP6 secreta al medio extracelular uno o varios compuestos con actividad antifúngica directa sobre el micelio de hongos fitopatógenos. La producción de estos compuestos es resultado de la biosíntesis mediada por genes específicos presentes en el genoma de SVBP6 y está regulada por la cascada de señalización Gac-Rsm.

Objetivos específicos

- Determinar los factores génicos presentes en el genoma de SVBP6 relacionados con la biosíntesis de uno o más compuestos antifúngicos.
- Identificar la/s molécula/s responsables del antagonismo de SVBP6 a hongos fitopatógenos.
- Caracterizar la actividad asociada a él/los compuesto/s con actividad antifúngica sintetizado/s por SVBP6.

Materiales y Métodos

Conservación y crecimiento de cepas bacterianas

Las cepas bacterianas utilizadas en este capítulo se detallan en la Tabla 1. Las cepas se conservaron en condiciones de esterilidad, en una solución *stock* acuosa de glicerol 20% final en ultrafreezer (-80°C). De forma rutinaria, las cepas fueron recuperadas de los *stocks* y crecidas en agar nutritivo, NA (agar tripteína soja, 40 g/L; extracto de levadura, 5 g/L) para su manipulación a corto plazo. Para cultivos *overnight* (aproximadamente 16 horas) se utilizó caldo nutritivo levadura, NYB (caldo nutritivo, 25 g/L; extracto de levadura, 5 g/L). Las cepas de *Pseudomonas* fueron incubadas a 28°C. En caso de requerirlo, se agregó estreptomycin (Str) 200 µg/ml para medios sólidos y 100 µg/ml para medios líquidos.

Microorganismos utilizados			
Microorganismo/Cepa	Descripción	Temperatura óptima de crecimiento	Referencia
<i>Pseudomonas donghuensis</i> SVBP6	Aislamiento silvestre proveniente de suelo agrícola en Viale, Provincia de Entre Ríos, Argentina	28°C	(Agaras <i>et al.</i> 2018)
28l	Mutante SVBP6 con inserción Tn5 en <i>gacS</i> Str ^R	28°C	(Agaras <i>et al.</i> 2018)
16d	Mutante SVBP6 con inserción Tn5 Str ^R	28°C	(B. C. Agaras, Iriarte, & Valverde, 2018)
78i	Mutante SVBP6 con inserción Tn5 Str ^R	28°C	(B. C. Agaras, Iriarte, & Valverde, 2018)
40b	Mutante SVBP6 con inserción Tn5 Str ^R	28°C	(B. C. Agaras, Iriarte, & Valverde, 2018)
5n	Mutante SVBP6 con inserción Tn5 Str ^R	28°C	(B. C. Agaras, Iriarte, & Valverde, 2018)
83j	Mutantes SVBP6 con inserción Tn5 Str ^R	28°C	(B. C. Agaras, Iriarte, & Valverde, 2018)
30n	Mutante SVBP6 con inserción Tn5 Str ^R	28°C	(B. C. Agaras, Iriarte, & Valverde, 2018)

<i>Macrophomina phaseolina</i> CCC 131-2010	Aislamiento fúngico silvestre de plantas de soja (Bengolea, Córdoba, Argentina).	28°C	(Agaras <i>et al.</i> 2015)
<i>Fusarium graminearum</i> CCC 122-2010	Aislamiento fúngico silvestre de pasto (Bengolea, Córdoba, Argentina).	24°C	(Agaras <i>et al.</i> 2015)
<i>Fusarium semitectum</i> CCC 120-2010	Aislamiento fúngico silvestre de pasto (Bengolea, Córdoba, Argentina).	24°C	(Agaras <i>et al.</i> 2015)
<i>Pythium ultimum</i> 67-1	Obtenido de Allelix Agriculture, Mississauga, Canada.	28°C	(Maurhofer <i>et al.</i> 1994)

Tabla 1: Tabla de microorganismos utilizados en este trabajo y sus temperaturas de crecimiento.

Conservación y crecimiento de aislamientos fúngicos

Los aislamientos fúngicos utilizados en este capítulo se detallan en la Tabla 1. Para su recuperación a partir de stocks de conidios o microesclerocios conservados en suspensión acuosa en glicerol 20% a -80°C y manipulación a corto plazo se utilizó medio agarizado papa-dextrosa (*potato dextrose agar*, 39 g/L, Laboratorios Britania). Cincuenta microlitros de suspensión eran vertidos sobre la placa de PDA y esparcidos con espátula de Drigalski. Luego de 24-72h, dependiendo del hongo, cuando el micelio resultante de los conidios/microesclerocios cubría toda la superficie del agar, un rectángulo de 1x1cm era cortado y apoyado sobre una nueva placa de PDA. Una vez crecido, cercano a la confluencia, se tomó el extremo del crecimiento micelial para su manejo en ensayos, de manera de utilizar la porción de micelio más activa. Las temperaturas de incubación de cada hongo/oomicete se indican en la Tabla 1.

Herramientas *in silico* para el análisis de secuencias de ADN y función génica

Al momento de realización de los análisis y experimentos del presente Capítulo, se contaba con un genoma borrador (incompleto) basado en secuenciación Illumina, depositado en NCBI bajo el código: NWCB000000000 (www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore) o en la base de datos PseudoCAP (www.pseudomonas.com) bajo el código 5836 (<https://pseudomonas.com/strain/show?id=5836>). Los códigos de anotaciones incluidos en el presente capítulo corresponderán a esta versión del genoma de SVBP6, en particular haciendo referencia a los *locus tag* de la base de datos PseudoCAP. La colección de mutantes Tn5 de SVBP6 se obtuvo previamente, como se describe en (Agaras *et al.* 2018). El sitio de inserción de cada mutante fue determinado mediante AP-PCR (Martínez-García *et al.* 2014, Agaras *et al.* 2018). Una vez identificado el sitio de inserción en los mutantes de interés, se utilizó la secuencia aminoacídica del producto proteico del gen interrumpido para predecir su función. Para ello, se realizaron búsquedas de homología mediante el servidor HMMER (Potter *et al.* 2018) y un análisis de dominios conservados en PFAM (InterPro, (Paysan-Lafosse *et al.* 2023)) para cada gen. La secuencia de la región identificada y estudiada en este trabajo como *cluster* biosintético relacionado al antagonismo de SVBP6

fue analizada en búsqueda de elementos relacionados con la expresión de sus genes, así como para determinar la aparición de regiones homólogas en el genoma de otras bacterias por dentro y fuera del género *Pseudomonas*. Se analizó la presencia de promotores mediante las herramientas Bprom (Taboada *et al.* 2018) y el servidor NNPP (Reese 2001). La co-transcripción de ORFs fue determinada con la herramienta Operon-Mapper (Taboada *et al.* 2018) y para la predicción de terminadores Rho-independientes se utilizó ARNold (Naville *et al.* 2011). Finalmente, para la búsqueda de sitios de unión para proteínas de la familia de Csr/Rsm, se utilizó el servidor RSAT (Schubert *et al.* 2007).

Ensayos de antagonismo *in vitro*

Para evaluar la capacidad de SVBP6 y sus mutantes Tn5 de antagonizar hongos/oomicete fitopatógenos se utilizó un ensayo de antagonismo por co-cultivo en placas de Petri sobre medio agarizado PDA (*potato dextrose agar*). Para ello, se tomó un cuadrado de 1x1cm de agar con el extremo del micelio activo y se apoyó sobre la superficie del agar en el centro de la placa de Petri. En paralelo, las placas fueron divididas en 4 cuadrantes, en cuyo extremo se estiraron las cepas bacterianas. El antagonismo de cada cepa evaluada fue ensayado por triplicado, incluyendo un control sin bacteria. Posterior a la inoculación del fitopatógeno y la estría bacteriana, se incubaron las placas hasta que el micelio del control alcanzaba la confluencia. La incubación se realizó en oscuridad, manteniendo la temperatura óptima de crecimiento para cada fitopatógeno (Tabla 1). Los tiempos de ensayo para cada hongo/oomicete evaluado fueron: *M. phaseolina*, 72 hs; *F. semitectum*, 20 días; *F. graminearum*, 13 días; *P. ultimum*, 4 días. La descripción del crecimiento microscópico de hifas se realizó observando ensayos de antagonismo ante *M. phaseolina*, luego de su incubación a 28°C durante 72h, con un microscopio invertido Leica DMI6000 B.

Evaluación del espectro UV-Visible de sobrenadantes y extractos

Para analizar el espectro de absorción UV-visible de los sobrenadantes libres de células y extractos ensayados en este trabajo, se tomaron 1,5 µl de la muestra correspondiente y se realizó un barrido en el rango 220-800nm mediante el uso de un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (Thermo Fischer Scientific), con un intervalo de medida de 3 nm. Como blanco, se utilizó medio de cultivo estéril, H₂O o AcEt, según correspondiera.

Extracción de sobrenadantes de espectro compatible con 7HT

Se realizaron cultivos bacterianos en Erlenmeyers de 125 ml, conteniendo 20 ml del medio líquido correspondiente. Los cultivos fueron inoculados a partir de un pre-cultivo *overnight*, de manera que la DO₆₀₀ (Densidad óptica a 600 nm) inicial fuera de 0,02, y se incubaron a 28°C y 200 rpm. Una vez obtenida la DO₆₀₀ o absorbancia 327nm deseada, se realizaron extracciones ácidas utilizando acetato de etilo. Para extracciones en pequeña escala (hasta 1 ml de sobrenadante), el volumen a extraer de cultivo fue removido del frasco de cultivo y centrifugado a 14800 rpm a temperatura ambiente durante 2 minutos. El sobrenadante libre de células resultante de remover el sobrenadante fue acidificado con 1/10 de volumen de HCl 1N (pH≈2) y extraído con 1 volumen de acetato de etilo (AcEt). La extracciones fueron

realizadas en Eppendorf y se repitieron 1 vez, combinando las fases orgánicas resultantes. El AcEt fue evaporado en SpeedVac y el residuo seco fue resuspendido en medio de cultivo o H₂O, según lo deseado.

Para extracciones a mediana escala (5 a 20 ml de sobrenadante), el volumen a extraer fue centrifugado a 10000 rpm durante 10 minutos a 4°C en tubos cónicos de 50 ml. El sobrenadante resultante fue luego trasvasado a ampolla de decantación o a un nuevo tubo cónico para ser acidificado y extraído como lo descrito para la escala pequeña. El extracto orgánico resultante fue secado utilizando Na₂SO₄, secado en rotavapor a temperatura ambiente y resuspendido en medio de cultivo o H₂O, según lo deseado.

Evaluación de cinéticas de cultivo y producción de 7HT

Para evaluar la cinética de producción de 7HT se realizaron cultivos por triplicado en medio de cultivo King's B (KB; Glicerol 8 g/l, Peptona bacteriana 10 g/l, K₂HPO₄·3H₂O 1,5 g/l, MgSO₄·7H₂O 1,5 g/l). Los cultivos se realizaron en Erlenmeyer de 125 ml utilizando 20 ml de medio KB y fueron incubados a 28°C, a 200 rpm de agitación. Se inocularon utilizando cultivos *overnight*, previo lavado de las células con solución salina (NaCl 0,9 g/l, dos veces), de manera que la DO₆₀₀ inicial fuera de 0,02. El crecimiento del cultivo fue monitoreado en muestras tomadas cada 1 hora para determinar DO₆₀₀ y su espectro UV-Visible.

Cuantificación de la actividad antifúngica de sobrenadantes y extractos

Para cuantificar el efecto del sobrenadante libre de células de SVBP6, sus mutantes, los extractos derivados y 7HT purificada, se monitoreó el crecimiento de los hongos fitopatógenos evaluados mediante el seguimiento temporal del área del micelio en medio agarizado, utilizando placas de poliestireno de 6 pocillos, por triplicado. Un esquema ilustrativo del método utilizado se muestra en la Figura 7. En todos los casos, los sobrenadantes utilizados para estos ensayos provenían de cultivos crecidos en Erlenmeyer (125 ml) en medio KB (20 ml), incubados a 28°C con 200 rpm de agitación. Luego de alcanzar DO₆₀₀=3,0 (aproximadamente a las 8 horas de cultivo), los cultivos fueron centrifugados a 10000 rpm por 10 minutos, se recuperaron los sobrenadantes libres de células, se esterilizaron por filtración (filtros de 0,2 µm) y se mezclaron con PDA 2× fundido y entibiado. Se mezclaron 2,5 ml de los sobrenadantes o extractos resuspendidos en KB a ensayar con 2,5 ml de PDA 2×, para luego verter los 5 ml resultantes en cada posición de una placa de 6 pocillos. Luego de que la mezcla se enfriara y solidificara, tacos cilíndricos de medio agarizado (0,25 cm²) con micelio activo del correspondiente hongo fitopatógeno fueron depositados en el centro de cada pocillo e incubados en oscuridad a la temperatura indicada en Tabla 1. El crecimiento del micelio fue monitoreado en fotografías de la placa de 6 pocillos, en las que se determinó el área cubierta por el micelio con la asistencia de Photoshop CC 2019 (Adobe Systems, Inc., San Jose, CA). Los datos obtenidos de área de cobertura del micelio se utilizaron para calcular el Índice de Crecimiento Micelial (ICM) según la expresión aritmética: [(área micelio – área inóculo del micelio)/área total del pocillo]]. Se incluyeron controles utilizando medio fresco KB en lugar de sobrenadante.

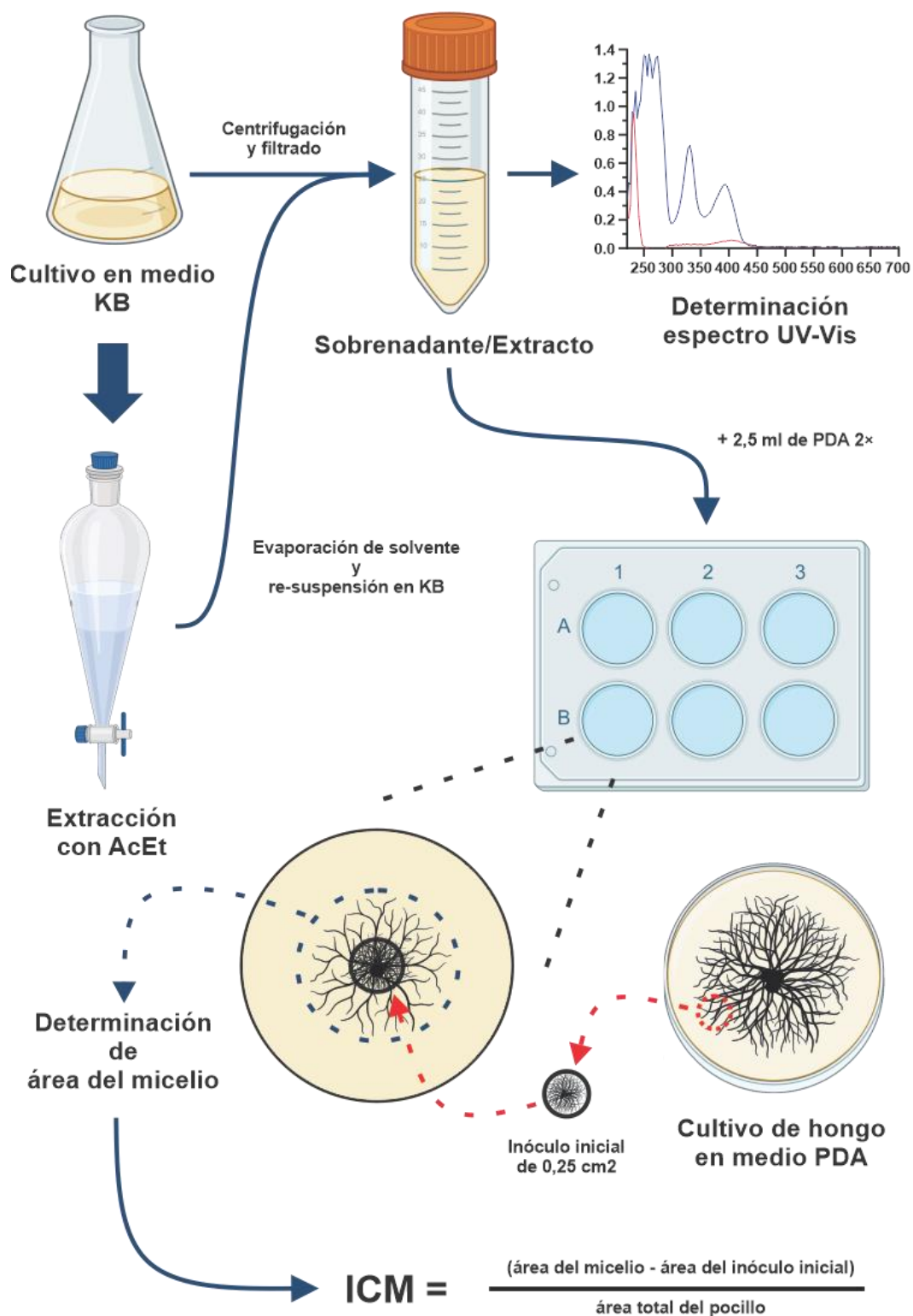


Figura 7: Esquema metodológico de la cuantificación de la actividad antifúngica del sobrenadante libre de células y/o extracto de SVBP6.

Análisis químico del extracto de SVBP6

Para disponer de suficiente sobrenadante de cultivo conteniendo metabolitos antifúngicos de SVBP6 que puedan ser sometidos a fraccionamiento y análisis químico, se realizaron cultivos a mayor escala que las descritas anteriormente. Se obtuvieron cultivos de 250 ml de medio KB sin glicerol (KB0) en Erlenmeyers de 1 litro, incubados a 28°C a 200 rpm de agitación. Sobrenadantes de hasta 2 litros totales de medio KB0 fueron acumulados luego de crecer los cultivos hasta alcanzar $DO_{600}=3$. Cada cultivo fue centrifugado a 10000 rpm durante 10 minutos a 4°C en frascos de centrifuga de 500 ml. Los sobrenadantes fueron liofilizados, resuspendidos en el mínimo volumen posible de agua destilada esterilizada, combinados y liofilizados nuevamente para su posterior extracción orgánica. Para el extracto del mutante biosintético 16d, un volumen total de sobrenadante de 50 ml fue procesado de igual forma que el de SVBP6. Asimismo, se procesaron de igual forma 30 ml de medio KB0 sin inocular, a modo de blanco de análisis futuros.

Se estableció una colaboración con el Dr. Antonio Evidente (Departamento de Ciencias Químicas de la Universidad “Federico II” de Nápoles), para el fraccionamiento y análisis de los residuos sólidos obtenidos de los sobrenadantes liofilizados de SVBP6. El material obtenido a partir de SVBP6 fue disuelto en 300 ml de H₂O y extraído a pH neutro, 3 veces con 1/3 volumen de AcEt. Luego de ser secadas con Na₂SO₄, las fases orgánicas fueron evaporadas al vacío, obteniéndose 305 mg de residuo oleoso. Este procedimiento fue repetido para el liofilizado de 16d, obteniendo residuos de 38 mg al extraer a pH=7 y 2,9 mg a pH=2.

Una fracción del AcEt obtenido en la extracción fue analizado por cromatografía en capa delgada, utilizando fases fijas de sílica gel (Merck; Kieselgel 60, F254; 0,25 mm y RP-18 F254) y cloroformo:isopropanol (9:1) como eluyente. Los perfiles cromatográficos resultantes fueron evaluados bajo una luz de radiación UV.

En paralelo, se tomó una muestra del residuo de SVBP6 y se lo resuspendió en metanol, añadiendo unas gotas de H₂O. Luego de 12 horas, se observó la formación de cristales que fueron analizados por refracción de rayos X. Un cristal fue tomado y montado sobre un flujo de N₂ a 173 °K, en un difractómetro Bruker-Nonius KappaCCD equipado con un aparato Oxford Cryostream (radiación Mo K α monocromatizada de grafito, imágenes de rotación CCD, cortes gruesos, escaneos ϕ y ω para llenar la unidad asimétrica). Se aplicó una corrección de absorción semi-emprírica (multiescaneo, SADABS). La estructura se resolvió mediante métodos directos utilizando el programa SIR97 (Altomare *et al.* 1999) y se refinó anisotrópicamente mediante el método de mínimos cuadrados de matriz completa en F2 frente a todas las reflexiones medidas independientes utilizando el programa SHELXL-2016/6 (Sheldrick 2015). Asimismo, los cristales obtenidos fueron utilizados para obtener espectros de ¹H-RMN en CDCl₃ a 400 MHz en un espectrómetro Bruker.

Preparación de 2,3- y 2,7-dimetoxi-tropolona

Para obtener las variantes metiladas de 7HT, se añadió una solución etérea de CH_2N_2 a 10 mg del extracto orgánico de AcEt de SVBP6 a pH 7,0 resuspendidos en metanol (1 mL). Luego de 1 hora, se detuvo la reacción evaporando el líquido con un flujo de N_2 . El residuo obtenido (10,8 mg) fue purificado por cromatografía en capa delgada preparativa en sílica gel (Merck; Kieselgel 60, F254; 0,5 mm) usando CHCl_3 -i-PrOH (9:1) como eluyente. Los productos de metilación fueron confirmados por ^1H -RMN en CDCl_3 a 400 MHz en un espectrómetro Bruker.

Obtención de cristales de 7HT

La cristalización de 7HT, para ensayos de antagonismo, se realizó a partir de 200 ml de sobrenadante del cultivo en Erlenmeyer de SVBP6, incubado hasta alcanzar una $\text{DO}_{600}=3,0$ a 28°C , 200 rpm. Una vez centrifugado para descartar el pellet de células, los 200 ml de sobrenadante fueron liofilizados y resuspendidos en 30 ml de H_2O . Se realizaron 3 extracciones con acetato de etilo de 15ml y se conservó la fase orgánica. Los 30 ml resultantes fueron evaporados en rotavapor y resuspendidos en 0,5 ml de metanol, para luego ser vertidos en un cristizador, posterior al añadido de 150 μl de H_2O . El volumen fue evaporado a -4°C , y el residuo sólido obtenido fue pesado.

Resultados y discusión

Identificación y descripción *in silico* de un cluster génico biosintético hipotéticamente vinculado a la actividad antifúngica de *P. donghuensis* SVBP6.

La capacidad de SVBP6 de antagonizar hongos fitopatógenos era de particular interés dado que, al momento de la realización del presente trabajo, no se había identificado en su genoma ningún *cluster* génico biosintético previamente caracterizado para bacterias del género *Pseudomonas*. Es por ello que se exploró la biblioteca de mutantes de inserción Tn5, en búsqueda de aquellos que habían perdido su capacidad de antagonizar *M. phaseolina* y dónde la función asociada al gen interrumpido, así como el contexto genómico de éste, posea indicios acerca de la identidad del metabolito o los metabolitos responsables de la pérdida de antagonismo.

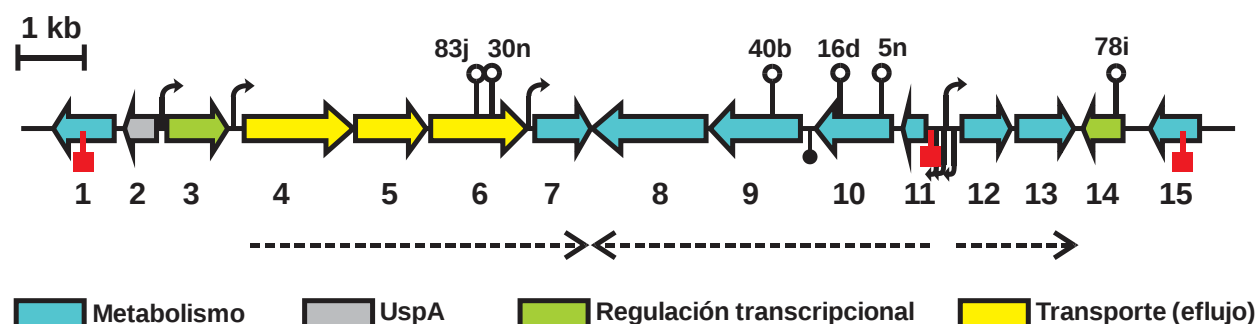


Figura 8: Locus genómico asociado con la actividad antifúngica de *Pseudomonas donghuensis* SVBP6. El diagrama muestra un fragmento de 16 kpb del genoma de la cepa SVBP6. Los sitios de inserción Tn5 correspondientes a los seis mutantes isogénicos independientes son indicados con líneas terminadas en un círculo blanco por sobre ellos. Las flechas en color representan los 15 ORFs anotados en el locus y su categoría funcional es indicada por los colores de la leyenda (ver Tabla 2). Las flechas discontinuas indican los transcritos policistrónicos predichos. La posición y sentido de los promotores detectados se indican con flechas dobladas. Los terminadores transcripcionales Rho-independientes predichos se indican con líneas con un círculo negro bajo el mismo. Las secuencias de reconocimiento asociadas a la cascada regulatoria Gac-Rsm predichas son indicadas por líneas con un cuadrado rojo en la punta.

En función de esta estrategia inicial y como primer acercamiento, se analizaron las locaciones físicas en el genoma de SVBP6 de las inserciones Tn5 de la colección de mutantes. De esta forma, se encontraron 6 mutantes, de los 50 que carecían actividad antagonista ante *M. phaseolina*, que poseían su inserción en marcos abiertos de lectura (*open reading frame*, ORF) muy próximos entre sí en el cromosoma de SVBP6. Las 6 inserciones se ubicaban dentro de una región de aproximadamente 16 kpb (Figura 8). Esta región posee 15 ORFs, cuyas funciones anotadas podían ser asociadas a la biosíntesis y transporte de moléculas, así como a la regulación de la expresión de sus genes (Tabla 2). Nueve de estas funciones fueron asociadas a actividades enzimáticas compatibles con la biosíntesis de un metabolito (genes 1, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 y 15), otras 3 (genes 4, 5 y 6) al transporte de moléculas al exterior de la célula, otras 2 a reguladores transcripcionales (genes 3 y 14, de las familias LysR y TetR, respectivamente), y finalmente un gen de

respuesta a estrés *uspA* (gen 2). La cercanía, distribución y funciones asociadas de estos ORF aludían a la organización de un *cluster* génico biosintético (Donia *et al.* 2014a, Donia *et al.* 2014b, Tran *et al.* 2019, Meesil *et al.* 2023, Zhang *et al.* 2024).

En función del interés por esta región, se procedió a caracterizar los elementos asociados a la expresión y su control de los ORF presentes por medio de herramientas *in silico*. Se predijo un terminador Rho-independiente en la región intergénica posterior al gen 10, así como 3 transcritos policistrónicos, organizados de la siguiente forma: orf4-5-6-7, orf11-10-9-8 y orf12-13. Esta distribución resultó coincidente en su mayoría con la posición y sentido de los promotores predichos para la región (Figura 8). Adicionalmente, y en línea con la relación funcional descrita previamente entre la actividad antifúngica de la cepa y la cascada regulatoria Gac-Rsm, se pudieron predecir 3 secuencias de unión compatibles con el motivo reconocido a nivel de transcritpo por las proteínas Rsm de la cascada regulatoria (Figura 8) (Schubert *et al.* 2007, Duss *et al.* 2014a).

ORF	Función asociada predicha	Número de acceso PseudoCAP*	Mutante Tn5 asociado	Mejor ortólogo fuera de <i>Pseudomonas</i> spp. (%identidad/%cobertura) - RefSeq
1	Enoil CoA hidratasa	COO64_RS11460		<i>Azotobacter chroococcum</i> (72/100) - WP_131340589
2	Proteína de estrés universal	COO64_RS11465		<i>Pantoea</i> sp Tr-811 (51/98) - WP_167271259
3	Regulador transcripcional de la familia LysR	COO64_RS11470		<i>Aeromonas caviae</i> (73/98) - GJB79141.1
4	Transportador tipo MFS	COO64_RS11475		<i>Paucimonas</i> sp.(79/94) - MDR2306476.1
5	Proteína de secreción de la familia HlyD	COO64_RS11480		<i>Aeromonas caviae</i> (73/98) - GJB79139.1
6	Subunidad de transportador de eflujo de la membrana exterior	COO64_RS11485	30n, 83j	<i>Paucimonas</i> sp.(76/94) - MDR0278484.1
7	Oxidorreductasa de la familia SDR	COO64_RS11490		<i>Aeromonas caviae</i> (78/100) - GJB79137.1
8	Proteína de unión a tiamina pirofosfato	COO64_RS11495		<i>Paraburkholderia xenovorans</i> (55/98) -WP_011493090
9	Fenilacetato CoA ligasa	COO64_RS11500	40b	<i>Stutzerimonas stutzeri</i> (72/99) - AZO86837.1
10	Proteína de la familia Acyl CoA deshidrogenasa	COO64_RS11505	16d, 5n	<i>Paraburkholderia</i> sp. BL21/4N1 (65/98) - WP_105510348

11	Proteína de la familia de la tioesterasa	COO64_RS11510		<i>Phaeobacter inhibens</i> (73/99) - TdaD (WP_014881726)
12	Oxidorreductasa dependiente de NAD(P) de la familia SDR	COO64_RS11515		<i>Trinickia fusca</i> (62/98) - WP_121278624.1
13	Ester CoA Liasa	COO64_RS11520		<i>Pseudoduganella violaceinigra</i> (65/98) -WP_028103602
14	Regulador transcripcional de la familia TetR/AcR	COO64_RS11525	78i	<i>Duganella</i> sp. Root1480D1 (45/86) - WP_057265804.1
15	Oxidoreductasa de la familia SDR	COO64_RS11530		<i>Paucimonas</i> sp.(77/100) - MDR0278485.1

* Los códigos incluidos en esta Tabla corresponden a la versión borrador del genoma de SVBP6 (<https://pseudomonas.com/strain/show?id=5836>)

Tabla 2: Predicciones funcionales de las proteínas asociadas al *cluster* de genes relacionados a la biosíntesis de 7HT en *P. donghuensis* SVBP6.

Esta región cromosomal (Figura 8, Tabla 2) posee sus contrapartes conservadas en el genoma del resto de la cepas de *P. donghuensis*, dónde se determinó que cada proteína parte de esta región del genoma de SVBP6 posee al menos un 99% de identidad con su homólogo en las cepas HYS, P482, 22G6, B21-042/043, ZF510 de *P. donghuensis* (Gao *et al.* 2012, Gao *et al.* 2015, Ossowicki *et al.* 2017, Tao *et al.* 2020, Zboralski *et al.* 2022a, Qin *et al.* 2023) y las cepas MM2-24 y MM2-37 (código de acceso en PseudoCAP: 17539 y 17540, respectivamente). Por fuera del género *Pseudomonas*, se encontró que los ORFs 3-7 y 15 codificaban para proteínas con ortólogos altamente similares (70 a 80%) en cepas de *Paucimonas* sp. y *Aeromonas caviae*, Por fuera del género *Pseudomonas*, se encontró que los ORFs 4-7 codificaban para proteínas con ortólogos altamente similares (75 a 78%) en cepas de *Stenotrophomonas rhizophila* y *Collimonas* sp., mientras que los ORFs 8, 10, 12, 13 y 14 poseen ortólogos moderadamente similares en *Pseudoduganella*, *Paraburkholderia*, *Trinickia* y *Duganella*, todos miembros de los *Burkholderiales* (Tabla 2). Dentro de *Pseudomonas*, el *cluster* biosintético hipotético ha sido detectado con un alto nivel de conservación en 39 cepas de un total de 1324 genomas completos y 12906 genomas borradores disponibles en la base de datos PseudoCAP (<http://www.pseudomonas.com/>: Junio 2024). Entre ellos, se encuentran los representantes de *P. donghuensis* (HYS, P482, 22G6, ZF510, MM2-24, MM2-37.1, Irchel 3F5, 1239, ABAC8, NBRC 111117 y RIT263), *P. qingdaonensis* (JJ3, BIGb0473, PA14H7, 1033, MF6396, BRM28 y UASWS0946), *P. vranovensis* T-26, *P. wadenswilerensis* (SNU, WT1) y *P. putida* (PA14H7, UASWS0946 y ABAC8), todos ellos incluidos en el grupo filogenético *P. putida*. Sin embargo, el grupo de *P. putida* puede descomponerse en 15 grupos actualmente (Girard *et al.* 2021). En base a esta clasificación, las cepas de *P. donghuensis*, *P. vranovensis*, *P. wadenswilerensis* pertenecen al sub-grupo de *P. vranovensis*, mientras que las cepas de *P. qingdaonensis*, al sub-grupo de *P. japonica*. Algunas de estas cepas, incluidas representantes de *P. donghuensis*, habían sido caracterizadas por sus actividades antimicrobianas, de igual manera que SVBP6 (Raoul des Essarts *et al.* 2016, Ossowicki *et al.* 2017, Aiman *et al.* 2018, Qin *et al.* 2023).

En resumen, la información asociada a esta región del cromosoma de SVBP6 apuntaba a la presencia de un BGC funcional, cuya correcta expresión parecería estar relacionada al antagonismo de SVBP6 a *M. phaseolina*, mediante la biosíntesis y secreción al medio extracelular de una o varias moléculas. La alta conservación de este *cluster* en cepas de *P. donghuensis* y múltiples especies del grupo *P. putida* también indicaba una posible importancia biológica en el nicho habitado por estas cepas, cuya asociación a fenotipos antimicrobianos promovía la asociación del *cluster* y la actividad de interés de SVBP6.

Confirmación del antagonismo a hongos fitopatógenos *in vitro* de mutantes de *P. donghuensis* SVBP6.

Como primer acercamiento experimental al estudio del *cluster* biosintético identificado (Figura 8), se procedió a confirmar la pérdida o disminución del fenotipo antagonista de los 6 mutantes correspondientes contra distintos hongos fitopatógenos.

En detalle, el antagonismo de SVBP6 a *M. phaseolina* en co-cultivo se evidencia cómo una zona claramente delimitada libre de hifas en el agar, con un amplio margen de distancia entre el frente del crecimiento de

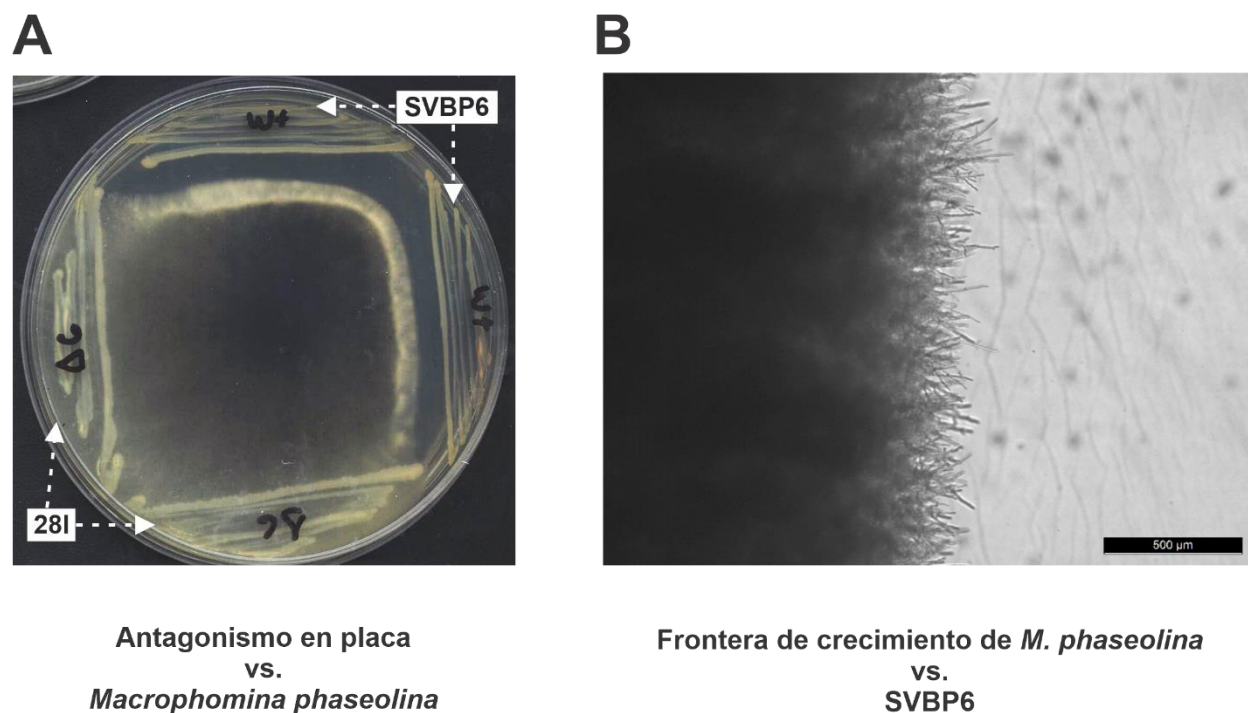
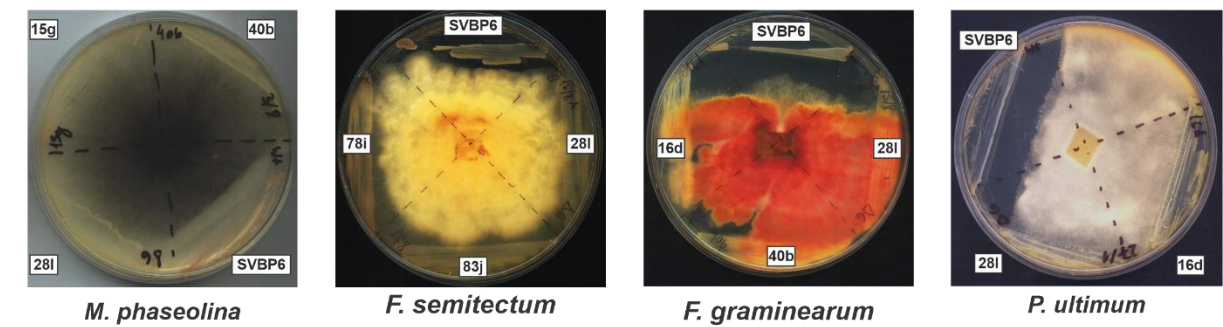


Figura 9: Actividad inhibitoria de SVBP6 y su mutante 28I (*gacS*::Tn5) ante el hongo fitopatógeno *M. phaseolina*. A) Foto de la placa de Petri con agar papa-dextrosa en el que se enfrentaron en co-cultivo el hongo y las bacterias. En la foto se pueden apreciar 2 estrías de crecimiento del mutante 28I y dos estrías de SVBP6 silvestre, así como el crecimiento de las hifas del hongo a partir de un *plug* de 1×1 cm en el centro de la placa, luego de una incubación de 72h a 28°C. B) Foto en campo claro del frente de crecimiento del hongo enfrentado a SVBP6 silvestre, de la placa mostrada en A).

las hifas del hongo y la estría bacteriana, indicativo de la producción de sustancias inhibitorias difusibles desde la biomasa bacteriana (Figura 9A). Este fenotipo se mantiene aún luego de hasta 4 semanas de incubación. En cambio, en el co-cultivo con el mutante 28l (*gacS*::Tn5), el hongo no posee restricciones de crecimiento, ni tampoco para avanzar sobre la biomasa del mutante (Figura 9A). A nivel microscópico, el efecto de los compuestos solubles que difunden desde las estrías de SVBP6 se evidencia como un frente nítido de hifas densamente empaquetadas que no pueden progresar hacia la estría bacteriana (Figura 9B).

A



B

Cepa	<i>Macrophomina phaseolina</i>	<i>Fusarium semitectum</i>	<i>Fusarium graminearum</i>	<i>Pythium ultimum</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Xanthomonas vesicatoria</i>
SVBP6	+	+	+	+	+	+
83j	-	-	-	-	+	+
30n	-	-	-	-	+	+
40b	-	-	-	-	+	+
16d	-	-	-	-	+	+
5n	-	-	-	-	+	+
78i	-	-	-	-	n.d.	n.d.
28l (<i>gacS</i> ::Tn5)	-	-	-	-	-	-

Figura 10: Resumen de los fenotipos de los mutantes del cluster biosintético frente a distintos hongos fitopatógenos. A) Fotos ilustrativas de cada uno de los hongos ensayados, en las siguientes condiciones: *M. phaseolina* 28°C, 72h; *F. semitectum* 21°C, 20 días; *F. graminearum* 21°C, 13 días; *P. ultimum* 21°C, 96hs. Todas las fotos incluyen controles con SVBP6 silvestre y su mutante *gacS*::Tn5 28l, alternando con distintos mutantes del cluster biosintético putativo. B) Tabla de comparación de los fenotipos de antagonismo de los 6 mutantes del cluster frente a los hongos y oomicete ensayados. El antagonismo ante bacterias de SVBP6 y sus mutantes fue corroborado en (Martins *et al.* 2023).

Aunque aparentemente esto no refleja un cambio morfológico evidente en las hifas de *M. phaseolina*, sí se traduce macroscópicamente en la detención del crecimiento del hongo.

Se corroboró la pérdida del fenotipo antifúngico de los 6 mutantes, inicialmente descrita para el hongo *M. phaseolina* (Figura 9A), contra otros fitopatógenos (los hongos *Fusarium oxysporum* y *Fusarium semitectum*, y el oomicete *Pythium ultimum*). Los mutantes 83j, 30n, 40n, 16d, 5n y 78i fueron incapaces de antagonizar a ninguno de los agentes fitopatógenos ensayados, con la excepción de las bacterias *Bacillus subtilis* y *Xanthomonas vesicatoria* (Figura 10 A, 10 B, Martins *et al.* (2023)). Por otro lado, el mutante de la cascada regulatoria Gac-Rsm 28l demostró carecer tanto de actividad antifúngica como antibacteriana. La cualidad pleiotrópica del control ejercido por la cascada Gac-Rsm sobre el metabolismo especializado explicaría el resultado observado (Ferreiro *et al.* 2021). En cepas modelo antagonistas de hongos fitopatógenos, la pérdida de función de la histidina quinasa GacS o del regulador de respuesta asociado GacA, resulta en una fuerte reducción en la expresión de genes asociados a la promoción del crecimiento vegetal y la producción de antimicrobianos (Haas *et al.* 2003, Haas *et al.* 2005, Lapouge *et al.* 2008). En contraste, el fenotipo de los 6 mutantes seleccionados (Figuras 8 y 10) se explicaría por la pérdida de la actividad del producto de expresión del gen interrumpido por el transposón Tn5, o del transcripto policistrónico asociado y sus productos de expresión. Estos mutantes se utilizaron entonces en análisis subsiguientes para intentar caracterizar el vínculo entre la pérdida del antagonismo y la expresión de los ORF interrumpidos en cada caso por el transposón.

Señales espectrofotométricas compatibles con 7-hidroxitropolona en el sobrenadante libre de células de *P. donghuensis* SVBP6 y mutantes en estudio

En base a la coincidencia detectada entre los genes responsables de la biosíntesis de 7HT en *P. donghuensis* HYS y los genes interrumpidos en la colección de mutantes carentes de antagonismo a hongos fitopatógenos en SVBP6, se procedió a evaluar si los mutantes de SVBP6 podían sintetizar compuestos químicamente relacionados con la 7HT. Considerando las actividades asociadas a los genes interrumpidos y las diferencias en los nichos ecológicos de HYS y SVBP6 se planteó, como hipótesis inicial, que SVBP6 es capaz de biosintetizar y secretar una o varias moléculas de estructura química similar a 7HT y con la capacidad de inhibir el crecimiento de organismos fitopatógenos.

La biosíntesis y secreción de 7HT al medio extracelular en la cepa HYS es detectable a través de su espectro UV-Visible (UV-Vis) a pH neutro ya que posee señales características que facilitan su reconocimiento: dos picos con máximos de absorbancia a 327 nm (A327) y 393 nm (A393) (Jiang *et al.* 2016). De manera que, como primer acercamiento en el análisis de la hipótesis propuesta, se determinó el espectro UV-Vis del medio condicionado por SVBP6. El sobrenadante libre de células de SVBP6 en medio líquido KB, luego de un cultivo de 8 horas, mostró los mismos picos de absorbancia A327 y A393 en coincidencia con el patrón observado para la cepa HYS. En un marcado contraste, el mutante en *gacS* (28l) sólo evidenció un pico de mucho menor intensidad que en SVBP6 y con un máximo de absorbancia alrededor de 405 nm (A400). Este pico a 405nm se incrementó en el sobrenadante de 28l a las 30 horas de cultivo (Figura 11 A). Resultados de la cepa HYS (Jiang *et al.* 2016) y de otras *Pseudomonas* (Meyer 2000) indican que este pico con máximo a 405 nm se debe a la secreción de pioverdina, un sideróforo común en bacterias del género *Pseudomonas*, que además otorga la característica pigmentación amarillo-verdosa a los cultivos en medios limitados en hierro y que es acompañada de la capacidad de fluorescer ante la luz azul (Figura 11 D). La presencia de pioverdina en el sobrenadante de 28l indica que su biosíntesis no es dependiente de una cascada Gac-Rsm funcional, cómo

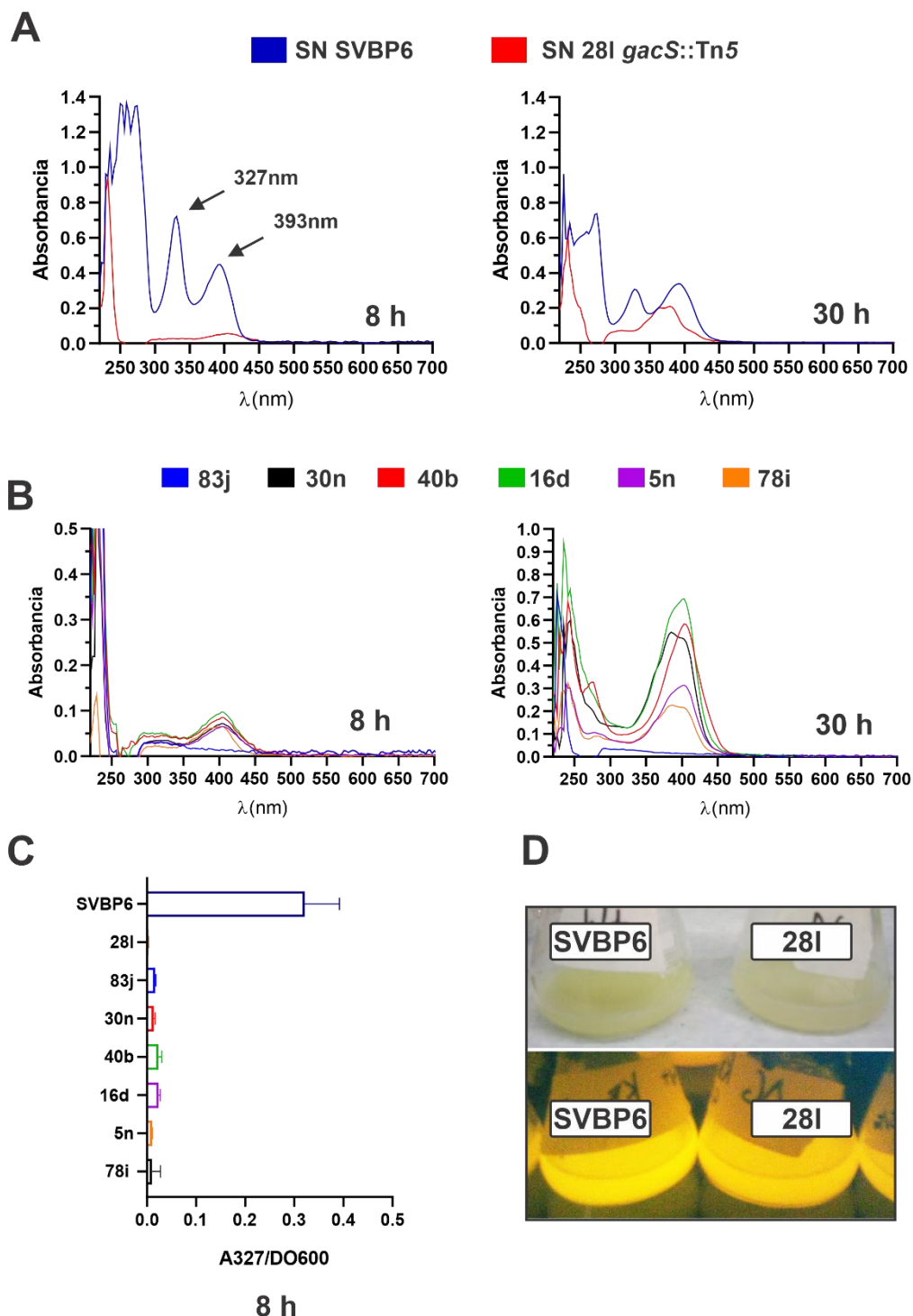


Figura 11: Espectro UV-visible del sobrenadante de cultivo libre de células de SVBP6 y sus mutantes. Los sobrenadantes fueron obtenidos de cultivos líquidos realizados en Erlenmeyer a 28°C y 200 rpm. Los valores observados en los gráficos de Absorbancia vs λ en esta figura son representados por los valores promedio obtenidos por triplicados en todos los casos. El intervalo de longitud de onda para los espectros UV-Visibles en esta figura y las siguientes mostradas en este manuscrito fue de 3 nm . A) Espectros UV-Visibles del sobrenadante de SVBP6 y su mutante *gacS*::Tn5 28I a las 8 horas (izquierda) y 30 horas (derecha) de cultivo. B) Espectros UV-Visible del sobrenadante de los mutantes correspondientes al cluster biosintético de interés a las 8 horas (izquierda) y 30 horas (derecha) de cultivo. C) Cuantificación de la absorbancia a 327 nm, relativizada por unidad de densidad óptica a 600 nm de su cultivo de origen, de los sobrenadantes de SVBP6 y sus mutantes a las 8 horas de cultivo. D) Foto de los cultivos en medio líquido KB de SVBP6 y el mutante 28I, luego de 30h. (Arriba) Foto con luz natural. (Abajo) Foto con luz UV.

se había observado para HYS (Jiang *et al.* 2016). Asimismo, en el sobrenadante de cultivos de SVBP6 de 30 h (Figura 4A) todavía se pudo advertir la presencia de 7H; sin embargo, la intensidad relativa del pico A327 fue menor al de A393 en comparación al espectro de 8 h de cultivo, y además se observó un corrimiento hacia los 405nm. Este cambio se reflejó en la relación de absorbancias de los máximos característicos de la 7HT (A327/A393), que para el cultivo a las 8h fue de 1,6, mientras que a las 30h esa relación se redujo a valores alrededor de 0,9. Dada la aparición del máximo de absorbancia

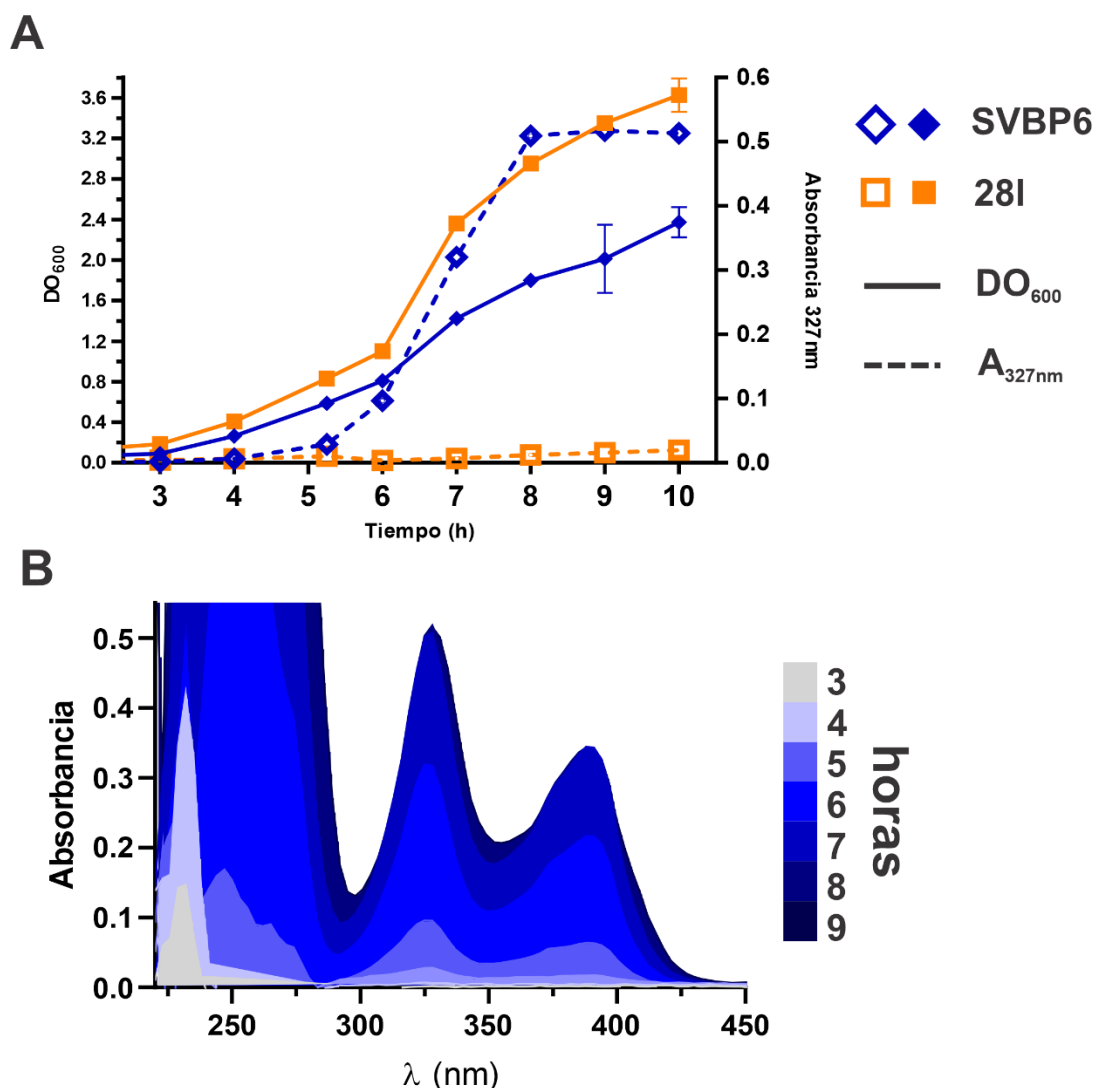


Figura 12: Monitoreo de la producción de 7HT durante el crecimiento de SVBP6 durante el crecimiento de SVBP6. A) Curvas de crecimiento monitoreadas por DO₆₀₀ nm de SVBP6 silvestre y su mutante *gacS::Tn5* 28I. Los datos de DO₆₀₀ se representan con una línea continua, mientras que los de absorbancia a 327nm con una línea interrumpida. La información correspondiente a SVBP6 se muestra en azul, mientras que la correspondiente al mutante 28I en naranja. B) Espectros UV-Visible de sobrenadantes de los cultivos que se muestran en A) para SVBP6. Los valores de absorbancia promedio (n=3) se representan con líneas continuas. Los espectros se encuentran superpuestos, mostrando colores más intensos para tiempos más cortos en el área bajo la curva de cada uno.

correspondiente a la pioverdina en el mutante 28I, podríamos explicar el cambio en la relación A327/A393 en SVBP6 por la combinación de una disminución en la cantidad de 7HT en el medio de cultivo a 30 h respecto a 8 h (con la consiguiente reducción en los valores de A327 y A393) y de un aumento en la concentración de pioverdina (con el consiguiente aumento de A405). De esta forma, el espectro UV-Vis a las 8 h de cultivo de SVBP6 correspondería mayoritariamente a la concentración presente de 7HT, mientras que a las 30 h de cultivo el espectro reflejaría una menor concentración de 7HT y la presencia de pioverdina.

