



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD XOCHIMILCO.

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

PROYECTO:

**“Comparación genómica de rizobacterias aisladas de biznaga dulce
(*Echinocactus platyacanthus*); búsqueda de los determinantes genéticos
involucrados en actividades PGPR”**

TESIS

(idónea Comunicación de Resultados)

Para obtener el grado de:

Doctora en Ciencias Agropecuarias

PRESENTA:

M. en C. Leilani Itzel Salinas Virgen

COMITÉ TUTORAL

CO-DIRECTOR:

Dr. Hugo César Ramírez Saad

CO-DIRECTORA:

Dra. María Eugenia de la Torre Hernández

ASESOR:

Dr. José Félix Aguirre Garrido

COMITÉ TUTORAL

CO-DIRECTOR:

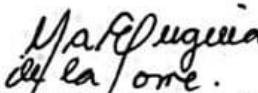
Dr. Hugo César Ramírez Saad



Profesor-Investigador. Laboratorio de Ecología Molecular. Departamento de Sistemas Biológicos, División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco.

CO-DIRECTORA:

Dra. María Eugenia de la Torre Hernández



Investigadora por México del CONAHCYT, comisionada a la UAM Xochimilco. Departamento de Producción Agrícola y Animal. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco.



ASESOR:

Dr. José Félix Aguirre Garrido

Profesor-Investigador. Laboratorio de Biotecnología Ambiental. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Lerma.

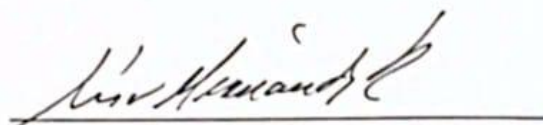
COMISIÓN DE EVALUACIÓN

El jurado designado por la Comisión de Evaluación del Doctorado en Ciencias Agropecuarias, de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco aprobó la Tesis titulada "**Comparación genómica de rizobacterias aisladas de biznaga dulce (*Echinocactus platyacanthus*); búsqueda de los determinantes genéticos involucrados en actividades PGPR**", que presentó:

M en C. Leilani Itzel Salinas Virgen

PRESIDENTE:

Dr. César Hugo Hernández Rodríguez



Profesor Titular C, Departamento de Microbiología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional

SECRETARIA:

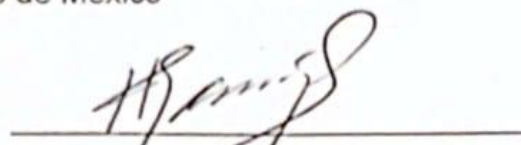
Dra. Ninfa Ramírez Durán



Profesora Investigadora E, Laboratorio de Microbiología Médica y Ambiental, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de México

VOCAL 1:

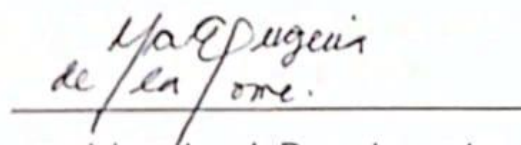
Dr. Hugo César Ramírez Saad



Profesor-Investigador, Laboratorio de Ecología Molecular, Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco.

VOCAL 2:

Dra. María Eugenia de la Torre Hernández



Investigadora por México del CONAHCYT, comisionada al Departamento de Producción Agrícola y Animal, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco.

VOCAL 3:

Dr. José Félix Aguirre Garrido



Profesor-Investigador, Laboratorio de Biotecnología Ambiental, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Lerma.

FINANCIAMIENTO

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Ecología Molecular del Departamento de Sistemas Biológicos, División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, contó con financiamiento de: Convocatorias para el Desarrollo Académico 2022, proyecto F129; Convocatorias para el Desarrollo Académico 2022, proyecto DT31.

El programa de Doctorado en Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONAHCYT, en el Nivel “En desarrollo” clave 003786.

La ponente contó con el apoyo de una beca para estudios de posgrado del CONAHCYT con número 765704 y la beca UAM para titulación de posgrado 24I.

DEDICATORIA

Esta tesis de doctorado y todo el trabajo que representa está dedicada, con todo mi cariño:

A mi padre, **Antonio**. Gracias por tu apoyo incondicional y por todo el esfuerzo que hiciste para brindarme una buena educación y lograr todo lo que me propusiera. Sé que cada uno de mis logros fue motivo de alegría para ti y aunque no pude compartir este contigo, estoy segura de que desde el lugar donde te encuentras, te sientes muy orgulloso de mí y saber eso es el motor que me impulsa para no rendirme.

A mi madre, **Obdulia**. Agradezco profundamente todo el apoyo que me has dado y me sigues dando, por todo el esfuerzo y sacrificio que has hecho junto a mi padre para que yo pudiera llegar tan lejos como he querido. Sé lo orgullosa que estas de mí, pero permíteme expresar cuanto me enorgullece tenerte como madre. Eres una de las fuerzas que me impulsan a seguir adelante.

A los motores de mi vida, **Yaretzi**, mi niña adorada, y **Yetzi** mi hermosa bebé. Sé que a veces es difícil y que hacen un gran sacrificio al no tenerme mucho tiempo a su lado, pero quiero que sepan que cada paso que doy es por ustedes.

A mi familia, especialmente a mi hermana **Esther**, y a mis sobrinos **Michelle**, **Aislinn**, **Julián**, **Ian** y **Danna**. Gracias por creer en mí, apoyarme incondicionalmente y acompañarme en cada etapa de mi vida personal y profesional.

Por último, pero no menos importante, a **Samuel**, más que mi esposo, mi compañero, mi pilar, quien me acompaña en cada paso que doy, cree en mí, vuelve suyos cada meta y cada sueño que tengo y me impulsa para alcanzarlos. Gracias por apoyarme en cada punto del camino hacia mi superación personal y profesional, por tu comprensión, tus consejos, por escucharme, por confiar en mí, y sobre todo, por amarme.

Los Amo, sin ustedes esto no sería posible.

AGRADECIMIENTOS

A mi comité tutorial:

Con respeto, admiración y cariño a mi director de tesis el **Dr. Hugo César Ramírez Saad**, en primer lugar, por haber dirigido este trabajo, pero además, ser mi guía desde el principio, por todos los conocimientos que me ha transmitido, por brindarme su apoyo, por la absoluta confianza que ha depositado en mí, por ayudarme a confiar en mí misma, por impulsarme a crecer personal y profesionalmente, por su paciencia y comprensión, pero, ante todo, por ser quien es; la bonhomía, sabiduría y modestia que lo caracterizan han tocado mi vida de tal manera que son para mí una fuente de inspiración y me invitan a seguir su ejemplo.

Con respeto, admiración y cariño a mi directora de tesis la **Dra. María Eugenia de la Torre Hernández** en principio, por haber dirigido este trabajo en conjunto con el Dr. Hugo, por ser una buena guía para mí desde el inicio del proyecto, por todos los conocimientos que me ha transmitido, por siempre dar más de lo que debe, por brindarme su apoyo y absoluta confianza, por impulsarme a crecer personal y profesionalmente, por su paciencia, comprensión y consejos, por honrarme con su amistad, pero sobre todo, por ser una gran persona y excelente profesora, indudablemente un gran modelo a seguir, sus enseñanzas han contribuido para ser quien soy.

Con respeto, admiración y afecto a mi asesor el **Dr. José Félix Aguirre Garrido** por ser un buen guía, por su paciencia, comprensión, apoyo y confianza, y por darme acceso a su servidor *Nautillus* para la realización de algunos análisis bioinformáticos.

A los miembros de la Comisión de Evaluación del Doctorado en Ciencias Agropecuarias, el **Dr. Germán David Mendoza Martínez**, el **Dr. Juan Esteban Barranco Florido**, el **Dr. Daniel Martínez Gómez** y la **Dra. Silvia Rodríguez Navarro** por haber aceptado y monitoreado este trabajo, mismo que se ha visto enriquecido a lo largo de su desarrollo a través de sus comentarios siempre propositivos.

A la coordinación del Doctorado en Ciencias Agropecuarias, de forma especial al **Dr. Germán David Mendoza Martínez**, por todo el apoyo que me ha brindado durante la realización de mis estudios de Doctorado.

Al **Dr. Francisco Martínez Abarca** Departamento de Microbiología del Suelo y la Planta, Estación Experimental del Zaidín, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Granada, España, por la asesoría brindada sobre análisis bioinformáticos, el tiempo y esfuerzo que realizó para revisar y mejorar mi trabajo y el apoyo y dedicación para la publicación del artículo.

Al **Dr. Jordan Kyril Golubov Figueroa** del Departamento El Hombre y Su Ambiente de la UAM Xochimilco, por permitirnos el uso del invernadero y entablar contacto con el Vivero Terohuico para el montaje de algunos experimentos.

A la **Dra. Guadalupe X. Malda Barrera** y al **Dr. Braulio Ayala García** del Laboratorio de Ecología de la Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro, por proporcionarnos semillas de *E. platyacanthus*, por la asesoría brindada y el espacio para montar uno de los experimentos *in planta*, además de colaborar con el cuidado y la recopilación de datos de éste.

Al **Vivero Terohuico**, especialmente a los biólogos **Erasmus** y **Marco**, por habernos proporcionado semillas y espacio para la realización de algunos experimentos *in planta*, además del tiempo, el trabajo y los cuidados empeñados para asegurar el éxito de dichos experimentos.

A **Elsy**, **Lluvia** y **Emmanuel** por el tiempo, el esfuerzo, el trabajo y la dedicación que invirtieron en el montaje de los experimentos *in planta*.

Al **Dr. Luis Mario Hernández Soto** por facilitarme el acceso al servidor *Nautilus*, propiedad del Laboratorio de Biotecnología Ambiental de la UAM Lerma, además de los softwares necesarios para realizar algunos análisis bioinformáticos.

Al **Dr. César Díaz** por su disposición para el intercambio de conocimientos y su invaluable ayuda para la autenticación de este documento.

A mis compañeros de laboratorio **Ángel**, **Omar**, **Diego**, **Karla**, **Ulises** y **Janette** por facilitar el ambiente para el intercambio de conocimientos, por haber hecho grata la estadía en el laboratorio, por su apoyo, compañía, consejos, pero, ante todo, su amistad.

Agradezco también a todas aquellas personas que han contribuido de alguna manera a mi crecimiento tanto personal como profesional, así como al desarrollo de este proyecto que culmina con esta tesis doctoral.

ABREVIATURAS

ANI: *Average Nucleotide Identity*. Identidad promedio de nucleótidos.

ACC desaminasa: *1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase*. Ácido 1-aminociclopropano-1-carboxilo desaminasa.

CAM: *Crassulacean Acid Metabolism*. Metabolismo ácido de las crasuláceas.

CARD: *Comprehensive Antibiotic Resistance Database*. Base de datos integral de resistencia a antibióticos.

CAT: Aproximación de tasa única para cada sitio para la elaboración de árboles filogenéticos.

cDNA: *Complementary Deoxyribonucleic Acid*. Ácido desoxirribonucleico complementario.

CONAZA: Comisión Nacional de las Zonas Áridas.

CRISPR-Cas: *Clustered Regularly Interspersed Short Palindromic Repeats / CRISPR-associated Cas protein*. Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente intercaladas /proteína Cas asociada a CRISPR.

dDDH: *Digital DNA-DNA Hybridization*. Hibridación digital DNA-DNA.

ddNTPS: *Dideoxy Nucleotides triphosphate*. Didesoxinucleótidos trifosfato.

DNA: *Deoxyribonucleic Acid*. Ácido desoxirribonucleico.

dNTPs: *Deoxy Nucleotides triphosphate*. Desoxinucleótidos trifosfato.

GBS: *Genotyping by sequencing*. Genotipificación por secuenciación.

IAA: *Indole Acetic Acid*. Ácido indol acético.

IAN: *Indole Acetic Acid synthesis via Acetonitrile Pathway*. Vía del acetonitrilo para la síntesis de ácido indol acético.

IPyA: *Indole Acetic Acid synthesis via Indole-3-pyruvate Pathway*. Vía del indol-3-piruvato para la síntesis de ácido indol acético.

JTT: Modelo de evolución Jones Taylor Thornton para la construcción de árboles filogenéticos.

MLSA: *Multilocus Sequence Analysis*. Análisis multilocus de secuencias.

NCBI: *National Center for Biotechnology Information*. Centro Nacional de Información Biotecnológica.

NGS: *Next Generation Sequencing*. Secuenciación de nueva generación.

NOM: Norma Oficial Mexicana

NP-Hard: Problemas computacionales asociados a la construcción del pangenoma de referencia cuando se utilizan genomas fragmentados o existen errores en la formación de *scaffolds*.

ONT: *Oxford Nanopore Technologies*.

³²P: Isótopo radioactivo de Fósforo (P).

PacBio: *Pacific Bioscience*.

PCR: *Polymerase Chain Reaction*. Reacción en cadena de la polimerasa.

PGAP: *Prokaryotic Genome Annotation Pipeline*. Pipeline de anotación de genomas procariotas.

PGPR: *Plant Growth Promotion Rhizobacteria*. Rizobacterias promotoras del crecimiento de plantas.

RagTags: *Rearrangement Tag*. Etiquetas de rearrreglos cromosómicos.

RAST: *Rapid Annotation using Subsystem Technology*. Anotación rápida usando tecnología de subsistemas.

REA: *Restriction Enzymatic Analysis*. Análisis de restricción enzimática.

SEMARNAT: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales.

SH: Test de probabilidad Shimodaira-Hasegawa para la construcción de árboles filogenéticos.

SMRT: *Single Molecule Real Time Sequencing*. Secuenciación en tiempo real de una sola molécula.

SNP's: *Single Nucleotide Polymorphism*. Polimorfismo de nucleótido único.

SOLID®: *Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection*. Secuenciación por ligación y detección de oligonucleótidos.

TAM: *Indole Acetic Acid synthesis via Tryptamine Pathway*. Vía de la triptamina para la síntesis de ácido indol acético.

TGS: *Third Generation Sequencing*. Tecnologías de secuenciación de tercera generación.

TYGS: *Type Strain Genome Server*. Servidor de genomas de cepas tipo.

ZAS: Zonas áridas y semiáridas.

ZMW: *Zero Mode Waveguide*. Guía de ondas de modo cero.

Para facilitar su identificación, las abreviaturas se resaltaron en su primera aparición en el texto con **negritas**.

Las PGPR son un grupo de bacterias asociadas a la rizósfera de las plantas que favorecen su desarrollo y crecimiento a través de diferentes actividades metabólicas como la producción de hormonas vegetales -por ejemplo el ácido indolacético-, la producción de enzimas líticas para solubilizar complejos inorgánicos -conduciendo a la mayor disponibilidad de nutrientes como K, N, P y S-, la inducción de resistencia sistémica de las plantas y el control biológico de fitopatógenos -mediante la producción de compuestos antimicrobianos-, entre otras. Su utilización para la formulación de bioinoculantes ha incrementado en los últimos años ya que han demostrado incrementar el crecimiento y la productividad de diferentes cultivos, principalmente de interés económico, reduciendo la dependencia de fertilizantes y pesticidas químicos, lo que contribuye al establecimiento de una agricultura sostenible.

Las PGPR presentes en ambientes extremos como las zonas áridas son de vital importancia para las plantas que ahí se desarrollan, ya que les proporcionan nutrientes y ayudan a mitigar los efectos de estreses bióticos y abióticos, confiriendo a las plantas nativas, como las cactáceas, la capacidad de crecer en condiciones ambientales difíciles, incrementando su establecimiento y supervivencia, por lo que los estudios de la comunidad bacteriana asociada a cactáceas son de gran interés.

Uno de los enfoques más utilizados hoy en día para dicho fin es el análisis genómico ya que permite conocer la diversidad de organismos cultivables y no cultivables, realizar análisis genéticos, filogenéticos y taxonómicos, además de detectar genes de interés en bacterias con potencial biotecnológico como las cepas *P. atacamensis* EMP42, *Stenotrophomonas* sp. EMP41 y *B. inaquosorum* EMP2, que son cepas aisladas de la rizósfera de *E. platyacanthus*, con características genómicas importantes que le confieren la capacidad de promover el crecimiento de las plantas y cuyo uso es confiable en términos de bioseguridad pues no son bacterias patógenas de humanos ni animales.

ABSTRACT

PGPR are a group of bacteria associated with the rhizosphere of plants promoting their development and growth through different metabolic activities, such as, the production of plant hormones -for example indoleacetic acid-, the production of lytic enzymes to solubilize inorganic complexes -leading to greater the availability of nutrients such as K, N, P and S-, the induction of systemic resistance in plants, and the biological control of phytopathogens -through the production of antimicrobial compounds- among others. Their use in the formulation of bioinoculants has increased in recent years, as they have been shown to increase the growth and productivity of different crops, mainly those of economic interest, reducing the dependence on chemical fertilizers and pesticides, and contributing to the establishment of a more sustainable agriculture.

PGPR present in extreme environments like arid zones are of vital importance for the plants growing there, as they provide nutrients and help in mitigating the effects of biotic and abiotic stresses; giving native plants, such as cacti, the ability to grow in difficult environmental conditions, thus increasing their establishment and survival. In this sense, the studies focusing on the bacterial community associated with cacti are of great interest.

Currently, one of the most widely used approaches for this purpose is genomic analysis, since it allows us to know the diversity of cultivable and non-cultivable organisms, to perform genetic, phylogenetic and taxonomic analyses, and to detect genes of interest in bacteria with biotechnological potential. The bacterial strains *Pseudomonas atacamensis* EMP42, *Stenotrophomonas* sp. EMP41 and *B. inaquosorum* EMP2, were isolated from the rhizosphere of *Echinocactus platyacanthus*, share the ability to promote plant growth and their use is reliable in terms of biosafety since they are not pathogenic for humans.

CONTENIDO

COMITÉ TUTORAL	I
COMISIÓN DE EVALUACIÓN.....	II
FINANCIAMIENTO	III
DEDICATORIA	IV
AGRADECIMIENTOS	V
ABREVIATURAS	VIII
RESUMEN	XI
ABSTRACT.....	XII
CONTENIDO	XIII
1. ÍNDICE DE FIGURAS	1
2. ÍNDICE DE TABLAS.....	2
3. INTRODUCCIÓN	3
3.1. Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR)	3
3.1.1. Mecanismos de la promoción del crecimiento	3
3.1.2. PGPR en zonas áridas	4
3.1.3. PGPR asociadas a cactáceas (<i>Echinocactus platyacanthus</i>).....	5
3.2. Secuenciación de DNA y análisis genómico	7
3.2.1. Secuenciación de genomas.....	7
3.2.2. Análisis genómicos	10
3.2.3. Análisis filogenómico	11
3.2.4. Genómica comparativa	13
4. ANTECEDENTES	15
5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	16
6. HIPÓTESIS	16
7. OBJETIVOS.....	16
7.1. Objetivo general	16
7.2. Objetivos específicos	16
8. METODOLOGÍA	17
8.1. Obtención de bibliotecas genéticas.....	18
8.2. Análisis bioinformático para el ensamble de genomas	18
8.3. Identificación basada en genoma.....	20
8.4. Identificación de genes relacionados con actividades PGPR	20

8.5. Identificación de sitios CRISPR-Cas, genes de resistencia y evaluación de patogenicidad.....	20
8.6. Genómica comparativa	20
9. RESULTADOS.....	21
9.1. Reconstrucción y comparación genómica de <i>Pseudomonas atacamensis</i> EMP42.....	21
9.1.1. Introducción	21
9.1.2. Resultados y discusión	23
9.1.2.1. Análisis taxonómico basado en la secuencia del gen 16S rRNA ...	23
9.1.2.2. Reconstrucción genómica y anotación funcional de <i>P. atacamensis</i> EMP42	24
9.1.2.3. Comparación genómica de <i>P. atacamensis</i> EMP42	31
9.1.3. Conclusiones	37
9.1.4. Perspectivas	37
9.2. <i>Stenotrophomonas</i> sp. cepa EMP41, nueva especie con características PGPR aislada de <i>Echinocactus platyacanthus</i>.	38
9.2.1. Introducción	38
9.2.2. Resultados y discusión	39
9.2.2.1. Análisis taxonómico basado en la secuencia del gen 16S rRNA ...	39
9.2.2.2. Reconstrucción genómica y anotación funcional de <i>Stenotrophomonas</i> sp. EMP41	41
9.2.2.3. Comparación genómica de <i>Stenotrophomonas</i> sp. EMP41	46
9.2.3. Conclusiones	51
9.2.4 Perspectivas	51
9.3. Genómica comparativa de <i>Bacillus</i> sp. EMP2, aislada de la rizósfera de <i>E. platyacanthus</i>.....	52
9.3.1. Introducción	52
9.3.2. Resultados y discusión.	54
9.3.2.1. Análisis taxonómico basado en el gen 16S rRNA.....	54
9.3.2.2. Reconstrucción genómica y anotación funcional de <i>Bacillus</i> sp. EMP2.....	56
9.3.2.3. Comparación genómica de <i>B. inaquosorum</i> EMP2	61
9.3.3. Conclusiones	67
10. CONCLUSIONES GENERALES.	68

11. REFERENCIAS	69
12. ANEXOS	94
ANEXO I. Medios de cultivo y soluciones	94
ANEXO II. Protocolo de extracción de DNA	98
ANEXO III. Electroforesis de DNA	99
ANEXO IV. Protocolo de cuantificación de DNA en fluorómetro	100
Preparación de estándares	100
Preparación de las muestras	100
Calibración del equipo	100
Lectura de muestras	100
ANEXO V. Análisis bioinformático para el ensamble de los genomas bacterianos	101
Procesamiento de datos obtenidos con la plataforma <i>Illumina MiSeq</i>	101
Procesamiento de datos obtenidos con la plataforma <i>PacBio</i>	102
ANEXO VI. Amplificación del gen 16S rRNA por PCR	103
ANEXO VII. Protocolo de purificación de productos de PCR	104
ANEXO VIII. Clonación del gen 16S rRNA	105
Preparación de células competentes	105
Ligación del plásmido con el gen 16S rRNA	105
ANEXO IX Transformación de bacterias por electroporación	107
Transformación de células competentes	107
Selección y aislamiento de bacterias transformadas	107
ANEXO X. Extracción de plásmido por la técnica de <i>Miniprep</i>	109
ANEXO XI. Análisis bioinformático de secuencias del gen 16S rRNA	110
ANEXO XII. Análisis bioinformático para genómica comparativa	112
13. ARTÍCULOS	116
Genotypic and Phenotypic Characterization of <i>Pseudomonas atacamensis</i> EMP42 a PGPR Strain Obtained from the Rhizosphere of <i>Echinocactus platyacanthus</i> (Sweet Barrel)	116
Complete genome of the opportunistic pathogen <i>Nocardia vulneris</i> strain LPB4002 and its biosynthetic potential	130
14. CURSOS	134
15. CONGRESOS	139
16. RETRIBUCIÓN SOCIAL	145

1. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Flujo de trabajo para el procesamiento de las muestras desde el cultivo bacteriano hasta la obtención y análisis del genoma de cada cepa en estudio. ...	17
Figura 2: Flujo de trabajo correspondiente al ensamblaje de los genomas bacterianos.....	18
Figura 3: Árbol filogenético de la cepa EMP42 y cepas tipo de <i>Pseudomonas</i>	24
Figura 4: Mapa del genoma cerrado de <i>P. atacamensis</i> EMP42	25
Figura 5: Curva <i>Pan-Core genome</i> de <i>P. atacamensis</i>	33
Figura 6: Pangenoma de <i>P. atacamensis</i>	34
Figura 7: Árbol filogenómico de <i>P. atacamensis</i>	35
Figura 8: Diagrama de Venn de los 208 clústeres de proteínas que la cepa <i>P. atacamensis</i> EMP42 comparte con alguna cepa de referencia.....	36
Figura 9: Árbol filogenético de la cepa EMP41 y cepas tipo de <i>Stenotrophomonas</i>	40
Figura 10: Mapa del genoma cerrado de <i>Stenotrophomonas</i> sp. EMP41.....	41
Figura 11: Comparación genómica de <i>Stenotrophomonas</i> spp.....	48
Figura 12: Árbol filogenómico de <i>Stenotrophomonas</i> spp.....	49
Figura 13: Diagrama de Venn de los 820 clústeres de proteínas que la cepa <i>Stenotrophomonas</i> sp. EMP41 comparte con alguna de las cepas de referencia	50
Figura 14: Árbol filogenético de la cepa EMP2 y cepas tipo de <i>Bacillus</i>	55
Figura 15: Mapa del genoma cerrado de <i>Bacillus</i> sp. EMP2.....	56
Figura 16: Curva <i>Pan-Core genome</i> de <i>B. inaquosorum</i>	63
Figura 17: Pangenoma de <i>B. inaquosorum</i>	64
Figura 18: Árbol filogenómico de <i>B. inaquosorum</i>	65
Figura 19: Diagrama de Venn de los 109 clústeres de proteínas que la cepa <i>B. inaquosorum</i> EMP2 comparte con alguna de las cepas de referencia.....	66

2. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Características de algunas plataformas de secuenciación de nueva generación.....	10
Tabla 2: Características PGPR de <i>P. atacamensis</i> EMP42.....	22
Tabla 3: Parámetros de crecimiento de plántulas de <i>A. thaliana</i> inoculadas con <i>P. atacamensis</i> EMP42.	22
Tabla 4: Comparación de secuencias de las 2 copias del gen 16S rRNA clonadas de la cepa EMP42 con la base de datos de genes 16S rRNA de cepas tipo de EzBioCloud.....	23
Tabla 5: Genes involucrados en las características PGPR de <i>P. atacamensis</i> EMP42.	26
Tabla 6: Métricas básicas de los 7 genomas completos de <i>Pseudomonas atacamensis</i> utilizados para la genómica comparativa	32
Tabla 7: Características PGPR de <i>Stenotrophomonas</i> sp. EMP41.	39
Tabla 8: Comparación de secuencias de las 2 copias del gen 16S rRNA clonadas de la cepa EMP41 con la base de datos de genes 16S rRNA de cepas tipo de EzBioCloud.....	40
Tabla 9: Genes involucrados en las características PGPR de <i>Stenotrophomonas</i> sp. EMP41.....	42
Tabla 10: Métricas básicas de los 10 genomas completos de <i>Stenotrophomonas</i> utilizados para genómica comparativa	47
Tabla 11: Características PGPR de <i>Bacillus</i> sp. EMP2.	53
Tabla 12: Comparación de secuencias de las 4 copias del gen 16S rRNA clonadas de la cepa EMP2 con la base de datos de genes 16S rRNA de cepas tipo de EzBioCloud.....	54
Tabla 13: Genes involucrados en las características PGPR de <i>B. inaquosorum</i> EMP2.	57
Tabla 14: Métricas básicas de los 8 genomas completos de <i>B. inaquosorum</i> utilizados para la genómica comparativa	62
Tabla 15: Mezcla de reacción para amplificación por PCR del gen 16S rRNA...	103
Tabla 16: Programa de termociclador para la amplificación por PCR del gen 16S rRNA	103
Tabla 17: Mezcla de reacción para la ligación del plásmido con el inserto.....	105

3. INTRODUCCIÓN

3.1. Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR)

Las rizobacterias promotoras del crecimiento de plantas, conocidas como **PGPR** por sus siglas en inglés (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*; Kloepper, 1978), son un grupo de bacterias asociadas a la rizósfera de las plantas que favorecen su desarrollo y crecimiento mediante diversas actividades metabólicas. El uso de este tipo de bacterias en cultivos vegetales ha producido incrementos en el crecimiento y la productividad vegetal (De-Bashan *et al.*, 2007), además de reducir la dependencia de fertilizantes químicos y, por consiguiente, la contaminación asociada a ellos (Chauhan *et al.*, 2015).

Las PGPR también son utilizadas con fines de biorremediación (Grobela *et al.*, 2015), y son una parte integral en los procesos de revegetación y reforestación ya que, al adicionarlos al suelo, pueden reducir la erosión de éste (Bashan *et al.*, 2005a). Por lo tanto, el estudio de las PGPR es de gran relevancia en el ámbito agroecológico, ya que podrían ayudar a combatir el rápido deterioro ambiental, garantizar una mejor productividad agrícola y mejorar la estructura del suelo (Basu *et al.*, 2021), lo que conduce al establecimiento de una agricultura más sostenible (Chauhan *et al.*, 2015).

3.1.1. Mecanismos de la promoción del crecimiento

La rizósfera es la zona de suelo bajo influencia del sistema radicular de las plantas, caracterizada por tener gran actividad microbiana debido al intercambio químico que tiene lugar (Chauhan *et al.*, 2015). Por un lado, las plantas liberan una amplia gama de compuestos orgánicos como azúcares, aminoácidos y ácidos orgánicos, que sirven como fuente de carbono y energía para los microorganismos. Estos microorganismos, a su vez, llevan a cabo diversas actividades metabólicas que impactan en el desarrollo de las plantas al proporcionar nutrientes como nitrógeno, fósforo, hierro, entre otros (Rico-Jiménez *et al.*, 2021; Velasco-Jiménez *et al.*, 2020).

Dichas actividades metabólicas catalogadas como mecanismos PGPR se clasifican en dos grandes grupos: a) mecanismos directos, son aquellos que influyen en el metabolismo de la planta, en este grupo se encuentran la producción de inductores de crecimiento como las hormonas vegetales (auxinas, citocininas y giberelinas) que propician la elongación y división celulares y radicales; y el aumento de la disponibilidad de nutrientes como nitrógeno, fósforo y hierro, necesarios para la síntesis de biomoléculas esenciales, mediante la solubilización de dichos minerales (Ferreira *et al.*, 2019). b) mecanismos indirectos, son aquellos que no influyen en el desarrollo de la planta, sin embargo, si colaboran con el mismo, induciendo la resistencia sistémica y ejerciendo control biológico sobre microorganismos fitopatógenos, mediante la competencia por nutrientes y la producción de compuestos antagónicos como antibióticos y enzimas líticas (Tabassum *et al.*, 2017).

La mayoría de las bacterias promotoras del crecimiento de las plantas pertenecen al Phylum *Pseudomonadota*, anteriormente Proteobacteria (Oren & Garrity, 2021), siendo *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Rhizobium*, *Erwinia*, *Serratia*, *Acinetobacter* y *Alcaligenes* algunos de los géneros más representativos (Basu *et al.*, 2021; Carro & Nouioui, 2017). Sin embargo, también se han identificado PGPR en otros géneros y Phyla. Por ejemplo, dentro del Phylum *Bacillota*, anteriormente Firmicutes (Hashmi *et al.*, 2020; Oren & Garrity, 2021), destacan géneros como *Aneurinibacillus*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Clostridium*, *Lysinibacillus*, *Virgibacillus*, *Terribacillus*, *Staphylococcus* y *Halobacillus*. Asimismo, en el Phylum Actinomycetota, anteriormente Actinobacteria (Oren & Garrity, 2021) se han encontrado géneros como *Agromyces*, *Arthrobacter*, *Streptomyces*, *Frankia*, *Solirubrobacter*, *Patulibacter* y *Rubrobacteria* (Boukhatem *et al.*, 2022). Distintos miembros de estos géneros bacterianos se han encontrado asociados a plantas en diferentes ecosistemas y condiciones climáticas, desde bosques (Li *et al.*, 2022) y selvas (Arce-Inga *et al.*, 2022; Lirio-Paredes *et al.*, 2022) hasta manglares (Shakilabanu *et al.*, 2012) y zonas áridas y semiáridas (Saraf *et al.*, 2011).

3.1.2. PGPR en zonas áridas

Las zonas áridas, que comprenden las categorías de hiperáridas, áridas y semiáridas, se caracterizan por una escasez hídrica significativa, con precipitaciones anuales inferiores al promedio mundial, que para 2023 fue de 742.31 mm (Global Climate Monitor). Bajo este parámetro, son consideradas como zonas hiperáridas las que reciben entre 0 y 100 mm de precipitación anual, las zonas áridas entre 100 y 250 mm, y las zonas semiáridas entre 250 y 500 mm (González Medrano, 2012).

En México, las zonas áridas y semiáridas (**ZAS**) representan el 65% del territorio nacional (SADR, 2023), y cerca del 26% de estas zonas se encuentra en alguna etapa del proceso de desertificación (CONAZA, 2019). Debido principalmente a las actividades humanas, que aumentan la velocidad del proceso por encima de la capacidad de recuperación del ecosistema, dificultando su desarrollo sostenible, la conservación del mismo, y limitando su productividad (Granados-Sánchez *et al.*, 2013).

La degradación de las ZAS conlleva a la desertificación, y abarca varios aspectos; erosión eólica y/o hídrica, deterioro de las características fisicoquímicas y biológicas del suelo (que en estas regiones es una capa poco profunda), reducción de la biomasa vegetal y sustitución o desaparición de la vegetación primaria (González Medrano, 2012; Granados-Sánchez *et al.*, 2013; Zhang, 2020). La vegetación natural de las zonas áridas está sujeta a condiciones ambientales drásticas y extremas que limitan su supervivencia, lo que aunado a factores antropogénicos como el cambio en el uso del suelo (hacia agrícola, ganadero, o asentamientos humanos), provoca la degradación y desaparición de la cubierta vegetal que protege al suelo de la erosión (Alanís Flores & Velazco Macías, 2008; Bashan *et al.*, 2005b).

En suelos erosionados el restablecimiento de la cobertura vegetal no puede darse de manera natural, sin embargo, varias especies de plantas de las ZAS, especialmente las que pertenecen a la familia *Cactaceae*, pueden funcionar como estabilizadores del suelo y ser usadas para prevenir la erosión (Bashan *et al.*, 2005b). Por lo anterior, el estudio de las cactáceas en las ZAS es de particular interés a pesar de que poseen baja tasa de establecimiento y lento crecimiento, que limitan su uso (Ibarra-Díaz *et al.*, 2016).

En este contexto, el uso de bacterias de tipo PGPR es importante ya que, por un lado, desempeñan un papel fundamental en la dinámica biogeoquímica, la estructura del suelo y la estabilidad del ecosistema, proveyendo de nutrientes a los suelos estresados donde el desarrollo de microorganismos nativos es pobre (Saraf *et al.*, 2011). Por otro lado pueden conferir a las cactáceas la capacidad de crecer en las condiciones de estrés ambiental a las que están sujetas, ya que realizan actividades que contrarrestan dicho estrés como la producción de osmolitos, la mejora de la captación de agua y nutrientes, la protección contra daños oxidativos y la estimulación del desarrollo radicular por producción de ácido indol acético (**IAA**), **ACC desaminasa** y expopolisacáridos (Etesami & Maheshwari, 2018; Karnwal *et al.*, 2023), incrementando su capacidad de adaptación y su supervivencia.

3.1.3. PGPR asociadas a cactáceas (*Echinocactus platyacanthus*)

México es uno de los principales centros de diversidad cactológica del mundo, albergando 670 de las cerca de 2,000 especies existentes de cactáceas, de las cuales el 77% son endémicas (Schwertner-Charão *et al.*, 2022). Los miembros de la familia *Cactaceae* constituyen un grupo de plantas morfológicamente heterogéneo, capaz de ocupar los estratos herbáceo, arbustivo y arbóreo (Portillo *et al.*, 2021), y se concentran principalmente en las zonas áridas y semiáridas del país como los desiertos de Chihuahua y Sonora.

Las cactáceas son uno de los grupos de plantas mejor adaptadas a las condiciones ambientales extremas de las zonas áridas, gracias a características como la succulencia, que les permite acumular gran cantidad de agua; la reducción o eliminación de la presencia de hojas, que disminuye la evapotranspiración; el metabolismo ácido de las crasuláceas (**CAM**), que permite realizar la fase oscura de la fotosíntesis y apertura de estomas durante la noche, para reducir la evapotranspiración; el desarrollo de estructuras de protección contra depredadores y radiación solar como espinas, lana, cerdas; y un sistema radicular extenso y ramificado que sirve de anclaje en los suelos adelgazados de las zonas áridas y para la captación de agua y nutrientes (Jiménez-Sierra, 2011). Además, las cactáceas proveen servicios ecosistémicos vitales, incluyendo la alimentación humana y animal, proporcionan hábitat y refugio a la fauna silvestre, y contribuyen a la prevención de la erosión y la estabilización del suelo antes mencionadas, que destacan la importancia ecológica de estas plantas (Huamaní-Sulca *et al.*, 2020; Stavi, 2022).

Por otro lado, las cactáceas son unos de los grupos de plantas más amenazadas, la **NOM-059-SEMARNAT-2010** incluye cerca de 300 especies en alguna categoría de riesgo de supervivencia (Herrera, 2010); la pérdida de cualquier especie vegetal conlleva a un proceso de empobrecimiento biológico y a la pérdida de los servicios ecosistémicos relacionados con la especie extinta. Es por ello que han surgido un gran número de estrategias de protección y conservación de cactáceas amenazadas como la recolección de semillas, la propagación *ex situ* de especies vegetales en jardines botánicos (Domínguez & Aldana, 2021), el establecimiento de áreas de protección como reservas naturales, programas de adopción y cuidado (SEMARNAT, 2018), y la inoculación con bacterias de tipo PGPR para aumentar su capacidad de adaptación y supervivencia en programas de conservación de especies en riesgo (Li *et al.*, 2024).

Es por ello que en los últimos años el estudio de las comunidades bacterianas asociadas a cactáceas ha ido en aumento, sin embargo los estudios sobre PGPR constituyen un campo relativamente poco explorado, considerando que existen cerca de 2000 especies de cactáceas y sólo se han estudiado las comunidades bacterianas asociadas a menos del 1% de ellas; algunas de las especies estudiadas son *Pachycereus pringlei*, *Stenocereus thurberi*, *Mammillaria fraileana* y *Opuntia cholla* (Bashan & de-Bashan, 2010), *Mammillaria carnea*, *Opuntia pilifera* y *Stenocereus stellatus*, tres cactáceas nativas del Valle de Tehuacán-Cuicatlán (Aguirre-Garrido *et al.*, 2012) y *Mammillaria* spp y *Coryphanta radians*, nativas del semidesierto de Querétaro (Chávez-Ambríz *et al.*, 2016).

Otros estudios se enfocan en el análisis de la fracción cultivable de bacterias asociadas a cactáceas de la región de Caatinga, Brasil, capaces de crecer con baja disponibilidad de agua, para ser utilizadas en la recuperación de suelos desérticos, al brindarle a las plantas la capacidad de crecer en condiciones de estrés hídrico (Kavamura *et al.*, 2013). En Perú se estudiaron las comunidades bacterianas presentes en la rizósfera de *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill (Campaña-Olaya *et al.*, 2018). Respecto a *Echinocactus platyacanthus*, se aislaron y caracterizaron bacterias asociadas a su rizósfera (de la Torre-Hernández *et al.*, 2020) y, en otro trabajo, se realizó el análisis del efecto que tiene la contaminación por Zn en el suelo, sobre la diversidad de la microbiota asociada a ella, para explicar su alta tolerancia al estrés ambiental (Carabalí *et al.*, 2019).

Bacterias de los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas* suelen ser las más abundantes en la rizósfera de las plantas (Debasis *et al.*, 2019), específicamente en *E. platyacanthus* (de la Torre-Hernández *et al.*, 2020); han sido reportados como fijadores de nitrógeno (Erturk *et al.*, 2010; Nakbanpote *et al.*, 2014), solubilizadores de fosfato (Datta *et al.*, 2011; Ogata *et al.*, 2016), productores de fitohormonas (Erturk *et al.*, 2010; Nakbanpote *et al.*, 2014) y con capacidad de ejercer control biológico sobre diferentes hongos fitopatógenos (Figueroa-López *et al.*, 2016; Wahyudi *et al.*, 2011).

Es importante mencionar que algunas especies de los géneros bacterianos antes mencionados han sido reportados como patógenos oportunistas en humanos, por ejemplo, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Stenotrophomonas maltophilia*, es por ello que en términos de bioseguridad es indispensable hacer una identificación taxonómica precisa de las PGPR que puedan ser utilizadas como bioinoculantes.

3.2. Secuenciación de DNA y análisis genómico

Las técnicas moleculares como la secuenciación de **DNA** y los análisis genómicos se erigen como herramientas eficientes en la clasificación bacteriana (Keswani *et al.*, 2019). Estas herramientas permiten conocer la diversidad de organismos cultivables y no cultivables en diversos hábitats; además de realizar análisis genéticos, filogenéticos y taxonómicos a nivel de especie, analizar la transferencia horizontal de genes y detectar genes asociados a la biosíntesis de enzimas, proteínas u otros metabolitos relevantes con potencial biotecnológico (Cadena-Zamudio *et al.*, 2016).

3.2.1. Secuenciación de genomas

La secuenciación de DNA es una herramienta fundamental en la biología molecular utilizada desde hace décadas, a lo largo de los años se han desarrollado diferentes técnicas de secuenciación que se clasifican en primera, segunda y tercera generación, de acuerdo con características que serán explicadas más adelante. El primer método de secuenciación, desarrollado por Sanger y Coulson en 1975, se basaba en la síntesis enzimática del DNA en ausencia de uno de los cuatro desoxinucleótidos trifosfato (**dNTPs**), lo que permitía detener la síntesis previo al dNTP faltante; los fragmentos de DNA resultantes, cada uno con un extremo 3' diferente según el dNTP omitido, se trataban con exonucleasa T4 en presencia de un único dNTP marcado radioactivamente, esta enzima eliminaba los nucleótidos del extremo 3' hasta encontrar el dNTP complementario al presente en la reacción, de esta manera solo las cadenas que terminaban en el dNTP específico permanecían marcadas. Finalmente, los fragmentos marcados se separaban por tamaño mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y se visualizaban por autoradiografía. La comparación de las bandas obtenidas en cada una de las cuatro reacciones (una por cada dNTP), permitía deducir la secuencia de DNA (Sanger & Coulson, 1975).

Posteriormente Maxam y Gilbert (1977) propusieron una técnica de secuenciación química en la cual el DNA es cortado en bases específicas con enzimas de restricción y sometido a modificaciones químicas que incluyen el marcaje radioactivo con ³²P, la escisión de una G/A o C/T, y la metilación de la base que no fue removida, por último los fragmentos se resuelven en un gel de poliacrilamida (uno para purinas y otro para pirimidinas) donde se aprecia un patrón de bandas claras y oscuras resultantes de la metilación de A/C y G/T respectivamente (Maxam & Gilbert, 1977).

El método de Maxam y Gilbert tuvo poca relevancia por la complejidad de la técnica y fue sustituido por métodos más rápidos y eficientes como la secuenciación enzimática de Sanger, la cual en ese mismo año tuvo una modificación importante que consistió en el reemplazo de los dNTPs marcados con radioactividad por di-desoxiribonucleótidos trifosfato (**ddNTPs**, que carecen del OH en el extremo 3', necesario para la polimerización de nucleótidos), permitiendo la terminación controlada de la cadena de DNA, los ddNTPs estaban marcados con ^{32}P para su detección por autoradiografía (Sanger *et al.*, 1977), posteriormente el marcaje se hizo con fluoróforos para su detección automatizada por electroforesis capilar (método moderno).

Estas técnicas de secuenciación son consideradas como la primera generación de tecnologías para la determinación de la secuencia del DNA y, aunque la secuenciación de Sanger sigue siendo utilizada para la obtención de secuencias de regiones específicas que incluyen marcadores moleculares como el gen 16S rRNA y genes que codifican una gran variedad de enzimas. Desde hace varios años se ha buscado no solo la secuenciación de fragmentos particulares, sino la obtención de genomas completos, por lo que han surgido diferentes tecnologías más rápidas, poderosas, eficientes y rentables, comparadas con la secuenciación de Sanger (Dorado *et al.*, 2021).

Las nuevas tecnologías de secuenciación, conocidas como **NGS** por sus siglas en inglés (*Next Generation Sequencing*), se caracterizan principalmente por su capacidad para generar una gran cantidad de datos mediante la secuenciación masiva y en paralelo (desde miles hasta centenas de miles) de moléculas independientes de DNA, incrementado notablemente el rendimiento del proceso de secuenciación. Considerando que las técnicas de primera generación solo permitían analizar desde una hasta 64 reacciones de secuenciación a la vez, resultó en un gran avance en el rendimiento de la secuenciación de DNA (Hu *et al.*, 2021).

Existen diferentes plataformas de secuenciación NGS que se caracterizan por la técnica utilizada para la generación de datos y por el tipo, cantidad y calidad de los mismos (Knief, 2014). Sin embargo todas comparten una serie de pasos universales: 1) Ruptura del genoma total en fragmentos pequeños de DNA (entre 200 y 1000 pb); 2) Elaboración de bibliotecas mediante la unión de oligos en los extremos de los fragmentos pequeños de DNA; 3) Amplificación de los fragmentos anteriores; y 4) Secuenciación de los fragmentos amplificados mediante diferentes metodologías (Eguiarte *et al.*, 2013), principalmente por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (**PCR**; Quail *et al.*, 2012).

Las plataformas más representativas de esta generación de secuenciadores son la pirosecuenciación 454 de Roche (actualmente en desuso), las plataformas **SOLiD®** (por sus siglas en inglés, Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection) de Life Technologies, la secuenciación por semiconducción de Ion Torrent de la misma compañía y las diferentes plataformas de *Illumina®*. Estas últimas siguen siendo las

más utilizadas hasta el día de hoy y se basan en la secuenciación por síntesis utilizando una tecnología de terminación reversible y etiquetas fluorescentes, en bibliotecas de DNA producidas por amplificación en puente dentro de una celda de flujo (Bentley *et al.*, 2008).

Los distintos sistemas de secuenciación de nueva generación tienen en común la producción de datos en gran magnitud, en el orden de las “Gigabases” o “Terabases” (Cadena-Zamudio *et al.*, 2016), lo que facilita la obtención de genomas completos en una corrida. Los resultados obtenidos permiten realizar análisis metagenómicos, caracterizar relaciones evolutivas entre genomas o dilucidar el papel de diversas proteínas, enzimas o metabolitos (Cadena-Zamudio *et al.*, 2016), por lo que se han vuelto indispensables en el campo de la investigación científica (Lee & Tang, 2012). Sin embargo, los datos producidos por plataformas NGS son constituidos por secuencias cortas con longitudes de 250-800 pb, que al ensamblarse pueden presentar variaciones estructurales o regiones de baja complejidad (segmentos cuya composición está sesgada, presentada como secuencias repetidas o con composición aleatoria; Hu *et al.*, 2021).

Para reducir los errores del ensamble de lecturas cortas de las plataformas NGS se han ido desarrollando nuevas tecnologías que constituyen la tercera generación de plataformas de secuenciación (*Third Generation Sequencing*, **TGS** por sus siglas en inglés). Se caracteriza principal es producir secuencias largas de 10 a 300 kb, además a diferencia de los secuenciadores de segunda generación, éstos no requieren un paso de amplificación durante la preparación de la librería genómica, permitiendo la secuenciación directa de una sola molécula (Bleidorn, 2016). Esta generación de secuenciadores está representada por la secuenciación en nanoporos de *Oxford Nanopore Technologies* (**ONT**) y la secuenciación en tiempo real de una sola molécula (**SMRT**) de *Pacific Bioscience* (**PacBio**; Quail *et al.*, 2012). Esta última se basa en la secuenciación en tiempo real de la molécula de DNA, incorporando nucleótidos marcados con fluorescencia, en una matriz de aluminio conocida como chip o celda SMRT con alrededor de 150,000 pozos, cada uno denominado guía de ondas de modo cero (**ZMW**), donde se llevan a cabo reacciones simultáneas que pueden generar datos de hasta 1 Gb (Rhoads & Au, 2015).

La selección de la plataforma a utilizar depende del tipo de estudio que se desea realizar, de la cantidad y calidad de datos que se desea obtener, de los costos y de la disponibilidad del equipo de secuenciación (Eguiarte *et al.*, 2013); el uso de cada plataforma representa ventajas y desventajas (Tabla 1) que deben evaluarse para su adecuada selección.

Tabla 1: Características de algunas plataformas de secuenciación de nueva generación (Eguiarte et al., 2013; Hu et al., 2021)

Plataforma	Compañía	Lecturas por corrida	Longitud de las lecturas (pb)	Ventajas	Desventajas	Aplicaciones
SOLiD	Life Technologies	1.4 x 10 ⁶	75+35	Pocos errores de secuenciación Barato Mucha información	Lecturas cortas Análisis de datos complicado	Resecuenciación de genomas Caracterización y conteo de transcriptomas Obtención de SNP's , RagTags y GBS Metagenómica
Ion Torrent	Life Technologies	0.4-5.5 x 10 ⁶	200-400	Alta precisión Buena profundidad de cobertura Fragmentos grandes	Preparación compleja Caro	Secuenciación y res secuenciación de genomas Obtención de SNP's Caracterización de transcriptomas
HiSeq	Illumina	5,000 x 10 ⁶	2 x 150	Barato	Lecturas cortas	Resecuenciación de genomas
MiSeq	Illumina	25 x 10 ⁶	2 x 300	Alta precisión	Lecturas cortas	Caracterización y conteo de transcriptomas
NextSeq	Illumina	260 x 10 ⁶	2 x 150	Buena profundidad de cobertura	Largos tiempos de corrida	Caracterización y conteo de transcriptomas
NovaSeq	Illumina	20,000 x 10 ⁶	2 x 250			Metagenómica
Sequel I y II	PacBio	370,000 x 10 ⁶	6-20 kb	Secuenciación en tiempo real Fragmentos largos Reduce ambigüedades	Errores de secuenciación Alto costo	Secuenciación y res secuenciación de genomas Metagenómica
Minlon	ONT	4.4 x 10 ⁶	Hasta 300 kb	Secuenciación rápida y barata Secuenciador portátil Análisis de datos en tiempo real	Alta tasa de error	Secuenciación de DNA, amplicones y cDNA Secuenciación directa de RNA

3.2.2. Análisis genómicos

El estudio del genoma completo de un organismo requiere de diferentes etapas de análisis que van desde la secuenciación hasta el uso herramientas bioinformáticas para realizar la reconstrucción genómica, la identificación de la función de genes de interés, análisis filogenómicos y análisis comparativos. Iniciando con la secuenciación, una vez que se ha seleccionado la plataforma para dicho fin, se obtiene un conjunto de datos en crudo constituido por un gran número de secuencias con longitudes variadas (*reads*), que deben ser procesadas para la

obtención de la secuencia y la estructura genómica, entendiendo esta última como la organización del material genético en cromosomas, plásmidos, etc.

Para la reconstrucción genómica, en primer lugar, es necesario realizar un análisis de calidad de las secuencias con softwares como NGSQC Toolkit (Patel & Jain, 2012), PRINSEQ (Schmieder & Edwards, 2011) y fastQC, siendo este último el más utilizado. El puntaje de Phred o puntaje de calidad Q es el parámetro generalmente utilizado por estas herramientas para evaluar la calidad de las secuencias, este consiste en la estimación de la probabilidad de que una base se haya determinado incorrectamente, dicha probabilidad es dada por una escala logarítmica negativa ($Q = -10 \times \log_{10}(P)$, donde p es la probabilidad de error estimada para esa base llamada) de modo que una puntuación q más alta indica una llamada de base más segura (Ewing *et al.*, 1998).

Posteriormente es necesaria la eliminación de secuencias de baja calidad, adaptadores y el filtrado de lecturas cortas, para ello existen herramientas como Trimmomatic (Bolger *et al.*, 2014), Cutadapt (Martin, 2011), Atropos (Didion *et al.*, 2017) y BBDuk de BBtools, entre otros. Una vez depuradas las lecturas se procede a la reconstrucción de la secuencia genómica completa, para ello se cuenta con distintos ensambladores como Spades (Bankevich *et al.*, 2012), Flye (Kolmogorov *et al.*, 2019) o Velvet (Zerbino & Birney, 2008); o paqueterías bioinformáticas como los softwares Geneious Prime (Kearse *et al.*, 2012) o DNASTar (DNASTar Inc.); que permiten el ensamble de las múltiples reads obtenidas, en una secuencia única correspondiente al genoma que se secuenció, además de determinar la organización del material genético, análisis filogenómicos, realizar la comparación de genomas y la anotación de genes.

Con la secuencia completa del genoma es posible realizar, por un lado, análisis filogenómicos y, por otro, la anotación de genes que consiste en la identificación o predicción de las características funcionales de las regiones codificantes del genoma, es decir, la localización de genes y la predicción de los productos derivados de ellos como enzimas, RNAs, etc. (Seemann, 2014). Para ello existen un gran número de softwares y plataformas que pueden ser utilizados, por ejemplo; Prokka (Seemann, 2014), Bakta (Schwengers *et al.*, 2021), Diamond (Buchfink *et al.*, 2014), Prokaryotic Gene Annotation Pipeline (**PGAP**; Tatusova *et al.*, 2016), Rapid Annotation using Subsystem Technology (**RAST**; Aziz *et al.*, 2008), entre otros. La anotación funcional de genomas completos es la base para realizar análisis de genómica comparativa.

3.2.3. Análisis filogenómico

Es un método que permite conocer la relación entre un grupo de organismos, comprende el estudio de la historia evolutiva de las especies, la evolución de genes, la identificación taxonómica, el descubrimiento de nuevas especies, así como la investigación de la ruta de infección de microorganismos patógenos, entre otros (Horiike, 2016).

Este tipo de análisis se realizan utilizando datos moleculares como las secuencias de DNA, RNA y proteínas. Anteriormente la filogenia bacteriana se infería a partir del análisis de la secuencia que codifica para la subunidad pequeña del ribosoma (16S rRNA), sin embargo, hoy se sabe que este gen carece de precisión para la delimitación de especies (Janda & Abbott, 2007), por lo que con el paso del tiempo han surgido nuevas técnicas que superan esta limitante como los análisis multilocus de secuencias (**MLSA**) y los análisis basados en el genoma completo (filogenómicos) como la hibridación DNA-DNA.

El MLSA es una técnica ampliamente utilizada para la postulación de relaciones filogenéticas entre microorganismos, consiste en el análisis de secuencias concatenadas de 6 a 8 genes centrales o de copia única (Kim *et al.*, 2021). Originalmente esta técnica se realizaba a partir de la amplificación de marcadores moleculares mediante PCR y su posterior secuenciación. Las secuencias de los genes (o fragmentos de ellos) se procesaban con herramientas bioinformáticas hasta la construcción de una secuencia concatenada, que se utilizaba para la construcción de árboles filogenéticos (Hanage *et al.*, 2006; Maiden *et al.*, 1998). Estos árboles son representaciones gráficas que pretenden establecer las historias evolutivas del microorganismo en estudio respecto a otros microorganismos relacionados previamente reportados en bases de datos como pubMLST (Jolley *et al.*, 2018).

El surgimiento de nuevas tecnologías de secuenciación de genomas completos ha revolucionado algunas técnicas de análisis molecular, como el MLSA, que ahora se puede llevar a cabo mediante la identificación de los genes marcadores dentro de una secuencia genómica completa. Esto permite la construcción de la filogenia a partir de la secuencia concatenada construida con los genes identificados, lo que reduce costos y trabajo para este tipo de análisis. Los resultados obtenidos son similares o superiores a los que se obtendrían con el MLSA tradicional. Actualmente existen diferentes herramientas con las que se puede realizar este tipo de análisis a partir de la secuencia genómica de un microorganismo como; seq2mlst (Carroll, 2017), BTypers (Carroll *et al.*, 2017), MLSTar (Ferrés & Iraola, 2018), entre otros.

Sin embargo, aunque el MLSA produce una clasificación taxonómica más precisa que la generada con el análisis del gen 16S rRNA, se basa en utilizar sólo una pequeña fracción del total de genes, por lo que no puede considerarse un verdadero método filogenético a escala genómica (Meier-Kolthoff & Göker, 2019). Por otro lado existen análisis filogenómicos que consisten en la comparación de la secuencia genómica completa mediante la hibridación DNA-DNA *in silico* **dDDH** (*digital DNA-DNA Hybridization*), utilizada por herramientas como el *Bacterial Genome Tree de BV-BRC Genomics* y el *Type Strain Genome Server (TYGS)* de *Digital Resources of the Leibniz Institute* (Meier-Kolthoff & Göker, 2019), o la identidad promedio de nucleótidos **ANI** (*Average Nucleotide Identity*), parámetro en que se basa la herramienta TrueBac ID de EzBioCloud (Ha *et al.*, 2019) para la clasificación bacteriana.

Estas herramientas analizan las secuencias genómicas previamente reconstruidas, mediante su comparación con bases de datos propias y permiten inferir las relaciones filogenéticas entre las bacterias de forma precisa al comparar la mayor parte de los genes centrales de las cepas en estudio con los de cepas tipo depositadas en sus bases de datos. En términos generales esta comparación consiste en la identificación de entre 1 a 3 genes centrales (dependiendo de la herramienta), incluido el 16S rRNA, que se utilizan para determinar que cepas tipo son más cercanas a la cepa en estudio. Posteriormente se calculan distancias intergenómicas con algoritmos propios de cada herramienta; estas distancias son utilizadas para calcular las relaciones entre genomas mediante el parámetro de identidad utilizado por cada herramienta (dDDH o ANI), lo que contribuye a la delimitación de especies y, de manera opcional, culminar con la construcción de un árbol filogenómico.

3.2.4. Genómica comparativa

La genómica comparativa comprende un conjunto de técnicas que permiten encontrar relaciones entre genomas distantes o cercanos, identificar componentes útiles para entender las relaciones bioquímicas, fisiológicas y patogénicas de los microorganismos, realizar reconstrucciones filogenéticas, predecir funciones de genes hipotéticos, identificar regiones intrónicas, sitios de *splicing* y regiones no codificadoras (Chaves *et al.*, 2010) y, principalmente conocer la diversidad genética dentro de las especies (Tettelin *et al.*, 2008).

La reconstrucción y la comparación de genomas bacterianos han revelado que la organización cromosómica no se conserva a lo largo de la escala evolutiva y posee un contenido génico muy variable, ya que su evolución ocurre principalmente por transferencia horizontal de genes, lo que deriva en que dos cepas de la misma especie bacteriana puedan tener hasta un 20% de divergencia genética (Bistue, 2018; Mollerach, 2006).

Con el análisis genómico comparativo existe la posibilidad de inferir relaciones entre las características de organización de los cromosomas y la fisiología celular (Chaves *et al.*, 2010), sin embargo, uno de sus principales usos es identificar las secuencias conservadas entre las diferentes cepas de una misma especie bacteriana, lo que se conoce como genoma central (Carhuaricra-Huaman & Setubal, 2024).

También es posible revelar regiones genéticas variables o exclusivas de secuencias comparadas (Genoma accesorio), que contribuyen al establecimiento del pangenoma de una especie, que es el conjunto de todos los genes no redundantes de la misma. Esto permite proponer su historia evolutiva, incluida la recombinación homóloga, la pérdida, duplicación o ganancia de genes mediante elementos móviles o transferencia horizontal (Zhou *et al.*, 2020), y la base de las diferencias fenotípicas entre organismos relacionados (Carhuaricra-Huaman & Setubal, 2024).

Lo anterior permitió ampliar el conocimiento en diferentes campos como la medicina y la fitopatología, donde destacan la epidemiología genómica de bacterias patógenas, el descubrimiento de genes asociados con la virulencia y la resistencia a los antibióticos, el descubrimiento de los sistemas de defensa antifagos (Carhuaricra-Huaman & Setubal, 2024), entre otros. Además, es posible identificar secuencias genéticas relacionadas con las características benéficas de las bacterias PGPR, punto donde se sitúa este trabajo.

Los análisis comparativos de genomas requieren de múltiples herramientas como EDGAR (Dieckmann *et al.*, 2021), PATRIC (Wattam *et al.*, 2018), PanX (Ding *et al.*, 2018), Roary (Page *et al.*, 2015), Panseq (Laing *et al.*, 2010), Anvio (Eren *et al.*, 2020), OrhoVenn (Wang *et al.*, 2015), JVenn (Bardou *et al.*, 2014), entre otros, que en conjunto permiten la construcción del Pangenoma y el establecimiento de los genomas central y accesorio.

4. ANTECEDENTES

En el laboratorio de Ecología Molecular de la UAM-X, se realizaron dos muestreos de la rizósfera de biznagas silvestres nativas de Tolimán, Querétaro, uno al inicio y el otro al final de la temporada de lluvias (junio y octubre de 2015, respectivamente), asumiendo que la cantidad de agua presente en el suelo podría influir sobre la estructura y composición de las comunidades bacterianas presentes en las muestras.

A partir de dichas muestras rizosféricas de *E. platyacanthus*, se aislaron bacterias utilizando medio para heterótrofos. Se obtuvieron 268 aislados cuya morfología colonial fue caracterizada, considerando la forma, color, luz transmitida y reflejada, superficie, elevación, borde y consistencia de las colonias, así como las características celulares que se definieron a través de la tinción de Gram (Salinas-Virgen, 2015).

Posteriormente, se extrajo el DNA genómico de los 268 aislados y se amplificó el gen 16S ribosomal, mismo que fue utilizado para realizar un análisis de restricción enzimática (**REA**) que permitió hacer el agrupamiento de las bacterias en función de sus patrones de restricción. Con esto se obtuvieron 41 ribotipos donde se ubicaron los 268 aislados (Salinas-Virgen, 2015). Se seleccionaron cepas representativas de cada ribotipo para estudios posteriores considerando un representante para los que tuvieran uno o dos aislados agrupados y dos representantes para los que tuvieran más de 5 aislados agrupados (4 grupos). Con esto se obtuvieron 45 cepas en estudio a las que se les determinó *in vitro* su potencial para producir indoles (las 45 cepas), solubilizar fosfato inorgánico (36 cepas), producir sideróforos para diferentes iones metálicos, principalmente hierro (6 cepas), y ejercer control biológico sobre el hongo fitopatógeno *Fusarium solani* (22 cepas), como forma de evaluar sus capacidades PGPR.

Una identificación taxonómica basada en la secuenciación de genes 16S rRNA ubicó a estas bacterias en los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Stenotrophomonas* principalmente (Salinas-Virgen, 2019), con lo que se determinó que cepas de un mismo género e incluso de la misma especie poseen marcadas diferencias en las actividades PGPR que realizan por lo que se seleccionó aleatoriamente un representante de cada género (*Stenotrophomonas* sp. EMP41, *Bacillus* sp. EMP2 y *Pseudomonas atacamensis* EMP42) para hacer un análisis de genómica comparativa con cepas previamente reportadas, que permita identificar los determinantes genéticos que producen dichas variaciones.

5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuáles son las diferencias en la composición y estructura genómica de las cepas bacterianas de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Stenotrophomonas* previamente seleccionadas, respecto a los genomas depositados de cepas relacionadas, que generan variaciones en las actividades PGPR que realizan?

6. HIPÓTESIS

Las cepas bacterianas en estudio tienen una organización genómica distinta en los determinantes genéticos relacionados con sus capacidades PGPR, comparadas con cepas de la misma especie que no presentan o presentan menores capacidades PGPR.

7. OBJETIVOS

7.1. Objetivo general

Establecer y anotar las diferencias genómicas entre las cepas; *Stenotrophomonas* sp. EMP41, *Bacillus* sp. EMP2 y *Pseudomonas atacamensis* EMP42, con los genomas reportados de cepas cercanas filogenéticamente, que puedan relacionarse con sus capacidades PGPR.

7.2. Objetivos específicos

1. Reevaluar las relaciones filogenómicas de las cepas en estudio mediante hibridación DNA-DNA *in silico*
2. Secuenciar y reconstruir el genoma de las cepas bacterianas seleccionadas.
3. Proponer un modelo de organización de los genomas obtenidos.
4. Realizar la anotación funcional e identificar los genes/operones de las regiones diferenciales entre genomas, que puedan estar relacionados a las capacidades PGPR de las bacterias en estudio.

8. METODOLOGÍA

Las cepas *Bacillus* sp. EMP2, *Stenotrophomonas* sp. EMP41 y *Pseudomonas atacamensis* EMP42, cuyas características PGPR fueron previamente evaluadas (de la Torre-Hernández *et al.*, 2020), se procesaron de acuerdo con el flujo de trabajo que se muestra en la Figura 1. Fueron cultivadas en medio líquido TY (Anexo I). El cultivo bacteriano se utilizó para la extracción del DNA genómico con el *Isolate II: Genomic DNA kit* (Meridian Bioscience, Cat: BIO-52066), con las instrucciones del fabricante (Anexo II). La obtención de DNA de alto peso molecular se observó mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa al 0.8%, teñido en solución de bromuro de etidio (5 µg/mL), usando como marcador de tamaño molecular DNA de *λ*EcoRI (Anexo III). Se hizo la cuantificación en fluorómetro Qubit 4 con el kit *1X dsDNA HS Assay Kit* (Invitrogen, Ref: Q33230), siguiendo las instrucciones del fabricante (Anexo IV); y la evaluación de pureza con el Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Cat: ND-2000).

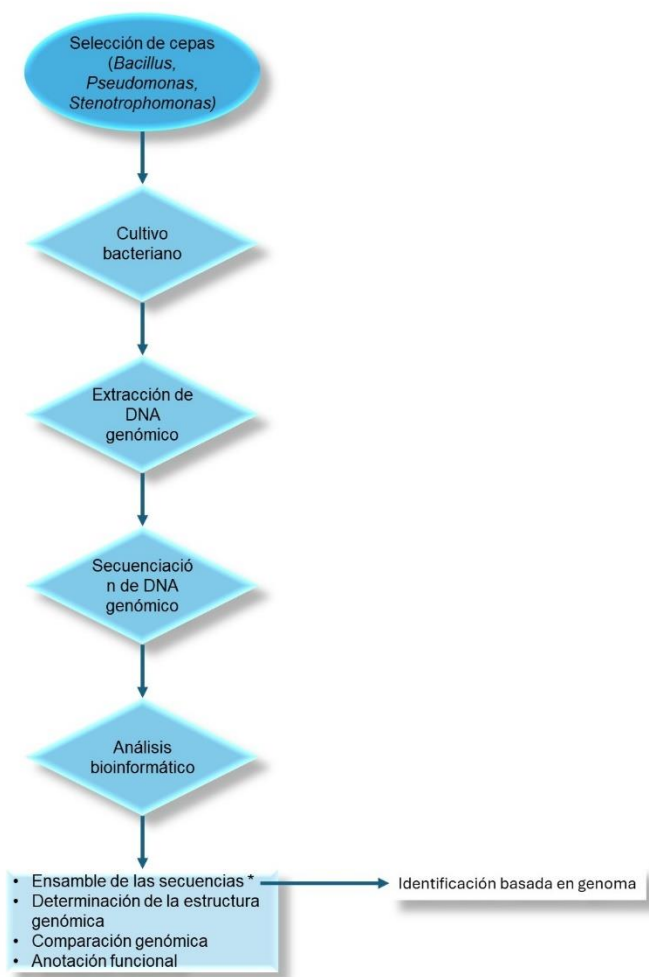


Figura 1: Flujo de trabajo para el procesamiento de las muestras desde el cultivo bacteriano hasta la obtención y análisis del genoma de cada cepa en estudio.

8.1. Obtención de bibliotecas genéticas

El DNA extraído de cada bacteria se envió a secuenciar al *Integrated Microbiome Resource* (IMR) de la Universidad de Dalhousie en Canadá, con la plataforma *Illumina MySeq* o *PacBio*, bajo protocolos estándar del IMR.

8.2. Análisis bioinformático para el ensamble de genomas

Los archivos fastQ obtenidos del servicio de secuenciación se procesaron como se indica en el flujo de trabajo de la Figura 2, con el uso del software bioinformático *Geneious prime* (Kearse *et al.*, 2012), cuya descripción completa se encuentra en el Anexo V.

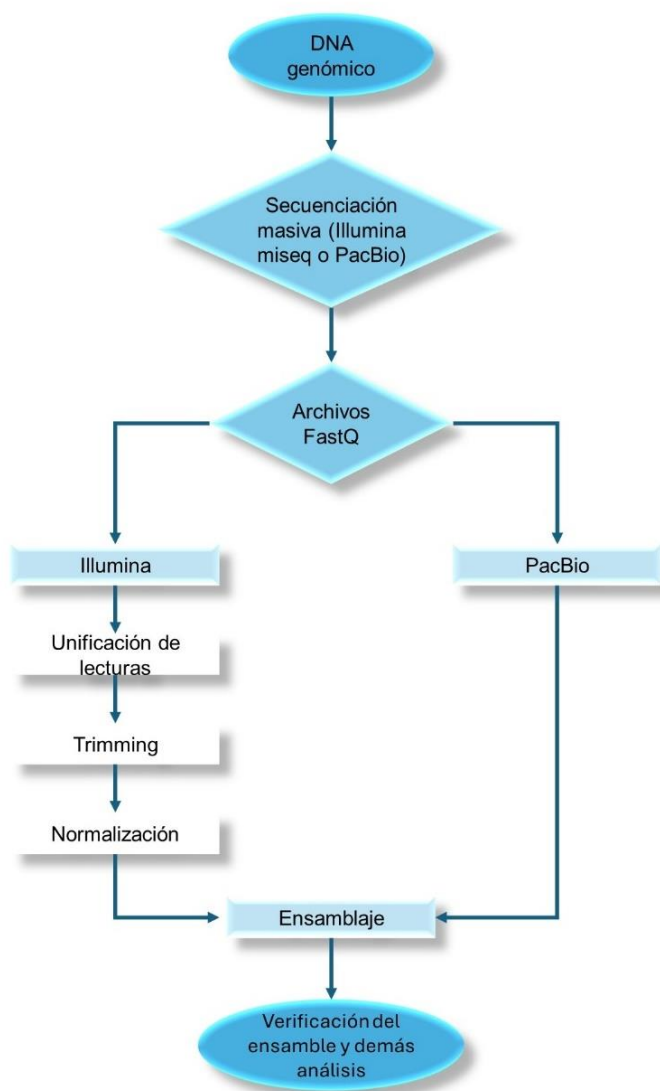


Figura 2: Flujo de trabajo correspondiente al ensamblaje de los genomas bacterianos a partir de los datos de secuenciación obtenidos con las plataformas *Illumina* y *PacBio*.

El orden y la orientación de los contigs obtenidos del ensamble se determinaron por comparación con un genoma de referencia con la herramienta Mauve (Darling *et al.*, 2004). El genoma de referencia seleccionado corresponde a la especie tipo más cercana a la cepa en estudio, de acuerdo con un análisis filogenético de los genes 16S rRNA clonados de las cepas en estudio.

La clonación del gen 16S rRNA se realizó con el objetivo de eliminar la divergencia genética inherente a este gen. El proceso de clonación consistió en la amplificación del gen 16S rRNA por PCR con los primers 8F y 1492R (Anexo VI), la purificación de los productos con el *Wizard Genomic DNA Purification Kit* (PROMEGA, Ref: A1120) con las instrucciones recomendadas por el fabricante (Anexo VII) y la unión de los productos de amplificación purificados a un vector de clonación con el *pGEM®-T Easy Vector Systems* (Promega, Cat: A1360) con las instrucciones recomendadas por el fabricante (Anexo VIII).

Posteriormente se transformaron células competentes de *E. coli* DH5α con el vector de clonación mediante electroporación (Anexo IX), las células transformadas se seleccionaron en medio LB (Anexo I) suplementado con X-Gal (50µg/mL), IPTG (0,1mM). y ampicilina (50µg/mL). Después de la incubación a 37°C, durante 24h, se seleccionaron las colonias transformantes y se extrajeron sus respectivos plásmidos mediante *minipreps* (Anexo X, Green & Sambrook, 2012).

Los plásmidos se linealizaron con la enzima de restricción *ScaI*. Los tamaños de los amplicones del gen 16S rRNA, así como de los plásmidos linealizados se evaluaron mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1%, teñido en solución de Bromuro de Etidio (5µg/mL), usando el marcador de tamaño molecular de 100 a 3,000 pb de *AXYGEN* (ID: PID0173430, Anexo III). Los genes 16S rRNA clonados se enviaron a secuenciar por el método de Sanger, en ambos sentidos de la cadena, con los primers M13-PUC F (5' GTT TTC CCA GTC ACG AC 3') y M13-PUC R (5' CAG GAA ACA GCT ATG AC 3'), a Macrogen, Corea.

Las secuencias obtenidas se analizaron y editaron con el software *Geneious Prime* (Kearse *et al.*, 2012), siguiendo el protocolo del Anexo XI, para la obtención de la secuencia del gen 16S rRNA completa. Estas secuencias se cargaron en la herramienta 16S-based ID, del servidor web *EzBioCloud*, para su identificación taxonómica (Yoon *et al.*, 2017). Por otro lado, se alinearon con secuencias descargadas de la base de datos de genes 16S rRNA de cepas tipo de *EzBioCloud* (Yoon *et al.*, 2017) y se construyó un árbol filogenético con el método de máxima verosimilitud, el modelo de sustitución nucleotídica Jukes-Cantor, determinado previamente con el software *JModelTest* (Darriba *et al.*, 2012), y un análisis de Bootstrap de 1,000 aleatorizaciones, en el software *Mega 11* (Tamura *et al.*, 2021).

8.3. Identificación basada en genoma

Se hizo una identificación taxonómica de cada cepa en estudio, basada en el análisis de la secuencia genómica completa con dos enfoques, la hibridación *in silico* genome to genome (valor dDDH) en la plataforma TYGS del Instituto Leibniz (Meier-Kolthoff & Göker, 2019) y la identidad promedio de nucleótidos (valor ANI) utilizando la herramienta TrueBack ID de EZBioCloud (Ha *et al.*, 2019).

8.4. Identificación de genes relacionados con actividades PGPR

La anotación funcional de los genomas de las bacterias en estudio se realizó con la herramienta online PGAP del **NCBI** (Tatusova *et al.*, 2016). Paralelamente, se realizó la búsqueda de los genes/operones PGPR reportados en la literatura para los géneros en estudio. Con este listado se identificaron los genes/operones relacionados con las actividades PGPR de las bacterias en estudio.

8.5. Identificación de sitios CRISPR-Cas, genes de resistencia y evaluación de patogenicidad

Los sitios **CRISPR-Cas** se identificaron con el programa CRISPR-Cas Finder (Couvin *et al.*, 2018); los genes de resistencia a antibióticos se identificaron por comparación de la secuencia genómica con la Base de Datos Integral de Resistencia a los Antibióticos (**CARD** por sus siglas en inglés “Comprehensive Antibiotic Resistance Database”; Alcock *et al.*, 2023); y la predicción de la patogenicidad bacteriana con el servidor Pathogen Finder (Cosentino *et al.*, 2013). El mapa de los genomas donde se observan el contenido y sesgo de GC, la anotación funcional, los sitios CRISPR-Cas y los genes de resistencia se generó con la plataforma Proksee (Grant *et al.*, 2023).

8.6. Genómica comparativa

Este análisis requirió el establecimiento de los pangenomas de las bacterias de cada especie para lo que se utilizó el pipeline Roary (Page *et al.*, 2015) con el protocolo del Anexo XII, usando solo genomas completos para evitar problemas computacionales **NP-Hard** (Nguyen *et al.*, 2014). Los genomas central y accesorio se evaluaron en la plataforma OrthoVenn (Wang *et al.*, 2015), identificando genes relacionados a actividades PGPR y generando un árbol filogenómico que contiene el número de ortogrupos presentes en cada secuencia genómica con el software FastTree2 (Price *et al.*, 2010) a través de OrthoVenn (Wang *et al.*, 2015), utilizando el método de máxima verosimilitud, el modelo de evolución Jones Taylor Thornton (**JTT**, Jones *et al.*, 1992) con una aproximación de tasa única para cada sitio (**CAT**) y el test de probabilidad Shimodaira-Hasegawa (**SH**, Shimodaira & Hasegawa, 1999) para la determinación de la topología del árbol.

9. RESULTADOS

9.1. Reconstrucción y comparación genómica de *Pseudomonas atacamensis* EMP42

9.1.1. Introducción

El género *Pseudomonas*, perteneciente al Phylum *Pseudomonadota* (Oren & Garrity, 2021), Clase *Gammaproteobacteria*, es característico por agrupar bacilos Gram negativos de origen ambiental, encontrados generalmente en suelo y agua, donde desempeñan funciones ecológicas importantes (Lalucat *et al.*, 2022). Algunas especies del género son patógenos oportunistas de humanos como *P. aeruginosa* asociada principalmente a enfermedades nosocomiales entre las que se enlistan; neumonía, osteomielitis, infecciones de la piel y del tracto urinario, entre otras (Tuon *et al.*, 2022); o fitopatógenos como *P. syringae* patógeno de una gran variedad de plantas como tomate, primula y *Arabidopsis* (Yang *et al.*, 2023).

Sin embargo, la mayoría de las especies de *Pseudomonas* generalmente son saprofitas inofensivas, pues es uno de los géneros más abundantes en la rizósfera de plantas como *E. platyacanthus* (de la Torre-Hernández *et al.*, 2020), y presentan una amplia gama de actividades metabólicas que permiten incluirlo en el grupo de las PGPR (Zboralski & Fillion, 2020). Son capaces de fijar nitrógeno, solubilizar potasio, producir fosfatasas y ácidos orgánicos para la solubilización de fosfatos, sintetizar fitohormonas que mejoran el desarrollo de tejidos vegetales, producir sideróforos que intervienen en la captación de iones metálicos como el hierro, así como la producción de antibióticos y diversas enzimas líticas que le confieren la capacidad de ejercer control biológico sobre diferentes hongos fitopatógenos, entre otros (Sah *et al.*, 2021).

Los efectos de la inoculación de diferentes especies vegetales con *Pseudomonas* con características PGPR han sido ampliamente reportados, por ejemplo; el incremento del desarrollo radicular de tomate inoculado con *P. palleroniana*, *P. fluorescens* y *P. moraviensis* productoras de IAA, reflejado en el peso húmedo y seco de las raíces (Cochard *et al.*, 2022); la desintoxicación de plantas de garbanzo, contaminadas con Cd, con *P. fluorescens* productora de sideróforos (Syed *et al.*, 2023); *P. psychrotolerans* mitiga el estrés salino y promueve el crecimiento de maíz, disminuyendo la concentración de ácido abscísico en 1.5 veces, y la concentración de ácido jasmónico en un 14.9% respecto a un control sin inocular (Kubi *et al.*, 2021), el ácido abscísico, conocido como hormona del estrés, interviene en la señalización química para el cierre de estomas y almacenamiento de agua (Khan *et al.*, 2020), y el ácido jasmónico, conocido como hormona de defensa, contribuye a la respuesta de defensa de las plantas frente a estrés biótico y abiótico (Khan *et al.*, 2019); y *P. azotoformans* mejora el crecimiento de trigo en condiciones de estrés por sequía mediante la producción de un expopolisacárido, incrementando el peso fresco (25.1%) y seco (19.1%) de la raíz y el peso fresco (11.5%) y seco (10.5%) de los brotes respecto a un control sin inocular (Ansari *et al.*, 2021).

P. atacamensis una especie recientemente descrita, fue aislada de la rizósfera de plantas en floración en el desierto de Atacama, Chile, (Poblete-Morales *et al.*, 2020), y posee potencial PGPR (Poblete-Morales *et al.*, 2020). Hasta la fecha, se han reportado 25 cepas pertenecientes a esta especie junto con sus respectivos genomas en la base de datos de NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Estas cepas han sido aisladas de diferentes ambientes como jardines urbanos comunitarios (Mafiz *et al.*, 2021), aislados clínicos (Tohya *et al.*, 2022), heces de vaca (NCBI), suelo agrícola (Zboralski *et al.*, 2022) y asociadas a plantas (Dolan *et al.*, 2024; Elmahi *et al.*, 2021; Girard *et al.*, 2021); estas últimas exhiben algún rasgo PGPR.

Además, en el estudio previo descrito en los antecedentes, se aisló la cepa *P. atacamensis* EMP42, cuyas características PGPR *in vitro* e *in planta* han sido descritas con anterioridad (Tabla 2, de la Torre-Hernández *et al.*, 2020; y Tabla 3, Salinas-Virgen, 2019); e inicialmente fue identificada como *Pseudomonas koreensis* mediante un análisis taxonómico basado en el gen 16S rRNA (Salinas Virgen *et al.*, 2020), sin embargo el análisis de su secuencia genómica reveló que en realidad se trata de una nueva cepa de *Pseudomonas atacamensis*.

Tabla 2: Características PGPR de *P. atacamensis* EMP42

Producción de Indoles	SPO ₄
50.43±1.59 µg/mL	68.86±1.52 µg/mL
Biocontrol <i>F. solani</i>	Producción de Sideróforos
47.50±2.5%	Fe, Ni, Cu, K, Zn, Mo, V, Cd, Co y Pb

Tabla 3: Parámetros de crecimiento de plántulas de *A. thaliana* inoculadas con *P. atacamensis* EMP42

Tratamiento	Supervivencia (%)	RF (%)	MS* (s)	SS* (s)	IA (s)	NS*	NI*	RD* (cm)	HAB* (cm)
Inoculadas	100	100	2.57	4.83	2.57	6.85	36	2.59	13.46
No-inoculadas	91.67	90.91	3.27	5.43	3.27	2.72	15.6	2.23	10.68

Los valores corresponden a la media de 15 plantas evaluadas 7 semanas después de la siembra. Los parámetros con * mostraron diferencias significativas. RF - plantas que forman rosetas; MS - media del tiempo de aparición del tallo principal; SS - tiempo medio de aparición de tallos secundarios; IA - media del tiempo de aparición de las inflorescencias; NS - número medio de tallos; NI: número medio de inflorescencias; RD – diámetro medio de la roseta; HAB - media de la altura del cuerpo aéreo; s - semanas.

Dado que el género *Pseudomonas* es un género en constante expansión y posee importantes características biotecnológicas y PGPR, resalta la importancia de realizar la identificación taxonómica precisa junto con un análisis de genómica comparativa que permita describir las diferencias genéticas que le confieren características con potencial biotecnológico a cepas como *P. atacamensis* EMP42.

9.1.2. Resultados y discusión

9.1.2.1. Análisis taxonómico basado en la secuencia del gen 16S rRNA

La secuenciación de genes 16S rRNA clonados tenía como objetivo producir una identificación más precisa de la cepa EMP42, evitando la divergencia genética inherente a este gen. Las 2 secuencias obtenidas correspondieron a 2 de las 5 copias de los genes 16S rRNA que contiene dicha cepa, la comparación con la base de datos EzBioCloud, con la herramienta 16S-based ID, mostró que una copia del gen tiene mayor similitud con la cepa tipo *Pseudomonas atacamensis* M7D1T, y la copia 2 con *Pseudomonas iranensis* SWRI54T (Tabla 4). Las relaciones filogenéticas de la cepa EMP42 y otras *Pseudomonas* estrechamente relacionadas se evaluaron con un árbol filogenético basado en secuencias dicho gen (Figura 3); como era de esperar, las secuencias de ambas copias del gen se agruparon con las cepas tipo antes mencionadas.