En paralelo, se evaluaron los espectros UV-vis de sobrenadantes de 8 h de cultivo de los mutantes isogénicos del *cluster* en estudio (Figura 1), de manera de evidenciar el impacto de las mutaciones sobre el patrón de absorbancia del sobrenadante de SVBP6 compatible con la producción de 7HT. Todos los mutantes perdieron las señales espectrales de la 7HT (Figura 11B). Sin embargo, todos mostraron un máximo centrado en 405 nm (a excepción del mutante 83j) similar al observado para el mutante de la cascada Gac-Rsm, el cual se vio acrecentado considerablemente a las 30 h de cultivo (Figura 11B). Dado que la eventual presencia de pioverdina aporta absorbancia a 393 nm (máximo característico de la 7HT), se decidió utilizar el valor de absorbancia a 327nm como un indicador selectivo para cuantificar la presencia de una/s molécula/s compatible/s con el espectro de la 7HT en los sobrenadantes de SVBP6 y sus mutantes. Con esta consideración, nuevamente observamos que en todos los mutantes analizados ocurrió una fuerte disminución en la producción de el o los compuestos con espectro compatible con la 7HT, en cuyo espectro no se observa un máximo de absorbancia a 327nm.

A la luz de estos resultados, se llevaron a cabo experimentos a fin de determinar una posible relación entre la molécula responsable del espectro compatible con la 7HT y las capacidades de antagonizar el crecimiento de hongos fitopatógenos de las células de SVBP6. Con el propósito de estandarizar condiciones de cultivos y sobrenadantes, así como de conocer más acerca de la cinética de aparición de las señales espectrales UV-Vis en el cultivo de SVBP6, se monitoreó A327nm del sobrenadante de cultivo durante el crecimiento de SVBP6. Se observó que la producción de el/los compuesto/s asociados a la A327nm se indujo en fase exponencial (entre 4 y 5 h del inicio del cultivo), aumentó hasta alcanzar un nivel máximo en la transición a fase estacionaria después de 7-8 h de cultivo (Figura 12 A y B), y disminuyó en un 50% a las 30 h de cultivo (Figura 11 A). En contraste, la A327nm en el sobrenadante del mutante *gacS::Tn5* se mantuvo en valores mínimos durante el cultivo, como se había observado anteriormente (Figura 5 A y B). Los datos de esta cinética de crecimiento y producción de molécula(s) compatible(s) con 7HT se consideraron como referencia para condiciones experimentales de las experiencias subsiguientes, tomando el momento de cultivo con A327nm máxima (8h) como punto de partida para caracterizar actividad antifúngica y realizar extracciones del sobrenadante de SVBP6.

Extracción de moléculas con señales espectrales compatibles con 7-hidroxitropolona a partir de sobrenadante de cultivo de SVBP6.

La 7-hidroxitropolona puede ser extraída a partir de medios de cultivo con acetato de etilo (AcEt) como solvente (Jiang *et al.* 2016). Con el objetivo de generar un extracto enriquecido que facilite la posterior purificación del/los compuesto/s que generaba/n espectros compatibles con 7HT en el sobrenadante de cultivo de SVBP6, se realizaron extracciones de sobrenadantes de 8 h de cultivo de SVBP6 en medio KB. La extracción con AcEt provocó la desaparición de la señal A327 en el sobrenadante. Asimismo, el extracto de AcEt obtenido mostró un patrón de absorbancia similar al observado en fase acuosa, aunque corrimiento hacia longitudes de onda menores (máximos de 324nm y 374nm), que podría explicarse debido a la acidificación previa a la extracción (Figura 13 A y B), como se reporta para la 7HT (Jiang *et al.* 2016). La suma de estas evidencias indicaba la transferencia mayoritaria de la/s molécula/s compatible/s con 7HT desde la fase acuosa al AcEt.

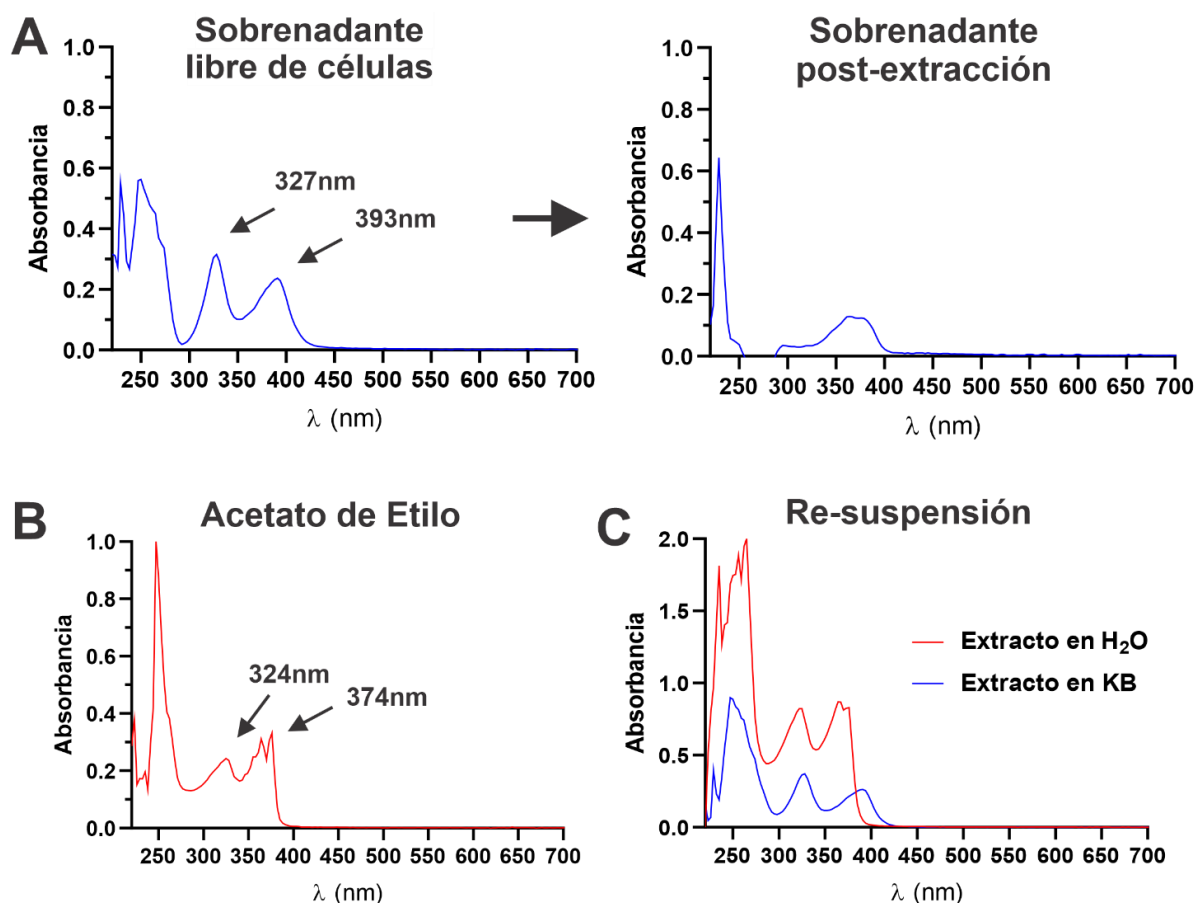


Figura 13: Extracción con acetato etilo a partir del sobrenadante libre de células de SVBP6 silvestre en medio KB. A) Espectros UV-visible del sobrenadante de SVBP6 silvestre luego de 8 horas de cultivo, antes de su extracción con acetato de etilo (izquierda) y después de su extracción (derecha). Ver Figura 11 para detalles acerca de la representación de espectros UV-Visibles. B) Espectro UV-visible del extracto de SVBP6 silvestre en acetato de etilo, proveniente del sobrenadante mostrado en A). C) Espectro UV-visible de la resuspensión en agua o medio de cultivo KB del residuo seco obtenido luego de la evaporación del solvente del extracto obtenido que se muestra en B).

Al evaporar el solvente y resuspender el extracto en KB, se observó el restablecimiento de las señales espectrales como se habían detectado en el sobrenadante de cultivo (Figura 6C). Por otro lado, la resuspensión en H₂O evidenció un desplazamiento de los máximos de absorbancia hacia longitudes menores, así como la descomposición del pico a mayores longitudes de onda en dos máximos, consistentes con 7HT resuspendida en H₂O o un pH más ácido (Figura 13 C, Jiang *et al.* (2016).

Las similitudes observadas en los espectros obtenidos bajo las condiciones de extracción y resuspensión aportaron evidencia adicional sobre la presencia de 7HT y/o de moléculas similares en el sobrenadante de SVBP6. La obtención de estos extractos permitió avanzar en el estudio de la relación entre las moléculas responsables del antagonismo a fitopatógenos y la presencia de espectros compatibles con 7HT en cultivos de SVBP6 y sus extractos con AcEt.

Actividad antifúngica de extractos del sobrenadante de cultivo de *P. donghuensis* SVBP6.

Hasta este punto, el efecto negativo de SVBP6 sobre el crecimiento de hongos fitopatógenos se había observado exclusivamente al enfrentar las células bacterianas en co-cultivo con micelio del fitopatógeno. El antagonismo en medio agarizado denotaba, como fue mencionado anteriormente, que esta actividad era mediada por factores solubles secretados desde las estrías de SVBP6 (Figuras 2 y 3). Con la finalidad de evaluar si esta actividad también estaba presente en el sobrenadante de cultivos líquidos, en los cuales se había detectado el espectro compatible con 7HT, se diseñó un ensayo dirigido a poner de manifiesto la actividad antifúngica de muestras libres de células. Brevemente, en este diseño, los sobrenadantes de cultivo libres de células o sus extractos en AcEt evaporados y resuspendidos en el mismo medio (KB), fueron mezclados en volúmenes iguales con medio agarizado fundido apto para el crecimiento del fitopatógeno correspondiente (PDA 2×). Cada muestra agarizada a ser evaluada fue luego vertida en un pocillo de una microplaca de 6 posiciones para que se solidifiquen. El inóculo de hongo consistió en un taco circular de agar con micelio fresco de *M. phaseolina* en el centro de cada pocillo. Durante la incubación de la placa, se tomaron fotografías y se cuantificó digitalmente el área cubierta por el micelio fúngico a través del cálculo de un “Índice de Crecimiento Micelial” (ICM), tal como se describió en Materiales y Métodos (Figura 14).

En primer lugar, se analizó el crecimiento de *M. phaseolina* en presencia del sobrenadante libre de células de SVBP6 obtenido a las 8 h de cultivo, en el que la A327nm asociada a la posible presencia de 7HT era la máxima posible en las condiciones de cultivo (Figuras 12 y 14 A). Se observó que el sobrenadante de cultivo de SVBP6 fue capaz de retrasar el crecimiento del micelio y extender 5 días el tiempo necesario para que cubra el pocillo entero, en comparación con la condición control con medio de cultivo KB (Figura 14 B y 14 C). A diferencia de los ensayos de antagonismo en co-cultivo en medio agarizado (Figuras 9 y 10), se observó que en este diseño de antagonismo en el que no hay células bacterianas vivas, sino solo sus productos extracelulares, *M. phaseolina* puede finalmente superar la inhibición establecida por la concentración de el/los compuesto/s presente/s al inicio y reanudar el crecimiento después del retraso inicial, aunque a una menor velocidad (Figura 14C). Esto podría deberse a que la/s molécula/s responsable/s presente/s en el sobrenadante no poseen una renovación propia de su biosíntesis y secreción por parte de las células de SVBP6, en contraste con la condición de co-cultivo en la que las células vivas podrían estar exportando moléculas al medio extracelular constantemente, manteniendo un gradiente de concentración sobre el agar. El o los compuestos presentes a una concentración fija inicial

en el sobrenadante de SVBP6 podrían estar sometidos a una degradación química intrínseca, o incluso a una degradación biológica por parte del agente fitopatógeno que para poder desarrollarse podría tener formas de procesar bioquímicamente las moléculas que obstaculizan su desarrollo (Mazzola *et al.* 1995, Duffy *et al.* 2003, Bardin *et al.* 2015). Adicionalmente, en algunos casos, se ha observado que metabolitos fúngicos pueden modificar expresión de los BCG de metabolitos antimicrobianos, cómo en el caso de ácido fusárico producido por miembros del género *Fusarium* sobre la biosíntesis DAPG en *P. protegens* (Duffy *et al.* 2004, Schouten *et al.* 2004). En síntesis, estos resultados permitieron observar que el efecto del sobrenadante de SVBP6 es característicamente fungistático sobre *M. phaseolina*.

Por otro lado, habiendo previamente equiparado sus absorbancias a 327nm (Figura 14 A), el extracto de SVBP6 resuspendido en KB demostró tener un efecto fungistático similar al sobrenadante de SVBP6 (Figuras 7B y 7C). El inicio del crecimiento de *M. phaseolina* se vio retrasado en igual magnitud que para el sobrenadante, aunque la confluencia del pocillo fue alcanzada un día antes para el extracto (Figura 14 C). Este resultado indicó que el o los agentes fungistáticos presentes en el sobrenadante de SVBP6 eran extraídos mayoritariamente con éxito por el extracto en AcEt, con un efecto adicional por parte del sobrenadante posiblemente asociado a molécula/s incapaces de ser extraídas eficientemente en AcEt.

Asimismo, en el sobrenadante del mutante 16d (carente de señales espectrales compatibles con 7HT; Figura 11) sólo se evidenció una actividad remanente mínima de inhibición de *M. phaseolina* (Figura 14 C). En función de la característica isogénica del mutante 16d con SVBP6, los resultados permiten vincular en primera instancia la pérdida de la propiedad fungistática del sobrenadante de SVBP6 con la inserción de Tn5 en el ORF asociado a la expresión de una Acil CoA deshidrogenasa (Tabla 2) asociada a la biosíntesis de 7HT en HYS. Dada la pérdida del patrón espectral UV-vis observada para el sobrenadante de este mutante (Figura 11), así como la asociación del gen y su contexto genómico a la síntesis de 7HT, estos resultados reforzaron la hipótesis de la existencia de un vínculo entre el antagonismo fúngico de SVBP6 y la biosíntesis de moléculas al menos similares a la 7HT. En esta misma línea, observamos que la actividad antifúngica podía ser reestablecida en el sobrenadante de cultivo del mutante 16d al complementarlo con el extracto de sobrenadante de SVBP6, incluso obteniéndose un efecto inhibitorio mayor que para el sobrenadante de SVBP6 (Figura 14 C), consistentemente con la concentración ligeramente mayor de principio activo detectada en el espectro UV-Vis (Figura 14 A). Cuando se suplementó el sobrenadante de SVBP6 con el mismo extracto activo que restableció la inhibición del sobrenadante del mutante 16d, observamos que se retrasó el crecimiento inicial del hongo en aproximadamente 5 días y se desfasó la confluencia del micelio en el pocillo en 8 días (Figura 14 C). Estos resultados indican que existiría una relación directamente proporcional entre el efecto fungistático y la cantidad de extracto (y de moléculas antifúngicas) presente en cada muestra evaluada. Con la finalidad de poner esto a prueba, realizamos un ensayo de dosis-respuesta para analizar la relación entre la actividad inhibitoria del crecimiento de *M. phaseolina* y la cantidad de extracto adicionada al medio de cultivo del hongo (Figura 15 A, B, C). Establecimos una dosis de extracto de referencia compatible con una $A_{327}=0,2$ (Figura 15 A, concentración 1x) medida en el extracto resuspendido en KB, previo a su dilución al 1/2 con el medio agarizado (PDA 2x) en el pocillo de la placa (Figura 15 B), y evaluamos la actividad antifúngica de un rango de concentraciones diferentes en factor 2 alrededor de la referencia. Las dosis iguales o menores a 0,5x no se diferenciaron del control sin extracto (Figura 15 B y 15 C). En el rango de dosis 1x a 4x, en cambio, observamos una correlación positiva en la inhibición del crecimiento de *M. phaseolina* con la dosis de extracto presente en los pocillos de prueba. Esto se evidencia cuantitativamente al calcular el tiempo que tardó el hongo en cubrir el 50% (ICM=0,5) del pocillo de la placa en cada condición ensayada ($t_{0,5}$, Figura

15 D). De esta forma, se pudo determinar que el atraso en el crecimiento micelial es directamente proporcional a la A327 del extracto de SVBP6. Se estimó un aumento de 29,24 horas por unidad de dosis ($A_{327}=0,2$) para el $t_{0,5}$ en el rango de dosis de extracto 0,5-4×.

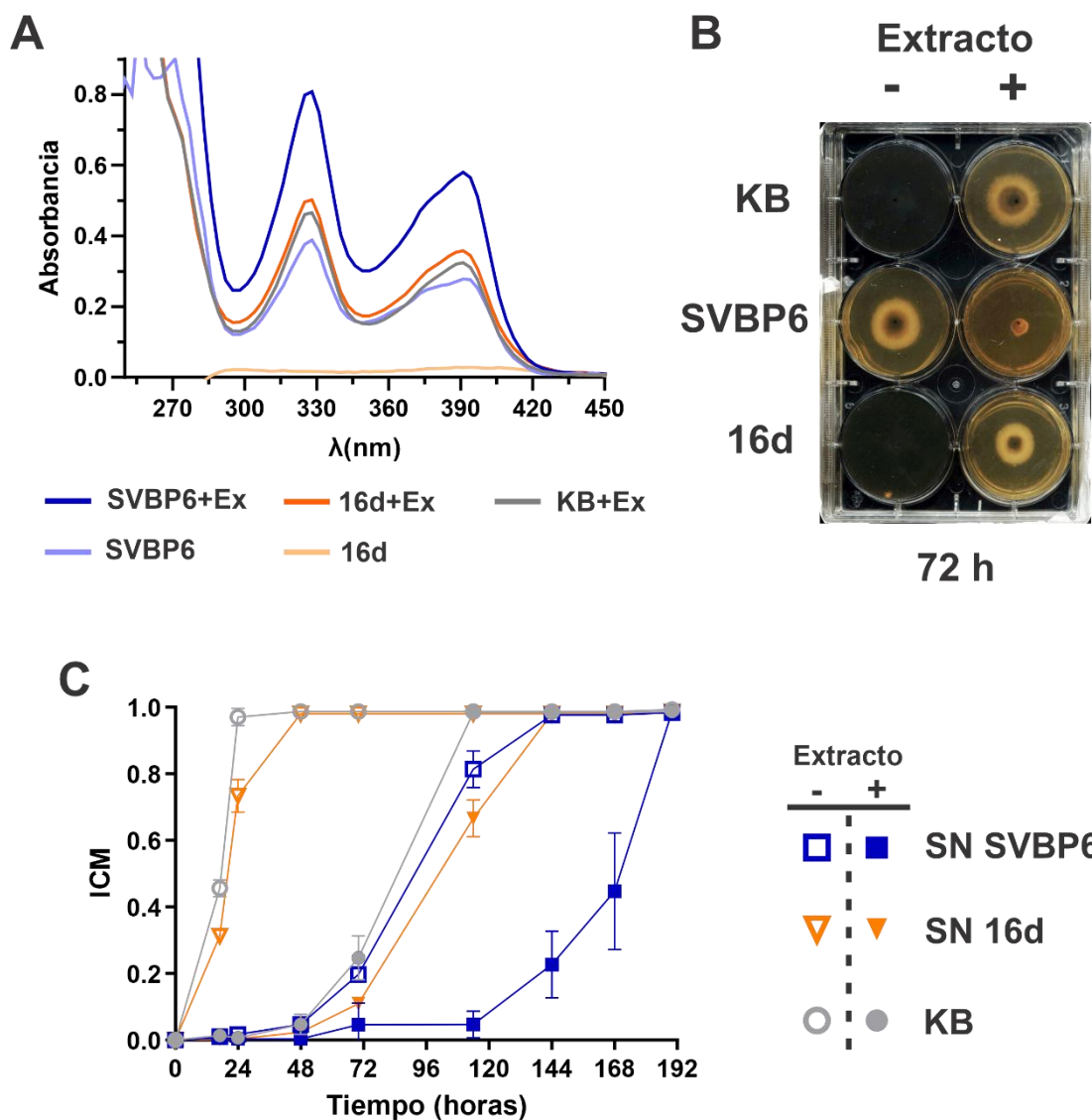


Figura 14: Evaluación de la actividad antifúngica del sobrenadante (SN) y extracto de cultivo de SVBP6 y su mutante 16d vs. *Macrophomina phaseolina*. A) Espectro UV-Visible de los sobrenadantes utilizados. Ver Figura 11 para detalles acerca de la representación de espectros UV-Visibles. Aquellas líneas representando un sobrenadante al que se le agregó extracto de SVBP6 silvestre poseen colores más oscuros. B) Foto representativa de una placa de 6 pocillos ensayada, luego de 72 horas de crecimiento a 28°C. Ver esquema (Figura 7) en metodología. Concisamente, el sobrenadante o extracto resuspendido en KB se diluyó al medio con PDA 2× fundido y se vertió en cada pocillo según corresponda, dejando que se solidifique. Posteriormente, un inóculo de micelio presente en un taco circular de medio agarizado de aproximadamente 0,25 centímetros de diámetro de *M. phaseolina* (en esta figura) o el hongo correspondiente, en experimentos posteriores, fue apoyado en el centro del pocillo, poniendo en contacto el micelio del hongo con el agar solidificado. C) Cuantificación del crecimiento superficial del hongo *M. phaseolina* en presencia del sobrenadante de cultivo de SVBP6 y su mutante 16d. El crecimiento micelial se expresa como Índice de Crecimiento Micelial (ICM). $ICM = (\text{área cubierta por el micelio} - \text{área del micelio inicial}) / \text{área total del pocillo}$.

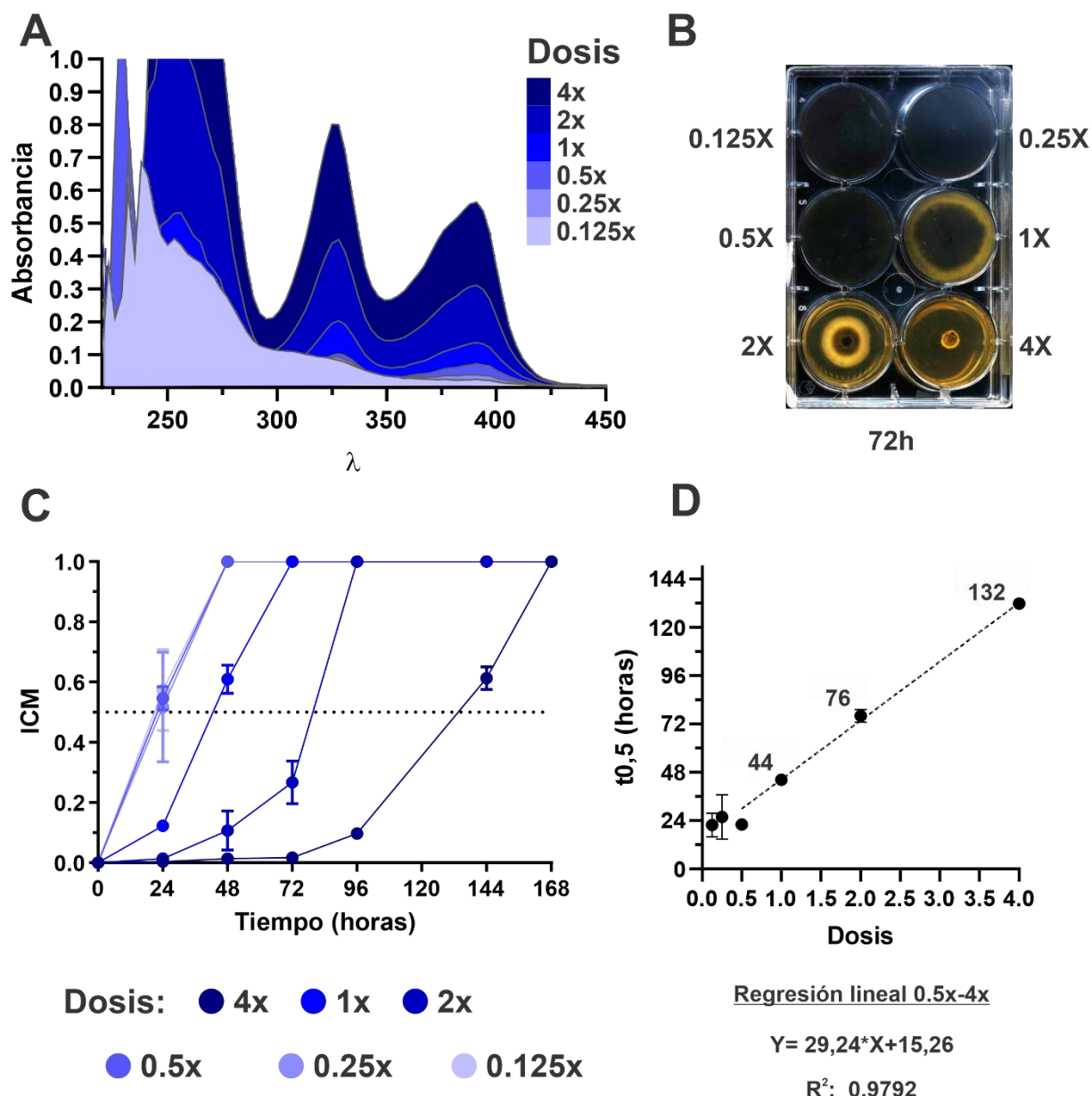


Figura 15: Ensayo dosis-respuesta para el extracto de sobrenadante de SVBP6s vs *M. phaseolina*. A) Espectro UV-Visible de los sobrenadantes utilizados. Ver Figura 11 para detalles acerca de la representación de espectros UV-Visibles. Las concentraciones utilizadas se expresan como diluciones o concentraciones en base 2, de un extracto con $A_{327} = 0.2$, el cual correspondería a la concentración 1x. Las mismas se señalan con distintas tonalidades de azul en el área bajo la curva, siendo la más oscura la más concentrada y viceversa. B) Foto representativa de una placa de 6 pocillos ensayada, luego de 72 horas de crecimiento a 28°C. C) Cuantificación del crecimiento superficial del hongo *M. phaseolina* en presencia de las concentraciones de extracto ensayadas. El crecimiento micelial se expresa como Índice de Crecimiento Micelial (ICM, ver Figura 7). La concentración de cada condición ensayada se expresa como distintas tonalidades de azul siendo la más oscura la más concentrada y viceversa. D) Tiempo calculado para que cada concentración logra cubrir el 50% (ICM=0,5) del well ($t_{0,5}$) en función de la dosis de extracto. La regresión lineal mostrada como una línea punteada corresponde para el rango de dosis 0.5-4x.

Confirmación de la identidad del factor bioquímico con actividad antifúngica mayoritaria del extracto del sobrenadante de *P. donghuensis* SVBP6: 7-hidroxitropolona.

El conjunto de experimentos realizados con el sobrenadante de cultivo de SVBP6 y su mutante biosintético 16d sobre el fitopatógeno *M. phaseolina* señalaban claramente a una o más moléculas secretadas por SVBP6 al medio circundante como responsables de su actividad antifúngica. Asimismo, indicaban que la aparición de esta actividad, así como del espectro compatible con 7HT, eran dependientes de la integridad del ORF 10 (Figura 8, Tabla 2), asociado a la biosíntesis de 7HT y que se encuentra interrumpido por el transposón Tn5 en el mutante 16d. En función de estos resultados y el resto de la información aquí presentada hasta este punto, se procedió a utilizar estrategias propias de la química analítica para obtener la identidad del factor bioquímico mayormente responsable del fenotipo antifúngico de *P. donghuensis* SVBP6.

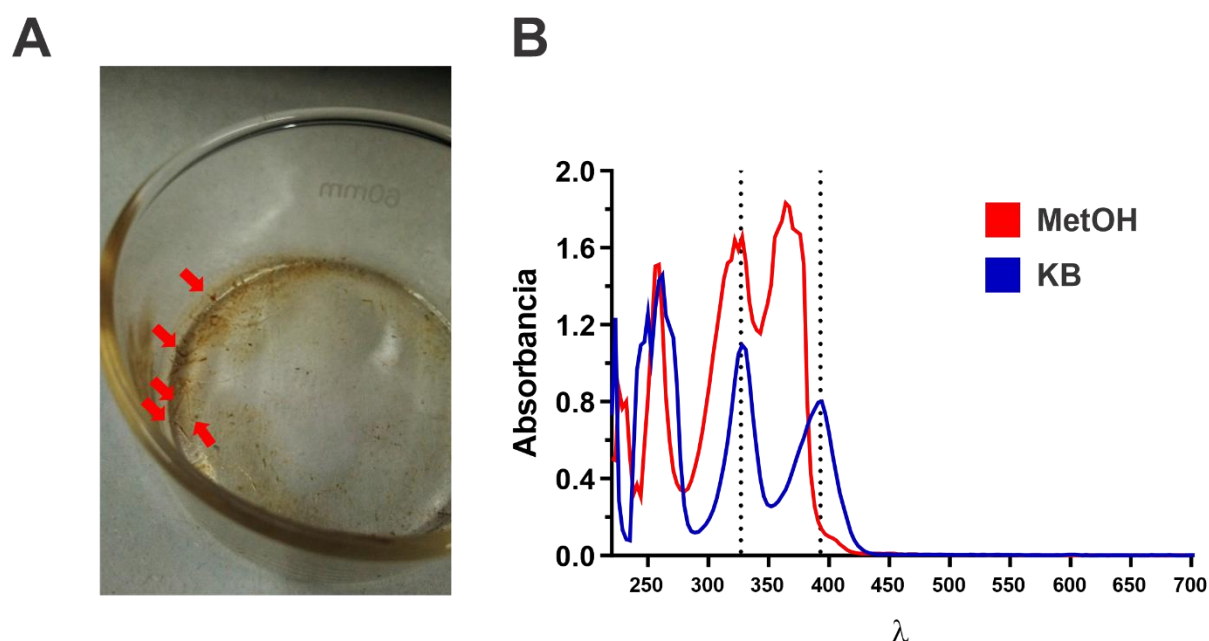


Figura 16: Obtención de cristales de 7-hidroxitropolona. A) Foto representativa de los cristales obtenidos en la cristalización del extracto de sobrenadante SVBP6. Con flechas rojas se indican las pequeñas estructuras aciculares resultado de la evaporación del metanol. B) Espectro UV-Visible de estructuras aciculares obtenidas, resuspendidos en metanol (MetOH) o en medio de cultivo KB. Las líneas punteadas indican las longitudes de onda 327nm y 393nm, asociadas a la 7HT a pH neutro. Ver Figura 11 para detalles acerca de la representación de espectros UV-Visibles.

La colaboración establecida entre nuestro laboratorio y el grupo del Dr. Antonio Evidente, del Departamento de Ciencias Químicas de la Universidad “Federico II” de Nápoles, nos permitió acceder a un método simple para obtener cristales de alta pureza de la 7HT. En primer lugar, se realizaron preparaciones a mayor escala de sobrenadante de SVBP6 y 16d y se liofilizaron (Ver Materiales y Métodos) para conservar las moléculas presentes durante el transporte. Una vez arribado, se chequeó el rendimiento de las extracciones a partir de estas preparaciones mediante TLC, observando que el extracto

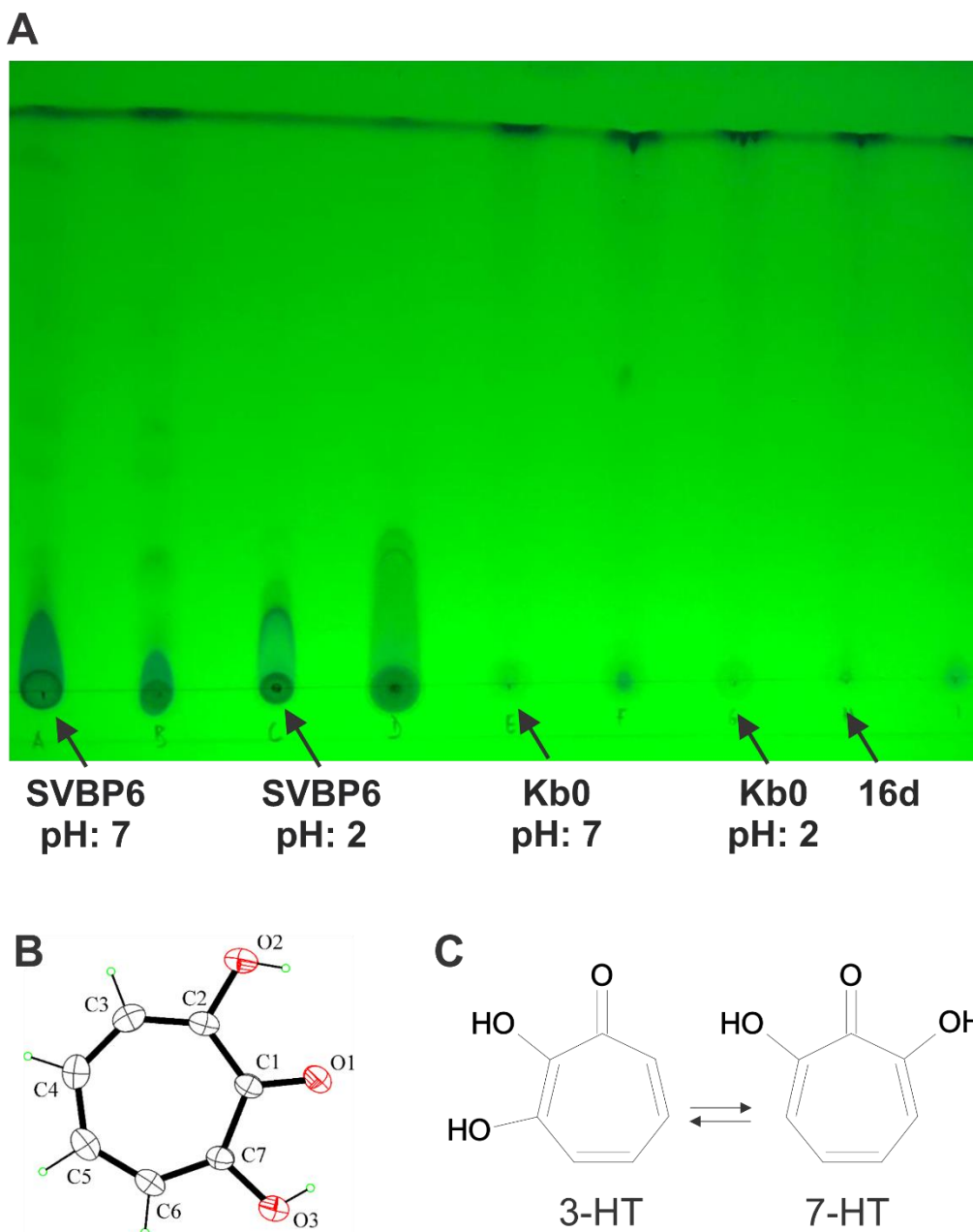


Figura 17: Confirmación de la presencia de 7-hidroxitropolona en el extracto de SVBP6 mediante TLC y difracción de rayos X. A) Cromatografía en capa delgada de los extractos, con cloroformo:isopropanol (9:1) como fase móvil, de SVBP6 y 16d, así como el medio control KB0 (Kings' B sin glicerol), extraídos a distintos pHs. B) Diagrama ORTEP de la molécula de 7HT basado en la estructura de difracción de rayos X del cristal obtenido del extracto de AcEt del sobrenadante libre de células de cultivos de SVBP6 en medio KB (ver Tabla A1 en Anexo A). C) Esquema del equilibrio tautomérico entre 7-hidroxitropolona (7HT) y 3-hidroxitropolona (3HT).

del mutante 16d carecía de una o varias moléculas, lo cual fue evidenciado por la presencia de una mancha al observar el extracto de SVBP6 a la luz UV (Figura 17 A). Se realizó la cristalización mediante la lenta evaporación de una solución hidroalcohólica del residuo seco del extracto en AcEt obtenido a partir del sobrenadante de SVBP6. Se obtuvieron cristales de un color marrón oscuro (Figura 16 A) los cuales, al ser redissueltos en solución acuosa, evidenciaron tener el patrón espectral UV-vis observado previamente en

el sobrenadante de SVBP6 y en su extracto (Figura 16 B). En el Departamento de Ciencias Químicas de la Universidad “Federico II” de Nápoles, se sometieron los cristales a difracción con rayos X, y el análisis de los datos corroboró que la estructura química de las moléculas presentes en el cristal era compatible con la 7-hidroxitropolona (Figura 17 B, Anexo A: Tabla A1). Asimismo, los cristales fueron sometidos a metilación mediante la reacción de diazotización, y se obtuvieron 2 derivados, 2,3 dimetoxitropolona y 2,7 dimetoxitropolona, que fueron confirmados por sus espectros RMN (Anexo A: Figura A1). Estos dos productos resultado de la metilación pusieron de manifiesto la existencia de un equilibrio tautomérico en solución acuosa entre 7-hidroxitropolona y 3-hidroxitropolona (Figura 17 C). Ambas moléculas podrían ser de relevancia para el antagonismo de SVBP6. Sin embargo, bibliografía previa sobre el equilibrio tautomérico en solución (Kubo *et al.* 2007), indica una predominancia de la abundancia de la especie 7-hidroxitropolona. Esto podría indicar un rol mayoritario de la 7HT frente a la 3-hidroxitropolona, por lo que de aquí en adelante se referirá a ella únicamente, a fin de mantener la claridad de este escrito.

Estos resultados nos permitieron concluir inequívocamente que el extracto con actividad antagonista de *M. phaseolina* utilizado en este trabajo contenía mayoritariamente 7-hidroxitropolona (y su tautómero en solución), la cual está directamente ligada al patrón espectral UV-Vis observado en los ensayos. Dado que el mutante 16d no presenta señales espectrales ni en TLC compatibles con 7HT, y tampoco muestra actividad antifúngica, se deduce que el *cluster* génico biosintético presentado anteriormente en este trabajo (Figura 8) sería responsable de la biosíntesis y secreción de 7HT, como se ha descrito para *P. donghuensis* HYS.

Actividad antifúngica de 7-hidroxitropolona.

La coocurrencia de 7HT con la mayor parte de la actividad antifúngica del sobrenadante de SVBP6 (y de su extracto) indicaban una fuerte vinculación entre ambas características del medio extracelular de SVBP6, a pesar de la referencia previa de 7HT como sideróforo en *P. donghuensis* HYS (Jiang *et al.* 2016). Es por eso que en este punto de la caracterización, resultaba mandatorio determinar si la 7HT obtenida a partir de cultivos de SVBP6 presentaba actividad antifúngica. Para ello, se recurrió a evaluar la actividad inhibitoria de hongos fitopatógenos de la 7HT purificada a partir de extractos de sobrenadantes de SVBP6 y de los derivados metilados correspondientes, gentilmente provistos por nuestro colaborador Dr. Antonio Evidente. El crecimiento de los distintos fitopatógenos indicó, en todos los casos, que el efecto fungistático dosis-dependiente del extracto de SVBP6 es compartido por la 7HT purificada (Figuras 12 y 13). Asimismo, para *F. graminearum* y *F. semitectum*, 7HT complementó la actividad del extracto de cultivo del mutante 16d, el cual demostró no tener efecto sobre el crecimiento de estos fitopatógenos por sí mismo (Figura 19). Adicionalmente, se observaron cualitativamente los mismos resultados sobre el crecimiento del oomicete *P. ultimum* (Anexo A: Figura A2). En el caso de *M. phaseolina* (Figura 18 B), la actividad fungistática de la 7HT pura fue significativamente mayor en comparación con el extracto de SVBP6 aún a una misma A327 (Figura 18 A). Por el contrario, los dos derivados metilados de 7HT fueron incapaces de retrasar el crecimiento fúngico (Figura 18 B), lo que sugiere que la actividad de la 7HT depende mayormente de sus grupos hidroxilo. De esta forma, establecimos por primera vez que la 7HT es un metabolito antimicrobiano. Los resultados evidencian el rol fundamental que tiene 7HT en la

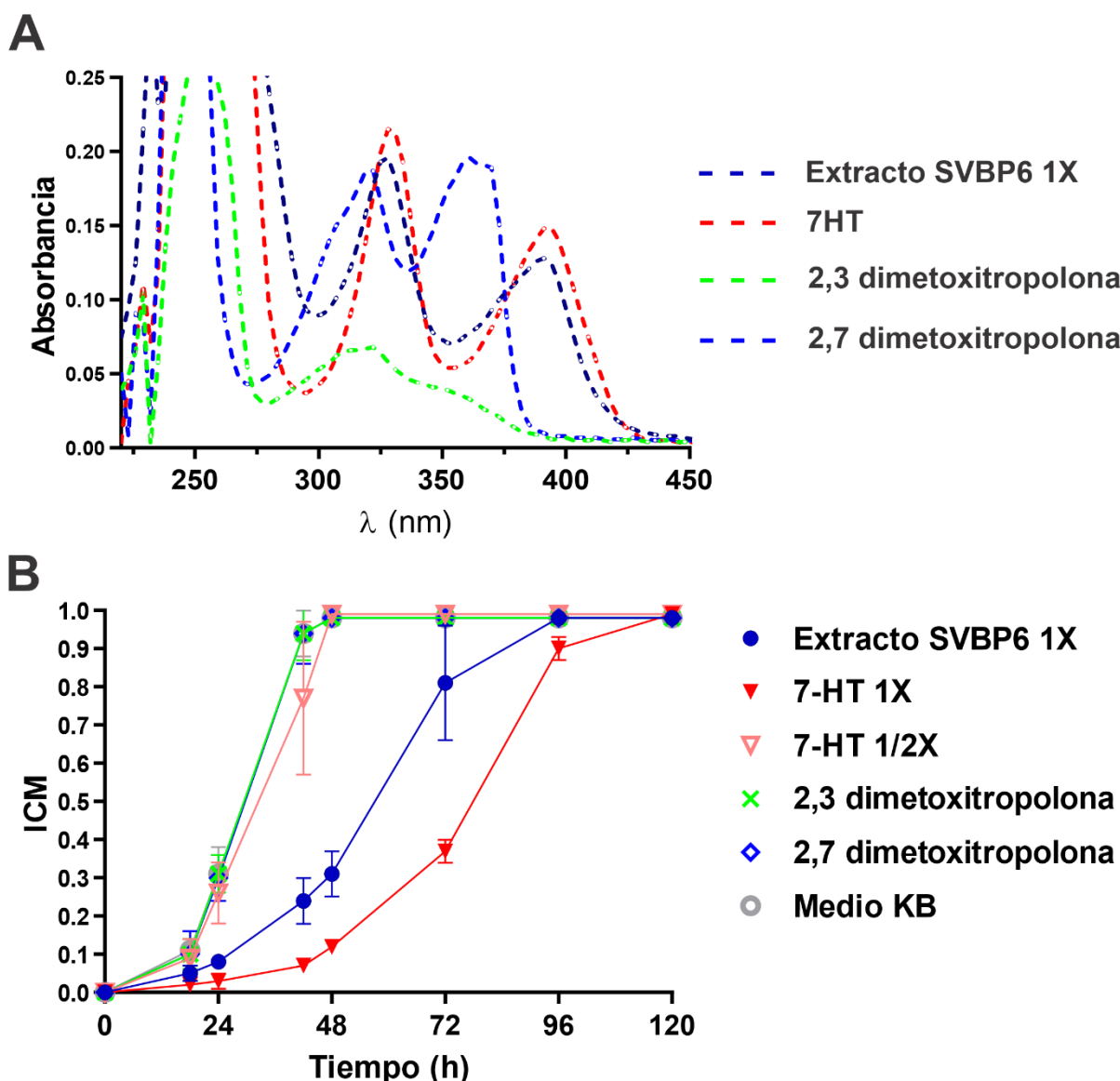


Figura 18: Actividad antifúngica de la 7-hidroxitropolona obtenida por cristalización y de sus derivados de metilación, con relación a la actividad del extracto orgánico de sobrenadante de cultivo. A) Espectros UV-visible obtenidos para la 7HT (en concentración 1x, ver Figura 15) utilizada en este ensayo, así como para los derivados metilados de 7HT. B) Cuantificación del crecimiento superficial del hongo *M. phaseolina* en presencia de los compuestos/extractos ensayados.). Las concentraciones de 7HT cristalizada y extracto definidas como 1x y 1/2x se encuentran definidas en la Figura 15. El crecimiento del hongo se expresa en valores de ICM (ver Figura 14).

actividad inhibitoria de distintos fitopatógenos fúngicos en el medio condicionado por SVBP6, como responsable primaria del amplio rango de antagonismo de las células de SVBP6.

Sin embargo, el efecto fungistático sostenido en el tiempo observado para SVBP6 en co-cultivo con distintos hongos (Figuras 15 y 16) parecería depender de la secreción activa de 7HT por parte de las células bacterianas, ya que en ausencia de células de SVBP6 los fitopatógenos ensayados fueron capaces de superar la inhibición dosis-dependiente de crecimiento por parte de 7HT, aunque a un ritmo menor de

crecimiento (Figuras 14, 15, 19 y 20). Con la finalidad de determinar si la superación del hongo se debe a una inestabilidad química intrínseca de la 7HT, a una actividad fúngica de degradación de metabolitos o ambos efectos, evaluamos el efecto de distintos tiempos de preincubación sobre la actividad antifúngica de una cantidad fija de extracto en AcEt de sobrenadante de SVBP6. Para ello, se incorporó el extracto en PDA, como en ensayos anteriormente descriptos, desfasando la inoculación de *M. phaseolina* una vez al día por hasta 5 días (Figura 20 A, B y C). El experimento reveló que la actividad inhibitoria en el medio agarizado al momento de la inoculación del hongo disminuyó progresivamente hasta más del 50% de la

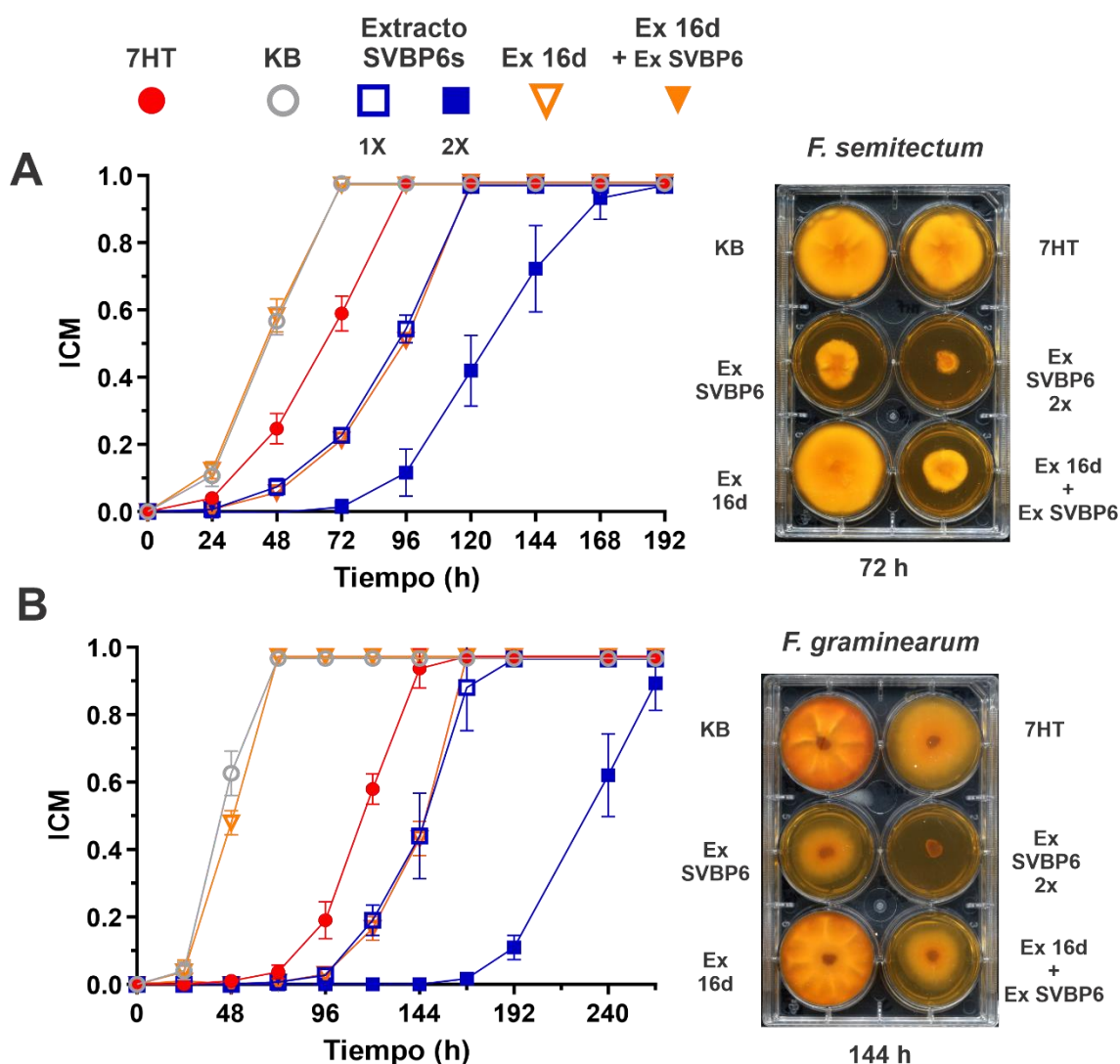


Figura 19: Actividad antifúngica de 7-HT y extracto de sobrenadantes de SVBP6 y de su mutante isogénico 16d vs *F. semitectum* y *F. graminearum*. Cada hongo ensayado se muestra en esta figura cómo una foto representativa de las placa de 6 pocillos utilizadas (derecha) y cuantificaciones por ICM (ver Figura 7) vs tiempo. La leyenda común para las cuantificaciones del crecimiento del micelio de los hongos (izquierda) se encuentra en el extremo superior de la Figura. Los extractos de SVBP6 o de 16d se indican con la abreviatura "Ex". A) Evaluación de la actividad antifúngica del extracto de SVBP6, 16d y 7HT cristalizada vs *F. semitectum*. La foto de la derecha corresponde a una réplica a las 72h de comenzado el ensayo incubada a temperatura ambiente. B) Evaluación de la actividad antifúngica del extracto de SVBP6/16d y 7HT cristalizada vs *F. graminearum*. La foto de la derecha corresponde a una réplica a las 144h de comenzado el ensayo, incubada a temperatura ambiente.

actividad, cómo se puede ver por la caída del $t_{0,5}$, de un valor promedio de 88h inicial a 40h (caída del 54,24%) (Figura 20 C) después de 5 días de incubación sin el hongo. Estos resultados indicaron que existe una reducción espontánea de la actividad en el extracto conteniendo 7HT. Sin embargo, más experimentos se necesitan para determinar si la forma de las curvas de crecimiento de *M. phaseolina* se explican solamente por esta inestabilidad intrínseca de la 7HT, o también a alguna actividad biológica de degradación de 7HT por parte del fitopatógeno.