Tabla 4: Comparación de secuencias de las 2 copias del gen 16S rRNA clonadas de la cepa EMP42 con la base de datos de genes 16S rRNA de cepas tipo de EzBioCloud

	Cepa tipo más cercana	Número de acceso	Cobertura (%)	Similitud (%)
Clona 1 (PP838374)	<i>Pseudomonas atacamensis</i> M7D1 ^T	SSBS01000008	100	99.92
Clona 2 (PP838375)	<i>Pseudomonas iranensis</i> SWRI54 ^T	JABWQU010000041	100	99.73

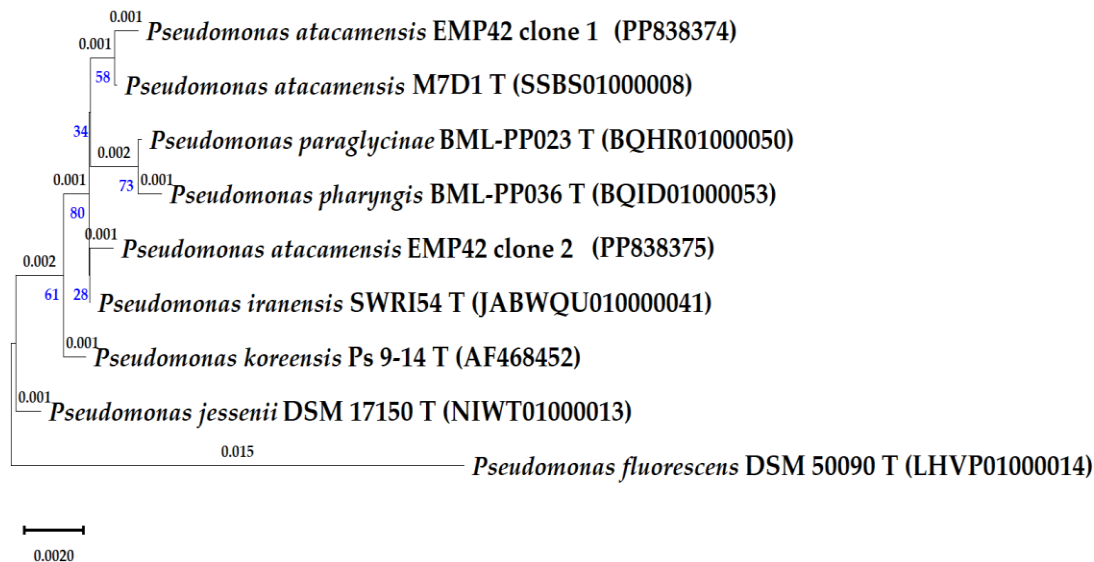


Figura 3: Árbol filogenético de la cepa EMP42 y cepas tipo de *Pseudomonas*, basado en secuencias parciales del gen 16S rRNA (1250 pb). La filogenia se infirió utilizando el método de Máxima Verosimilitud; se muestra el árbol con la mayor probabilidad logarítmica (-3020,63). El porcentaje de árboles en los que se agruparon los taxones asociados se muestra debajo de las ramas en azul. Las pequeñas longitudes de las ramas que representan el número de sustituciones por sitio (valores encima de las ramas) corresponden a 1 o 2 variaciones en las secuencias de genes.

Estas diferencias en la identificación apuntaron a la necesidad de una caracterización más profunda basada en la secuenciación del genoma, pues aunque la secuencia del gen 16S rRNA se seleccionó inicialmente como marcador molecular para estudios filogenéticos bacterianos, hoy en día se sabe que carece de suficiente poder discriminatorio para diferenciar especies, por lo que se requieren estudios más precisos como MLSA y la taxogenómica (Lalucat *et al.*, 2020).

9.1.2.2. Reconstrucción genómica y anotación funcional de *P. atacamensis* EMP42

De la secuenciación del genoma completo se obtuvieron un total de 858,366 lecturas emparejadas, con una longitud media de 246.7 bases, lo que brinda una cobertura del genoma de 99x. La calidad de las secuencias fue evaluada mediante el puntaje Phred, el cual fue de 30 para el 95.1% de ellas. Las lecturas con un puntaje de Phred mayor a 20 fueron utilizadas para realizar el ensamble *de novo* con el ensamblador de Geneious Prime, obteniendo 110 contigs de buena calidad con un N50 de 923,094 pb, una L50 de 2 contigs y un porcentaje de guanina-citocina de 59.78%. El mapeo de los contigs con una longitud mayor a 1,000 pb culminó en la obtención de la reconstrucción genómica que se muestra en la Figura 4, dónde se observa un genoma cerrado de 6,145,328 bp, tamaño que se aproxima al de los genomas reportados para cepas de *Pseudomonas atacamensis*.

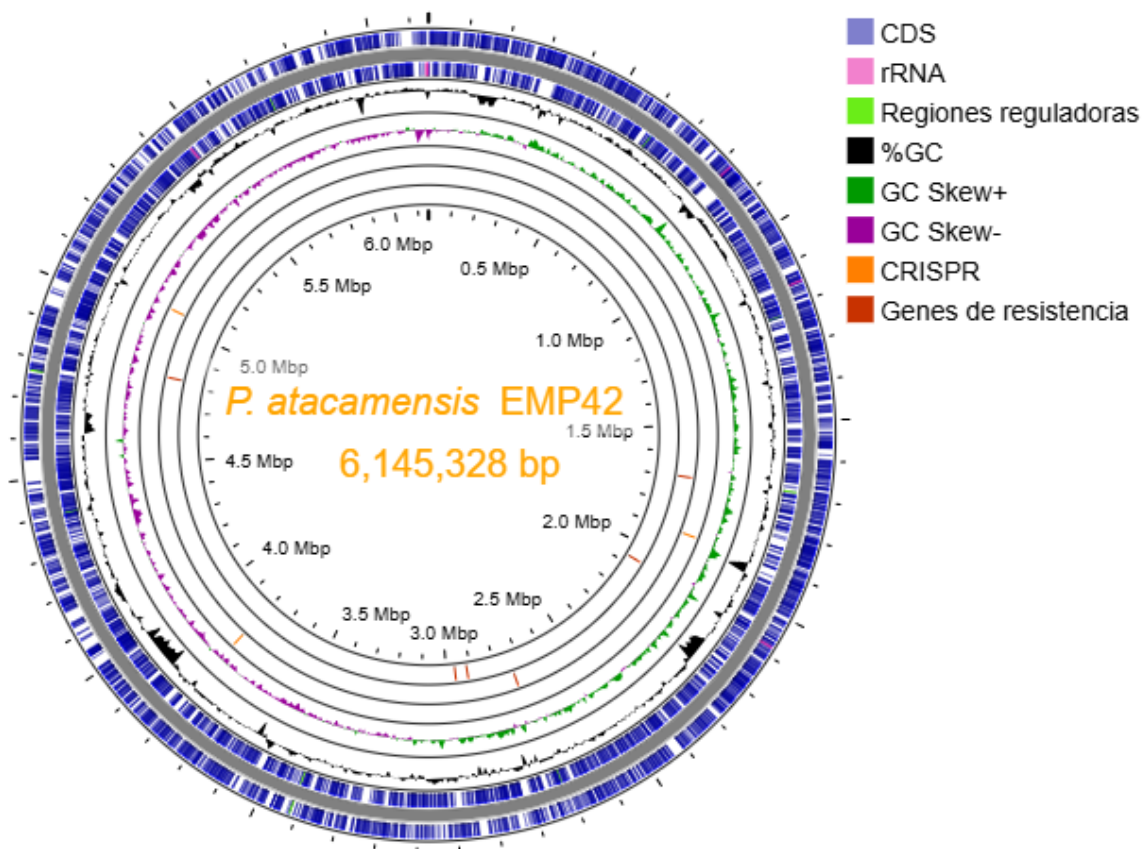


Figura 4: Mapa del genoma cerrado de *P. atacamensis* EMP42 con una longitud de 6.145.328 pb. Desde el exterior: los círculos 1 y 2 encierran los genes de la cadena principal y la cadena complementaria respectivamente; el círculo 3 muestra el contenido de GC; el círculo 4, el sesgo de GC; el círculo 5 los loci CRISPR-CAS (2 líneas naranja); los círculos 6 y 7 los genes de resistencia (6 líneas rojo oscuro). La escala en Mbp se indica en el círculo interior.

La identificación basada en la secuencia del genoma completo confirmó que la cepa EMP42 es *P. atacamensis*. La herramienta TruebackID de EzBioCloud (Ha *et al.*, 2019) arrojó un valor ANI de 96.82%, mayor al límite establecido de 95% para la delimitación de especie (Yoon *et al.*, 2017). Mientras que el software TYGS del Instituto Leibniz (Meier-Kolthoff & Göker, 2019) produjo un valor dDDH de 72.3%, mayor al límite establecido de 70%, (Meier-Kolthoff *et al.*, 2014), ambos parámetros son esenciales en la definición de especie bacteriana.

Adicionalmente se encontró una secuencia de 36,460 pb, que no forma parte del cromosoma principal, de acuerdo con la anotación funcional corresponde al genoma parcial de un bacteriófago. Cabe mencionar que, si bien existe un gran número de reportes de bacteriófagos asociados a *Pseudomonas*, hasta el momento no existen reportes de bacteriófagos asociados a *P. atacamensis* en la plataforma de NCBI.

Con la anotación del genoma realizada se predijeron 5,572 genes, 3 loci de ncRNA 9 regiones reguladoras de cobalamina, guanidina, fosfatasa trehalosa 6-fosfato (TPP), S-adenosil-L-homocisteína, *yybP-ykoY* para detección de manganeso y mononucleótido de flavina (FMN), además de 5 operones completos de rRNA que muestran un 99,94 % de similitud entre sus secuencias 16S. Entre los genes codificantes se encuentran aquellos que intervienen en la producción de enzimas asociadas con actividades PGPR como los genes de los operones *trpABCDE* y *phoABPRUA*, entre otros (Tabla 5).

Tabla 5: Genes involucrados en las características PGPR de *P. atacamensis* EMP42

Característica PGPR	Gen	Nombre del producto
Producción de IAA	<i>iaaM</i>	Monoamina oxidasa
	<i>N</i>	Nitrilasa/cianuro hidratasa/apolipoproteína N-aciltransferasa
	<i>trpA</i>	Triptófano sintasa cadena alfa
	<i>trpB</i>	Triptófano sintasa cadena beta
	<i>trpC</i>	Indol glicerofosfato sintasa
	<i>trpD</i>	Antranilato fosforribosiltransferasa
	<i>trpF</i>	Fosforribosilantranilato isomerasa
Movilidad y quimiotaxis	<i>bdIA_1</i>	Proteína transdutora/sensora de quimiotaxis aceptora de metilo
	<i>heA</i>	Proteína de quimiotáctica CheA
	<i>cheB</i>	Glutamato metilesterasa CheB
	<i>cheR</i>	Metiltransferasa CheR
	<i>cheV</i>	Proteína de quimiotáctica CheV
	<i>cheW</i>	Proteína de transducción de señales de quimiotaxis CheW
	<i>cheY</i>	Regulador de respuesta a quimiotaxis CheY
	<i>cheZ</i>	Fosfatasa de respuesta a la quimiotaxis CheZ
	<i>cpaB</i>	Proteína de ensamblaje de pili FLP CpaB
	<i>cpaC</i>	Proteína de ensamblaje de pili FLP CpaC
	<i>cpaE</i>	Proteína de ensamblaje de pili FLP CpaE
	<i>CS1</i>	Proteína CS1 para la formación de pili contiene el dominio C-terminal
	<i>ctpH</i>	Proteína quimiotáctica aceptora de metilo CtpH
	<i>ctpL</i>	Proteína transdutora/sensora de quimiotaxis aceptora de metilo CtpL
	<i>flaA</i>	Proteína flagelina FlaA
	<i>flaG</i>	Proteína flagelar FlaG
	<i>fleN</i>	Regulador de síntesis flagelar FleN
	<i>flgB</i>	Proteína de varilla del cuerpo basal flagelar FlgB
	<i>flgC</i>	Proteína de varilla del cuerpo basal flagelar FlgC
	<i>flgD</i>	Proteína de ensamblaje de gancho flagelar FlgD
	<i>flgE</i>	Proteína de gancho flagelar FlgE
	<i>flgF</i>	Proteína de bastón del cuerpo basal flagelar FlgF

<i>flgG</i>	Proteína de bastón del cuerpo basal flagelar FlgG
<i>flgH</i>	Proteína del anillo L del cuerpo basal flagelar FlgH
<i>flgI</i>	Proteína del anillo P del cuerpo basal flagelar FlgI
<i>flgJ</i>	Peptidoglicano hidrolasa FlgJ para el ensamblaje flagelar
<i>flgK</i>	Proteína FlgK asociada al gancho flagelar
<i>flgL</i>	Proteína FlgL asociada al gancho flagelar
<i>flgM</i>	Factor anti-sigma de biosíntesis flagelar FlgM
<i>flgN</i>	Proteína flagelar FlgN
<i>flhA</i>	Proteína de biosíntesis flagelar FlhA
<i>flhB</i>	Proteína de biosíntesis flagelar FlhB
<i>flhF</i>	Proteína de biosíntesis flagelar FlhF
<i>fliA</i>	Factor sigma de ARN polimerasa para el operón flagelar
<i>fliE</i>	Proteína gancho-basal del complejo corporal flagelar FliE
<i>fliF</i>	Proteína de anillo/collar MS del cuerpo basal flagelar FliF
<i>fliG</i>	Proteína interruptora del motor flagelar FliG
<i>fliH</i>	Proteína de ensamblaje flagelar FliH
<i>fliI</i>	ATPasa FliI exportadora de la proteína flagelar
<i>fliJ</i>	Proteína de exportación flagelar FliJ
<i>fliK</i>	Proteína de control de la longitud del gancho flagelar FliK
<i>fliL</i>	Proteína asociada al cuerpo basal flagelar FliL
<i>fliM</i>	Proteína interruptora del motor flagelar FliM
<i>fliP</i>	Porina del sistema de secreción flagelar tipo III FlpP
<i>fliQ</i>	Proteína de biosíntesis flagelar FliQ
<i>fliR</i>	Proteína de biosíntesis flagelar FliR
<i>fliS</i>	Proteína de biosíntesis flagelar FliS
<i>fliT</i>	Proteína flagelar FliT
<i>Flp</i>	Pili tipo IVb de la familia FLP
<i>flp/fap</i>	Componente de pili Flp/Fap
<i>gcbA</i>	Glutamato metilesterasa reguladora de la respuesta a la quimiotaxis
<i>gspG</i>	Sistema de secreción tipo II pseudopilina mayor GspG
<i>gspH</i>	Sistema de secreción tipo II pseudopilina menor GspH
<i>gspH/fimT</i>	Pseudopilina de la familia GspH/FimT
<i>gspK</i>	Sistema de secreción tipo II pseudopilina menor GspK
<i>mcpA_1</i>	Proteína quimiotáctica aceptora de metilo
<i>mcpA_2</i>	Proteína quimiotáctica aceptora de metilo
<i>mcpH_1</i>	Proteína transductora/sensora de quimiotaxis que aceptora de metilo
<i>mcpH_2</i>	Transductor sensorial de quimiotaxis
<i>mcpP_2</i>	Transductor sensorial de quimiotaxis
<i>mcpQ_1</i>	Proteína quimiotáctica aceptora de metilo
<i>mcpS</i>	Proteína quimiotáctica aceptora de metilo McpS
<i>mcpU_2</i>	Proteína transductora/sensora de quimiotaxis que aceptora metilo

<i>mcpU_3</i>	Proteína transductora/sensora de quimiotaxis que aceptora metilo
<i>motA</i>	Proteína del estator del motor flagelar MotA
<i>motD</i>	Proteína motora flagelar MotD
<i>otB</i>	Proteína motora flagelar MotB
PAS	Proteína quimiotáctica aceptora de metilo que contiene dominio PAS
<i>pctA</i>	Proteína quimiotáctica aceptora de metilo PctA
<i>pctA</i>	Proteína quimiotáctica aceptora de metilo PctA
<i>pctB</i>	Proteína quimiotáctica aceptora de metilo PctB
<i>pctB</i>	Proteína quimiotáctica aceptora de metilo PctB
<i>pctC</i>	Transductor sensorial de quimiotaxis que aceptor de metilo
<i>wspA</i>	Proteína quimiotáctica aceptora de metilo WspA
<i>wspC</i>	Metiltransferasa de quimiotaxis
<i>ycgR</i>	Proteína de freno flagelar YcgR
<i>Apl</i>	Fosfatasa alcalina
ASGA	1-acil-sn-glicerol-3-fosfato aciltransferasa
<i>corC</i>	Proteína de eflujo de magnesio y cobalto CorC
NaPi	Transportador de fosfato dependiente de sodio
<i>phoB</i>	Proteína reguladora transcripcional PhoB (SphR) del regulón de fosfato
<i>phoD</i>	Fosfatasa alcalina D
<i>phoH</i>	ATPasa relacionada con la proteína PhoH inducible por falta de fosfato
<i>phoHv</i>	ATPasa relacionada con la proteína PhoHv inducible por falta de fosfato
<i>phoP</i>	Proteína reguladora transcripcional de síntesis de fosfatasa alcalina PhoP
<i>phoQ</i>	Sensor histidina quinasa PhoQ
<i>phoR</i>	Proteína sensora de regulón de fosfato PhoR (SphS)
<i>phoU</i>	Proteína reguladora del sistema de transporte de fosfato PhoU
<i>pitA</i>	Transportador de fosfato inorgánico de baja afinidad
<i>pntA</i>	NAD(P) transhidrogenasa subunidad alfa
<i>pntB</i>	NAD(P) transhidrogenasa subunidad beta
<i>Ppa</i>	Pirofosfatasa inorgánica
<i>ppaX</i>	Pirofospatasa inorgánica PpaX
<i>Ppk</i>	Polifosfato quinasa
<i>Ppx</i>	Exopolifosfatasa
<i>ptsA</i>	Permeasa del sistema de transporte de fosfato PstA
<i>ptsB</i>	Proteína de unión a ATP del sistema de transporte de fosfato PstB
<i>ptsC</i>	Permeasa del sistema de transporte de fosfato PstC
<i>ptsS</i>	Transportador de fosfato tipo ABC PstS
<i>sthA</i>	Transhidrogenasa de piridina
<i>surE</i>	Exopolifosfatasa 5'-nucleotidasa SurE
<i>ybeY</i>	Hidrolasa YbeY dependiente de metales, implicada en la maduración y ensamblaje del rRNA y/o ribosomas

	<i>ybeZ</i>	ATPasa PhoH inducible por falta de fosfato
Producción de sideróforos	<i>bfrD</i>	Receptor de sideróforos dependiente de TonB
	<i>btuB</i>	Hemina dependiente de TonB, receptor de ferricromo o sideróforo de hierro
	<i>cntO</i>	Receptor de sideróforos dependiente de TonB
	<i>fcuA</i>	Proteína receptora de acromobactina férrica dependiente de TonB
	<i>fecA</i>	Proteína transportadora de dicitrato de hierro (III) FecA
	<i>fecL</i>	Factor Sigma-70 (subfamilia ECF), que controla la biosíntesis de pioverdina
	<i>fecR</i>	Proteína sensora de sideróforos de hierro
	<i>fhuA</i>	Receptor de sideróforos dependiente de TonB
	IUP	Proteína de absorción de hierro
	<i>lgrB</i>	Sintetasa no ribosomal de biosíntesis de sideróforos
	<i>pbuA</i>	Receptor PbuA de pseudobactina férrica M114
	<i>pupB</i>	Receptor de membrana externa de ferripioverdina
	<i>pvdA</i>	L-ornitina 5-monooxigenasa, PvdA para biosíntesis de pioverdina
	<i>pvdE</i>	Sistema de exportación de pioverdina tipo ABC
	<i>pvdH</i>	L-2,4-diaminobutirato:2-oxoglutarato aminotransferasa para biosíntesis de pioverdina
	<i>pvdI</i>	Sintetasa no ribosomal de cadena lateral de pioverdina
	<i>pvdJ/pvdD</i> <i>/pvdP</i>	Proteína similar a PvdJ/PvdD/PvdP
	<i>pvdL</i>	Sintetasa no ribosomal de biosíntesis de precursor de cromóforo de pioverdina
	<i>pvdM</i>	Proteína PvdM similar a dipeptidasa que adapta la pioverdina
	<i>pvdN</i>	Aminotransferasa clase V para biosíntesis de pioverdina
	<i>pvdO</i>	Enzima de hierro no hemo de la familia SUMF1/EgtB/PvdO
	<i>pvdQ</i>	Acil-homoserina lactona acilasa PvdQ
	<i>pvdS</i>	Factor sigma PvdS, que controla la biosíntesis de pioverdina
	<i>pvdU</i>	Serina/treonina quinasa sensible a pioverdina
	<i>pvdY</i>	Componente pequeño de sideróforo sintetasa
	<i>sbnA</i>	2,3-diaminopropionato para biosíntesis de sideróforos SbnA
	<i>sbnB</i>	2,3-diaminopropionato para biosíntesis de sideróforos SbnB
	<i>yqjH</i>	Proteína que interactúa con sideróforos
Control Biológico	ABM	Monooxigenasa para biosíntesis de antibióticos
	<i>araC</i>	Regulador transcripcional de la familia AraC
	<i>arpC</i>	Proteína de membrana externa de bomba de eflujo de antibióticos ArpC
	BIP	Proteína de inmunidad a la bacteriocina
	<i>btuB_3</i>	Receptor de membrana externa dependiente de TonB para ferrienteroquelina y colicinas.
	Cim	Proteína de inmunidad a la toxina similar a la colicina E3
	CvpA	Proteína de membrana necesaria para la producción de colicina V
	E3/S6	Citotoxina de la familia colicina E3/piocina S6
	FUR	Regulador transcripcional de la absorción de hierro férrico

	<i>hcnA</i>	Subunidad de cianuro de hidrógeno sintasa HcnA
	<i>hcnB</i>	Subunidad HcnB de glicina deshidrogenasa formadora de cianuro
	<i>hcnC</i>	Subunidad de cianuro de hidrógeno sintasa HcnC
	<i>hcpA</i>	Efecto del sistema de secreción tipo VI de la familia Hcp
	<i>Imm</i>	Proteína de inmunidad a la toxina similar a la colicina E3
	<i>pepSY</i>	Peptidasa
	<i>prsD</i>	Sistema de secreción tipo I de proteasa
	<i>prsE</i>	Proteína de fusión de membrana de secreción tipo I
	<i>S</i>	Proteína que contiene dominio de piocina tipo S
	<i>S6</i>	Proteína de inmunidad a la toxina de la familia piocina S6
Otros	<i>katB</i>	Catalasa
	<i>katE</i>	Catalasa HPII
	<i>katG</i>	Catalasa/peroxidasa HPI
	<i>srpA</i>	Catalasa de la familia de las peroxidasas
	<i>ydbD</i>	Manganeso catalasa

Como se observa en la tabla anterior, las bases moleculares de las capacidades PGPR de la cepa *P. atacamensis* EMP42 están dadas por la presencia de genes que codifican enzimas relacionadas con dichas actividades. En primer lugar, posee genes relacionados con la movilidad y quimiotaxis indispensable para la colonización de la rizósfera de las plantas y el inicio de la actividad PGPR (Zboralski & Fillion, 2020), como los operones *FlaAB* para la síntesis de Flagelina, *FlhAB*, *FliIR* y *FlgDH* que intervienen en la síntesis de proteínas flagelares, y los genes *CheAVY* que codifican proteínas quimiotácticas, entre otros.

En relación con la producción de IAA, se encontraron genes como *trpABCDE* (sintetasas) que participan en la biosíntesis de triptófano (Singh *et al.*, 2021), Nitrilasas que intervienen en la producción de IAA por la vía del acetonitrilo (**IAN**), Monoamina oxidasa (*iaaM*) en la vía de la triptamina (**TAM**), IAD (Indol-acetaldehído deshidrogenasa) en la vía del indol-3-piruvato (**IPyA**). Estos hallazgos sugieren que la cepa en estudio podría ser capaz de producir IAA a través de 3 diferentes vías metabólicas, cuya activación depende del estímulo del entorno (Vega-Celedón *et al.*, 2016); cabe mencionar que la vía del IPyA es más utilizada por rizobacterias benéficas para las plantas (Singh *et al.*, 2022).

Otros genes importantes son aquellos que intervienen con la solubilización y asimilación de P, asegurando su absorción (Kang *et al.*, 2020) como API (fosfatasa alcalina), PPA (pirofosfatasa inorgánica), PPX (exopirofosfatasa), *phoAPRU* que conforman el regulón *pho* encargado de la detección de la disponibilidad ambiental de fosfato inorgánico (Monds *et al.*, 2006), *ptsABCS* (proteínas transportadoras de P), etc.

La capacidad para producir sideróforos está representada por la presencia del operón *pvdADEHIJPLMNOQSUY* necesario para la biosíntesis de pioverdina, sideróforo fluorescente con alta afinidad al hierro, de tipo mixto que contiene un grupo catecolato y dos hidroxiamato (Vindeirinho *et al.*, 2021), generalmente producido por *Pseudomonas* (Ringel & Brüser, 2018). También por los genes *acs* y *fcu* que codifican enzimas que intervienen en la producción y asimilación de acromobactina, sideróforo de tipo hidroxicarboxilato inicialmente caracterizado en *Erwinia chrysanthemi* (Münzinger *et al.*, 2000), e identificado también en bacterias del género *Pseudomonas* (Schalk *et al.*, 2020); además posee un conjunto de genes similares a los *acs* que codifican proteínas putativas que podrían intervenir en la producción de un sideróforo no caracterizado.

El control biológico de fitopatógenos está codificado por genes que intervienen en la producción de moléculas con acción antimicrobiana, como E3 y S6 relacionados con colicina y piocina, bacteriocinas citotóxicas producidas por bacterias Gram negativas (Fathizadeh *et al.*, 2020); el operón *hcnABC* necesario para la producción de cianuro de hidrógeno, metabolito secundario que inhibe el crecimiento de hongos, nemátodos e insectos, mediante el bloqueo de la citocromo carbono oxidasa en las mitocondrias (Sehrawat *et al.*, 2022); además de limitar la disponibilidad de hierro por la producción de sideróforos, como la pioverdina codificada por el operón *pvdADEHIJPLMNOQSUY*.

También se encontraron 16 genes de resistencia a antibióticos como carbapenem (BSU-1), macrólidos (*mphK*), lincosamida (*lmrB* y *vmrR*), nucleósidos (*tmrB*), glicopéptidos (*vanTWY*), péptidos (*mprF*), aminoglicósidos-tetraciclina-fenicol (*ykkCD*), agentes desinfectantes y antisépticos (*qacGJ*), ácido fosfónico (FosBx1) y cefalosporinas (Bcl). Estos genes forman parte del resistoma intrínseco de la bacteria por lo que, a pesar de su presencia en el genoma, es improbable que la cepa *P. atacamensis* EMP42 represente una amenaza clínica (Cox & Wright, 2013), ya que fue catalogada como no patógena, con una probabilidad de predicción de 0.081 menor al umbral establecido (0.3) por el servidor Pathogen Finder.

Además, fue posible identificar 2 sitios de CRISPR-Cas necesarios para la respuesta inmunitaria de las bacterias ante infecciones virales e inserciones de elementos genéticos móviles provenientes de transferencia horizontal (Wheatley & MacLean, 2021).

9.1.2.3. Comparación genómica de *P. atacamensis* EMP42

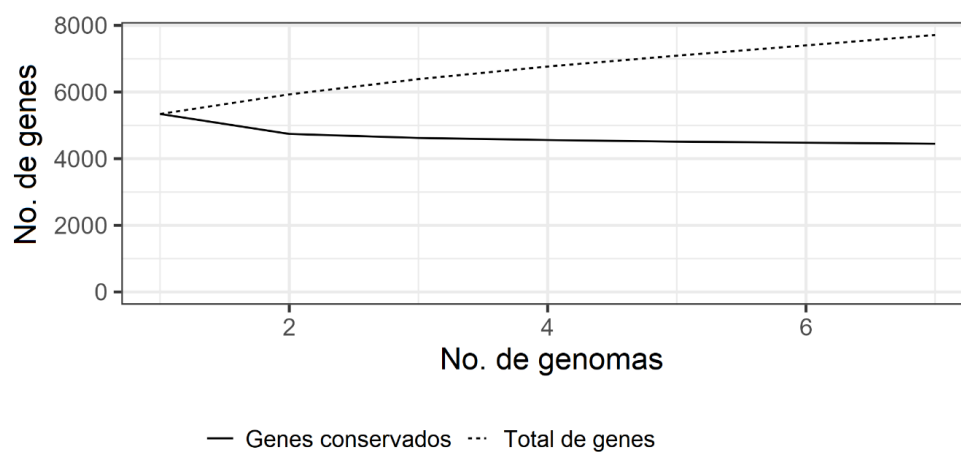
El análisis del pangenoma de *P. atacamensis* se realizó con los 7 genomas completos disponibles para evitar dificultades adicionales relacionadas con el uso de ensamblajes fragmentados (Page *et al.*, 2015) o problemas en la formación de scaffolds que puedan interferir en la generación del pangenoma (Nguyen *et al.*, 2014). Algunas características del genoma de las 7 cepas utilizadas para este análisis se encuentran en la Tabla 6.

Tabla 6: Métricas básicas de los 7 genomas completos de *Pseudomonas atacamensis* utilizados para la genómica comparativa. Todas las secuencias poseen un %GC=60

Cepa	Fuente	No. de acceso GenBank	Longitud (Mbp)	CDS	Contigs	Cobertura	Referencia
<i>P. atacamensis</i> EMP42	rizósfera de <i>E. platyacanthus</i>	CP149965.1	6.145	5,572	1	99x	(de la Torre-Hernández et al., 2020)
<i>P. atacamensis</i> SM1	rizósfera de palmera datilera	CP070503.1	5.991	5,469	2	200x	(Elmahi et al., 2021)
<i>P. atacamensis</i> MGMM4	rizósfera de girasol	CP123909.1	6.011	6.011	1	150x	(Afordoanyi et al., 2023)
<i>P. atacamensis</i> SWIR7	rizósfera de trigo	CP077081.1	6.084	5,461	1	121x	(Girard et al., 2021)
<i>P. atacamensis</i> B21-026	suelo agrícola	CP087187.1	5.970	5,398	1	181x	(Zboralski et al., 2022)
<i>P. atacamensis</i> B21-045	suelo agrícola	CP087171.1	5.992	5,405	1	139x	(Zboralski et al., 2022)
<i>P. atacamensis</i> B21-050	suelo agrícola	CP087167.1	5.940	5,356	1	216x	(Zboralski et al., 2022)

Se pudo determinar que *P. atacamensis* tiene un pangenoma abierto y en expansión (Figura 5) compuesto por 7,712 genes, de los cuales 3,264 son parte del genoma accesorio. Este último se compone de 1,104 genes compartidos por la mayoría de los genomas (*shell genome*) y 2,160 genes compartidos por un subconjunto mínimo de los genomas (*cloud genome*), incluidos aquellos genes presentes en solo uno de los genomas (Figura 6-A). La cepa en estudio tiene un genoma central consistente con las cepas de referencia y tiene una firma metabólica específica en el *cloud genome* (Figura 6-B), compuesta por genes relacionados a la producción de proteínas de transposición para recombinación genética, proteínas relacionadas con la replicación y el metabolismo del ADN, y otras proteínas relacionadas con la resistencia al cobre y la resistencia al cobalto-zinc-cadmio.

A)



B)

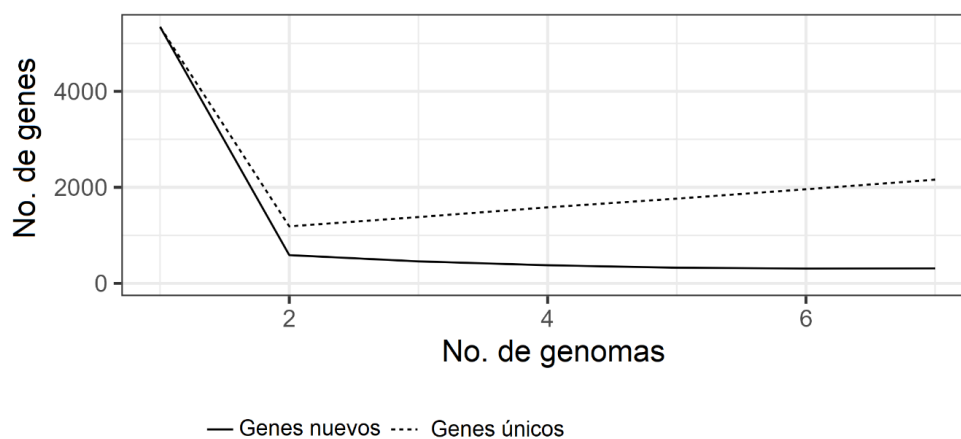
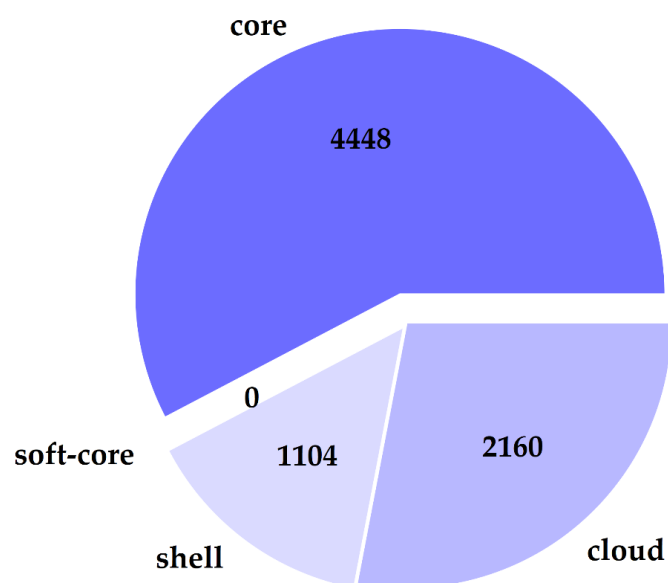


Figura 5: Curva *Pan-Core genome*. El pangenoma de *P. atacamensis* varía a medida que se agregan genomas (en órdenes aleatorios). A) Comparación de genes conservados versus genes totales agregados con los genomas. B) Comparación de genes nuevos versus genes únicos agregados con los genomas.

A)



B)

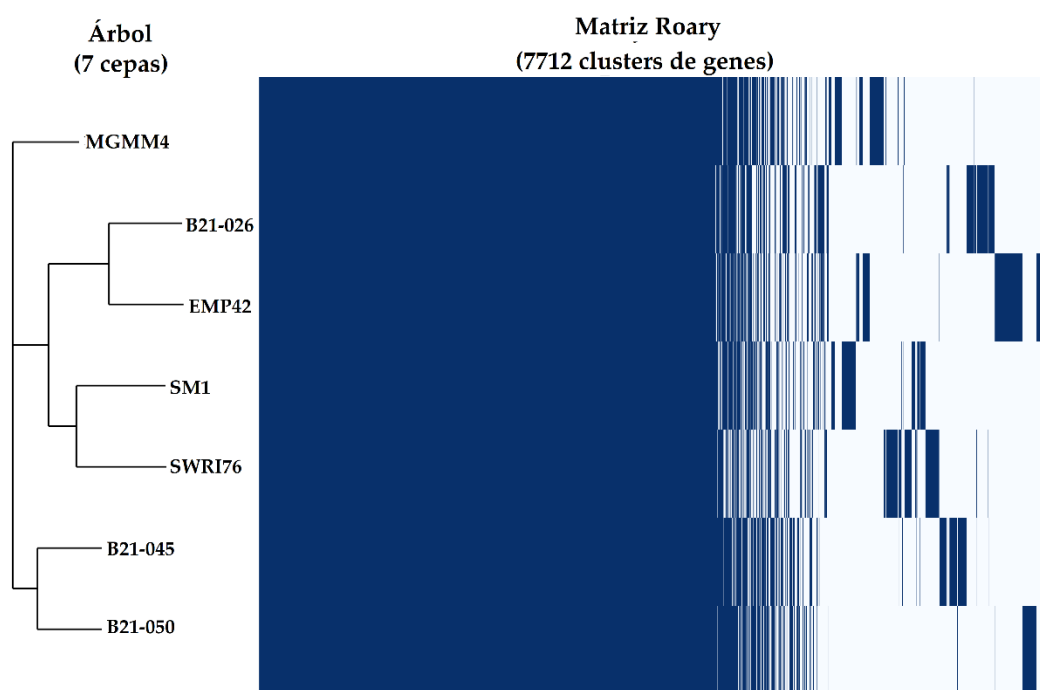


Figura 6: Pangenoma de *Pseudomonas atacamensis*. A) Gráfico de pie que representa la proporción de genes dentro de los genomas comparados. Los genes centrales se encuentran en >99% de los genomas, el *shell genome* se encuentra en el 15-95% y el *cloud genome* está representado en <15%. B) Matriz de presencia/ausencia de genes, las ramas del árbol filogenómico muestran el perfil genético de cada una de las 7 cepas comparadas.

Se determinó que, con la totalidad de los genes, se generan 5,504 clústeres de proteínas; de ellos, 5,062 se encuentran en la cepa EMP42 y 4,551 constituyen el genoma central en donde están codificadas proteínas con funciones relacionadas a la síntesis de DNA, división celular y funciones metabólicas básicas. El árbol filogenómico (Figura 7) mostró que *P. atacamensis* EMP42 es filogenómicamente más cercana a *P. atacamensis* B21-026, ya que ambas cepas tienen un número similar de ortogrupos, compartiendo la mayoría de ellos.

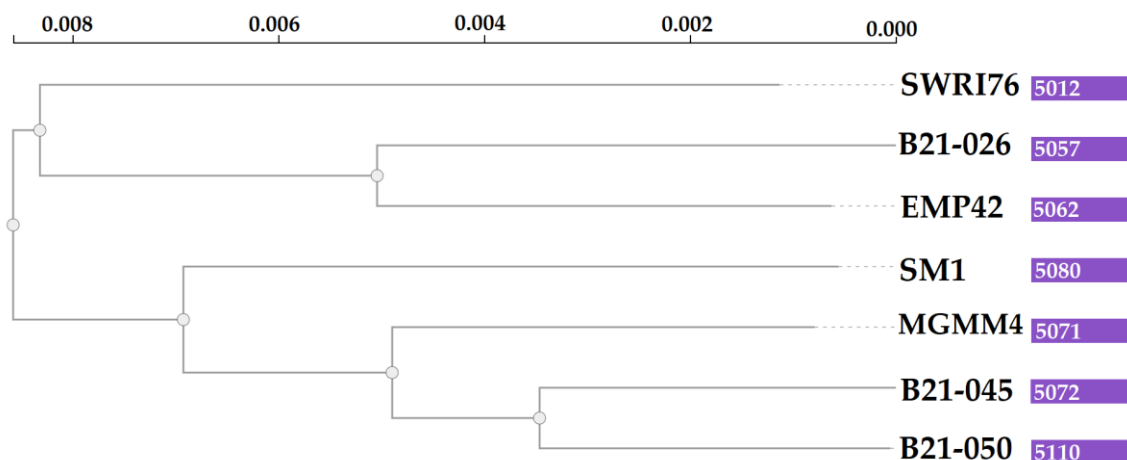


Figura 7: Árbol filogenómico de *P. atacamensis*. Se observa una escala de distancia de 0.001 y en morado se encuentra el número de ortogrupos que posee cada cepa analizada.

En la Figura 5 se muestran los grupos de proteínas exclusivos o compartidos presentes en los genomas accesorios de 6 cepas de referencia. Entre los grupos de proteínas compartidos se encuentran aquellos relacionados con funciones de PGPR como la producción de fosfatasa, la biosíntesis de triptófano, el metabolismo de xenobióticos, la formación de biopelículas, el transporte de sideróforos, etc. *P. atacamensis* EMP42 tiene también 7 grupos exclusivos, tres de ellos relacionados con proteínas de unión al DNA, transporte y respuesta a la estimulación por cadmio -que podrían conferir a la bacteria resistencia al estrés por contaminación con este metal- y, los 4 restantes, no tienen una función biológica identificada.

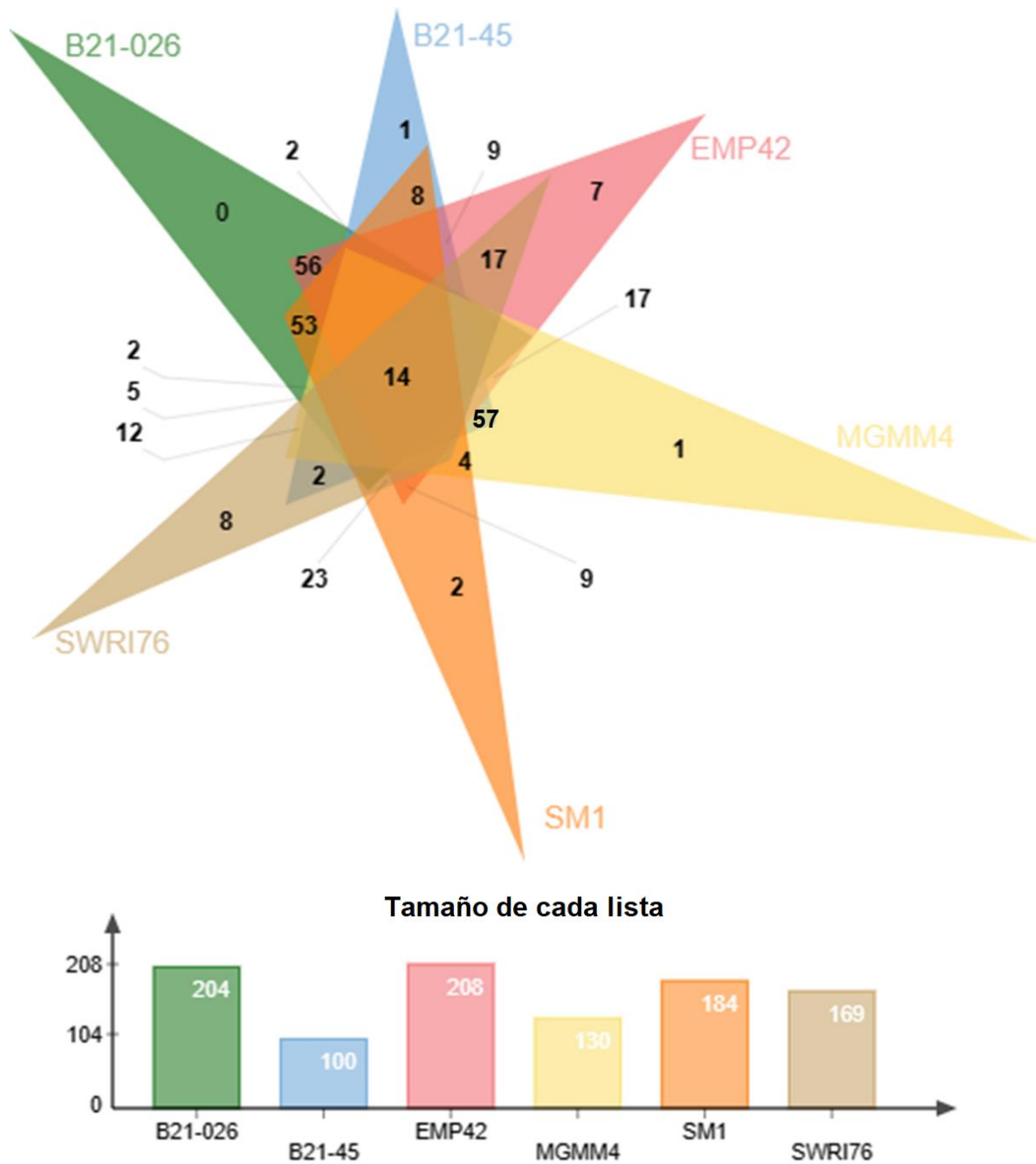


Figura 8: Diagrama de Venn de los 208 clústeres de proteínas que la cepa *P. atacamensis* EMP42 (en rosa) comparte con alguna de las cepas de referencia B21-026, B21-045, MGMM4, SM1 y SWRI76. En las intersecciones de los triángulos se muestra el número de clústeres compartidos y al extremo se muestran los clústeres exclusivos de cada cepa.

9.1.3. Conclusiones

La estructura genómica de la cepa EMP42 consiste en un único cromosoma cerrado cuya anotación funcional indica que posee un gran número de genes relacionados con las características PGPR descritas previamente. La mayoría de dichos genes conforman operones completos, no agrupados en islas genómicas, sino más bien distribuidos a lo largo de todo el genoma.

La identificación basada en la secuencia genómica completa indica que la cepa EMP42 no es *Pseudomonas koreensis*, como se había descrito originalmente, sino *Pseudomonas atacamensis*, definido por valores de ANI=96.82% y dDDH=72.3%, superiores a los establecidos para la delimitación de especies.

La comparación genómica de *P. atacamensis* EMP42 con genomas de otras cepas de la misma especie obtenidas de suelos rizosféricos o agrícolas, mostró que la mayoría de los genes relacionados con las actividades PGPR se encuentran en el genoma accesorio, y no son compartidos por todas las cepas estudiadas, por lo que es posible establecer las bases moleculares de las diferencias en las capacidades PGPR de estas bacterias.

9.1.4. Perspectivas

La presencia de un elemento extracromosomal, presuntamente un bacteriófago, resulta interesante, ya que podría tener implicaciones en la generación de variabilidad genética, mediante reordenamientos y/o transferencia de genes.

Las características PGPR de *P. atacamensis* EMP42 han sido evaluadas a nivel genético y en planta, bajo condiciones controladas, surge la necesidad de realizar ensayos que definan su capacidad promotora del crecimiento vegetal en condiciones de campo, lo que determinaría si la cepa podría ser utilizada como bioinoculante para cultivos de interés además de las cactáceas.

9.2. *Stenotrophomonas* sp. cepa EMP41, nueva especie con características PGPR aislada de *Echinocactus platyacanthus*.

9.2.1. Introducción

Stenotrophomonas es un género bacteriano que engloba 35 especies bien caracterizadas; pertenece al Phylum *Pseudomonadota* (Clase *Gammaproteobacteria*) ya que anteriormente formaba parte del género *Pseudomonas*, sin embargo, sus características fenotípicas permitieron su reclasificación (Ghosh *et al.*, 2020). Es característico por agrupar bacilos Gram negativos de origen ambiental que se encuentran generalmente en agua y suelo, aunque también es posible encontrarlo en otros sitios como ambientes extremos y la rizósfera de las plantas (Pinski *et al.*, 2020), por ejemplo *S. acidaminiphila* aislada de un reactor de manto de lodo anaeróbico de flujo ascendente (UASB; Assih *et al.*, 2002), *S. bentonitica* aislada de bentonitas españolas (Sánchez-Castro *et al.*, 2017), *S. lactitubi* y *S. indicatrix* aisladas de platos sucios (Weber *et al.*, 2018), *S. koreensis* aislada de compost (Yang *et al.*, 2006), *S. sepiolia* aislada de hemocultivo (Gautam *et al.*, 2021), *S. muris* aislada de intestino de ratón (Afrizal *et al.*, 2022), *S. terrae* y *S. humi* aisladas de suelo (Heylen *et al.*, 2007); y algunas asociadas a plantas, como *S. aracearum* y *S. oahuensis* aisladas de flor ibérica (Chuang *et al.*, 2024) y *S. pavanii* aislada de caña de azúcar (Ramos *et al.*, 2011).

Algunas de las especies de este género bacteriano son patógenas oportunistas de humanos y están relacionadas a enfermedades nosocomiales, como es el caso de *S. maltophilia* relacionada con bacteriemia, infecciones respiratorias como la neumonía, endocarditis, infección hepática, ocular, del sistema nervioso, de la médula espinal, del tracto gastrointestinal, del tracto urinario, entre otros (Brooke, 2021). Sin embargo en los últimos años han sido descritas un gran número de ellas como *S. rhizophila*, *S. pavanii* e incluso *S. maltophilia*, asociadas a la rizosfera de las plantas, donde intervienen en los ciclos biogeoquímicos del azufre y el nitrógeno, y en la degradación de diferentes compuestos (Pinski *et al.*, 2020), y con diversas características que mejoran el desarrollo de las mismas, que permiten incluirlas dentro del grupo de las PGPR como la producción de indoles como hormonas vegetales, la solubilización de K, la producción de fosfatasas y ácidos orgánicos para la solubilización de P, el control biológico de fitopatógenos mediante la producción de antibióticos y enzimas líticas, la producción de sideróforos para la captación de diferentes iones metálicos como el hierro, entre otros (Kumar *et al.*, 2023).

Los múltiples beneficios de la inoculación de diferentes plantas con bacterias del género *Stenotrophomonas* han sido descritos ampliamente, por ejemplo, el aumento de la tolerancia al estrés por sequía de plantas de garbanzo inoculadas con *Stenotrophomonas* sp, aumentando la concentración de los osmoprotectores prolina (hasta un 28.9%) y glucosa (hasta 98.6%) respecto a un control sin inocular (Sharma *et al.*, 2023). *S. rhizophila* incrementa la longitud de los brotes de raíz

(47.22-63.41%), la biomasa (136.36-156.66%) y la concentración de pigmentos fotosintéticos (36.93-92.28%) de lechuga creciendo en condiciones de estrés salino y contaminación con diurón, herbicida de efecto prolongado (Silambarasan *et al.*, 2020). *S. maltophilia* como agente de control biológico es capaz de reducir hasta un 55.6%, respecto a un grupo control, la enfermedad del brusone del arroz, causado por el hongo *Pyricularia oryzae* (Badri *et al.*, 2022).

Sin embargo, existe un gran número de cepas sin clasificar en la base de datos de NCBI, tal es el caso de *Stenotrophomonas* sp. EMP41, cepa aislada de la rizósfera de *Echinocactus platyacanthus* (biznaga dulce), nativa del semidesierto de Querétaro. Esta cepa que inicialmente fue identificada como *Pseudomonas* sp mediante un análisis taxonómico basado en la secuencia del gen 16S rRNA, también posee importantes características PGPR (Tabla 7; de la Torre-Hernández *et al.*, 2020). Análisis posteriores del genoma de esta bacteria indican que podría tratarse de una nueva especie de *Stenotrophomonas*.

Tabla 7: Características PGPR de *Stenotrophomonas* sp. EMP41

Producción de indoles	SPO ₄
36.61±0.30 µg/mL	65.08±1.54 µg/mL
Biocontrol <i>F. Solani</i>	Producción de sideróforos
49.17±1.44%	Fe, Ni, Cu, K, Zn, Mo, V, Cd, Co y Pb

Teniendo en cuenta el potencial biotecnológico de la cepa *Stenotrophomonas* sp. EMP41, y la importancia de diferenciar entre bacterias benéficas y patógenas, surge la necesidad de hacer una clasificación taxonómica precisa y una comparación genómica que permita identificar características genéticas importantes para su actividad biológica.

9.2.2. Resultados y discusión

9.2.2.1. Análisis taxonómico basado en la secuencia del gen 16S rRNA

Como se mencionó anteriormente, la secuenciación de genes 16S rRNA clonados tenía como objetivo producir una identificación más precisa de la cepa EMP41. Se obtuvieron 2 secuencias que corresponden a 2 de las 4 copias de los genes 16S rRNA que contiene dicha cepa, la comparación con la base de datos EzBioCloud mostró que ambas copias del gen tienen similitud con la cepa tipo *Stenotrophomonas pavanii* DSM 25135 (Tabla 8). Además, las relaciones filogenéticas de la cepa EMP41 y *Stenotrophomonas* estrechamente relacionadas se evaluaron con un árbol filogenético basado en secuencias del gen antes mencionado (Figura 9); como era de esperar, las secuencias de ambas copias del gen se agruparon con *S. pavanii* DSM 25135^T.

Tabla 8: Comparación de secuencias de las 2 copias del gen 16S rRNA clonadas de la cepa EMP41 con la base de datos de genes 16S rRNA de cepas tipo de EzBioCloud

	Cepa tipo más cercana	Número de acceso	Cobertura (%)	Similitud (%)
Clona 1	<i>Stenotrophomonas pavanii</i>	LDJN01000038	100	99.86
Clona 2	DSM 25135 ^T		100	99.65

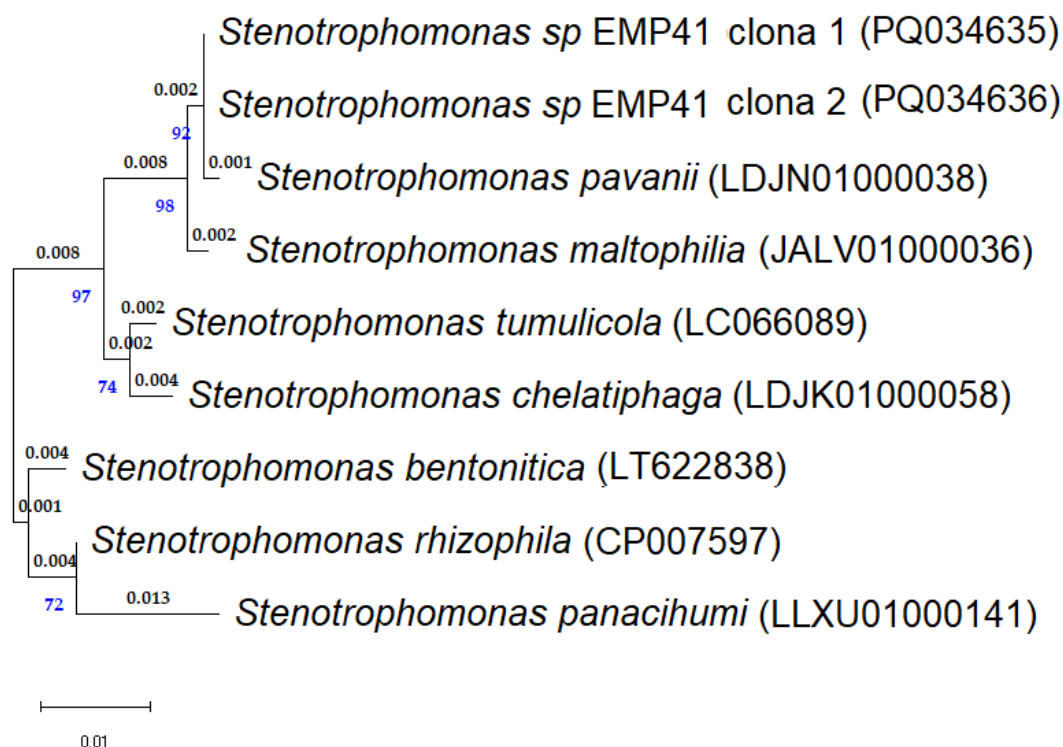


Figura 9: Árbol filogenético de la cepa EMP41 y cepas tipo de *Stenotrophomonas*, basado en secuencias parciales del gen 16S rRNA (1400 pb). La filogenia se infirió utilizando el método de Máxima Verosimilitud; se muestra el árbol con la mayor probabilidad logarítmica (-2441,90). El porcentaje de árboles en los que se agruparon los taxones asociados se muestra debajo de las ramas en azul. El árbol está dibujado a escala, con la longitud de las ramas medida en número de sustituciones por sitio (valores encima de las ramas).

Este análisis identificó a la cepa EMP41 como *S. pavanii*, sin embargo, hoy en día se sabe que la secuencia del gen 16S rRNA carece de suficiente poder discriminatorio para diferenciar especies (Lalucat *et al.*, 2020), por lo que se requiere una caracterización más profunda basada en la secuenciación del genoma.

9.2.2.2. Reconstrucción genómica y anotación funcional de *Stenotrophomonas* sp. EMP41

De la secuenciación del genoma completo se obtuvieron un total de 347,160 lecturas, con longitudes entre 51 y 103,741 pb, y una longitud media de 4,670 pb, lo que brinda una cobertura del genoma de 366X. La calidad de las secuencias fue evaluada mediante el puntaje Phred, el cual fue de 30 para el 99% de ellas. Las lecturas fueron utilizadas para realizar el ensamble de novo en Geneious Prime con el ensamblador Flye, obteniendo 1 único contig circular de 4,421,649 pb, de buena calidad con una longitud de N50 equivalente a la longitud del contig, una L50 de 1 contig y un porcentaje de guanina-citocina de 66.8%. El genoma obtenido (Figura 10) tiene un tamaño y un porcentaje de GC aproximados a los reportados para otras cepas de *S. pavanii*.

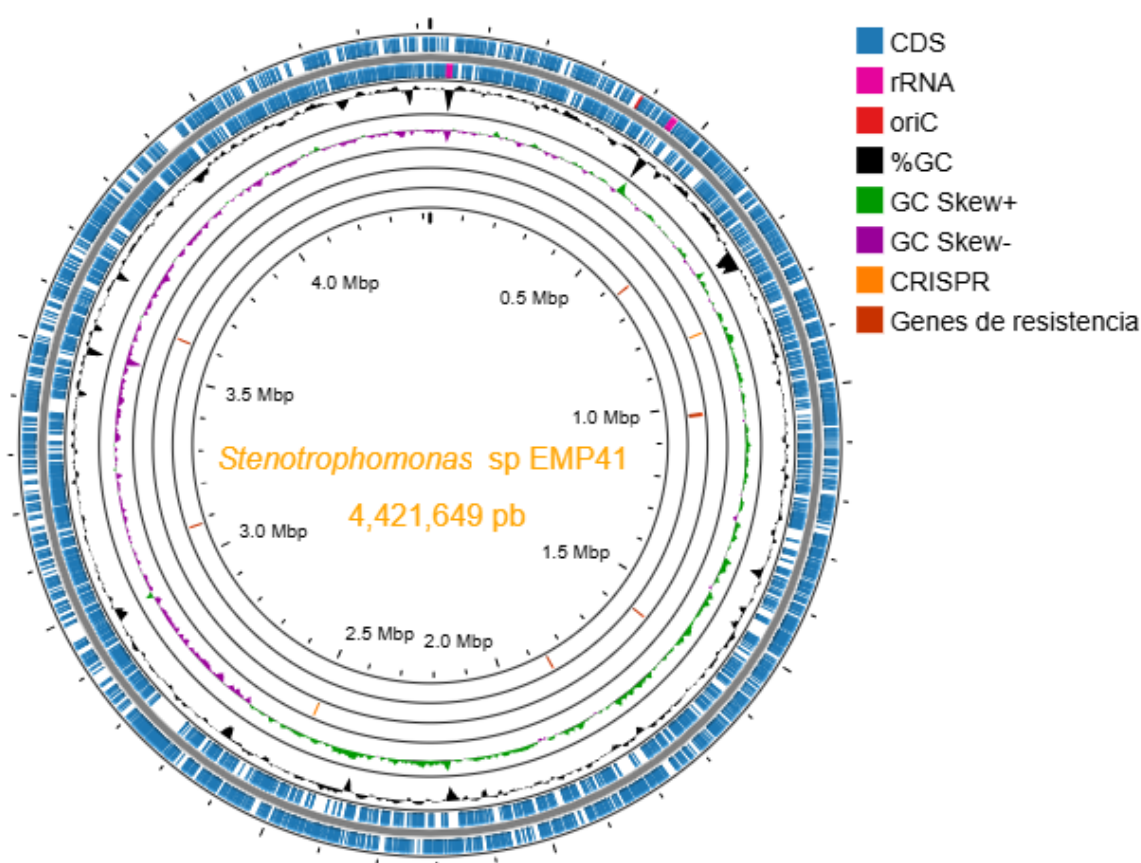


Figura 10: Mapa del genoma cerrado de *Stenotrophomonas* sp. EMP41 con una longitud de 4,421,649 pb. Desde el exterior: los círculos 1 y 2 encierran los genes de la cadena principal y la cadena complementaria respectivamente; el círculo 3 el contenido de GC; el círculo 4 el sesgo de GC; el círculo 5 muestra los loci CRISPR-Cas (2 líneas naranja); los círculos 6 y 7 los genes de resistencia (seis líneas rojo oscuro). La escala en Mbp se indica en el círculo interior.

Con el genoma ensamblado se realizó una identificación basada en genoma en el TYGS del Instituto Leibniz donde se determinó que la cepa EMP41 podría tratarse de una nueva especie ya que la cepa más cercana a ella, filogenéticamente hablando, es *Stenotrophomonas sepilia* SM16975^T, con un dDDH de 65.6%, menor al límite establecido de 70%, (Meier-Kolthoff *et al.*, 2014) de acuerdo con esta plataforma (Meier-Kolthoff & Göker, 2019).

Con la anotación del genoma realizada se predijeron 3,963 genes, 16 loci de ncRNA 20 regiones reguladoras de adenosil metionina, cobalamina, guanidina, glicina, tiamina y censo de magnesio; Además de 4 operones completos de rRNA que muestran un 99,9% de similitud entre sus secuencias 16S. Entre los genes codificantes se encuentran aquellos que intervienen en la producción de enzimas asociadas con actividades PGPR como los genes de los operones *FlhAGKMT* *CheBXYZ* *trpABCDE* y *phoABPRUA*, entre otros (Tabla 9).

Tabla 9: Genes involucrados en las características PGPR de *Stenotrophomonas* sp. EMP41

Característica PGPR	Gen	Producto
Producción de IAA	<i>trpA</i>	Triptófano sintasa cadena alfa
	<i>trpB</i>	Triptófano sintasa cadena beta
	<i>trpC</i>	Indol-3-glicerol fosfato sintetasa
	<i>trpD</i>	Antranilato fosforribosiltransferasa
	<i>trpE</i>	Antranilato sintasa componente I
	<i>trpF</i>	Fosforribosilantranilato isomerasa
	<i>trpG</i>	Antranilato sintasa
	<i>trpI</i>	Regulador transcripcional, familia LysR
Movilidad y quimiotaxis	<i>cheA</i>	Histidina quinasa para transducción de señales CheA
	<i>cheB</i>	Proteína reguladora de la respuesta a la quimiotaxis glutamato metilesterasa CheB
	<i>cheD</i>	Proteína quimiotáctica CheD
	<i>cheR</i>	Metiltransferasa para quimiotaxis
	<i>cheV</i>	Proteína quimiotáctica CheV
	<i>cheW</i>	Proteína quimiotáctica CheW
	<i>cheY</i>	Regulador de la quimiotaxis: transmite señales de los quimiorreceptores a los componentes motores del flagelo CheY
	<i>cheZ</i>	Fosfatasa de respuesta a quimiotaxis CheZ
	<i>fleN</i>	Regulador de síntesis flagelar FleN
	<i>fleQ</i>	Proteína reguladora flagelar FleQ
	<i>flgA</i>	Proteína de formación del anillo P del cuerpo basal flagelar FlgA
	<i>flgB</i>	Proteína de varilla del cuerpo basal flagelar FlgB
	<i>flgC</i>	Proteína de varilla del cuerpo basal flagelar FlgC
	<i>flgD</i>	Proteína de modificación de la varilla del cuerpo basal flagelar FlgD

	<i>flgE</i>	Proteína de gancho flagelar FlgE
	<i>flgF</i>	Proteína de varilla del cuerpo basal flagelar FlgF
	<i>flgG</i>	Proteína de varilla del cuerpo basal flagelar FlgG
	<i>flgH</i>	Proteína del anillo L flagelar FlgH
	<i>flgI</i>	Proteína del anillo P flagelar FlgI
	<i>flgJ</i>	Proteína flagelar peptidoglicano hidrolasa FlgJ
	<i>flgK</i>	Proteína asociada al gancho flagelar FlgK
	<i>flgL</i>	Proteína asociada al gancho flagelar FlgL
	<i>flgM</i>	Regulador negativo de la síntesis de flagelina FlgM
	<i>flgN</i>	Proteína flagelar FlgN
	<i>flhA</i>	Proteína de biosíntesis flagelar FlhA
	<i>flhB</i>	Proteína de biosíntesis flagelar FlhB
	<i>flhF</i>	Proteína de biosíntesis flagelar FlhF
	<i>fliA</i>	Factor sigma de la ARN polimerasa para el operón flagelar FliA
	<i>fliC</i>	Flagelina FliC
	<i>fliD</i>	Proteína asociada al gancho flagelar FliC
	<i>fliE</i>	Proteína del complejo gancho flagelar-cuerpo basal FliE
	<i>fliF</i>	Proteína del anillo M flagelar FliF
	<i>fliG</i>	Proteína interruptora del motor flagelar FliG
	<i>fliH</i>	Proteína de ensamblaje flagelar FliH
	<i>fliI</i>	ATP sintasa específica de flagelo FliI
	<i>fliJ</i>	Proteína flagelar FliJ
	<i>fliK</i>	Proteína de control de la longitud del gancho flagelar FliK
	<i>fliL</i>	Proteína flagelar FliL
	<i>fliM</i>	Proteína interruptora del motor flagelar FliM
	<i>fliN</i>	Proteína interruptora del motor flagelar FliN
	<i>fliO</i>	Proteína de biosíntesis flagelar FliO
	<i>fliP</i>	Proteína de biosíntesis flagelar FliP
	<i>fliQ</i>	Proteína de biosíntesis flagelar FliQ
	<i>fliR</i>	Proteína de biosíntesis flagelar FliR
	<i>fliS</i>	Chaperona de secreción flagelar FliS
	<i>fliT</i>	Proteína flagelar FliT
	<i>ftcR</i>	Regulador transcripcional flagelar FtcR
	<i>motA</i>	Proteína de rotación de motor flagelar MotA
	<i>motB</i>	Proteína de rotación de motor flagelar MotB
	<i>ycgR</i>	Proteína de freno flagelar YcgR
Solubilización de fosfato	<i>ppa_1</i>	Pirofosfatasa inorgánica
	<i>ppa_2</i>	Pirofosfatasa inorgánica
	<i>corC</i>	Proteína de eflujo de magnesio y cobalto CorC
	LAT	Transportador de fosfato

	<i>oprO</i>	Porina de membrana externa específica de fosfato/pirofosfato OprO
	<i>oprP</i>	Porina de membrana externa específica de fosfato/pirofosfato OprP
	<i>phoA2</i>	Fosfatasa alcalina
	<i>phoB</i>	Proteína reguladora de la transcripción PhoB
	<i>phoD</i>	Fosfatasa alcalina
	<i>phoH</i>	ATPasa relacionada con la proteína inducible por inanición de fosfato PhoH
	<i>phoP</i>	Proteína reguladora de la transcripción PhoP
	<i>phoR</i>	Proteína sensora de fosfato PhoR
	<i>phoU</i>	Proteína accesoria del sistema de transporte específico de fosfato PhoU
	<i>ppaX</i>	Pirofosfatasa inorgánica
	<i>ppk</i>	Polifosfato quinasa
	<i>ppx</i>	Exopolifosfatasa
	<i>ptsA</i>	Permeasa del sistema de transporte de fosfato PstA
	<i>ptsB</i>	Proteína de unión a ATP para la importación de fosfato PstB
	<i>ptsC</i>	Permeasa del sistema de transporte de fosfato PstC
	<i>ptsS</i>	Proteína de unión a fosfato PstS
	<i>ybeZ</i>	Proteína inducible por inanición de fosfato PhoH
Producción de sideróforos	<i>bfd</i>	Ferredoxina asociada a bacterioferritina
	<i>bfr</i>	Bacterioferritina
	<i>bfrD</i>	Proteína receptora de catecoles monoméricos de hierro de membrana externa dependiente de TonB
	<i>btuB_10</i>	Receptor de sideróforos de hierro
	<i>btuB_12</i>	Receptor de enterobactina férrica
	<i>btuB_13</i>	Receptor de enterobactina férrica
	<i>btuB_20</i>	Receptor de sideróforos de membrana externa
	<i>cntO_2</i>	Receptor de sideróforos dependiente de TonB
	<i>dhbA</i>	2,3-dihidro-2,3-dihidroxibenzoato deshidrogenasa para biosíntesis de sideróforos
	<i>dhbB</i>	Isocorismatasa para biosíntesis de sideróforos
	<i>dhbC</i>	Sintetasa de isocorismato para biosíntesis de sideróforos
	<i>dhbE</i>	2,3-dihidroxibenzoato-AMP ligasa para biosíntesis de sideróforos
	<i>dhbF</i>	Sintetasa de péptidos no ribosómicos para biosíntesis de sideróforos
	<i>entD</i>	4'-fosfopanteteinil transferasa para biosíntesis de sideróforos
	<i>exbB</i>	Sistema de transporte de sideróforos férricos ExbB
	<i>exbD</i>	Sistema de transporte de sideróforos férricos ExbD
	<i>fatA</i>	Receptor de hierro-ferricromo
	<i>fcuA</i>	Receptor de hierro-ferricromo
	<i>fecA</i>	Proteína transportadora de dicitrato de Fe(3) FecA
	<i>fecE</i>	Sistema de transporte tipo ABC de sideróforos cobalamina/Fe3+
	<i>fecR</i>	Regulador del transporte de dicitrato de hierro FecR
	<i>feoA</i>	Proteína asociada al transportador de hierro FeoA
	<i>feoB</i>	Transportador de hierro FeoB

	<i>fepB</i>	Sistema de transporte de tipo ABC de Fe ³⁺ -hidroxamato, componente periplásmico
	<i>fepD</i>	Sistema de transporte de tipo ABC de sideróforos Fe ³⁺ , componente permeasa
	<i>fepG</i>	Sistema de transporte de tipo ABC de enterobactina, componente permeasa
	<i>fpvA</i>	Receptor de membrana externa para el coprogeno férrico y el ácido férrico-rodotorácico
	<i>Fur</i>	Proteína reguladora para captación de hierro
	<i>pfeA</i>	Receptor de membrana externa de enterobactina
	<i>viuB</i>	Sideróforo reductasa férrica dependiente de NADPH
	<i>ylmA</i>	Sistema de transporte de complejos de hierro
	<i>yqjH</i>	Proteína que utiliza quelantes de hierro
	<i>Zur</i>	Proteína reguladora para captación de hierro
Control biológico	<i>chi1</i>	Quitinasa A
	E3	Proteína de síntesis de colicina V
	<i>btuB_17</i>	Receptor de colicina I
	<i>cirA_1</i>	Receptor de membrana externa para ferrienteroquelina y colicinas
	<i>cirA_2</i>	Receptor de membrana externa dependiente de TonB para ferrienteroquelina y colicinas
	<i>cirA_3</i>	Receptor de membrana externa dependiente de TonB para ferrienteroquelina y colicinas
Otros	<i>katA</i>	Catalasa
	<i>katE</i>	Catalasa

Las capacidades PGPR de la cepa *Stenotrophomonas* sp. EMP41 están determinadas por la presencia de genes que codifican enzimas relacionadas con dichas actividades. Esta cepa posee genes relacionados con la flagelación y quimiotaxis que facilitan la colonización de la bacteria a la rizósfera de las plantas (Adeleke *et al.*, 2021), como los operones *FliAGKMT* que intervienen en la síntesis de proteínas flagelares y los genes *CheBXYZ* que codifican proteínas quimiotácticas, entre otros.

En relación con la producción de IAA, se encontraron genes como *trpBCDES* (sintetasas) que participan en la biosíntesis de triptófano (Singh *et al.*, 2021), y en la síntesis de acetaldehído deshidrogenasa (*mhpF*) que interviene en la producción de IAA por la vía del indol-3-piruvato (IPyA), que es más utilizada por rizobacterias benéficas para las plantas (Singh *et al.*, 2022). También se encontraron genes que codifican para otras enzimas como las amidasas (*gatA*) que intervienen en la producción de IAA por la vía del acetonitrilo (IAN) (Adeleke *et al.*, 2021) y Monoamina oxidasa (*yobN*) en la vía de la triptamina (TAM) lo que sugiere que la cepa en estudio podría ser capaz de producir IAA a través de 3 diferentes vías metabólicas, previamente descritas en bacterias, activadas mediante el estímulo del entorno (Vega-Celedón *et al.*, 2016). Cabe mencionar que algunos genes necesarios para la transformación del triptófano en el intermediario inicial de las diferentes vías, principalmente la IPyA, no fueron encontrados, lo que podría

explicarse con una posible conversión directa o con la intervención de otras enzimas (Ulrich *et al.*, 2021).

La solubilización de P está determinada por la presencia de genes de los operones *phoADEHUX* que conforman el regulón *pho* encargado de la detección de la disponibilidad ambiental de fosfato inorgánico (Monds *et al.*, 2006), *gppA* (exopolifosfatasa), PPA (pirofosfatasa inorgánica), API (fosfatasa alcalina), entre otros, necesarios para la solubilización y asimilación de P (Kang *et al.*, 2020).

La producción de sideróforos está representada por la presencia de los genes *viuB* (reductasa) y *entD* (transferasa) para la síntesis, y *fepBCDG* para el transporte de sideróforos, además de los genes *bfd* y *bfr* que codifican bacterioferritina, molécula de naturaleza proteica que interviene en la homeóstasis y almacenaje de Fe como reserva ante la deficiencia de este metal (Guo *et al.*, 2022)

El control biológico de fitopatógenos esta codificado por genes que intervienen en la producción de moléculas con acción antimicrobiana como E3 relacionada con la síntesis de colicina, bacteriocina citotóxica producida por bacterias Gram negativas (Fathizadeh *et al.*, 2020); el gen *chi1* que codifica una quitinasa, enzima que degrada la quitina constituyente de los exoesqueletos de insectos, crustáceos y nematodos, así como de la pared celular de hongos, protozoarios y algas (Jankiewicz *et al.*, 2020); además de la limitación de hierro por la producción de bacterioferritina antes mencionada.

Además, fue posible identificar 4 sitios de CRISPR-Cas necesarios para la respuesta inmunitaria de las bacterias ante infecciones virales e inserciones de elementos genéticos móviles provenientes de la transferencia horizontal (Wheatley & MacLean, 2021). También se encontraron 8 genes de resistencia a antibióticos como macrólidos-fluoroquinolonas-tetraciclina-fenicol (*smeDEF*) aminoglicosidos-cefalosporinas-cefamandol (*smeR*), aminoglicosidos (AAC), fluoroquinolonas-tetraciclina (*adeF*), glicopéptidos (*vanY*) y agentes desinfectantes y antisépticos (*qacJ*), que forman parte del resistoma intrínseco de *Stenotrophomonas* spEMP41 por lo que es improbable que esta cepa no represente un riesgo de salud (Cox & Wright, 2013) ya que además fue catalogada como no patógena con una probabilidad de predicción de 0.072 menor al umbral establecido (0.3) por el servidor Pathogen Finder.

9.2.2.3. Comparación genómica de *Stenotrophomonas* sp. EMP41

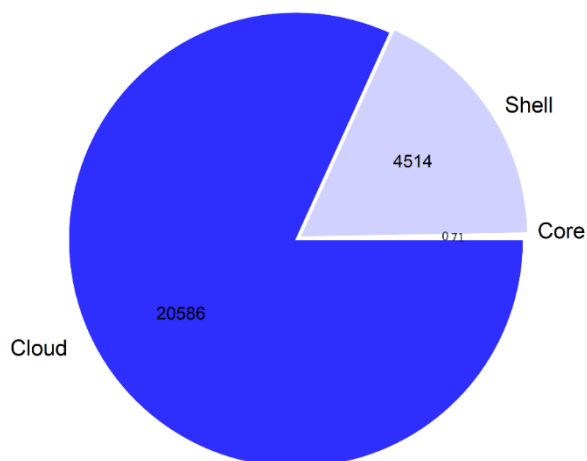
Debido a que *Stenotrophomonas* sp. EMP41 no cuenta con una clasificación a nivel de especie su genoma de se comparó con 9 diferentes especies de *Stenotrophomonas*, se utilizaron genomas completos para evitar problemas relacionados con el uso de ensamblajes fragmentados (Page *et al.*, 2015) o en la formación de *scaffolds* que puedan interferir en la comparación genómica (Nguyen *et al.*, 2014). Algunas características del genoma de las 10 cepas utilizadas para este análisis se encuentran en la Tabla 10.

Tabla 10: Métricas básicas de los 10 genomas completos de *Stenotrophomonas* utilizados para genómica comparativa. Todas las secuencias genómicas están constituidas por 1 contig

Cepa	Fuente	No. de acceso GenBank	Longitud (Mbp)	GC (%)	CDS	Cobertura	Referencia
<i>Stenotrophomonas</i> sp EMP41	Rizósfera de <i>E. platyacanthus</i>	No asignado	4.4	66.8	3,963	366x	(de la Torre-Hernández <i>et al.</i> , 2020)
<i>S. acidaminiphila</i> T0-18	Biofilm de reactor	CP043567.1	3.8	69	3,486	100x	(Huyan <i>et al.</i> , 2020)
<i>S. aracearum</i> A5588	<i>Anthurium</i>	CP115543.1	4.3	66.5	3,852	341x	(Chunag <i>et al.</i> , 2022)
<i>S. geniculata</i> FLMAT1	Psílido asiático de cítricos	CP140571.1	4.5	66.5	4,126	100x	(Duan & Wu, 2023)
<i>S. indicatrix</i> DAIF1	Agua	CP037883.1	4.6	66.5	4,198	100x	(Friedrich <i>et al.</i> , 2021)
<i>S. maltophilia</i> NCTC10258	Humano	LS483377.1	4.5	66.5	4,080	100x	(Doyle, 2018)
<i>S. nitritireducens</i> 2001	Sedimentos lacustres	CP016756.1	4.5	64	3,936	102x	(Oh & Kim, 2016)
<i>S. pavanii</i> Y	No determinado	AP024684.1	4.6	67	4,232	108.3x	(Dohra <i>et al.</i> , 2021)
<i>S. rhizophila</i> BI2-2	Suelo	CP088000.1	4.3	66.5	3,940	100x	(Lu & Yu, 2021)
<i>S. riyadhensis</i> ESTM1A_MKCTX4_10a	Agua	CP155568.1	4.7	66.5	4,197	153x	(Vinuesa, 2024)

Se compararon un total de 25,171 genes, de los cuales sólo 71 constituyen el genoma central, el resto forman parte del genoma accesorio compuesto de 4,514 genes compartidos por la mayoría de los genomas (*shell genome*) y 20,586 genes compartidos por un subconjunto mínimo de los genomas (*cloud genome*), incluidos aquellos genes presentes en solo uno de los genomas (Figura 11-A). Claramente la cepa en estudio tiene diferencias genómicas importantes con las cepas de referencia, reflejadas en una firma metabólica específica en el *cloud genome* (Figura 11-B), compuesta por genes relacionados a la producción de proteínas para la replicación y el metabolismo del ADN, la división celular, el transporte de biopolímeros, ensamble de lipopolisacáridos, el censo de hierro, el transporte de P, entre otros.

A)



B)

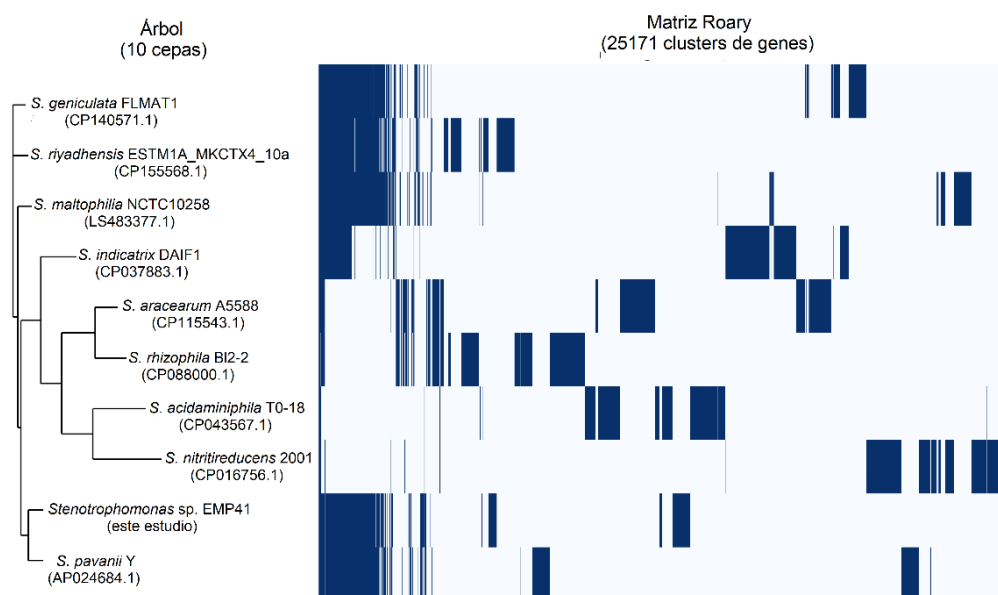


Figura 11: Comparación genómica de *Stenotrophomonas* spp. A) Gráfico de pie que representa la proporción de genes dentro de los genomas comparados. Los genes centrales se encuentran en >99% de los genomas, el *shell genome* se encuentra en el 15-95% y el *cloud genome* está representado en <15%. B) Matriz de presencia/ausencia de genes, las ramas del árbol filogenómico muestran el perfil genético de cada una de las 10 cepas comparadas.

Con la totalidad de los genes se generaron 4,835 clústeres de proteínas, de los cuales 3,747 se encuentran en la cepa EMP41 y 2,562 se encuentran en todas las cepas comparadas donde se codifican proteínas con funciones básicas relacionadas a la síntesis de DNA, división celular y funciones metabólicas básicas. El árbol filogenómico (Figura 12) mostró que la cepa *Stenotrophomonas* sp. EMP41 es más cercana filogenómicamente hablando a la cepa *S. pavanii* Y, con quien comparte el mayor número de ortogrupos.

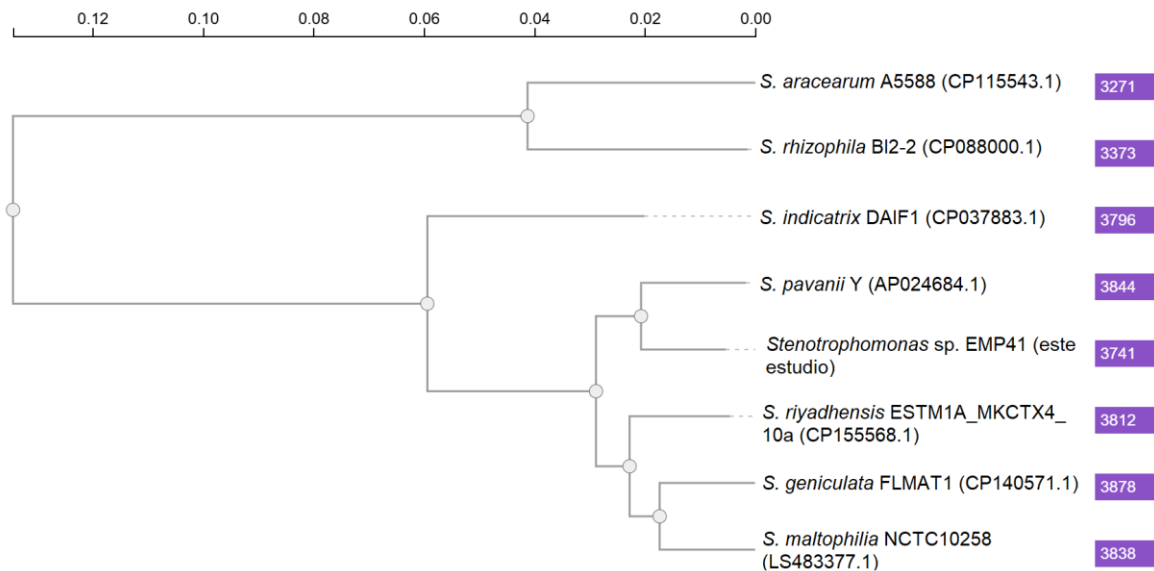


Figura 12: Árbol filogenómico de *Stenotrophomonas* spp. Se observa una escala de distancia de 0.02 y en morado se encuentra el número de ortogrupos que posee cada especie analizada.