En esta misma línea y con el objetivo de seguir caracterizando la relación entre la actividad de 7HT y su dependencia con la presencia de células, se evaluó la capacidad de células de SVBP6 o su mutante 16d de inhibir el crecimiento del micelio de *M. phaseolina* en pocillos con medio semisólido conteniendo las células bacterianas (Figura 21B). De esta forma, se podría observar si las células son capaces de sostener la inhibición del crecimiento del fitopatógeno (como sucede en los ensayos de antagonismo; Figura 9). En paralelo, se evaluó el efecto de una concentración fija de extracto de SVBP6, con una A327 comparable a la concentración 2× (Figura 15). Con este diseño, las células de SVBP6 fueron capaces de desfasar el crecimiento del micelio a un $t_{0,5}$ de 193 h, siendo este un efecto mayor al exhibido por concentración de extracto 2× ensayada ($t_{0,5}$ =122h, Figura 21 A y C). Estos resultados podrían sugerir que, en estas condiciones de enfrentamiento, las células de SVBP6 fueron capaces de producir y mantener una concentración de 7HT suficiente para inhibir el crecimiento del hongo hasta 5 días, luego de los cuales el hongo superó esta restricción (Figura 21 A). En contraste, las células del mutante biosintético 16d fueron capaces de ejercer una actividad mínima, aunque significativa, sobre el crecimiento de *M. phaseolina* que alcanzó la confluencia del pocillo 1 día después que en el pocillo control (Figura 21). Este resultado era esperable, dada la incapacidad de las células de 16d de secretar 7HT al medio circundante. Sin embargo, la actividad inhibitoria residual del mutante 16d fue un indicio de la producción de otro/s metabolito/s fungistático/s sobre *M. phaseolina* en las condiciones del ensayo. Asimismo, la presencia de extracto junto a las células evidenció una actividad antifúngica significativamente mayor al de las células de SVBP6 ($t_{0,5}$ =261 vs 194h, Figura 21C), que resulta coherente por la combinación de la 7HT aportada por el extracto y la 7HT de origen celular. Cuando la misma dosis de extracto se incluyó en pocillos con células del mutante 16d ($t_{0,5}$ =154h), notamos nuevamente que el efecto inhibitorio atribuible a las células mutantes fue mayor que el esperado por el aporte de la concentración de 7HT del extracto (122 h, Figura 21 C). Esta observación respalda la idea que las células de 16d son capaces de producir otro/s metabolito/s antimicrobiano/s además de 7HT.

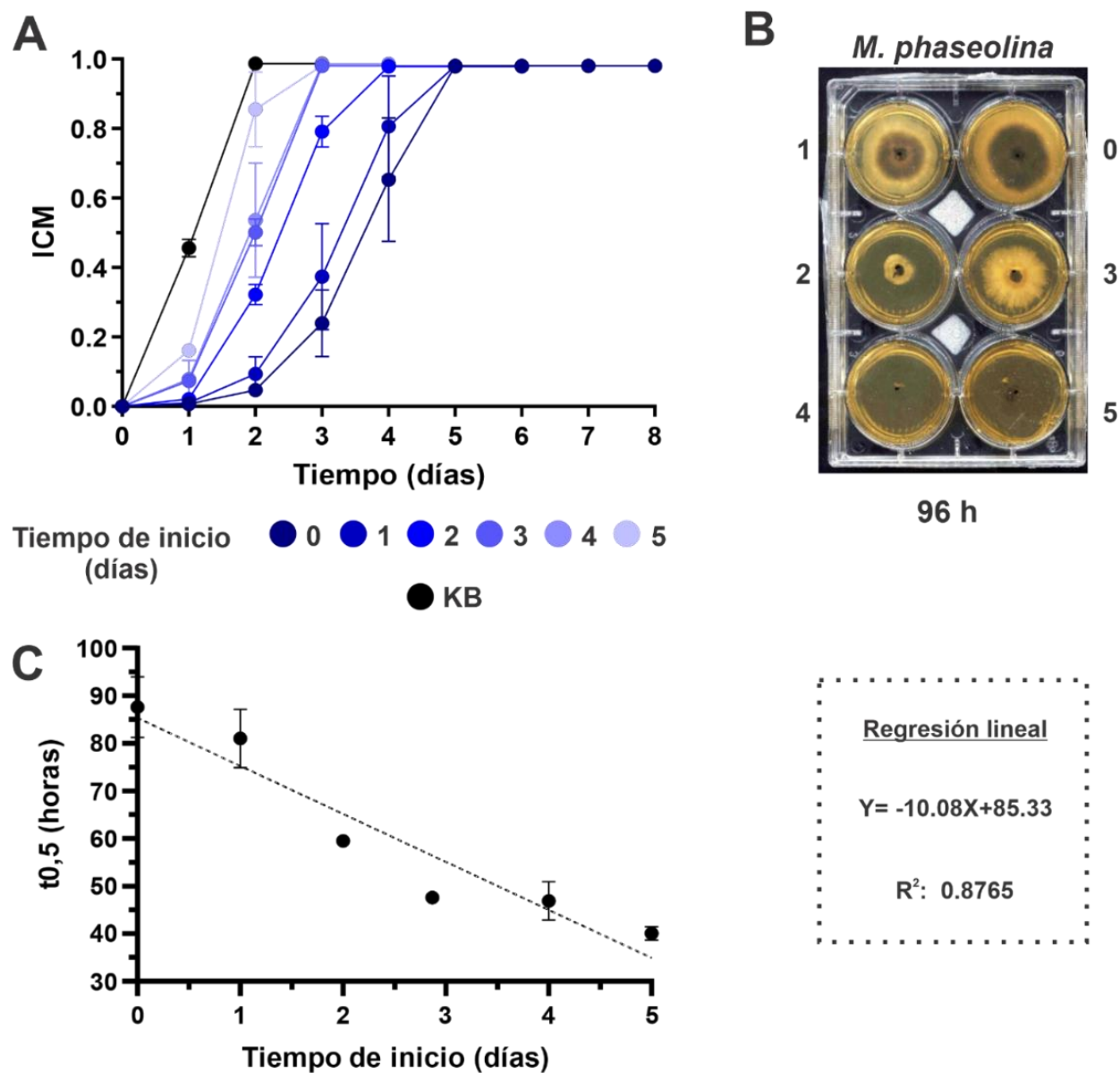


Figura 20: Estabilidad de la actividad antifúngica de 7HT. A) Cuantificación del crecimiento superficial del hongo *M. phaseolina*, donde cada condición indica el tiempo de preincubación a 28°C del medio agarizado conteniendo extracto de SVBP6 en cada pocillo, antes de la siembra del inóculo de hongo (Tiempo de inicio). El crecimiento del hongo se representa en valores de ICM (ver Figura 14). B) Foto representativa de la placa del ensayo de estabilidad de 6 pocillos luego de 96 h de incubación a 28°C. Los números al lado de cada pocillo indican el tiempo de preincubación del pocillo al momento de incorporar el inóculo de micelio. C) Evolución temporal de la actividad inhibitoria residual, en función del t0.5 (ver Figura 15).

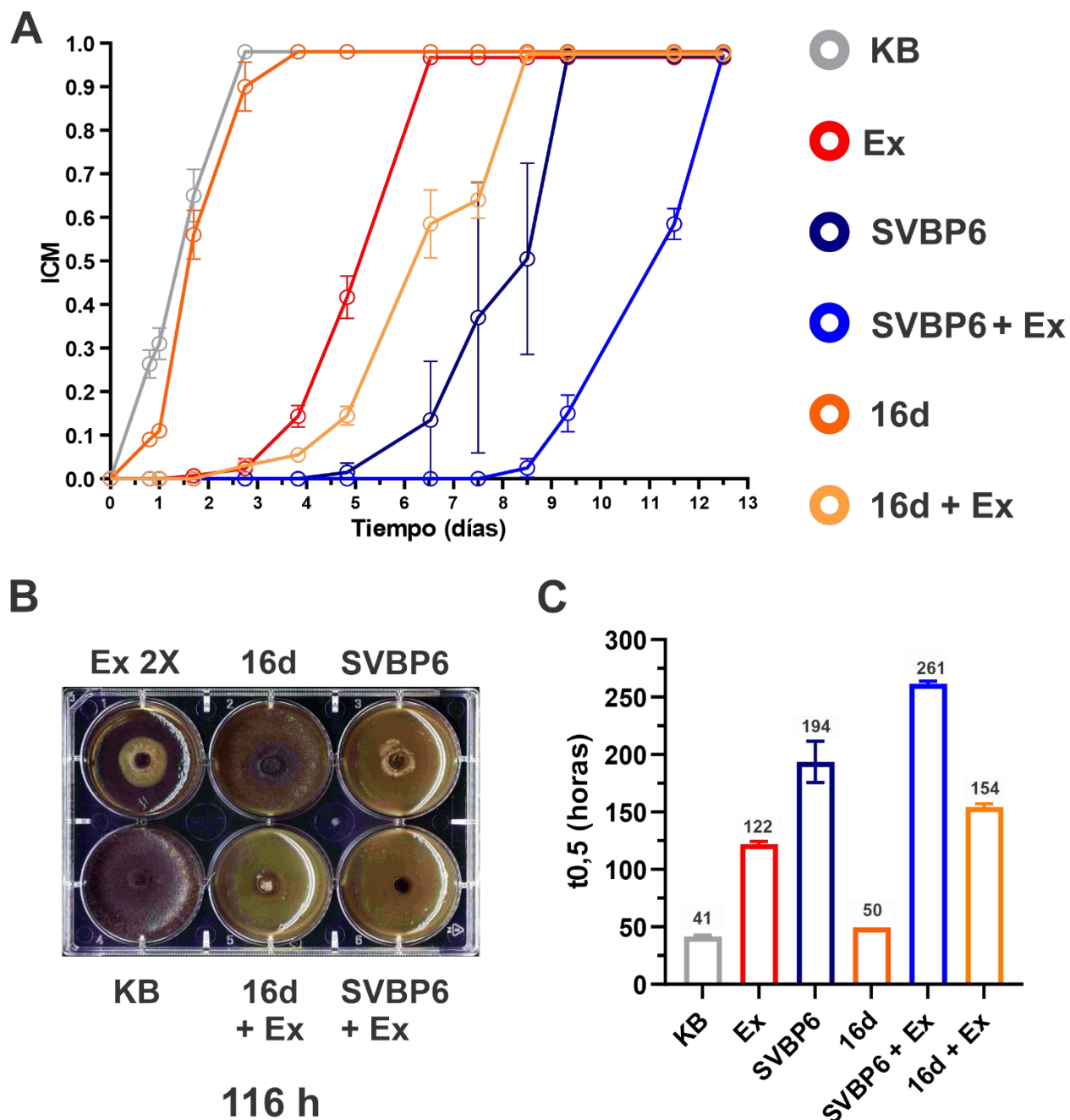


Figura 21: Efecto de la complementación con el extracto de SVBP6 sobre células de SVBP6 y 16d. A) Cuantificación del crecimiento superficial del hongo *M. phaseolina*, dónde cada condición indica las células incorporadas al medio semisólido y la adición de extracto en AcEt de sobrenadante de cultivo de SVBP6 (Ex). El crecimiento del hongo se expresa en valores de ICM (ver Figura 14). B) Foto representativa de la placa de 6 pocillos del ensayo, luego de 116h de incubación a 28°C. C) Valores promedio de t_{0,5} (Ver Figura 15) de cada condición.

La biosíntesis de 7-hidroxitropolona y su actividad antifúngica son afectadas marginalmente por la presencia de Fe^{+2} .

Concentraciones relativamente bajas de Fe^{+2} (6-8 μM) son capaces de disminuir fuertemente (>90%) la producción de 7HT en la cepa *P. donghuensis* HYS, lo que derivó en la propuesta de 7HT como sideróforo para esa cepa (Jiang *et al.* 2016, Chen *et al.* 2018a). En este contexto, se determinó que los ensayos analizados hasta el momento para SVBP6, no eran capaces de discernir si la actividad de la 7HT observada era mediada por la escasez de hierro en el medio o por otras vías no identificadas para la 7-hidroxitropolona. En función del rol de captador de Fe^{+2} descrito para 7HT y la estricta regulación sobre su biosíntesis en la cepa *P. donghuensis* HYS, se decidió evaluar la influencia de Fe^{+2} en la producción de 7HT por parte de SVBP6.

Para establecer si existía una restricción similar sobre la biosíntesis de 7HT en SVBP6 evaluamos, en primer lugar, el impacto de la suplementación con hierro sobre el crecimiento de SVBP6 en medio líquido. En un marcado contraste con el comportamiento de la cepa HYS, la producción de 7HT en la cepa SVBP6 se vio parcialmente reprimida por concentraciones de hierro ferroso aproximadamente 10 veces mayores que las inhibitorias en la cepa HYS (Figura 22 A, B). La reducción de la producción de 7HT fue de aproximadamente 50% en presencia de 100 μM de Fe^{+2} (Figura 15B). Este resultado sugiere que SVBP6 y HYS poseen una regulación diferencial de la biosíntesis y secreción de 7HT, siendo SVBP6 mucho menos sensible a la disponibilidad de hierro. Esto podría deberse a un rol diferencial del metabolito en los ambientes dispares desde los cuales se aislaron ambas cepas (sedimento de un lago para HYS, y suelo en producción agrícola para SVBP6; (Agaras *et al.* 2015, Gao *et al.* 2015)). Sin embargo, la actividad antifúngica observada para SVBP6 podría eventualmente explicarse por un mecanismo de competencia por el hierro del medio de cultivo entre las células de la bacteria y el fitopatógeno. En condiciones limitantes de hierro, la 7HT sería capaz de captar el Fe^{+2} para uso exclusivo o preferencial por parte de SVBP6, limitando nutricionalmente al fitopatógeno. Con el fin de establecer si la actividad antifúngica observada para SVBP6 era mediada por la disponibilidad de hierro, evaluamos el efecto del extracto en AcEt del sobrenadante de SVBP6 sobre el crecimiento del hongo fitopatógeno *M. phaseolina* en condiciones saturantes de Fe^{+2} . A partir de datos espectrofotométricos de 7HT disponibles en bibliografía (Jiang *et al.* 2016), estimamos que las dosis de extracto 1x y 2x utilizadas en el ensayo correspondían a concentraciones de 7HT de 12 y 23 μM , respectivamente, mientras que las concentraciones de FeSO_4 evaluadas fueron 0, 15 y 50 μM (Figura 22C). Observamos que la combinación 12 μM 7HT y 50 μM FeSO_4 (relación $\text{Fe}^{+2}/7\text{HT} = 4,2$) fue la única en la que se redujo parcialmente la actividad antifúngica de 7HT. Esto podría deberse a que la formación del complejo $(7\text{HT})_2:\text{Fe}^{+2}$ favorecida para esa proporción de hierro y 7HT, podría provocar menor disponibilidad de 7HT para una acción directa sobre el hongo. Sin embargo, la actividad de la 7HT no se vio mayormente afectada para las demás condiciones evaluadas en las que la relación $\text{Fe}^{+2}/7\text{HT}$ fue <4 (Figura 22C).

Previo a estos ensayos, al probar el antagonismo de las células 16d suspendidas en agar blando (ver sección anterior), se observó que a tiempos prolongados de incubación (>66h), los pocillos conteniendo sólo células del mutante 16d exhibían una coloración característica de la secreción de pioverdina al medio de cultivo. La aparición de pioverdina en cultivos de la cepa de *P. donghuensis* HYS, así como lo observado para cultivos de SVBP6 (Figura 11 D), podía estar señalando una limitación en la concentración de Fe^{+2} disponible para las células en el medio de cultivo de los experimentos realizados hasta ese momento. Sin embargo, los resultados de actividad antifúngica mostrados por el extracto en condiciones saturantes de

Fe^{+2} indican que la actividad fungistática de 7HT es mayormente independiente de la presencia de hierro del medio, y sugieren un mecanismo de acción sobre el crecimiento micelial que no depende de la disponibilidad de hierro.

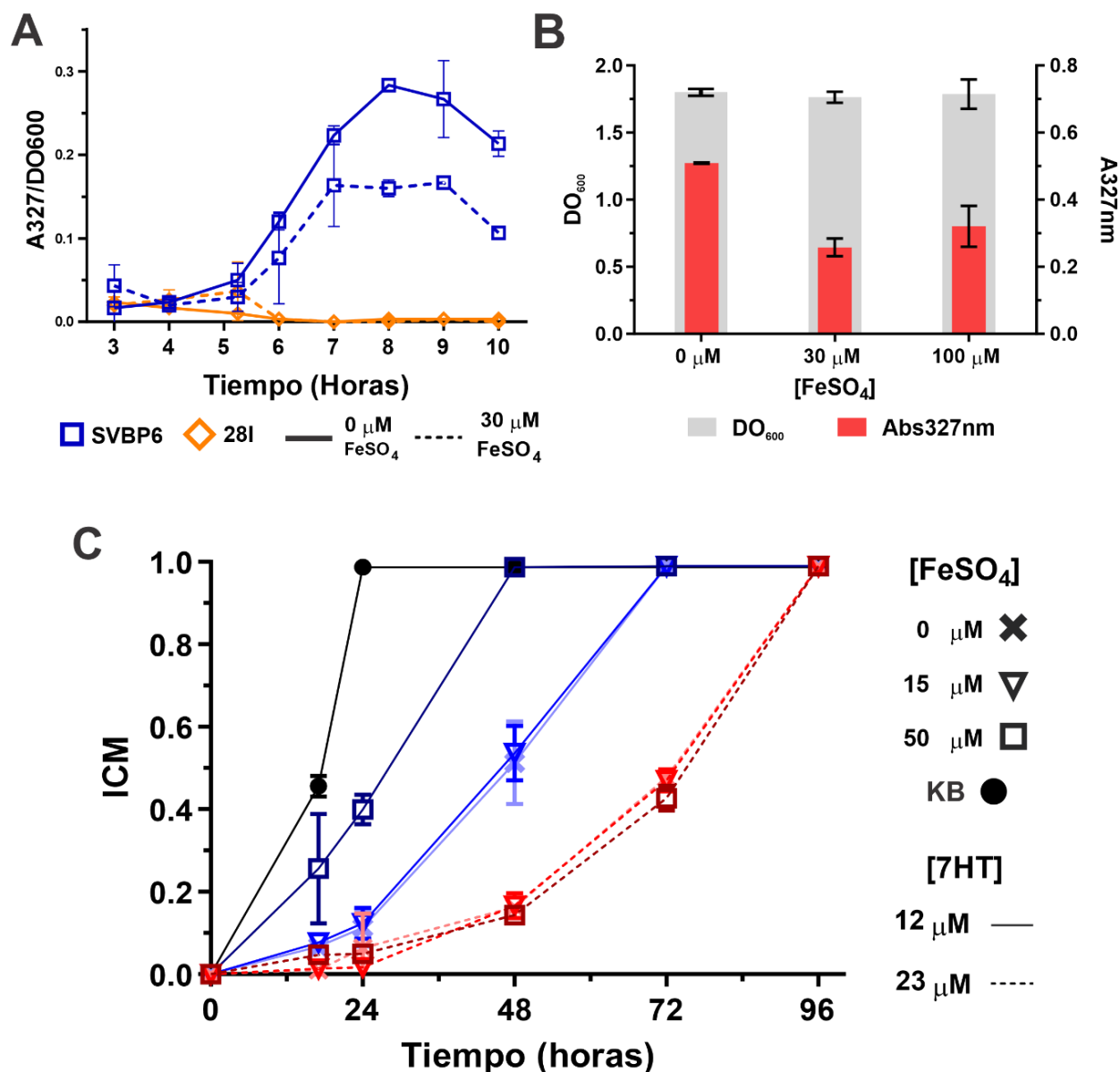


Figura 22: La producción de 7HT y actividad antifúngica vs *M. phaseolina* de SVBP6 son afectadas marginalmente por la presencia de FeSO_4 . A) Efecto de FeSO_4 (30 μM) en la producción de 7HT durante el crecimiento de SVBP6. B) Producción de 7HT (A_{327}) en presencia de distintas concentraciones de FeSO_4 . Las determinaciones se realizaron por triplicado en cultivos muestreados a la DO_{600} indicada. C) Cuantificación del crecimiento superficial del hongo *M. phaseolina*, en función de distintas concentraciones de 7HT y FeSO_4 . El crecimiento del hongo se expresa en valores de ICM (ver Figura 14). Las condiciones con 23 μM de 7HT se muestran en tonos de rojo, mientras que las correspondientes a la adición de 12 μM de 7HT se representan en tonos de azul. Dentro de cada grupo de datos, las concentraciones crecientes de FeSO_4 se indican mediante la oscuridad del color, aumentando gradualmente.

La inhibición de hongos fitopatógenos por *P. donghuensis* SVBP6 a través de la biosíntesis de 7-hidroxitropolona, un metabolito antifúngico independiente de la disponibilidad de hierro.

Al momento de ser aislado, *Pseudomonas donghuensis* SVBP6 se destacaba entre el resto de los aislamientos caracterizados en Agar *et al.* 2015, por su amplia capacidad de inhibir el crecimiento de diversos hongos fitopatógenos de importancia agronómica. Esta capacidad lo posicionaba como un candidato prometedor para un bioproducto agrícola, en vistas de la relación del biocontrol con la promoción del crecimiento vegetal (Beneduzi *et al.* 2012). Además, la ausencia de BGCs identificados en otros miembros del género *Pseudomonas* en su genoma sugería un potencial adicional, relacionado a la prospección de nuevas herramientas bioquímicas, útil para el conocimiento y beneficio humano (Agar *et al.* 2018). Estas perspectivas guiaron al uso de la mutagénesis al azar con Tn5 como herramienta para identificar genes vinculados a la producción de metabolitos antimicrobianos. Así, dentro de una colección de 58 mutantes incapaces de antagonizar a *M. phaseolina*, y a los que se les determinó la secuencia génica interrumpida, se identificaron 6 mutantes independientes cuyas inserciones mapearon en una región cromosomal de 16 Kpb conteniendo 15 genes codificantes de proteínas biosintéticas, regulatorias y de transporte (Figura 8).

Mientras se estudiaba esta región del cromosoma de SVBP6, resultados obtenidos para la cepa *P. donghuensis* HYS, caracterizada por su capacidad de captar Fe^{+2} , revelaron que la biosíntesis de uno de sus sideróforos, la 7-hidroxitropolona (7HT), era dependiente de la expresión de los genes de un *cluster* génico homólogo al que habíamos identificado en SVBP6 (Chen *et al.* 2018a). Como ya fue mencionado en este capítulo, la biosíntesis de 7HT es fuertemente reprimida por la concentración de Fe^{+2} en el medio en el cual se evaluó el crecimiento de *P. donghuensis* HYS. Tal regulación estricta de la biosíntesis por la presencia de hierro resultaba coherente con la descripción de 7HT como sideróforo (Jiang *et al.* 2016). Sin embargo, el rol de esta molécula como mediador del antagonismo de cepas de *Pseudomonas* a agentes microbianos fúngicos no había sido estudiado previamente. Asimismo, como lo indican los resultados observados en este trabajo para el mutante 28I (*gacS*::Tn5), parece haber un punto común entre el control de la producción de 7HT en HYS y SVBP6, dado que se ha demostrado (Chen *et al.* 2018a) que en ambas cepas la expresión de los genes del *cluster* depende a nivel post-transcripcional de una cascada Gac-Rsm funcional. Además, resultados en HYS apuntan a la regulación transcripcional de la expresión de los genes biosintéticos mediante los reguladores tipo TetR y LysR, correspondientes al ORF 3 y ORF 14 en SVBP6 (Figura 8, Tabla 2).

La incapacidad de los mutantes de SVBP6 de antagonizar fitopatógenos (Figura 9) sugería un vínculo entre los genes interrumpidos, la biosíntesis y secreción de un compuesto como la 7HT o similar, y una relación directa de la 7HT con el fenotipo antagonista de SVBP6. Sin embargo, la marcada diferencia entre los ambientes de los cuales se habían aislado las cepas HYS y SVBP6 (Agar *et al.* 2015, Gao *et al.* 2015), la heterogeneidad mostrada entre los genomas y fenotipos de SVBP6, HYS y P482 (Ossowicki *et al.* 2017, Agar *et al.* 2018), así como la capacidad de SVBP6 de detener el crecimiento fúngico en medios ricos, daba indicios de una posible divergencia en el control y rol biológico de sus elementos en común, cómo el *cluster* asociado a la 7HT.

La identificación de 7HT como el metabolito principal presente en el extracto con actividad fungistática de SVBP6 constituyó el vínculo necesario para poder relacionar la producción de 7HT en *P. donghuensis* y

las actividades de antagonismo de la cepa SVBP6. Esto significó la adición de las tropolonas como un nuevo tipo de metabolito antimicrobiano a la diversidad de compuestos producidos por *Pseudomonas* (Höfte 2021, Müller *et al.* 2021, Zboralski *et al.* 2022b). Las tropolonas y los productos naturales que contienen un motivo tropolonoide se caracterizan por una estructura única de ciclopenta-2,4,6-trienona, que es un anillo aromático no bencenoide de siete miembros (Bentley 2008), entre las que se destacan las α -tropolonas, aquellas que poseen hidroxilada la posición contigua al grupo ceto (Meck *et al.* 2014). Aunque se sabe que las tropolonas son producidas por bacterias (Allen *et al.* 1982), hongos (Seephonkai *et al.* 2001) y plantas (Dewar 1945), la estructura del núcleo de la tropolona sigue siendo rara entre los productos naturales (Guo *et al.* 2019). Existen diversos casos de actividades antifúngicas y antibacterianas entre las α -tropolonas, como por ejemplo la 7-hidroxi-4-isopropiltropolona producida por *Thuja plicata* (cedro rojo occidental) que evita diversas podredumbres fúngicas en su madera (Roff *et al.* 1959) e incluso la misma 7-hidroxitropolona reportada como producto de *Streptomyces neyagawaensis*, la cual es capaz de competir por el ATP contra la aminoglucósido-2"-O-adenililtransferasa de diversas bacterias patógenas de humanos (Allen *et al.* 1982).

En bacterias, la biosíntesis de tropolonas ha sido de interés desde la primera instancia en la que se identificó en *Burkholderia plantarii*, identificada como el agente causal de la podredumbre de plantines de arroz (Azegami *et al.* 1987). La biosíntesis de tropolona en este caso, fue explicada por experimentos de marcaje con isótopos, mostrando que la fenilalanina se convierte directamente en ácido fenilacético y posteriormente en tropolona (Wang *et al.* 2016b). De manera similar, otro estudio demostró la incorporación de glucosa, fenilalanina y ácido fenilacético en la tiotropocina y ácido tropoditioico, sugiriendo un origen de dichas tropolonas en el shikimato y/o fenilpiruvato (Cane *et al.* 1992). La secuencia del genoma del patógeno vegetal *B. plantarii* mostró genes relacionados con la producción de tropolona, genes regulatorios (factor de transcripción tipo LysR y un sistema de dos componentes) y sistemas secretorios (Miwa *et al.* 2016, Wang *et al.* 2016b). Otro ejemplo relevante de biosíntesis de tropolonas en bacterias es la descrita para *Streptomyces*. Análisis bioinformáticos revelaron nueve genes denominados *trlA-R* organizados en tres posibles operones: *trlAB*, *trlCDEF* y *trlGHR*, todos los cuales estaban involucrados en la vía del shikimato y en la vía catabólica del ácido fenilacético. En síntesis, a partir de las vías anabólicas de biosíntesis de corismato y fenilpiruvato que son reforzadas por la acción de TrlB, TrlH y TrlA, cuatro proteínas Trl (TrlF, TrlE, TrlC y TrlD) modifican secuencialmente los precursores para formar tropolona, 7-hidroxitropolona y 3,7-dihidroxitropolona. Esta última posee actividades antimicrobianas, antivirales y anticancerígenas (Chen *et al.* 2018c).

Respecto del género *Pseudomonas*, la producción de tropolonas había sido reportada por primera vez en *P. donghuensis* HYS (Jiang *et al.* 2016) y se había asociado al *cluster* génico mencionado previamente (Chen *et al.* 2018a). Sin embargo, la ruta biosintética de tropolonas, así como la producción de una α -tropolona interviniendo en el antagonismo antifúngico de *Pseudomonas*, no habían sido descritas al momento de inicio de este trabajo. No obstante, durante la escritura del presente manuscrito, se reportó la biosíntesis de 7HT por parte de los productos del *cluster* génico *tpo* del aislamiento *Pseudomonas sp.* Ps652 (Figura 23, (Moffat *et al.* 2024)), homólogo al *cluster* asociado al antagonismo fúngico de SVBP6 (Figura 8, Tabla 2). Se ha identificado la decarboxilasa dependiente de TPP TpoG (ORF 8 en Figura 8, Tabla 2) que cataliza la conversión del ácido fenilpirúvico, proveniente de la vía del shikimato, en fenilacetaldehído. Este último compuesto es posteriormente oxidado por una deshidrogenasa no descrita (no incluida en el *cluster*),

resultando en ácido fenilacético (PAA), que también puede ingresar a la vía de biosíntesis como sustrato catabólico de la bacteria.

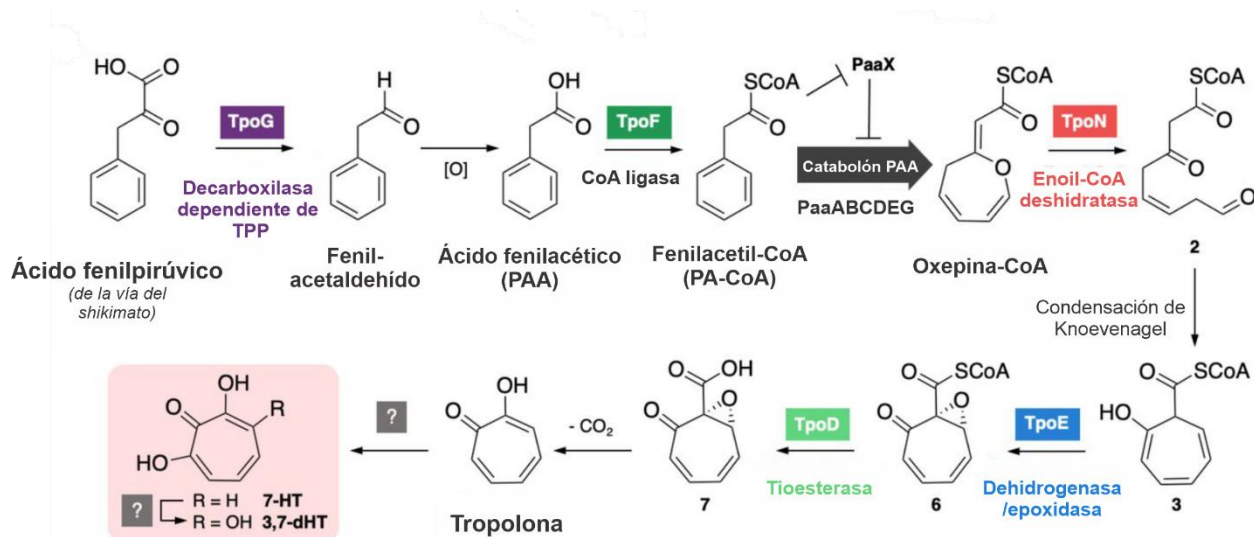


Figura 23: Ruta propuesta para la biosíntesis de 7HT y 3,7-dHT en *Pseudomonas sp.* Ps652. Adaptado de Moffat *et al* 2024.

La fenilacetato CoA ligasa TpoF (ORF 9 en Figura 8, Tabla 2) convierte el fenilacetato en fenilacetato-CoA, que luego es catabolizado por el catabolón de fenil acetato (PaaABCDE, genes COO64_RS25505 - RS25485, y PaaG, gen COO64_RS25530, en el genoma de SVBP6), produciendo oxepina-CoA. A través de la enoyl CoA hidratasa TpoN (ORF1 en Figura 8, Tabla 2), se lleva a cabo la conversión a 3-oxo-5,6-dehydrosuberoyl-CoA semialdehído (2, Figura 23), que, mediante una condensación espontánea de Knoevenagel, forma el precursor ciclado 2-hidroxyciclohepta-1,4,6-triene-1-formyl-CoA (3, Figura 23). Finalmente, mediante las actividades secuenciales de la deshidrogenasa TpoE y la tioesterasa TpoD (ORF 10 y ORF 11 en Figura 8, Tabla 2) y una descarboxilación espontánea, se ha descrito que Ps652 produce tropolona, el precursor inmediato de 7HT en esta cepa. No se ha descrito en Moffat *et al.* 2024 una enzima responsable de la conversión de tropolona a 7HT o 3,7-dihydroxytropolona (3,7-dHT), sin embargo, en SVBP6 este rol podría cumplirlo la oxidoreductasa SDR producto del ORF 15 (Figura 8, Tabla 2).

Por otro lado, los resultados obtenidos en el presente trabajo no sólo identificaron inequívocamente la 7HT como el metabolito principal con antagonismo fúngico en el sobrenadante de cultivo de SVBP6, sino que aportaron información acerca del rol de la 7HT en dicho antagonismo. Estos resultados apuntaron a resolver la siguiente pregunta: ¿Cuál sería el mecanismo antifúngico de 7HT? Como se menciona anteriormente, la 7HT en *P. donghuensis* había sido identificada como un sideróforo contribuyendo a la adquisición de hierro en la cepa HYS, por lo cual, el mecanismo que estos antecedentes para la inhibición de hongos por parte de la 7HT, era la de limitar el crecimiento a través de la reducción de la disponibilidad de hierro en el medio de cultivo. Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo divergen de tal hipótesis, en función de tres observaciones: Primero, la producción de 7HT no fue abolida (Figura 22 A y B) con la suplementación de hierro (como sí ocurrió con la producción de pioverdina). Las condiciones ensayadas en este trabajo muestran un descenso parcial de la producción de 7HT, a concentraciones que

exceden aquellas que eran capaces de minimizar la 7HT presente en el medio de cultivo de la cepa HYS (Jiang *et al.* 2016). En segundo lugar y relacionado con esta observación, no pudimos detectar secuencias de ADN consistentes con cajas *Fur* (Deng *et al.* 2015) a lo largo de las regiones promotoras de los genes y operones anotados en el clúster de genes asociado con la producción de 7HT en la cepa SVBP6 (Figura 8). Esto indicaría una regulación de la expresión de dicho clúster independiente de una regulación directa por la presencia de hierro en el medio de cultivo dónde se encuentra SVBP6. En tercer lugar, concentraciones abundantes de FeSO_4 no fueron capaces de anular el efecto observado de 7HT sobre *M. phaseolina* (Figura 15 C). Esto indicaría una inhibición del crecimiento independiente del hierro disponible para el hongo.

Las α -hidroxitropolonas, como la 7HT, poseen tres átomos de oxígeno en una disposición contigua que los convierte en inhibidores competitivos potentes de una variedad de metaloenzimas eucariotas dinucleares que contienen iones divalentes en su sitio activo, como Mg^{+2} , Zn^{+2} y Cu^{+2} (Guo *et al.* 2019); estos incluyen la inositol monofosfatasa, la fosfatasa alcalina, la dopamina-oxigenasa (Meck *et al.* 2014), así como miembros de la superfamilia de transferasas nucleotídicas que requieren dos iones Mg^{+2} en sus sitios activos (Piettre *et al.* 1997). La pérdida completa de actividad antifúngica por parte de los derivados metilados de 7HT ensayados en este trabajo (Figura 18 B), resaltó la importancia de los grupos hidroxilos para la actividad de 7HT. Esto está en línea con el aumento de la eficiencia quelante de las formas iónicas ante una desprotonación de los grupos hidroxilo en condiciones fisiológicas reportado para este tipo de moléculas (Meck *et al.* 2014). Asimismo, resultados posteriores en la cepa P482 (Jafra *et al.* 2024) aportaron información complementaria acerca del rol de la 7HT en el antagonismo de *P. donghuensis*. En esta cepa, la actividad antibacteriana ante *D. solani* y *P. syringae* resultó ser dependiente tanto de 7HT como de pioverdina. En la cepa P482 bajo condiciones limitantes de Fe^{+2} , la pioverdina actúa limitando el hierro disponible para los fitopatógenos, mientras que la producción de 7HT ejerce una acción directa de inhibición a los fitopatógenos. Este escenario podría ser homólogo en SVBP6, sin embargo como se menciona anteriormente, existen grandes diferencias fenotípicas entre las cepas, como la producción de volátiles, o la presencia de secuencias *Fur* en el BGC de la 7HT para P482. En este sentido, se determinó que al crecer P482 con glicerol como única fuente de carbono, los niveles de expresión del *cluster* biosintético de 7HT disminuían su expresión respecto de medios con glucosa como fuente de carbono, asignando la actividad antimicrobiana en estas condiciones a un metabolito desconocido, asociado a un *cluster* de genes novedoso. Por otro lado, al crecer P482 utilizando glucosa como única fuente de carbono, los autores concluyen que, al observar una disminución en la expresión de los genes del *cluster* novedoso, el antagonismo observado frente a *D. solani* y *P. syringae* debe mayoritariamente a 7HT. Esto es contradictorio con resultados obtenidos para SVBP6, dado que no se detectó producción de 7HT en M9-glucosa (resultado no mostrado), reforzando la idea de una regulación de la producción de 7HT muy heterogénea entre distintas cepas de *P. donghuensis*.

Conclusiones

Conjuntamente, los resultados obtenidos en este capítulo proporcionan una respuesta clara a la incógnita que surgió durante el aislamiento y caracterización de *P. donghuensis* SVBP6, así como a la hipótesis que originó este estudio. El principal metabolito responsable del fenotipo de inhibición del crecimiento a hongos fitopatógenos, al menos en las condiciones experimentales de co-cultivo utilizadas, es la 7-hidroxitropolona. Se observó que este compuesto ejerce un efecto fungistático sobre las hifas de los hongos, independientemente de la concentración de hierro en el medio, lo que sugiere un posible efecto directo de la molécula sobre la fisiología fúngica. Además, se identificó un clúster biosintético en el genoma de SVBP6 asociado a la producción de 7HT, cuya correcta expresión depende de la cascada Gac-Rsm, dado que se requiere una quinasa GacS funcional para detectar la presencia de 7HT en el medio de cultivo bacteriano. Estas observaciones y sus conclusiones contribuyen a consolidar el vínculo entre las tropolonas y el antagonismo frente a hongos fitopatógenos en el género *Pseudomonas*, aportando una nueva familia de moléculas al arsenal bioquímico antimicrobiano conocido para este género.

Anexo A

Fórmula empírica	C₇ H₆ O₃
Peso molecular	138.12
Temperatura	298(2) K
Longitud de onda	0.71073 Å
Sistema cristalino, grupo espacial	Monoclínico, P 2₁/n
Dimensiones de la celda unitaria	a = 5.0560(8) Å α = 90° b = 9.476(4) Å β = 97.45(2)° c = 13.291(5) Å γ = 90°
Volumen	631.4(3) Å³
Z, Densidad calculada	4, 1.453 Mg/m³
Coeficiente de absorción	0.115 mm⁻¹
Reflexiones recogidas / únicas	7829 / 1449 [R(int) = 0.1100]
Datos / restricciones / parámetros	1449 / 0 / 97
Bondad de ajuste sobre F²	1.045
Índices R finales [I>2σ(I)]	R1 = 0.1639, wR2 = 0.1211
Índices R (todos los datos)	R1 = 0.1639, wR2 = 0.1211
Mayor pico y hueco de dif.	0.187 and -0.204 e.Å⁻³

Tabla A1: Parámetros obtenidos para los cristales de 7HT por difracción de rayos X.

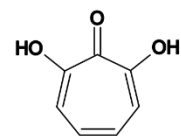
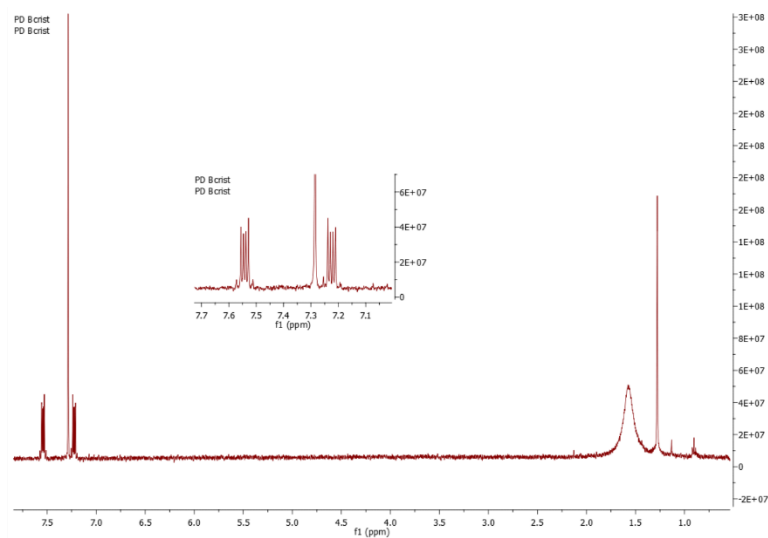
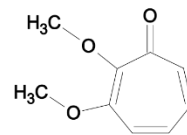
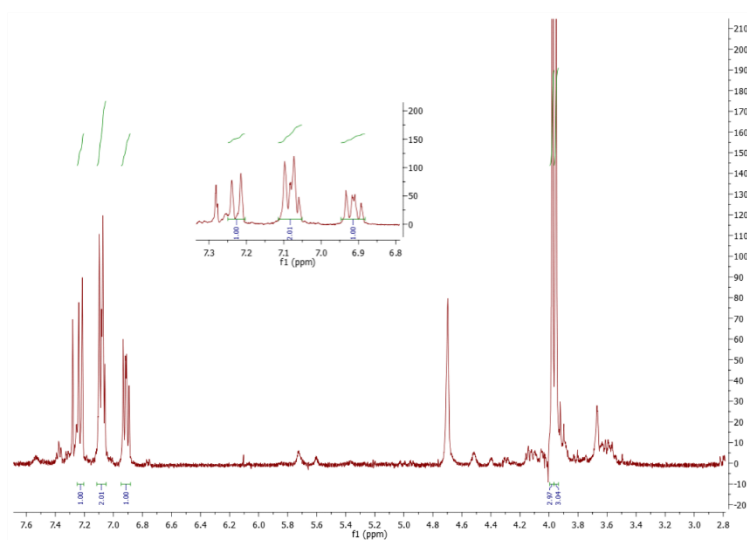
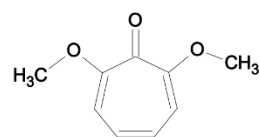
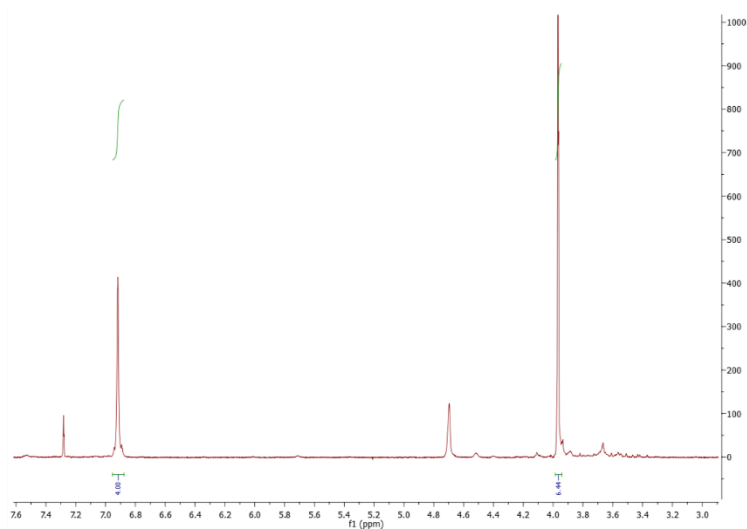
**7-hidroxitropolona****2,3 dimetoxitropolona****2,7 dimetoxitropolona**

Figura A1: Confirmación por RMN de la estructura de 7-hidroxitropolona y sus derivados metilados. Los espectros corresponden a 7-hidroxitropolona, 2,3-dimetoxitropolona y 2,7-dimetoxitropolona, respectivamente, todos obtenidos en CDCl₃ a 400 MHz.

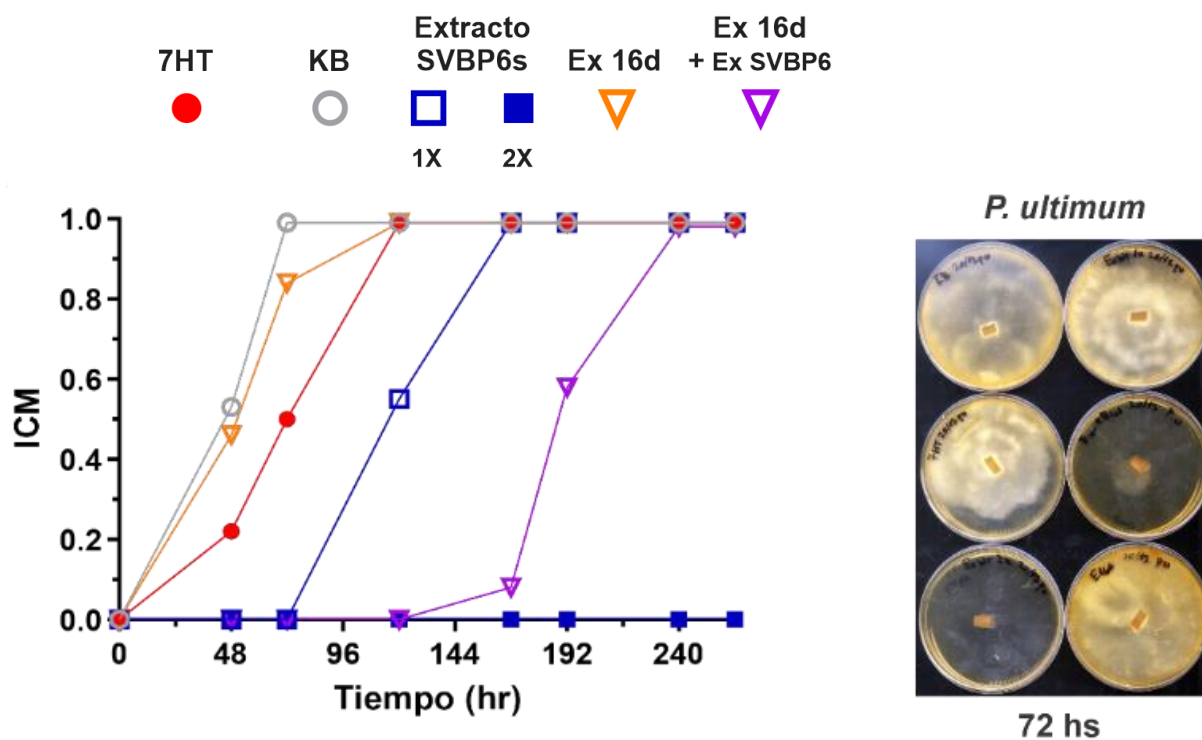


Figura A2: Actividad antifúngica de 7-HT y extracto de sobrenadantes de SVBP6 y de su mutante isogénico 16d vs *P. ultimum*. (izquierda). Cuantificación del crecimiento superficial del oomicete *P. ultimum* en presencia de los compuestos/extractos ensayados, expresados en ICM (ver Figura 7 en Materiales y Métodos) vs tiempo. Los valores representados corresponden al valor medio obtenido de duplicados. Los extractos de SVBP6 o de 16d se indican en la leyenda con la abreviatura "Ex". (derecha) Fotografía de una de las placas de 6 pocillos utilizadas, luego de 72hs a 28°C.

Capítulo 2: “Análisis multi-ómico comparativo de nuevos BGCs y metabolitos especializados en *P. donghuensis* SVBP6”

Introducción

Desde las primeras técnicas de generación masiva de datos biológicos, como los *microarrays*, las tecnologías “ómicas” han avanzado significativamente. Las mejoras continuas en la velocidad de procesamiento de muestras, junto con la disminución de los costos de secuenciación profunda, han hecho que estas técnicas sean accesibles para un público más amplio (Grady *et al.* 2017). La anotación computacional y los análisis genómicos comparativos de secuencias de ADN han proporcionado información sobre la función de los genes, las estructuras genómicas, las vías biológicas, las redes metabólicas y regulatorias, y la evolución de los genomas microbianos, lo que ha mejorado enormemente nuestra comprensión del metabolismo microbiano. Sin embargo, para dilucidar completamente el metabolismo microbiano y sus respuestas a factores ambientales, es necesario incluir la caracterización funcional y la cuantificación precisa de todos los niveles de la información genética, ARNm, proteínas y metabolitos, así como sus interacciones. Así es como, desde la genómica con el ADN, se ha aplicado este tipo de aproximación a la información biológica para desarrollar tecnologías analíticas relacionadas con la medición de ARNm, proteínas y metabolitos. Estos esfuerzos han dado lugar a la creación de varios nuevos campos de investigación “ómica”: transcriptómica, proteómica, metabolómica, interactómica, entre otros (Zhang *et al.* 2010). Sin embargo, incluso con estas ventajas, los conjuntos de datos de una única técnica o nivel de información biológica todavía ofrecen solo una dimensión de las actividades de un organismo. Es un fenómeno bien estudiado, por ejemplo, que los niveles de ARNm a menudo se correlacionan pobremente con los niveles de proteínas (Ideker *et al.* 2001, Nie *et al.* 2007). Incluso en bacterias, donde muchos genes y operones están regulados principalmente a nivel transcripcional, se ha determinado que las redes regulatorias co- y post-transcripcionales tienen un papel importante en la expresión de genes metabólicos y en la abundancia de proteínas. Además, independientemente del sistema modelo, las mediciones transcripcionales por sí solas proporcionan poca o ninguna información sobre la actividad catalítica de las enzimas. Por estas razones, es deseable recolectar y analizar múltiples capas de datos ómicos simultáneamente para comprender verdaderamente un sistema biológico complejo, a pesar de las dificultades bioinformáticas de este proceso a la hora de integración de datos (Grady *et al.* 2017).

En general, todos los enfoques experimentales ómicos comparten características principales que los diferencian con los procedimientos tradicionales, permitiéndole estudiar fenómenos más complejos. Estas características se resumen en: Los enfoques ómicos son holísticos y derivados de los datos obtenidos, en estrategias del tipo “*top-down*”; interpretan a los procesos biológicos como un solo sistema integrado, en lugar de una colección de sistemas individuales; y, finalmente, generan grandes cantidades de datos, los cuales luego requieren de un intensivo proceso computacional y estadístico para ser

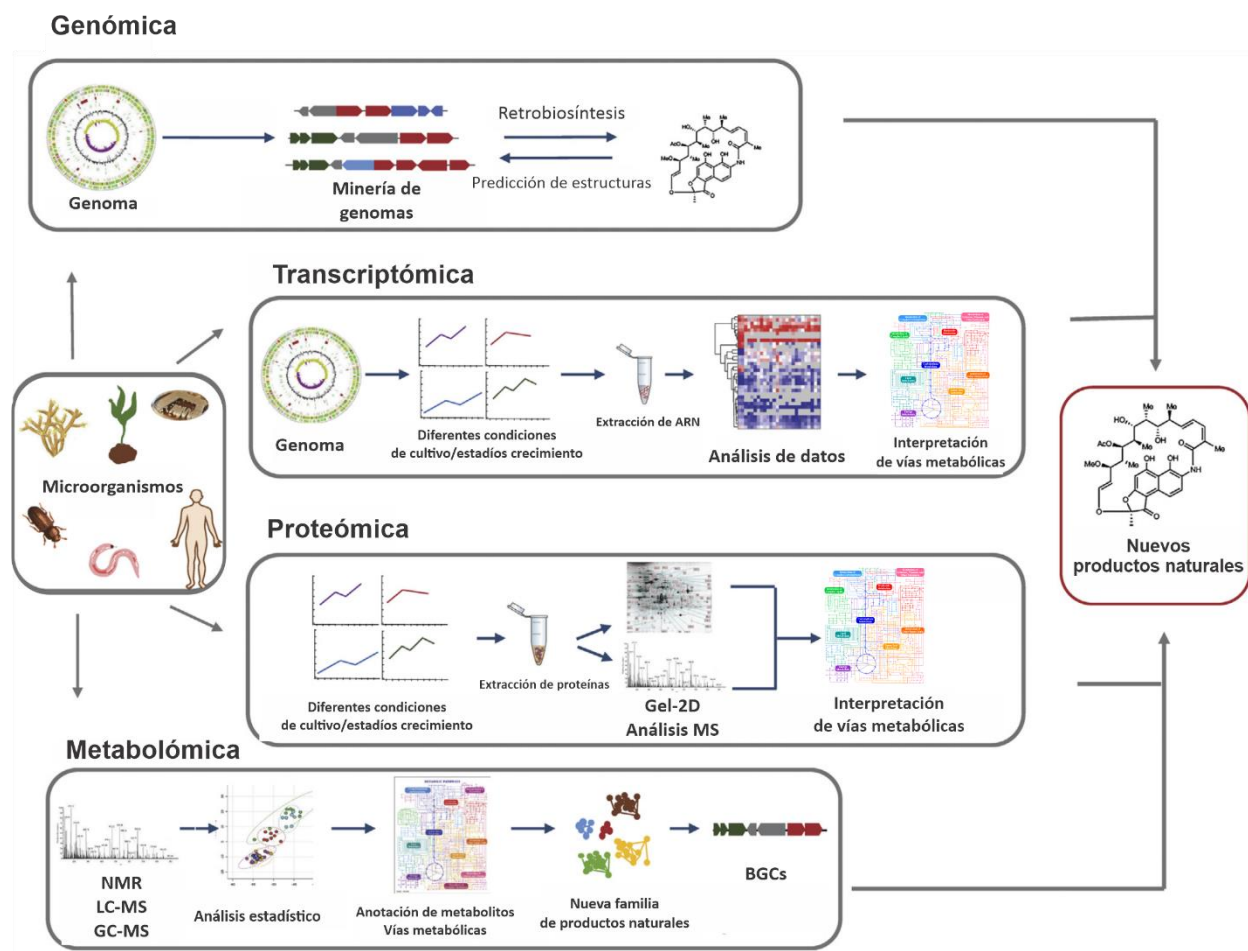


Figura 24: Representación esquemática del flujo de trabajo “multi-ómico” para el descubrimiento de productos naturales. El flujo de trabajo representado incluye los procedimientos experimentales utilizados en los enfoques de genómica, transcriptómica, proteómica y metabolómica. Adaptado de Palazzotto *et al.* (2018).

analizados (Zhang *et al.* 2010). Sin embargo, cada enfoque aborda un nivel de la expresión biológica diferente (Figura 24), de los cuales se destacan para este trabajo:

La transcriptómica, es una de las herramientas para medir el conjunto completo de todas las moléculas de ARNm, o "transcriptos", producidos en una célula o en una población de células. Los datos obtenidos por esta aproximación reflejan los genes que están siendo activamente expresados en un momento dado.