La Figura 13 muestra los grupos de proteínas exclusivos o compartidos presentes en los genomas accesorios de 6 cepas de referencia. Entre los grupos de proteínas compartidos se encuentran aquellos relacionados con funciones de PGPR como el transporte de sideróforos, biosíntesis de lipopolisacáridos para la formación de biopelículas, transducción de señales para quimiotaxis, y muchos otros con función biológica no identificada como los 8 grupos exclusivos de *Stenotrophomonas* sp. EMP41.

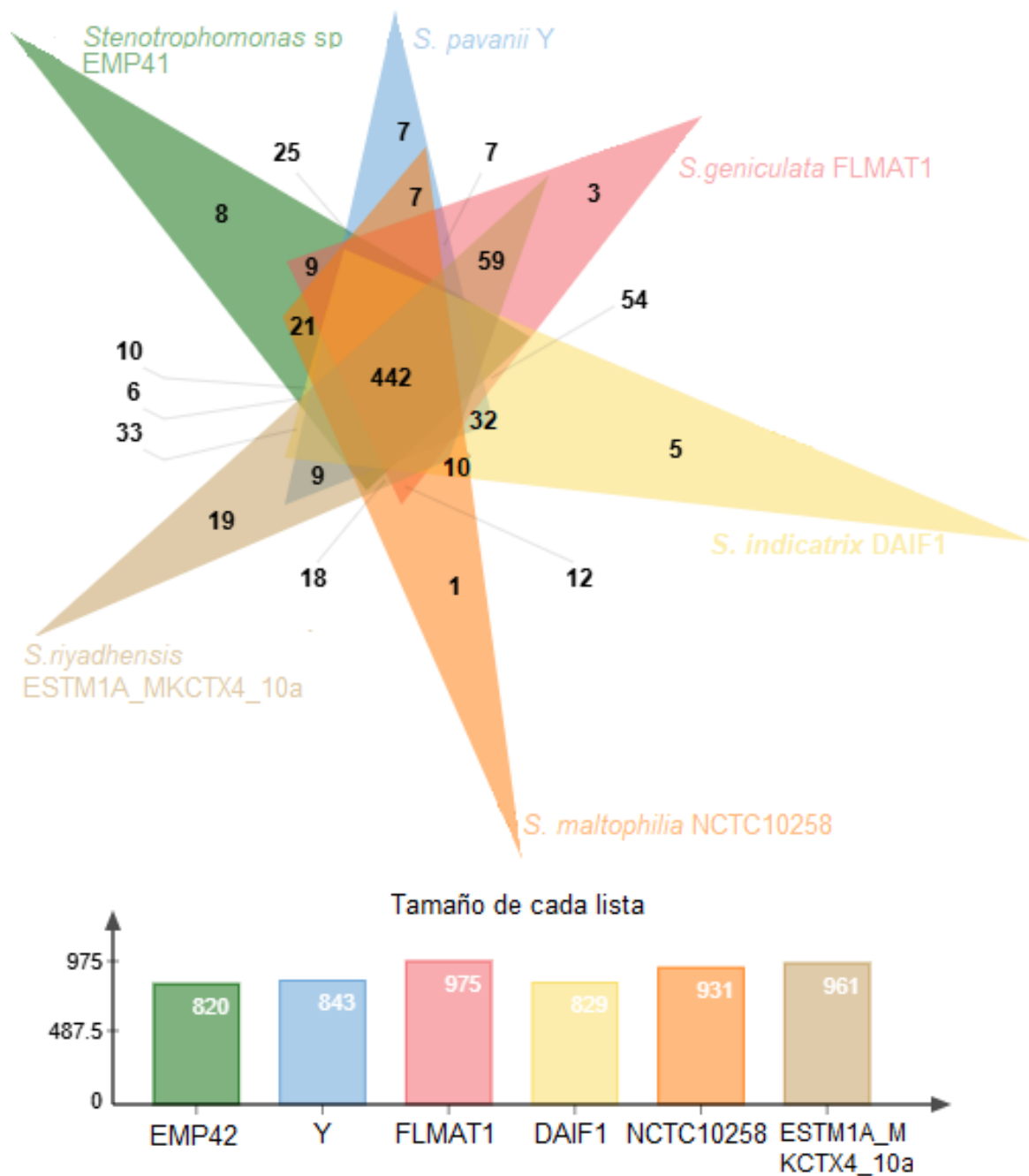


Figura 13: Diagrama de Venn de los 820 clústeres de proteínas que la cepa *Stenotrophomonas* sp. EMP41 (en verde) comparte con alguna de las cepas de referencia, *S. geniculata* FLMAT1, *S. indicatrix* DAIF1, *S. maltophilia* NCTC10258, *S. pavanii* Y y *S. ryadhensis* ESTM1A_MKCTX4_10a. En las intersecciones de los triángulos se muestra el número de clústeres compartidos y al extremo se muestran los clústeres exclusivos de cada cepa.

9.2.3. Conclusiones

La estructura genómica de la cepa *Stenotrophomonas* sp. EMP41 consiste en un único cromosoma cerrado cuya anotación funcional indica que posee un gran número de genes relacionados con las características PGPR descritas previamente. La mayoría de dichos genes conforman operones completos, no agrupados en islas genómicas, sino más bien distribuidos a lo largo de todo el genoma.

El análisis filogenómico determinó que la cepa EMP41 puede ser una nueva especie, posee un dDDH menor al 70% con *S. pavanii*, la especie tipo más cercana. La comparación con genomas de otras especies de *Stenotrophomonas* mostró que la cepa en estudio es claramente distinta a ellas (dDDH<70%).

Stenotrophomonas sp. EMP41 posee un genoma accesorio grande, donde se encuentran los genes relacionados con sus capacidades PGPR, el que no es compartido con las otras cepas estudiadas.

9.2.4 Perspectivas

Postular a *Stenotrophomonas* sp. EMP41 como una nueva especie denominada *Stenotrophomonas sandovalesii* EMP41, cumpliendo previamente con las pruebas fenotípicas y genómicas que permitan dicha postulación.

Las características PGPR de *Stenotrophomonas* sp. EMP41 han sido evaluadas a nivel genético e *in vitro*, surge la necesidad de realizar pruebas *in planta* que determinen el potencial de la cepa para ser utilizada como bioinoculante de otras cactáceas y diferentes cultivos con interés económico.

9.3. Genómica comparativa de *Bacillus* sp. EMP2, aislada de la rizósfera de *E. platyacanthus*.

9.3.1. Introducción

El género *Bacillus*, perteneciente al Phylum *Bacillota*, antes *Firmicutes* (Oren & Garrity, 2021); está compuesto por bacterias Gram positivas en forma de bastón, aerobias o anaerobias facultativas que se encuentran en casi todos los ambientes, principalmente en intestino y suelo (Mutlu *et al.*, 2020). Bacterias de este género tienen tasas de crecimiento relativamente altas, bajos requerimientos nutricionales y la capacidad de esporulación, siendo esta última de gran importancia ya que les permite sobrevivir en ambientes hostiles, volviéndolas candidatas potenciales para la elaboración de bioformulaciones agrícolas estables y de alta prevalencia (Etesami *et al.*, 2023).

Algunas bacterias del género *Bacillus* son patógenos humanos, por ejemplo *B. cereus* que es el agente etiológico de infecciones gastrointestinales causantes de síndrome emético o diarreico (Jovanovic *et al.*, 2021); y *B. anthracis*, responsable del ántrax, enfermedad infecciosa grave que afecta humanos y animales, causante de bacteremia severa y la muerte (Bartholomew *et al.*, 2020). Otras especies son patógenas de insectos como *B. larvae*, *B. thuringiensis*, *B. subtilis* y *B. amyloliquefaciens*, ya que producen moléculas con acción larvicida como los lipopéptidos, e insecticida como quitinasas, que degradan el exoesqueleto de los insectos (Falqueto *et al.*, 2021).

Sin embargo, la mayoría de las especies de *Bacillus* son saprófitas inofensivas del suelo donde juegan un papel importante en la regulación de ciclos biogeoquímicos como el del nitrógeno (Mahapatra *et al.*, 2022); y asociados a plantas donde realizan diferentes actividades metabólicas que resultan benéficas para las mismas, como la producción de indoles que funcionan como hormonas vegetales, la solubilización de fosfatos mediante la producción de fosfatasas y ácidos orgánicos, la capacidad de ejercer control biológico sobre organismos fitopatógenos a través de la producción de antibióticos y enzimas líticas, la fijación de nitrógeno y la inducción de la resistencia sistémica de las plantas (Khan *et al.*, 2022); lo que permite clasificarlas dentro del grupo de las PGPR.

Existen múltiples reportes sobre los beneficios adyacentes de la inoculación de plantas con cepas de diferentes especies de *Bacillus*. Todos los incrementos citados se comparan contra controles sin inocular: *B. aryabhattai* incrementa 107% la longitud del brote, 197% la longitud total de la raíz, y 25% el grosor de la raíz de plantas de maíz, en cultivo hidropónico (Deng *et al.*, 2022); *B. velezensis* como agente de control biológico reduce la infección por *Botrytis cinerea* en plantas de tomate y fresa en un 50% cada una (Toral *et al.*, 2020); *B. tequilensis* mejora el contenido nutricional del arroz incrementando hasta un 158,46% el contenido de N, 81.96% el contenido de P y 201.49% el contenido de K, además lo protege contra

estrés salino aumentando el contenido de los osmoprotectores prolina, hasta 144.86%, y azúcar soluble, en más de un 70% (Shultana *et al.*, 2021).

Actualmente el género *Bacillus* engloba 250 especies reconocidas, algunas de ellas con las características benéficas antes mencionadas (Herrmann *et al.*, 2024), entre las que se encuentra *B. cabrialesii*, bacteria de origen ambiental, de reciente descubrimiento, cuya primera cepa fue descubierta como endófita de trigo en Sonora, México en el año 2015 (de los Santos *et al.*, 2019). Sin embargo, los reportes del beneficio de la inoculación de plantas con esta bacteria son limitados y los genomas secuenciados existentes son 6 y sólo 1 está completo (NCBI).

Sin embargo la clasificación taxonómica de *B. cabrialesii* basada en marcadores moleculares como el gen 16S rRNA no es precisa, ya que posee casi el 100% de similitud con *B. inaquosorum*, que en contraste contiene 138 cepas aisladas de diferentes fuentes como kimchi (Regmi *et al.*, 2020), tejido de esponja de mar (Bhattacharya *et al.*, 2020) o aguas termales (Geraldí *et al.*, 2022), y también asociadas a plantas como uva (Ranade *et al.*, 2024), rizósfera de tomate (Kamali *et al.*, 2019), soya (Kim *et al.*, 2022), piña (Vaithanomsat *et al.*, 2022) y trigo (Morales-Sandoval *et al.*, 2024); es importante mencionar que sólo 7 de estas cepas tienen su genoma completamente reconstruido.

En esta situación de identificación taxonómica imprecisa se encuentra la cepa EMP2, aislada de la rizósfera de *Echinocactus platyacanthus* (biznaga dulce), nativa del semidesierto de Querétaro, con características PGPR previamente descritas (Tabla 11). La cepa fue identificada inicialmente como *B. subtilis*, pero un nuevo análisis de su secuencia del gen 16S rRNA indicó que podría tratarse de una nueva cepa de *B. cabrialesii* o *B. inaquosorum*, por lo que surge la necesidad de hacer análisis taxonómicos más profundos basados en la secuenciación del genoma completo y la comparación genómica, que además permiten enriquecer la base de datos genómicos y evaluar características PGPR de las bacterias a nivel genético.

Tabla 11: Características PGPR de *Bacillus* sp. EMP2

Producción de Indoles	SPO ₄
33.55±0.48 µg/MI	28.87±2.63 µg/mL
Biocontrol <i>F. solani</i>	Producción de Sideróforos
Negativo	Negativo

9.3.2. Resultados y discusión.

9.3.2.1. Análisis taxonómico basado en el gen 16S rRNA

De la clonación de los genes 16S rRNA de la cepa *Bacillus* sp. EMP2 se obtuvieron 4 secuencias que corresponden a 6 de las 10 copias de este gen que contiene dicha cepa, la comparación con la base de datos EzBioCloud mostró que todas las copias del gen tienen similitud con la cepa tipo *Bacillus cabrialesii* TE3 (MK462260); es importante mencionar que las 4 secuencias poseen los mismos porcentajes de cobertura y similitud con la cepa tipo *Bacillus inaquosorum* KCTC13429 (AMXN01000021, Tabla 12). Las relaciones filogenéticas de la cepa EMP2 y bacterias del género *Bacillus* estrechamente relacionadas se evaluaron con un árbol filogenético (Figura 14); como era de esperar, las 4 copias del gen se agruparon con las cepas tipo antes mencionadas.

Tabla 12: Comparación de secuencias de las 4 copias del gen 16S rRNA clonadas de la cepa EMP2 con la base de datos de genes 16S rRNA de cepas tipo de EzBioCloud

	Cepa tipo más cercana (Número de acceso)	Cobertura (%)	Similitud (%)
Clona 1		100	99.66
Clona 2	<i>B. cabrialesii</i> TE3 ^T (MK462260) / <i>B.</i>	100	99.86
Clona 3	<i>inaquosorum</i> KCTC13429 (AMXN01000021)	100	99.80
Clona 4		100	99.86

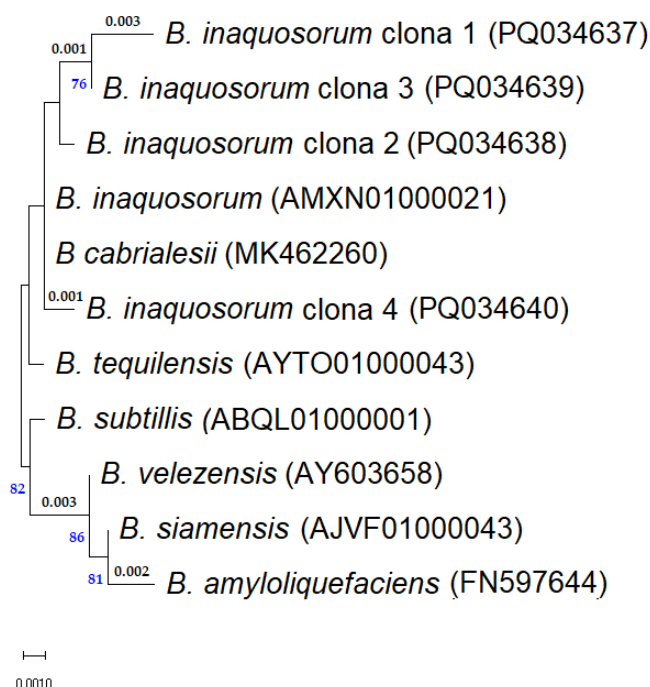


Figura 14: Árbol filogenético de la cepa EMP2 y cepas tipo de *Bacillus*, basado en secuencias parciales del gen 16S rRNA (1400 pb). La filogenia se infirió utilizando el método de Máxima Verosimilitud; se muestra el árbol con la mayor probabilidad logarítmica (-2137.90). El porcentaje de árboles en los que se agruparon los taxones asociados se muestra debajo de las ramas en azul. El árbol está dibujado a escala, con la longitud de las ramas medida en número de sustituciones por sitio (valores encima de las ramas).

La comparación de las secuencias del gen 16S rRNA clonadas de la cepa EMP2 no permitió hacer una identificación taxonómica precisa pues presenta los mismos porcentajes de similitud con cepas tipo de dos especies distintas, lo que hizo necesaria una caracterización más profunda basada en la secuenciación del genoma, pues la secuencia del gen 16S rRNA carece de suficiente poder discriminatorio para diferenciar entre especies de un mismo género bacteriano (Lalucat *et al.*, 2020), particularmente en el caso de *Bacillus* se ha demostrado que no es posible diferenciar entre cepas estrechamente relacionadas únicamente con el análisis de este gen debido a su naturaleza altamente conservada que generalmente sobrepasa el límite establecido para la delimitación de especies, con más del 99% de similitud entre secuencias de diferentes especies del género (Borriss, 2020; Rooney *et al.*, 2009). Además, el número de copias de genes 16S rRNA en diferentes especies es muy variable, en *Bacillus* puede haber más de 10 (Liu *et al.*, 2022; Nakano, 2020), y los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) presentes en cada copia pueden dar lugar a una sobreestimación de la diversidad (Liu *et al.*, 2022).

9.3.2.2. Reconstrucción genómica y anotación funcional de *Bacillus* sp. EMP2

De la secuenciación del genoma completo se obtuvieron un total de 388,510 lecturas, con longitudes entre 51 y 172,619 pb, y una longitud media de 5,255 pb, con las que se obtiene una cobertura del genoma de 484X. La calidad de las secuencias fue evaluada mediante el puntaje Phred, el cual fue de 30 para el 99% de ellas. el ensamble *de novo* de las lecturas produjo 1 único contig lineal de 4,218,157 pb de buena calidad, con una longitud de N50 equivalente a la longitud del contig, una L50 de 1 contig y un porcentaje de guanina-citocina de 43.9%. El genoma obtenido (Figura 15) tiene tamaño y porcentaje de GC muy cercanos a los reportados para otras cepas de *B. inaquosorum*.

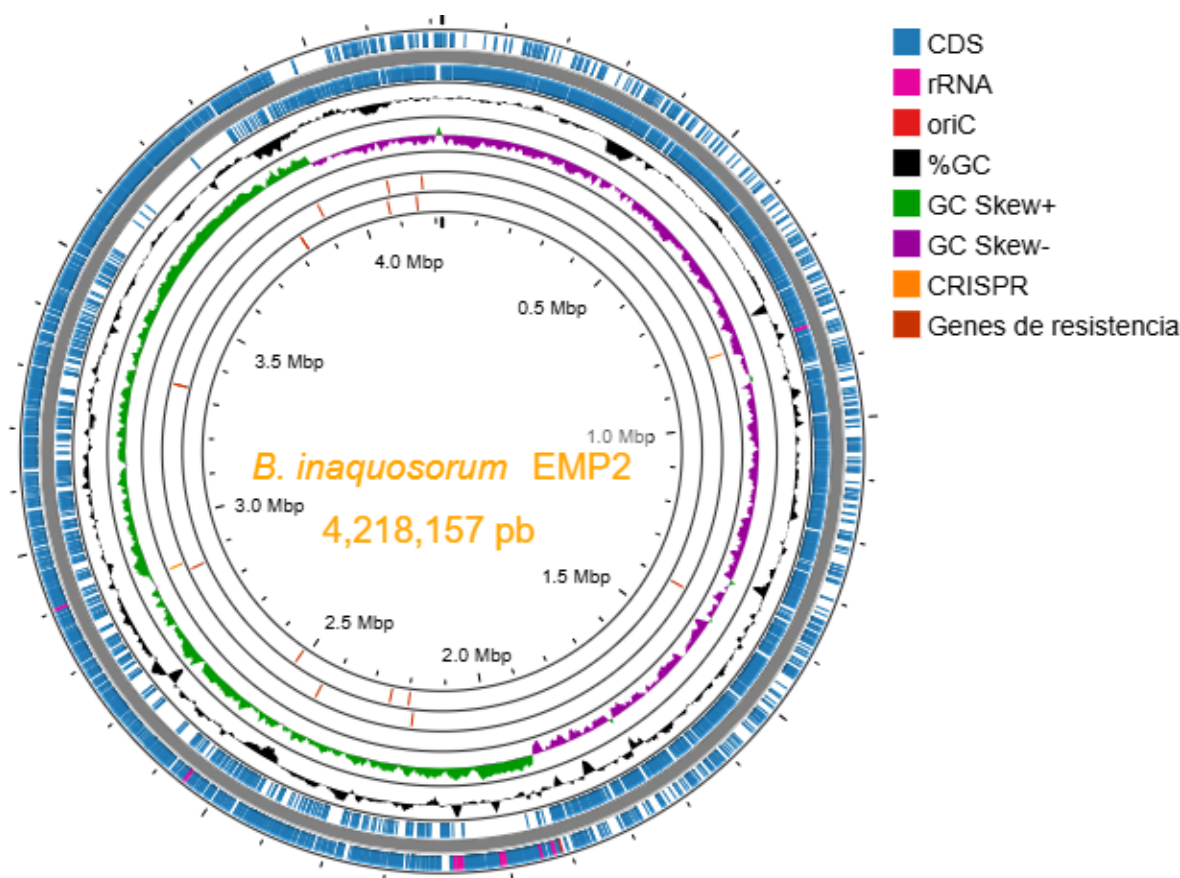


Figura 15: Mapa del genoma cerrado de *Bacillus* sp. EMP2 con una longitud de 4,421,649 pb. Desde el exterior: los círculos 1 y 2 encierran los genes de la cadena principal y la cadena complementaria respectivamente; el círculo 3 el contenido de GC; el círculo 4 el sesgo de GC; el círculo 5 muestra los loci CRISPR-Cas (2 líneas naranja); los círculos 6 y 7 los genes de resistencia (14 líneas rojo oscuro). La escala en Mbp se indica en el círculo interior.

Con la secuencia del genoma completo se realizó una identificación basada en genoma con la que se determinó que la cepa EMP2 es *B. inaquosorum*, con un ANI de 98.76%, mayor al límite preestablecido de 95% para la delimitación de especies (Yoon *et al.*, 2017), de acuerdo con la herramienta TruebackID de EzBioCloud (Ha *et al.*, 2019) y un dDDH de 89.5%, mayor al límite establecido de 70%, (Meier-Kolthoff *et al.*, 2014) de acuerdo con el TYGS del Instituto Leibniz (Meier-Kolthoff & Göker, 2019). Con *B. cabrialesii* tiene un ANI de 93.97% y un dDDH de 54.4% por lo que se descartó que la cepa EMP2 perteneciera a esta especie.

Con la anotación del genoma se predijeron 4,122 genes codificantes, 64 regiones reguladoras para: triptófano, mononucleótido de flavina (FMN), glicina, lisina, aminoacilación de aminoácidos (Tbox), metionina (Sbox) y otros más. Contiene 10 operones completos de rRNA que muestran un 99,9% de similitud entre sus secuencias 16S y 86 tRNA. Entre los genes codificantes se encuentran aquellos que intervienen en la producción de enzimas asociadas con actividades PGPR como los genes de los operones *flgBCN*, *trpABP* y *phoABDEHRP*, entre otros (Tabla 13).

Tabla 13: Genes involucrados en las características PGPR de *B. inaquosorum* EMP2

Característica PGPR	Gen	Producto
Producción de IAA	<i>iaaH</i>	Proteína A de utilización del aminobenzoil-glutamato
	<i>trpA</i>	Triptófano sintasa cadena alfa
	<i>trpB</i>	Triptófano sintasa cadena beta
	<i>trpC</i>	Indol-3-glicerol fosfato sintetasa
	<i>trpD</i>	Antranilato fosforribosiltransferasa
	<i>trpE</i>	Antranilato sintasa
	<i>trpF</i>	N-(5'-fosforibosil) antranilato isomerasa
	<i>trpP</i>	Transportador de triptófano
	<i>trpS</i>	Triptófano-RNAt ligasa
Motilidad y quimiotaxis	<i>cheA</i>	Transducción de señales histidina quinasa CheA
	<i>cheB</i>	Glutamato metilesterasa reguladora de la respuesta a la quimiotaxis CheB
	<i>cheC</i>	Fosfatasa CheY-P CheC
	<i>cheD</i>	Quimiorreceptor glutamina deamidasa CheD
	<i>cheR</i>	Glutamato metiltransferasa CheR
	<i>cheV</i>	Proteína quimiotáctica CheV
	<i>cheW</i>	Regulador positivo de la actividad de la proteína CheA, CheW
	<i>cheY</i>	Regulador de la quimiotaxis que transmite señales de los quimiorreceptores a los componentes motores flagelares CheY
	<i>flaA</i>	Flagelina FlaA
	<i>flaB</i>	Proteína flagelar FlaB
	<i>flbD</i>	Proteína flagelar FlbD
	<i>flbG</i>	Proteína flagelar FlbG

<i>flaE</i>	Regulador de síntesis flagelar FlaE
<i>flgB</i>	Proteína de varilla del cuerpo basal flagelar FlgB
<i>flgC</i>	Proteína de varilla del cuerpo basal flagelar FlgC
<i>flgD</i>	Proteína de modificación de la varilla del cuerpo basal flagelar FlgD
<i>flgE</i>	Proteína de gancho flagelar FlgE
<i>flgF</i>	Proteína de varilla del cuerpo basal flagelar FlgF
<i>flgG</i>	Proteína de varilla del cuerpo basal flagelar FlgG
<i>flgK</i>	Proteína asociada al gancho flagelar FlgK
<i>flgL</i>	Proteína asociada al gancho flagelar FlgL
<i>flgM</i>	Regulador negativo de la síntesis de flagelina FlgM anti-sigma28
<i>flgN</i>	Proteína de biosíntesis flagelar FlgN
<i>flhA</i>	Proteína de biosíntesis flagelar FlhA
<i>flhB</i>	Proteína de biosíntesis flagelar FlhB
<i>flhF</i>	Proteína de biosíntesis flagelar FlhF
<i>flhG</i>	ATPasa ubicación/número del flagelo FlhG
<i>flhO</i>	Proteína del complejo gancho flagelar-cuerpo basal FlhO
<i>flhP</i>	Proteína del complejo gancho flagelar-cuerpo basal FlhP
<i>fliD</i>	Proteína de capuchón flagelar FliD
<i>fliE</i>	Proteína del complejo gancho flagelar-cuerpo basal FliE
<i>fliF</i>	Proteína del anillo M del flagelo FliF
<i>fliG</i>	Proteína del interruptor del motor flagelar FliG
<i>fliH</i>	Proteína de ensamblaje flagelar FliH
<i>fliI</i>	ATP sintasa específica de flagelo FliI
<i>fliJ</i>	Proteína flagelar FliJ
<i>fliK</i>	Proteína de control de la longitud del gancho flagelar FliK
<i>fliL</i>	Proteína asociada al cuerpo basal flagelar FliL
<i>fliM</i>	Proteína del interruptor del motor flagelar FliM
<i>fliN</i>	Proteína del interruptor del motor flagelar FliN
<i>fliP</i>	Proteína de biosíntesis flagelar FliP
<i>fliQ</i>	Proteína biosíntesis flagelar FliQ
<i>fliR</i>	Proteína biosíntesis flagelar FliR
<i>fliS</i>	Chaperona de secreción flagelar FliS
<i>fliT</i>	Proteína de biosíntesis flagelar FliT
<i>fliW</i>	Factor de ensamblaje flagelar FliW
<i>fliZ</i>	Regulador del factor sigma S FliZ
<i>mcpA</i>	Proteína sensora/transductora de quimiotaxis aceptora de metilo
<i>mcpB</i>	Proteína sensora/transductora de quimiotaxis aceptora de metilo
<i>mcpC</i>	proteína de quimiotaxis aceptora de metilo
<i>motA</i>	Proteína de rotación de motor flagelar MotA
<i>motB</i>	Proteína de rotación de motor flagelar MotB

	<i>sigD</i>	Factor sigma de la ARN polimerasa para el operón flagelar
	<i>tlpC</i>	Proteína de quimiotaxis aceptora de metilo TlpC
	<i>yfmS</i>	Proteína de quimiotaxis aceptora de metilo
	<i>yoaH</i>	Proteína de quimiotaxis aceptora de metilo
	<i>yviE</i>	Proteína asociada al gancho flagelar
Solubilización de fosfato	<i>phoA</i>	Fosfatasa alcalina PhoA
	<i>phoB</i>	Fosfatasa alcalina PhoB
	<i>phoD</i>	Fosfodiesterasa/fosfatasa alcalina D
	<i>phoE</i>	Fosfatasa PhoE
	<i>phoH</i>	ATPasa inducible por inanición de fosfato PhoH
	<i>phoP</i>	Proteína reguladora de la transcripción de la síntesis de fosfatasa alcalina PhoP
	<i>phoR</i>	Histidina quinasa PhoR
	<i>ppaC</i>	Pirofosfatasa inorgánica dependiente del manganeso
	<i>ppaX</i>	Pirofosfatasa PpaX
	<i>ptsG</i>	Sistema PTS específico de glucosa
	<i>ptsH</i>	Proteína transportadora de fosfato HPr
	<i>ptsI</i>	Fosfoenolpiruvato fosfotransferasa
	<i>ptsJ</i>	Regulador transcripcional, dominio de la familia GntR / Aspartato aminotransferasa
Otros	<i>ahpA</i>	Peroxidasa específica de biopelícula AhpA
	<i>bslA</i>	Proteína de la capa superficial del biofilm BslA
	<i>bslB</i>	Proteína de la capa superficial del biofilm BslB
	<i>epsB</i>	Proteína tirosina quinasa EpsB
	<i>epsC</i>	Proteína de biosíntesis de polisacáridos EpsC
	<i>epsD</i>	Glicosiltransferasa EpsD
	<i>epsE</i>	Glicosiltransferasa EpsE
	<i>epsF</i>	Glicosiltransferasa EpsF
	<i>epsG</i>	Proteína de biosíntesis de exopolisacáridos de biopelícula EpsG
	<i>epsH</i>	Glicosiltransferasa EpsH
	<i>epsI</i>	Piruvil transferasa EpsI
	<i>epsJ</i>	Glicosiltransferasa EpsJ
	<i>epsK</i>	Receptor de di-GMP cíclico EpsK
	<i>epsL</i>	N,N'-diacetilbacilosamina 1-fosfato transferasa EpsL
	<i>epsM</i>	Acetiltransferasa EpsM
	<i>epsN</i>	Glutamina-escilo-inositol transaminasa EpsN
	<i>epsO</i>	Polisacárido piruvil transferasa EpsO
	<i>mstX</i>	Proteína de formación de biopelícula MstX
	<i>remA</i>	Regulador de la matriz extracelular/biopelícula RemA
	<i>sipW</i>	Peptidasa de señalización SipW, necesaria para la secreción de TasA
	<i>tapA</i>	Proteína de anclaje/ensamblaje de TasA
	<i>tasA</i>	Proteína de matriz de biopelícula TasA

Síntesis y transporte de osmoprotectores	<i>opcR</i>	Regulador transcripcional del operón opuC, OpcR
	<i>opuAA</i>	Transportador tipo ABC de betaína de glicina/prolina OpuAA
	<i>opuAB</i>	Subunidad de la permeasa del transportador tipo ABC de betaína y glicina/prolina OpuAB
	<i>opuAC</i>	Proteína de unión al sustrato del transportador tipo ABC de betaína y glicina/prolina OpuAC
	<i>opuBA</i>	Sistema de transporte tipo ABC de colina, proteína de unión a ATP OpuBA
	<i>opuBB</i>	Sistema de transporte tipo ABC de colina, proteína permeasa OpuBB
	<i>opuBC</i>	Sistema de transporte tipo ABC de colina, proteína de unión a colina OpuBC
	<i>opuBD</i>	Sistema de transporte tipo ABC de colina, proteína permeasa OpuBD
	<i>opuCA</i>	Transportador tipo ABC osmoprotector, proteína de unión a ATP OpuCA
	<i>opuCB</i>	Transportador tipo ABC de glicina betaína/carnitina/colina/sulfato de colina permeasa OpuCB
	<i>opuCC</i>	Lipoproteína de unión al sustrato del transportador tipo ABC osmoprotector OpuCC
	<i>opuCD</i>	Transportador tipo ABC de glicina betaína/carnitina/colina/sulfato de colina permeasa OpuCD
	<i>opuD</i>	Transportador de glicina betaína OpuD
	<i>opuE</i>	Simportador sodio/prolina osmorregulador OpuE
Producción de lipopéptidos	<i>comA</i>	Regulador positivo de los genes de competencia tardía y producción de surfactina (comS, srfA, rapA)
	<i>srfAA</i>	Péptido sintetasa no ribosómica surfactina SrfAA
	<i>srfAB</i>	Péptido sintetasa no ribosómica surfactina SrfAB
	<i>srfAC</i>	Péptido sintetasa no ribosómica surfactina SrfAC
	<i>srfAD</i>	Subunidad tioesterasa de la surfactina sintasa SrfAD
Estrés oxidativo	<i>katA</i>	Catalasa
	<i>katE</i>	Catalasa
	<i>katX</i>	Catalasa

Las capacidades PGPR de la cepa *B. inaquosorum* EMP2 están determinadas por un conjunto de genes que intervienen en la síntesis de enzimas relacionadas con dichas actividades. En primer lugar, la movilidad y la quimiotaxis de la bacteria, necesarias para la colonización exitosa de la rizósfera de las plantas, están definidas por la presencia de genes codificantes de proteínas quimiotácticas y quimiorreceptores (*CheABCDRVWY*) y proteínas que intervienen en la síntesis de estructuras flagelares (*fliEGHJLMPQRSW*, *flgBCN*, *flhABFGOP*, etc).

La producción de IAA se ve representada por la presencia de los genes *trpABCDEPS* (sintetasas) que participan en la biosíntesis de triptófano (Singh *et al.*, 2021), *iaaH* que codifica una hidrolasa involucrada en la síntesis de acetaldehído deshidrogenasa, que interviene en la producción de IAA por la vía del indol-3-piruvato (IPyA), generalmente utilizada por rizobacterias benéficas para las plantas (Singh *et al.*, 2022). No fueron encontrados genes relacionados a otras vías de

producción de IAA, lo que sugiere que EMP2 sólo produce IAA por la ruta mencionada. La solubilización de P está determinada por la presencia de genes de los operones *phoABDPR* que conforman el regulón *pho* encargado de la detección de la disponibilidad ambiental de fosfato inorgánico (Monds *et al.*, 2006), *ptsGHIJ* (transportadores), *ppaC* (pirofosfatasa), *ppaX* (pirofosfatasa PPAX), entre otros, necesarios para la solubilización y asimilación de P (Kang *et al.*, 2020).

En el genoma de la cepa EMP2 no se encontraron genes relacionados a la producción de sideróforos, ni a la síntesis de quitina, lo que concuerda con la caracterización fenotípica de la bacteria (de la Torre-Hernández *et al.*, 2020). Sin embargo, fue posible identificar genes relacionados con otras características benéficas para las plantas, como el operón *epsBCDEFGHIJKO* y los genes *tasA*, *bslAB*, *mstX*, determinantes de la producción de exopolisacárido y la formación de biofilm que mitigan el estrés hídrico (Rajkumar *et al.*, 2024), y el operón *opuD/E/AA/AB/AC/BA/BB/BC/BD/CA/CB/CC/CD* que interviene en la síntesis y transporte de osmoprotectores para aminorar el estrés salino (Ibarra-Villarreal *et al.*, 2021), generando tolerancia sistémica inducida (IST) al estrés abiótico al que están sometidas las plantas en ambientes adversos (Etesami & Maheshwari, 2018). Otros genes encontrados están relacionados a la producción de lipopéptidos como la surfactina (*srfAA/AB/AC/AD*) que podría tener efecto plaguicida contra insectos, ácaros y nemátodos en los cultivos (Penha *et al.*, 2020).

Además, fue posible identificar 2 sitios de CRISPR-Cas necesarios para la respuesta inmunitaria de las bacterias ante infecciones virales e inserciones de elementos genéticos móviles provenientes de transferencia horizontal (Wheatley & MacLean, 2021). También se encontraron 16 genes de resistencia a antibióticos y desinfectantes como carbapenem (BSU-1), macrólidos (*mphK*), lincosamida (*lmrB*), nucleósidos (*tmrB*) glicopéptidos (*vanTWY*), lincosamida-estreptogramina (*vmlR*), antibióticos peptídicos (*mprF*), aminoglicosidos-tetraciclina-fenicol (*ykkCD*), agentes desinfectantes y antisépticos (*qacGJ*), ácido fosfónico (*fosBx1*) y cefalosporinas-penem (Bcl), que forman parte del resistoma intrínseco de *B. inaquosorum* EMP2 que contribuye al establecimiento y supervivencia de la cepa en el nicho ecológico, al no ser afectado por los antibióticos producidos por otros microorganismos competentes (Amna *et al.*, 2020). Por otro lado, la cepa fue catalogada como no patógena, con una probabilidad de predicción de 0.108, menor al umbral establecido (0.3) por el servidor Pathogen Finder, por lo que podría ser utilizada para la formulación de bioinoculantes.

9.3.2.3. Comparación genómica de *B. inaquosorum* EMP2

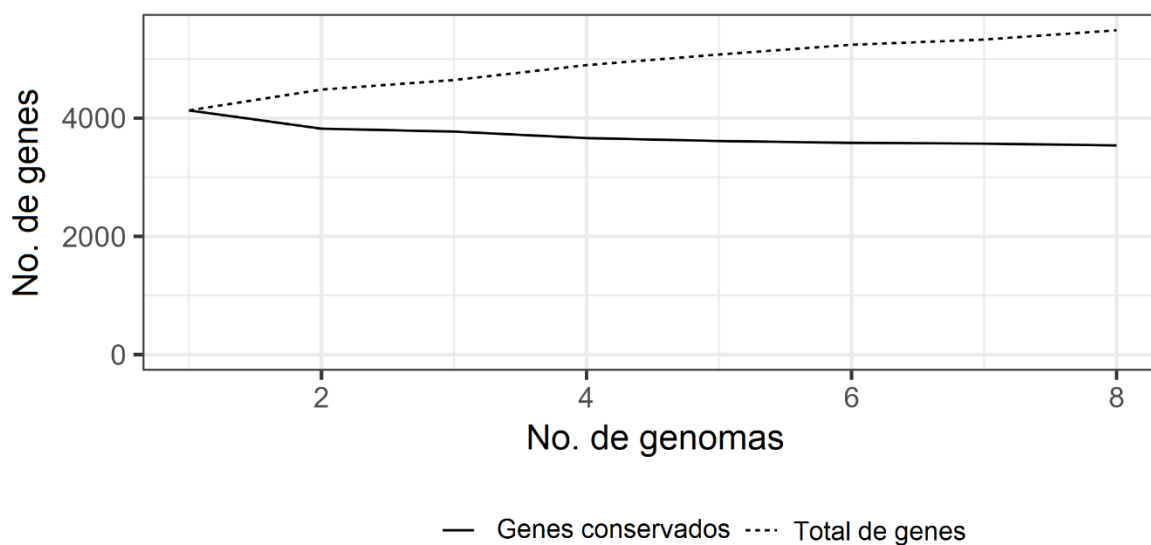
El análisis del pangenoma de *B. inaquosorum* se realizó con los 7 genomas completos de cepas de esta especie disponibles en GenBank, para evitar problemas relacionados con el uso de ensamblajes fragmentados (Page *et al.*, 2015). Algunas características del genoma de las 8 cepas utilizadas para este análisis se encuentran en la Tabla 14.

Tabla 14: Métricas básicas de los 8 genomas completos de *Bacillus inaquosorum* utilizados para la genómica comparativa. Todos los genomas están ensamblados en un contig

Cepa	Fuente	No. de acceso GenBank	Longitud (Mbp)	GC (%)	CDS	Cobertura	Referencia
<i>B. inaquosorum</i> EMP2	Rizósfera de <i>E. platyacanthus</i>	CP162598	4.2	43.9	4,122	484x	(de la Torre-Hernández <i>et al.</i> , 2020)
<i>B. inaquosorum</i> BIM-B-2002	Solución etanólica	CP141263.1	4.2	44	4,315	75x	(Akhremchuk <i>et al.</i> , 2023)
<i>B. inaquosorum</i> BSY82	Productos probióticos	CP126534.1	4.2	44	4,316	49x	(Wang & Shi, 2023)
<i>B. inaquosorum</i> KCTC-13429	No determinado	CP029465.1	4.4	44	4,374	209.4x	(Kim, 2018)
<i>B. inaquosorum</i> SI3	Suelo contaminado con metales pesados	CP135973.1	4.4	44	4,441	1029x	(Imdad & Ishii, 2023)
<i>B. inaquosorum</i> LBA001	Suelo	CP127095.1	4.2	44	4,291	100x	(Rosas, 2023)
<i>B. inaquosorum</i> M3	Intestino de pescado	CP123994.1	4.1	44	4,309	99.7x	(Shen, 2023)
<i>B. inaquosorum</i> A65-1	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fisch	CP096592.1	4.2	44	4,303	100x	(Kong & Hou, 2022)

Con este análisis se determinó que la especie *B. inaquosorum* tiene un pangenoma abierto y en expansión (Figura 16) compuesto por 5,487 genes, de los cuales 3,539 son parte del genoma accesorio que a su vez se compone de 846 genes compartidos por la mayoría de los genomas (*shell genome*) y 1,102 genes compartidos por un subconjunto mínimo de los genomas (*cloud genome*), incluidos aquellos genes presentes en solo uno de los genomas (Figura 17-A). La cepa en estudio tiene un genoma central consistente con las cepas de referencia y una firma metabólica específica en el *cloud genome* (Figura 17-B), comparable solo con las cepas aisladas de suelo, compuesta por genes relacionados a la producción de proteínas de transposición para recombinación genética, proteínas relacionadas con la replicación del DNA, con la síntesis de estructuras flagelares y peptidoglucano, entre otras.

A)



B)

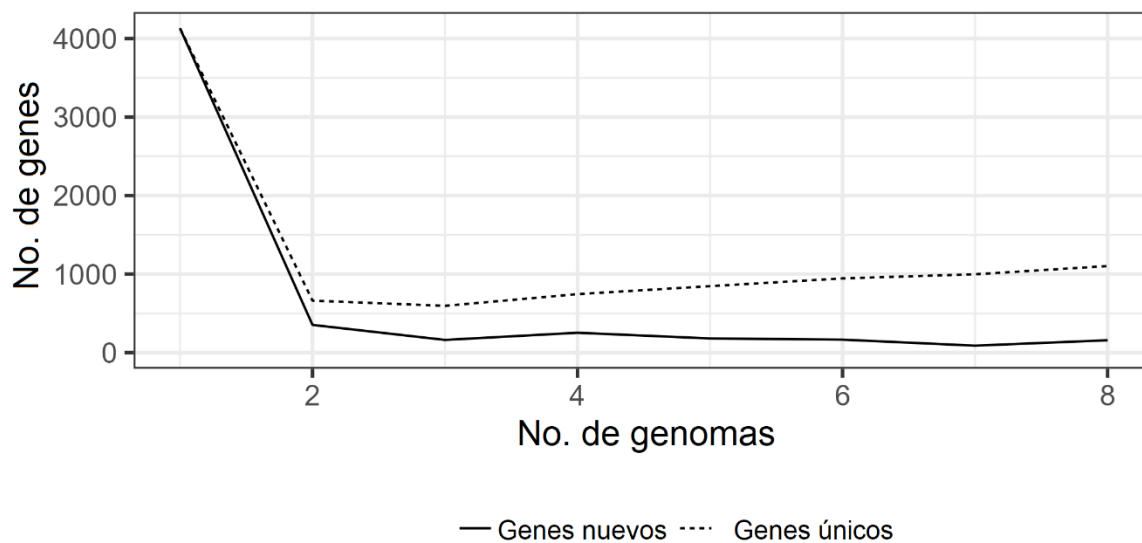
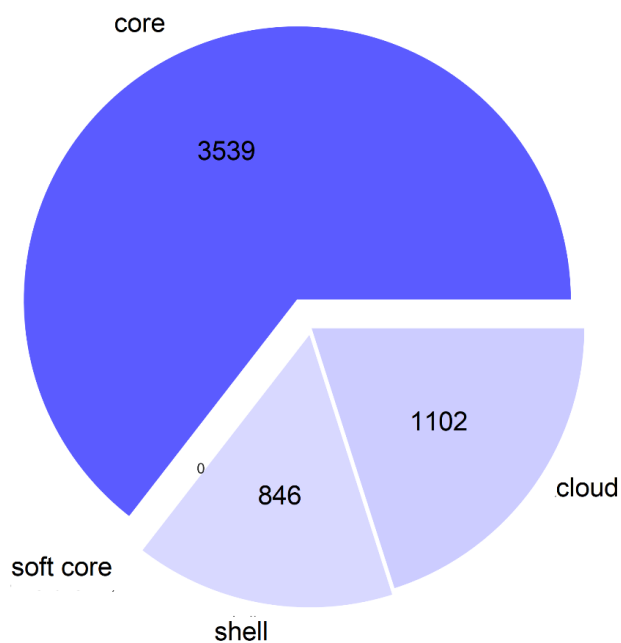


Figura 16: Curva *Pan-Core genome*. El pangenoma de *B. inaquosorum* varía a medida que se agregan genomas (en órdenes aleatorios). A) Comparación de los genes conservados contra los genes totales agregados con los genomas. B) Comparación de los genes nuevos contra los genes únicos agregados con los genomas.

A)



B)

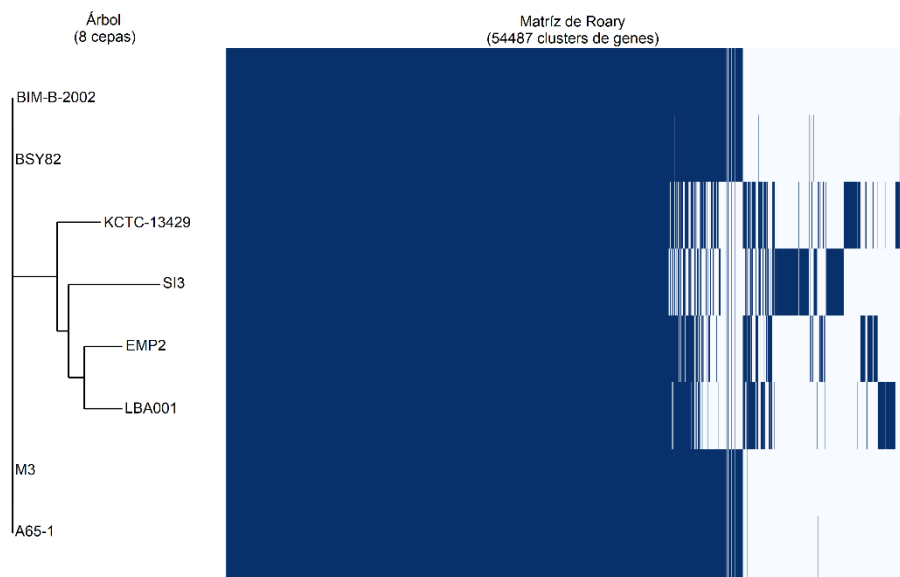


Figura 17: Pangenoma de *Bacillus inaquosorum*. A) Gráfico de pie que representa la proporción de genes dentro de los genomas comparados. Los genes centrales se encuentran en >99% de los genomas, el *shell genome* se encuentra en el 15-95% y el *cloud genome* está representado en <15%. B) Matriz de presencia/ausencia de genes, las ramas del árbol filogenómico muestran el perfil genético de cada una de las 8 cepas comparadas.

Con la totalidad de los genes se generaron 4,296 clústeres de proteínas, de los cuales 3,962 se encuentran en la cepa EMP2, 3,697 constituyen el genoma central en donde se codifican proteínas con funciones básicas relacionadas a la síntesis de DNA, división celular, esporulación, quimiotaxis, transporte de aminoácidos, funciones metabólicas básicas y algunas relacionadas con características PGPR como la producción de fosfatasa. En árbol filogenómico de la Figura 18 se muestra que la cepa EMP2 de *B. inaquosorum* es más cercana, filogenómicamente hablando, de la cepa *B. inaquosorum* LBA001, ya que ambas cepas tienen un número similar de ortogrupos y comparten la mayoría de ellos.

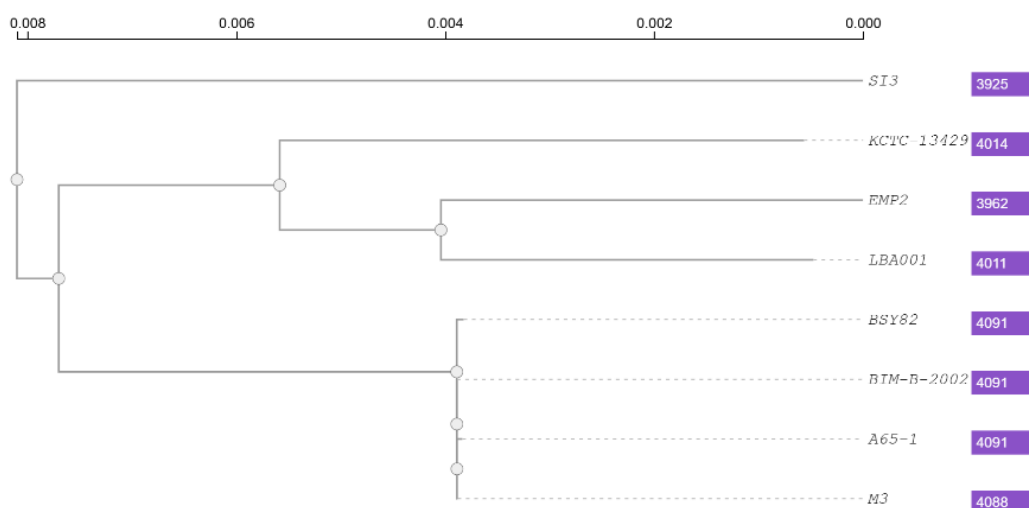


Figura 18: Árbol filogenómico de *B. inaquosorum*. Se observa una escala de distancia de 0.002 y en morado se encuentra el número de ortogrupos que posee cada cepa analizada.

En la Figura 19 se muestran los grupos de proteínas presentes en los genomas accesorios de las 3 cepas de referencia aisladas de suelo, ya que solo con ellas la cepa EMP2 comparte algunos clústeres. Entre los grupos de proteínas compartidos se encuentran algunos relacionados a la biosíntesis de ácido teicoico y elementos de transposición, la mayoría de estos grupos no tienen una función biológica identificada. Además, EMP2 posee 4 grupos exclusivos de los cuales 2 corresponden a elementos de transposición y los otros 2 no tienen una función biológica definida.

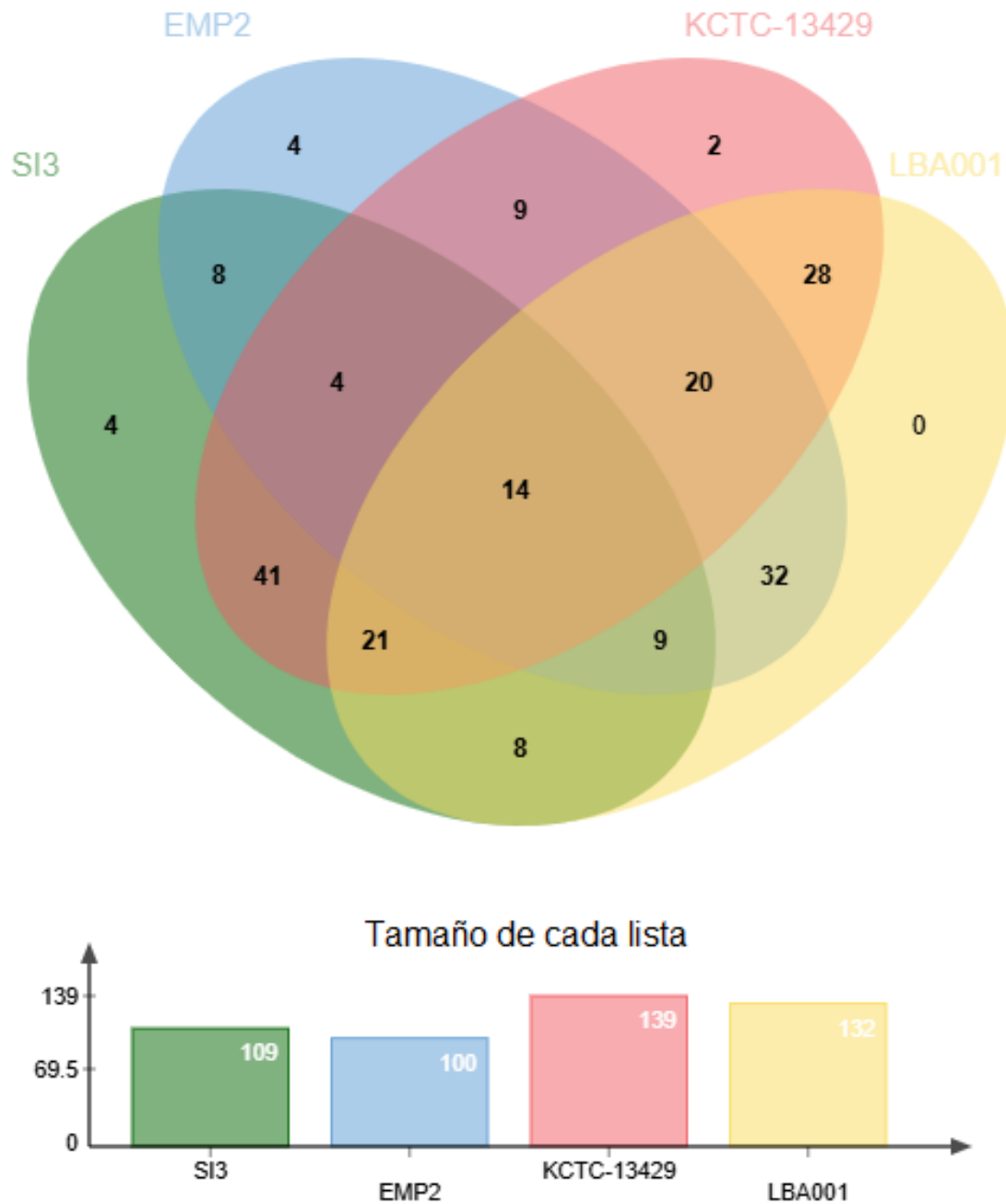


Figura 19: Diagrama de Venn de los 109 clústeres de proteínas que la cepa *B. inaquosorum* EMP2 (en azul) comparte con alguna de las cepas de referencia SI3, KCTC-13429 Y LBA001. En las intersecciones de los óvalos se muestra el número de clústeres compartidos y al extremo se muestran los clústeres exclusivos de cada cepa.

9.3.3. Conclusiones

La estructura genómica de la cepa EMP2 consiste en un único cromosoma cerrado cuya anotación funcional indica que posee genes relacionados con las características PGPR descritas previamente para esta bacteria. Algunos de esos genes conforman operones completos distribuidos a lo largo del genoma.

Esta cepa fue finalmente identificada como *Bacillus inaquosorum* al obtener valores de ANI=98.76% y dDDH=89.5%, superiores a los establecidos para la delimitación de especies.

La caracterización fenotípica indica que EMP2 no posee notables características PGPR, sin embargo, posee genes que codifican para la producción de exopolisacáridos (EPS) y osmoprotectores, que reducen el estrés abiótico, así como la producción de lipopéptidos para la prevención de plagas en los cultivos. Estas características genéticas son compartidas con otras cepas aisladas del suelo, que han sido reportadas como PGPR.

10. CONCLUSIONES GENERALES.

Se reconstruyeron los genomas completos de las tres cepas en estudio, mediante la obtención de ensamblajes de buena calidad. Permitiendo la identificación taxonómica precisa de las mismas basada en sus secuencias genómicas completas.

La anotación funcional de cada genoma permitió identificar los genes u operones que les confieren las características PGPR a estas bacterias y determinar que los mismos se encuentran distribuidos a lo largo del genoma y no están agrupados en islas genómicas o elementos extracromosómicos.

La comparación genómica de las cepas en estudio, con otras del mismo género y/o especie previamente reportadas, mostró mayor cercanía en estructura genómica con cepas aisladas de orígenes similares.

11. REFERENCIAS

- Adeleke, B. S., Ayangbenro, A. S., & Babalola, O. O. (2021). Genomic assessment of *Stenotrophomonas indicatrix* for improved sunflower plant. *Current Genetics*, 67(6), 891–907. <https://doi.org/10.1007/S00294-021-01199-8/TABLES/7>
- Afordoanyi, D. M., Diabankana, R. G. C., & Validov, S. Z. (2023). Genome sequences of plant-beneficial *Pseudomonas atacamensis* MGMM4 isolated from roots sunflower (*Helianthus annuus* L.). Kazan Scientific Center of Russian Academy of Sciences, Laboratory of Molecular Genetics and Microbiology Methods, 2/31 Lobachevskogo street, Kazan, Tatarstan 420111, Russia.
- Afrizal, A., Jennings, S. A. V., Hitch, T. C. A., Riedel, T., Basic, M., Panyot, A., Treichel, N., Hager, F. T., Wong, E. O. Y., Wolter, B., Viehof, A., von Strempel, A., Eberl, C., Buhl, E. M., Abt, B., Bleich, A., Tolba, R., Blank, L. M., Navarre, W. W., Kiessling, F., Horz, H. P., Torow, N., Cerovic, V., Stecher, B., Strowig, T., Overmann, J. & Clavel, T. (2022). Enhanced cultured diversity of the mouse gut microbiota enables custom-made synthetic communities. *Cell Host and Microbe*, 30(11), 1630-1645.e25. <https://doi.org/10.1016/J.CHOM.2022.09.011/ATTACHMENT/75492C06-B072-402D-BB67-85A59D06315F/MMC4.XLSX>
- Aguirre-Garrido, J. F., Montiel-Lugo, D., Hernández-Rodríguez, C., Torres-Cortes, G., Millán, V., Toro, N., Martínez-Abarca, F., & Ramírez-Saad, H. C. (2012). Bacterial community structure in the rhizosphere of three cactus species from semi-arid highlands in central Mexico. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 101(4), 891–904. <https://doi.org/10.1007/S10482-012-9705-3/TABLES/4>
- Akhremchuk, K. V., Akhremchuk, A. E., Sikolenko, M. A., & Valentovich, L. N. (2023). Genome analysis of *Bacillus inaquosorum* strain BIM B-2002, isolated as a laboratory contaminant. Center of Analytical and Genetic Engineering Research, Institute of Microbiology, National Academy of Sciences of Belarus, Kuprevich 2, Minsk 220084, Belarus.
- Alanís Flores, G. J., & Velazco Macías, C. (2008). Importancia de las cactáceas como recurso natural en el noreste de México. *Ciencia UANL*, 30(1), 4–11. ISSN: 1405-9177.
- Alcock, B. P., Huynh, W., Chalil, R., Smith, K. W., Raphenya, A. R., Wlodarski, M. A., Edalatmand, A., Petkau, A., Syed, S. A., Tsang, K. K., Baker, S. J. C., Dave, M., McCarthy, M. C., Mukiri, K. M., Nasir, J. A., Golbon, B., Imtiaz, H., Jiang, X., Kaur, K., Kwong, M., Liang, Z. C., Niu, K. C., Shan, P., Yang, J. Y. J., Gray, K. L., Hoad, G. R., Jia, B., Bhandu, T., Carfrae, L. A., Farha, M. A., French, S., Gordzevich, R., Rachwalski, K., Tu, M. M., Bordeleau, E., Dooley, D., Griffiths, E., Zubyk, H. L., Brown, E. D., Maguire, F., Beiko, R. G., Hsiao, W. W. L., Brinkman, F. S. L., Van Domselaar, G. & McArthur, A. G. (2023). CARD 2023:

- expanded curation, support for machine learning, and resistome prediction at the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Research*, 51(D1), D690–D699. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAC920>
- Amna, Xia, Y., Farooq, M. A., Javed, M. T., Kamran, M. A., Mukhtar, T., Ali, J., Tabassum, T., Rehman, S., Hussain Munis, M. F., Sultan, T., & Chaudhary, H. J. (2020). Multi-stress tolerant PGPR *Bacillus xiamenensis* PM14 activating sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) red rot disease resistance. *Plant Physiology and Biochemistry*, 151, 640–649. <https://doi.org/10.1016/J.PLAPHY.2020.04.016>
- Ansari, F. A., Jabeen, M., & Ahmad, I. (2021). *Pseudomonas azotoformans* FAP5, a novel biofilm-forming PGPR strain, alleviates drought stress in wheat plant. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 18(12), 3855–3870. <https://doi.org/10.1007/S13762-020-03045-9/FIGURES/5>
- Arce-Inga, M., González-Pérez, A. R., Hernandez-Diaz, E., Chuquibala-Checan, B., Chavez-Jalk, A., Llanos-Gómez, K. J., Leiva-Espinoza, S. T., Oliva-Cruz, S. M., & Cumpa-Velasquez, L. M. (2022). Bioremediation potential of native *Bacillus* sp. strains as a sustainable strategy for cadmium accumulation of *Theobroma cacao* in Amazonas region. *Microorganisms*, 10(11), 2108. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS10112108/S1>
- Assih, E. A., Ouattara, A. S., Thierry, S., Cayol, J. L., Labat, M., & Macarie, H. (2002). *Stenotrophomonas acidaminiphila* sp. nov., a strictly aerobic bacterium isolated from an upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(Pt 2), 559–568. <https://doi.org/10.1099/00207713-52-2-559>
- Aziz, R. K., Bartels, D., Best, A., DeJongh, M., Disz, T., Edwards, R. A., Formsma, K., Gerdes, S., Glass, E. M., Kubal, M., Meyer, F., Olsen, G. J., Olson, R., Osterman, A. L., Overbeek, R. A., McNeil, L. K., Paarmann, D., Paczian, T., Parrello, B., Pusch, G. D., Reich, C., Stevens, R., Vassieva, O., Vonstein, V., Wilke, A. & Zagnitko, O. (2008). The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics*, 9. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-75>
- Badri Fariman, A., Abbasiliasi, S., Akmar Abdullah, S. N., Mohd Saud, H., & Wong, M. Y. (2022). *Stenotrophomonas maltophilia* isolate UPMKH2 with the abilities to suppress rice blast disease and increase yield a promising biocontrol agent. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 121, 101872. <https://doi.org/10.1016/J.PMPP.2022.101872>
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., Dvorkin, M., Kulikov, A. S., Lesin, V. M., Nikolenko, S. I., Pham, S., Prjibelski, A. D., Pyshkin, A. V., Sirotkin, A. V., Vyahhi, N., Tesler, G., Alekseyev, M. A., & Pevzner, P. A. (2012). SPAdes:

- A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. *Journal of Computational Biology*, 19(5), 455. <https://doi.org/10.1089/CMB.2012.0021>
- Bardou, P., Mariette, J., Escudié, F., Djemiel, C., & Klopp, C. (2014). Jvarkit: An interactive Venn diagram viewer. *BMC Bioinformatics*, 15(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-15-293/FIGURES/3>
- Bartholomew, R. A., Ozanich, R. M., Arce, J. S., Engelmann, H. E., Heredia-Langner, A., Hofstad, B. A., Hutchison, J. R., Jarman, K., Melville, A. M., Victry, K. D., & Bruckner-Lea, C. J. (2020). Detection and identification of *Bacillus anthracis*: from conventional to molecular microbiology methods. *Microorganisms*, 8(1), 125. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS8010125>
- Bashan, Y., & de-Bashan, L. E. (2010). Microbial populations of arid lands and their potential for restoration of deserts. In: Dion, P. (eds) *Soil Biology and Agriculture in the Tropics*. Soil Biology, vol 21. Springer, Berlin, Heidelberg. 109–137. https://doi.org/10.1007/978-3-642-05076-3_6
- Bashan, Y., Puente, M. E., Salazar, B., De-Bashan, L. E., Bacilio, M., Hernandez, J.-P., Leyva, L. A., Romero, B., Villalpando, R., & Bethlenfalvay, G. J. (2005a). Reforestación de tierras erosionadas en el desierto: el papel de las bacterias promotoras de crecimiento en plantas y la materia orgánica. *Suelos Ecuatoriales*, 35(1), 70–77.
- Bashan, Y., Puente, M. E., Salazar, B., De-Bashan, L. E., Bacilio, M., Hernandez, J.-P., Leyva, L. A., Romero, B., Villalpando, R., & Bethlenfalvay, G. J. (2005b). Reforestación de tierras erosionadas en el desierto: el papel de las bacterias promotoras de crecimiento en plantas y la materia orgánica. *Suelos Ecuatoriales*, 35(1), 70–77.
- Basu, A., Prasad, P., Das, S. N., Kalam, S., Sayyed, R. Z., Reddy, M. S., & Enshasy, H. El. (2021). Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) as green bioinoculants: recent developments, constraints, and prospects. *Sustainability* 2021, Vol. 13, Page 1140, 13(3), 1140. <https://doi.org/10.3390/SU13031140>
- Bentley, D. R., Balasubramanian, S., Swerdlow, H. P., Smith, G. P., Milton, J., Brown, C. G., Hall, K. P., Evers, D. J., Barnes, C. L., Bignell, H. R., Boutell, J. M., Bryant, J., Carter, R. J., Keira Cheetham, R., Cox, A. J., Ellis, D. J., Flatbush, M. R., Gormley, N. A., Humphray, S. J., et al. (2008). Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature* 2008 456:7218, 456(7218), 53–59. <https://doi.org/10.1038/nature07517>
- Bhattacharya, D., de los Santos Villalobos, S., Ruiz, V. V., Selvin, J., & Mukherjee, J. (2020). *Bacillus rugosus* sp. nov. producer of a diketopiperazine antimicrobial, isolated from marine sponge *Spongia officinalis* L. *Antonie van Leeuwenhoek*,

- International Journal of General and Molecular Microbiology, 113(11), 1675–1687. <https://doi.org/10.1007/S10482-020-01472-9/FIGURES/3>
- Bistue, A. S. (2018). Hacia la reprogramación de crecimiento bacteriano mediante edición genómica: la bioinformática puesta a prueba. *Química Viva*, 2, 13–22.
- Bleidorn, C. (2016). Third generation sequencing: technology and its potential impact on evolutionary biodiversity research. *Systematics and Biodiversity*, 14(1), 1–8. <https://doi.org/10.1080/14772000.2015.1099575>
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114–2120. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTU170>
- Borriss, R. (2020). *Bacillus*. Beneficial Microbes in Agro-Ecology: Bacteria and Fungi, 107–132. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823414-3.00007-1>
- Boukhatem, Z. F., Merabet, C., & Tsaki, H. (2022). Plant Growth Promoting Actinobacteria, the most promising candidates as bioinoculants? *Frontiers in Agronomy*, 4, 849911. <https://doi.org/10.3389/FAGRO.2022.849911/BIBTEX>
- Brooke, J. S. (2021). Advances in the microbiology of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Clinical Microbiology Reviews*, 34(3). <https://doi.org/10.1128/CMR.00030-19/ASSET/87A45862-1FD3-4B60-A554-538031945688/ASSETS/IMAGES/LARGE/CMR.00030-19-F0004.JPG>
- Buchfink, B., Xie, C., & Huson, D. H. (2014). Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. *Nature Methods* 2014 12:1, 12(1), 59–60. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3176>
- Cadena-Zamudio, J. D., Martínez-Peña, M. D., Guzmán-Rodríguez, L. F., & Arteaga-Garibay, R. I. (2016). Aplicación de la secuenciación masiva para el estudio y exploración de diversidad microbiana y su aprovechamiento biotecnológico. *Agro Productividad*, 9(2), 70–83. <https://www.revista-agroproductividad.org/index.php/agroproductividad/article/view/723>
- Campaña-Olaya, J., Luis-Alaya, B., Mendez-Farroñan, S., Quezada-Salirrosas, M., Nouchi-Moromizato, E., Munaya-Sáenz, N., Sánchez-Suárez, H., Prada-Gutiérrez, E., & Mialhel, E. (2018). Caracterización molecular de la microbiota rizosférica nativa de *Opuntia ficus-indica* y evaluación de los efectos de cepas microbianas aisladas sobre el desarrollo del cactus. *Manglar*, 14(1), 3–11. <https://doi.org/10.17268/MANGLAR>
- Carabalí, M. M. S., García-Oliva, F., Cortés Páez, L. E., & López Lozano, N. E. (2019). The response of candy barrel cactus to zinc contamination is modulated by its rhizospheric microbiota. *Rhizosphere*, 12, 100177. <https://doi.org/10.1016/J.RHISPH.2019.100177>

- Carhuaricra-Huaman, D., & Setubal, J. C. (2024). Step-by-Step bacterial genome comparison. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), 2802, 107–134. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3838-5_5/FIGURES/8
- Carro, L., & Nouioui, I. (2017). Taxonomy and systematics of plant probiotic bacteria in the genomic era. *AIMS Microbiology* 2017 3:383, 3(3), 383–412. <https://doi.org/10.3934/MICROBIOL.2017.3.383>
- Carroll, L. M. (2017). *seq2mlst*: In silico multi-locus sequence typing (1.0.1). <https://github.com/lmc297/seq2mlst>.
- Carroll, L. M., Kovac, J., Miller, R. A., & Wiedmann, M. (2017). Rapid, high-throughput identification of anthrax-causing and emetic *Bacillus cereus* group genome assemblies via BTyper, a computational tool for virulence based classification of *Bacillus cereus* group isolates by using nucleotide sequencing data. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(17), 1096–1113. https://doi.org/10.1128/AEM.01096-17/SUPPL_FILE/ZAM999118007S1.PDF
- Chauhan, H., Bagyaraj, D. J., Selvakumar, G., & Sundaram, S. P. (2015). Novel plant growth promoting rhizobacteria—prospects and potential. *Applied Soil Ecology*, 95, 38–53. <https://doi.org/10.1016/J.APSOIL.2015.05.011>
- Chaves, D., Sandoval, A., Rodríguez, L., García, J. C., Restrepo, S., & Zambrano, M. M. (2010). Análisis comparativo de seis genomas del complejo *Mycobacterium tuberculosis*. *Biomédica*, 30, 23–31. <http://bioinfo.hku.hk/EMBOSS>,
- Chávez-Ambriz, L. A., Hernández-Morales, A., Cabrera-Luna, J. A., Luna-Martínez, L., & Pacheco-Aguilar, J. R. (2016). Aislados de *Bacillus* provenientes de la rizósfera de cactus incrementan la germinación y la floración en *Mammillaria* spp. (Cactaceae). *Revista Argentina de Microbiología*, 48(4), 333–341. <https://doi.org/10.1016/J.RAM.2016.09.001>
- Chuang, S. C., Dobhal, S., Álvarez, A. M., & Arif, M. (2024). Three new species, *Xanthomonas hawaiiensis* sp. nov., *Stenotrophomonas aracearum* sp. nov., and *Stenotrophomonas oahuensis* sp. nov., isolated from the Araceae family. *Frontiers in Microbiology*, 15, 1356025. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2024.1356025/BIBTEX>
- Chunag, S. C., Dobhal, S., Alvarez, A., & Arif, M. (2022). Two new species, *Stenotrophomonas aracearum* and *Stenotrophomonas oahuensis*, isolated from Anthurium (Araceae family) in Hawaii. *Plant and Environmental Protection Sciences*, University of Hawaii at Manoa, 3190 Maile Way, St John 312, Honolulu, HI 96822, USA.

- Cochard, B., Giroud, B., Crovadore, J., Chablais, R., Arminjon, L., & Lefort, F. (2022). Endophytic PGPR from tomato roots: isolation, *in vitro* characterization and *in vivo* evaluation of treated tomatoes (*Solanum lycopersicum* L.). *Microorganisms*, 10(4), 765. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS10040765/S1>
- CONAZA. (2019). Priorizarán atención a comunidades de extrema marginación de las zonas áridas y en proceso de desertificación. <https://www.gob.mx/conaza/prensa/priorizaran-atencion-a-comunidades-de-extrema-marginacion-de-las-zonas-aridas-y-en-proceso-de-desertificacion-198461>
- Cosentino, S., Voldby Larsen, M., Møller Aarestrup, F., & Lund, O. (2013). PathogenFinder--distinguishing friend from foe using bacterial whole genome sequence data. *PloS One*, 8(10). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0077302>
- Couvin, D., Bernheim, A., Toffano-Nioche, C., Touchon, M., Michalik, J., Néron, B., Rocha, E. P. C., Vergnaud, G., Gautheret, D., & Pourcel, C. (2018). CRISPRCasFinder, an update of CRISPRFinder, includes a portable version, enhanced performance and integrates search for Cas proteins. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W246–W251. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKY425>
- Cox, G., & Wright, G. D. (2013). Intrinsic antibiotic resistance: Mechanisms, origins, challenges and solutions. *International Journal of Medical Microbiology*, 303(6–7), 287–292. <https://doi.org/10.1016/J.IJMM.2013.02.009>
- Darling, A. C. E., Mau, B., Blattner, F. R., & Perna, N. T. (2004). Mauve: Multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements. *Genome Research*, 14(7), 1394. <https://doi.org/10.1101/GR.2289704>
- Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., & Posada, D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 2012 9:8, 9(8), 772–772. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2109>
- Datta, M., Palit, R., Sengupta, C., Kumar Pandit, M., & Banerjee, S. (2011). Plant Growth Promoting Rhizobacteria enhance growth and yield of chilli (*Capsicum annuum* L.) under field conditions. *Australian Journal of Crop Science*, 5(5), 531–536. <https://doi.org/10.5555/20113203005>
- de la Torre-Hernández, M. E., Salinas-Virgen, L. I., Aguirre-Garrido, J. F., Fernández-González, A. J., Martínez-Abarca, F., Montiel-Lugo, D., & Ramírez-Saad, H. C. (2020). Composition, structure, and PGPR traits of the rhizospheric bacterial communities associated with wild and cultivated *Echinocactus platyacanthus* and *Neobuxbaumia polylopha*. *Frontiers in Microbiology*, 11, 518239. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2020.01424/BIBTEX>**

- de los Santos Villalobos, S., Robles, R. I., Parra Cota, F. I., Larsen, J., Lozano, P., & Tiedje, J. M. (2019). *Bacillus cabrialesii* sp. nov., an endophytic plant growth promoting bacterium isolated from wheat (*Triticum turgidum* subsp. *durum*) in the Yaqui Valley, Mexico. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 69(12), 3939–3945. <https://doi.org/10.1099/IJSEM.0.003711>
- De-Bashan, L. E., Holguín, G., Glick, B. R., & Bashan, Y. (2007). Bacterias promotoras de crecimiento en plantas para propósitos agrícolas y ambientales. *Microbiología Agrícola. Hongos, Bacterias, Micro y Macrofauna, Control Biológico, Planta-Microorganismo*. México: Editorial Trillas, 170–224.
- Debasis, M., Snežana, A., Ansuman, S., Tanja, V., Devvret, V., & Divya, J. (2019). Plant growth promoting microorganisms (PGPMs) helping in sustainable agriculture: current perspective. *International Journal of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine*, 7(2). <https://www.researchgate.net/publication/333394804>
- Deng, C., Zhang, N., Liang, X., Huang, T., & Li, B. (2022). *Bacillus aryabhattai* LAD impacts rhizosphere bacterial community structure and promotes maize plant growth. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 102(14), 6650–6657. <https://doi.org/10.1002/JSFA.12032>
- Didion, J. P., Martin, M., & Collins, F. S. (2017). Atropos: specific, sensitive, and speedy trimming of sequencing reads. *PeerJ*, 2017(8), e3720. <https://doi.org/10.7717/PEERJ.3720/SUPP-1>
- Dieckmann, M. A., Beyvers, S., Nkouamedjo-Fankep, R. C., Hanel, P. H. G., Jelonek, L., Blom, J., & Goesmann, A. (2021). EDGAR3.0: comparative genomics and phylogenomics on a scalable infrastructure. *Nucleic Acids Research*, 49(W1), W185–W192. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAB341>
- Ding, W., Baumdicker, F., & Neher, R. A. (2018). panX: pan-genome analysis and exploration. *Nucleic Acids Research*, 46(1), E5. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKX977>
- DNASStar Inc. <https://www.dnastar.com/>
- Dohra, H., Mohad Din, A. R. J., Suzuki, K., Fatma, A., Honjyo, M., Nishimura, T., Moriuch, R., Masuda, K., Minoura, A., Tashiro, Y., & Futamata, H. (2021). Complete genome sequence of *Stenotrophomonas pavanii* strain Y. Contact: Hiroyuki Futamata Shizuoka University, Faculty of Engineering; Nakaku Johoku 3-5-1, Hamamatsu 432-8561, Japan.
- Dolan, J. R., Forster, D., Dunthorn, M., Bass, D., Bittner, L., Boutte, C., Christen, R., Claverie, J., Decelle, J., Edvardsen, B., Egge, E., Eikrem, W., Kooistra, W. H. C. F., Logares, R., Massana, R., Montresor, M., Not, F., Ogata, H., Pawlowski, J., Pernice, M. C., Romac, S., Shalchian-tabrizi, K., Sarno, D., Simon, N.,

- Richards, T. A., Siano, R., Vault, D., Wincker, P., Zingone, A., Vargas, C. D., Stoeck, T., Csics, M. & Mar, P. (2024). Seedling microbiota engineering using bacterial synthetic community inoculation on seeds. *FEMS Microbiology Ecology*, 100(4), 1–11. <https://doi.org/10.1093/FEMSEC/FIAE027>
- Domínguez Morales, E. C., & Aldana Salguero, E. Y. (2021). El Jardín botánico de oriente: Vinculando ciencia con sociedad. Instituto de Investigaciones Centro Universitario de Zacapa -CUNZAC. Universidad de San Carlos de Guatemala, Dirección General de Investigación
- Dorado, G., Gálvez, S., Rosales, T. E., Vásquez, V. F., & Hernández, P. (2021). Analyzing modern Biomolecules: the revolution of nucleic-acid sequencing – Review. *Biomolecules* 2021, Vol. 11, Page 1111, 11(8), 1111. <https://doi.org/10.3390/BIOM11081111>
- Doyle, S. (2018). *Stenotrophomonas maltophilia* strain NCTC10258 genome assembly, chromosome: 1. WTSI, Pathogen Informatics, Wellcome Trust Sanger Institute, CB10 1SA, United Kingdom.
- Duan, Y., & Wu, B. (2023). Complete genome of *Stenotrophomonas geniculata* isolated from Asian citrus psyllid. School of Computing, Clemson University, 821 Mcmillan Rd, Clemson, SC 29631, USA.
- Eguarte, L. E., Aguirre-Liguori, J. A., Jardón-Barbolla, L., Aguirre-Planter, E., & Souza, V. (2013). Genómica de poblaciones: nada en evolución va a tener sentido si no es a la luz de la genómica, y nada en genómica tendrá sentido si no es a la luz de la evolución. *Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 16(1), 42–56. [https://doi.org/10.1016/S1405-888X\(13\)72077-1](https://doi.org/10.1016/S1405-888X(13)72077-1)
- Elmahi, Y., Alshamsi, M. S., Sudalaimuthuasari, N., Kundu, B., Almaskari, R. S., Hazzouri, K. M., Chandran, S., Malik, S. S., Mundra, S., Amiri, K. M. A., & Putonti, C. (2021). Complete genome sequences of *Pseudomonas atacamensis* strain SM1 and *Pseudomonas toyotomiensis* strain SM2, isolated from the date palm rhizosphere. *Microbiology Resource Announcement*, 10(18). <https://doi.org/10.1128/MRA.00253-21>
- Enright, J. M., Dickson, Z. W., & Golding, G. B. (2023). Low complexity regions in proteins and DNA are poorly correlated. *Molecular Biology and Evolution*, 40(4). <https://doi.org/10.1093/MOLBEV/MSAD084>
- Eren, A. M., Kiefl, E., Shaiber, A., Veseli, I., Miller, S. E., Schechter, M. S., Fink, I., Pan, J. N., Yousef, M., Fogarty, E. C., Trigodet, F., Watson, A. R., Esen, Ö. C., Moore, R. M., Clayssen, Q., Lee, M. D., Kivenson, V., Graham, E. D., Merrill, B. D., Karkman, A., Blankenberg, D., Eppley, J. M., Sjödin, A., Scott, J. J., Vázquez-Campos, X., McKay, L. J., McDaniel, E. A., Stevens, S. L.R., Anderson, R. E., Fuessel, J., Fernandez-Guerra, A., Maignien, L., Delmont, T. O. & Willis, A. D. (2020). Community-led, integrated, reproducible multi-omics

- with anvi'o. *Nature Microbiology* 2020 6:1, 6(1), 3–6.
<https://doi.org/10.1038/s41564-020-00834-3>
- Erturk, Y., Ercisli, S., Haznedar, A., & Cakmakci, R. (2010). Effects of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on rooting and root growth of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) stem cuttings. *Biological Research*, 43(1), 91–98.
<https://doi.org/10.4067/S0716-97602010000100011>
- Etesami, H., Jeong, B. R., & Glick, B. R. (2023). Biocontrol of plant diseases by *Bacillus* spp. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 126, 102048.
<https://doi.org/10.1016/J.PMPP.2023.102048>
- Etesami, H., & Maheshwari, D. K. (2018). Use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) with multiple plant growth promoting traits in stress agriculture: action mechanisms and future prospects. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 156, 225–246.
<https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2018.03.013>
- Ewing, B., Hillier, L. D., Wendl, M. C., & Green, P. (1998). Base-calling of automated sequencer traces using Phred. I. Accuracy assessment. *Genome Research*, 8(3), 175–185. <https://doi.org/10.1101/GR.8.3.175>
- Falqueto, S. A., Pitaluga, B. F., de Sousa, J. R., Targanski, S. K., Campos, M. G., de Oliveira Mendes, T. A., da Silva, G. F., Silva, D. H. S., & Soares, M. A. (2021). *Bacillus* spp. metabolites are effective in eradicating *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae with low toxicity to non-target species. *Journal of Invertebrate Pathology*, 179, 107525. <https://doi.org/10.1016/J.JIP.2020.107525>
- Fathizadeh, H., Saffari, M., Esmaeili, D., Moniri, R., & Salimian, M. (2020). Evaluation of antibacterial activity of enterocin A-colicin E1 fusion peptide. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 23(11), 1471.
<https://doi.org/10.22038/IJBMS.2020.47826.11004>
- Ferreira, C. M. H., Soares, H. M. V. M., & Soares, E. V. (2019). Promising bacterial genera for agricultural practices: an insight on plant growth-promoting properties and microbial safety aspects. *Science of The Total Environment*, 682, 779–799. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2019.04.225>
- Ferrés, I., & Iraola, G. (2018). MLSTar: automatic multilocus sequence typing of bacterial genomes in R. *PeerJ*, 6(6). <https://doi.org/10.7717/PEERJ.5098>
- Figuerola-López, A. M., Cordero-Ramírez, J. D., Martínez-Álvarez, J. C., López-Meyer, M., Lizárraga-Sánchez, G. J., Félix-Gastélum, R., Castro-Martínez, C., & Maldonado-Mendoza, I. E. (2016). Rhizospheric bacteria of maize with potential for biocontrol of *Fusarium verticillioides*. *SpringerPlus*, 5(1), 1–12.
<https://doi.org/10.1186/S40064-016-1780-X/TABLES/3>