La proteómica es derivada del conjunto de tecnologías con la capacidad de identificar y medir proteínas a gran escala, que tienen como objetivo el análisis simultáneo de todas las proteínas expresadas por una célula, tejido u organismo en una condición fisiológica específica (Zhang *et al.* 2010). Dado el rol central de las proteínas en los procesos celulares, la proteómica proporciona, por ejemplo, información sobre la regulación diferencial de rutas metabólicas, destacando a los actores clave en la biosíntesis de productos naturales (Palazzotto *et al.* 2018).

La metabolómica implica la medición de pequeñas moléculas, que son los productos y sustratos de reacciones químicas dentro de los sistemas biológicos, lo que proporciona información esencial sobre el

estado biológico subyacente del sistema en cuestión. Puede involucrar una exploración "no dirigida", en la que se perfilan miles de características desconocidas y se miden las diferencias relativas en dos condiciones o en una población (semi-cuantificación) (Liu *et al.* 2017).

Los metabolitos especializados, son producidos por muchos microorganismos que codifican BGCs productores de antimicrobianos, sideróforos y moléculas de QS. Estas biomoléculas no solo tienen aplicaciones versátiles en la medicina moderna y la biotecnología, sino que también desempeñan un papel ecológico importante al mediar las interacciones de los productores microbianos con su entorno y los organismos simpátricos (Zhang *et al.* 2024). El desarrollo de técnicas ómicas ha contribuido significativamente al resurgimiento del descubrimiento de nuevos antibióticos, aumentando la comprensión de los complejos mecanismos que controlan la expresión de BGCs que codifican metabolitos especializados (Thapa *et al.* 2019). Gracias a los avances tecnológicos en genómica, metabolómica, transcriptómica y otras ómicas, se ha explorado el potencial biosintético de sistemas grandes y complejos, revelando nuevos BGCs y descubriendo nuevos productos naturales. La integración del análisis multi-ómico puede proporcionar una enorme visión tanto de la diversidad, distribución y evolución de los BGCs (Palazzotto *et al.* 2018).

Dada la competitividad en los entornos donde habitan ciertos microorganismos, la producción coordinada de metabolitos especializados se convierte en una adaptación crucial, debido al alto costo metabólico asociado a su biosíntesis (Zboralski *et al.* 2020). Además, la regulación precisa de los BGCs responsables de su producción garantiza una eficiente coordinación en la expresión génica, optimizando así el impacto fenotípico a nivel comunitario. Comprender los mecanismos que inducen la expresión de estos grupos de genes es esencial para avanzar en el descubrimiento de nuevos compuestos beneficiosos. La identificación de reguladores globales que controlan la expresión de genes biosintéticos crípticos ha abierto nuevas posibilidades en este campo (Thapa *et al.* 2019). Como se describe con más detalle en la introducción de este manuscrito, en el género *Pseudomonas*, uno de los reguladores globales del metabolismo especializado, el *fitness* celular y los comportamientos sociales más importantes es la cascada regulatoria post-transcripcional Gac-Rsm (Ferreiro *et al.* 2021). Este sistema, presente en todo el género, consta de dos módulos principales (Figura 4, en Introducción General): 1) un módulo de señalización y transducción, dominado por el sistema de dos componentes GacS-GacA y quinasas sensoriales accesorias (como RetS), y 2) un módulo de salida en el cual el GacA fosforilado activa la expresión de ARN no codificantes (RsmX/Y/Z), que se unen a proteínas de la familia Rsm, liberando así los ARNm diana (Lapouge *et al.* 2008). Aunque la naturaleza química de la/s señal/es detectada/s por GacS continúa siendo desconocida, se ha observado que las moléculas autoinductoras del sistema Gac-Rsm están presentes en los sobrenadantes de cultivo, dependiendo de la densidad celular (Latour 2020).

En cepas modelo de biocontrol como *P. protegens* CHAO y Pf-5, la cascada Gac-Rsm juega un papel crucial en la transición del metabolismo primario al secundario, lo cual es esencial para la adaptación y supervivencia en ambientes competitivos como la rizósfera de plantas o durante infecciones en hospedadores (Latour 2020). Esta cascada regula positivamente la expresión de diversos grupos de genes biosintéticos, que a su vez conducen a la producción de varios metabolitos antimicrobianos especializados. Entre estos compuestos se incluyen 2,4-diacetilfloroglucinol, pirrolnitrina, pioluteorina, cianuro de hidrógeno, orfamidas, protegencina, toxoflavina y rizoxina, como lo han documentado diversos estudios (Haas *et al.* 2005, Loper *et al.* 2016, Yan *et al.* 2018, Mullins *et al.* 2021). Además de su rol en la

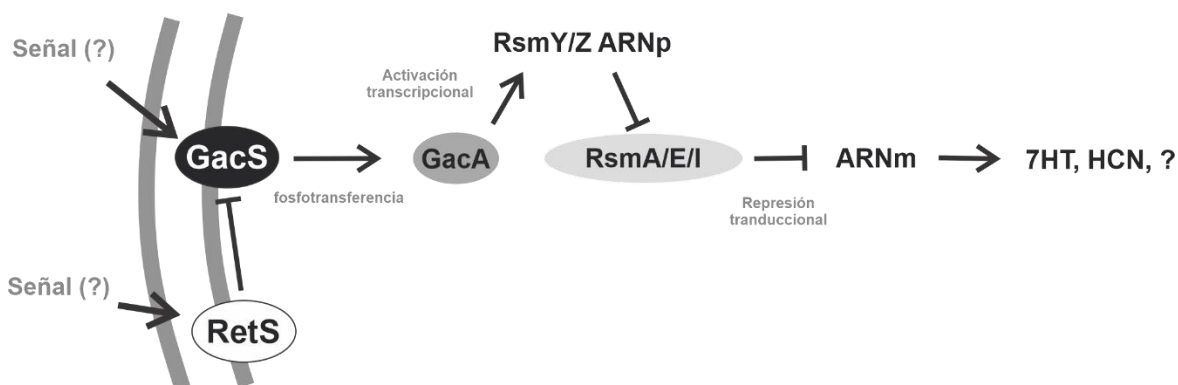
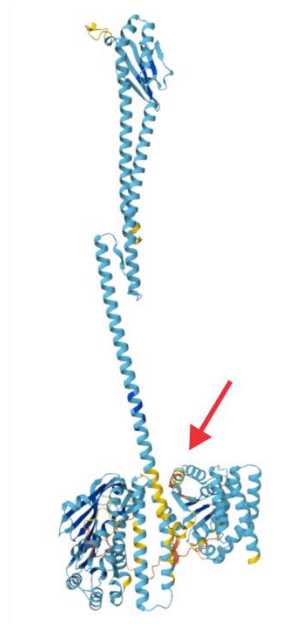
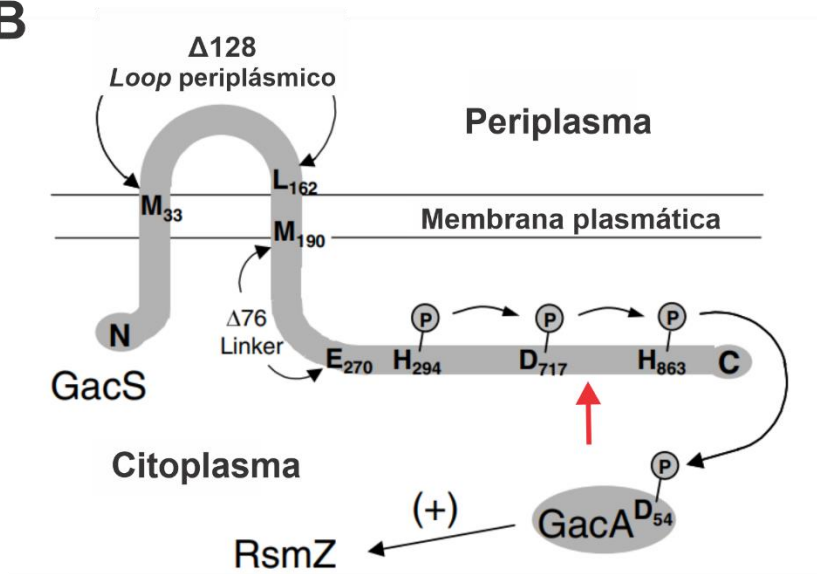
A**B**

Figura 25: La regulación Gac-Rsm en *P. donghuensis* SVBP6 y ubicación de la inserción de Tn5 en el mutante 28I. A) Elementos de la cascada regulatoria Gac-Rsm presentes en el genoma de SVBP6 (Agaras *et al.* 2018). B) Representaciones esquemáticas del polipéptido GacS, indicando la posición aproximada (flecha roja) en la que ocurre la interrupción de la secuencia del sensor quinasa por la inserción Tn5 en el gen *gacS*. (Izquierda) Adaptado de Zuber *et al.* 2003. (Derecha) Adaptado de representación tridimensional de la estructura de GacS, predicha con AlphaFold (<https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/A0A2M9VRN1>).

síntesis de estos metabolitos, la cascada Gac-Rsm también activa la expresión de genes que permiten a la bacteria defenderse contra amenazas eucariotas, incluyendo la producción de enzimas extracelulares como quitinasas, metaloproteasas y fosfolipasa C, así como la proteína insecticida FitD (Sacherer *et al.* 1994, Loper *et al.* 2016). La interrupción de la actividad de GacS, GacA o de los ARN reguladores tipo Rsm mediante mutaciones resulta en una disminución de la capacidad de la bacteria para suprimir

enfermedades en plantas, haciéndola más vulnerable a la depredación por protistas del suelo (Kay *et al.* 2005, Jousset *et al.* 2006). La relevancia de la cascada Gac-Rsm en la regulación estricta de la producción de metabolitos especializados ha sido confirmada en diversos aislamientos del suelo con propiedades biocontroladoras, como *P. fluorescens* SBW25, *P. brassicacearum* NFM421, *P. fluorescens* QS161, *P. chlororaphis* 30-84 y *P. aeruginosa* M18, entre otros (Lalaouna *et al.* 2012, Stallforth *et al.* 2013, Wang *et al.* 2013, Wei *et al.* 2013, Cheng *et al.* 2015, Song *et al.* 2015b).

El genoma de la cepa de *P. donghuensis* SVBP6 contiene todos los elementos genéticos para una cascada Gac-Rsm funcional (Figura 25 A, Agarar *et al.* (2018)). En primer lugar, en el genoma se encuentran los genes *gacS* (QYF67_RS20035), *retS* (QYF67_RS12065) y *gacA* (QYF67_RS12065), que codifican para los productos proteicos histidina kinasa GacS y RetS, así como el regulador de respuesta GacA. Estos tres primeros componentes peptídicos corresponden al llamado “módulo de señalización” del sistema de regulación Gac-Rsm, en el cual GacS y RetS son capaces de detectar y responder a molécula/s autoinductora/s de identidad química desconocida liberado al medio circundante a las células. Esta respuesta es comunicada mediante el regulador de respuesta GacA, el cual es fosforilado por GacS, para promover la transcripción de los ARN que componen el “módulo de salida”. Para el módulo de salida, en el genoma de SVBP6, están codificados los ARN RsmY (posición 5242500 a 5245500, cadena molde) y RsmZ (posición 1305000 a 1308000, cadena codificante). Asimismo, las proteínas represoras de la actividad traduccional de múltiples ARNm, cuyas actividades asociadas son reguladas por Gac-Rsm, SVBP6 posee en su genoma la información que codifica para RsmA (QYF67_RS24295), RsmE (QYF67_RS15755) y RsmI (QYF67_RS21850). A partir de la colección de mutantes mencionada en el Capítulo 1 de este manuscrito, donde 58 mutantes fueron aislados por su pérdida del antagonismo hacia *M. phaseolina*, se identificaron 2 clones independientes cuya inserción única del transposón Tn5, se encontraba dentro de *gacS*. Uno de ellos, el mutante 28I, fue caracterizado y destacado por su fenotipo pleiotrópico diferencial a SVBP6, que exhibía alteraciones en diversas actividades, entre ellas, su actividad antimicrobiana. 28I poseía la inserción Tn5 en el nucleótido 2290 (Figura 25 B), causando la expresión de una versión del polipéptido GacS truncado en el residuo 763, dentro del dominio funcional que participa en la transferencia de un grupo fosfato de una hacia GacA (denominado “*phosphorelay*”) (Figura 25 B). Asimismo, en adición a su fenotipo deficiente de actividades característicamente asociadas a una cascada regulatoria Gac-Rsm funcional, se reportó previamente que la abundancia celular del transcripto de RsmY (dependiente de la activación por la acción de GacA) era apenas detectable por Northern blot, aún en cultivos saturados, y mucho menor que para la cepa silvestre (Agarar *et al.* 2018).

Al inicio de este trabajo de tesis, SVBP6 mostraba un antagonismo mediado por factores solubles inicialmente desconocidos en ensayos *in vitro*. A través de la minería del genoma de SVBP6 (Agarar *et al.* 2018), se determinó que el aislamiento no poseía ninguno de los BGC clásicos asociados al control biológico en otras cepas del género *Pseudomonas*, aunque su actividad antifúngica dependía de GacS funcional. Los resultados presentados en el Capítulo 1 demuestran que la mayor parte del antagonismo de SVBP6 frente a *M. phaseolina* y miembros del género *Fusarium* se debe a la producción del metabolito 7-hidroxitropolona (7HT), junto con los genes responsables de su síntesis. Sin embargo, otros estudios en nuestro laboratorio paralelos al desarrollo de este trabajo revelaron que, a pesar de su incapacidad de producir 7HT y con un antagonismo reducido hacia otros hongos fitopatógenos, mutantes de SVBP6 deficientes en la producción de 7HT, son aún capaces de inhibir el crecimiento de bacterias fitopatógenas, como *Xanthomonas vesicatoria*, y del hongo *Sclerotinia sclerotiorum*. Sin embargo, el mutante 28I perdió toda actividad antimicrobiana (Martins *et al.* 2023). Estas observaciones sugieren que SVBP6 produce,

además de 7HT, otro/s metabolito/s especializado/s con actividad antimicrobiana, y que la expresión de los genes que determinan su ruta biosintética requiere al sensor GacS funcional.

En este contexto, el presente Capítulo se centra en la identificación de otros componentes genéticos y metabólicos implicados en el fenotipo antimicrobiano de SVBP6, más allá de los ya identificados. Para ello, se empleó una aproximación multi-ómica, aprovechando la cualidad pleiotrópica de la cascada regulatoria Gac-Rsm para identificar determinantes de actividades relacionadas con el biocontrol y la producción de metabolitos especializados.

Hipótesis de trabajo

La cepa bacteriana *Pseudomonas donghuensis* SVBP6 posee clústeres génicos biosintéticos (BGCs), cuya expresión es dependiente de la activación mediada por la función de GacS, y que son determinantes de la biosíntesis de metabolitos con actividad antimicrobiana independiente de 7HT.

Objetivos específicos

- Determinar el estado fisiológico óptimo de cultivos de la cepa *P. donghuensis* SVBP6 para la toma de muestras necesaria para los análisis comparativos ómicos vinculados a la función de GacS.
- Caracterizar el impacto transcriptómico de la pérdida de función de *gacS* en SVBP6.
- Caracterizar el impacto proteómico de la pérdida de función de *gacS* en SVBP6.
- Caracterizar el impacto metabolómico de la pérdida de función de *gacS* en SVBP6.
- Identificar nuevos BGCs y/o metabolitos antimicrobianos a través de la integración de los distintos análisis ómicos comparativos de la pérdida de función de *gacS* en SVBP6.

Materiales y Métodos

Conservación y crecimiento de cepas bacterianas

Las cepas bacterianas utilizadas en este capítulo y sus temperaturas de crecimiento se detallan en la Tabla 3. Las cepas se conservaron en condiciones de esterilidad, en una solución *stock* acuosa de glicerol 20% final en ultrafreezer (-80°C). De forma rutinaria, las cepas fueron recuperadas de los *stocks* y crecidas de en agar nutritivo NA (agar triptéina soja, 40 g/L; extracto de levadura, 5 g/L) para su manipulación a corto plazo. Para cultivos *overnight* (aproximadamente 16 horas) se utilizó caldo nutritivo NYB (caldo nutritivo, 25 g/L; extracto de levadura, 5 g/L). Los cultivos de SVBP6 y su mutante *gacS::Tn5* (28l) utilizados para obtener muestras en las distintas aproximaciones ómicas fueron crecidos en medio de cultivo King's B (KB; glicerol 8 g/l, peptona bacteriana 10 g/l, K₂HPO₄·3H₂O 1,5 g/l, MgSO₄·7H₂O 1,5 g/l). En caso de requerirlo, se incluyeron los siguientes antibióticos en los medios de cultivo: para *Pseudomonas*, tetraciclina (Tc) 125 µg/ml, y estreptomycin (Str) 200 µg/ml para medios sólidos y 100 µg/ml para medios líquidos. Para *E. coli*, tetraciclina (Tc) 25 µg/ml.

Microorganismos utilizados			
Microorganismo/Cepa	Descripción	Temperatura óptima de crecimiento	Referencia
<i>Pseudomonas donghuensis</i> SVBP6	Aislamiento silvestre proveniente de suelo agrícola en Viale, Provincia de Entre Ríos, Argentina	28°C	(Agaras <i>et al.</i> 2018)
<i>P. donghuensis</i> 28l	Mutante SVBP6 con inserción Tn5 en <i>gacS</i> (<i>gacS::Tn5</i>) Str ^R	28°C	(Agaras <i>et al.</i> 2018)
<i>Escherichia coli</i> DH5α	<i>recA1 endA1 hsdR17 deoR thi-1 supE44 gyrA96 relA1Δ(lacZYA-argF) U169 (Φ80d/lacZΔM15)</i>	37°C	Stock de laboratorio
<i>Macrophomina phaseolina</i> CCC 131-2010	Aislamiento fúngico silvestre de plantas de soja (Bengolea, Córdoba, Argentina).	28°C	(Agaras <i>et al.</i> 2015)

Plásmidos utilizados

pME7402	Vector pPROBE-TT' conteniendo una fusión transcripcional del promotor de <i>rsmZ</i> de <i>P. protegens</i> CHA0 (340 pb) y el ORF de GFP (<i>P_{rsmZ}-gfp</i>), Tc ^R	(Dubuis <i>et al.</i> 2006)
---------	--	-----------------------------

Tabla 3: Microorganismos y plásmidos utilizados en este capítulo.

Conservación y crecimiento de aislamientos fúngicos

En este capítulo se utilizó el aislamiento *M. phaseolina* CCC 131-2010 (Tabla 3). Para su recuperación a partir de stocks de conidios conservados en suspensión acuosa en glicerol 20% a -80°C y manipulación a corto plazo se empleó medio agarizado papa-dextrosa (*potato dextrose agar*, 39 g/L, Laboratorios Britania). Cincuenta microlitros de suspensión de conidios se transfirieron a placa de PDA y fueron esparcidos con espátula de Drigalski. Luego de 24-48h a 28°C, cuando el micelio resultante de los conidios cubría toda la superficie del agar, un rectángulo de 1x1cm fue cortado y apoyado sobre una nueva placa de PDA. Una vez crecida cercana a la confluencia (aproximadamente 72h), con la ayuda de un bisturí esterilizado, se tomó material del borde externo del crecimiento micelial de manera de utilizar la porción de micelio más activa para los ensayos correspondientes.

Transformación de pME7402 en SVBP6 por electroporación

Las células de *P. donghuensis* SVBP6 fueron transformadas para la incorporación del plásmido pME7402, siguiendo parámetros de preparación de células y electroporación de *P. protegens* (Tabla 3, Heeb *et al.* (2002)). Para preparar las células electrocompetentes se inoculó un Erlenmeyer de 250 ml conteniendo 100 ml de medio NYB y se crecieron a 28°C, 200 rpm. Una vez que el cultivo alcanzó una DO₆₀₀ de 0,7, las células se colectaron por centrifugación a 5000 rpm por 15 min a 4°C y se lavaron al menos tres veces con una solución fría de glicerol 10% (v/v) en H₂O milliQ. Alícuotas de 50 µl fueron guardadas a -80°C para usos futuros. Para la electroporación, una alícuota de células electrocompetentes se mezcló con 0,05-0,5 µg de plásmido pME7402 (Tabla 3, obtenido por miniprep de *E. coli* DH5α (Sambrook 1989)) en una cubeta 0,1 cm y se electroporó en un Bio-RAD *gene pulser* con un pulso de voltaje de 2,5 kV, 25 µF y 200 Ω. Luego de la transformación, la mezcla se diluyó en 1 ml de medio SOC (triptona, 20 g/l; extracto de levadura, 5 g/l; NaCl, 0,584 g/l; KCl, 0,19 g/l; MgCl₂·6H₂O, 2,03 g/l; MgSO₄·7H₂O, 3,96 g/l; Glucosa, 3,96 g/l) y se incubó durante 1 h a 28°C, 200 rpm. Por último, la mezcla se plaqueó en medio NA sólido con Tc 125 para la selección de colonias conteniendo el plásmido.

Extracción de “señal Gac” a partir de cultivos de SVBP6.

Para la obtención del extracto conteniendo la/s molécula/s activadora/s de la cascada regulatoria Gac-Rsm, se siguió el procedimiento descrito en Dubuis *et al.* (2006). Se crecieron cultivos de *P. donghuensis* SVBP6 a partir de un cultivo ON, en Erlenmeyers de 125 ml, utilizando 20 ml de medio Casaminoácidos-glicerol (CSM; glicerol, 17,8 g/l; casaminoácidos, 5 g/l; K₂HPO₄, 1,5 g/l; MgSO₄·7H₂O, 75 g/l; FeCl₃·6H₂O, 5,4 g/l; ZnCl₂, 2,7 g/l) durante 20 horas, a 28°C y 200 rpm. El sobrenadante obtenido se centrifugó 10 minutos a 10000 rpm, se filtró a través de membranas de 0,45 µm, se acidificó a pH =5,0 utilizando HCl, y se extrajo con 1/3 de volumen de diclorometano, utilizando ampollas de decantación. Los extractos se secaron con Na₂SO₄, se filtraron con papel de filtro y se evaporaron en rotavapor. El residuo remanente en el balón se resuspendió en un volumen de metanol equivalente a 1/100 del volumen de cultivo tomado para el procesamiento.

Expresión de P_{rsmZ} -*gfp* para el monitoreo de la actividad de GacS.

La actividad del módulo de señalización Gac-Rsm se monitoreó mediante la expresión de la fusión transcripcional entre el promotor del gen *rsmZ* de *P. protegens* CHA0 y *gfp* (P_{rsmZ} -*gfp*), codificada en el plásmido pME7402 (Tabla 1). Dependiendo del diseño experimental, la expresión *in vitro* de P_{rsmZ} -*gfp* se monitoreó tanto en cultivos de 20 ml de medio King's B (KB; glicerol 8 g/l, peptona bacteriana 10 g/l, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 1,5 g/l, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1,5 g/l) en frascos de 125 ml a 28 °C y 200 rpm, o en microplacas de 96 pocillos que contenían 100 µl de medio King's B a 28 °C y 300 rpm. La fluorescencia asociada a la presencia de GFP se determinó en un lector de placas Cytation 5 Agilent, utilizando un monocromador con los siguientes parámetros: ex=485, em=528, ganancia 70%. Cuando fue necesario, el medio de crecimiento se suplementó con extracto de sobrenadante de cultivo de SVBP6 conteniendo "señal GacS", de manera que la cantidad de extracto añadido al medio de crecimiento fue tal que la/s señal/es alcanzó/aron una concentración inicial equivalente a la del cultivo saturado del cual fue extraído. Se utilizó metanol como control. De requerirlo, la producción de 7HT fue monitoreada tomando sobrenadante de los cultivos y midiendo la absorbancia a 327nm, por espectrometría UV, mediante uso de un Nanodrop ND-1000 (Thermo Fischer Scientific).

Determinación y toma de muestras para el análisis multi-ómico.

En función de los resultados obtenidos de la determinación paralela de la expresión de P_{rsmZ} -*gfp* y la producción de 7HT, se determinaron dos etapas del cultivo de SVBP6, a partir de los cuales se tomaron muestras para el análisis multi-ómico del impacto de la mutación GacS, utilizando cultivos de SVBP6 y 28I (*gacS*::Tn5). La primera, al comenzar la biosíntesis de 7HT y con una baja actividad la cascada Gac-Rsm (G1, Gac-1), y el segundo, en el máximo de producción de 7HT y con una alta actividad Gac-Rsm (G2, Gac-2). A modo de resumen, para la aproximación transcriptómica se tomaron muestras en G2, para proteómica en G1 y G2 y para metabolómica en G2. (Figura 26) Se incluyeron muestras conteniendo micelio de *M. phaseolina* (detalles más adelante) para el análisis proteómico y metabolómico.

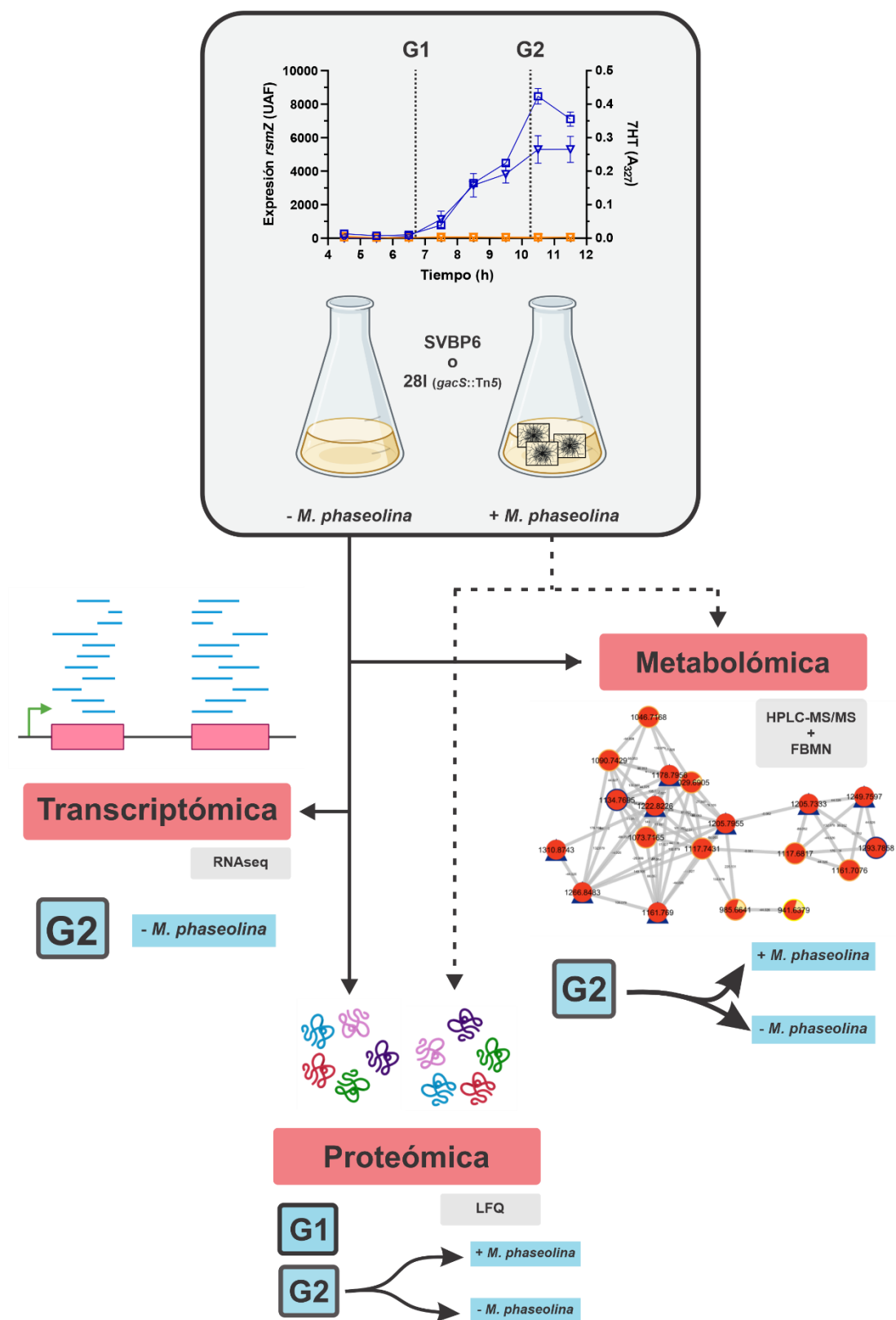


Figura 26: Esquema ilustrativo de la toma de muestras y procesamiento de cada análisis ómico utilizado (enmarcadas en celeste).

Re-secuenciación del genoma de la cepa SVBP6

Al inicio del presente trabajo, disponíamos de un borrador del genoma de SVBP6 obtenido mediante secuenciación Illumina de fragmentos de 250 pb (<https://pseudomonas.com/strain/show/5836>; Agaras *et al.* (2018)). Con la finalidad de obtener la secuencia completa del genoma para la búsqueda de BGCs novedosos y contar con información confiable para otros análisis, se resecuenció el genoma combinando lecturas largas de secuenciación por Nanopore (Jain *et al.* 2016) y lecturas de 400 pb de Illumina (Bentley *et al.* 2008), a través del servicio ofrecido por SeqCenter (Pittsburgh, EE. UU.). Para ello, se preparó una muestra de ADN total a partir de un cultivo saturado de SVBP6 con el kit DNeasy Ultraclean® Microbial siguiendo las instrucciones del fabricante (Qiagen GmbH, Alemania). La pureza, calidad y concentración de la preparación se evaluaron mediante espectrometría UV, utilizando un Nanodrop ND-1000 (Thermo Fischer Scientific) y electroforesis en gel de agarosa (Sambrook 1989). Las lecturas de Nanopore se recortaron para eliminar secuencias de adaptadores, se generaron ensamblajes del genoma *de novo* y posteriormente se refinaron con datos de lecturas de Illumina. Finalmente, se circularizaron para obtener un *contig* (cromosoma) de 5736632 pb. La secuencia completa se depositó en NCBI bajo el código de acceso CP12953, y en la base de datos de Pseudomonas.com (<https://pseudomonas.com/strain/show?id=23564>). El genoma fue anotado por Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP) de NCBI (Li *et al.* 2021).

Análisis transcriptómico del impacto de la mutación *gacS*.

La generación de muestras y datos transcriptómicos se realizó mediante una colaboración con el laboratorio de la Dra. Cara Haney, Departamento de Microbiología e Inmunología de la Universidad de British Columbia, en Vancouver, Canadá. Se realizaron cultivos de SVBP6 y de su mutante *gacS::Tn5* (28I), en 20 ml de medio KB en Erlenmeyers de 125 ml, a 28°C y 200 rpm. Aproximadamente 10 horas después de la inoculación ($DO_{600} \approx 3,5$), se cosecharon los cultivos de 4 réplicas biológicas por cepa. Se recolectaron células mediante centrifugación a $10000 \times g$ durante 10 minutos a 4 °C y se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido. El ARN total se extrajo utilizando el kit RNeasy Mini (Qiagen) según las instrucciones del fabricante, incluyendo un tratamiento con DNase I en columna para eliminar cualquier ADN genómico contaminante. La calidad y concentración del ARN se evaluaron utilizando un espectrofotómetro NanoDrop y un Bioanalizador Agilent 2100. Las muestras con valores de número de integridad de ARN (RIN) superiores a 7,0 se consideraron para la preparación de bibliotecas. La preparación de bibliotecas utilizando el pipeline de Novogene fue normalizada y agrupada equimolarmente. La secuenciación de extremos emparejados (lecturas de 150 pb) se realizó utilizando la plataforma Illumina Nova PE150. El genoma de SVBP6 (GCF_030556675.1, <https://pseudomonas.com/strain/show?id=23564>) se utilizó como referencia para el análisis transcriptómico de *P. donghuensis*, con anotaciones de la Base de Datos del Genoma de Pseudomonas (PseudoCAP, <http://www.pseudomonas.com/>). Las lecturas de secuenciación crudas se evaluaron para calidad utilizando FastQC y se recortaron. Las lecturas de alta calidad se alinearon al genoma de referencia de *Pseudomonas* utilizando HISAT2. Las lecturas alineadas se procesaron con SAMtools para generar archivos BAM ordenados. Los niveles de expresión génica se cuantificaron utilizando featureCounts, y el análisis de expresión diferencial se realizó utilizando DESeq2 (Song *et al.* 2023). Se consideraron como genes con expresión diferencial significativa a aquellos que mostraron un cambio de abundancia media >2 veces y que a posteriori de un análisis de modelos lineales generalizados tuvieron en la comparación estadística con un valor p ajustado (modelos lineales

generalizados) <0.05 y un cambio en la expresión >2 veces. El análisis de enriquecimiento funcional de los genes diferencialmente expresados se realizó utilizando la base de datos de Gene Ontology (GO) y las vías KEGG. Los datos de secuenciación de ARN han sido depositados con número de acceso PRJNA1119972 en la base de datos BioProject de NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/>).

Análisis proteómico del impacto de la mutación *gacS*.

El análisis proteómico cuantitativo sin etiquetas (LFQ, *label-free quantification*) se realizó con la tecnología nanoHPLC-MS/MS en la plataforma de espectrometría de masas del CEQUIBIEM de la Facultad de Ciencias Exactas, Universidad de Buenos Aires. SVBP6 y el mutante 28I se cultivaron por triplicado en medio KB (50 ml) a 28 °C y 200 rpm. Al momento de la recolección de las células, se centrifugaron alícuotas de cultivos que contenían 40 unidades de DO₆₀₀ cada una para recolectar los pellets celulares. Las células se resuspendieron en 3 ml de solución tampón de lisis (10 mM MgCl₂, 20 mM Tris/HCl pH 8,0, PMSF 0,1 mM, conteniendo 10 µg de DNasa I y 5 µg de RNasa A) y se transfirieron a una prensa francesa (1000 psi) para romper la biomasa. Los lisados se clarificaron por centrifugación (5 min, 10000×g a 4 °C). La concentración de proteínas en cada lisado se determinó mediante el ensayo colorimétrico de Bradford (Sambrook 1989), utilizando reactivo de Bradford listo para usar (Bio-Rad, EE.UU.) utilizando una solución de albúmina de suero bovino como estándar. La calidad de las preparaciones se verificó mediante SDS-PAGE (Sambrook 1989). Se cargaron 50 µg de proteína total de cada muestra en un gel SDS-PAGE (12% acrilamida) y se corrió durante 50 minutos a 110 V. El gel se tiñó con Coomassie blue coloidal y las proteínas teñidas de cada muestra se recuperaron cortando con un bisturí los geles de poliacrilamida, para luego ser transferidas a microtubos para su posterior procesamiento. Ya en el laboratorio de servicios CEQUIBIEM, se realizó una digestión *in-gel* con tripsina luego de la reducción de los péptidos con ditiotreitól y la alquilación con yodo acetamida. Los péptidos se extrajeron con acetonitrilo, se liofilizaron, se resuspendieron en 30 µl de ácido trifluoroacético al 0,1 % p/v, y se desalaron a través de ZipTips C18 (Merck). Las muestras fueron analizadas mediante nanoHPLC (Thermo Scientific, Alemania; modelo EASY-nLC 1000) acoplado a un espectrómetro de masas Orbitrap (Thermo Scientific, Alemania; modelo Q-Exactive, equipado con una célula HCD y un analizador Orbitrap). La ionización se realizó por electrospray. Los datos resultantes se analizaron utilizando Proteome Discoverer (v.2.2; Thermo Scientific) comparándolos con la base de datos Uniprot para *P. donghuensis*. El análisis comparativo de abundancias de proteínas se realizó con un *script* en R. Todas las proteínas requirieron valores de cuantificación sin etiquetas promediados $\geq 1 \times 10^6$ para ser consideradas detectadas. Se realizó un análisis de tasa de descubrimiento falso (FDR, *False Discovery Rate*) y solo se consideraron los péptidos con un FDR inferior a 0,05. En los casos en que no se obtuvieron valores de abundancia para alguna de las tres réplicas analizadas, se imputaron dichos valores con un promedio de los otros dos valores de abundancia registrados. En el caso contrario, cuando los valores faltantes de abundancia correspondían a dos de las tres réplicas, el valor de la tercera réplica fue desestimada. Las diferencias en abundancia entre las muestras se calcularon como cambios de orden (*fold change*) entre SVBP6 y el mutante *gacS::Tn5*, y se realizaron pruebas t de Student para evaluar la significancia estadística. Las anotaciones de las vías KEGG para las proteínas expresadas diferencialmente realizaron utilizando la base de datos KEGG (<http://www.kegg.jp/kegg/pathway.html>). El paquete R (4.4) clusterprofiler (Wu *et al.* 2021) se utilizó para el análisis de sobrerrepresentación y la correspondiente prueba estadística. Los procesos de la vía KEGG con $p < 0,05$ se consideraron significativamente sobrerrepresentados.

Análisis metabolómico del impacto de la mutación *gacS*.

La obtención de datos metabolómicos fue realizada bajo la dirección del Dr. Daniel Petras, en el Laboratorio de Metabolómica Funcional de la Universidad de Tübingen, Tübingen, Alemania. Cultivos de SVBP6 y su mutante 28I se realizaron por triplicado en medio KB (20 ml). Se obtuvieron muestras del sobrenadante de los cultivos centrifugando 5 ml (15 minutos, 10,000 rpm a 4°C), seguido de la adición de 1/10 del volumen de HCl 1 N y la posterior extracción con 1/2 del volumen de acetato de etilo (EtOAc). La extracción se repitió una vez y luego se combinó con la anterior. Los extractos se secaron en viales de vidrio mediante la utilización de un rotavapor y se resuspendieron en metanol al 80% a una concentración de 1 mg de extracto total por mililitro. Se utilizó medio de cultivo estéril como control. Las muestras se analizaron a través de un protocolo de metabolómica no dirigida por LC-MS/MS, inyectando las muestras en un sistema de cromatografía líquida de ultra alto rendimiento (UHPLC) Vanquish acoplado a un espectrómetro de masas Q Exactive HF con una fuente de ionización por electrospray calentada (HESI) (Thermo Fisher Scientific). La separación por UHPLC se realizó en una columna C18 Kinetex Coreshell (2x 50 mm, tamaño de partícula de 1,8 µm, Phenomenex), en modo de adquisición dependiente de los datos. Las fases móviles comprendieron un solvente polar (A) consistente en H₂O (grado LC/MS, Fisher Scientific) + 0,1% de ácido fórmico (FA) y un solvente apolar (B) consistente en acetonitrilo (grado LC/MS, Fisher Scientific) + 0,1% de FA (Stincone *et al.* 2023). Después de la inyección de la muestra, se utilizó un método de gradiente lineal de 5 minutos para eluir pequeñas moléculas, y la velocidad de flujo se mantuvo a 0,150 ml/min. Las condiciones de separación se establecieron de la siguiente manera: en el rango de tiempo de 0-4 min se utilizó un 5% a 50% de solvente B, de 4-7 min de 50% a 99% de solvente B, seguido de una fase de lavado de 3 minutos al 99% de solvente B y una fase de re-equilibrio de 3 minutos al 5% de solvente B. La polaridad de escaneo se estableció en modo positivo, y los ajustes de la fuente HESI fueron los siguientes: tasa de flujo del gas de recubrimiento a 30 L/min AU, tasa de flujo del gas auxiliar a 10 L/min AU, tasa de flujo del gas de barrido a 2 L/min AU, voltaje de pulverización a 3,50 kV, temperatura del capilar a 250°C, nivel de RF de la lente S a 50 V y temperatura del calentador de gas auxiliar a 200°C. Para la adquisición de datos de Full MS, la resolución se estableció en 45K, el objetivo de AGC en 1e⁶, el IT máximo en 100 ms, y el rango de escaneo de 120-1800 m/z. Para la adquisición de datos MS/MS, la resolución se estableció en 15K, el objetivo de AGC en 5e⁵, el IT máximo en 50 ms, el TopN en 5, la ventana de aislamiento en 1,0 m/z, y el NCE escalonado en 25-35-45. Los datos crudos de LC-MS/MS se convirtieron al formato de archivo .mzML seleccionando los picos de MS/MS utilizando el software msConvert (Adusumilli *et al.* 2017). La detección de *features* moleculares se realizó con la versión MZmine3 (<https://github.com/mzmine/mzmine3/releases>) (Schmid *et al.* 2023). La tabla de *features* resultante (.csv) y los archivos de espectros MS/MS (.mgf) se exportaron y utilizaron para el análisis de redes moleculares basadas en *features* (FBMN) en GNPS (<https://gnps.ucsd.edu/>) (Nothias *et al.* 2020b) y el análisis de datos en Rstudio (<http://www.rstudio.com>), siguiendo el script proporcionado en (Pakkir Shah *et al.* 2023). Las redes se exportaron desde GNPS para su exploración, análisis y visualización en el software Cytoscape. Durante el análisis de datos, las características del blanco se filtraron basándose en las abundancias medias en los extractos de SVBP6 (utilizando un valor de corte del 30%), ya que promediar abundancias con datos de las muestras *gacS*::Tn5 para filtrar características conduciría a un alto número de falsos negativos. Los valores faltantes se imputaron utilizando el valor mínimo detectado en las muestras. Las abundancias se normalizaron mediante escalado central y, según los detalles de (Pakkir Shah *et al.* 2023), se evaluó la normalidad y se detectaron características significativas a través de ANOVA. Se realizaron pruebas *post hoc* de Tukey entre cada comparación de muestras para determinar diferencias

estadísticamente significativas. Para la anotación *in silico* de *features* sin una coincidencia de librerías de compuestos, se utilizó el software SIRIUS (Duhrkop *et al.* 2019) para predecir la estructura molecular *de novo* y el módulo CANOPUS para una posterior anotación de características en familias bioquímicas.

Resultados y discusión

GacS regula la actividad antimicrobiana en la cepa *P. donghuensis* SVBP6.

En función a la estrecha relación entre la producción de metabolitos especializados en cepas de bacterias del género *Pseudomonas* y la cascada de regulación Gac-Rsm, se determinó que un análisis comparativo entre SVBP6 y su mutante *gacS* podría proporcionar información valiosa sobre novedosos metabolitos antimicrobianos y/o sobre los BGCs responsables de su producción en la cepa. En esta línea, se identificó que el vínculo común entre la regulación génica de estos metabolitos y la 7HT podría ser una herramienta poderosa para observar cambios tanto en el metaboloma de SVBP6 como en su transcriptoma y/o

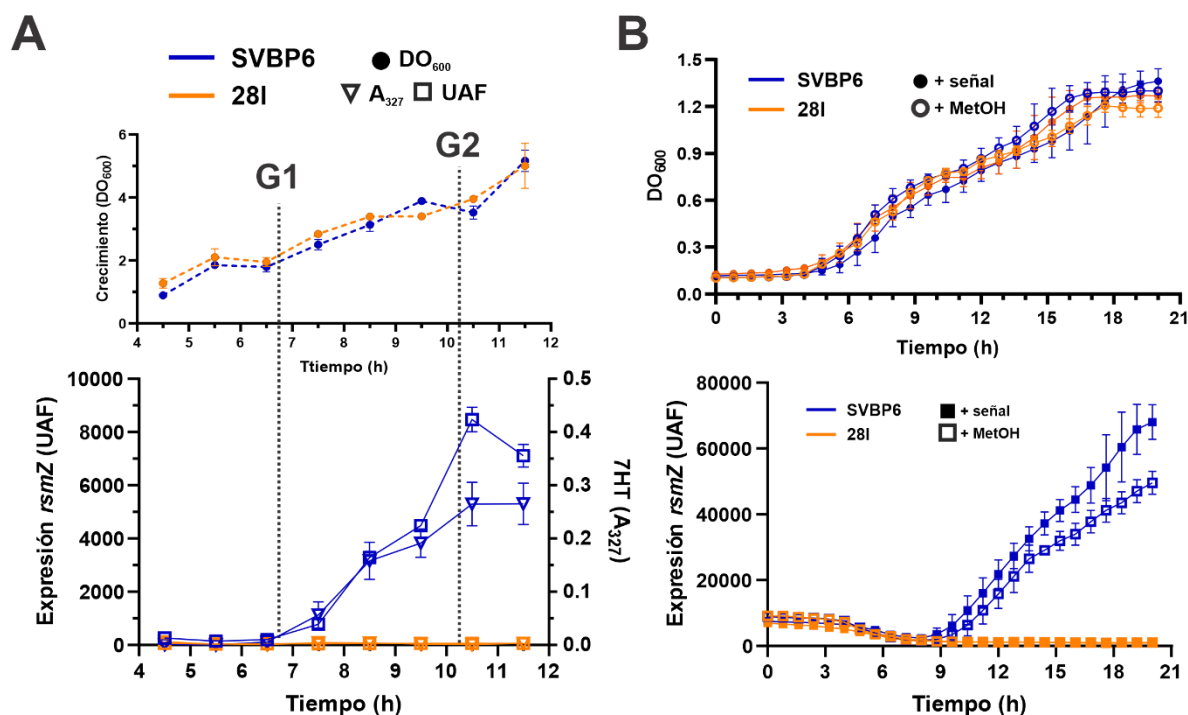


Figura 27: GacS regula la producción de 7HT en *P. donghuensis* SVBP6. A) Cinética de producción de 7HT y de activación del promotor de *rsmZ* en la fusión *P_{rsmZ}-gfp*. SVBP6 y su mutante *gacS::Tn5* fueron crecidos en Erlenmeyer de 125 ml, conteniendo 20 ml de medio KB (n=3), a 28°C y 200 rpm. El crecimiento fue registrado mediante DO₆₀₀ (arriba). La producción de 7HT y la activación de *P_{rsmZ}-gfp* fueron determinadas mediante absorbancia 327 nm (A₃₂₇) e intensidad de fluorescencia (abajo). UAF= Unidades Arbitrarias de Fluorescencia. Los momentos de cultivo en los que se tomaron muestras fueron definidos como G1 y G2, y se encuentran señalizados por líneas punteadas en ambos gráficos. G1 corresponde al momento del cultivo de SVBP6 donde comienza la activación del promotor *rsmZ* por GacS y la biosíntesis de 7HT. G2 al momento de máxima producción de 7HT y mayor activación de la cascada Gac-Rsm. B) El extracto de sobrenadante de cultivo de SVBP6 conteniendo la señal activadora Gac, es capaz de estimular la expresión de la fusión *P_{rsmZ}-gfp*. SVBP6 y su mutante *gacS::Tn5* fueron crecidos en microplacas, con un volumen final de 100 µl de medio KB (n=5), a 28°C y 300 rpm. Los cultivos fueron crecidos en presencia de un extracto proveniente de cultivos saturados de SVBP6 (+señal) o con metanol (+MetOH) como control. Se monitorearon el crecimiento (DO₆₀₀, arriba) y la fluorescencia (UAF, abajo) de los cultivos durante el tiempo ensayado.

proteoma, lo que permitiría obtener evidencias sobre nuevos metabolitos y BGCs relacionados con la producción de antimicrobianos en *Pseudomonas*.

Como primer paso para investigar el vínculo entre GacS y nuevos metabolitos antimicrobianos, se utilizaron parámetros previamente descritos para la biosíntesis de 7HT (Capítulo 1) con el objetivo de establecer las condiciones óptimas de muestreo para el análisis; en paralelo, se monitoreó la actividad de la cascada Gac-Rsm. Para ello, se utilizó una fusión reportera heteróloga del promotor de *rsmZ* de *P. protegens* CHA0 y *gfp* (P_{rsmZ} -*gfp*) (Dubuis *et al.* 2006), ya que todos los elementos necesarios para la activación transcripcional por GacA (Anexo B: Figura B1) se encuentran conservados en la región promotora del alelo *rsmZ* de SVBP6. La expresión exitosa de GFP indicaría que la transducción de señal mediada por el sistema de dos componentes GacS-GacA funciona en SVBP6 de manera similar a otras *Pseudomonas*, y en función del patrón de expresión dependiente de la densidad celular conocido para la fusión P_{rsmZ} -*gfp* de la cepa heteróloga CHA0, se esperaría también una activación de la expresión de *gfp* en SVBP6 de manera dependiente de la densidad celular. En cambio, en el mutante 28I, se esperaría una expresión mínima o basal de la fusión e independiente de la densidad celular, debido a la disfuncionalidad de GacS (Figura 25 A).

Al monitorear la fluorescencia de GFP durante el cultivo de SVBP6 en medio KB (Figura 27 A), se observó que SVBP6 era capaz de activar la expresión de GFP correspondiente a la fusión, como lo indica el aumento de UAF en el cultivo. En contraste, el sobrenadante de 28I no mostró un incremento en la fluorescencia del medio de cultivo, permaneciendo en niveles indistinguibles de línea base durante todo el crecimiento medido. Estas evidencias determinaron que SVBP6 es capaz de activar la expresión de *rsmZ*, mediante el sistema de dos componentes GacS-GacA, a menos que la proteína GacS haya perdido su función como en el caso del mutante *gacS*::Tn5.

Como se menciona en la Introducción de este manuscrito, cultivos de *Pseudomonas* de altas densidades poseen molécula/s extraíble/s, no relacionadas con señales de QS canónicas, capaces de disminuir el umbral de activación de la cascada Gac-Rsm. Se ha sugerido que estas moléculas podrían actuar como señales autoinductoras dentro del sistema regulatorio; sin embargo, su identidad química ha permanecido desconocida hasta hoy en día (Dubuis *et al.* 2006, Latour 2020). Sin embargo, la actividad de estas moléculas puede detectarse en el sobrenadante de los cultivos por su capacidad para activar tempranamente genes dependientes de la cascada Gac-Rsm, como *rsmZ*. En este contexto, se observó que la adición de un extracto de señal proveniente de un cultivo tardío (20 h) a un cultivo fresco de la cepa SVBP6 (Figura 27 B) aumentaba la expresión de P_{rsmZ} -*gfp*. Esto sugiere que SVBP6 es capaz de sintetizar y exportar la señal autoinductora de la cascada Gac-Rsm al medio de cultivo, además de confirmar la presencia de una cascada funcional.