- Friedrich, I., Hollensteiner, J., Scherf, J., Weyergraf, J., Klassen, A., Poehlein, A., Hertel, R., & Daniel, R. (2021). Complete genome sequence of *Stenotrophomonas indicatrix* DAIF1. Microbiology Resource Announcements, 10(6). <https://doi.org/10.1128/MRA.01484-20/ASSET/712B21FE-9263-4E6F-A948-1A316976E009/ASSETS/IMAGES/LARGE/MRA.01484-20-F0001.JPG>
- Gautam, V., Patil, P. P., Bansal, K., Kumar, S., Kaur, A., Singh, A., Korpole, S., Singhal, L., & Patil, P. B. (2021). Description of *Stenotrophomonas sepilia* sp. nov., isolated from blood culture of a hospitalized patient as a new member of *Stenotrophomonas maltophilia* complex. New Microbes and New Infections, 43. <https://doi.org/10.1016/J.NMNI.2021.100920>
- Geraldi, A., Asritafriha, L., Zain, R., Azzahra, A., Aryq, D., Wafi, I., Sukma, F., Chasanah, M., Zain, R. A., Watun, U., & Khasanah, N. (2022). Isolation and characterization of thermophilic *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* CGR-1 from Cangar Hot Springs industrial microbiology thermophilic bacteria thermostable enzymes. Journal of Bio-Molecule Research and Engineering, 1(1), 32–39. <https://doi.org/10.20473/jbiome.v1i1.35860>
- Ghosh, R., Chatterjee, S., & Mandal, N. C. (2020). *Stenotrophomonas*. Beneficial Microbes in Agro-Ecology: Bacteria and Fungi, 427–442. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823414-3.00020-4>
- Girard, L., Lood, C., Höfte, M., Vandamme, P., Rokni-Zadeh, H., van Noort, V., Lavigne, R., & De Mot, R. (2021). The ever-expanding *Pseudomonas* genus: description of 43 new species and partition of the *Pseudomonas putida* group. Microorganisms, 9(8), 1766. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS9081766/S1>
- Global Climate Monitor. Retrieved May 19, 2024, from <https://www.globalclimatemonitor.org/#>
- González Medrano, F. (2012). Las zonas áridas y semiáridas de México y su vegetación. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Instituto Nacional de Ecología
- Granados-Sánchez, D., Hernández-García, M. Á., Vázquez-Alarcón, A., & Ruíz-Puga, P. (2013). Los procesos de desertificación y las regiones áridas. Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente, 19(1), 45–66. <https://doi.org/10.5154/R.RCHSCFA.2011.10.077>
- Grant, J. R., Enns, E., Marinier, E., Mandal, A., Herman, E. K., Chen, C. Y., Graham, M., Van Domselaar, G., & Stothard, P. (2023). Proksee: in-depth characterization and visualization of bacterial genomes. Nucleic Acids Research, 51(W1), W484–W492. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAD326>

- Green, M. R., & Sambrook, J. (2012). Molecular Cloning a laboratory manual (4th ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Grobelak, A., Napora, A., & Kacprzak, M. (2015). Using Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) to improve plant growth. *Ecological Engineering*, 84, 22–28. <https://doi.org/10.1016/J.ECOLENG.2015.07.019>
- Guo, M., Gao, M., Liu, J., Xu, N., & Wang, H. (2022). Bacterioferritin nanocage: Structure, biological function, catalytic mechanism, self-assembly and potential applications. *Biotechnology Advances*, 61, 108057. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2022.108057>
- Ha, S.-M., Kim, C. K., Roh, J., Byun, J.-H., Yang, S.-J., Choi, S.-B., Chun, J., & Yong, D. (2019). Application of the whole genome-based bacterial identification system, TrueBac ID, using clinical isolates that were not identified with three matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) systems. *Annals of Laboratory Medicine*, 39(6), 530–536. <https://doi.org/10.3343/ALM.2019.39.6.530>
- Hanage, W. P., Fraser, C., & Spratt, B. G. (2006). Sequences, sequence clusters and bacterial species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 361(1475), 1917–1927. <https://doi.org/10.1098/RSTB.2006.1917>
- Hashmi, I., Bindschedler, S., & Junier, P. (2020). Firmicutes. Beneficial Microbes in Agro-Ecology, 363–396. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823414-3.00018-6>
- Hernández-Ledesma, P., & Cruz-Esteban, S. (2021). Las pequeñas cactáceas: ¿camuflaje o simple coincidencia? *Elementos*, 121, 71–76. <https://www.atlaszo>
- Herrera Flores, S. D. (2010). Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo.
- Herrmann, L. W., Letti, L. A. J., Penha, R. de O., Soccol, V. T., Rodrigues, C., & Soccol, C. R. (2024). *Bacillus* genus industrial applications and innovation: first steps towards a circular bioeconomy. *Biotechnology Advances*, 70, 108300. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2023.108300>
- Heylen, K., Vanparys, B., Peirsegeale, F., Lebbe, L., & De Vos, P. (2007). *Stenotrophomonas terrae* sp. nov. and *Stenotrophomonas humi* sp. nov., two nitrate-reducing bacteria isolated from soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(Pt 9), 2056–2061. <https://doi.org/10.1099/IJS.0.65044-0>
- Horiike, T. (2016). An introduction to molecular phylogenetic analysis. *Reviews in Agricultural Science*, 4(0), 36–45. https://doi.org/10.7831/RAS.4.0_36

- Hu, T., Chitnis, N., Monos, D., & Dinh, A. (2021). Next-generation sequencing technologies: an overview. *Human Immunology*, 82(11), 801–811. <https://doi.org/10.1016/J.HUMIMM.2021.02.012>
- Huamani-Sulca, R. E., De La Cruz-Arango, J., Chuchón-Martínez, S., & Peláez-Peláez, F. (2020). Comunidades endémicas de cactáceas en peligro de extinción. Una necesidad de conservación de los recursos naturales del distrito de Pacaycasa. Ayacucho-Perú. *Journal of the Selva Andina Biosphere*, 8(2), 92–109. <https://doi.org/10.36610/J.JSAB.2020.080200092>
- Huyan, J., Tian, Z., Zhang, Y., Zhang, H., Shi, Y., Gillings, M. R., & Yang, M. (2020). Dynamics of class 1 integrons in aerobic biofilm reactors spiked with antibiotics. *Environment International*, 140, 105816. <https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2020.105816>
- Ibarra-Villarreal, A. L., Gándara-Ledezma, A., Godoy-Flores, A. D., Herrera-Sepúlveda, A., Díaz-Rodríguez, A. M., Parra-Cota, F. I., & de los Santos-Villalobos, S. (2021). Salt-tolerant *Bacillus* species as a promising strategy to mitigate the salinity stress in wheat (*Triticum turgidum* subsp. *durum*). *Journal of Arid Environments*, 186, 104399. <https://doi.org/10.1016/J.JARIDENV.2020.104399>
- Imdad, S., & Ishii, S. (2023). Genome sequences of heavy metal resistant bacteria isolated from soil in Pakistan. BioTechnology Institute, University of Minnesota, 1479 Gortner Avenue, St. Paul, MN 55108, USA.
- Ibarra-Díaz, I. V., Lebgue-Keleng, T., Viramontes-Olivas, O., Reyes-Cortes, I., Ortega-Gutiérrez, J. A. & Morales-Nieto, C. (2016). Modelo de nicho fundamental para *Coryphantha chihuahuensis* (Cactaceae) en el estado de Chihuahua, México. *Ecología Aplicada*, 15(1).
- Janda, J. M., & Abbott, S. L. (2007). 16S rRNA Gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(9), 2761–2764. <https://doi.org/10.1128/JCM.01228-07>
- Jankiewicz, U., Baranowski, B., Swiontek Brzezinska, M., & Frańk, M. (2020). Purification, characterization and cloning of a chitinase from *Stenotrophomonas rhizophila* G22. *3 Biotech*, 10(1), 1–10. <https://doi.org/10.1007/S13205-019-2007-Y/FIGURES/7>
- Jiménez-Sierra, C. L. (2011). Las cactáceas mexicanas y los riesgos que enfrentan. *Revista Digital Universitaria* (1607 - 6079). Vol. 12, No. 1 (2011). <https://www.ru.tic.unam.mx/xmlui/handle/123456789/1844>
- Jolley, K. A., Bray, J. E., & Maiden, M. C. J. (2018). Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications.

- Jones, D. T., Taylor, W. R., & Thornton, J. M. (1992). The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Computer Applications in the Biosciences* : CABIOS, 8(3), 275–282.
<https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/8.3.275>
- Jovanovic, J., Ornelis, V. F. M., Madder, A., & Rajkovic, A. (2021). *Bacillus cereus* food intoxication and toxicoinfection. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(4), 3719–3761. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12785>
- Kamali, M., Ahmadi, J., Naeimi, S., & Guo, D. (2019). Characterization of *Bacillus* Isolates from the rhizosphere of tomato suppressing *Fusarium* wilt disease. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*, 54(1), 53–68.
<https://doi.org/10.1556/038.54.2019.006>
- Kang, S. M., Asaf, S., Khan, A. L., Lubna, Khan, A., Mun, B. G., Khan, M. A., Gul, H., & Lee, I. J. (2020). Complete genome sequence of *Pseudomonas psychrotolerans* CS51, a Plant Growth-Promoting Bacterium, under heavy metal stress conditions. *Microorganisms*, 8(3), 382.
<https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS8030382>
- Karnwal, A., Shrivastava, S., Al-Tawaha, A. R. M. S., Kumar, G., Kumar, A., & Kumar, A. (2023). PGPR-Mediated Breakthroughs in plant stress tolerance for sustainable farming. *Journal of Plant Growth Regulation* 2023, 1–17.
<https://doi.org/10.1007/S00344-023-11013-Z>
- Kavamura, V. N., Santos, S. N., Silva, J. L. da, Parma, M. M., Ávila, L. A., Visconti, A., Zucchi, T. D., Taketani, R. G., Andreote, F. D., & Melo, I. S. de. (2013). Screening of brazilian cacti rhizobacteria for plant growth promotion under drought. *Microbiological Research*, 168(4), 183–191.
<https://doi.org/10.1016/J.MICRES.2012.12.002>
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Meintjes, P., & Drummond, A. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12), 1647.
<https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTS199>
- Keswani, C., Prakash, O., Bharti, N., Vélchez, J. I., Sansinenea, E., Lally, R. D., Borriss, R., Singh, S. P., Gupta, V. K., Fraceto, L. F., de Lima, R., & Singh, H. B. (2019). Re-addressing the biosafety issues of plant growth promoting rhizobacteria. *Science of The Total Environment*, 690, 841–852.
<https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2019.07.046>

- Khan, A. R., Mustafa, A., Hyder, S., Valipour, M., Rizvi, Z. F., Gondal, A. S., Yousuf, Z., Iqbal, R., & Daraz, U. (2022). *Bacillus* spp. as bioagents: uses and application for sustainable agriculture. *Biology* 2022, Vol. 11, Page 1763, 11(12), 1763. <https://doi.org/10.3390/BIOLOGY11121763>
- Khan, M. A., Asaf, S., Khan, A. L., Jan, R., Kang, S. M., Kim, K. M., & Lee, I. J. (2020). Extending thermotolerance to tomato seedlings by inoculation with SA1 isolate of *Bacillus cereus* and comparison with exogenous humic acid application. *PLOS ONE*, 15(4), e0232228. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0232228>
- Khan, M. A., Ullah, I., Waqas, M., Hamayun, M., Khan, A. L., Asaf, S., Kang, S. M., Kim, K. M., Jan, R., & Lee, I. J. (2019). Halo-tolerant rhizospheric *Arthrobacter woluwensis* AK1 mitigates salt stress and induces physio-hormonal changes and expression of GmST1 and GmLAX3 in soybean. *Symbiosis*, 77(1), 9–21. <https://doi.org/10.1007/S13199-018-0562-3/FIGURES/7>
- Kim, J., Na, S. I., Kim, D., & Chun, J. (2021). UBCG2: Up-to-date bacterial core genes and pipeline for phylogenomic analysis. *Journal of Microbiology*, 59(6), 609–615. <https://doi.org/10.1007/S12275-021-1231-4/METRICS>
- Kim, M. J., Park, T. H., Jung, D. R., Lee, G. D., & Shin, J. H. (2022). Complete genome sequence of *Bacillus inaquosorum* 1HC-NA assembled from the Oxford Nanopore sequencing data. *The Microbiological Society of Korea*, 58(3), 194–196. <https://doi.org/10.7845/KJM.2022.2047>
- Kim, S. (2018). Complete genome sequence of *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* KCTC 13429T. Center for Bioanalysis, Korea Research Institute of Standards and Science (KRISS), 267 Gajeong-Ro, Yuseong-Gu, Daejeon 34113, Republic of Korea.
- Kloepper, J. W. & Schroth, M. N. (1978). Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. *Proceedings of the 4th Internat. Conference on Plant Pathogenic Bacteria*, Station de Pathologie Vegetale et Phytobacteriologie, INRA, Angers, France, 1978, 2, 879–882. <https://cir.nii.ac.jp/crid/1573387450264426624>
- Knief, C. (2014). Analysis of plant microbe interactions in the era of next generation sequencing technologies. *Frontiers in Plant Science*, 5(MAY), 86904. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2014.00216/ABSTRACT>
- Kolmogorov, M., Yuan, J., Lin, Y., & Pevzner, P. A. (2019). Assembly of long, error-prone reads using repeat graphs. *Nature Biotechnology* 2019 37:5, 37(5), 540–546. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0072-8>
- Kong, X., & Hou, M. (2022). *Bacillus inaquosorum* strain A65.1 chromosome, complete genome. Institute of Applied Microbiology, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Nanchang Road, Bayi Street, Urumqi 830000, China.

- Kubi, H. A. A., Khan, M. A., Adhikari, A., Imran, M., Kang, S. M., Hamayun, M., & Lee, I. J. (2021). Silicon and Plant Growth-Promoting Rhizobacteria *Pseudomonas psychrotolerans* CS51 mitigates salt stress in *Zea mays* L. *Agriculture* 2021, Vol. 11, Page 272, 11(3), 272. <https://doi.org/10.3390/AGRICULTURE11030272>
- Kumar, A., Rithesh, L., Kumar, V., Raghuvanshi, N., Chaudhary, K., Abhineet, & Pandey, A. K. (2023). *Stenotrophomonas* in diversified cropping systems: friend or foe? *Frontiers in Microbiology*, 14, 1214680. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2023.1214680/BIBTEX>
- Laing, C., Buchanan, C., Taboada, E. N., Zhang, Y., Kropinski, A., Villegas, A., Thomas, J. E., & Gannon, V. P. J. (2010). Pan-genome sequence analysis using Panseq: An online tool for the rapid analysis of core and accessory genomic regions. *BMC Bioinformatics*, 11(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-461/TABLES/3>
- Lalucat, J., Gomila, M., Mulet, M., Zaruma, A., & García-Valdés, E. (2022). Past, present and future of the boundaries of the *Pseudomonas* genus: proposal of *Stutzerimonas* gen. Nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 45(1), 126289. <https://doi.org/10.1016/J.SYAPM.2021.126289>
- Lalucat, J., Mulet, M., Gomila, M., & García-Valdés, E. (2020). Genomics in bacterial taxonomy: impact on the genus *Pseudomonas*. *Genes* 2020, Vol. 11, Page 139, 11(2), 139. <https://doi.org/10.3390/GENES11020139>
- Lee, H., & Tang, H. (2012). Next-generation sequencing technologies and fragment assembly algorithms. *Methods in Molecular Biology*, 855, 155–174. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-582-4_5/FIGURES/8
- Li, F., Lu, S., & Sun, W. (2024). Comparison of rhizosphere bacterial communities of *Pinus squamata*, a plant species with extremely small populations (PSESP) in different conservation sites. *Microorganisms*, 12(4), 638. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS12040638/S1>
- Li, H. P., Gan, Y. N., Yue, L. J., Han, Q. Q., Chen, J., Liu, Q. M., Zhao, Q., & Zhang, J. L. (2022). Newly isolated *Paenibacillus monticola* sp. nov., a novel Plant Growth-Promoting Rhizobacteria strain from high-altitude spruce forests in the Qilian mountains, China. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2022.833313/FULL>
- Lirio-Paredes, J., Ogata-Gutiérrez, K., & Zúñiga-Dávila, D. (2022). Effects of rhizobia isolated from coffee fields in the high jungle Peruvian region, tested on *Phaseolus vulgaris* L. var. Red Kidney. *Microorganisms*, 10(4), 823. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS10040823/S1>

- Liu, Y., Štefanič, P., Miao, Y., Xue, Y., Xun, W., Zhang, N., Shen, Q., Zhang, R., Xu, Z., & Mandic-Mulec, I. (2022). Housekeeping gene *gyrA*, a potential molecular marker for *Bacillus* ecology study. *AMB Express*, 12(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/S13568-022-01477-9/FIGURES/5>
- Lu, S., & Yu, J. (2021). Salt tolerant, polyvinyl alcohol (PVA)-degrading and plant growth promoting *Stenotrophomonas rhizophila* BI2-2. Research Center of Plant Ecology and Environment, Institute of Botany, Jiangsu Province and Chinese Academy of Sciences, Qianhuhoucun 1#, Nanjing 210014, China.
- Mafiz, A. I., He, Y., Zhang, W., & Zhang, Y. (2021). Soil bacteria in urban community gardens have the potential to disseminate antimicrobial resistance through horizontal gene transfer. *Frontiers in Microbiology*, 12, 771707. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2021.771707/BIBTEX>
- Mahapatra, S., Yadav, R., & Ramakrishna, W. (2022). *Bacillus subtilis* impact on plant growth, soil health and environment: Dr. Jekyll and Mr. Hyde. *Journal of Applied Microbiology*, 132(5), 3543–3562. <https://doi.org/10.1111/JAM.15480>
- Maiden, M. C. J., Bygraves, J. A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J. E., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou, J., Zurth, K., Caugant, D. A., Feavers, I. M., Achtman, M., & Spratt, B. G. (1998). Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(6), 3140–3145. <https://doi.org/10.1073/PNAS.95.6.3140>
- Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.Journal*, 17(1), 10–12. <https://doi.org/10.14806/EJ.17.1.200>
- Maxam, A. M., & Gilbert, W. (1977). A new method for sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(2), 560–564. <https://doi.org/10.1073/PNAS.74.2.560>
- Meier-Kolthoff, J. P., & Göker, M. (2019). TYGS is an automated high-throughput platform for state-of-the-art genome-based taxonomy. *Nature Communications*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/S41467-019-10210-3>
- Meier-Kolthoff, J. P., Hahnke, R. L., Petersen, J., Scheuner, C., Michael, V., Fiebig, A., Rohde, C., Rohde, M., Fartmann, B., Goodwin, L. A., Chertkov, O., Reddy, T. B. K., Pati, A., Ivanova, N. N., Markowitz, V., Kyrpides, N. C., Woyke, T., Göker, M., & Klenk, H. P. (2014). Complete genome sequence of DSM 30083(T), the type strain (U5/41(T)) of *Escherichia coli*, and a proposal for delineating subspecies in microbial taxonomy. *Standards in Genomic Sciences*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/1944-3277-9-2>

- Mollerach, M. (2006). Genómica y proteómica: oportunidades y desafíos para la Microbiología. *Revista Argentina de Microbiología*, 38(1), 1–3.
- Monds, R. D., Newell, P. D., Schwartzman, J. A., & O'Toole, G. A. (2006). Conservation of the Pho regulon in *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1. *AEM*, 72(3), 1910–1924. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.3.1910-1924.2006/ASSET/72CF5A53-A495-4E1C-AD27-5777ACDBB90B/ASSETS/GRAPHIC/ZAM0030665580007.JPEG>
- Morales-Sandoval, P. H., Valenzuela-Ruíz, V., Santoyo, G., Hyder, S., Mitra, D., Zelaya-Molina, L. X., Ávila-Alistac, N., Parra-Cota, F. I., & Santos-Villalobos, S. D. L. (2024). Draft genome of a biological control agent against *Bipolaris sorokiniana*, the causal phytopathogen of spot blotch in wheat (*Triticum turgidum* L. subsp. *durum*): *Bacillus inaquosorum* TSO22. *Open Agriculture*, 9(1). https://doi.org/10.1515/OPAG-2022-0309/ASSET/GRAPHIC/J_OPAG-2022-0309_FIG_004.JPG
- Münzinger, M., Budzikiewicz, H., Expert, D., Enard, C., & Meyer, J. M. (2000). Achromobactin, a new citrate siderophore of *Erwinia chrysanthemi*. *ZNC*, 55(5–6), 328–332. <https://doi.org/10.1515/ZNC-2000-5-605/MACHINEREADABLECITATION/RIS>
- Mutlu, A., Kaspar, C., Becker, N., & Bischofs, I. B. (2020). A spore quality–quantity tradeoff favors diverse sporulation strategies in *Bacillus subtilis*. *The ISME Journal*, 14(11), 2703–2714. <https://doi.org/10.1038/S41396-020-0721-4>
- Nakano, M. (2020). Development of a multiplex real-time PCR assay for the identification and quantification of group-specific *Bacillus* spp. and the genus *Paenibacillus*. *International Journal of Food Microbiology*, 323, 108573. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2020.108573>
- Nakbanpote, W., Panitlurtumpai, N., Sangdee, A., Sakulpone, N., Sirisom, P., & Pimthong, A. (2014). Salt-tolerant and plant growth-promoting bacteria isolated from Zn/Cd contaminated soil: identification and effect on rice under saline conditions. *Journal of Plant Interactions*, 9(1), 379–387. <https://doi.org/10.1080/17429145.2013.842000>
- National Center for Biotechnology Information. Retrieved December 19, 2023, from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Nguyen, N., Hickey, G., Zerbino, D. R., Raney, B., Earl, D., Armstrong, J., Haussler, D., & Paten, B. (2014). Building a pangenome reference for a population. In Sharan R. (ed.) *Research in Computational Molecular Biology: Vol. 8394 LNBI* (pp. 207–221). Springer Verlag. https://doi.org/10.1007/978-3-319-05269-4_17
- Ogata Gutiérrez, K., Alvarado, D. E., Zúñiga, D., Ogata-Gutiérrez, K., Alvarado, D., Chumpitaz-Segovia, C., Zúñiga-Dávila, D., Rodríguez-Couto, S., & Borek, S.

- (2016). Characterization of Plant Growth Promoting Rhizobacteria isolated from the rhizosphere of Peruvian highlands native crop. *International Journal of Plant & Soil Science*, 11(1)(1), 1–8. <https://doi.org/10.9734/IJPSS/2016/24573>
- Oh, D.-K., & Kim, K.-R. (2016). *Stenotrophomonas nitritireducens* KACC 91585 Complete genome. Bioscience and Biotechnology, Konkuk University, 120 Neungdong-ro, Gwangjin-gu, Seoul 05029, South Korea.
- Oren, A., & Garrity, G. M. (2021). Valid publication of the names of forty-two phyla of prokaryotes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 71(10), 005056. <https://doi.org/10.1099/IJSEM.0.005056/CITE/REFWORKS>
- Page, A. J., Cummins, C. A., Hunt, M., Wong, V. K., Reuter, S., Holden, M. T. G., Fookes, M., Falush, D., Keane, J. A., & Parkhill, J. (2015). Roary: rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. *Bioinformatics*, 31(22), 3691–3693. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTV421>
- Patel, R. K., & Jain, M. (2012). NGS QC Toolkit: A Toolkit for Quality Control of Next Generation Sequencing Data. *PLOS ONE*, 7(2), e30619. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0030619>
- Penha, R. O., Vandenberghe, L. P. S., Faulds, C., Soccol, V. T., & Soccol, C. R. (2020). *Bacillus* lipopeptides as powerful pest control agents for a more sustainable and healthy agriculture: recent studies and innovations. *Planta*, 251(3), 1–15. <https://doi.org/10.1007/S00425-020-03357-7/METRICS>
- Pinski, A., Zur, J., Hasterok, R., & Hupert-Kocurek, K. (2020). Comparative genomics of *Stenotrophomonas maltophilia* and *Stenotrophomonas rhizophila* revealed characteristic features of both species. *International Journal of Molecular Sciences* 2020, Vol. 21, Page 4922, 21(14), 4922. <https://doi.org/10.3390/IJMS21144922>
- Poblete-Morales, M., Carvajal, D., Almasia, R., Michea, S., Cantillana, C., Levican, A., & Silva-Moreno, E. (2020). *Pseudomonas atacamensis* sp. nov., isolated from the rhizosphere of desert bloom plant in the region of Atacama, Chile. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 113(8), 1201–1211. <https://doi.org/10.1007/S10482-020-01427-0/TABLES/2>
- Portillo, L., Soltero, R., Vigueras, A., De, R., & Campos, L. R. (2021). *Opuntia*. Aportaciones a su conocimiento y aprovechamiento. D.R. © 2021, primera edición. Universidad de Guadalajara. Av. Juárez 976, Guadalajara, Jalisco 44100, México. ISBN: 978-607-571-218-5

- Price, M. N., Dehal, P. S., & Arkin, A. P. (2010). FastTree 2 – Approximately Maximum-Likelihood trees for large alignments. PLoS ONE, 5(3). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0009490>
- Quail, M. A., Smith, M., Coupland, P., Otto, T. D., Harris, S. R., Connor, T. R., Bertoni, A., Swerdlow, H. P., & Gu, Y. (2012). A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. BMC Genomics, 13(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-341/FIGURES/5>
- Rajkumar, M., Narayanasamy, S., & Uthandi, S. (2024). Apoplast-associated *Bacillus amyloliquefaciens* LAS10 for plant growth promotion and drought stress tolerance in little millet (*Panicum sumatransae*). Plant Stress, 11, 100340. <https://doi.org/10.1016/J.STRESS.2023.100340>
- Ramos, P. L., Van Trappen, S., Thompson, F. L., Rocha, R. C. S., Barbosa, H. R., de Vos, P., & Moreira-Filho, C. A. (2011). Screening for endophytic nitrogen-fixing bacteria in Brazilian sugar cane varieties used in organic farming and description of *Stenotrophomonas pavanii* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 61(Pt 4), 926–931. <https://doi.org/10.1099/IJS.0.019372-0>
- Ranade, Y., Pathak, P., Chandrashekar, M., Pardeshi, A., & Saha, S. (2024). Bioremediation of lambda cyhalothrin by *Bacillus inaquosorum* and *Bacillus spizizenii* isolated from surface of Thompson seedless grape berry. Biologia, 79(3), 1015–1026. <https://doi.org/10.1007/S11756-024-01598-5/FIGURES/8>
- Regmi, S., Choi, Y. S., Kim, Y. K., Khan, M. M., Lee, S. H., Cho, S. S., Jin, Y. Y., Lee, D. Y., Yoo, J. C., & Suh, J. W. (2020). Endoglucanase produced by *Bacillus subtilis* strain CBS31: biochemical characterization, thermodynamic study, enzymatic hydrolysis, and bio-industrial applications. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 25(1), 104–116. <https://doi.org/10.1007/S12257-019-0338-5/METRICS>
- Rhoads, A., & Au, K. F. (2015). PacBio sequencing and its applications. Genomics, Proteomics & Bioinformatics, 13(5), 278–289. <https://doi.org/10.1016/J.GPB.2015.08.002>
- Rico-Jiménez, M., Muñoz-Mira, S., Krell, T., & Matilla, M. A. (2021). Relevancia de la quimiotaxis bacteriana para la colonización e infección de plantas. AyTBUAP, 6(24), 143–172. <https://doi.org/10.5281/zenodo.5771451>
- Ringel, M. T., & Brüser, T. (2018). The biosynthesis of pyoverdines. Microbial Cell, 5(10), 424. <https://doi.org/10.15698/MIC2018.10.649>
- Rooney, A. P., Price, N. P. J., Ehrhardt, C., Sewzey, J. L., & Bannan, J. D. (2009). Phylogeny and molecular taxonomy of the *Bacillus subtilis* species complex and

- description of *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* subsp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 59(10), 2429–2436. <https://doi.org/10.1099/IJS.0.009126-0/CITE/REFWORKS>
- Rosas, N. (2023). Genome announcement for a novel *Bacillus* species. Laboratorio de Biotecnología Genómica, Cbg Instituto Politécnico Nacional, Boulevard del Maestro S/N Esq. Elías Pina, la Escalera, Reynosa 88710, México.
- SADR. (2023). Programa Institucional de la Comisión Nacional de las Zonas Áridas CONAZA 2020-2024.
- Sah, S., Krishnani, S., & Singh, R. (2021). *Pseudomonas* mediated nutritional and growth promotional activities for sustainable food security. Current Research in Microbial Sciences, 2, 100084. <https://doi.org/10.1016/J.CRMICR.2021.100084>
- Salinas Virgen, L. I., De la Torre Hernández, M. E., Aguirre Garrido, J. F., Ramírez Saad, H. C., Salinas Virgen, L. I., Torre Hernández, M. E. de la, Aguirre Garrido, J. F., & Ramírez Saad, H. C. (2020). Caracterización molecular de bacterias rizosféricas asociadas a *Echinocactus platyacanthus* en invernadero y silvestres. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas, 11(3), 531–542. <https://doi.org/10.29312/remexca.v11i3.2017>**
- Salinas-Virgen, L. I. (2015). Aislamiento y caracterización mediante técnicas microbiológicas y de biología molecular de bacterias promotoras del crecimiento obtenidas de la rizósfera de la cactácea *Echinocactus platyacanthus* (biznaga dulce) del semidesierto de Querétaro. Reporte de Servicio Social, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco.**
- Salinas-Virgen, L. I. (2019). Identificación y caracterización de la actividad PGPR de bacterias rizosféricas y endófitas aisladas de *Echinocactus platyacanthus* (biznaga dulce) creciendo en condiciones silvestres y de invernadero en el semidesierto queretano. Tesis de Maestría, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco. <https://repositorio.xoc.uam.mx/jspui/handle/123456789/2116>**
- Sánchez-Castro, I., Bakkali, M., & Merroun, M. L. (2017). Draft Genome Sequence of *Stenotrophomonas bentonitica* BII-R7T, a selenite-reducing bacterium isolated from spanish bentonites. Genome Announcements, 5(31). <https://doi.org/10.1128/GENOMEA.00719-17>
- Sanger, F., & Coulson, A. R. (1975). A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. Journal of Molecular Biology, 94(3), 441–448. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(75\)90213-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(75)90213-2)
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences, 74(12), 5463–5467. <https://doi.org/10.1073/PNAS.74.12.5463>

- Saraf, M., Rajkumar, S., & Saha, T. (2011). Perspectives of PGPR in agri-ecosystems. *Bacteria in Agrobiology: Crop Ecosystems*, 361–385. https://doi.org/10.1007/978-3-642-18357-7_13
- Schalk, I. J., Rigouin, C., & Godet, J. (2020). An overview of siderophore biosynthesis among fluorescent *Pseudomonads* and new insights into their complex cellular organization. *Environmental Microbiology*, 22(4), 1447–1466. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14937>
- Schmieder, R., & Edwards, R. (2011). Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics*, 27(6), 863–864. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTR026>
- Schwengers, O., Jelonek, L., Dieckmann, M. A., Beyvers, S., Blom, J., & Goesmann, A. (2021). Bakta: Rapid and standardized annotation of bacterial genomes via alignment-free sequence identification. *Microbial Genomics*, 7(11), 000685. <https://doi.org/10.1099/MGEN.0.000685/CITE/REFWORKS>
- Schwertner-Charão, L., Treviño-Carreón, J., & Martínez, R. D. (2022). Las fascinantes adaptaciones de las cactáceas y su historia evolutiva. *Ciencia Ergo-Sum*, 30(2). <https://doi.org/10.30878/CES.V30N2A9>
- Seemann, T. (2014). Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*, 30(14), 2068–2069. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTU153>
- Sehrawat, A., Sindhu, S. S., & Glick, B. R. (2022). Hydrogen cyanide production by soil bacteria: biological control of pests and promotion of plant growth in sustainable agriculture. *Pedosphere*, 32(1), 15–38. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(21\)60058-9](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(21)60058-9)
- SEMARNAT. (2018). En el Día de las cactáceas, adopta una, cuidala y apoya a su conservación. <https://www.gob.mx/semarnat/articulos/en-el-dia-de-las-cactaceas-adopta-una-cuidala-y-apoya-a-su-conservacion-178213>
- Shakilabanu, S., Kanchana, D., & Jayanthi, M. (2012). Biodiversity of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) in mangrove ecosystem: a review. *International Journal of Pharmaceutical and Biological Archives*, 3(3), <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/20123346417>
- Sharma, A., Vaishnav, A., Jamali, H., Keswani, C., Srivastava, A. K., Kaushik, R., Gupta, S., & Bansal, Y. K. (2023). Unraveling the Plant Growth-Promoting mechanisms of *Stenotrophomonas* sp. CV83 for Drought stress tolerance and growth enhancement in chickpea. *Journal of Plant Growth Regulation*, 42(10), 6760–6775. <https://doi.org/10.1007/S00344-023-11010-2/FIGURES/5>
- Shen, H. (2023). *Bacillus inaquosorum* strain M3 chromosome, complete genome. Marine Ecology Lab, Jiangsu Marine Fisheries Research Institute, Education Road 31#, Nantong, Jiangsu 226007, China.

- Shimodaira, H., & Hasegawa, M. (1999). Multiple comparisons of log-likelihoods with applications to phylogenetic inference. *Molecular Biology and Evolution*, 16(8), 1114–1114. <https://doi.org/10.1093/OXFORDJOURNALS.MOLBEV.A026201>
- Shultana, R., Zuan, A. T. K., Yusop, M. R., Saud, H. M., & El-Shehawi, A. M. (2021). *Bacillus tequilensis* strain 'UPMRB9' improves biochemical attributes and nutrient accumulation in different rice varieties under salinity stress. *PLOS ONE*, 16(12), e0260869. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0260869>
- Silambarasan, S., Logeswari, P., Ruiz, A., Cornejo, P., & Kannan, V. R. (2020). Influence of plant beneficial *Stenotrophomonas rhizophila* strain CASB3 on the degradation of diuron-contaminated saline soil and improvement of *Lactuca sativa* growth. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(28), 35195–35207. <https://doi.org/10.1007/S11356-020-09722-Z/FIGURES/6>
- Singh, P., Singh, R. K., Guo, D. J., Sharma, A., Singh, R. N., Li, D. P., Malviya, M. K., Song, X. P., Lakshmanan, P., Yang, L. T., & Li, Y. R. (2021). Whole genome analysis of sugarcane root-associated endophyte *Pseudomonas aeruginosa* B18—A Plant Growth-Promoting Bacterium with antagonistic potential against *Sporisorium scitamineum*. *Frontiers in Microbiology*, 12, 628376. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2021.628376/FULL>
- Singh, P., Singh, R. K., Zhou, Y., Wang, J., Jiang, Y., Shen, N., Wang, Y., Yang, L., & Jiang, M. (2022). Unlocking the strength of Plant Growth Promoting *Pseudomonas* in improving crop productivity in normal and challenging environments: A review. *Journal of Plant Interactions*, 17(1), 220–238. <https://doi.org/10.1080/17429145.2022.2029963>
- Stavi, I. (2022). Ecosystem services related with *Opuntia ficus-indica* (prickly pear cactus): a review of challenges and opportunities. *Agroecology and Sustainable Food Systems*, 46(6), 815–841. <https://doi.org/10.1080/21683565.2022.2076185>
- Syed, A., Elgorban, A. M., Bahkali, A. H., Eswaramoorthy, R., Iqbal, R. K., & Danish, S. (2023). Metal-tolerant and siderophore producing *Pseudomonas fluorescence* and *Trichoderma* spp. improved the growth, biochemical features and yield attributes of chickpea by lowering Cd uptake. *Scientific Reports* 2023 13:1, 13(1), 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-31330-3>
- Tabassum, B., Khan, A., Tariq, M., Ramzan, M., Iqbal Khan, M. S., Shahid, N., & Aaliya, K. (2017). Bottlenecks in commercialization and future prospects of PGPR. *Applied Soil Ecology*, 121, 102–117. <https://doi.org/10.1016/J.APSOIL.2017.09.030>
- Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38(7), 3022–3027. <https://doi.org/10.1093/MOLBEV/MSAB120>

- Tatusova, T., Dicuccio, M., Badretdin, A., Chetvernin, V., Nawrocki, E. P., Zaslavsky, L., Lomsadze, A., Pruitt, K. D., Borodovsky, M., & Ostell, J. (2016). NCBI prokaryotic genome annotation pipeline. *Nucleic Acids Res*, 44(14), 6614–6624. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKW569>
- Tettelin, H., Riley, D., Cattuto, C., & Medini, D. (2008). Comparative genomics: the bacterial pan-genome. *Current Opinion in Microbiology*, 11(5), 472–477. <https://doi.org/10.1016/J.MIB.2008.09.006>
- Tohya, M., Teramoto, K., Watanabe, S., Hishinuma, T., Shimojima, M., Ogawa, M., Tada, T., Tabe, Y., & Kirikae, T. (2022). Whole-genome sequencing-based re-identification of *Pseudomonas putida* / *fluorescens* clinical isolates identified by biochemical bacterial identification systems. *Microbiology Spectrum*, 10(2). https://doi.org/10.1128/SPECTRUM.02491-21/SUPPL_FILE/SPECTRUM02491-21_SUPP_1_SEQ5.PDF
- Toral, L., Rodríguez, M., Béjar, V., & Sampedro, I. (2020). Crop Protection against *Botrytis cinerea* by Rhizosphere Biological Control Agent *Bacillus velezensis* XT1. *Microorganisms* 2020, Vol. 8, Page 992, 8(7), 992. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS8070992>
- Tuon, F. F., Dantas, L. R., Suss, P. H., & Tasca Ribeiro, V. S. (2022). Pathogenesis of the *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm: a review. *Pathogens* 2022, Vol. 11, Page 300, 11(3), 300. <https://doi.org/10.3390/PATHOGENS11030300>
- Ulrich, K., Kube, M., Becker, R., Schneck, V., & Ulrich, A. (2021). Genomic analysis of the endophytic *Stenotrophomonas* strain 169 reveals features related to Plant-Growth promotion and stress tolerance. *Frontiers in Microbiology*, 12, 687463. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2021.687463/BIBTEX>
- Vaithanomsat, P., Trakunjae, C., Meelaksana, J., Boondaeng, A., Apiwatanapiwat, W., Janchai, P., Boonyarit, J., & Chollakup, R. (2022). Improvement of pineapple leaf fiber quality by pectinase produced from newly isolated *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* P4-1. *Fibers and Polymers*, 23(2), 576–588. <https://doi.org/10.1007/S12221-021-0120-0/METRICS>
- Vega-Celedón, P., Martínez, H., Vergara, M., & Seeger, M. (2016). Biosíntesis de ácido indol-3-acético y promoción del crecimiento de plantas por bacterias. *Cultivos Tropicales*, 37, 33–39.
- Velasco-Jiménez, A., Castellanos-Hernández, O., Acevedo-Hernández, G., Aarland, R. C., & Rodríguez-Sahagún, A. (2020). Bacterias rizosféricas con beneficios potenciales en la agricultura. *Terra Latinoamericana*, 38(2), 333–345.
- Vindeirinho, J. M., Soares, H. M. V. M., & Soares, E. V. (2021). Modulation of siderophore production by *Pseudomonas fluorescens* through the manipulation

- of the culture medium composition. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 193(3), 607–618. <https://doi.org/10.1007/S12010-020-03349-Z/FIGURES/5>
- Vinuesa, P. (2024). *Stenotrophomonas riyadhensis* strain ESTM1A_MKCTX4_10a chromosome, complete genome. Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México - UNAM, Avenida Universidad sn, Cuernavaca, Morelos 62210, México.
- Wahyudi, A. T., Astuti, R. P., Widyawati, A., Meryandini, A., & Nawangsih, A. A. (2011). Characterization of *Bacillus* sp. strains isolated from rhizosphere of soybean plants for their use as potential plant growth for promoting Rhizobacteria. *Journal of Microbiology and Antimicrobials*, 3(2), 34–40.
- Wang, Y., Coleman-Derr, D., Chen, G., & Gu, Y. Q. (2015). OrthoVenn: a web server for genome wide comparison and annotation of orthologous clusters across multiple species. *Nucleic Acids Research*, 43(Web Server issue), W78. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKV487>
- Wang, Y., & Shi, A. (2023). A plant of *Bacillus subtilis* that efficiently degrades sulfur glycosides in rapeseed meal and its biological safety. *Fish Disease Ward, Pearl River Fisheries Research Institute, CAFS*, No. 1 Xingyu Road, Guangzhou, Guangdong 510385, China.
- Wattam, A. R., Brettin, T., Davis, J. J., Gerdes, S., Kenyon, R., Machi, D., Mao, C., Olson, R., Overbeek, R., Pusch, G. D., Shukla, M. P., Stevens, R., Vonstein, V., Warren, A., Xia, F., & Yoo, H. (2018). Assembly, annotation, and comparative genomics in PATRIC, the all bacterial bioinformatics resource center. *Methods in Molecular Biology*, 1704, 79–101. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7463-4_4/FIGURES/6
- Weber, M., Schünemann, W., Fuß, J., Kämpfer, P., & Lipski, A. (2018). *Stenotrophomonas lactitubi* sp. nov. and *Stenotrophomonas indicatrix* sp. nov., isolated from surfaces with food contact. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68(6), 1830–1838. <https://doi.org/10.1099/IJSEM.0.002732/CITE/REFWORKS>
- Wheatley, R. M., & MacLean, R. C. (2021). CRISPR-Cas systems restrict horizontal gene transfer in *Pseudomonas aeruginosa*. *The ISME Journal*, 15(5), 1420–1433. <https://doi.org/10.1038/S41396-020-00860-3>
- Yang, H. C., Im, W. T., Kang, M. S., Shin, D. Y., & Lee, S. T. (2006). *Stenotrophomonas koreensis* sp. nov., isolated from compost in South Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(Pt 1), 81–84. <https://doi.org/10.1099/IJS.0.63826-0>
- Yang, P., Zhao, L., Gao, Y. G., & Xia, Y. (2023). Detection, diagnosis, and preventive management of the bacterial plant pathogen *Pseudomonas syringae*. *Plants*

- Yoon, S. H., Ha, S. M., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, H., & Chun, J. (2017). Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(5), 1613–1617. <https://doi.org/10.1099/IJSEM.0.001755>
- Yoon, S. H., Ha, S. min, Lim, J., Kwon, S., & Chun, J. (2017). A large-scale evaluation of algorithms to calculate average nucleotide identity. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 110(10), 1281–1286. <https://doi.org/10.1007/S10482-017-0844-4/FIGURES/3>
- Zboralski, A., Biessy, A., Ciotola, M., Cadieux, M., Albert, D., Blom, J., & Filion, M. (2022). Harnessing the genomic diversity of *Pseudomonas* strains against lettuce bacterial pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2022.1038888>
- Zboralski, A., & Filion, M. (2020). Genetic factors involved in rhizosphere colonization by phytobeneficial *Pseudomonas* spp. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 18, 3539–3554. <https://doi.org/10.1016/J.CSBJ.2020.11.025>
- Zerbino, D. R., & Birney, E. (2008). Velvet: Algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Research*, 18(5), 821. <https://doi.org/10.1101/GR.074492.107>
- Zhang, J. (2020). Soil environmental deterioration and ecological rehabilitation. *Study of Ecological Engineering of Human Settlements*, 41–82. https://doi.org/10.1007/978-981-15-1373-2_2
- Zhou, Z., Charlesworth, J., & Achtman, M. (2020). Accurate reconstruction of bacterial pan- And core genomes with PEPPAN. *Genome Research*, 30(11), 1667–1679. <https://doi.org/10.1101/GR.260828.120/-/DC1>

12. ANEXOS

ANEXO I. Medios de cultivo y soluciones

Medio LB para selección de transformantes

Composición: Triptona 10g/L, extracto de levadura 5g/L, NaCl 10g/L y agar 1.5%

Disolver los reactivos, a excepción del agar, en agua destilada; ajustar el pH a 7 con HCl 1N o NaOH 1N; agregar el agar y esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121°C y 15lb de presión. Una vez atemperado el medio suplementarlo con Xgal 50mg/mL (50µL por caja para alcanzar una concentración final de 0.01mg/mL) y ampicilina 50mg/mL (50µL por caja para alcanzar una concentración final de 0.01mg/mL); verter 25mL en cajas Petri de 90mm de diámetro. Agregar 100µL de IPTG 0.1M sobre cada placa y dispersarlo con varilla de vidrio hasta su absorción.