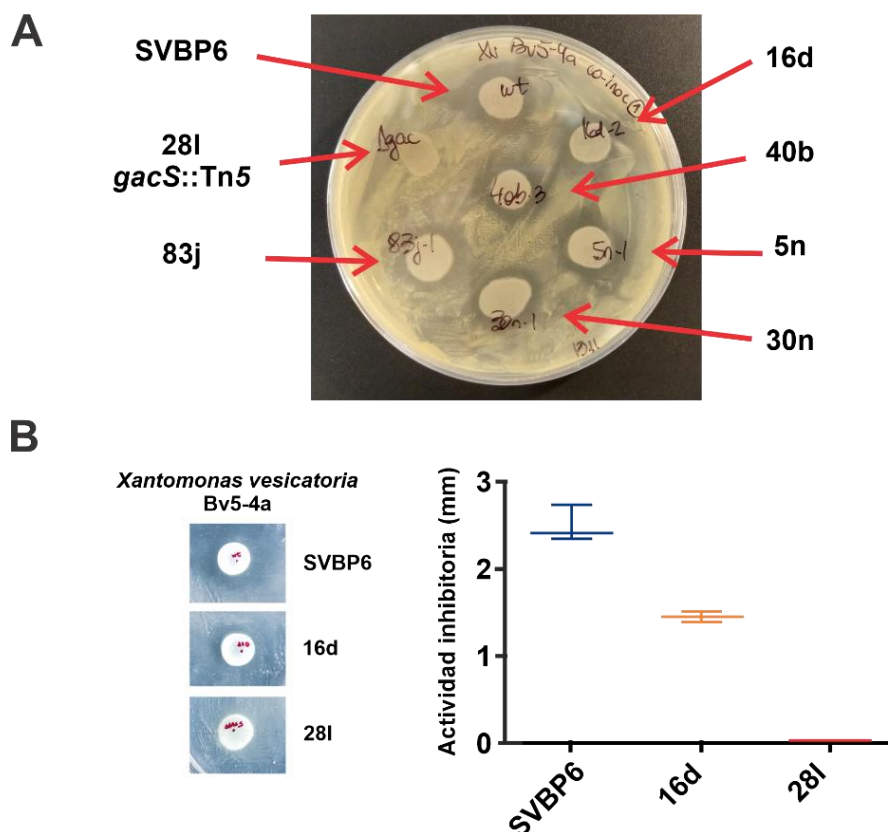


Figura 28: Los mutantes que no producen 7HT son capaces de inhibir el crecimiento de bacterias fitopatógenas. A) Ensayo de antagonismo de los mutantes Tn5 del clúster productor de 7HT en SVBP6 ante *Xanthomonas vesicatoria*. Más detalles acerca de cada mutante en Capítulo 1. Foto del ensayo en medio agarizado NA luego de 48 h a 28°C. B) Cuantificación del antagonismo a *X. vesicatoria* de SVBP6, el mutante de 7HT 16d y el mutante *gacS*::Tn5 28l (n=3). La actividad inhibitoria fue definida como diámetro del halo de transparencia – diámetro de la colonia. Adaptado de Martins y Agaras 2023. (Izquierda) Fotos del ensayo en medio agarizado M9-glucosa. (Derecha) Cuantificación de la actividad expresada como la mediana de los datos y su desvío estándar.

En el capítulo anterior de esta Tesis se identificaron 6 mutantes correspondientes al BGC responsable de la producción de 7HT. Los seis mutantes eran incapaces de antagonizar a *M. phaseolina* (Capítulo 1, Figura 10, Tabla 2), al igual que el mutante 28l (*gacS*::Tn5). Sin embargo, estudios paralelos en nuestro laboratorio demostraron que estos seis mutantes del BGC incapaces de producir 7HT, mantenían su antagonismo frente a bacterias como *Bacillus subtilis* (Capítulo 1, Tabla 2) y *Xanthomonas vesicatoria* (Figura 28), así como frente al hongo *Sclerotinia sclerotiorum* (Martins *et al.* 2023). Estas evidencias sugieren la existencia de otro(s) antimicrobiano(s) que contribuyen al antagonismo de SVBP6, en forma independiente de la biosíntesis de 7HT, dado que el halo de inhibición alrededor de la biomasa de cada mutante defectuoso en 7-HT sería indicativo de la difusión de moléculas secretadas desde las estrías de crecimiento hacia los fitopatógenos. Además, este comportamiento independiente de 7HT también requiere un alelo *gacS* funcional, ya que el mutante *gacS*::Tn5 no mostró antagonismo frente a ninguno de los fitopatógenos ensayados (Martins & Agaras, 2023), lo cual es consistente con el control pleiotrópico ejercido por la cascada Gac-Rsm (Ferreiro & Gallegos, 2021).

En función de evidencias similares que condujeron a la identificación de 7HT como el principal metabolito antifúngico, la posibilidad de que SVBP6 produjera otros metabolitos antimicrobianos resultaba especialmente interesante, dado que la cepa continuaba exhibiendo actividades de antagonismo *in vitro*. Además, no se había identificado en el genoma de SVBP6 ningún otro *cluster* de genes biosintéticos previamente caracterizado en el género *Pseudomonas*, como aquellos determinantes de la producción de DAPG, pioluteorina, o fenazinas (Nowak-Thompson *et al.* 1997, Banger *et al.* 1999, Biessy *et al.* 2018). La dependencia común de la regulación realizada por la cascada Gac-Rsm se presentaba como una herramienta valiosa para la identificación de nuevos BGCs, permitiendo formular hipótesis sobre la producción de otros metabolitos al utilizar como referencia los parámetros ya establecidos para 7HT. Con base en esta información, se decidió buscar evidencia de la identidad de estos metabolitos antimicrobianos y de los factores genéticos involucrados en el genoma de SVBP6, a través de un enfoque multi-ómico que incluyó análisis genómicos, transcriptómicos, proteómicos y metabolómicos.

Bajo la hipótesis de que la biosíntesis de todos los metabolitos antimicrobianos producidos por SVBP6 es activada por la cascada regulatoria Gac-Rsm, y por tanto deberían mostrar un patrón de activación similar, se analizó el perfil de expresión de la fusión P_{rsmZ} -*gfp* (como indicador de la activación de la cascada Gac-Rsm) con relación al perfil de producción de 7HT. Para ello, se monitoreó la expresión de GFP derivada de la fusión P_{rsmZ} -*gfp* y la A327 correspondiente a la presencia de 7HT a lo largo del cultivo de SVBP6 y su mutante isogénico 28I (*gacS*::Tn5). El patrón de expresión de ambos fenotipos fue paralelo en SVBP6, pero fueron indetectables para el mutante *gacS*::Tn5, 28I (Figura 28 A). Esto permitió el establecimiento de dos momentos distintos del cultivo de SVBP6 en medio King's B para la toma de muestras en las distintas aproximaciones ómicas, que reflejaron distintos estados metabólicos y de activación para la biosíntesis de metabolitos regulados por Gac-Rsm (Figura 27 A, marcados con líneas punteadas). El primero, al comenzar la biosíntesis de 7HT y con una baja actividad la cascada Gac-Rsm (**G1**), y el segundo, en el máximo de producción de 7HT y con una alta actividad Gac-Rsm (**G2**). Se implementaron estas referencias para la toma de muestras de cultivos de SVBP6 y de su mutante 28I (G1 y G2 para proteómica y G2 para transcriptómica y metabolómica, ver Figura 26 en Materiales y Métodos) para comparar los transcriptos/proteínas/metabolitos diferenciales entre la cepa silvestre y su mutante. Esto permitió obtener información cuantitativa acerca de la magnitud del impacto de la pérdida de función de la cascada Gac-Rsm en cada caso, e idealmente, poner de manifiesto aquellos factores asociados a la actividad antimicrobiana independiente de 7HT de SVBP6. Asimismo, el análisis multi-ómico permitió corroborar el impacto a distintos niveles del flujo de información biológica entre genotipo y fenotipo.

Impacto transcriptómico global de la pérdida de función de *gacS* en SVBP6.

Para explorar el alcance del control de sobre los niveles de ARNm e identificar BGCs regulados por la cascada Gac-Rsm, se realizó un análisis de RNA-seq para reconocer transcritos cuya abundancia sea dependiente de GacS. Las células de las cepas SVBP6 y 28I mutante fueron muestreadas en la etapa de crecimiento con máxima producción de 7HT y expresión de *rsmZ* (G2), lo que significa una alta actividad de la cascada Gac-Rsm para el cultivo de SVBP6. La cuantificación e identificación de transcriptos por RNA-seq reveló un impacto masivo (Tabla 4, Figura 29 A) causado por la pérdida de función de *gacS*, con la desregulación significativa del 43% de los 5355 ARNm detectados (Anexo B: Tabla B1). Curiosamente, las proporciones de transcriptos sobre-expresados y sub-expresados fueron similares (1822 y 1122, respectivamente).

En primer lugar, se analizaron los cambios en la abundancia de los transcriptos correspondientes a las proteínas que componen el sistema de regulación del cual GacS es parte (Tabla 4). Para el transcripto

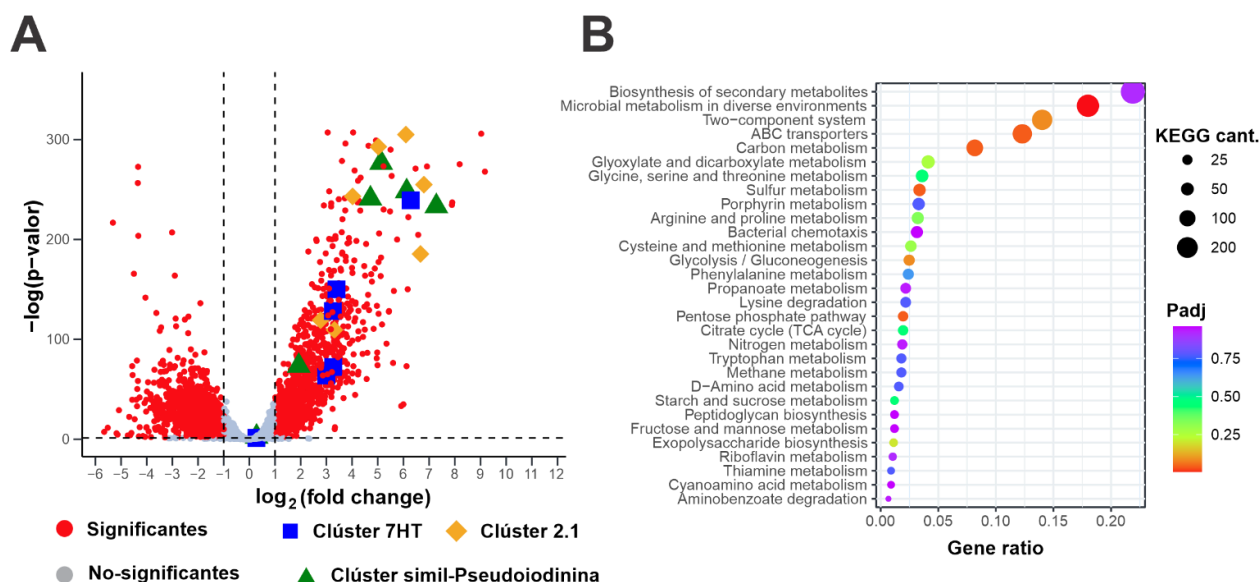


Figura 29: Impacto transcriptómico de la pérdida de función de la proteína GacS en SVBP6. A) *Volcano plot* mostrando la regulación positiva ($\text{Log}_2 \text{fold change} > 1$) o negativa ($\text{Log}_2 \text{fold change} < -1$) de la proteína GacS funcional en células en el estadio de mayor activación Gac-Rsm denominado G2 (ver Figura 27 A), sobre la abundancia de mRNAs de SVBP6. Cada transcripto detectado es indicado con un círculo. Los círculos rojos representan transcriptos significativamente abundantes y diferencialmente regulados por GacS ($\text{Log}_2 \text{fold change} > 1$ o < -1). Los transcriptos correspondientes a genes de interés de BGCs descritos más adelante son resaltados con diferentes símbolos y colores: los cuadrados azules corresponden a genes del BGC de 7HT; los triángulos verdes hacen referencia al BGC de la pseudoiodinina; los diamantes naranjas corresponden a los genes del “clúster 2.1”. B) Esquema de las anotaciones de KEGG más significativamente reguladas por GacS. El tamaño de los puntos hace referencia al número de transcriptos (KEGG cant) y su color al valor de significancia calculado como el valor P ajustado (Padj) de cada categoría KEGG. El eje horizontal cuantifica la abundancia relativa de cada anotación expresada como $\text{gene ratio} = \text{cantidad de transcriptos} / \text{transcriptos totales}$.

gacS, se observó una diferencia no significativa ($\text{Padj} = 0,62$), con una abundancia prácticamente indistinguible (5% mayor) en los cultivos de SVBP6 en comparación con el mutante. Esto es coherente con la naturaleza insercional de la mutación en 281 (*gacS*::Tn5), en la que el transposón determina la expresión de una proteína con secuencia trunca sin interrumpir la formación del transcripto (Figura 25 B). La abundancia de los transcriptos *retS* y *gacA* fue ligeramente mayor en las muestras de SVBP6 (76-88%; Tabla 4). Por otro lado, los ARNm para *RsmA* y *RsmE* se detectaron con una abundancia considerablemente mayor en las muestras de la cepa silvestre (4,5 y 6,6 veces, respectivamente; Tabla 4), mientras que el transcripto *rsmI* mostró una dependencia mucho menor de la funcionalidad de GacS (33% menos abundante en las muestras del cultivo de SVBP6; Tabla 4). La baja abundancia de los ARNm *rsmA/E* observada en el mutante podría explicarse por la mayor disponibilidad de las proteínas *RsmA* y *RsmE* no secuestradas en ausencia de los sRNAs *RsmY/Z*, que entonces podrían ejercer una regulación negativa sobre sus propios ARNm. Este mecanismo de retroalimentación negativa, en conjunto con la disminución en la estabilidad de los ARNm y potenciales alteraciones en la regulación transcripcional, contribuiría a los niveles reducidos de ARNm *rsmA/E* como se ha reportado para otros mutantes *gacA/gacS* en *Pseudomonas* (Reimann *et al.* 2005a, Jean-Pierre *et al.* 2015).

La incapacidad para la transducción de la señal autoinductora en el mutante 28I por parte de GacS/GacA, dada por la mutación sobre *gacS* (Figura 25 B), imposibilita la activación de la expresión de los genes *rsmZ/rsmY* que codifican los ARNp pequeños (ARNp) antagonistas de RsmA/E/I en el mutante (como fue evidenciado con la fusión P_{rsmZ} -*gfp*, Figura 27 A y B). De esta forma, es esperable que las células del mutante 28I no puedan relajar la represión traduccional que las proteínas RsmA/E/I ejerzan sobre un conjunto de mRNAs diana. En este sentido, al comparar las abundancias de los transcritos asociados a actividades ya reportadas bajo el control de Gac-Rsm entre la cepa silvestre y su mutante *gacS* (Tabla 4), se obtuvieron resultados consistentes, en línea con su identificación previa como procesos dependientes de GacS para SVBP6 (Agaras *et al.* 2018). Los ARNm de las subunidades de la sintasa de ácido cianhídrico, la principal proteasa extracelular, la fosfolipasa C extracelular, la quitinasa y una proteína de unión a quitina, mostraron niveles de expresión significativamente más bajos en la cepa mutante *gacS* (Tabla 4).

Particularmente relevante para los objetivos de este trabajo y dado el fenotipo antimicrobiano de SVPB6, la mayor categoría funcional KEGG de transcritos diferencialmente regulados en el mutante *gacS* (Figura 29 B) fue la biosíntesis de metabolitos secundarios o especializados. En esta línea, casi todos los genes del BGC asociados con la producción de 7HT se ubicaron dentro del grupo de los 100 transcritos con mayor dependencia de GacS (Figura 29 A, Figura 33 B, Anexo B: Tabla B1), junto con genes de la vía del ácido fenilacético (PAA), *paaABCDE*, (Anexo B: Tabla B1), cuyos productos de expresión alimentan con PAA a la ruta biosintética de 7HT en *Pseudomonas* (Moffat *et al.* 2024). Entre los transcritos con mayor abundancia diferencial entre las muestras, se encontraron además, conjuntos de ARNm agrupados que codifican funciones predichas posiblemente relacionadas con la biosíntesis de metabolitos especializados no descritos (BGCs “huérfanos”), los cuales serán detallados más adelante en este manuscrito.

Transcriptómica comparativa SVBP6-28I (*gacS*::Tn5)

Datos globales

Momento de activación de cascada Gac-Rsm	Transcriptos detectados	Regulados positivamente Por GacS ¹	Regulados negativamente Por GacS ²
G2	5355	1182	1122

Transcriptos de componentes de la cascada Gac-Rsm

Código PseudoCAP	Anotación	log ₂ -fold change ³	Valor P ajustado ⁴	Función
QYF67_RS20035	<i>gacS</i>	0,07	0,62	Kinasa sensora - percibe la señal autoinductora, se autofosforila y transfiere el fosfato a GacA
QYF67_RS02800	<i>retS</i>	0,91	5,80E-12	Kinasa sensora - en respuesta a señal/es desconocida/s, interactúa con GacS e inhibe su autofosforilación
QYF67_RS12065	<i>gacA</i>	0,82	2,90E-13	Regulador de respuesta; activador transcripcional de <i>rsmY</i> y <i>rsmZ</i>
QYF67_RS07595	<i>rsmA</i>	2,18	1,40E-83	Proteína de unión a ARNm y ARNp Rsm
QYF67_RS15755	<i>rsmE</i>	2,72	9,70E-167	Proteína de unión a ARNm y ARNp Rsm
QYF67_RS19520	<i>rsmI</i>	-0,58	0,01	Proteína de unión ARNm y ARNp Rsm

Transcriptos ligados a actividades Gac-dependientes

Código PseudoCAP	Anotación	log ₂ -fold change ³	Valor P ajustado ⁴	Actividad asociada
QYF67_RS04645	Fosfolipasa C	5,52	8,37E-28	Actividad lipasa extracelular
QYF67_RS07045	Proteína de unión a quitina	10,19	0,00E+00	Actividad quitinasa
QYF67_RS13745	Quitinasa	9,36	0,00E+00	Actividad quitinasa
QYF67_RS26665	Sintasa de HCN	2,25	7,41E-45	Biosíntesis de HCN
QYF67_RS26670	Oxidoreductasa de unión a FAD/NAD(P)	1,60	5,71E-27	Biosíntesis de HCN

Top 10 de transcritos regulados positivamente por GacS

Código PseudoCAP	$\log_2$ -fold change ³	Valor P ajustado ⁴	Función	Referencia
QYF67_RS02005	11,64	0,0E+00	Proteína de la familia de cuerpos de inclusión (pequeña proteína de choque térmico)	(Krajewski <i>et al.</i> 2013)
QYF67_RS07045	10,19	0,0E+00	Proteína de unión a quitina	(Takeuchi <i>et al.</i> 2023)
QYF67_RS16105	9,88	0,0E+00	Proteína con dominio DUF1842 (no caracterizada)	(Scott <i>et al.</i> 2022)
QYF67_RS10045	9,73	0,0E+00	Proteína hipotética (dentro de un locus de profago)	-
QYF67_RS13745	9,36	0,0E+00	Proteína de la familia de glicosil hidrolasas 18 (quitinasa)	(Takeuchi <i>et al.</i> 2023)
QYF67_RS16100	9,19	0,0E+00	Proteína con dominio DUF1842 (no caracterizada)	(Scott <i>et al.</i> 2022)
QYF67_RS18815	9,17	0,0E+00	Metaloproteasa de la familia serralisina (metaloproteasa AprA)	(Sacherer <i>et al.</i> 1994)
QYF67_RS19725	8,36	0,0E+00	Proteína con dominio DUF3050 (probable enzima redox hemo-oxigenasa)	(Mudgal <i>et al.</i> 2015)
QYF67_RS13475	8,30	7,1E-285	Oxidorreductasa GMC	(Cavener 1992)
QYF67_RS22380	8,04	1,6E-278	Proteína hipotética (no caracterizada)	-

¹Número de transcritos con acumulación diferencial estadísticamente significativa, cuyo $\log_2$ (fold change SVBP6/28I) era > 1, indicando una diferencia de al menos el doble de abundancia en muestras de SVBP6 respecto del mutante *gacS*::Tn5.

²Número de transcritos con acumulación diferencial estadísticamente significativa, cuyo $\log_2$ (fold change SVBP6/28I) era < -1, indicando una diferencia de al menos el doble de abundancia en muestras del mutante *gacS*::Tn5 respecto de SVBP6.

³ Valor de $\log_2$ (fold change SVBP6/28I), indicando la magnitud del cambio relativo entre las muestras de SVBP6 y las de su mutante *gacS*::Tn5.

⁴ Valor del estadístico P ajustado por modelos lineales generales, indicando la significancia estadística de la detección del transcritos en el set de datos obtenido.

Tabla 4: Impacto transcriptómico de la pérdida de función de la proteína GacS en SVBP6. Para más detalles, ver Anexo B: Tabla B1

Impacto proteómico global de la pérdida de función de *gacS* en SVBP6.

Un enfoque complementario para identificar BGCs relacionados con la capacidad de producir metabolitos especializados fue el análisis comparativo del proteoma de SVBP6 y su mutante isogénico *gacS*. Para ello, se analizaron extractos de proteínas solubles de las cepas mediante la técnica de cuantificación independiente de etiquetas (LFQ, *label-free quantification*). Se tomaron muestras correspondientes a los puntos G1 y G2 (Figura 27 A) en cultivos de SVBP6 y *gacS::Tn5* (28I). Adicionalmente, se llevaron a cabo cultivos de cada cepa en presencia de hifas del hongo *M. phaseolina*, las cuales se mantuvieron físicamente aisladas de las células bacterianas por una membrana de diálisis con un corte de 5,000 Da para evitar el contacto directo y la contaminación con la mayoría de las proteínas fúngicas, permitiendo así poner en contacto las moléculas de bajo peso molecular secretadas por el hongo con las células de SVBP6 y su mutante 28I, en muestras correspondientes a G2. Este enfoque experimental tenía como objetivo explorar si las moléculas derivadas del crecimiento del hongo podían influir en la regulación proteica de SVBP6, y su dependencia de GacS en el mutante 28I y, en particular, si la presencia de *M. phaseolina* modula la expresión de BGCs. Se verificó la calidad y cantidad de proteínas presentes en los extractos de la fracción soluble obtenida luego de disgregar las células recolectadas en las 4 condiciones experimentales, mediante electroforesis en SDS-PAGE (Anexo B: Figura B2). Para cada muestra por triplicado, se recuperaron porciones del gel conteniendo cantidades equivalentes de proteínas totales sembradas, y se enviaron para su análisis proteómico por LFQ (Ver procedimiento y Figura 26 en Materiales y Métodos).

En los cultivos que contenían únicamente bacterias, se detectaron 1747 polipéptidos en la etapa del cultivo con producción incipiente de 7HT (G1), mientras que se detectaron 1792 polipéptidos en la etapa de máxima producción de 7HT (G2) (Tabla 5, Anexo B: Tabla B2). De estos últimos, un 21% (374) fue afectado por la mutación de *gacS*: 209 fueron regulados positivamente y 165 negativamente por GacS en SVBP6. Además, se detectaron 82 polipéptidos exclusivamente en SVBP6 y otros 42 polipéptidos solo en células de 28I. Respecto a las muestras tomadas en cultivos durante la activación temprana de Gac-Rsm (G1), la falta de una proteína GacS funcional tuvo un impacto significativo en el proteoma, con 6,8% (122) de las proteínas reguladas diferencialmente por GacS. Entre ellas, 84 fueron reguladas positivamente y 38 negativamente por GacS en SVBP6, lo que sugiere que la cascada Gac-Rsm ya está operativa en *P. donghuensis* SVBP6 a densidades celulares relativamente bajas durante el crecimiento activo de las células. Globalmente, se pudo observar que el efecto de GacS sobre los niveles de expresión proteica fue mayormente positivo (Figura 30 A y B), lo cual coincide con las características descritas para este sistema en *Pseudomonas*. El efecto del aumento en la densidad celular sobre la activación del sistema regulatorio fue claro al comparar el aumento del porcentaje de polipéptidos regulados positivamente. Esto coincidiría con el conocimiento previo acerca de cómo la acumulación de una señal por parte de todas las células del cultivo es la que gobierna la concertación de la expresión génica de los metabolitos bajo el control Gac-Rsm (Latour 2020, Ferreiro *et al.* 2021).

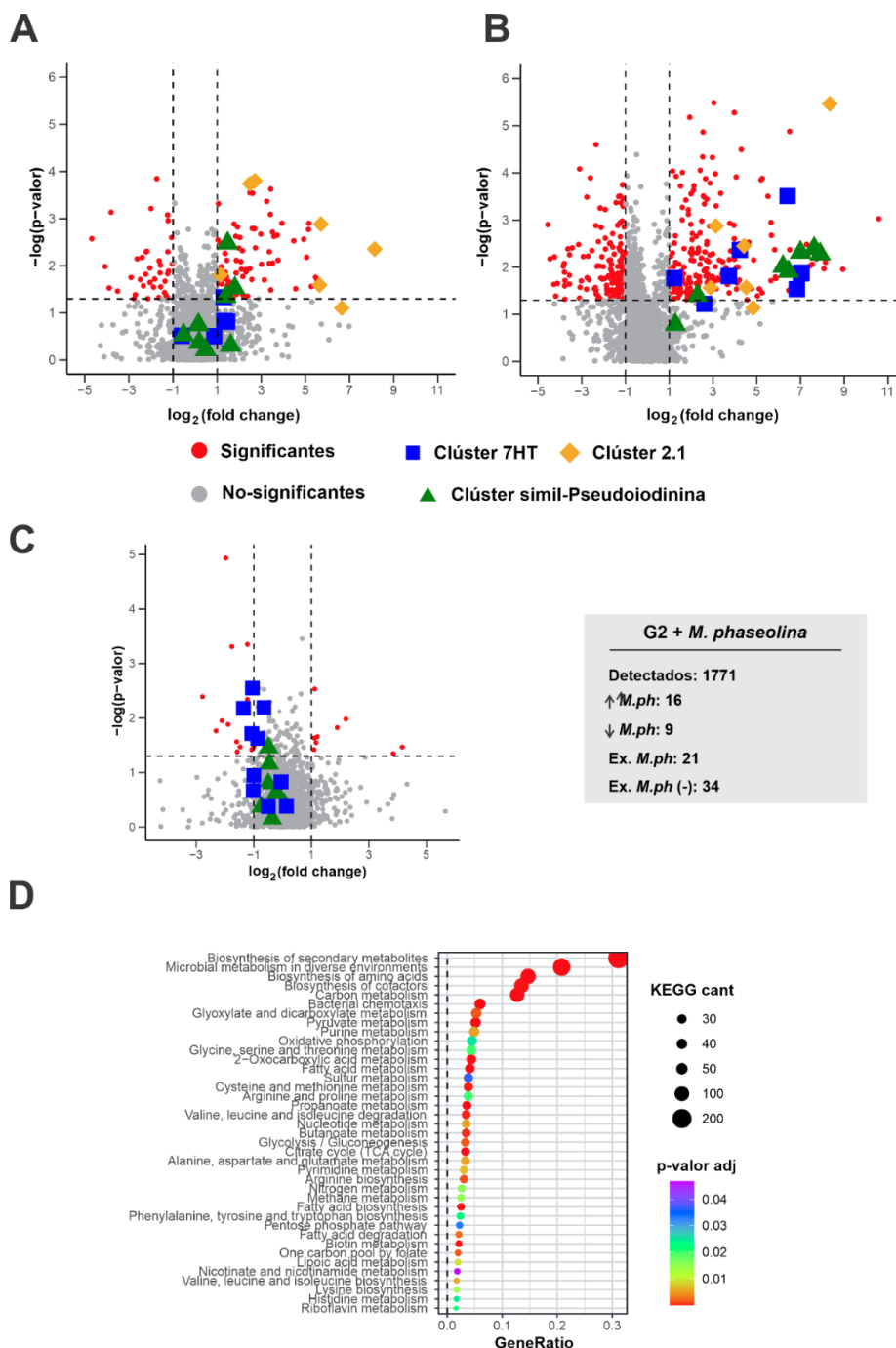


Figura 30: Impacto proteómico de la pérdida de función de la proteína GacS en SVBP6. Ver Figura 27 A para referencias acerca de los elementos de los volcano plots. A) Volcano plot mostrando la regulación positiva o negativa de la proteína GacS funcional en células con producción incipiente de 7HT (G1, ver Figura 27 A), sobre la abundancia de los polipéptidos de SVBP6. B) Volcano plot mostrando la regulación positiva o negativa de la proteína GacS funcional en células en la estadia de mayor activación de la cascada Gac-Rsm (G2, ver Figura 27A), sobre la abundancia de los polipéptidos de SVBP6. C) (izquierda) Volcano plot mostrando la regulación positiva o negativa de la presencia de hifas de *M. phaseolina* en el cultivo de SVBP6. (derecha) Tabla resumen de los datos obtenidos del análisis proteómico, mostrando polipéptidos totales detectados, regulados al alza (flecha apuntando arriba), a la baja (flecha apuntada hacia abajo), así como péptidos exclusivos (Ex.) de cultivos con *M. phaseolina* (*M. ph.*) y sin *M. phaseolina* (*M. ph.* (-)). D) Esquema de las anotaciones de KEGG más significativamente reguladas por GacS. Referencias en Figura 29 B.

De igual manera que para los resultados de la evaluación transcriptómica, el análisis comparativo de la abundancia de polipéptidos que son parte del sistema Gac-Rsm, o que son blanco del mismo, ayudó en la validación del estado regulatorio de las células al momento de la toma de muestras. GacS se detectó con muy baja confianza en todas las muestras, con solo dos péptidos identificados y con abundancia variable entre réplicas. Esto podría deberse a que GacS es una proteína incrustada en la membrana, y las muestras utilizadas de extractos proteicos estaban relativamente empobrecidos en proteínas integrales, por el procedimiento de fraccionamiento celular utilizado (Ver Materiales y Métodos, Figura 26). En contraste, la abundancia del polipéptido GacA se vio solo marginalmente afectado por la pérdida de función de GacS, en línea con lo observado a nivel de ARNm. En función del impacto global de la mutación de GacS, lo observado sugiere que, aunque la abundancia de GacA no se vea mayormente afectada, su funcionalidad debería estar comprometida en este contexto, ya que su fosforilación (un paso crítico en la cascada de señalización), no sería posible en el mutante *gacS::Tn5* (Figura 24). Respecto de las proteínas de unión a ARNm y ARNp de la familia Rsm (RsmA, RsmE o RsmI), resultó llamativo no detectar péptidos trípticos en las muestras de ambas cepas.

Nuevamente, los datos de abundancia comparados derivados del análisis LFQ de las muestras en G2 fueron consistentes con los fenotipos dependientes de GacS reportados para la cepa SVBP6, como en los casos de los polipéptidos de las subunidades de la sintasa de ácido cianhídrico, la proteasa extracelular, la fosfolipasa extracelular y la quitinasa (Tabla 5). En relación con el BGC responsable de la producción de 7HT, y en línea con hallazgos previos, todos los polipéptidos detectados del BGC de 7HT fueron regulados positivamente y de manera muy significativa por GacS (Figura 30 A y B, Figura 33 B).

De igual manera que en el análisis transcriptómico comparativo, la "biosíntesis de metabolitos secundarios" (Figura 30 D) fue la categoría funcional KEGG más afectada de proteínas diferencialmente expresadas en la cepa SVBP6 en ausencia de una proteína GacS intacta. Además del BGC de 7HT, los polipéptidos de los mismos BGCs huérfanos identificados como controlados positivamente por GacS a nivel de abundancia de ARNm también fueron detectados por LFQ como fuertemente activados por GacS (detallados más adelante). Aparte de los genes y operones previamente conocidos por estar bajo control de Gac-Rsm en *P. donghuensis* SVBP6 (Agaras *et al.* 2018), y además de los BGCs huérfanos identificados mediante RNA-seq comparativo y LFQ (Anexo B: Tabla B1 y Tabla B2), varios otros procesos parecen estar controlados positivamente por GacS, incluyendo el sistema de secreción tipo VI, la formación de cuerpos de inclusión, sistemas de transducción de señales, el metabolismo del glucógeno, el transporte y catabolismo de taurina, el catabolismo de espermidina y la resistencia al estrés oxidativo (Tabla 5, Anexo B: Tabla B2). Sin embargo, se requiere evidencia experimental adicional para confirmar el control de Gac-Rsm sobre estos procesos en la cepa SVBP6.

En cuanto a las muestras que contenían moléculas derivadas del crecimiento de *M. phaseolina*, el efecto observado de la adición del hongo sobre la expresión proteica fue leve (Figura 30 B). A pesar de haberse detectado un total de 1771 proteínas, solo 37 polipéptidos estuvieron presentes exclusivamente o fueron regulados positivamente en presencia del hongo, mientras que 43 estuvieron presentes exclusivamente o fueron regulados al alza en ausencia de *M. phaseolina*. Estos resultados sugieren que, bajo las condiciones probadas, la respuesta proteómica de SVBP6 a la presencia de *M. phaseolina* fue limitada. Sin embargo, entre los polipéptidos regulados al alza por el hongo, se detectaron algunos productos del BGC de 7HT, lo que indicaría que existiría una respuesta específica, aunque de intensidad reducida, a la presencia del hongo por parte de actividades ligadas al antagonismo de la cepa.

Aunque se espera que el efecto regulatorio primario y directo de la pérdida de función de la cascada Gac-Rsm sobre la expresión de los genes detectados diferencialmente ocurra a nivel traduccional (Figura 25 A), los resultados obtenidos sugieren que podrían producirse efectos secundarios y/o indirectos en los ARNm controlados por Gac-Rsm. Una explicación posible podría ser que los transcriptos pierdan estabilidad al ser bloqueados para su traducción por la unión a las proteínas de la familia RsmA y la imposibilidad de relajar esa represión por parte de los ARNp RsmY/Z (Figura 25 A). Los ARNm pueden volverse más susceptibles a la degradación si no están protegidos por ribosomas en traducción (Deana *et al.* 2005). Por lo tanto, los cambios en los niveles de ARNm en el mutante *gacS* pueden reflejar no solo el impacto directo de la pérdida de activación traduccional cuando los ARNp RsmY/Z titulan las proteínas

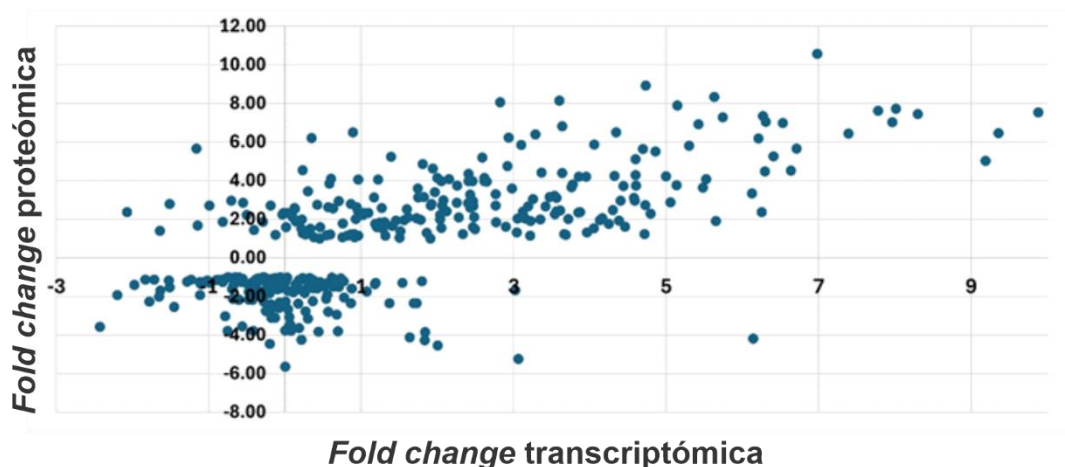


Figura 31: Correlación entre la magnitud de regulación ejercida por GacS sobre cada ARNm y su correspondiente polipéptido detectados. El eje vertical representa el cambio en el $\log_2$ de la abundancia de los polipéptidos significativamente regulados por GacS. El eje horizontal representa el cambio en el $\log_2$ de la abundancia de ARNm significativamente regulados por GacS. Muestras tomadas en estadio G2 (Ver Figura 27 A).

RsmA/E/I, sino también impactos colaterales debido a la menor estabilidad de los ARNm no traducidos. En este sentido, la abundancia de polipéptidos controlados positiva o negativamente por GacS se correlacionó en la mayoría de los casos (72%) con el nivel celular de sus correspondientes ARNm (Figura 31), observando un mayor impacto en la abundancia individual de los ARNm al contrastar con su producto proteico. Por otra parte, los niveles alterados de ARNm podrían ser consecuencia indirecta del control de Gac-Rsm sobre la expresión de un factor transcripcional específico. En este sentido, se ha reportado que la expresión de los genes de reguladores transcripcionales del BGC de orfamidas en *P. protegens* CHA0 (*orf1* y *orf2*) es un blanco directo de la cascada Gac-Rsm (Sobrero *et al.* 2017). De esta forma, Gac-Rsm termina controlando la expresión del BGC para orfamida, en forma indirecta, a través del control directo sobre los reguladores transcripcionales. Ejemplos como este podrían explicar que la pérdida de función de Gac-Rsm afecta negativamente no solo la traducción y la estabilidad de los ARNm asociados, sino también su síntesis (transcripción). De hecho, identificamos 107 ARNm que codifican reguladores transcripcionales (Anexo B: Tabla B1) como genes con expresión controlada por GacS, lo que indicaría que el impacto de GacS se extiende mucho más allá de la capa post-transcripcional de la regulación génica.

Proteómica comparativa SVBP6-28I (*gacS*::Tn5)

Datos globales

Momento de activación Gac	Polipéptidos detectados	Regulados positivamente por GacS ¹	Regulados negativamente por GacS ²	Exclusivos de SVBP6 ³	Exclusivos de 28I ⁴
G1	1747	84	38	74	58
G2	1792	209	165	82	42

Polipéptidos de componentes de la cascada Gac-Rsm

Código PseudoCAP	Nombre	log2-fold change ⁵	P-valor ajustado ⁶	Función
QYF67_RS12065	<i>gacA</i>	1,15	4,70E-2	Regulador de respuesta; activador transcripcional de <i>rsmY</i> y <i>rsmZ</i>

Polipéptidos ligados a actividades Gac-dependientes

Código PseudoCAP	Nombre	log2-fold change ⁵	P-valor ajustado ⁶	Actividad asociada
QYF67_RS04645	Fosfolipasa C	4,07	1,53	Actividad lipasa extracelular
QYF67_RS07045	Proteína de unión a quitina	4,16	1,01	Actividad quitinasa
QYF67_RS13745	Quitinasa	6,46	1,51	Actividad quitinasa
QYF67_RS26665	Sintasa de HCN	2,86	3,78	Biosíntesis de HCN
QYF67_RS26670	Oxidoreductasa de unión a FAD/NAD(P)	2,53	4,34	Biosíntesis de HCN

Top 10 de polipéptidos regulados positivamente por GacS

Código PseudoCAP	log2-fold change ⁵	P-valor ajustado ⁶	Función	Referencia
QYF67_RS16400	10,58	9,40E-04	Metiltransferasa dependiente de SAM de clase I (BGC de pseudoiodinina)	(Yang et al., 2023)

QYF67_RS14200	8,94	1,10E-02	Proteína con dominio DUF3313 (no caracterizada)	-
QYF67_RS19700	8,34	3,40E-06	Aspartato aminotransferasa clase III (BGC huérfano 1)	-
QYF67_RS13945	8,14	7,90E-03	Proteína de función desconocida DUF917 (BGC huérfano 3)	-
QYF67_RS14740	8,07	1,10E-02	Proteína de unión al sustrato del transportador ABC, tipo MppA	(Park <i>et al.</i> 1998)
QYF67_RS16415	7,90	5,30E-03	Enzima no hemo de la familia SUMF1/EgtB/PvdO (BGC de pseudoiodinina)	(Yang <i>et al.</i> 2023)
QYF67_RS02000	7,73	6,70E-03	Proteína de la familia de cuerpos de inclusión (pequeña proteína de choque térmico)	(Krajewski <i>et al.</i> 2013)
QYF67_RS16425	7,62	4,00E-03	Metiltransferasa (BGC de pseudoiodinina)	(Yang <i>et al.</i> 2023)
QYF67_RS16105	7,54	8,60E-03	Proteína con dominio DUF1842 (no caracterizada)	(Scott <i>et al.</i> 2022)
QYF67_RS13475	7,45	9,30E-03	Oxidorreductasa GMC	(Cavener 1992)

¹Número de polipéptidos con acumulación diferencial estadísticamente significativa, cuyo $\log_2$ (*fold change* SVBP6/28I) era > 1, indicando una diferencia de al menos el doble de abundancia en muestras de SVBP6 respecto del mutante *gacS::Tn5*.

² Número de polipéptidos con acumulación diferencial estadísticamente significativa, cuyo $\log_2$ (*fold change* SVBP6/28I) era < -1, indicando una diferencia de al menos el doble de abundancia en muestras del mutante *gacS::Tn5* respecto de SVBP6.

³ Número de polipéptidos detectados son significancia estadística sólo en muestras de SVBP6.

⁴ Número de polipéptidos detectados son significancia estadística sólo en muestras de mutante *gacS::Tn5*.

⁵ Valor de $\log_2$ (*fold change* SVBP6/28I), indicando la magnitud del cambio relativo entre las muestras de SVBP6 y las de su mutante *gacS::Tn5*.

⁶ Valor del estadístico P calculado por test de t, indicando la significancia estadística de la detección del polipéptido en el set de datos obtenido.

Tabla 5: Impacto proteómico de la pérdida de función de la proteína GacS en SVBP6. Para más detalles, ver Anexo B: Tabla B2.

Impacto metabolómico de la pérdida de función de *gacS* en SVBP6.

A pesar de la información aportada por el antagonismo difusible de SVBP6 contra bacterias (Figura 28) y la identificación de las enzimas biosintéticas de los posibles BGCs dependientes de GacS (detallados más adelante en esta sección), no se disponía de evidencia sobre la identidad química de metabolitos antimicrobianos diferentes de 7HT producidos por la cepa. Por lo tanto, se escogió por una aproximación metabolómica no dirigida, con la finalidad de explorar el conjunto de moléculas diferencialmente producidas entre SVBP6 y su mutante 28I. La metabolómica es el estudio de los perfiles de pequeñas moléculas derivadas del metabolismo celular que pueden reflejar directamente el resultado de redes complejas de reacciones bioquímicas, proporcionando así información sobre múltiples aspectos de la fisiología celular (Liu *et al.* 2017). De esta forma, la obtención de los perfiles moleculares de SVBP6 y 28I

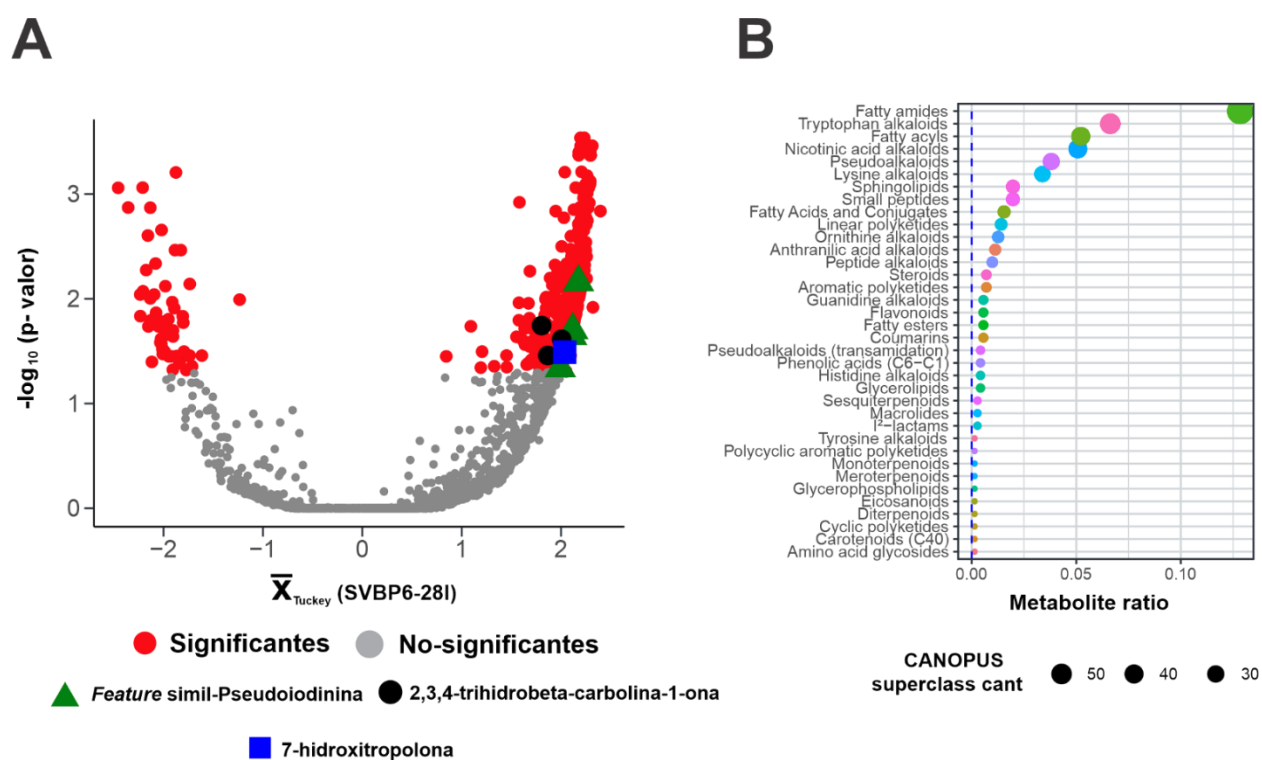


Figura 32: Impacto metabolómico de la pérdida de función de la proteína GacS en SVBP6. A) *Volcano plot* mostrando la regulación positiva o negativa de la proteína GacS funcional en células en el estadio de mayor activación de la cascada Gac-Rsm (G2, ver Figura 27 A), sobre la abundancia de las *features* moleculares detectadas para SVBP6. Las *features* detectadas se representan con círculos, siendo los rojos aquellos con un p-valor < 0,05 y una diferencia entre los promedios, obtenidos a partir del test de Tukey, de las muestras de SVBP6 y 28I mayor a 1 o menor a -1. Las *features* moleculares correspondientes a redes de interés descritas más adelante son resaltadas con diferentes símbolos y colores: El cuadrado azul corresponde a la 7HT, los círculos negros a nodos de la red de las β -carbolinas y los triángulos verdes representan nodos de la red correspondiente a la pseudoiodinina. B) Esquema de las anotaciones de CANOPUS (predicciones de SIRIUS) más significativamente reguladas por GacS. El tamaño de los círculos refiere a la cantidad de *features* correspondientes a cada categoría (CANOPUS *superclass* cant). El eje horizontal representa la proporción de cada categoría con el total de metabolitos detectados (*Metabolite ratio*, *features/features* totales).

podría arrojar luz sobre la diversidad de moléculas presentes en el sobrenadante de SVBP6, dónde podría explorarse la búsqueda de metabolitos antimicrobianos.

En este contexto, se extrajeron sobrenadantes libres de células SVBP6 y su mutante *gacS*::Tn5 a partir de cultivos recolectados en el pico de producción de 7HT (G2). También se incluyeron muestras crecidas en presencia de micelio de *M. phaseolina*, cómo se detalló anteriormente. Se utilizó acetato de etilo como solvente, ya que, al ser ligeramente menos polar que el agua, es capaz de extraer una amplia variedad de moléculas del sobrenadante (Albarracín Orio *et al.* 2020, Pinto-Almeida *et al.* 2021), incluyendo la 7HT (Muzio *et al.* 2020), que sirvió como control positivo interno y complementó los resultados obtenidos en los enfoques ómicos previamente descriptos. Los extractos fueron concentrados e inyectados en un sistema UHPLC-MS/MS, seguido de un análisis por armado de redes moleculares basado en características (FBMN, *feature-based molecular networking*, red total en Anexo B: Figura B3). Las redes se componen de nodos que representan *features* moleculares correspondientes a diferentes moléculas de la muestra analizada. Estas *features* integran los parámetros obtenidos para cada compuesto, definiéndose 3 dimensiones de datos: 1) Altura de pico y tiempo de retención de HPLC; 2) Espectros de masa de primer orden (MS₁); 3) Espectro de masa de segundo orden (MS₂). La integración de todos estos datos, tras el procesamiento de datos hecho por MZmine 3 (Schmid *et al.* 2023), da lugar a *features* moleculares representadas como nodos en una red, los cuales están conectados según un puntaje de similitud (conocido como *cosine score*, Nothias *et al.* (2020a)) obtenido mediante la comparación de espectros de masa, que es directamente proporcional a la masa del compuesto original. Este enfoque permite identificar visualmente familias de compuestos relacionados químicamente, lo cual es particularmente útil dado que las bibliotecas de espectros de masa aún están incompletas (Wang *et al.* 2016a). Sin embargo, la cantidad de coincidencias con bibliotecas de compuestos (llamadas *library matches*) fue baja, por lo que fue de particular relevancia realizar predicciones *in silico de novo*, cuando fue posible, utilizando el software SIRIUS (Dührkop *et al.* 2019). Aunque las identidades obtenidas mediante este método carecen de la robustez informativa de los *library matches*, son útiles para guiar la exploración de las redes, especialmente cuando se cuenta con información complementaria de otras aproximaciones ómicas, lo que refuerza la solidez de los resultados.

Así, se observó que el impacto metabolómico de la mutación en *gacS* fue claramente negativo para la abundancia de la mayoría de los metabolitos (Tabla 6, Figura 32 A). Se detectaron un total de 2044 *features* moleculares en ambos tipos de muestras, de las cuales casi el 50% (1019) tuvieron abundancias por encima del límite de detección exclusivamente en las muestras de la cepa silvestre. Entre las características detectadas tanto en SVBP6 como en el mutante *gacS*, 288 fueron reguladas positivamente y 51 fueron reguladas negativamente por GacS. Esto coincide nuevamente con la naturaleza pleiotrópica de la cascada regulatoria, donde la expresión, como se observó en los análisis transcriptómicos (Tabla 4) y proteómicos (Tabla 5), dependía en gran medida de la presencia de GacS funcional. Dado el amplio abanico de actividades asociadas con el metabolismo secundario de *Pseudomonas* (Lapouge *et al.* 2008), era esperable encontrar una gran huella metabolómica, siendo los metabolitos asociados a un organismo uno de los últimos reflejos de la expresión de sus genes, en este caso como consecuencia de la disrupción del control ejercido por GacS (y la cascada Gac-Rsm en conjunto).

Asimismo, era esperable que, de existir tal impacto, este tuviera una visible influencia, particularmente en los metabolitos asociados a actividades antimicrobianas, dado que el sistema regulatorio afecta de manera significativa el antagonismo de otras cepas de *Pseudomonas*, como *P. protegens* CHA0, *P. brassicacearum* NFM421, *P. chlororaphis* O6 y *P. fluorescens* F11, entre otras (Laville *et al.* 1992, Aarons *et al.* 2000, Lalaouna *et al.* 2012, Anderson *et al.* 2017, Ferreira *et al.* 2021). En primer lugar, respecto a la identidad de las moléculas de abundancia diferencial, la mayoría de las características espectrales

coincidieron con familias moleculares de amidas de ácidos grasos, de ácidos grasos y de alcaloides (Figura 32 B). Esto también se reflejó en la lista de las 10 *features* espectrales principales reguladas positivamente por GacS, que contaban con una predicción molecular *in silico* disponible (Tabla 6). Para al menos dos de ellas, la N-ciclopropilicosa-5,8,11,14-tetraenamida y la N-fenil-hexadecanamida, existen reportes sobre su actividad antimicrobiana (Farshori *et al.* 2011, Desbois *et al.* 2013, Liu *et al.* 2016).

Asimismo, se corroboró la presencia de 7-hidroxitropolona, detectando un nodo singular (*singleton*) cuya predicción de SIRIUS reveló su identidad como 3-hidroxitropolona, el tautómero de 7HT (Kubo *et al.* (2007), Figura 33 A). Este nodo presentaba una diferencia de abundancia significativa entre las muestras de SVBP6 y 28I (Figura 33 B), lo que sugiere nuevamente que su acumulación en el medio extracelular depende de la presencia de la proteína GacS funcional. Sin embargo, resultó llamativo que la 7HT apareciera como un nodo singular, dado que se esperaba encontrar una familia de compuestos asociados, derivados de su inestabilidad química en solución (Capítulo 1, Figura 20 C). Tampoco se detectaron en los sobrenadantes moléculas precursoras (Capítulo 1, Figura 24), lo que sería consistente con la presencia de transportadores específicos para 7HT codificados en el BGC correspondiente del genoma de SVBP6 (Capítulo 1, Tabla 2).

Finalmente, se detectaron diversas redes de metabolitos (familias químicas) con actividad antimicrobiana reportada en otras bacterias, cuya abundancia mostró ser dependiente de GacS. A continuación, se detallan estos resultados, integrando los resultados de aproximaciones previas.

Metabolómica comparativa SVBP6-28I (*gacS*::Tn5)

Datos globales

Momento de activación Gac	<i>Features</i> detectadas	Reguladas positivamente Por GacS ¹	Reguladas negativamente Por GacS ²	Exclusivas de SVBP6 ³	Exclusivas de 28I ⁴
G2	2044	288	51	1019	0

Top 10 de *features* moleculares reguladas positivamente por GacS

Código de <i>feature</i>	Diferencia de promedio escalada ⁵	P-valor ajustado ⁶	Predicción <i>in silico</i> por SIRIUS	Código SMILES (SIRIUS)
9920	2,32	1,21E-02	Hexadecanamida	CCCCCCCCCCCCCCCC(=O)N
15007	2,30	4,27E-04	2-aminoacetato de tridecilo	CCCCCCCCCCCCCOC(=O)CN
16279	2,29	8,03E-04	N-(4-dodecilfenil)-3-oxobutanamida	CCCCCCCCCCCCC1=C(C=C(C1)NC(=O)CC(=O)C

16381	2,27	8,69E-04	N-(2,3,4,6,7,8,9a-octahidro-1H-quinolizin-1-ilmetil)-4-(1-propan-2-ilindol-3-il)butanamida	<chem>CC(C)N1C=C(C2=CC=CC=C21)CCCC(=O)NC3CCCN4C3CCCC4</chem>
7848	2,26	3,96E-03	Ácido 2-(2-feniletilamino)benzoico (ácido enfenámico)	<chem>C1=CC=C(C=C1)CCNC2=CC=CC=C2C(=O)O</chem>
16727	2,25	1,95E-03	N-ciclopropilicosa-5,8,11,14-tetraenamida	<chem>CCCCC=CCC=CCC=C</chem> <chem>CC=CCCCC(=O)NC1CC1</chem>
15376	2,25	2,89E-03	1-morfolin-4-iltridecan-1-ona	<chem>CCCCCCCCCCCCC(=O)N1CCOCC1</chem>
10725	2,24	3,96E-03	N-[7-[1-(ciclopropilamino)-1-oxopropan-2-il]-8-hidroxi-1,4a-dimetil-2,3,4,5,6,7,8,8a-octahidro-1H-naftalen-2-il]ciclopropanocarboxamida	<chem>CC1C(CCC2(C1C(C(C2)C(C)C(=O)NC3CC3)O)C)NC(=O)C4CC4</chem>
382	2,24	3,43E-03	2-(4-oxobutil)-guanidina	<chem>C(CC=O)CN=C(N)N</chem>
10461	2,23	3,36E-03	N-fenil-hexadecanamida	<chem>CCCCCCCCCCCCCCCC(=O)NC1=CC=CC=C1</chem>

¹Número de *features* detectados con significancia estadística, cuya diferencia de medias calculada por el test *post hoc* de Tukey's era > 0, indicando una abundancia mayor en muestras de SVBP6 respecto del mutante *gacS::Tn5*.

² Número de *features* moleculares con acumulación diferencial estadísticamente significativa, cuya diferencia de medias calculadas sobre los valores de abundancia por el test *post hoc* de Tukey's era < 0, indicando una abundancia mayor en muestras del mutante *gacS::Tn5* respecto de SVBP6.

³ Número de *features* moleculares detectadas con significancia estadística sólo en muestras de SVBP6.

⁴ Número de *features* moleculares detectadas con significancia estadística sólo en muestras del mutante *gacS::Tn5*.

⁵ Valor de la diferencia de medias (SVBP6-28I), calculada por el test *post hoc* de Tukey's.

⁶ Valor del estadístico P (ANOVA), indicando la significancia estadística de la detección de la *feature* en el set de datos obtenido.

Tabla 6: Impacto metabolómico de la pérdida de función de la proteína GacS en SVBP6. Para más detalles, ver Anexo B: Tabla B3.

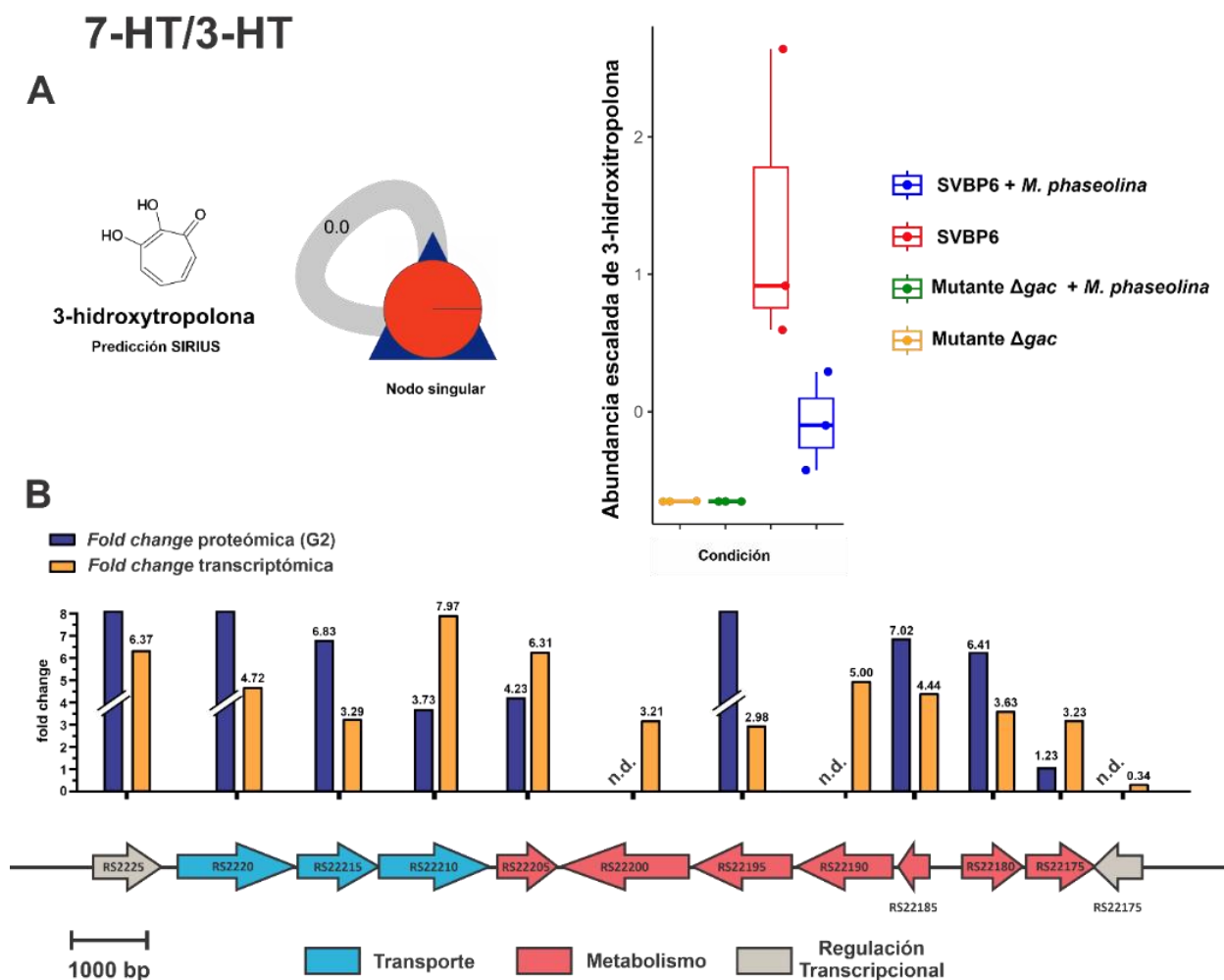


Figura 33: Control de GacS sobre la producción de 7HT y la expresión de su BGC. A) (izquierda) Red molecular identificada como 7HT, mostrada como un único nodo (*singleton*, nodo singular), junto con su correspondiente estructura molecular de 3-HT predicha por SIRIUS, la forma tautomérica de 7HT (Isin y Karakus, 2010). Más detalles sobre las redes moleculares en Figura 34. (derecha) Gráfico de diagrama de cajas, mostrando los valores de abundancia escalados de muestras triplicadas y sus valores promedio correspondientes para las diferentes muestras biológicas analizadas. La caja central de cada *boxplot* representa el rango intercuartil, que abarca desde el primer cuartil (límite inferior de la caja), determinado a partir de los datos, hasta el tercer cuartil (límite superior de la caja). La línea dentro de cada caja indica la mediana del conjunto de datos. Las barras por encima y debajo de las cajas corresponden a los valores máximos y mínimos que no se considerarían *outliers*. B) Grupo de genes biosintéticos para la producción de 7HT y las magnitudes de regulación GacS sobre los transcritos y polipéptidos correspondientes, derivadas de la comparación entre muestras de SVBP6 y 28I. Las barras naranjas corresponden a los valores promedio de cambio ($\log_2$ fold change) de cada gen detectado por RNAseq, mientras que las barras azules corresponden a los valores promedio de cambio ($\log_2$ fold change) de cada gen detectado como polipéptido por LFQ, para SVBP6 en relación a las células del mutante *gacS*::Tn5 en cultivos muestreados en el pico de producción de 7HT (G2, ver Figura 27). Las barras discontinuas representan polipéptidos que se detectaron solo en muestras de la cepa silvestre SVBP6. “n.d.” denota transcritos o polipéptidos que no fueron detectados. Las anotaciones de genes corresponden a los *locus tag* del genoma completo de la cepa SVBP6 en la base de datos PseudoCAP (<https://pseudomonas.com/strain/show?id=23564>).

GacS controla la expresión de BGCs novedosos y la abundancia de sus correspondientes metabolitos especializados en SVBP6.

Como primer caso, entre las redes moleculares con *features* significativamente enriquecidas en los sobrenadantes de la cepa silvestre SVBP6 en comparación con los del mutante *gacS::Tn5*, se identificó una familia espectral relacionada con la pseudoiodinina (Figura 34 A y B). La pseudoiodinina es un compuesto con actividad antimicrobiana de la familia de las pirazolotriazinas (Kelly *et al.* 2006, Yang *et al.* 2023), cuya producción ha sido reportada en diferentes aislados de *Pseudomonas* con taxonomía incierta (Smirnov *et al.* 1997). Recientemente, se describió su BGC y su expresión dependiente de Gac-Rsm en el aislamiento *P. mosselii* 923 (Yang *et al.* 2023). En el genoma de la cepa SVBP6, se identificó por homología de secuencias un BGC similar así como los genes reguladores y de transporte asociados, localizados entre las posiciones 3,511,808 y 3,521,606, organizado en 9 ORFs (Figura 34 B). De hecho, la expresión de estos genes biosintéticos había sido detectada tanto a nivel transcriptómico como proteómico como fuertemente regulada al alza por GacS (Figura 34 B, Anexo B: Tabla B1 y B2). Además, se observó que el BGC de SVBP6 carece de un gen presente en *P. mosselii* 923 (MXB02_RS10650 en PseudoCAP), que codificaría una enzima biosintética (RibD) con actividad predicha de deaminasa/reductasa bifuncional. Esto sugiere la posible producción de una molécula relacionada con la pseudoiodinina en SVBP6, pero distinta de la reportada en 923. Llamativamente, se determinó que este *cluster* destacado en los resultados de transcriptómica y proteómica correspondía al *cluster* asignado a la toxoflavina, predicho por la herramienta antiSMASH en Agarar *et al.* (2018). Esta coincidencia tiene sentido al comparar la estructura de la pseudoiodinina detectada (Figura 34 A) y la estructura de la toxoflavina (Introducción General, Figura 3). Dada la similitud estructural en las moléculas, resulta esperable que la herramienta fuese incapaz de discernir entre los genes biosintéticos de ambas, particularmente debido a la reciente descripción de su biosíntesis en *Pseudomonas*. El conjunto de estos resultados indicó que la cepa *P. donghuensis* SVBP6 produce pseudoiodinina o un metabolito estrechamente relacionado como parte de su arsenal antimicrobiano bajo el control positivo de la cascada Gac-Rsm.

Adicionalmente, se detectó una red molecular destacada por estar significativamente enriquecida en el sobrenadante de SVBP6. Esta red de *features* moleculares poseía un *library match* con la molécula 2,3,4-trihidro- β -carbolina-1-ona en uno de sus nodos (Figura 35). Este compuesto pertenece al grupo de alcaloides bioactivos de la familia de la β -carbolina, mayoritariamente de origen vegetal o de invertebrados marinos (Cao *et al.* 2007). La producción de β -carbolinas es relativamente rara en procariotas (Chen *et al.* 2018b), pero se ha informado en algunos aislamientos de *Pseudomonas*. Por ejemplo, la cepa Y5 de *P. koreensis* y la cepa UJ6 de *Pseudomonas sp.* (estrechamente relacionada con las especies *P. reactans* y *P. azotoformans*) producen 1-acetil-9H- β -carbolina-3-carboxílico y 1-acetil- β -carbolina, respectivamente, ambos con actividad antibacteriana (Lee *et al.* 2013, Kaur *et al.* 2019). Sin embargo, la ruta biosintética de β -carbolinas ha sido poco caracterizada en bacterias. Datos de aislados de actinobacterias marinas indicaron que el triptófano fue un precursor directo y que las primeras etapas de la biosíntesis del esqueleto β -carbolina fueron catalizadas por enzimas de tipo Pictet-Spenglerasa (Koketsu *et al.* 2010). Curiosamente, una de estas actividades enzimáticas caracterizadas se basa en el

Pseudoiodinina

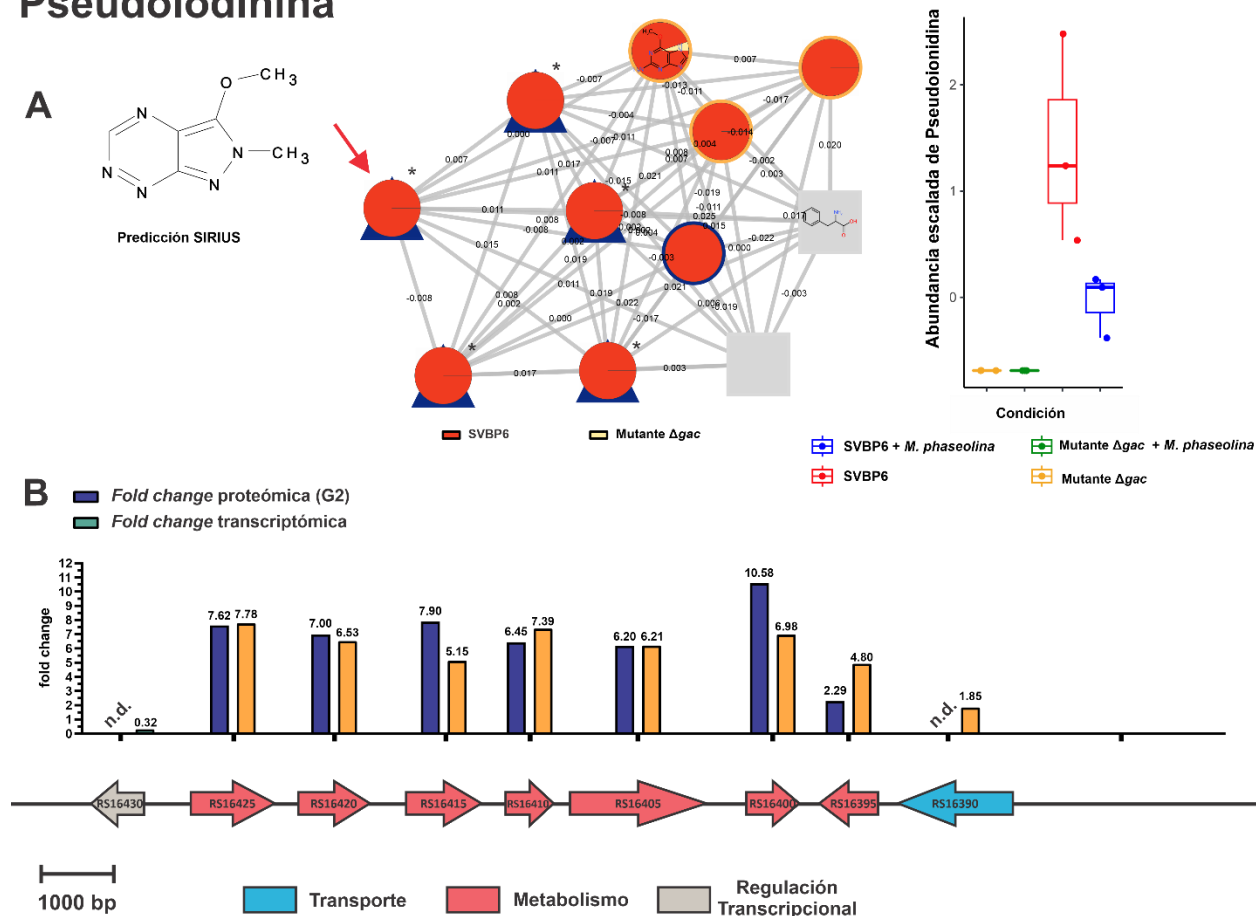


Figura 34: Control de GacS sobre la biosíntesis de moléculas de pseudoiodinina y la expresión de su BGC. A) (izquierda) Red molecular obtenida correspondiente a la pseudoiodinina (predicha por SIRIUS, flecha roja). Los nodos se muestran como formas geométricas (triángulos azules para las características significativamente diferentes según Tukey, círculos azules para las características significativas según ANOVA, círculos naranjas para las características no significativas y cuadrados grises para las características presentes solo en el medio de cultivo). Los conectores grises denotan similitud química calculada como *cosine score* y se muestran como diferencia de masa sobre cada conector. Sobre cada nodo, un gráfico circular muestra la abundancia en muestras de SVBP6 (rojo) y muestras de mutante *gacS*::Tn5 (amarillo). Los nodos marcados con un asterisco son destacados en el *volcano plot* de la Figura 32. (derecha) Gráfico de diagrama de cajas del nodo destacado con una flecha roja. Ver Figura 33 para detalles acerca de los datos de abundancia representados. B) Grupo de genes biosintéticos para la producción de 7HT y las magnitudes de regulación GacS sobre los transcritos y polipéptidos correspondientes, derivadas de la comparación entre muestras de SVBP6 y 28I. Referencias en Figura 33 B.

dominio C-terminal de una sintasa de péptidos no ribosomales de un aislamiento de *Streptomyces lavendulae* (Koketsu *et al.* 2010, Chen *et al.* 2018b), y este dominio de 364 residuos tiene una homología remota, pero significativa (26% de identidad, e-value $7,5e^{-14}$), con el polipéptido codificado por el primer gen de un posible BGC que está fuertemente activado por GacS en *P. donghuensis* SVBP6 (Figura 35). Este clúster de genes contiene ORFs codificantes para proteínas con actividades necesarias para la biosíntesis de un compuesto, así como proteínas de transporte y regulación, de manera similar a otros BGCs descritos para SVBP6 (Figura 33 B y Figura 34 B). Tanto los datos de transcriptómica como los de proteómica

indicaron una fuerte dependencia en la abundancia de sus transcritos y proteínas con la presencia de GacS (Figura 29, Figura 30, Anexo B: Tabla B1 y B2). No obstante, se requieren más datos experimentales para identificar los compuestos de tipo β -carbolina producidos por la cepa SVBP6 y para determinar si su biosíntesis está relacionada con el BGC candidato aquí propuesto. Por otro lado, respecto de las muestras en presencia del micelio de *M. phaseolina*, se observó que la abundancia de este compuesto de β -carbolina fue mayor en los sobrenadantes de las células bacterianas cultivadas en presencia del hongo *M. phaseolina* (Figura 35, derecha), lo cual podría estar indicando una respuesta de la bacteria a la presencia del hongo, con un aumento de este metabolito antimicrobiano.

2,3,4-trihidrobeta-carbolin-1-ona

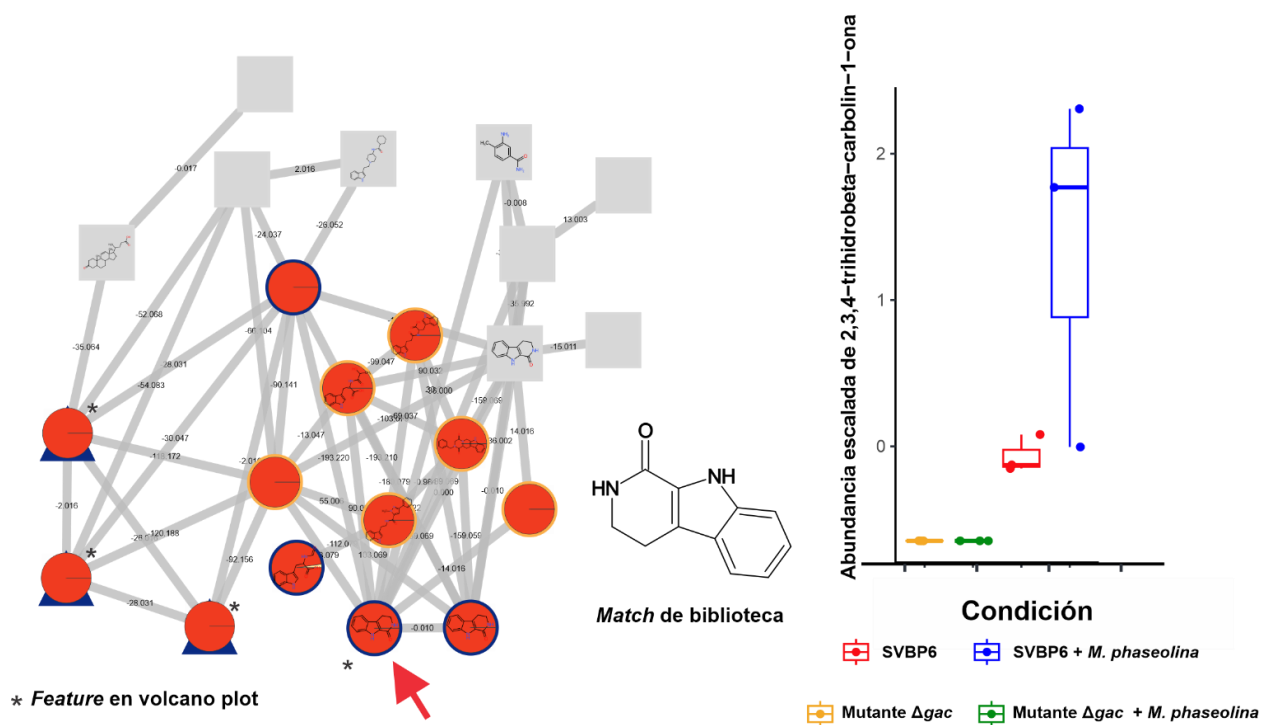


Figura 35: Control de GacS sobre la biosíntesis de moléculas de tipo β -carbolinas. (izquierda) Red molecular obtenida correspondiente a la β -carbolinas, conteniendo un *library match* a la 2,3,4-trihidro- β -carbolina-1-ona (flecha roja). Ver Figura 34 para detalles sobre la representación de redes moleculares. Los nodos marcados con un asterisco son destacados en el *volcano plot* de la Figura 32 A. (derecha) Gráfico de diagrama de cajas del nodo destacado con una flecha roja. Ver Figura 33 para detalles acerca de los datos de abundancia representados.

Por otro lado, se logró identificar otro posible BGC, sin un correlato metabolómico, pero con evidencia transcriptómica y proteómica, que habíamos denominado preliminarmente como “clúster 2.1” (Figura 36). Esta región cromosómica de SVBP6, delimitada por las coordenadas 4,218,479 – 4,230,970, contiene 12 ORFs que codifican diversos polipéptidos. De estos, siete estarían asociados con actividades biosintéticas predichas, tres podrían formar un sistema de eflujo para un metabolito, y dos ubicados en cada extremo del clúster codifican posibles reguladores transcripcionales. Los productos génicos con actividades enzimáticas incluyen dos deshidrogenasas de cadena corta, una aminotransferasa de clase III (dependiente de PLP), una START/SRPBCC/policétido ciclase, una acil-CoA deshidrogenasa/oxidasa, una desaturasa de ácidos grasos y una proteína similar a una hemo-oxigenasa con dominio DUF3050. Esta

disposición funcional sugirió que se trataba de un BGC huérfano involucrado en la producción regulada de un metabolito extracelular, posiblemente relacionado con modificaciones de un precursor de ácido graso. Sin embargo, aunque el primer gen biosintético del clúster mostró una homología distante con el dominio C-terminal de una proteína asociada a la biosíntesis del esqueleto de β -carbolina, no fue posible deducir la identidad química del compuesto producido por este BGC únicamente a partir de las funciones codificadas. La misma requeriría una purificación basada en la actividad antimicrobiana, seguida de caracterización química. Asistidos por el *Comparative Gene Cluster Analysis Toolbox* (CAGECAT) (van den Belt *et al.* 2023), se determinó que además de *P. donghuensis*, el “clúster 2.1” está totalmente conservado en genomas de miembros dispersos del grupo *P. fluorescens* (especies de los subgrupos *P. fluorescens* y *P. fragi*) y del grupo *P. putida* (especies dentro de los subgrupos *P. capeferrum*, *P. mosselii* y *P. vranovensis*). Hasta el momento, este BGC potencial no ha sido caracterizado completamente en ninguna especie en la que el clúster esté presente. Tampoco fue identificado en el genoma de la cepa SVBP6 mediante la versión más reciente de la plataforma antiSMASH (7.0) que permite identificar clústeres de genes de metabolitos especializados (Blin *et al.* 2023). Sin embargo, un BGC homólogo se detectó previamente en el genoma del aislamiento *P. donghuensis* P482 mediante una versión ya obsoleta de antiSMASH (2.0). Se reportó que una mutación inactivadora del primer gen del operón en P482 resultó en la pérdida de actividad antibacteriana en presencia de glicerol como única fuente de carbono (Matuszewska *et al.* 2021), lo que sugirió una posible relación entre este BGC y una actividad antimicrobiana. Nuestros análisis ómicos comparativos indicaron que la expresión de todas las funciones biosintéticas y de transporte de este BGC fue marcadamente regulada al alza por GacS a nivel de abundancia de mRNA en SVBP6 en el momento G2, y que esta regulación se correlacionó con un aumento de más de 10 veces en la abundancia de los polipéptidos detectados del BGC (Figura 29, Figura 30, Figura 36). En conjunto, estas evidencias sugirieron que el “clúster 2.1” en la cepa SVBP6 es responsable de la producción de un metabolito especializado, posiblemente exportado al medio extracelular, cuyos genes biosintéticos y de transporte son fuertemente activados por la cascada Gac-Rsm, aunque la identidad de este metabolito todavía requiere de futuros estudios.

Clúster 2.1

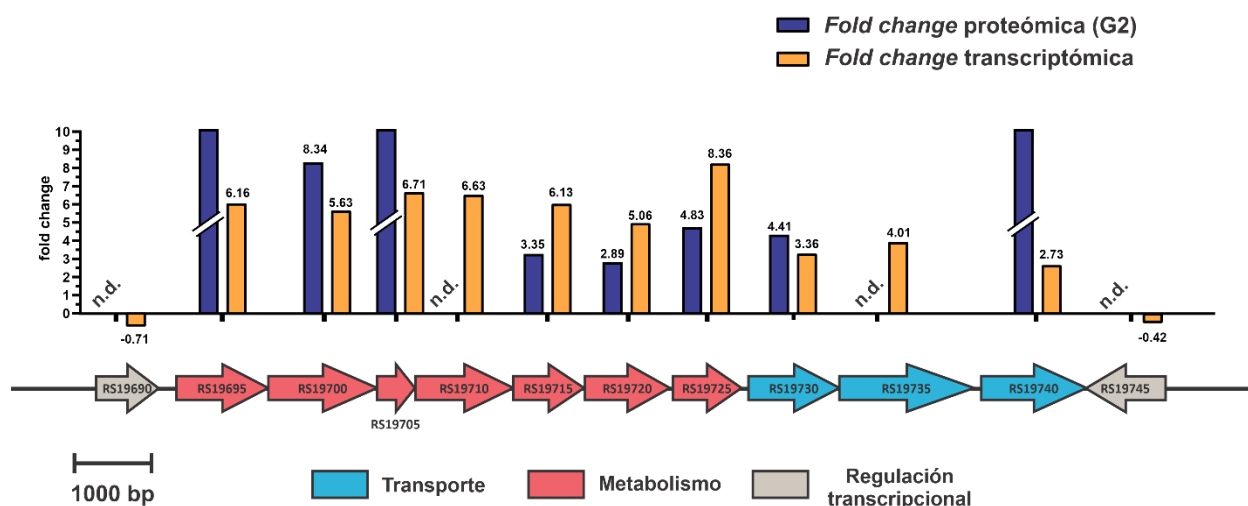


Figura 36: El “clúster 2.1” es un BGC novedoso presente en el genoma de SVBP6 y fuertemente regulado por GacS. El BGC representado en la parte inferior del esquema está compuesto por genes que codifican polipéptidos con actividades biosintéticas predichas, seguidos por componentes de un sistema de exportación putativo, y flanqueados por genes que codifican reguladores transcripcionales. Referencias en Figura 33 B.

Conclusiones

Los resultados obtenidos mediante las tres aproximaciones ómicas aplicadas en forma comparativa a un mutante del regulador global *gacS* de *P. donghuensis* y a la cepa silvestre facilitaron la identificación de nuevos clústeres de genes biosintéticos y/o de metabolitos especializados posiblemente involucrados en su actividad antimicrobiana.

A lo largo de los distintos conjuntos de datos y aproximaciones se evidenció cómo el elemento funcional superior de la cascada reguladora post-transcripcional Gac-Rsm, la quinasa sensora GacS, tiene un impacto amplio y marcado en la expresión génica y en el perfil de metabolitos extracelulares de la cepa SVBP6 de *P. donghuensis*. Tanto a nivel de abundancia de mRNA como de polipéptidos, la categoría funcional con respuesta regulatoria más significativa en el mutante de pérdida de función de *gacS* fue la del metabolismo especializado (Figura 29 B y Figura 30 B). A nivel metabolómico, las familias espectrales con mayor representatividad en el sobrenadante de la cepa SVBP6, pero no en el mutante de pérdida de función *gacS*, fueron amidas de ácidos grasos, ácidos grasos y alcaloides (Figura 32 B). Además de la ya caracterizada 7HT y su BGC (Figura 33), GacS promueve la producción del compuesto antimicrobiano pseudoiodinina (o de una molécula similar) y controla positivamente la expresión del BGC correspondiente (Figura 34). También detectamos la producción dependiente de GacS de 2,3,4-trihidro- β -carbolina-1-ona en los sobrenadantes de cultivos de la cepa silvestre SVBP6, y/o posibles compuestos relacionados de la familia de las β -carbolinas (Figura 35), lo que podría sumarse al arsenal antimicrobiano de SVBP6. Sin embargo, un número importante de familias espectrales dependientes de GacS dentro de la red completa de moléculas espera su identificación química inequívoca (Tabla 6, Anexo B: Figura B1).

Finalmente, fue posible identificar cuatro regiones cromosómicas adicionales que codificarían posibles clústeres de genes biosintéticos altamente regulados por GacS a nivel de mRNA y/o polipéptidos (BGC3, BGC4, BGC5 y BGC6; Figura 37, AnexoB: Tabla B1, Tabla B2). Los cuatro clústeres huérfanos escaparon a la detección del servidor antiSMASH 7.0 y, curiosamente, todos parecen estar restringidos al subgrupo *P. vranovensis* de especies de *Pseudomonas* (que incluye a *P. donghuensis*). A pesar de no poseer más información acerca del rol de estos determinantes genéticos, su expresión o metabolitos especializados asociados, su detección soporta la idea que un enfoque multi-ómico comparativo tiene el potencial de identificar nuevos BGCs putativos que han escapado a la detección por otros métodos.

Aunque el enfoque de este trabajo fue en metabolitos especializados y sus clústeres genéticos subyacentes, principalmente expresados a alta densidad celular, los análisis transcriptómicos y proteómicos diferenciales han proporcionado datos interesantes sobre procesos celulares que son: a) regulados diferencialmente por GacS a baja densidad celular (estado G1); b) controlados negativamente por la cascada Gac-Rsm a baja o alta densidad celular; c) influenciados indirectamente por la cascada Gac-Rsm a través de reguladores transcripcionales y otros sistemas de señalización (Anexo B: Tabla B1, Tabla B2).

Tanto la integración de enfoques multi-ómicos (Palazzotto *et al.* 2018) como el estudio del efecto de la alteración del nivel celular de reguladores globales han sido sugeridas, en forma alternativa, como estrategias prometedoras para descubrir nuevos antibióticos (Thapa *et al.* 2019). Los resultados presentados en esta tesis representaron, al menos al momento de su redacción, la primera vez que se combinaron estas dos estrategias para explorar el potencial antimicrobiano de una cepa de *Pseudomonas*. Dado que la cascada reguladora global Gac-Rsm está ampliamente conservada en el género *Pseudomonas* (Sobrero *et al.* 2020), este enfoque podría resultar particularmente útil para aislamientos de especies bacterianas poco caracterizadas de este género cuyos genomas no contienen BGCs conocidos y

conservados para la producción de antibióticos. En este contexto, los resultados obtenidos respaldaron el uso de mutantes de pérdida de función de *gacS* (o alternatively, podrían ser también de *gacA*; Figura 1A) en conjunto con análisis comparativos multi-ómicos en cepas de *Pseudomonas* como una estrategia prometedora para descubrir nuevos metabolitos bioactivos y/o clústeres de genes biosintéticos para este tipo de compuestos.

Asimismo, el registro masivo de transcritos, polipéptidos y metabolitos (Anexo B: Tabla B1, Tabla B2, Tabla B3) regulados por la presencia de GacS funcional constituyen una base de datos sólida para la identificación de futuros metabolitos y/o procesos celulares de interés. La información aquí obtenida podría ser relevante para el estudio de la colonización competitiva de raíces de plantas y la contribución de funciones beneficiosas a la rizósfera en *Pseudomonas*.

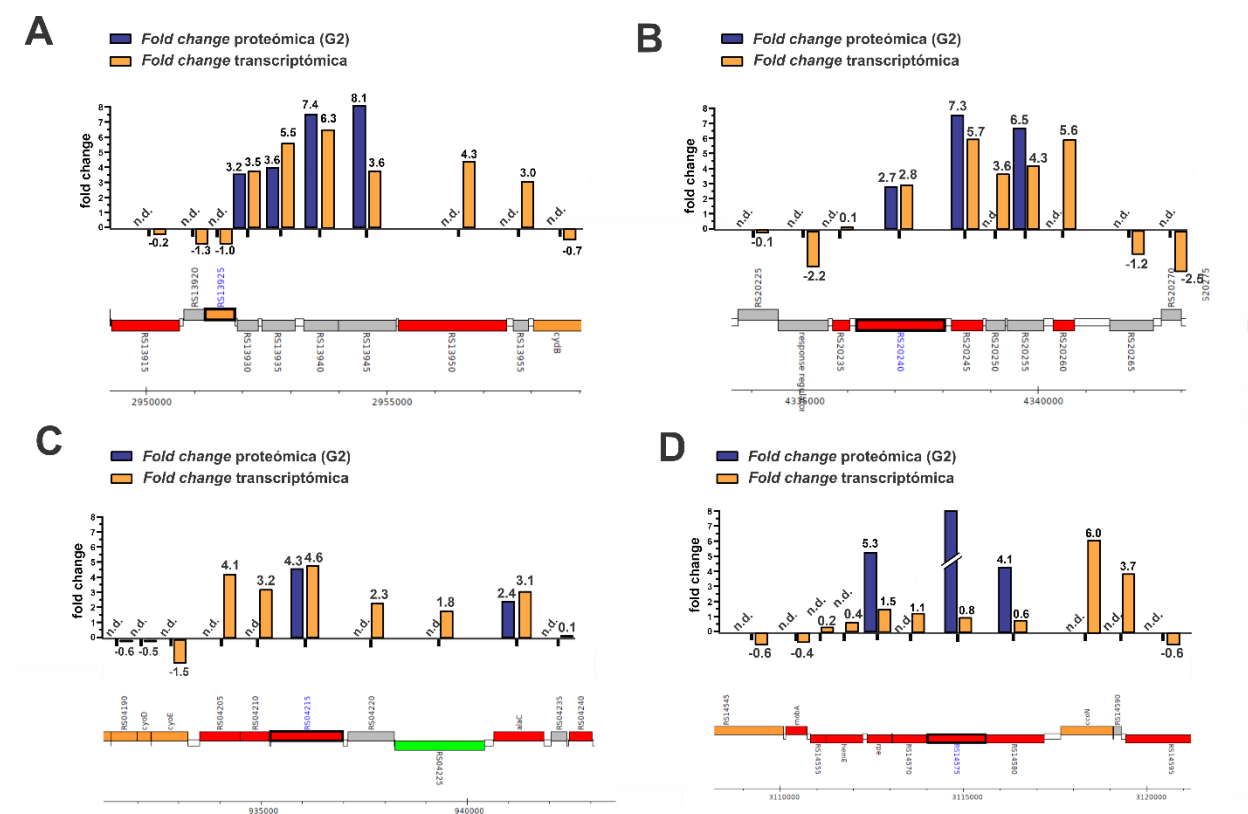


Figura 37: Nuevos BGCs huérfanos fuertemente regulados al alza por GacS en SVBP6. a) BGC3. b) BGC4. c) BGC5. d) BGC6. Para más detalles, ver Anexo B: Tabla B1 y Tabla B2. Los *loci* genómicos correspondientes han sido recortados del visor del genoma de *P. donghuensis* SVBP6 en la base de datos PseudoCAP. Las barras denotan los factores regulatorios sobre la expresión de cada gen que fueron detectados mediante RNAseq (barras naranjas) y LFQ (barras azules) de células de tipo salvaje y *gacS*::Tn5 en cultivos muestreados en el pico de producción de 7HT (G2, ver Figura 27 A). Las anotaciones de genes corresponden a los *locus tag* del genoma completo de la cepa SVBP6 en la base de datos PseudoCAP (<https://pseudomonas.com/strain/show?id=23564>).

Anexo B

```
>Pprot_CHA0_rsmZ
TGTGCAGCGGATAGACACACGCCATCAAGGACGATGCTGACGGAAGCGATTTTCATCAGGACGAT
GAAAAGGAACACACAGGGACTACGGGAAATGTGGGCGGGTGATACGCCCCCTTTTTTTT

>Pdong_SVBP6_rsmZ
TGTCGACCGACTGACACAGGCCTTCAAGGATGAGGCCGAACATCGGAAGTGCGATTCACTAGG
ATGATGAAAGGACAACAGGGACTACGGGAAATGTGGGCGGGTGTAACCACCCCCTTTTTTTT
```



Figura B1: El locus *rsmZ* de la cepa SVBP6 de *P. donghuensis* y su similitud con el locus *rsmZ* de la cepa CHA0 de *P. protegens*.

La secuencia de ADN de los genes que codifican los ARNp RsmZ de las cepas CHA0 y SVBP6 se muestra en la parte superior de la figura. La alineación via Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/clustalo>) de la secuencia de ADN corresponde a la secuencia codificante de *rsmZ* más las regiones promotoras correspondientes (200 pb *upstream*, incluyendo el sitio de inicio de la transcripción de cada gen *rsmZ*) (acá debe ir la cita de Heeb et al 2002 doi 10.1128/jb.184.4.1046-1056.2002). Los elementos de secuencia conservados necesarios para la transcripción (sitios de unión de la ARN polimerasa -10 y -35, en naranja) y la activación por el sistema de dos componentes GacS-GacA (sitio diana de GacA, en rojo) están recuadradas. Las secuencias recuadradas en azul corresponden a los transcritos de ARNp RsmZ.

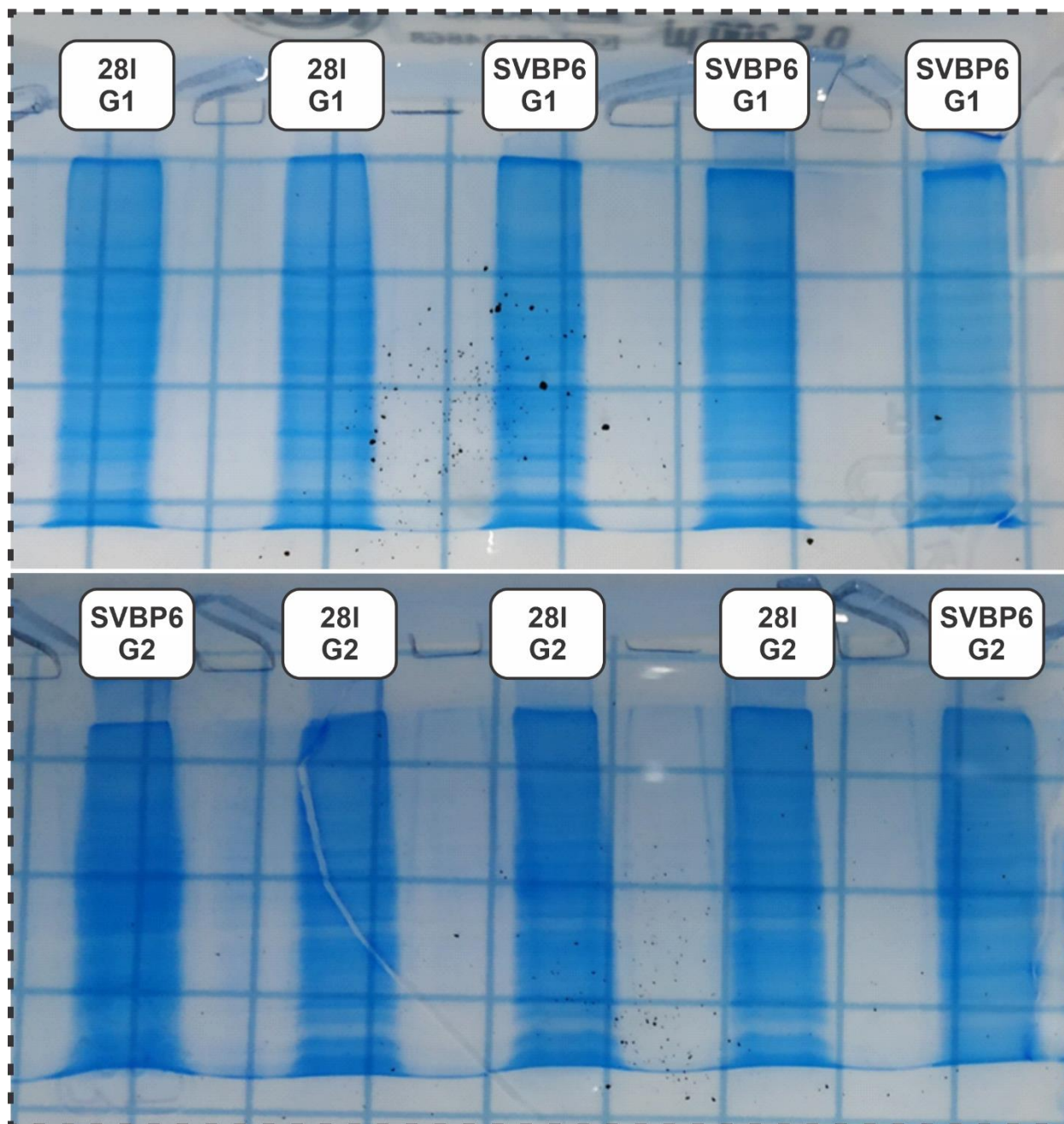


Figura B2: Muestras del proteoma de SVBP6 y su mutante *gacS*::Tn5, 28I. Fotos ejemplificadoras de los geles de poliacrilamida obtenidos luego de realizar el SDS PAGE 12%, a 110V por 50 minutos.

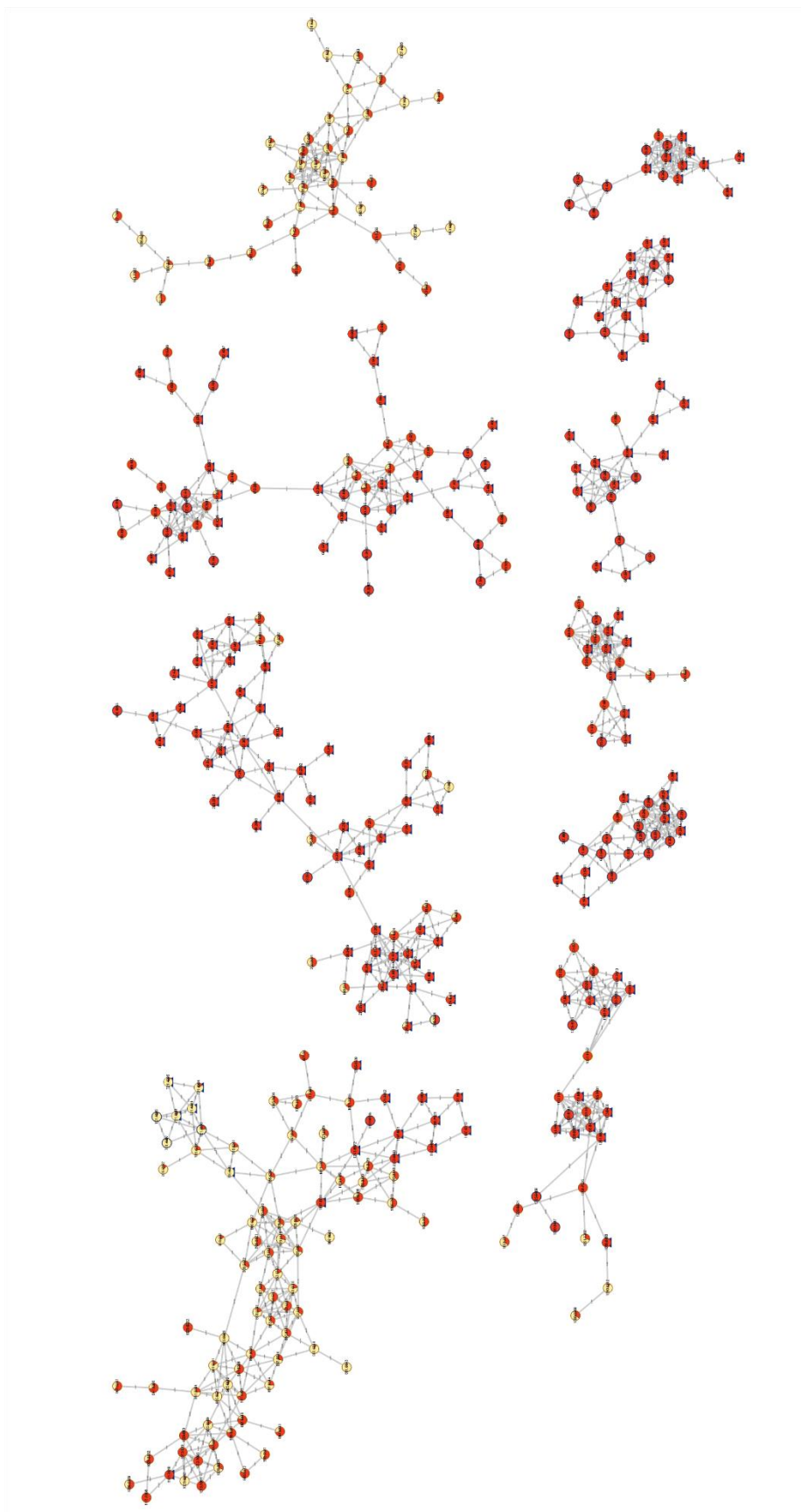


Figura B3: Top 10 (en número de nodos) redes metabolómicas obtenidas en muestras de SVBP6 y 28I. Ver Figura para referencias sobre las redes moleculares. La red completa se encuentra disponible en https://drive.google.com/open?id=1vdxFJKQ0e7VvzzIAoxQsxoMWsWuMqE&usp=drive_fs.

Tabla B1: Genes diferencialmente detectados por RNA-seq en *P. donghuensis* SVBP6.

Ver: https://docs.google.com/spreadsheets/d/17vs-bsLeGc0-jZBrSMX95OBVA7IU8TbQ/edit?usp=drive_link&oid=111464678711164194239&rtpof=true&sd=true

Tabla B2: Polipéptidos diferencialmente expresados detectados por LFQ en *P. donghuensis* SVBP6.

Ver: https://docs.google.com/spreadsheets/d/17wG8KqJ4J-LQJOYYX91Lb_08PJkZF7br/edit?usp=drive_link&oid=111464678711164194239&rtpof=true&sd=true

Tabla B3: *Features* moleculares diferencialmente abundantes detectadas por LC-MS/MS en *P. donghuensis* SVBP6.

Ver: https://docs.google.com/spreadsheets/d/17yC77ObA8lwaDN-V-EUMy_zmyPHSII-Y/edit?usp=drive_link&oid=111464678711164194239&rtpof=true&sd=true

Conclusiones y perspectivas

En coincidencia con la hipótesis inicial, los resultados obtenidos en el transcurso de este trabajo confirmaron que la cepa *P. donghuensis* SVBP6 efectivamente produce una o más moléculas con actividad antimicrobiana, cuya producción media el fenotipo antagonista de la cepa. Principalmente, los resultados aquí expuestos evidenciaron el rol central que posee la 7-hidroxitropolona en el fenotipo antagonista a hongos fitopatógenos. Se determinó que la 7HT y, por lo tanto, la expresión de los genes asociados a su producción en SVBP6, son responsables de gran parte de la inhibición ejercida por parte de la bacteria sobre el crecimiento micelial. La 7HT demostró poseer un efecto fungistático sobre el crecimiento de los hongos ensayados, el cual es independiente de la disponibilidad de hierro en el medio, en contraste al rol propuesto como sideróforo previamente para la molécula en otras cepas de *P. donghuensis*. Se observó que la producción de esta molécula se encuentra regulada por la cascada regulatoria Gac-Rsm en SVBP6, lo que luego fue corroborado por las aproximaciones ómicas al evaluar el impacto de la mutación sobre *gacS*. Asimismo, el estudio de este impacto develó nuevas evidencias acerca de posibles BGCs en *P. donghuensis*, los cuales podrían ser determinantes del antagonismo antibacteriano de SVBP6. El estudio multi-ómico basado en la mutación de un componente de un sistema regulatorio global resultó ser efectivo en su capacidad de determinar la presencia de nuevos BGCs en la cepa previamente descritos en otros organismos (como el asociado a la pseudoiodinina), así como para señalar posibles nuevos BGCs aún por ser descritos (*cluster* 2.1, BGCs 3-6).

Sin embargo, estos últimos resultados requieren estudios complementarios. La información obtenida en este trabajo sugiere que los potenciales nuevos BGCs están regulados por la cascada Gac-Rsm, la cual es determinante para fenotipos de antagonismo en SVBP6 y en otras *Pseudomonas*, pero su relación con la capacidad de SVBP6 de inhibir el crecimiento de fitopatógenos queda pendiente de ser comprobada. Estudios de mutagénesis y complementación son necesarios para observar el impacto, caracterización y corroboración del rol de los BGCs identificados en el antagonismo a bacterias/hongos fitopatógenos. Asimismo, las moléculas detectadas por LC-MS/MS requieren ser corroboradas como agentes antimicrobianos, siendo todavía desconocido su rol en el antagonismo. Particularmente, la variante de pseudoiodinina dependiente de Gac-Rsm identificada en el extracto mediante una predicción *in silico* requiere de resultados de identificación química (RMN, por ejemplo) y posteriores ensayos de actividad antimicrobiana para determinar su papel en los fenotipos de SVBP6.

Por otro lado, todos los resultados obtenidos en este trabajo fueron hechos en un contexto *in vitro*. Resultaría de interés continuar en el estudio de la actividad de las moléculas y componentes genéticos descritos en este trabajo en contextos más cercanos al ambiente natural. Estudios *in planta* utilizando mutantes y/o complementados por la detección los agentes antimicrobianos en rizósfera establecerían la relevancia de los agentes antimicrobianos descritos en el nicho biológico de SVBP6 y arrojarían luz sobre las relaciones biológicas establecidas por la cepa en el contexto rizosférico.

Bibliografía

- Aarons, S., A. Abbas, C. Adams, A. Fenton and F. O'Gara** (2000). "A regulatory RNA (PrrB RNA) modulates expression of secondary metabolite genes in *Pseudomonas fluorescens* F113." *Journal of bacteriology* **182**(14): 3913-3919.
- Abken, H.-J. R., M. Tietze, J. Brodersen, S. BäUmer, U. Beifuss and U. Deppenmeier** (1998). "Isolation and Characterization of Methanophenazine and Function of Phenazines in Membrane-Bound Electron Transport of *Methanosarcina mazei* G 1." *Journal of bacteriology* **180**(8): 2027-2032.
- Adeleke, R. A., T. E. Cloete, A. Bertrand and D. P. Khasa** (2012). "Iron ore weathering potentials of ectomycorrhizal plants." *Mycorrhiza* **22**(7): 535-544.
- Adusumilli, R. and P. Mallick** (2017). "Data Conversion with ProteoWizard msConvert." *Methods Mol Biol* **1550**: 339-368.
- Agaras, B. C., A. Iriarte and C. F. Valverde** (2018). "Genomic insights into the broad antifungal activity, plant-probiotic properties, and their regulation, in *Pseudomonas donghuensis* strain SVBP6." *PLoS ONE* **13**(3): e0194088.
- Agaras, B. C., F. Noguera, G. González Anta, L. Wall and C. Valverde** (2020). "Biocontrol potential index of pseudomonads, instead of their direct-growth promotion traits, is a predictor of seed inoculation effect on crop productivity under field conditions." *Biological Control* **143**: 104209.
- Agaras, B. C., M. Scandiani, A. Luque, L. Fernández, F. Farina, M. Carmona, M. Gally, A. Romero, L. Wall and C. Valverde** (2015). "Quantification of the potential biocontrol and direct plant growth promotion abilities based on multiple biological traits distinguish different groups of *Pseudomonas* spp. isolates." *Biological Control* **90**: 173-186.
- Ahn, J. H. and J. D. Walton** (1998). "Regulation of cyclic peptide biosynthesis and pathogenicity in *Cochliobolus carbonum* by TOXEp, a novel protein with a bZIP basic DNA-binding motif and four ankyrin repeats." *Molecular and General Genetics MGG* **260**(5): 462-469.
- Aiman, S., M. Shehroz, M. Munir, S. Gul, M. Shah and A. Khan** (2018). "Species-wide genome mining of *Pseudomonas putida* for potential secondary metabolites and drug-like natural products characterization." *J. Proteom. Bioinform* **11**: 1-7.
- Albarracín Orio, A. G., D. Petras, R. A. Tobares, A. A. Aksenov, M. Wang, F. Juncosa, P. Sayago, A. J. Moyano, P. C. Dorrestein and A. M. Smania** (2020). "Fungal–bacterial interaction selects for quorum sensing mutants with increased production of natural antifungal compounds." *Communications Biology* **3**(1).
- Alexopoulos, C., C. Mims and M. Blackwell** (1996). "Introductory mycology."
- Ali-Ahmad, A., F. Fadel, C. Sebban-Kreuzer, M. Ba, G. D. Pélissier, O. Bornet, F. Guerlesquin, Y. Bourne, C. Bordin and F. Vincent** (2017). "Structural and functional insights into the periplasmic detector domain of the GacS histidine kinase controlling biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*." *Sci Rep* **7**(1): 11262.
- Ali, S., V. Rivera and G. Secor** (2005). "First report of *Fusarium graminearum* causing dry rot of potato in North Dakota." *Plant Disease* **89**(1): 105-105.
- Allen, N. E., W. E. Alborn, J. N. Hobbs and H. A. Kirst** (1982). "7-Hydroxytropolone: an inhibitor of aminoglycoside-2"-O-adenylyltransferase." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **22**(5): 824-831.
- Almario, J., M. Bruto, J. Vacheron, C. Prigent-Combaret, Y. Moënné-Loccoz and D. Muller** (2017). "Distribution of 2, 4-diacetylphloroglucinol biosynthetic genes among the *Pseudomonas* spp. reveals unexpected polyphyletism." *Frontiers in microbiology* **8**: 1218.

- Altomare, A., M. C. Burla, M. Camalli, G. L. Cascarano, C. Giacobazzo, A. Guagliardi, A. G. Moliterni, G. Polidori and R. Spagna** (1999). "SIR97: a new tool for crystal structure determination and refinement." Journal of applied crystallography **32**(1): 115-119.
- Anderson, A. J., B. R. Kang and Y. C. Kim** (2017). "The Gac/Rsm Signaling Pathway of a Biocontrol Bacterium, *Pseudomonas chlororaphis* O6." Research in Plant Disease **23**(3): 212-227.
- Azegami, K., K. Nishiyama, Y. Watanabe, I. Kadota, A. Ohuchi and C. Fukazawa** (1987). "*Pseudomonas plantarii* sp. nov., the Causal Agent of Rice Seedling Blight." International Journal of Systematic Bacteriology **37**(2): 144-152.
- Babitzke, P., Y.-J. Lai, A. J. Renda and T. Romeo** (2019). "Posttranscription Initiation Control of Gene Expression Mediated by Bacterial RNA-Binding Proteins." Annual review of microbiology **73**(1): 43-67.
- Bai, Y., D. B. Müller, G. Srinivas, R. Garrido-Oter, E. Potthoff, M. Rott, N. Dombrowski, P. C. Münch, S. Spaepen and M. Remus-Emsermann** (2015). "Functional overlap of the Arabidopsis leaf and root microbiota." Nature **528**(7582): 364-369.
- Baird, R. E., C. E. Watson and M. Scruggs** (2003). "Relative longevity of *Macrophomina phaseolina* and associated mycobiota on residual soybean roots in soil." Plant Disease **87**(5): 563-566.
- Baker, K. F. and R. J. Cook** (1974). Biological control of plant pathogens.
- Baltz, R.** (2008). "Renaissance in antibacterial discovery from actinomycetes." Current Opinion in Pharmacology **8**(5): 557-563.
- Bangera, M. G. and L. S. Thomashow** (1999). "Identification and Characterization of a Gene Cluster for Synthesis of the Polyketide Antibiotic 2,4-Diacetylphloroglucinol from *Pseudomonas fluorescens* Q2-87." Journal of bacteriology **181**(10): 3155-3163.
- Barceló, J. and C. Poschenrieder** (2002). "Fast root growth responses, root exudates, and internal detoxification as clues to the mechanisms of aluminium toxicity and resistance: a review." Environmental and Experimental Botany **48**(1): 75-92.
- Bardin, M., S. Ajouz, M. Comby, M. Lopez-Ferber, B. Graillet, M. Siegwart and P. C. Nicot** (2015). "Is the efficacy of biological control against plant diseases likely to be more durable than that of chemical pesticides?" Frontiers in plant science **6**.
- Bassler, B. L.** (1999). "How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing." Current Opinion in Microbiology **2**(6): 582-587.
- Battistuzzi, F. U. and S. B. Hedges** (2009). "A Major Clade of Prokaryotes with Ancient Adaptations to Life on Land." Molecular Biology and Evolution **26**(2): 335-343.
- Bending, G. D., M. K. Turner and J. E. Jones** (2002). "Interactions between crop residue and soil organic matter quality and the functional diversity of soil microbial communities." Soil Biology and Biochemistry **34**(8): 1073-1082.
- Beneduzi, A., A. Ambrosini and L. M. P. Passaglia** (2012). "Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): their potential as antagonists and biocontrol agents." Genetics and molecular biology **35**(4 suppl 1): 1044-1051.
- Bennett, I., N. J. P. Broom, R. Cassels, J. S. Elder, N. D. Masson and P. J. O'Hanlon** (1999). "Synthesis and antibacterial properties of β -diketone acrylate bioisosteres of pseudomonic acid A." Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters **9**(13): 1847-1852.
- Bentley, D. R., S. Balasubramanian, H. P. Swerdlow, G. P. Smith, J. Milton, C. G. Brown, K. P. Hall, D. J. Evers, C. L. Barnes and H. R. Bignell** (2008). "Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry." Nature **456**(7218): 53-59.
- Bentley, R.** (2008). "A fresh look at natural terpenoids." Nat. Prod. Rep. **25**(1): 118-138.
- Berg, G.** (2015). "Beyond borders: investigating microbiome interactivity and diversity for advanced biocontrol technologies." Microbial Biotechnology **8**(1): 5-7.
- Berg, G., M. Alavi, M. Schmid and A. Hartmann** (2013). *The Rhizosphere as a Reservoir for Opportunistic Human Pathogenic Bacteria*, John Wiley & Sons, Inc.: 1209-1216.

- Berg, G., M. Köberl, D. Rybakova, H. Müller, R. Grosch and K. Smalla** (2017). "Plant microbial diversity is suggested as the key to future biocontrol and health trends." *FEMS microbiology ecology* **93**(5).
- Biessy, A. and M. Filion** (2018). "Phenazines in plant-beneficial *Pseudomonas* spp.: biosynthesis, regulation, function and genomics." *Environ Microbiol* **20**(11): 3905-3917.
- Blagodatskaya, E. and Y. Kuzyakov** (2013). "Active microorganisms in soil: Critical review of estimation criteria and approaches." *Soil Biology and Biochemistry* **67**: 192-211.
- Blankenfeldt, W. and J. F. Parsons** (2014). "The structural biology of phenazine biosynthesis." *Current Opinion in Structural Biology* **29**: 26-33.
- Blaser, M.** (2014). *Missing microbes: how killing bacteria creates modern plagues*, Simon and Schuster.
- Blin, K., S. Shaw, H. E. Augustijn, Z. L. Reitz, F. Biermann, M. Alanjary, A. Fetter, B. R. Terlouw, W. W. Metcalf, E. J. N. Helfrich, G. P. van Wezel, M. H. Medema and T. Weber** (2023). "antiSMASH 7.0: new and improved predictions for detection, regulation, chemical structures and visualisation." *Nucleic Acids Research* **51**(W1): W46-W50.
- Blumer, C., S. Heeb, G. Pessi and D. Haas** (1999). "Global GacA-steered control of cyanide and exoprotease production in *Pseudomonas fluorescens* involves specific ribosome binding sites." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**(24): 14073-14078.
- Brazelton, J. N., E. E. Pfeufer, T. A. Sweat, B. B. M. Gardener and C. Coenen** (2008). "2, 4-Diacetylphloroglucinol alters plant root development." *Molecular plant-microbe interactions* **21**(10): 1349-1358.
- Brencic, A. and S. Lory** (2009). "Determination of the regulon and identification of novel mRNA targets of *Pseudomonas aeruginosa* RsmA." *Molecular Microbiology* **72**(3): 612-632.
- Brendel, N., L. P. Partida-Martinez, K. Scherlach and C. Hertweck** (2007). "A cryptic PKS–NRPS gene locus in the plant commensal *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 codes for the biosynthesis of an antimetabolic rhizoxin complex." *Organic & biomolecular chemistry* **5**(14): 2211-2213.
- Brodhagen, M., M. D. Henkels and J. E. Loper** (2004). "Positive autoregulation and signaling properties of pyoluteorin, an antibiotic produced by the biological control organism *Pseudomonas fluorescens* Pf-5." *Applied and Environmental Microbiology* **70**(3): 1758-1766.
- Bruce, J. B., S. A. West and A. S. Griffin** (2017). "Bacteriocins and the assembly of natural *Pseudomonas fluorescens* populations." *Journal of Evolutionary Biology* **30**(2): 352-360.
- Brundrett, M. C.** (2002). "Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants." *New Phytologist* **154**(2): 275-304.
- Brussaard, L.** (1997). "Biodiversity and Ecosystem Functioning in Soil." *Ambio* **26**(8): 563-570.
- Bulgarelli, D., M. Rott, K. Schlaeppi, E. Ver Loren van Themaat, N. Ahmadinejad, F. Assenza, P. Rauf, B. Huettel, R. Reinhardt and E. Schmelzer** (2012). "Revealing structure and assembly cues for Arabidopsis root-inhabiting bacterial microbiota." *Nature* **488**(7409): 91-95.
- Bull, C. T., D. M. Weller and L. S. Thomashow** (1991). "Relationship between root colonization and suppression of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* by *Pseudomonas fluorescens* strain 2-79." *Phytopathology* **81**(9): 954-959.
- Cane, D. E., Z. Wu and J. E. Van Epp** (1992). "Thiotropocin biosynthesis. Shikimate origin of a sulfur-containing tropolone derivative." *Journal of the American Chemical Society* **114**(22): 8479-8483.
- Cao, R., W. Peng, Z. Wang and A. Xu** (2007). "β-Carboline alkaloids: biochemical and pharmacological functions." *Current Medicinal Chemistry* **14**(4): 479-500.
- Cardinale, M., M. Grube, A. Erlacher, J. Quehenberger and G. Berg** (2015). "Bacterial networks and co-occurrence relationships in the lettuce root microbiota." *Environ Microbiol* **17**(1): 239-252.
- Cavener, D. R.** (1992). "GMC oxidoreductases: a newly defined family of homologous proteins with diverse catalytic activities." *J Mol Biol* **223**(3): 811-814.

- Chae, D.-H., D.-R. Kim, M. S. Cheong, Y. B. Lee and Y.-S. Kwak** (2020). "Investigating the induced systemic resistance mechanism of 2, 4-Diacetylphloroglucinol (DAPG) using DAPG hydrolase-transgenic *Arabidopsis*." The plant pathology journal **36**(3): 255.
- Chavan, M. A. and M. A. Riley** (2007). Molecular evolution of bacteriocins in gram-negative bacteria. Bacteriocins: Ecology and evolution, Springer: 19-43.
- Chen, M., P. Wang and Z. Xie** (2018a). "A complex mechanism involving LysR and TetR/AcrR that regulates iron scavenger biosynthesis in *Pseudomonas donghuensis* HYS." Journal of bacteriology: JB. 00087-00018.
- Chen, Q., S. Zhang and Y. Xie** (2018b). "Characterization of a new microbial Pictet-Spenglerase NscbB affording the β -carboline skeletons from *Nocardiopsis synnemataformans* DSM 44143." Journal of Biotechnology **281**: 137-143.
- Chen, X., M. Xu, J. Lü, J. Xu, Y. Wang, S. Lin, Z. Deng and M. Tao** (2018c). "Biosynthesis of Tropolones in *Streptomyces* spp.: Interweaving Biosynthesis and Degradation of Phenylacetic Acid and Hydroxylations on the Tropone Ring." Applied and Environmental Microbiology **84**(12): e00349-00318.
- Cheng, W. and A. Gershenson** (2007). Carbon Fluxes in the Rhizosphere, Elsevier: 31-56.
- Cheng, X., M. Van Der Voort and J. M. Raaijmakers** (2015). "Gac-mediated changes in pyrroloquinoline quinone biosynthesis enhance the antimicrobial activity of *Pseudomonas fluorescens* SBW25." Environmental Microbiology Reports **7**(1): 139-147.
- Clough, S. E., A. Jousset, J. G. Elphinstone and V. P. Friman** (2022). "Combining in vitro and in vivo screening to identify efficient *Pseudomonas* biocontrol strains against the phytopathogenic bacterium *Ralstonia solanacearum*." Microbiologyopen **11**(2).
- Comerford, N. B.** (2005). Soil Factors Affecting Nutrient Bioavailability. Nutrient Acquisition by Plants. H. BassiriRad, Springer-Verlag: 1-14.
- Compant, S. P., B. Duffy, J. Nowak, C. Clément and E. D. A. Barka** (2005). "Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases: Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects." Applied and Environmental Microbiology **71**(9): 4951-4959.
- Condon, L., C. Stark, M. O'Callaghan, P. Clinton and Z. Huang** (2010). "The role of microbial communities in the formation and decomposition of soil organic matter." Soil microbiology and sustainable crop production: 81-118.
- Costa, S. G., F. Lépine, S. Milot, E. Déziel, M. Nitschke and J. Contiero** (2009). "Cassava wastewater as a substrate for the simultaneous production of rhamnolipids and polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas aeruginosa*." Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology **36**(8): 1063-1072.
- Crawford, J., J. Harris, K. Ritz and I. Young** (2005). "Towards an evolutionary ecology of life in soil." Trends in Ecology & Evolution **20**(2): 81-87.
- Curtis, T. P., W. T. Sloan and J. W. Scannell** (2002). "Estimating prokaryotic diversity and its limits." Proceedings of the National Academy of Sciences **99**(16): 10494-10499.
- D'aes, J., K. De Maeyer, E. Pauwelyn and M. Höfte** (2010). "Biosurfactants in plant–*Pseudomonas* interactions and their importance to biocontrol." Environmental Microbiology Reports **2**(3): 359-372.
- d'Arcy, C., D. Eastburn and G. Schumann** (2001). Illustrated glossary of plant pathology, APS.
- Davies, J.** (1990). "What are antibiotics? Archaic functions for modern activities." Molecular Microbiology **4**(8): 1227-1232.
- Davies, J.** (2013). "Specialized microbial metabolites: functions and origins." The Journal of antibiotics **66**(7): 361-364.
- Davies, J. and D. Davies** (2010). "Origins and Evolution of Antibiotic Resistance." Microbiology and Molecular Biology Reviews **74**(3): 417-433.
- de Ackermann, M. D. and M. M. Kohli** (1997). "Screening for *Fusarium* head blight resistance in wheat." Cereal Research Communications **25**(3): 733-734.
- De Galich, M.** (1996). "Fusarium head blight in Argentina." Global Status and Future Prospects: 19.

- Deana, A. and J. G. Belasco** (2005). "Lost in translation: the influence of ribosomes on bacterial mRNA decay." *Genes & Development* **19**(21): 2526-2533.
- Dekkers, L. C., I. H. Mulders, C. C. Phoelich, T. F. Chin-A-Woeng, A. H. Wijffes and B. J. Lugtenberg** (2000). "The sss colonization gene of the tomato-Fusarium oxysporum f. sp. radicle-lycopersici biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* WCS365 can improve root colonization of other wild-type *Pseudomonas* spp. bacteria." *Molecular plant-microbe interactions* **13**(11): 1177-1183.
- Deng, Z., Q. Wang, Z. Liu, M. Zhang, A. C. D. Machado, T.-P. Chiu, C. Feng, Q. Zhang, L. Yu and L. Qi** (2015). "Mechanistic insights into metal ion activation and operator recognition by the ferric uptake regulator." *Nature Communications* **6**(1): 7642.
- Desbois, A. P. and K. C. Lawlor** (2013). "Antibacterial activity of long-chain polyunsaturated fatty acids against *Propionibacterium acnes* and *Staphylococcus aureus*." *Marine drugs* **11**(11): 4544-4557.
- Dewar, M. J. S.** (1945). "Structure of Colchicine." *Nature* **155**(3927): 141-142.
- Dill-Macky, R.** (1997). "Fusarium head blight: recent epidemics and research efforts in the upper Midwest of the United States." *Fusarium head scab: Global status and future prospects* **1997**: 1-6.
- Dinolfo, M. I., E. Castañares and S. A. Stenglein** (2017). "Fusarium-plant interaction: state of the art - a review." *Plant Protection Science* **53**(2): 61-70.
- Djonović, S., G. Vittone, A. Mendoza-Herrera and C. M. Kenerley** (2007). "Enhanced biocontrol activity of *Trichoderma virens* transformants constitutively coexpressing β -1,3- and β -1,6-glucanase genes." *Molecular Plant Pathology* **8**(4): 469-480.
- Donia, M., P. Cimermancic, Christopher, Laura, J. Martin, M. Mitreva, J. Clardy, Roger and Michael** (2014a). "A Systematic Analysis of Biosynthetic Gene Clusters in the Human Microbiome Reveals a Common Family of Antibiotics." *Cell* **158**(6): 1402-1414.
- Donia, M. S., P. Cimermancic, C. J. Schulze, L. C. Wieland Brown, J. Martin, M. Mitreva, J. Clardy, R. G. Linington and M. A. Fischbach** (2014b). "A systematic analysis of biosynthetic gene clusters in the human microbiome reveals a common family of antibiotics." *Cell* **158**(6): 1402-1414.
- Dubey, A. K., C. S. Baker, T. Romeo and P. Babitzke** (2005). "RNA sequence and secondary structure participate in high-affinity CsrA-RNA interaction." *Rna* **11**(10): 1579-1587.
- Dubuis, C. and D. Haas** (2007). "Cross-Species GacA-Controlled Induction of Antibiosis in *Pseudomonads*." *Applied and Environmental Microbiology* **73**(2): 650-654.
- Dubuis, C., J. Rolli, M. Lutz, G. Defago and D. Haas** (2006). "Thiamine-auxotrophic mutants of *Pseudomonas fluorescens* CHA0 are defective in cell-cell signaling and biocontrol factor expression." *Applied and Environmental Microbiology* **72**(4): 2606-2613.
- Duffy, B., C. Keel and G. Défago** (2004). "Potential Role of Pathogen Signaling in Multitrophic Plant-Microbe Interactions Involved in Disease Protection." *Applied and Environmental Microbiology* **70**(3): 1836-1842.
- Duffy, B., A. Schouten and J. M. Raaijmakers** (2003). "Pathogen Self Defense: Mechanisms to Counteract Microbial Antagonism." *Annual review of phytopathology* **41**(1): 501-538.
- Duhrkop, K., M. Fleischauer, M. Ludwig, A. A. Aksenov, A. V. Melnik, M. Meusel, P. C. Dorrestein, J. Rousu and S. Bocker** (2019). "SIRIUS 4: a rapid tool for turning tandem mass spectra into metabolite structure information." *Nat Methods* **16**(4): 299-302.
- Duss, O., E. Michel, N. Diarra dit Konté, M. Schubert and F. H.-T. Allain** (2014a). "Molecular basis for the wide range of affinity found in Csr/Rsm protein-RNA recognition." *Nucleic Acids Research* **42**(8): 5332-5346.
- Duss, O., E. Michel, M. Yulikov, M. Schubert, G. Jeschke and F. H.-T. Allain** (2014b). "Structural basis of the non-coding RNA RsmZ acting as a protein sponge." *Nature* **509**(7502): 588-592.
- Edwards, J., C. Johnson, C. Santos-Medellín, E. Lurie, N. K. Podishetty, S. Bhatnagar, J. A. Eisen and V. Sundaresan** (2015). "Structure, variation, and assembly of the root-associated microbiomes of rice." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **112**(8): E911-E920.

- El-Sayed, A. K., J. Hotherhall, S. M. Cooper, E. Stephens, T. J. Simpson and C. M. Thomas** (2003). "Characterization of the Mupirocin Biosynthesis Gene Cluster from *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 10586." *Chemistry & Biology* **10**(5): 419-430.
- Elad, Y. and R. Baker** (1985). "Influence of trace amounts of cations and siderophore-producing pseudomonads on chlamydospore germination of *Fusarium oxysporum*." *Phytopathology* **75**(9): 1047-1052.
- Farshori, N. N., A. Ahmad, A. U. Khan and A. Rauf** (2011). "A facile, one-pot synthesis, characterization and antimicrobial activity of o-hydroxy anilide derivatives and 1-substituted-1, 3-dicyclohexylurea analogs of long chain carboxylic acids." *European journal of medicinal chemistry* **46**(4): 1433-1438.
- Ferreiro, M. D. and M. T. Gallegos** (2021). "Distinctive features of the Gac-Rsm pathway in plant-associated *Pseudomonas*." *Environ Microbiol* **23**(10): 5670-5689.
- Fox, A. R., G. Soto, C. Valverde, D. Russo, A. Lagares, Á. Zorreguieta, K. Alleva, C. Pascuan, R. Frare, J. Mercado-Blanco, R. Dixon and N. D. Ayub** (2016). "Major cereal crops benefit from biological nitrogen fixation when inoculated with the nitrogen-fixing bacterium *Pseudomonas protegens* Pf-5 X940." *Environ Microbiol* **18**(10): 3522-3534.
- Frapolli, M., J. F. Pothier, G. Défago and Y. Moëne-Loccoz** (2012). "Evolutionary history of synthesis pathway genes for phloroglucinol and cyanide antimicrobials in plant-associated fluorescent pseudomonads." *Molecular Phylogenetics and Evolution* **63**(3): 877-890.
- Freckman, D. W., T. H. Blackburn, L. Brussaard, H. Patricia, M. A. Palmer and V. R. S. Paul** (1997). "Linking Biodiversity and Ecosystem Functioning of Soils and Sediments." *Ambio* **26**(8): 556-562.
- Freeman, S., S. Horowitz and A. Sharon** (2001). "Pathogenic and Nonpathogenic Lifestyles in *Colletotrichum acutatum* from Strawberry and Other Plants." *Phytopathology* **91**(10): 986-992.
- Fridlender, M., J. Inbar and I. Chet** (1993). "Biological control of soilborne plant pathogens by a β -1, 3 glucanase-producing *Pseudomonas cepacia*." *Soil Biology and Biochemistry* **25**(9): 1211-1221.
- Fuller, D. Q. and C. J. Stevens** (2019). "Between domestication and civilization: the role of agriculture and arboriculture in the emergence of the first urban societies." *Vegetation History and Archaeobotany* **28**: 263-282.
- Gao, J., G. Xie, F. Peng and Z. Xie** (2015). "*Pseudomonas donghuensis* sp. nov., exhibiting high-yields of siderophore." *Antonie Van Leeuwenhoek* **107**(1): 83-94.
- Gao, J., X. Yu and Z. Xie** (2012). "Draft genome sequence of high-siderophore-yielding *Pseudomonas* sp. strain HYS." *Journal of bacteriology* **194**(15): 4121-4121.
- Garavaglia, M., A. Muzlera and C. Valverde** (2023). "Comparative genomics and informational content analysis uncovered internal regions of the core genes *rpoD*, *pepN* and *gltX* for an MLSA with genome-level resolving power within the genus *Pseudomonas*." *Molecular Phylogenetics and Evolution* **179**: 107663.
- Garbeva, P., J. Postma, J. A. Van Veen and J. D. Van Elsas** (2006). "Effect of above-ground plant species on soil microbial community structure and its impact on suppression of *Rhizoctonia solani* AG3." *Environ Microbiol* **8**(2): 233-246.
- Garbeva, P., J. A. Van Veen and J. D. Van Elsas** (2004). "MICROBIAL DIVERSITY IN SOIL: Selection of Microbial Populations by Plant and Soil Type and Implications for Disease Suppressiveness." *Annu. Rev. Phytopathol* **42**: 243-270.
- Garrido-Sanz, D., J. P. Meier-Kolthoff, M. Göker, M. Martín, R. Rivilla and M. Redondo-Nieto** (2016). "Genomic and Genetic Diversity within the *Pseudomonas fluorescens* Complex." *PLoS ONE* **11**(2): e0150183.
- Ghequire, M. G. K. and R. De Mot** (2014). "Ribosomally encoded antibacterial proteins and peptides from *Pseudomonas*." *FEMS Microbiology Reviews* **38**(4): 523-568.

- Gilbert, J. and W. Fernando** (2004). "Epidemiology and biological control of *Gibberella zeae*/Fusarium graminearum." Canadian Journal of Plant Pathology **26**(4): 464-472.
- Girard, L., C. Lood, M. Höfte, P. Vandamme, H. Rokni-Zadeh, V. Van Noort, R. Lavigne and R. De Mot** (2021). "The Ever-Expanding *Pseudomonas* Genus: Description of 43 New Species and Partition of the *Pseudomonas putida* Group." Microorganisms **9**(8): 1766.
- Glick, B. R.** (1995). "The enhancement of plant growth by free-living bacteria." Canadian Journal of Microbiology **41**(2): 109-117.
- Gómez Expósito, R., I. De Bruijn, J. Postma and J. M. Raaijmakers** (2017). "Current Insights into the Role of Rhizosphere Bacteria in Disease Suppressive Soils." Frontiers in microbiology **8**.
- Gomila, M., A. Peñá, M. Mulet, J. Lalucat and E. Garcá-A-Valdás** (2015). "Phylogenomics and systematics in *Pseudomonas*." Frontiers in microbiology **6**.
- Gonzalez Garcia, V., M. A. Portal Onco and V. Rubio Susan** (2006). "Review. Biology and systematics of the form genus *Rhizoctonia*." Spanish Journal of Agricultural Research **4**(1): 55-79.
- Goswami, D., J. N. Thakker and P. C. Dhandhukia** (2016). "Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review." Cogent Food & Agriculture **2**(1): 1127500.
- Gottlieb, D.** (1976). "The production and role of antibiotics in soil." The Journal of antibiotics **29**(10): 987-1000.
- Götze, S. and P. Stallforth** (2020a). "Structure elucidation of bacterial nonribosomal lipopeptides." Organic & Biomolecular Chemistry **18**(9): 1710-1727.
- Götze, S. and P. Stallforth** (2020b). "Structure, properties, and biological functions of nonribosomal lipopeptides from pseudomonads." Natural Product Reports **37**(1): 29-54.
- Grady, S. L., S. A. Malfatti, T. S. Gunasekera, B. K. Dalley, M. G. Lyman, R. C. Striebich, M. B. Mayhew, C. L. Zhou, O. N. Ruiz and L. C. Dugan** (2017). "A comprehensive multi-omics approach uncovers adaptations for growth and survival of *Pseudomonas aeruginosa* on n-alkanes." BMC Genomics **18**(1).
- Gross, H. and J. E. Loper** (2009). "Genomics of secondary metabolite production by *Pseudomonas* spp." Natural Product Reports **26**(11): 1408.
- Guo, H., D. Roman and C. Beemelmans** (2019). "Tropolone natural products." Natural Product Reports.
- Gutierrez Manero, F., N. Acero, J. Lucas and A. Probanza** (1996). "The influence of native rhizobacteria on European alder (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.) growth. II. Characterisation and biological assays of metabolites from growth promoting and growth inhibiting bacteria."
- Gutiérrez, P., Y. Li, M. J. Osborne, E. Pomerantseva, Q. Liu and K. Gehring** (2005). "Solution structure of the carbon storage regulator protein CsrA from *Escherichia coli*." Journal of bacteriology **187**(10): 3496-3501.
- Guttenberger, N., W. Blankenfeldt and R. Breinbauer** (2017). "Recent developments in the isolation, biological function, biosynthesis, and synthesis of phenazine natural products." Bioorganic & Medicinal Chemistry **25**(22): 6149-6166.
- Haas, D. and G. Défago** (2005). "Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads." Nature reviews microbiology **3**(4): 307.
- Haas, D. and C. Keel** (2003). "Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease." Annu Rev Phytopathol **41**: 117-153.
- Hacquard, S., R. Garrido-Oter, A. González, S. Spaepen, G. Ackermann, S. Lebeis, Alice C. McHardy, Jeffrey L. Dangl, R. Knight, R. Ley and P. Schulze-Lefert** (2015). "Microbiota and Host Nutrition across Plant and Animal Kingdoms." Cell Host & Microbe **17**(5): 603-616.
- Hallmann, J., A. Quadts-Hallmann, W. F. Mahaffee and J. W. Kloepper** (1997). "Bacterial endophytes in agricultural crops." Canadian Journal of Microbiology **43**(10): 895-914.
- Handelsman, J. and E. V. Stabb** (1996). "Biocontrol of Soilborne Plant Pathogens." The Plant Cell **8**(10): 1855-1869.

- Harman, G. E., C. R. Howell, A. Viterbo, I. Chet and M. Lorito** (2004). "Trichoderma species — opportunistic, avirulent plant symbionts." Nature reviews microbiology **2**(1): 43-56.
- Hassan, K. A., A. Johnson, B. T. Shaffer, Q. Ren, T. A. Kidarsa, L. D. H. Elbourne, S. Hartney, R. Duboy, N. C. Goebel, T. M. Zabriskie, I. T. Paulsen and J. E. Loper** (2010). "Inactivation of the GacA response regulator in *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 has far-reaching transcriptomic consequences." Environ Microbiol **12**(4): 899-915.
- Heeb, S., C. Blumer and D. Haas** (2002). "Regulatory RNA as Mediator in GacA/RsmA-Dependent Global Control of Exoprotein Formation in *Pseudomonas fluorescens* CHA0." Journal of bacteriology **184**(4): 1046-1056.
- Heeb, S., C. Valverde, C. Gigot-Bonnefoy and D. Haas** (2005). "Role of the stress sigma factor RpoS in GacA/RsmA-controlled secondary metabolism and resistance to oxidative stress in *Pseudomonas fluorescens* CHA0." FEMS Microbiology Letters **243**(1): 251-258.
- Henry, A. W.** (1931). "THE NATURAL MICROFLORA OF THE SOIL IN RELATION TO THE FOOT-ROT PROBLEM OF WHEAT." Canadian Journal of Research **4**(1): 69-77.
- Heroven, A. K., K. Böhme and P. Dersch** (2012). "The Csr/Rsm system of *Yersinia* and related pathogens: a post-transcriptional strategy for managing virulence." RNA Biol **9**(4): 379-391.
- Hesse, C., F. Schulz, C. T. Bull, B. T. Shaffer, Q. Yan, N. Shapiro, K. A. Hassan, N. Varghese, L. D. H. Elbourne, I. T. Paulsen, N. Kyrpides, T. Woyke and J. E. Loper** (2018). "Genome-based evolutionary history of *Pseudomonas* spp." Environ Microbiol **20**(6): 2142-2159.
- Hill, D., J. Stein, N. Torkewitz, A. Morse, C. Howell, J. Pachlatko, J. Becker and J. Ligon** (1994). "Cloning of genes involved in the synthesis of pyrrolnitrin from *Pseudomonas fluorescens* and role of pyrrolnitrin synthesis in biological control of plant disease." Applied and Environmental Microbiology **60**(1): 78-85.
- Hiltner, L.** (1904). "Über neuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiet der Bodenbakteriologie und unter besonderer Berücksichtigung der Gründüngung und Brache." Arbeiten der deutschen landwirtschaftlichen gesellschaft **98**: 59.
- Hinsinger, P., A. G. Bengough, D. Vetterlein and I. M. Young** (2009). "Rhizosphere: biophysics, biogeochemistry and ecological relevance." Plant and Soil **321**(1-2): 117-152.
- Hodge, A., D. Robinson and A. Fitter** (2000). "Are microorganisms more effective than plants at competing for nitrogen?" Trends in Plant Science **5**(7): 304-308.
- Hoffman, P. F., A. J. Kaufman, G. P. Halverson and D. P. Schrag** (1998). "A Neoproterozoic Snowball Earth." Science **281**(5381): 1342-1346.
- Höfte, M.** (2021). The use of *Pseudomonas* spp. as bacterial biocontrol agents to control plant diseases, Burleigh Dodds Science Publishing: 301-374.
- Holland, H. D.** (2006). "The oxygenation of the atmosphere and oceans." Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences **361**(1470): 903-915.
- Hotter, V., D. Zopf, H. J. Kim, A. Silge, M. Schmitt, P. Aiyar, J. Fleck, C. Matthäus, J. Hniopek, Q. Yan, J. Loper, S. Sasso, C. Hertweck, J. Popp and M. Mittag** (2021). "A polyene toxin produced by an antagonistic bacterium blinds and lyses a *Chlamydomonas* alga." Proceedings of the National Academy of Sciences **118**(33): e2107695118.
- HU, H.-B., Y.-Q. XU, F. Chen, X. H. Zhang and B.-K. HUR** (2005). "Isolation and characterization of a new fluorescent *Pseudomonas* strain that produces both phenazine 1-carboxylic acid and pyoluteorin." Journal of microbiology and biotechnology **15**(1): 86-90.
- Huertas-Rosales, Ó., M. Romero, K.-G. Chan, K.-W. Hong, M. Cámara, S. Heeb, L. Barrientos-Moreno, M. A. Molina-Henares, M. L. Travieso and M. I. Ramos-González** (2021). "Genome-wide analysis of targets for post-transcriptional regulation by Rsm proteins in *Pseudomonas putida*." Frontiers in Molecular Biosciences **8**: 624061.

- Iavicoli, A., E. Boutet, A. Buchala and J.-P. Métraux** (2003). "Induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* in response to root inoculation with *Pseudomonas fluorescens* CHA0." Molecular plant-microbe interactions **16**(10): 851-858.
- Ideker, T., V. Thorsson, J. A. Ranish, R. Christmas, J. Buhler, J. K. Eng, R. Bumgarner, D. R. Goodlett, R. Aebersold and L. Hood** (2001). "Integrated Genomic and Proteomic Analyses of a Systematically Perturbed Metabolic Network." Science **292**(5518): 929-934.
- Jacob, F. (1954). BIOSYNTHESE INDUITE ET MODE D'ACTION DUNE PYOCINE, ANTIBIOTIQUE DE PSEUDOMONAS-PYOCYANEA. ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR, MASSON EDITEUR 21 STREET CAMILLE DESMOULINS, ISSY, 92789 MOULINEAUX CEDEX 9
- Jafra, S., M. Jabłońska, T. Maciąg, M. Matuszewska, M. Borowicz, M. Prusiński, W. Żmudzińska, M. Thiel, P. Czaplewska, D. M. Krzyżanowska and R. Czajkowski** (2024). "An iron fist in a velvet glove: The cooperation of a novel pyoverdine from *Pseudomonas donghuensis* P482 with 7-hydroxytropolone is pivotal for its antibacterial activity." Environ Microbiol **26**(1).
- Jain, M., H. E. Olsen, B. Paten and M. Akeson** (2016). "The Oxford Nanopore MinION: delivery of nanopore sequencing to the genomics community." Genome Biology **17**(1).
- Janssen, K. H., M. R. Diaz, C. J. Gode, M. C. Wolfgang and T. L. Yahr** (2018). "RsmV, a small noncoding regulatory RNA in *Pseudomonas aeruginosa* that sequesters RsmA and RsmF from target mRNAs." Journal of bacteriology **200**(16): 10.1128/jb. 00277-00218.
- Jean-Pierre, F., J. Perreault and E. Déziel** (2015). "Complex autoregulation of the post-transcriptional regulator RsmA in *Pseudomonas aeruginosa*." Microbiology **161**(9): 1889-1896.
- Jha, C. K. and M. Saraf** (2015). "Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): a review." Journal of Agricultural Research and Development **5**(2): 108-119.
- Jiang, Z., M. Chen, X. Yu and Z. Xie** (2016). "7-Hydroxytropolone produced and utilized as an iron-scavenger by *Pseudomonas donghuensis*." BioMetals **29**(5): 817-826.
- Jousset, A., E. Lara, L. G. Wall and C. Valverde** (2006). "Secondary metabolites help biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0 to escape protozoan grazing." Applied and Environmental Microbiology **72**(11): 7083-7090.
- Jousset, A., B. Schmid, S. Scheu and N. Eisenhauer** (2011). "Genotypic richness and dissimilarity opposingly affect ecosystem functioning." Ecology Letters **14**(6): 537-545.
- Kaiser, K. and K. Kalbitz** (2012). "Cycling downwards – dissolved organic matter in soils." Soil Biology and Biochemistry **52**: 29-32.
- Kaur, M., M. Jangra, H. Singh, R. Tambat, N. Singh, S. M. Jachak, S. Mishra, C. Sharma, H. Nandanwar and A. K. Pinnaka** (2019). "Pseudomonas koreensis recovered from raw yak milk synthesizes a β -carboline derivative with antimicrobial properties." Frontiers in microbiology **10**: 1728.
- Kaur, S., G. S. Dhillon, S. K. Brar, G. E. Vallad, R. Chand and V. B. Chauhan** (2012). "Emerging phytopathogen *Macrophomina phaseolina*: biology, economic importance and current diagnostic trends." Critical Reviews in Microbiology **38**(2): 136-151.
- Kay, E., C. Dubuis and D. Haas** (2005). "Three small RNAs jointly ensure secondary metabolism and biocontrol in *Pseudomonas fluorescens* CHA0." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **102**(47): 17136-17141.
- Kay, E., B. Humair, V. Dénervaud, K. Riedel, S. Spahr, L. Eberl, C. Valverde and D. Haas** (2006). "Two GacA-dependent small RNAs modulate the quorum-sensing response in *Pseudomonas aeruginosa*." Journal of bacteriology **188**(16): 6026-6033.
- Keel, C., C. Voisard, C.-H. Berling, G. Kahr and G. Defago** (1989). "Iron sufficiency, a prerequisite for the suppression of tobacco black root rot by *Pseudomonas fluorescens* strain CHA 0 under gnotobiotic conditions." Phytopathology **79**(5): 584-589.

- Kelly, T. R., E. L. Elliott, R. Lebedev and J. Pagalday** (2006). "Synthesis of the pyrazolo[4,3-e][1,2,4]triazine family of natural products: nostocine A, fluviol A, and pseudoiodinine." Journal of the American Chemical Society **128**(17): 5646-5647.
- Kennedy, R. K., V. Veena, P. R. Naik, P. Lakshmi, R. Krishna, S. Sudharani and N. Sakthivel** (2015). "Phenazine-1-carboxamide (PCN) from *Pseudomonas* sp. strain PUP6 selectively induced apoptosis in lung (A549) and breast (MDA MB-231) cancer cells by inhibition of antiapoptotic Bcl-2 family proteins." Apoptosis **20**(6): 858-868.
- Kilani, J. and S. Fillinger** (2016). "Phenylpyrroles: 30 Years, Two Molecules and (Nearly) No Resistance." Frontiers in microbiology **7**.
- Kirchner, J. W.** (2002). "The Gaia Hypothesis: Fact, Theory, and Wishful Thinking." Climatic Change **52**(4): 391-408.
- Kirner, S., P. E. Hammer, D. S. Hill, A. Altmann, I. Fischer, L. J. Weislo, M. Lanahan, K.-H. van Pée and J. M. Ligon** (1998). "Functions encoded by pyrrolnitrin biosynthetic genes from *Pseudomonas fluorescens*." Journal of bacteriology **180**(7): 1939-1943.
- Kögel-Knabner, I.** (2002). "The macromolecular organic composition of plant and microbial residues as inputs to soil organic matter." Soil Biology and Biochemistry **34**(2): 139-162.
- Koketsu, K., K. Watanabe, H. Suda, H. Oguri and H. Oikawa** (2010). "Reconstruction of the saframycin core scaffold defines dual Pictet-Spengler mechanisms." Nat Chem Biol **6**(6): 408-410.
- Koltai, H. and Y. Kapulnik** (2010). Arbuscular mycorrhizas: physiology and function, Springer Science & Business Media.
- Korenblum, E., H. Massalha and A. Aharoni** (2022). "Plant-microbe interactions in the rhizosphere via a circular metabolic economy." The Plant Cell **34**(9): 3168-3182.
- Kost, T., N. Stopnisek, K. Agnoli, L. Eberl and L. Weisskopf** (2014). "Oxalotrophy, a widespread trait of plant-associated Burkholderia species, is involved in successful root colonization of lupin and maize by Burkholderia phytofirmans." Frontiers in microbiology **4**.
- Krajewski, S. S., M. Nagel and F. Narberhaus** (2013). "Short ROSE-like RNA thermometers control lbpA synthesis in *Pseudomonas* species." PLoS ONE **8**(5): e65168.
- Krzyzanowska, D. M., A. Ossowicki and S. Jafra** (2014). "Genome sequence of *Pseudomonas* sp. strain P482, a tomato rhizosphere isolate with broad-spectrum antimicrobial activity." Genome announcements **2**(3): e00394-00314.
- Krzyzanowska, D. M., A. Ossowicki, M. Rajewska, T. Maciag, M. Jablonska, M. Obuchowski, S. Heeb and S. Jafra** (2016). "When Genome-Based Approach Meets the "Old but Good": Revealing Genes Involved in the Antibacterial Activity of *Pseudomonas* sp. P482 against Soft Rot Pathogens." Front Microbiol **7**: 782.
- Krzyzanowska, D. M., M. Potrykus, M. Golanowska, K. Polonis, A. Gwizdek-Wisniewska, E. Lojkowska and S. Jafra** (2012). "RHIZOSPHERE BACTERIA AS POTENTIAL BIOCONTROL AGENTS AGAINST SOFT ROT CAUSED BY VARIOUS PECTOBACTERIUM AND Dickeya spp. STRAINS." Journal of Plant Pathology **94**(2): 367-378.
- Kubo, K., T. Matsumoto and A. Mori** (2007). "3-Hydroxytropolone (2, 7-dihydroxycyclohepta-2, 4, 6-trien-1-one)." Acta Crystallographica Section E: Structure Reports Online **63**(2): o941-o943.
- Kuiper, I., L. V. Kravchenko, G. V. Bloembergen and B. J. J. Lugtenberg** (2002). "*Pseudomonas putida* Strain PCL1444, Selected for Efficient Root Colonization and Naphthalene Degradation, Effectively Utilizes Root Exudate Components." Molecular Plant-Microbe Interactions® **15**(7): 734-741.
- Kuzyakov, Y. and E. Blagodatskaya** (2015). "Microbial hotspots and hot moments in soil: Concept & review." Soil Biology and Biochemistry **83**: 184-199.
- Kwak, M.-J., H. G. Kong, K. Choi, S.-K. Kwon, J. Y. Song, J. Lee, P. A. Lee, S. Y. Choi, M. Seo, H. J. Lee, E. J. Jung, H. Park, N. Roy, H. Kim, M. M. Lee, E. M. Rubin, S.-W. Lee and J. F. Kim** (2018). "Rhizosphere

- microbiome structure alters to enable wilt resistance in tomato." *Nature Biotechnology* **36**(11): 1100-1109.
- Lalaouna, D., S. Fochesato, L. Sanchez, P. Schmitt-Kopplin, D. Haas, T. Heulin and W. Achouak** (2012). "Phenotypic switching in *Pseudomonas brassicacearum* involves GacS- and GacA-dependent Rsm small RNAs." *Applied and Environmental Microbiology* **78**(6): 1658-1665.
- Lalucat, J., M. Mulet, M. Gomila and E. García-Valdés** (2020). "Genomics in Bacterial Taxonomy: Impact on the Genus *Pseudomonas*." *Genes* **11**(2): 139.
- Lambers, H., C. Mougél, B. Jaillard and P. Hinsinger** (2009). "Plant-microbe-soil interactions in the rhizosphere: an evolutionary perspective." *Plant and Soil* **321**(1): 83-115.
- Lamont, I. L., P. A. Beare, U. Ochsner, A. I. Vasil and M. L. Vasil** (2002). "Siderophore-mediated signaling regulates virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**(10): 7072-7077.
- Lanteigne, C., V. J. Gadkar, T. Wallon, A. Novinscak and M. Fillion** (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.
- Lapouge, K., R. Perozzo, J. Iwaszkiewicz, C. Bertelli, V. Zoete, O. Michielin, L. Scapozza and D. Haas** (2013). "RNA pentaloop structures as effective targets of regulators belonging to the RsmA/CsrA protein family." *RNA Biol* **10**(6): 1030-1041.
- Lapouge, K., M. Schubert, F. H. T. Allain and D. Haas** (2008). "Gac/Rsm signal transduction pathway of γ -proteobacteria: from RNA recognition to regulation of social behaviour." *Molecular Microbiology* **67**(2): 241-253.
- Latiffah, Z., N. Huda and T. Tengku Ahmad Akram** (2013). "Characterization of fusarium semitectum isolates from vegetable fruits." *Sains Malaysiana* **42**(5): 629-633.
- Latour, X.** (2020). "The Evanescent GacS Signal." *Microorganisms* **8**(11).
- Laurence, M. H., L. W. Burgess, B. A. Summerell and E. C. Liew** (2012). "High levels of diversity in *Fusarium oxysporum* from non-cultivated ecosystems in Australia." *Fungal biology* **116**(2): 289-297.
- Laville, J., C. Voisard, C. Keel, M. Maurhofer, G. Défago and D. Haas** (1992). "Global control in *Pseudomonas fluorescens* mediating antibiotic synthesis and suppression of black root rot of tobacco." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **89**(5): 1562-1566.
- Leclère, V., C. Clément, S. Dorey and C. Prigent-Combaret** (2022). *The Role of Microbial Metabolites in Biological Control*, Springer Netherlands: 137-145.
- Leclère, V. R., M. Béchet, A. Adam, J.-S. B. Guez, B. Wathelet, M. Ongena, P. Thonart, F. D. R. Gancel, M. N. Chollet-Imbert and P. Jacques** (2005). "Mycosubtilin Overproduction by *Bacillus subtilis* BBG100 Enhances the Organism's Antagonistic and Biocontrol Activities." *Applied and Environmental Microbiology* **71**(8): 4577-4584.
- Lee, D.-S., S.-H. Eom, S.-Y. Jeong, H. J. Shin, J.-Y. Je, E.-W. Lee, Y.-H. Chung, Y.-M. Kim, C.-K. Kang and M.-S. Lee** (2013). "Anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) substance from the marine bacterium *Pseudomonas* sp. UJ-6." *Environmental Toxicology and Pharmacology* **35**(2): 171-177.
- Lenton, T. M. and M. Van Oijen** (2002). "Gaia as a complex adaptive system." *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* **357**(1421): 683-695.
- Leslie, J. and B. Summerell** (2006). "Fusarium laboratory workshops—A recent history." *Mycotoxin Research* **22**(2): 73-74.
- Li, W., K. R. O'Neill, D. H. Haft, M. DiCuccio, V. Chetvernin, A. Badretudin, G. Coulouris, F. Chitsaz, M. K. Derbyshire, A. S. Durkin, N. R. Gonzales, M. Gwadz, C. J. Lanczycki, J. S. Song, N. Thanki, J. Wang, R. A. Yamashita, M. Yang, C. Zheng, A. Marchler-Bauer and F. Thibaud-Nissen** (2021). "RefSeq: expanding the Prokaryotic Genome Annotation Pipeline reach with protein family model curation." *Nucleic Acids Res* **49**(D1): D1020-d1028.

- Li, W., Paulina, S. Matthijs, G.-L. Xie, R. Busson, P. Cornelis, J. Rozenski and René (2011). "Promysalin, a Salicylate-Containing *Pseudomonas putida* Antibiotic, Promotes Surface Colonization and Selectively Targets Other *Pseudomonas*." Chemistry & Biology **18**(10): 1320-1330.
- Liao, K., J. Wu, C. Wang, J.-Z. Li and H.-L. Wei (2024). "Pseudomonas beijingensis sp. nov., a novel species widely colonizing plant rhizosphere." International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **74**(7).
- Ligon, J. M., D. S. Hill, P. E. Hammer, N. R. Torkewitz, D. Hofmann, H.-J. Kempf and K.-H. V. Pée (2000). "Natural products with antifungal activity from *Pseudomonas* biocontrol bacteria." Pest Management Science **56**(8): 688-695.
- Lim, H.-S., Y.-S. Kim and S.-D. Kim (1991). "Pseudomonas stutzeri YPL-1 genetic transformation and antifungal mechanism against *Fusarium solani*, an agent of plant root rot." Applied and Environmental Microbiology **57**(2): 510-516.
- Lin, Y. H., J. L. Xu, J. Hu, L. H. Wang, S. L. Ong, J. R. Leadbetter and L. H. Zhang (2003). "Acyl-homoserine lactone acylase from *Ralstonia* strain XJ12B represents a novel and potent class of quorum-quenching enzymes." Molecular Microbiology **47**(3): 849-860.
- Lindner, H. J. and G. Schaden (1972). "Pyrazolo[4.3-e]as-triazin, ein neues heterocyclisches System aus *Pseudomonas fluorescens* var. pseudoiodinum." Chemische Berichte **105**(6): 1949-1955.
- Liu, K.-M. and K.-J. Liu (2016). "Lipase-catalyzed synthesis of palmitanilide: Kinetic model and antimicrobial activity study." Enzyme and Microbial Technology **82**: 82-88.
- Liu, X. and J. W. Locasale (2017). "Metabolomics: a primer." Trends in biochemical sciences **42**(4): 274-284.
- Loper, J. E. and J. S. Buyer (1991). "Siderophores in microbial interactions on plant surfaces." Mol. Plant-Microbe Interact **4**(1): 5-13.
- Loper, J. E., M. D. Henkels, L. I. Rangel, M. H. Olcott, F. L. Walker, K. L. Bond, T. A. Kidarsa, C. N. Hesse, B. Sneh and V. O. Stockwell (2016). "Rhizoxin analogs, orfamide A and chitinase production contribute to the toxicity of *Pseudomonas protegens* strain Pf-5 to *Drosophila melanogaster*." Environ Microbiol **18**(10): 3509-3521.
- López-Sánchez, A., A. Leal-Morales, L. Jiménez-Díaz, A. I. Platero, J. Bardallo-Pérez, A. Díaz-Romero, R. D. Acemel, J. M. Illán, J. Jiménez-López and F. Govantes (2016). "Biofilm formation-defective mutants in *Pseudomonas putida*." FEMS Microbiology Letters **363**(13): fnw127.
- Lorch, M., C. Valverde and B. C. Agaras (2024). Strain-Specific Variability in Maize Seed Bacterization and Survival Capacity Correlates with Root Colonization Pattern and Competitiveness of Autochthonous *Pseudomonas* Isolates with Plant-Probiotic Traits, Elsevier BV.
- Lovelock, J. (1979). Gaia: A new look at life on earth, Oxford University Press.
- Lovelock, J. E. and L. Margulis (1974). "Atmospheric homeostasis by and for the biosphere: the gaia hypothesis." Tellus A: Dynamic Meteorology and Oceanography **26**(1-2): 2.
- Lugtenberg, B. and F. Kamilova (2009). "Plant-growth-promoting rhizobacteria." Annual review of microbiology **63**(1): 541-556.
- Luo, L.-M., H. Xu, N. Zhang, H. Ge, Y. Xiang, H. Yang and Y.-X. He (2024). "Pyoluteorin regulates the biosynthesis of 2,4-DAPG through the TetR family transcription factor PhlH in *Pseudomonas protegens* Pf-5." Applied and Environmental Microbiology **90**(4).
- Lynch, J. M. and J. M. Whipps (1990). "Substrate flow in the rhizosphere." Plant and Soil **129**(1): 1-10.
- Lyons, T. W., C. J. Tino, G. P. Fournier, R. E. Anderson, W. D. Leavitt, K. O. Konhauser and E. E. Stüeken (2024). "Co-evolution of early Earth environments and microbial life." Nature reviews microbiology.
- Ma, Z., N. Geudens, N. P. Kieu, D. Sinnaeve, M. Ongena, J. C. Martins and M. Höfte (2016). "Biosynthesis, Chemical Structure, and Structure-Activity Relationship of Orfamide Lipopeptides Produced by *Pseudomonas protegens* and Related Species." Frontiers in microbiology **7**.

- Maestre, F. T., M. A. Bowker, C. Escolar, M. D. Puche, S. Soliveres, S. Maltez-Mouro, P. García-Palacios, A. P. Castillo-Monroy, I. Martínez and A. Escudero** (2010). "Do biotic interactions modulate ecosystem functioning along stress gradients? Insights from semi-arid plant and biological soil crust communities." Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences **365**(1549): 2057-2070.
- Malik, M. S., A. Rehman, I. U. Khan, T. A. Khan, M. Jamil, E. S. Rha and M. Anees** (2023). "Thermo-neutrophilic cellulases and chitinases characterized from a novel putative antifungal biocontrol agent: *Bacillus subtilis* TD11." PLoS ONE **18**(1): e0281102.
- Mallon, C. A., J. D. Van Elsas and J. F. Salles** (2015). "Microbial invasions: the process, patterns, and mechanisms." Trends in microbiology **23**(11): 719-729.
- Mao, D., B. K. Okada, Y. Wu, F. Xu and M. R. Seyedsayamdost** (2018). "Recent advances in activating silent biosynthetic gene clusters in bacteria." Current Opinion in Microbiology **45**: 156-163.
- Marschner, P.** (2012). *Rhizosphere Biology*, Elsevier: 369-388.
- Martinelli, F., R. Scalenghe, S. Davino, S. Panno, G. Scuderi, P. Ruisi, P. Villa, D. Stroppiana, M. Boschetti and L. R. Goulart** (2015). "Advanced methods of plant disease detection. A review." Agronomy for sustainable development **35**: 1-25.
- Martínez-García, E., T. Aparicio, V. de Lorenzo and P. I. Nikel** (2014). "New Transposon Tools Tailored for Metabolic Engineering of Gram-Negative Microbial Cell Factories." Frontiers in Bioengineering and Biotechnology **2**(46).
- Martínez-Gil, M., M. I. Ramos-González and M. Espinosa-Urgel** (2014). "Roles of Cyclic Di-GMP and the Gac System in Transcriptional Control of the Genes Coding for the *Pseudomonas putida* Adhesins LapA and LapF." Journal of bacteriology **196**(8): 1484-1495.
- Martins, M. R. and B. Agaras** (2023). Antagonistic activity of the autochthonous isolate *Pseudomonas donghuensis* SVBP6 against the tomato phytopathogen *Xanthomonas vesicatoria* BV5-4A. XVIII Anual Meeting of the Argentinean Society for General Microbiology - SAMIGE, Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina.
- Matuszewska, M., T. Maciag, M. Rajewska, A. Wierzbicka and S. Jafra** (2021). "The carbon source-dependent pattern of antimicrobial activity and gene expression in *Pseudomonas donghuensis* P482." Sci Rep **11**(1): 10994.
- Maurhofer, M., C. Keel, D. Haas and G. Défago** (1994). "Pyoluteorin production by *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 is involved in the suppression of *Pythium* damping-off of cress but not of cucumber." European journal of plant pathology **100**: 221-232.
- Maurhofer, M., C. Keel, U. Schnider, C. Voisard, D. Haas and G. Défago** (1992). "Influence of enhanced antibiotic production in *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 on its disease suppressive capacity." Annual review of phytopathology **44**(1): 417-445.
- Mavrodi, D. V., W. Blankenfeldt and L. S. Thomashow** (2006). "Phenazine Compounds in Fluorescent *Pseudomonas* Spp. Biosynthesis and Regulation." Annual review of phytopathology **44**(1): 417-445.
- Mavrodi, D. V., J. A. Parejko, O. V. Mavrodi, Y. S. Kwak, D. M. Weller, W. Blankenfeldt and L. S. Thomashow** (2013). "Recent insights into the diversity, frequency and ecological roles of phenazines in fluorescent *Pseudomonas* spp." Environ Microbiol **15**(3): 675-686.
- Mayak, S., T. Tirosh and B. R. Glick** (2004). "Plant growth-promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress." Plant Physiology and Biochemistry **42**(6): 565-572.
- Mayék-Pérez, N., C. López-Castañeda, M. González-Chavira, R. García-Espinosa, J. Acosta-Gallegos, O. M. N. De La Vega and J. Simpson** (2001). "Variability of Mexican isolates of *Macrophomina phaseolina* based on pathogenesis and AFLP genotype." Physiological and Molecular Plant Pathology **59**(5): 257-264.
- Mazoyer, M. and L. Roudart** (2006). A history of world agriculture: from the neolithic age to the current crisis, NYU Press.
- Mazzola, M.** (2004). "ASSESSMENT AND MANAGEMENT OF SOIL MICROBIAL COMMUNITY STRUCTURE FOR DISEASE SUPPRESSION." Annual review of phytopathology **42**(1): 35-59.

- Mazzola, M., D. K. Fujimoto, L. S. Thomashow and R. J. Cook** (1995). "Variation in Sensitivity of *Gaeumannomyces graminis* to Antibiotics Produced by Fluorescent *Pseudomonas* spp. and Effect on Biological Control of Take-All of Wheat." *Applied and Environmental Microbiology* **61**(7): 2554-2559.
- Meck, C., M. P. D'Erasmus, D. R. Hirsch and R. P. Murelli** (2014). "The biology and synthesis of α -hydroxytropolones." *Med. Chem. Commun.* **5**(7): 842-852.
- Medema, M. H. and M. A. Fischbach** (2015). "Computational approaches to natural product discovery." *Nature Chemical Biology* **11**(9): 639-648.
- Meesil, W., P. Muangpat, S. Sitthisak, T. Rattanarojpong, N. Chantratita, R. A. R. Machado, Y. M. Shi, H. B. Bode, A. Vitta and A. Thanwisai** (2023). "Genome mining reveals novel biosynthetic gene clusters in entomopathogenic bacteria." *Sci Rep* **13**(1): 20764.
- Mendes, R., P. Garbeva and J. M. Raaijmakers** (2013). "The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms." *FEMS Microbiol Rev* **37**(5): 634-663.
- Menkir, A., G. Ejeta, L. Butler and A. Melakeberhan** (1996). "Physical and chemical kernel properties associated with resistance to grain mold in sorghum." *Cereal Chemistry* **73**(5): 613-617.
- Mercado-Blanco, J. and P. A. Bakker** (2007). "Interactions between plants and beneficial *Pseudomonas* spp.: exploiting bacterial traits for crop protection." *Antonie Van Leeuwenhoek* **92**(4): 367-389.
- Mercante, J., A. N. Edwards, A. K. Dubey, P. Babitzke and T. Romeo** (2009). "Molecular geometry of CsrA (RsmA) binding to RNA and its implications for regulated expression." *J Mol Biol* **392**(2): 511-528.
- Meyer, J.-M.** (2000). "Pyoverdines: pigments, siderophores and potential taxonomic markers of fluorescent *Pseudomonas* species." *Archives of Microbiology* **174**(3): 135-142.
- Meziane, H., I. Van Der Sluis, L. C. Van Loon, M. Höfte and P. A. H. M. Bakker** (2005). "Determinants of *Pseudomonas putida* WCS358 involved in inducing systemic resistance in plants." *Molecular Plant Pathology* **6**(2): 177-185.
- Migula, W.** (1897). *Arbeiten aus dem bacteriologischen Institut der technischen Hochschule zu Karlsruhe*.
- Miller, M. B. and B. L. Bassler** (2001). "Quorum Sensing in Bacteria." *Annual review of microbiology* **55**(1): 165-199.
- Miransari, M.** (2011). "Arbuscular mycorrhizal fungi and nitrogen uptake." *Archives of Microbiology* **193**(2): 77-81.
- Mishra, P., J. Mishra, S. K. Dwivedi and N. K. Arora** (2020). *Microbial Enzymes in Biocontrol of Phytopathogens*, Springer Singapore: 259-285.
- Miwa, S., E. Kihira, A. Yoshioka, K. Nakasone, S. Okamoto, M. Hatano, M. Igarashi, Y. Eguchi, A. Kato and N. Ichikawa** (2016). "Identification of the three genes involved in controlling production of a phytotoxin tropolone in *Burkholderia plantarii*." *Journal of bacteriology* **198**(11): 1604-1609.
- Moffat, A. D., L. Höing, J. Santos-Aberturas, T. Markwalder, J. G. Malone, R. Teufel and A. W. Truman** (2024). "Understanding the biosynthesis, metabolic regulation, and anti-phytopathogen activity of 3,7-dihydroxytropolone in *Pseudomonas* spp." *bioRxiv*: 2024.2004.2003.587903.
- Moll, S., D. J. Schneider, P. Stodghill, C. R. Myers, S. W. Cartinhour and M. J. Filiatrault** (2010). "Construction of an rsmX co-variance model and identification of five rsmX non-coding RNAs in *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000." *RNA Biol* **7**(5): 508-516.
- Morris, C. E., C. L. Monteil and O. Berge** (2013). "The life history of *Pseudomonas syringae*: linking agriculture to earth system processes." *Annual review of phytopathology* **51**(1): 85-104.
- Mudgal, R., S. Sandhya, N. Chandra and N. Srinivasan** (2015). "De-DUFing the DUFs: Deciphering distant evolutionary relationships of Domains of Unknown Function using sensitive homology detection methods." *Biology Direct* **10**: 1-23.
- Mulet, M., J. Lalucat and E. García-Valdés** (2010). "DNA sequence-based analysis of the *Pseudomonas* species." *Environ Microbiol* **12**(6): 1513-1530.

- Müller, T. and U. Behrendt** (2021). "Exploiting the biocontrol potential of plant-associated pseudomonads—A step towards pesticide-free agriculture?" *Biological Control* **155**: 104538.
- Mullins, A. J., G. Webster, H. J. Kim, J. Zhao, Y. D. Petrova, C. E. Ramming, M. Jenner, J. A. H. Murray, T. R. Connor, C. Hertweck, G. L. Challis and E. Mahenthiralingam** (2021). "Discovery of the *Pseudomonas* Polyne Protegencin by a Phylogeny-Guided Study of Polyne Biosynthetic Gene Cluster Diversity." *MBio* **12**(4): e0071521.
- Muzio, F. M., B. C. Agaras, M. Masi, A. Tuzi, A. Evidente and C. Valverde** (2020). "7-hydroxytropolone is the main metabolite responsible for the fungal antagonism of *Pseudomonas donghuensis* strain SVBP6." *Environ Microbiol* **22**(7): 2550-2563.
- Muzlera, A., P. Sobrero, B. Agaras and C. Valverde** (2024). "Orfamide production in *Pseudomonas* protegens CHAOT promotes rhizospheric colonization and influences assemblage of the bacterial community of wheat roots in soil." *Rhizosphere* **30**: 100882.
- Nandi, M., C. Selin, A. K. C. Brassinga, M. F. Belmonte, W. G. D. Fernando, P. C. Loewen and T. R. De Kievit** (2015). "Pyrrolnitrin and Hydrogen Cyanide Production by *Pseudomonas chlororaphis* Strain PA23 Exhibits Nematicidal and Repellent Activity against *Caenorhabditis elegans*." *PLoS ONE* **10**(4): e0123184.
- Naville, M., A. Ghullot-Gaudeffroy, A. Marchais and D. Gautheret** (2011). "ARNold: a web tool for the prediction of Rho-independent transcription terminators." *RNA Biol* **8**(1): 11-13.
- Neiendam Nielsen, M. and J. Sørensen** (1999). "Chitinolytic activity of *Pseudomonas fluorescens* isolates from barley and sugar beet rhizosphere." *FEMS microbiology ecology* **30**(3): 217-227.
- Neumann, G. and V. Römhild** (2000). "The release of root exudates as affected by the plant's physiological status." *The Rhizosphere: Biochemistry and organic substances at the soil-plant interface*: 41-93.
- Nguyen, C.** (2009). *Rhizodeposition of Organic C by Plant: Mechanisms and Controls*, Springer Netherlands: 97-123.
- Nie, L., G. Wu, D. E. Culley, J. C. M. Scholten and W. Zhang** (2007). "Integrative Analysis of Transcriptomic and Proteomic Data: Challenges, Solutions and Applications." *Critical Reviews in Biotechnology* **27**(2): 63-75.
- Nielsen, T. H., C. Christophersen, U. Anthoni and J. Sorensen** (1999). "Viscosinamide, a new cyclic depsipeptide with surfactant and antifungal properties produced by *Pseudomonas fluorescens* DR54." *Journal of Applied Microbiology* **87**(1): 80-90.
- Nielsen, T. H., C. Thrane, C. Christophersen, U. Anthoni and J. Sorensen** (2000). "Structure, production characteristics and fungal antagonism of tensin - a new antifungal cyclic lipopeptide from *Pseudomonas fluorescens* strain 96.578." *Journal of Applied Microbiology* **89**(6): 992-1001.
- Nothias, L.-F., D. Petras, R. Schmid, K. Dührkop, J. Rainer, A. Sarvepalli, I. Protsyuk, M. Ernst, H. Tsugawa, M. Fleischauer, F. Aicheler, A. A. Aksenov, O. Alka, P.-M. Allard, A. Barsch, X. Cachet, A. M. Caraballo-Rodriguez, R. R. Da Silva, T. Dang, N. Garg, J. M. Gauglitz, A. Gurevich, G. Isaac, A. K. Jarmusch, Z. Kameník, K. B. Kang, N. Kessler, I. Koester, A. Korf, A. Le Gouellec, M. Ludwig, C. Martin H, L.-I. McCall, J. McSayles, S. W. Meyer, H. Mohimani, M. Morsy, O. Moyne, S. Neumann, H. Neuweiger, N. H. Nguyen, M. Nothias-Esposito, J. Paolini, V. V. Phelan, T. Pluskal, R. A. Quinn, S. Rogers, B. Shrestha, A. Tripathi, J. J. J. Van Der Hooft, F. Vargas, K. C. Weldon, M. Witting, H. Yang, Z. Zhang, F. Zubeil, O. Kohlbacher, S. Böcker, T. Alexandrov, N. Bandeira, M. Wang and P. C. Dorrestein** (2020a). "Feature-based molecular networking in the GNPS analysis environment." *Nature Methods* **17**(9): 905-908.
- Nothias, L. F., D. Petras, R. Schmid, K. Dührkop, J. Rainer, A. Sarvepalli, I. Protsyuk, M. Ernst, H. Tsugawa, M. Fleischauer, F. Aicheler, A. A. Aksenov, O. Alka, P. M. Allard, A. Barsch, X. Cachet, A. M. Caraballo-Rodriguez, R. R. Da Silva, T. Dang, N. Garg, J. M. Gauglitz, A. Gurevich, G. Isaac, A. K. Jarmusch, Z. Kamenik, K. B. Kang, N. Kessler, I. Koester, A. Korf, A. Le Gouellec, M. Ludwig, H. C. Martin, L. I. McCall, J. McSayles, S. W. Meyer, H. Mohimani, M. Morsy, O. Moyne, S. Neumann, H.**

- Neuweger, N. H. Nguyen, M. Nothias-Esposito, J. Paolini, V. V. Phelan, T. Pluskal, R. A. Quinn, S. Rogers, B. Shrestha, A. Tripathi, J. J. J. van der Hooft, F. Vargas, K. C. Weldon, M. Witting, H. Yang, Z. Zhang, F. Zubeil, O. Kohlbacher, S. Bocker, T. Alexandrov, N. Bandeira, M. Wang and P. C. Dorrestein** (2020b). "Feature-based molecular networking in the GNPS analysis environment." Nat Methods **17**(9): 905-908.
- Nowak-Thompson, B., S. J. Gould and J. E. Loper** (1997). "Identification and sequence analysis of the genes encoding a polyketide synthase required for pyoluteorin biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens* Pf-5." Gene **204**(1-2): 17-24.
- Nyval, R., J. Percich and C. Mirocha** (1999). "Fusarium head blight of cultivated and natural wild rice (*Zizania palustris*) in Minnesota caused by *Fusarium graminearum* and associated *Fusarium* spp." Plant Disease **83**(2): 159-164.
- Oburger, E., G. J. D. Kirk, W. W. Wenzel, M. Puschenreiter and D. L. Jones** (2009). "Interactive effects of organic acids in the rhizosphere." Soil Biology and Biochemistry **41**(3): 449-457.
- Ossowicki, A., S. Jafra and P. Garbeva** (2017). "The antimicrobial volatile power of the rhizospheric isolate *Pseudomonas donghuensis* P482." PLoS ONE **12**(3): e0174362.
- Pakkir Shah, A. K., A. Walter, F. Ottosson, F. Russo, M. Navarro-Díaz, J. Boldt and e. al.** (2023). The Hitchhiker's Guide to Statistical Analysis of Feature-based Molecular Networks from Non-Targeted Metabolomics Data.
- Pal, K. K. and B. M. Gardener** (2006). "Biological control of plant pathogens." The plant health instructor **2**(5): 1117-1142.
- Palazzotto, E. and T. Weber** (2018). "Omics and multi-omics approaches to study the biosynthesis of secondary metabolites in microorganisms." Current Opinion in Microbiology **45**: 109-116.
- Panchal, K. J.** (2022). Identification of Cellulase Enzyme Involved in, Springer US: 317-322.
- Park, J. T., D. Raychaudhuri, H. Li, S. Normark and D. Mengin-Lecreulx** (1998). "MppA, a Periplasmic Binding Protein Essential for Import of the Bacterial Cell Wall Peptidyl-Alanyl- γ -d-Glutamyl-meso-Diaminopimelate." Journal of bacteriology **180**(5): 1215-1223.
- Parveen, T. and K. Sharma** (2015). "Pythium diseases, control and management strategies: a review." Int. J. Plant Anim. Environ. Sci **5**: 244-2547.
- Pathma, J., R. K. Kennedy and N. Sakthivel** (2011a). Mechanisms of Fluorescent *Pseudomonads* That Mediate Biological Control of Phytopathogens and Plant Growth Promotion of Crop Plants, Springer Berlin Heidelberg: 77-105.
- Pathma, J., G. Rahul, R. Kennedy, R. Subashri and N. Sakthivel** (2011b). "Secondary metabolite production by bacterial antagonists." Journal of Biological Control **25**(3): 165-181.
- Paul, E. and S. Frey** (2015). Soil microbiology, ecology and biochemistry, Elsevier.
- Paul, E. A.** (2016). "The nature and dynamics of soil organic matter: Plant inputs, microbial transformations, and organic matter stabilization." Soil Biology and Biochemistry **98**: 109-126.
- Paulin, M. M., A. Novinscak, C. Lanteigne, V. J. Gadkar and M. Filion** (2017). "Interaction between 2,4-Diacetylphloroglucinol- and Hydrogen Cyanide-Producing *Pseudomonas brassicacearum* LBUM300 and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in the Tomato Rhizosphere." Applied and Environmental Microbiology **83**(13): AEM.00073-00017.
- Paulsen, I. T., C. M. Press, J. Ravel, D. Y. Kobayashi, G. S. Myers, D. V. Mavrodi, R. T. DeBoy, R. Seshadri, Q. Ren and R. Madupu** (2005). "Complete genome sequence of the plant commensal *Pseudomonas fluorescens* Pf-5." Nature Biotechnology **23**(7): 873-878.
- Paysan-Lafosse, T., M. Blum, S. Chuguransky, T. Grego, B. L. Pinto, Gustavo A. Salazar, Maxwell L. Bileschi, P. Bork, A. Bridge, L. Colwell, J. Gough, Daniel H. Haft, I. Letunić, A. Marchler-Bauer, H. Mi, Darren A. Natale, Christine A. Orengo, Arun P. Pandurangan, C. Rivoire, C. J. A. Sigrist, I. Sillitoe, N. Thanki, P. D. Thomas, S. C. E. Tosatto, Cathy H. Wu and A. Bateman** (2023). "InterPro in 2022." Nucleic Acids Research **51**(D1): D418-D427.

- Peix, A., M.-H. Ramírez-Bahena and E. Velázquez** (2009). "Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas*." *Infection, Genetics and Evolution* **9**(6): 1132-1147.
- Philmus, B., B. T. Shaffer, T. A. Kidarsa, Q. Yan, J. M. Raaijmakers, T. P. Begley and J. E. Loper** (2015). "Investigations into the Biosynthesis, Regulation, and Self-Resistance of Toxoflavin in *Pseudomonas protegens* Pf-5." *ChemBioChem* **16**(12): 1782-1790.
- Pierson III, L. S. and E. A. Pierson** (2007). "Roles of diffusible signals in communication among plant-associated bacteria." *Phytopathology* **97**(2): 227-232.
- Pierson III, L. S. and L. S. Thomashow** (1992). "Cloning and heterologous expression of the phenazine biosynthetic." *Mol. Plant-Microbe Interact* **5**(4): 330-339.
- Piettre, S. R., A. Ganzhorn, J. Hoflack, K. Islam and J.-M. Hornsperger** (1997). " α -Hydroxytropolones: a new class of potent inhibitors of inositol monophosphatase and other bimetallic enzymes." *Journal of the American Chemical Society* **119**(14): 3201-3204.
- Pinto-Almeida, A., A. Bauermeister, L. Luppino, I. R. Grilo, J. Oliveira, J. R. Sousa, D. Petras, C. F. Rodrigues, A. Prieto-Davó, D. Tasdemir, R. G. Sobral and S. P. Gaudêncio** (2021). "The Diversity, Metabolomics Profiling, and the Pharmacological Potential of Actinomycetes Isolated from the Estremadura Spur Pockmarks (Portugal)." *Marine drugs* **20**(1): 21.
- Pinton, R.** (2007). "The Rhizosphere."
- Pioli, R., L. Mozzoni and E. Morandi** (2004). "First report of pathogenic association between *Fusarium graminearum* and soybean." *Plant Disease* **88**(2): 220-220.
- Ponomarenko, A. G.** (2015). "Early evolutionary stages of soil ecosystems." *Biology Bulletin Reviews* **5**(3): 267-279.
- Potter, S. C., A. Luciani, S. R. Eddy, Y. Park, R. Lopez and R. D. Finn** (2018). "HMMER web server: 2018 update." *Nucleic Acids Research* **46**(W1): W200-W204.
- Potts, A. H., Y. Guo, B. M. Ahmer and T. Romeo** (2019). "Role of CsrA in stress responses and metabolism important for *Salmonella* virulence revealed by integrated transcriptomics." *PLoS ONE* **14**(1): e0211430.
- Prashar, P., N. Kapoor and S. Sachdeva** (2014). "Rhizosphere: its structure, bacterial diversity and significance." *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* **13**(1): 63-77.
- Qin, S., L. LU, X. XIE, Y. SHI, A. CHAI, Y. WANG, B. LI and L. Li** (2023). "Isolation, Identification and Control Effect of Strain ZF510 on Bacterial Soft Rot of Chinese Cabbage." *Chinese Journal of Biological Control*.
- Raaijmakers, J.** (2001). Rhizosphere and rhizosphere competence. *Encyclopedia of plant pathology*, Wiley: 859-860.
- Raaijmakers, J., I. De Bruijn and M. De Kock** (2006). "Cyclic lipopeptide production by plant-associated *Pseudomonas* species: diversity, activity, biosynthesis and regulation. *Mol. Plant Microb.*" *PlanteMicrobe Interact* **19**.
- Raaijmakers, J. M., M. Leeman, M. M. Van Oorschot, I. Van der Sluis, B. Schippers and P. Bakker** (1995). "Dose-response relationships in biological control of *Fusarium* wilt of radish by *Pseudomonas* spp." *Phytopathology* **85**(10): 1075-1080.
- Raaijmakers, J. M. and M. Mazzola** (2012). "Diversity and Natural Functions of Antibiotics Produced by Beneficial and Plant Pathogenic Bacteria." *Annual review of phytopathology* **50**(1): 403-424.
- Raaijmakers, J. M. and M. Mazzola** (2016). "Soil immune responses." *Science* **352**(6292): 1392-1393.
- Raaijmakers, J. M., T. C. Paulitz, C. Steinberg, C. Alabouvette and Y. Moënné-Loccoz** (2009). "The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms." *Plant and Soil* **321**(1): 341-361.
- Rajkumar, M., L. B. Bruno and J. R. Banu** (2017). "Alleviation of environmental stress in plants: The role of beneficial *Pseudomonas* spp." *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* **47**(6): 372-407.

- Ramette, A., M. Frapolli, M. Fischer-Le Saux, C. Gruffaz, J.-M. Meyer, G. Défago, L. Sutra and Y. Moëgne-Loccoz** (2011). "Pseudomonas protegens sp. nov., widespread plant-protecting bacteria producing the biocontrol compounds 2, 4-diacetylphloroglucinol and pyoluteorin." Systematic and applied microbiology **34**(3): 180-188.
- Ramette, A. and J. M. Tiedje** (2007). "Multiscale responses of microbial life to spatial distance and environmental heterogeneity in a patchy ecosystem." Proceedings of the National Academy of Sciences **104**(8): 2761-2766.
- Raoul des Essarts, Y., J. Cigna, A. Quêtu-Laurent, A. Caron, E. Munier, A. Beury-Cirou, V. Hélias and D. Faure** (2016). "Biocontrol of the Potato Blackleg and Soft Rot Diseases Caused by *Dickeya dianthicola*." Applied and Environmental Microbiology **82**(1): 268-278.
- Reese, M. G.** (2001). "Application of a time-delay neural network to promoter annotation in the *Drosophila melanogaster* genome." Comput Chem **26**(1): 51-56.
- Reimmann, C., L. Serino, M. Beyeler and D. Haa** (1998). "Dihydroaeruginosic acid synthetase and pyochelin synthetase, products of the pchEF, are induced by extracellular pyochelin in *Pseudomonas aeruginosa*." Microbiology **144**(11): 3135-3148.
- Reimmann, C., C. Valverde, E. Kay and D. Haas** (2005a). "Posttranscriptional Repression of GacS/GacA-Controlled Genes by the RNA-Binding Protein RsmE Acting Together with RsmA in the Biocontrol Strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0." Journal of bacteriology **187**(1): 276-285.
- Reimmann, C., C. Valverde, E. Kay and D. Haas** (2005b). "Posttranscriptional repression of GacS/GacA-controlled genes by the RNA-binding protein RsmE acting together with RsmA in the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0." Journal of bacteriology **187**(1): 276-285.
- Rezzonico, F., M. Zala, C. Keel, B. Duffy, Y. Moëgne-Loccoz and G. Défago** (2007). "Is the ability of biocontrol fluorescent pseudomonads to produce the antifungal metabolite 2, 4-diacetylphloroglucinol really synonymous with higher plant protection?" New Phytologist **173**(4): 861-872.
- Richardson, A. E., J.-M. Barea, A. M. McNeill and C. Prigent-Combaret** (2009). "Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms." Plant and Soil **321**(1-2): 305-339.
- Rieusset, L., M. Rey, D. Muller, J. Vacheron, F. Gerin, A. Dubost, G. Comte and C. Prigent-Combaret** (2020). "Secondary metabolites from plant-associated *Pseudomonas* are overproduced in biofilm." Microbial Biotechnology **13**(5): 1562-1580.
- Rife, C., R. Schwarzenbacher, D. McMullan, P. Abdubek, E. Ambing, H. Axelrod, T. Biorac, J. M. Canaves, H. J. Chiu and A. M. Deacon** (2005). "Crystal structure of the global regulatory protein CsrA from *Pseudomonas putida* at 2.05 Å resolution reveals a new fold." Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics **61**(2): 449-453.
- Rillig, M. C. and D. L. Mummey** (2006). "Mycorrhizas and soil structure." New Phytologist **171**(1): 41-53.
- Roff, J. W. and E. I. Whittaker** (1959). "TOXICITY TESTS OF A NEW TROPOLONE, β -THUJAPLICINOL (7-HYDROXY-4-ISOPROPYLTROPOLONE) OCCURRING IN WESTERN RED CEDAR." Canadian Journal of Botany **37**(5): 1132-1134.
- Romanowski, A., M. L. Migliori, C. Valverde and D. A. Golombek** (2011). "Circadian variation in *Pseudomonas fluorescens* (CHA0)-mediated paralysis of *Caenorhabditis elegans*." Microbial Pathogenesis **50**(1): 23-30.
- Romeo, T. and P. Babitzke** (2018). "Global Regulation by CsrA and Its RNA Antagonists." Microbiology Spectrum **6**(2): 341-354.
- Ross, C., K. Scherlach, F. Kloss and C. Hertweck** (2014). "The Molecular Basis of Conjugated Polyyne Biosynthesis in Phytopathogenic Bacteria." Angewandte Chemie International Edition **53**(30): 7794-7798.

- Sacherer, P., G. Defago and D. Haas** (1994). "Extracellular protease and phospholipase C are controlled by the global regulatory gene *gacA* in the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0." FEMS Microbiology Letters **116**(2): 155-160.
- Sacristán, S. and F. García-Arenal** (2008). "The evolution of virulence and pathogenicity in plant pathogen populations." Molecular Plant Pathology **9**(3): 369-384.
- Sadfi, N., M. Cherif, I. Fliss, A. Boudabbous and H. Antoun** (2001). "Evaluation of bacterial isolates from salty soils and *Bacillus thuringiensis* strains for the biocontrol of *Fusarium* dry rot of potato tubers." Journal of Plant Pathology: 101-117.
- Sahr, T., C. Rusniok, D. Dervins-Ravault, O. Sismeiro, J.-Y. Coppee and C. Buchrieser** (2012). "Deep sequencing defines the transcriptional map of *L. pneumophila* and identifies growth phase-dependent regulated ncRNAs implicated in virulence." RNA Biol **9**(4): 503-519.
- Sambrook, J.** (1989). "Molecular cloning: a laboratory manual." Cold Spring Harbor Laboratory.
- Schalk, I. J., C. Rigouin and J. Godet** (2020). "An overview of siderophore biosynthesis among fluorescent *Pseudomonads* and new insights into their complex cellular organization." Environ Microbiol **22**(4): 1447-1466.
- Schloss, P. D. and J. Handelsman** (2006). "Toward a Census of Bacteria in Soil." PLoS Computational Biology **2**(7): e92.
- Schmid, R., S. Heuckeroth, A. Korf, A. Smirnov, O. Myers, T. S. Dyrland, R. Bushuiev, K. J. Murray, N. Hoffmann, M. Lu, A. Sarvepalli, Z. Zhang, M. Fleischauer, K. Duhrkop, M. Wesner, S. J. Hoogstra, E. Rudt, O. Mokshyna, C. Brungs, K. Ponomarov, L. Mutabdzija, T. Damiani, C. J. Pudney, M. Earll, P. O. Helmer, T. R. Fallon, T. Schulze, A. Rivas-Ubach, A. Bilbao, H. Richter, L. F. Nothias, M. Wang, M. Oresic, J. K. Weng, S. Bocker, A. Jeibmann, H. Hayen, U. Karst, P. C. Dorrestein, D. Petras, X. Du and T. Pluskal** (2023). "Integrative analysis of multimodal mass spectrometry data in MZmine 3." Nat Biotechnol **41**(4): 447-449.
- Schnider-Keel, U., A. Seematter, M. Maurhofer, C. Blumer, B. Duffy, C. c. Gigot-Bonnefoy, C. Reimann, R. Notz, G. v. Défago and D. Haas** (2000a). "Autoinduction of 2, 4-diacetylphloroglucinol biosynthesis in the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0 and repression by the bacterial metabolites salicylate and pyoluteorin." Journal of bacteriology **182**(5): 1215-1225.
- Schnider-Keel, U., A. Seematter, M. Maurhofer, C. Blumer, B. Duffy, C. C. Gigot-Bonnefoy, C. Reimann, R. Notz, G. V. Défago, D. Haas and C. Keel** (2000b). "Autoinduction of 2,4-Diacetylphloroglucinol Biosynthesis in the Biocontrol Agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0 and Repression by the Bacterial Metabolites Salicylate and Pyoluteorin." Journal of bacteriology **182**(5): 1215-1225.
- Schouten, A., G. Van Den Berg, V. Edel-Hermann, C. Steinberg, N. Gautheron, C. Alabouvette, C. H. De Vos, P. Lemanceau and J. M. Raaijmakers** (2004). "Defense Responses of *Fusarium oxysporum* to 2,4-Diacetylphloroglucinol, a Broad-Spectrum Antibiotic Produced by *Pseudomonas fluorescens*." Molecular Plant-Microbe Interactions® **17**(11): 1201-1211.
- Schrader, S., H. Rogasik, I. Onasch and D. Jégou** (2007). "Assessment of soil structural differentiation around earthworm burrows by means of X-ray computed tomography and scanning electron microscopy." Geoderma **137**(3-4): 378-387.
- Schubert, M., K. Lapouge, O. Duss, F. C. Oberstrass, I. Jelesarov, D. Haas and F. H. Allain** (2007). "Molecular basis of messenger RNA recognition by the specific bacterial repressing clamp RsmA/CsrA." Nat Struct Mol Biol **14**(9): 807-813.
- Scott, T. A., M. Verest, J. Farnung, C. C. Forneris, S. L. Robinson, X. Ji, F. Hubrich, C. Chepkirui, D. U. Richter and S. Huber** (2022). "Widespread microbial utilization of ribosomal β -amino acid-containing peptides and proteins." Chem **8**(10): 2659-2677.

- Seephonkai, P., M. Isaka, P. Kittakoop, S. Trakulnaleamsai, R. Rattanajak, M. Tanticharoen and Y. Thebtaranonth** (2001). "A new tropolone from the insect pathogenic fungus *Cordyceps* sp. BCC 1681." *The Journal of antibiotics* **54**(9): 751-752.
- Setten, L., G. Soto, M. Mozzicafreddo, A. R. Fox, C. Lisi, M. Cuccioloni, M. Angeletti, E. Pagano, A. Díaz-Paleo and N. D. Ayub** (2013). "Engineering *Pseudomonas protegens* Pf-5 for Nitrogen Fixation and its Application to Improve Plant Growth under Nitrogen-Deficient Conditions." *PLoS ONE* **8**(5): e63666.
- Sheldrick, G. M.** (2015). "Crystal structure refinement with SHELXL." *Acta Crystallographica Section C: Structural Chemistry* **71**(1): 3-8.
- Shepherd, R. W. and S. E. Lindow** (2009). "Two dissimilar N-acyl-homoserine lactone acylases of *Pseudomonas syringae* influence colony and biofilm morphology." *Applied and Environmental Microbiology* **75**(1): 45-53.
- Smirnov, V. V., E. A. Kiprianova, A. D. Garagulya, S. E. Esipov and S. A. Dovjenko** (1997). "Fluviols, bicyclic nitrogen-rich antibiotics produced by *Pseudomonas fluorescens*." *FEMS Microbiology Letters* **153**(2): 357-361.
- Sobrero, P. M., A. Muzlera, J. Frescura, E. Jofré and C. Valverde** (2017). "A matter of hierarchy: activation of orfamide production by the post-transcriptional Gac-Rsm cascade of *Pseudomonas protegens* CHA0 through expression upregulation of the two dedicated transcriptional regulators." *Environmental Microbiology Reports* **9**(5): 599-611.
- Sobrero, P. M. and C. Valverde** (2020). "Comparative Genomics and Evolutionary Analysis of RNA-Binding Proteins of the CsrA Family in the Genus *Pseudomonas*." *Frontiers in Molecular Biosciences* **7**.
- Somers, E., J. Vanderleyden and M. Srinivasan** (2004). "Rhizosphere Bacterial Signalling: A Love Parade Beneath Our Feet." *Critical Reviews in Microbiology* **30**(4): 205-240.
- Song, C., M. van der Voort, J. van de Mortel, K. A. Hassan, L. D. Elbourne, I. T. Paulsen, J. E. Loper and J. M. Raaijmakers** (2015a). "The Rsm regulon of plant growth-promoting *Pseudomonas fluorescens* SS101: role of small RNA s in regulation of lipopeptide biosynthesis." *Microbial Biotechnology* **8**(2): 296-310.
- Song, C., M. Van Der Voort, J. Van De Mortel, K. A. Hassan, L. D. H. Elbourne, I. T. Paulsen, J. E. Loper and J. M. Raaijmakers** (2015b). "The Rsm regulon of plant growth-promoting *Pseudomonas fluorescens* SS101: role of small RNAs in regulation of lipopeptide biosynthesis." *Microbial Biotechnology* **8**(2): 296-310.
- Song, S., Z. Morales Moreira, A. L. Briggs, X.-C. Zhang, A. C. Diener and C. H. Haney** (2023). "PSKR1 balances the plant growth–defence trade-off in the rhizosphere microbiome." *Nature Plants* **9**(12): 2071-2084.
- Sonnleitner, E. and D. Haas** (2011). "Small RNAs as regulators of primary and secondary metabolism in *Pseudomonas* species." *Applied Microbiology and Biotechnology* **91**(1): 63-79.
- Spaink, H. P., A. Kondorosi and P. J. Hooykaas** (2012). *The Rhizobiaceae: molecular biology of model plant-associated bacteria*. Springer Science & Business Media.
- Stallforth, P., D. A. Brock, A. M. Cantley, X. Tian, D. C. Queller, J. E. Strassmann and J. Clardy** (2013). "A bacterial symbiont is converted from an inedible producer of beneficial molecules into food by a single mutation in the *gacA* gene." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**(36): 14528-14533.
- Stincone, P., A. K. Pakkiri Shah, R. Schmid, L. G. Graves, S. P. Lambidis, R. R. Torres, S. N. Xia, V. Minda, A. T. Aron, M. Wang, C. C. Hughes and D. Petras** (2023). "Evaluation of Data-Dependent MS/MS Acquisition Parameters for Non-Targeted Metabolomics and Molecular Networking of Environmental Samples: Focus on the Q Exactive Platform." *Analytical Chemistry* **95**(34): 12673-12682.
- Stutz, E., G. Défago and H. Kern** (1986). "Naturally occurring fluorescent *Pseudomonads* involved in suppression." *Phytopathology* **76**(2): 181-185.

- Su, G., S. O. Suh, R. W. Schneider and J. S. Russin** (2001). "Host Specialization in the Charcoal Rot Fungus, *Macrophomina phaseolina*." *Phytopathology*® **91**(2): 120-126.
- Suryadi, Y., D. Susilowati, P. Lestari, T. Priyatno, I. Samudra, N. Hikmawati and N. Mubarik** (2014). "Characterization of bacterial isolates producing chitinase and glucanase for biocontrol of plant fungal pathogens."
- Taboada, B., K. Estrada, R. Ciria and E. Merino** (2018). "Operon-mapper: a web server for precise operon identification in bacterial and archaeal genomes." *Bioinformatics* **34**(23): 4118-4120.
- Takeuchi, K., P. Kiefer, C. Reimann, C. Keel, C. Dubuis, J. Rolli, J. A. Vorholt and D. Haas** (2009). "Small RNA-dependent expression of secondary metabolism is controlled by Krebs cycle function in *Pseudomonas fluorescens*." *Journal of Biological Chemistry* **284**(50): 34976-34985.
- Takeuchi, K., N. Noda, Y. Katayose, Y. Mukai, H. Numa, K. Yamada and N. Someya** (2015). "Rhizoxin Analogs Contribute to the Biocontrol Activity of a Newly Isolated *Pseudomonas* Strain." *Molecular Plant-Microbe Interactions*® **28**(3): 333-342.
- Takeuchi, K., M. Ogiso, T. Morohoshi and S. Seo** (2023). "Glutamate positively regulates chitinase activity and the biocontrol efficacy of *Pseudomonas protegens*." *Molecular plant-microbe interactions* **36**(6): 323-333.
- Tao, X., H. Zhang, M. Gao, M. Li, T. Zhao and X. Guan** (2020). "Pseudomonas species isolated via high-throughput screening significantly protect cotton plants against verticillium wilt." *AMB Express* **10**(1).
- Thakker, J. N., P. Patel and P. C. Dhandhukia** (2011). "Induction of defence-related enzymes in susceptible variety of banana: role of *Fusarium*-derived elicitors." *Archives Of Phytopathology And Plant Protection* **44**(20): 1976-1984.
- Thapa, S. S. and A. Grove** (2019). "Do Global Regulators Hold the Key to Production of Bacterial Secondary Metabolites?" *Antibiotics* **8**(4): 160.
- Thomashow, L. S. and D. M. Weller** (1988). "Role of a phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*." *Journal of bacteriology* **170**(8): 3499-3508.
- Thrane, C., M. Nielsen, J. Sørensen and S. Olsson** (2001). "*Pseudomonas fluorescens* DR54 reduces sclerotia formation, biomass development, and disease incidence of *Rhizoctonia solani* causing damping-off in sugar beet." *Microbial ecology* **42**: 438-445.
- Tiunov, A. V. and S. Scheu** (2004). "Carbon availability controls the growth of detritivores (Lumbricidae) and their effect on nitrogen mineralization." *Oecologia* **138**(1): 83-90.
- Tombolini, R., D. J. Van Der Gaag, B. Gerhardson and J. K. Jansson** (1999). "Colonization Pattern of the Biocontrol Strain *Pseudomonas chlororaphis* MA 342 on Barley Seeds Visualized by Using Green Fluorescent Protein." *Applied and Environmental Microbiology* **65**(8): 3674-3680.
- Tran, P. N., M.-R. Yen, C.-Y. Chiang, H.-C. Lin and P.-Y. Chen** (2019). "Detecting and prioritizing biosynthetic gene clusters for bioactive compounds in bacteria and fungi." *Applied Microbiology and Biotechnology* **103**(8): 3277-3287.
- Tyrrell, T.** (2013). *On Gaia: a critical investigation of the relationship between life and Earth*, Princeton University Press.
- Uroz, S., P. E. Courty and P. Oger** (2019). "Plant Symbionts Are Engineers of the Plant-Associated Microbiome." *Trends in Plant Science* **24**(10): 905-916.
- Vacheron, J., Y. Moënné-Loccoz, A. Dubost, M. Gonçalves-Martins, D. Muller and C. Prigent-Combaret** (2016). "Fluorescent *Pseudomonas* strains with only few plant-beneficial properties are favored in the maize rhizosphere." *Frontiers in plant science* **7**: 1212.
- Vakulskas, C. A., A. H. Potts, P. Babitzke, B. M. M. Ahmer and T. Romeo** (2015). "Regulation of Bacterial Virulence by Csr (Rsm) Systems." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **79**(2): 193-224.
- Valverde, C. and D. Haas** (2008). "Small RNAs controlled by two-component systems." *Bacterial Signal Transduction: Networks and Drug Targets*: 54-79.

- Van Breemen, N.** (1993). "Soils as biotic constructs favouring net primary productivity." *Geoderma* **57**(3): 183-211.
- van den Belt, M., C. Gilchrist, T. J. Booth, Y. H. Chooi, M. H. Medema and M. Alanjary** (2023). "CAGECAT: The CompAriative GENE Cluster Analysis Toolbox for rapid search and visualisation of homologous gene clusters." *BMC Bioinformatics* **24**(1): 181.
- Van Elsas, J. D., M. Chiurazzi, C. A. Mallon, D. Elhottová, V. Křišťůfek and J. F. Salles** (2012). "Microbial diversity determines the invasion of soil by a bacterial pathogen." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**(4): 1159-1164.
- Van Es, H.** (2017). "A New Definition of Soil." *CSA News* **62**(10): 20-21.
- Van Loon, L. C. and P. A. H. M. Bakker** (2005). *Induced Systemic Resistance as a Mechanism of Disease Suppression by Rhizobacteria*, Springer Netherlands: 39-66.
- van Rhijn, P. and J. Vanderleyden** (1995). "The Rhizobium-plant symbiosis." *Microbiological reviews* **59**(1): 124-142.
- Venturi, V.** (2006). "Regulation of quorum sensing in Pseudomonas." *FEMS Microbiology Reviews* **30**(2): 274-291.
- Vinale, F., K. Sivasithamparam, E. L. Ghisalberti, R. Marra, S. L. Woo and M. Lorito** (2008). "Trichoderma-plant-pathogen interactions." *Soil Biology and Biochemistry* **40**(1): 1-10.
- Voisard, C., C. Keel, D. Haas and G. Défago** (1989). "Cyanide production by Pseudomonas fluorescens helps suppress black root rot of tobacco under gnotobiotic conditions." *The EMBO journal* **8**(2): 351-358.
- Von Bodman, S. B., W. D. Bauer and D. L. Coplin** (2003). "Quorum sensing in plant-pathogenic bacteria." *Annual review of phytopathology* **41**(1): 455-482.
- Voroney, R. P.** (2007). 2 - THE SOIL HABITAT. *Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry (Third Edition)*. E. A. Paul. San Diego, Academic Press: 25-49.
- Wang, D., S. H. Lee, C. Seeve, J. M. Yu, L. S. Pierson and E. A. Pierson** (2013). "Roles of the Gac-Rsm pathway in the regulation of phenazine biosynthesis in *Pseudomonas chlororaphis*." *Microbiologyopen* **2**(3): 505-524.
- Wang, M., J. J. Carver, V. V. Phelan, L. M. Sanchez, N. Garg, Y. Peng, D. D. Nguyen, J. Watrous, C. A. Kapono, T. Luzzatto-Knaan, C. Porto, A. Bouslimani, A. V. Melnik, M. J. Meehan, W.-T. Liu, M. Crüsemann, P. D. Boudreau, E. Esquenazi, M. Sandoval-Calderón, R. D. Kersten, L. A. Pace, R. A. Quinn, K. R. Duncan, C.-C. Hsu, D. J. Floros, R. G. Gavilan, K. Kleigrew, T. Northen, R. J. Dutton, D. Parrot, E. E. Carlson, B. Aigle, C. F. Michelsen, L. Jelsbak, C. Sohlenkamp, P. Pevzner, A. Edlund, J. McLean, J. Piel, B. T. Murphy, L. Gerwick, C.-C. Liaw, Y.-L. Yang, H.-U. Humpf, M. Maansson, R. A. Keyzers, A. C. Sims, A. R. Johnson, A. M. Sidebottom, B. E. Sedio, A. Klitgaard, C. B. Larson, C. A. Boya P, D. Torres-Mendoza, D. J. Gonzalez, D. B. Silva, L. M. Marques, D. P. Demarque, E. Pociute, E. C. O'Neill, E. Briand, E. J. N. Helfrich, E. A. Granatosky, E. Glukhov, F. Ryffel, H. Houson, H. Mohimani, J. J. Kharbush, Y. Zeng, J. A. Vorholt, K. L. Kurita, P. Charusanti, K. L. McPhail, K. F. Nielsen, L. Vuong, M. Elfeki, M. F. Traxler, N. Engene, N. Koyama, O. B. Vining, R. Baric, R. R. Silva, S. J. Mascuch, S. Tomasi, S. Jenkins, V. Macherla, T. Hoffman, V. Agarwal, P. G. Williams, J. Dai, R. Neupane, J. Gurr, A. M. C. Rodríguez, A. Lamsa, C. Zhang, K. Dorrestein, B. M. Duggan, J. Almaliti, P.-M. Allard, P. Phapale, L.-F. Nothias, T. Alexandrov, M. Litaudon, J.-L. Wolfender, J. E. Kyle, T. O. Metz, T. Peryea, D.-T. Nguyen, D. Vanleer, P. Shinn, A. Jadhav, R. Müller, K. M. Waters, W. Shi, X. Liu, L. Zhang, R. Knight, P. R. Jensen, B. Ø. Palsson, K. Pogliano, R. G. Linington, M. Gutiérrez, N. P. Lopes, W. H. Gerwick, B. S. Moore, P. C. Dorrestein and N. Bandeira** (2016a). "Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking." *Nature Biotechnology* **34**(8): 828-837.
- Wang, M., S. Tachibana, Y. Murai, L. Li, S. Y. L. Lau, M. Cao, G. Zhu, M. Hashimoto and Y. Hashidoko** (2016b). "Indole-3-acetic acid produced by Burkholderia heleaia acts as a phenylacetic acid antagonist to disrupt tropolone biosynthesis in Burkholderia plantarii." *Sci Rep* **6**(1): 22596.

- Wang, Y., Y. Pei, X. Wang, X. Dai and M. Zhu** (2024). "Antimicrobial metabolites produced by the plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): *Bacillus* and *Pseudomonas*." Advanced Agrochem.
- Ward, P.** (2009). The medea hypothesis: is life on earth ultimately self-destructive?, Princeton University Press.
- Waters, C. M. and B. L. Bassler** (2005). "QUORUM SENSING: Cell-to-Cell Communication in Bacteria." Annual Review of Cell and Developmental Biology **21**(1): 319-346.
- Watt, M., W. K. Silk and J. B. Passioura** (2006). "Rates of Root and Organism Growth, Soil Conditions, and Temporal and Spatial Development of the Rhizosphere." Annals of Botany **97**(5): 839-855.
- Wei, X., X. Huang, L. Tang, D. Wu and Y. Xu** (2013). "Global control of GacA in secondary metabolism, primary metabolism, secretion systems, and motility in the rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* M18." Journal of bacteriology **195**(15): 3387-3400.
- Weller, D. M., B. Landa, O. Mavrodi, K. Schroeder, L. De La Fuente, S. B. Bankhead, R. A. Molar, R. Bonsall, D. Mavrodi and L. Thomashow** (2007). "Role of 2, 4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* spp. in the defense of plant roots." Plant biology **9**(01): 4-20.
- Weller, D. M., D. V. Mavrodi, J. A. van Pelt, C. M. Pieterse, L. C. van Loon and P. A. Bakker** (2012). "Induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* against *Pseudomonas syringae* pv. tomato by 2, 4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas fluorescens*." Phytopathology **102**(4): 403-412.
- Wilpiseski Regina, L., A. Aufrecht Jayde, T. Retterer Scott, B. Sullivan Matthew, E. Graham David, M. Pierce Eric, D. Zablocki Olivier, V. Palumbo Anthony and A. Elias Dwayne** (2019). "Soil Aggregate Microbial Communities: Towards Understanding Microbiome Interactions at Biologically Relevant Scales." Applied and Environmental Microbiology **85**(14): e00324-00319.
- Wu, T., E. Hu, S. Xu, M. Chen, P. Guo, Z. Dai, T. Feng, L. Zhou, W. Tang and L. Zhan** (2021). "clusterProfiler 4.0: A universal enrichment tool for interpreting omics data." The innovation **2**(3).
- Yan, Q., L. D. Lopes, B. T. Shaffer, T. A. Kidarsa, O. Vining, B. Philmus, C. Song, V. O. Stockwell, J. M. Raaijmakers and K. L. McPhail** (2018). "Secondary metabolism and interspecific competition affect accumulation of spontaneous mutants in the GacS-GacA regulatory system in *Pseudomonas protegens*." MBio **9**(1): 10.1128/mbio. 01845-01817.
- Yang, R., Q. Shi, T. Huang, Y. Yan, S. Li, Y. Fang, Y. Li, L. Liu, X. Wang, Y. Peng, J. Fan, L. Zou, S. Lin and G. Chen** (2023). "The natural pyrazolotriazine pseudoiodinine from *Pseudomonas mosselii* 923 inhibits plant bacterial and fungal pathogens." Nat Commun **14**(1): 734.
- Young, I. M., J. W. Crawford, N. Nunan, W. Otten and A. Spiers** (2008). Chapter 4 Microbial Distribution in Soils, Elsevier: 81-121.
- Yu, X., M. Chen, Z. Jiang, Y. Hu and Z. Xie** (2014). "The two-component regulators GacS and GacA positively regulate a nonfluorescent siderophore through the Gac/Rsm signaling cascade in high-siderophore-yielding *Pseudomonas* sp. strain HYS." Journal of bacteriology **196**(18): 3259-3270.
- Yuan, J., N. Zhang, Q. Huang, W. Raza, R. Li, J. M. Vivanco and Q. Shen** (2015). "Organic acids from root exudates of banana help root colonization of PGPR strain *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6." Sci Rep **5**(1): 13438.
- Zagade, S., G. Deshpande, D. Gawade, A. Wadje and A. Pawar** (2012). "Evaluation of fungicides, bioagent and botanicals against chilli damping off against *Pythium Ultimum*." Journal of Plant Disease Sciences **7**(1): 60-63.
- Zboralski, A., A. Biessy, M. Ciotola, M. Cadieux, D. Albert, J. Blom and M. Filion** (2022a). "Harnessing the genomic diversity of *Pseudomonas* strains against lettuce bacterial pathogens." Frontiers in microbiology **13**.
- Zboralski, A., A. Biessy and M. Filion** (2022b). "Bridging the Gap: Type III Secretion Systems in Plant-Beneficial Bacteria." Microorganisms **10**(1): 187.
- Zboralski, A. and M. Filion** (2020). "Genetic factors involved in rhizosphere colonization by phytobeneficial *Pseudomonas* spp." Computational and Structural Biotechnology Journal **18**: 3539-3554.

- Zeilinger, S., C. Galhaup, K. Payer, S. L. Woo, R. L. Mach, C. Fekete, M. Lorito and C. P. Kubicek** (1999). "Chitinase Gene Expression during Mycoparasitic Interaction of *Trichoderma harzianum* with Its Host." Fungal Genetics and Biology **26**(2): 131-140.
- Zhalnina, K., K. B. Louie, Z. Hao, N. Mansoori, U. N. Da Rocha, S. Shi, H. Cho, U. Karaoz, D. Loqué and B. P. Bowen** (2018). "Dynamic root exudate chemistry and microbial substrate preferences drive patterns in rhizosphere microbial community assembly." Nature microbiology **3**(4): 470-480.
- Zhang, S., C. Li, J. Si, Z. Han and D. Chen** (2022). "Action Mechanisms of Effectors in Plant-Pathogen Interaction." International Journal of Molecular Sciences **23**(12): 6758.
- Zhang, W., F. Li and L. Nie** (2010). "Integrating multiple 'omics' analysis for microbial biology: application and methodologies." Microbiology **156**(2): 287-301.
- Zhang, Z., L. Zhang, L. Zhang, H. Chu, J. Zhou and F. Ju** (2024). "Diversity and distribution of biosynthetic gene clusters in agricultural soil microbiomes." mSystems **9**(4): e01263-01223.
- Zuber, S., F. Carruthers, C. Keel, A. Mattart, C. Blumer, G. Pessi, C. Gigot-Bonnefoy, U. Schnider-Keel, S. Heeb and C. Reimmann** (2003). "GacS sensor domains pertinent to the regulation of exoproduct formation and to the biocontrol potential of *Pseudomonas fluorescens* CHA0." Molecular plant-microbe interactions **16**(7): 634-644.