Medio LB para cultivo de células transformadas

Composición: Triptona 10g/L, extracto de levadura 5g/L, NaCl 10g/L

Disolver los reactivos en agua destilada y ajustar el pH a 7 con HCl 1N o NaOH 1N; pasar 5mL a tubos de ensayo con tapa de rosca y esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121°C y 15lb de presión. Una vez atemperado el medio suplementar cada tubo con 50µL ampicilina 50mg/mL alcanzar una concentración final de 0.5mg/mL.

Medio SOC para transformación celular

Composición: Triptona 2%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 10mM, KCl 2.5mM, MgCl₂ 10mM, MgSO₄ 10mM y glucosa 20mM

Disolver los reactivos en agua destilada y ajustar el pH a 7 con HCl 1N o NaOH 1N; esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121°C y 15lb de presión.

Medio TY para cultivo para heterótrofos (Aguirre-Garrido *et al.*, 2012)

Composición: Triptona 5g/L, extracto de levadura 3g/L y CaCl₂ 1g/L

Disolver los reactivos en agua destilada y ajustar el pH a 7 con HCl 1N o Ca(OH)₂ 1N; distribuir en alícuotas de 5mL en tubos con tapa de rosca y esterilizar en autoclave bajo condiciones normales (15 minutos a 121°C y 15lb de presión).

Medio TYM para células competentes

Composición: Triptona 2%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 0.1M, MgCl₂ 0.1M

Disolver los reactivos en agua destilada y ajustar el pH a 7 con HCl 1N o NaOH 1N; para medio líquido pasar 5mL de medio a tubos de ensayo con tapa de rosca y esterilizar en autoclave bajo condiciones normales (15 minutos a 121°C y 15lb de presión). Para medio sólido agregar agar 1.2%, esterilizar con bajo las condiciones antes mencionadas y verter 25mL en cajas Petri de 90mm de diámetro.

Buffer de carga de DNA para electroforesis

Composición: Azul de bromofenol 12.5mg/10mL, xilén cianol 12.5mg/10mL, glicerol puro 4mL/10mL

Disolver los reactivos en 4mL de TAE 1X, agregar el glicerol, aforar a 10mL con TAE 1X y homogeneizar cuidadosamente evitando la formación de burbujas.

Buffer de tinción de bromuro de etidio para geles de agarosa para electroforesis de DNA

Composición: EtBr (10mg/mL) 40μL/L

Agregar 40μL de EtBr 10mg/mL a 500mL de TAE 1X, mezclar y aforar a 1L con TAE 1X.

Ca(OH)₂ 1N

Composición: Ca(OH)₂ 37.05g/L

Disolver el reactivo en 500mL de agua destilada y aforar a 1L

Etanol al 70%

Composición: EtOH 96% 729.17mL/L

Aforar a 1L con agua destilada.

NaOH 1N

Composición: NaOH 40g/L

Disolver el reactivo en 500mL de agua destilada y aforar a 1L.

HCl 1N

Composición: HCl (37%) 82mL/L

Agregar lentamente el ácido a un matraz aforado con 918mL de agua destilada.

Solución de ampicilina 50mg/mL

Composición: Ampicilina 0.5g/10mL

Disolver la ampicilina en 5mL de agua destilada y aforar a 10mL, esterilizar por filtración con microfiltro de 0.22 μm, conservar a 4°C.

Solución acetato de sodio 3M pH 5.2

Composición: CH₃COONa 12.36g/50mL

Disolver el reactivo en 30 mL de agua destilada y aforar a 50mL.

Solución acetato de potasio 5M pH 5.2

Composición: CH₃COOK 24.5375g/50mL

Disolver el reactivo en 25mL de agua destilada y aforar a 50mL.

Solución de lisis NaOH 100mM/SDS 0.5%

Composición: NaOH 10mM 10mL/50mL, SDS 0.5% 2.5mL/50mL

Solución para criopreservación

Composición: Glicerol 50% (en agua destilada)

Hacer alícuotas de 900µL en criotubos con tapa de rosca y esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121°C y 15lb de presión.

Solución de IPTG 0.1M

Composición: IPTG 0.238 g/10mL

Disolver el reactivo en 5mL de agua destilada, esterilizar por filtración con microfiltro de 0.22 µm, conservar en oscuridad a 4°C.

Solución TfbI para preparación de células competentes

Composición: Acetato de potasio 1M, MnCl₂ 1M, KCl 2M, CaCl₂ 1M y glicerol puro 15%

Las soluciones se preparan por separado, se esterilizan en autoclave durante 15 minutos a 121°C y 15lb de presión y se mezclan en un recipiente estéril y se lleva al volumen final con agua destilada estéril previo a su uso.

Solución TfbII para preparación de células competentes

Composición: Na-MOPS 1M, KCl 2M, CaCl₂ 1M y glicerol puro 15%

Las soluciones se preparan por separado, se esterilizan en autoclave durante 15 minutos a 121°C y 15lb de presión y se mezclan en un recipiente estéril se lleva al volumen final con agua destilada estéril previo a su uso.

Solución de XGAL 50mg/mL

Composición: XGAL 0.5g/10mL

Disolver el reactivo en 5mL de DMSO y aforar a 10mL, esterilizar por filtración con microfiltro de 0.22 µm, conservar a 4°C.

TAE 50X para electroforesis de DNA

Composición: Tris base 242g/L, ácido acético glacial 57.1mL/L, EDTA 0.5M 100mL/L

Disolver el tris base en 500 mL de agua destilada, agregar el ácido acético y el EDTA, aforar a 1L.

TAE 1X para electroforesis de DNA

Composición: TAE 50X 20mL/L

Agregar a 500 mL de agua el TAE 50X, mezclar y aforar a 1L.

ANEXO II. Protocolo de extracción de DNA

El protocolo de extracción del *Isolate II genomic DNA Kit* (Meridian Bioscience, Cat: BIO-52066), en el que se agregó un paso de eliminación de RNA con RNAsa (Promega, Ref: A797A), es el siguiente:

1. Poner 500µL de cultivo fresco de cada bacteria en medio líquido TY (ver Anexo I) en microtubos de 1.5mL
2. Centrifugar a 11,000 rpm por 1min
3. Descartar el sobrenadante y resuspender el pellet celular en 200µL de buffer de Lisis GL
4. Agregar 25µL de proteinasa K y 200µL de buffer de lisis G3
5. Incubar a 70°C durante 15min
6. Mezclar en vórtex
7. Agregar 3µL de RNAsa e incubar a 37°C por 30min
8. Mezclar en vórtex
9. Agregar 210µL de EtOH 96% y agitar en vórtex
10. Montar la columna en un tubo colector y agregar la muestra
11. Centrifugar a 10,000 rpm por 1min y se descartar el eluido
12. Agregar 500µL de buffer de lavado GW1
13. Centrifugar a 10,000 rpm por 1min y descartar el eluido
14. Agregar 600µL de buffer de lavado GW2
15. Centrifugar a 10,000 rpm por 1min y se descartar el eluido
16. Centrifugar a 10,000 rpm por 1min para eliminar restos de etanol
17. Pasar la columna a 1 microtubo de 1.5mL previamente rotulado y agregar 100µL de buffer de elución G precalentado a 70°C
18. Incubar a temperatura ambiente por 1min
19. Centrifugar a 10,000 rpm por 1min
20. Descartar la columna y se conservar la muestra a 4°C

ANEXO III. Electroforesis de DNA

Se utilizaron geles de agarosa para separación del DNA, las concentraciones de trabajo generalmente se encuentran entre 0.8% y 1.2%, dependiendo del tamaño de la molécula que se va a analizar. La preparación es la siguiente:

1. Preparar 30mL de gel de agarosa 0.8-1.2% p/v (agarosa / buffer TAE 1X, ver Anexo I)
2. Calentó la mezcla en horno de microondas hasta disolver la agarosa
3. Verter la solución en la charola para hacer geles y, dentro de ella, colocar el peine para formar los pozos
4. Dejar gelificar durante 20min
5. Una vez que se solidifique el gel, retirar el peine y colocarlo dentro de la cámara de electroforesis con buffer TAE 1X
6. Cargar 3 μ L de marcador de tamaño molecular. Los marcadores de tamaño molecular utilizados fueron DNA de fago λ digerido con *EcoRI*, en el caso de visualizar DNA de alto peso molecular, y marcador de 100 a 3,000 pb (Axygen, IDPIDO185432), en el caso de analizar el gen 16S rRNA amplificado por PCR o el plásmido linealizado
7. Mezclar 3 μ L de cada muestra con 2 μ L de buffer de carga de DNA (ver Anexo I)
8. Cargar el volumen total de la mezcla anterior en pozos independientes del gel (5 μ L en cada pozo)
9. Realizar la corrida a 100 volts durante 30min
10. Colocar el gel en buffer de tinción de bromuro de etidio (0.5 μ g/mL, ver Anexo I) durante 15min
11. Revelar el gel en transiluminador y fotodocumentador. El transiluminador utilizado fue el KODAK EDAS 290 con lámpara UV y se guardó la fotografía con el software K1D

ANEXO IV. Protocolo de cuantificación de DNA en fluorómetro

La cuantificación de DNA se realizó en el fluorómetro Qubit 4 (Thermo Fisher Scientific, Cat: Q33238) con el *1X dsDNA HS Assay Kit* (Invitrogen, Ref: Q33230).

Preparación de estándares

El kit utilizado requiere de 2 estándares para la calibración del equipo (incluidos en el kit), su preparación es la siguiente:

1. Agregar 190µL de la solución de trabajo incluida a un microtubo de 0.5mL (incluido) previamente rotulado
2. Agregar 10µL de cada estándar al tubo correspondiente, el volumen final por tubo es de 200µL

Preparación de las muestras

1. Agregar 198µL de la solución de trabajo incluida a un microtubo de 0.5mL (incluido) previamente rotulado
2. Agregar 2µL de muestra al tubo correspondiente con la solución de trabajo (un tubo por muestra)
3. Mezclar las muestras y los estándares en vórtex durante 3 a 5 segundos.
4. Incubar a temperatura ambiente durante 2 minutos

Calibración del equipo

1. En la pantalla de inicio del equipo seleccionar el programa para el tipo de molécula que se está analizando, en este caso “dsDNA”
2. Elegir el ensayo de acuerdo con el kit que se está utilizando, en este caso “*1x dsDNA High Sensitivity*”
3. Presionar el botón “Leer estándares”
4. Insertar el estándar 1 en la cámara para muestras y presionar “Leer estándar”
5. Insertar el estándar 2 en la cámara para muestras y presionar “Leer estándar”
6. Presionar siguiente para completar la calibración del equipo

Lectura de muestras

1. Una vez que calibrado del equipo, seleccionar el volumen de la muestra, en este caso 2 µL, y las unidades de la muestra de salida, en este caso ng/µL
2. Insertar la muestra en la cámara y presionar “Leer tubo”
3. Registrar el resultado
4. Repetir los pasos 2 y 3 con cada muestra

ANEXO V. Análisis bioinformático para el ensamble de los genomas bacterianos

El DNA genómico extraído, de acuerdo a lo descrito en la Sección 8. Metodología general, fue enviado al servicio de secuenciación del *Integrated Microbiome Resource* de la Universidad de Dalhousie en Canadá, donde se construyeron librerías genéticas para cada cepa en estudio, de acuerdo con la plataforma de secuenciación utilizada, mediante protocolos internos del servicio de secuenciación desarrollados para cada plataforma.

El DNA de la cepa *P. atacamensis* EMP42 fue secuenciado con la plataforma *Illumina MiSeq* y el DNA de las cepas *Stenotrophomonas* EMP41 y *B. inaquosorum* EMP2 fueron secuenciados con la plataforma PacBio. La diferencia de estas dos plataformas de secuenciación radica en la longitud y la calidad de las secuencias: con *Illumina* se obtienen lecturas de alrededor de 300 pb de calidad promedio, mientras que con PacBio se obtienen lecturas más largas (de alrededor de 50,000 pb) de alta calidad, lo que permite secuenciar operones completos y reducir los pasos correspondientes al control de calidad de las lecturas.

Cada conjunto de datos fue procesado con el software *Geneious Prime* de acuerdo con la plataforma de secuenciación utilizada como se muestra a continuación:

Procesamiento de datos obtenidos con la plataforma *Illumina MiSeq*

Se obtuvieron lecturas paired end en formato fastq (2 archivos por genoma) que se procesaron con el siguiente protocolo:

1. Importar los archivos en el software *Geneious Prime*
2. Aparear los dos archivos de lecturas importados para generar un único archivo de lecturas pareadas
3. Hacer el trimming del archivo de lecturas obtenido en el paso anterior con el plugin *BBDUK* para eliminar adaptadores, secuencias de baja calidad y secuencias cortas de menos de 100 pb
4. Hacer la unificación de lecturas (merged) y eliminación de lecturas duplicadas
5. Realizar el ensamble del genoma utilizando el ensamblador de *Geneious* con los parámetros establecidos por default
6. Evaluar la calidad del ensamble mediante los parámetros N50, L50 y %GC, dados por el ensamblador
7. Evaluar los contigs obtenidos para determinar cuáles forman parte del genoma bacteriano, tomando en cuenta parámetros como longitud y profundidad, descartar aquellos menores a 1,000 pb y profundidades bajas
8. Hacer la concatenación de los contigs para la obtención de una secuencia lineal de longitud similar al genoma esperado
9. Ordenar los contigs mediante comparación con un genoma de referencia utilizando el plugin *Mauve*
10. Buscar empalmes entre contigs

11. Rellenar los huecos entre contigs no empalmados por mapeo de lecturas crudas
12. Intentar cerrar el genoma por solapamiento de extremos o rellenado con lecturas crudas y obtener la estructura genómica final

Procesamiento de datos obtenidos con la plataforma *PacBio*

Se obtuvieron de lecturas en formato fastq (1 archivo por genoma) que se procesaron con el siguiente protocolo:

1. Importar los archivos en Geneious Prime
2. Realizar el ensamble del genoma utilizando el ensamblador Flye mediante Geneious prime indicando un tamaño de genoma aproximado, considerando los tamaños de genomas de cepas previamente reportados
3. Evaluar la calidad del ensamble mediante los parámetros N50, L50 y %GC, dados por el ensamblador
4. Concatenar los contigs para la obtención de una secuencia lineal de longitud similar al genoma esperado
5. Ordenar los contigs mediante comparación con un genoma de referencia utilizando el plugin Mauve
6. Buscar empalmes entre contigs
7. Rellenar los huecos entre contigs no empalmados por mapeo con lecturas crudas
8. Intentar cerrar el genoma por solapamiento de extremos o rellenado con lecturas crudas y obtener la estructura genómica final

ANEXO VI. Amplificación del gen 16S rRNA por PCR

1. Preparar una dilución 1:10 del DNA genómico extraído de cada muestra
2. Preparar la mezcla de reacción (Tabla 15), homogeneizar y colocar en un tubo para PCR

Tabla 15: Mezcla de reacción para amplificación por PCR del gen 16S rRNA

Reactivo	μL (1X)
H ₂ O grado MQ.	17.3
Buffer 10x.	2.5
MgCl ₂ .	1.5
dNTPs.	0.5
Primer 8F.	1.0
Primer 1492R.	1.0
Polimerasa (Taq).	0.2
Total.	24

1. Agregar 1 μL de la dilución 1:10 del DNA genómico preparada en el punto 1, para tener un volumen final de reacción de 25 μL
2. Centrifugar 30s
3. Colocar los tubos en el termociclador con las condiciones necesarias para la amplificación (Tabla 16)

Tabla 16: Programa de termociclador para la amplificación por PCR del gen 16S rRNA

Paso	Tiempo (min)	Temperatura (°C)	
Desnaturalización inicial	5	94	
Desnaturalización	0.5	94	} 35 ciclos.
Alineamiento	0.5	52	
Elongación	0.5	72	
Elongación final	1	72	
Conservación	∞	4	

Al finalizar el programa, mezclar 3 μL de la reacción con 2 μL de buffer de carga de DNA (ver Anexo I) y cargar en gel de agarosa al 1% (ver Anexo III).

Las secuencias de los primers utilizados para la amplificación del gen 16S rRNA son:

8F: 5' AGA CTT TGA TCM TGG CTC AG 3'

1492R: 5' TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T 3'

ANEXO VII. Protocolo de purificación de productos de PCR

Se utilizó el kit de purificación *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (PROMEGA, Ref: A9281) cuyo protocolo es el siguiente:

1. Agitar el tubo con la reacción de PCR del gen 16S ribosomal de cada muestra
2. Agregar solución de unión a membrada a la reacción de PCR guardando una proporción 1:1
3. Mezclar por pipeteo
4. Insertar una minicolumna en un tubo colector previamente rotulado
5. Transferir la mezcla obtenida en el paso 2 a la minicolumna
6. Incubar a temperatura ambiente durante 5min
7. Centrifugar a 14,000 rpm durante 1min
8. Remover la minicolumna y descartar el eluido por decantación
9. Reinsertar la minicolumna y agregar 700µL de solución de lavado de membrana
10. Centrifugar a 14,000 rpm durante 1min
11. Remover la minicolumna y descartar el eluido por decantación
12. Reinsertar la minicolumna y agregar 500µL de solución de lavado de membrana
13. Centrifugar durante a 14,000 rpm durante 5min
14. Remover la minicolumna y descartar el eluido por decantación
15. Reinsertar la minicolumna y centrifugar durante a 14,000 rpm durante 1min para eliminar los residuos de EtOH
16. Transferir la minicolumna a un microtubo de 1.5mL nuevo previamente rotulado.
17. Agregar 30µL de agua libre de nucleasas e incubar a temperatura ambiente durante 5min
18. Centrifugar a 14,000 rpm durante 5min
19. Retirar la minicolumna del tubo, que contiene el producto de PCR purificado
20. Almacenar el producto de PCR a -20°C

Visualizar los productos de PCR purificados en geles de agarosa al 1% (ver Anexo III), cuantificar y evaluar la pureza en Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Cat: ND-2000).

ANEXO VIII. Clonación del gen 16S rRNA

Preparación de células competentes

1. Sembrar por estira en caja Petri con medio TYM (ver Anexo I) 20µL de cultivo criopreservado de *E. coli* DH5α
2. Incubar a 37°C durante la noche
3. Tomar una colonia aislada del cultivo anterior e inocular un matraz de 125mL con 5mL de medio TYM
4. Incubar a 37°C y agitación orbital de 150 rpm durante 2h
5. Transferir los 5mL a un matraz de 250mL con 100mL de medio TYM
6. Incubar a 37°C y agitación orbital de 180 rpm por 2.5 a 4h
7. A partir de las 2.5h se determinar la densidad óptica del cultivo a 550nm en intervalos de 30min hasta alcanzar un valor de 0.6
8. Detener el crecimiento poniendo el matraz en hielo
9. Dividir el cultivo en 10 tubos para centrifuga clínica previamente enfriados en hielo
10. Centrifugar los 10 tubos en frío a 3,000 rpm durante 10min
11. Descartar el sobrenadante y resuspender las células en 6mL de solución TfbI fría (ver Anexo I)
12. Incubar la suspensión en hielo entre 5 y 10min
13. Centrifugar a 4°C y 3,000 rpm durante 8min
14. Descartar el sobrenadante y resuspender las células en 400µL de solución TfbII fría (ver Anexo I)
15. Hacer alícuotas de 200µL en microtubos de 1.5mL fríos previamente rotulados
16. Conservar las alícuotas a -80 °C

Ligación del plásmido con el gen 16S rRNA

1. Centrifugar los tubos de los reactivos durante 30s para recolectar el contenido en el fondo del tubo y poder tomarlo fácilmente
2. Mezclar los reactivos de acuerdo con las cantidades que se muestran en la tabla 17

Tabla 17: Mezcla de reacción para la ligación del plásmido con el inserto

Reactivo	1X
Buffer de ligación rápida 2x	5µL
Plásmido <i>PGEM</i> – <i>Teasy Vector</i> (Promega, Cat: A1360)	1µL
DNA ligasa T4	1µL
Producto de PCR*	2 o 3µL
Agua libre de nucleasas	Aforar a 10µL

La cantidad de producto de PCR a agregar dependerá de la proporción producto:vector que se quiera guardar, la más común es 3:1 pero puede ser desde 1:1 hasta 8:1. Para calcular la cantidad de producto de PCR que se debe poner se usa la siguiente fórmula:

$$ng\ inserto = \frac{ng\ vector \times tamaño\ inserto\ (kb)}{tamaño\ vector\ (kb)} \times \frac{proporción\ inserto}{vector}$$

3. Dejar en incubación a 4°C durante toda la noche

ANEXO IX Transformación de bacterias por electroporación

Transformación de células competentes

1. Descongelar alícuotas de células competentes de *E. coli* DH5 α en hielo para evitar choque térmico
2. Agregar 100 μ L de las células descongeladas a un microtubo de 1.5mL previamente rotulado
3. Agregar las reacciones de ligación previamente preparadas (ver Anexo VIII) a cada microtubo con células competentes
4. Incubar los tubos con la mezcla de células y ligación durante 10 minutos en hielo
5. Pasar las reacciones a celdas para electroporador (BIO-RAD, Cat: 165-2083), previamente rotuladas y enfriadas en hielo (1 celda por reacción)
6. Colocar las celdas con la reacción, una por una, en el electroporador MicroPulser™ (BIO-RAD, Cat: 1652100) siguiendo el programa Ec1 para células bacterianas que da una descarga de 1,800V durante 5 milisegundos
7. Agregar a cada celda 1mL de medio SOC y se mezclar cuidadosamente por pipeteo
8. Transferir el contenido de cada celda a tubos de ensayo con tapa de rosca estériles, previamente rotulados
9. Incubar a 37°C y agitación orbital de alrededor de 200 rpm durante 1h, para recuperar a las células después de la electroporación
10. Pasado el tiempo de recuperación, sembrar 100 μ L de cada cultivo en cajas de medio LB+XGal 0.01mg/mL+Ampicilina 0.01mg/mL+IPTG 0.1M y 300 μ L en otra por extensión con varilla de vidrio
11. Pasar el volumen restante de los tubos de ensayo a microtubos de 1.5mL previamente rotulados y centrifugarlos a 14,000 rpm durante 1min
12. Descartar el sobrante por decantación y resuspender el pellet celular formado por centrifugación en el volumen que quede en el tubo
13. Sembrar el volumen que quedó del paso anterior en otra caja con LB+XGal 0.01mg/mL+Ampicilina 0.01mg/mL+IPTG 0.1M por extensión con varilla de vidrio
14. Dejar las cajas en incubación a 37°C por 24h

Selección y aislamiento de bacterias transformadas

1. Al término de la incubación, observar 2 cosas en las cajas: 1) sí hay crecimiento 2) sí se distinguen colonias blancas y azules, ambos son indicadores de que la transformación se realizó con éxito ya que en el medio usado sólo pueden crecer bacterias con resistencia a ampicilina adquirida por el plásmido, las colonias blancas además indican que el plásmido contiene el inserto
2. Refrigerar las cajas a 4°C durante 1h para acentuar la coloración azul de aquellas bacterias transformadas con el plásmido, pero que no contiene

inserto; de esta forma se seleccionan con mayor facilidad las colonias blancas

3. Hacer el conteo de todas las colonias y calcular la eficiencia de transformación que equivale al porcentaje de colonias blancas respecto al total
4. Seleccionar 5 colonias blancas totalmente aisladas de cada muestra
5. Tomar cada colonia con la punta de un palillo estéril
6. Inocular con cada colonia medio sólido y líquido, poniendo la colonia con la punta del palillo en el centro de un cuadrante de 1cm x 1cm, previamente delimitado en una caja Petri de 90 mm con medio LB+XGal 0.01mg/mL+Ampicilina 0.01mg/mL+IPTG 0.1M y colocando el palillo en un tubo de ensayo con tapa de rosca estéril con 5mL de medio LB+Ampicilina 0.5mg/mL previamente rotulado
7. Incubar los tubos y las cajas a 37°C durante toda la noche, mantener los tubos con agitación orbital de 280rpm durante el tiempo de incubación

ANEXO X. Extracción de plásmido por la técnica de *Miniprep*

1. Inocular con 50µL del cultivo celular obtenido en el Anexo IX, apartado Selección y aislamiento de bacterias transformadas, tubos de ensayo con tapa de rosca con 3mL de medio LB+Ampicilina 0.5mg/mL, previamente rotulados
2. Incubar los tubos a 37°C con agitación orbital a 280rpm por 12h
3. Transferir 1.5mL de cultivo a un microtubo de 1.5mL nuevo y estéril previamente rotulado
4. Centrifugar a 13,000rpm por 1min
5. Decantar el sobrenadante
6. Lavar el pellet celular con agua estéril libre de nucleasas para eliminar los restos de medio de cultivo
7. Centrifugar como en el paso 3 y descartar el sobrenadante
8. Resuspender el pellet celular en 100µL de la Solución de Resuspensión (RNAsa 5mg/mL/TE 10mM) con ayuda de un vórtex
9. Adicionar 450µL de solución de lisis NaOH 100mM/SDS 0.5% y mezclar por inversión
10. Agregar 225µL de acetato de sodio 3M, pH 5.2 o acetato de potasio 5M, pH 5.2
11. Incubar 10min en hielo
12. Centrifugar a 14,000 rpm a 4°C durante 10min
13. Transferir el sobranate a un microtubo de 1.5mL nuevo previamente rotula
14. Adicionar 700 µL de isopropanol frío y agitar en vórtex
15. Centrifugar a 14,000 rpm durante 5min
16. Retirar el sobranate y agregar 1mL de EtOH al 70% frío.
17. Agitar en vórtex
18. Centrifugar a 14,000 rpm durante 2min
19. Retirar el sobrenadante
20. Repetir los pasos 15 a 18
21. Secar el pellet al aire durante 10 a 15min y resuspenderlo en 50µL de agua libre de nucleasas
22. Conservar el DNA plasmídico a 4°C

ANEXO XI. Análisis bioinformático de secuencias del gen 16S rRNA

Los genes 16S rRNA se enviaron a secuenciar por el método de Sager, en ambos sentidos de la cadena, con los *primers* 27F (5' AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG 3') y 1492R (5' TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T 3'), a la empresa Macrogen en Corea. Se obtuvieron 2 secuencias parciales (*Fwd* y *Rev*) que se procesaron para obtener la secuencia completa del gen siguiendo los pasos enlistados a continuación:

1. En Geneious Prime crear una carpeta llamada genes 16S rRNA
2. Importar los archivos FASTA de la secuencia *Fwd* y la secuencia *Rev* obtenidas del servicio de secuenciación, de todas las cepas en estudio, de cada clona, en el software, en la carpeta creada en el paso anterior
3. Obtener el reverso complementario de la secuencia *Rev* y guardar los cambios
4. Realizar un BLAST en GeneBank para verificar que las dos secuencias de una muestra correspondan a la misma bacteria
5. Descargar 2 o 3 secuencias de la base de datos de EZBioCloud, con una longitud ≥ 1400 pb, que se parezcan a la secuencia problema (con mayor porcentaje de similitud) y que sirven de referencia para editar las secuencias
6. Importar las secuencias de referencia en Geneious prime, en la misma carpeta que las secuencias en estudio
7. Seleccionar la secuencia *Fwd*, el reverso complementario de la secuencia *Rev* y las secuencias de referencia
8. Hacer el alineamiento con el alineador de Geneious con los valores por default, presionando el menú "Align/Assemble<Pairwise/multiple alignment<Geneious Alignment<OK"
9. Dentro del alineamiento editar la secuencia consenso para obtener la secuencia completa del gen 16S rRNA, tomando en cuenta la calidad de las secuencias *Fwd* y *Rev*, y su similitud con las secuencias de referencia
10. Extraer la secuencia consenso editada, la cual corresponde a la secuencia completa del gen 16S rRNA, del alineamiento anterior con el botón "Extract", asignar un nombre a la secuencia y presionar "OK"
11. Hacer una comparación de cada secuencia obtenida en el paso anterior con la base de datos de genes 16S rRNA de EzBioCloud (https://www.ezbiocloud.net/16SrRNA_list?tn=Root) para identificar a la bacteria a la que pertenece y crear una tabla de identidad a partir de la información obtenida
12. Repetir los pasos 3 al 11 con las secuencias de cada clona y cada cepa en estudio, considerando que las secuencias de referencia sirven para el análisis de las clonas de una misma bacteria en estudio
13. Seleccionar las secuencias completas de los genes 16S rRNA de las clonas de una cepa en estudio, obtenidas en el paso 10 y exportarlas en un único archivo en formato FASTA seleccionando el menú

- “File<Export<Documents<File Name=nombre del archivo<Files of Type=FASTA sequences/alignment (*.fasta)<Export”
14. Cargar el archivo resultante del paso anterior en la página de Bellerophon (Huber et al., 2004; <https://comp-bio.anu.edu.au/bellerophon/bellerophon.pl>), utilizando la corrección de Kimura y una ventana de 300 pb, para determinar si alguna de las secuencias era una secuencia quimérica
 15. Eliminar en Geneious prime aquellas secuencias que resulten ser quiméricas
 16. Seleccionar las secuencias completas de los genes 16S rRNA de las clonas de una cepa en estudio, obtenidas en el paso 10 y sus secuencias de referencia
 17. Alinear las secuencias seleccionadas en el paso anterior con el alineador de Geneious con los valores por default, presionando el menú “Align/Assemble<Pairwise/multiple alignment<Geneious Alignment<OK”
 18. Dentro del alineamiento eliminar los extremos no alineados de las secuencias, para obtener secuencias de la misma longitud y guardar los cambios
 19. Exportar el alineamiento anterior a un archivo en formato FASTA seleccionando el menú “File<Export<Documents<File Name=nombre del archivo<Files of Type=FASTA sequences/alignment (*.fasta)<Export”
 20. Analizar este nuevo archivo con el software JModelTest (Darriba et al., 2012) para determinar cuál modelo estadístico de sustitución nucleotídica se ajusta mejor a las secuencias analizadas y elaborar el árbol filogenético correspondiente
 21. Elaborar el árbol filogenético en el software Mega 11 (Tamura et al., 2021b) con el método de Máxima Verosimilitud, el modelo indicado por JModelTest y un análisis de bootstrap con 1,000 aleatorizaciones

ANEXO XII. Análisis bioinformático para genómica comparativa

El análisis de genómica comparativa se realizó con el pipeline Roary; dado que dicho pipeline corre en sistema operativo Linux con línea de comandos fue necesaria la instalación previa de diferentes dependencias (<http://github.com/sanger-pathogens/Roary>). El protocolo es el siguiente:

1. Recopilar los genomas de las cepas en estudio previamente reconstruidos (ver Anexo V)
2. Descargar de la base de datos del NCBI genomas de referencia completos de cada género o especie a la que pertenece cada cepa en estudio (*Bacillus inaquosorum*, *Pseudomonas atacamensis* y *Stenotrophomonas* spp)
3. Crear carpetas por género y especie bacteriana y colocar los genomas correspondientes en cada una
4. Hacer la anotación funcional de cada uno de los genomas (los genomas en estudio y los de referencia) con el anotador Prokka (previa instalación), con el siguiente comando:
`Prokka -cpus 4 -kingdom Bacteria -prefix sequence_name -locustag sequence_name */sequence_name.fasta`
Reemplazar “sequence_name” por el nombre de la secuencia que se va a anotar. La anotación de cada genoma se hace por separado
5. Una vez anotados todos los genomas, copiar el archivo con extensión “.gff” de cada uno, en una carpeta llamada gffs, creada con el comando `mkdir gffs`. La comparación se realiza con los archivos en este formato
6. Realizar la comparación entre el genoma en estudio y los genomas de referencia con el comando:
`Roary -f roaryresult -p 4 -e -n -v -maft gffs/*.gff`
La comparación se realiza entre genomas de un mismo género o especie
7. Construir un árbol filogenómico con el software FastTree (previa instalación), con el comando:
`FastTree -nt -gtr roaryresult/core_gene_alignment.aln > roaryresult/mytree.newick`
8. Generar una matriz de presencia/ausencia de genes con Python (previa instalación), con el comando:
`Python roary_plots.py -labels roaryresult/mytree.newick roaryresult/gene_presence_absense.cvs`
9. Por último, determinar si se trata de un Pangenoma abierto o cerrado con ayuda de RStudio (entorno de desarrollo integrado para el lenguaje de programación R), utilizando el siguiente script:

```
#!/usr/bin/env Rscript
# ABSTRACT: Create R plots
# PODNAME: create_plots.R
```

```
# Take the output files from the pan genome pipeline and create nice plots.
```

```
library(ggplot2)
```

```
mydata = read.table("number_of_new_genes.Rtab")
png(filename = "number_new_genes.png", width = 6, height = 4, units
= "in", res = 300)
boxplot(mydata, data=mydata, main="Number of new genes",
        xlab="No. of genomes", ylab="No. of genes",varwidth=TRUE,
ylim=c(0,max(mydata)), outline=FALSE)
dev.off()
```

```
mydata = read.table("number_of_conserved_genes.Rtab")
png(filename = "number_of_conserved_genes.png", width = 6, height
= 4, units = "in", res = 300)
boxplot(mydata, data=mydata, main="Number of conserved genes",
        xlab="No. of genomes", ylab="No. of genes",varwidth=TRUE,
ylim=c(0,max(mydata)), outline=FALSE)
dev.off()
```

```
mydata = read.table("number_of_genes_in_pan_genome.Rtab")
png(filename = "number_of_genes_in_pan.png", width = 6, height = 4,
units = "in", res = 300)
boxplot(mydata, data=mydata, main="No. of genes in the pan-
genome",
        xlab="No. of genomes", ylab="No. of genes",varwidth=TRUE,
ylim=c(0,max(mydata)), outline=FALSE)
dev.off()
```

```
mydata = read.table("number_of_unique_genes.Rtab")
png(filename = "number_of_unique_genes.png", width = 6, height = 4,
units = "in", res = 300)
boxplot(mydata, data=mydata, main="Number of unique genes",
        xlab="No. of genomes", ylab="No. of genes",varwidth=TRUE,
ylim=c(0,max(mydata)), outline=FALSE)
dev.off()
```

```
mydata = read.table("blast_identity_frequency.Rtab")
png(filename = "blast_identify_frequency.png", width = 6, height = 4,
units = "in", res = 300)
plot(mydata,main="Number of blastp hits with different percentage
identity", xlab="Blast percentage identity", ylab="No. blast results")
dev.off()
```

```

conserved =
colMeans(read.table("number_of_conserved_genes.Rtab"))
total =
colMeans(read.table("number_of_genes_in_pan_genome.Rtab"))

genes = data.frame( genes_to_genomes = c(conserved,total),
                    genomes =
c(c(1:length(conserved)),c(1:length(conserved))),
                    Key = c(rep("Conserved genes",length(conserved)),
rep("Total genes",length(total))) )

ggplot(data = genes, aes(x = genomes, y = genes_to_genomes, group
= Key, linetype=Key)) +geom_line()+
theme_classic() +
ylim(c(1,max(total)))+
xlim(c(1,length(total)))+
xlab("No. of genomes") +
ylab("No. of genes")+ theme_bw(base_size = 16) +
theme(legend.justification=c(0,1),legend.position=c(0,1))
ggsave(filename="conserved_vs_total_genes.png", scale=1)

#Modificando la posición de la etiqueta de datos
ggplot(data = genes, aes(x = genomes, y = genes_to_genomes, group
= Key, linetype=Key)) +geom_line()+
theme_classic() +
ylim(c(1,max(total)))+
xlim(c(1,length(total)))+
xlab("No. of genomes") +
ylab("No. of genes")+ theme_bw(base_size = 16) +
theme(legend.justification="center",legend.position="bottom")
ggsave(filename="conserved_vs_total_genes.png", scale=1)

#####

unique_genes =
colMeans(read.table("number_of_unique_genes.Rtab"))
new_genes = colMeans(read.table("number_of_new_genes.Rtab"))

genes = data.frame( genes_to_genomes =
c(unique_genes,new_genes),
                    genomes =
c(c(1:length(unique_genes)),c(1:length(unique_genes))),

```

```

Key = c(rep("Unique genes",length(unique_genes)),
rep("New genes",length(new_genes))) )

```

```

ggplot(data = genes, aes(x = genomes, y = genes_to_genomes, group
= Key, linetype=Key)) +geom_line()+
theme_classic() +
ylim(c(1,max(unique_genes)))+
xlim(c(1,length(unique_genes)))+
xlab("No. of genomes") +
ylab("No. of genes")+ theme_bw(base_size = 16) +
theme(legend.justification=c(1,1),legend.position=c(1,1))
ggsave(filename="unique_vs_new_genes.png", scale=1)

```



Article

Genotypic and Phenotypic Characterization of *Pseudomonas atacamensis* EMP42 a PGPR Strain Obtained from the Rhizosphere of *Echinocactus platyacanthus* (Sweet Barrel)

Leilani Itzel Salinas-Virgen ¹, María Eugenia de la Torre-Hernández ^{2,3} , José Félix Aguirre-Garrido ⁴ , Francisco Martínez-Abarca ⁵ and Hugo César Ramírez-Saad ^{3,*}

13. ARTÍCULOS

- ¹ Doctorado en Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, Mexico City 04960, Mexico; lisv.nani@gmail.com
- ² CONAHCYT-Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, Mexico City 04960, Mexico; mdelatorre@correo.xoc.uam.mx
- ³ Departamento Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, Mexico City 04960, Mexico
- ⁴ Departamento de Ciencias Ambientales, Universidad Autónoma Metropolitana-Lerma, Lerma de Villada 52004, Mexico; j.aguirre@correo.ler.uam.mx
- ⁵ Departamento de Microbiología del Suelo y la Planta, Estación Experimental del Zaidín, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 18008 Granada, Spain; fmarbarca@eez.csic.es
- * Correspondence: hurasa@correo.xoc.uam.mx



Citation: Salinas-Virgen, L.I.; de la Torre-Hernández, M.E.; Aguirre-Garrido, J.F.; Martínez-Abarca, F.; Ramírez-Saad, H.C. Genotypic and Phenotypic Characterization of *Pseudomonas atacamensis* EMP42 a PGPR Strain Obtained from the Rhizosphere of *Echinocactus platyacanthus* (Sweet Barrel). *Microorganisms* **2024**, *12*, 1512. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12081512>

Academic Editor: Mohamed Hijri

Received: 17 June 2024

Revised: 3 July 2024

Accepted: 15 July 2024

Published: 24 July 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) are a group of bacteria that associate with the rhizosphere of plants; one of the most abundant bacterial genera in this ecological niche is *Pseudomonas*, which is constantly expanding due to the emergence of new species such as *Pseudomonas atacamensis*, whose discovery in 2019 has led to the characterization of several strains from different environments but taxonomically related. The objective of this work was to phenotypically and molecularly characterize *P. atacamensis* strain EMP42, isolated from the rhizosphere of *Echinocactus platyacanthus*. The strain EMP42 is able to use different substrates and reduce oxidative stress in plants. It is capable of improving growth parameters such as the number of inflorescences and the height of the aerial body of *Arabidopsis thaliana*, as well as the germination and seedling survival of the cacti *Echinocactus platyacanthus* and *Astrophytum capricorne*. The genetic structure of *P. atacamensis* EMP42 consists of a closed chromosome of 6.14 Mbp, and 61.1% GC content. It has 5572 genes, including those associated with PGPR activities, such as the *trp*ABCDE, *SAP*, *pho*ABPRU and *acs*ABC genes, among others, and three ncRNA loci, nine regulatory regions, five complete rRNA operons and three CRISPR-Cas loci, showing phylogenomic similarities with the reference strain *P. atacamensis* B21-026. Therefore, this study contributes to the understanding of genomic diversity within *P. atacamensis* and, particularly, highlights the potential application of strain EMP42 as a PGPR.

Keywords: PGPR; *Pseudomonas atacamensis*; genomics

1. Introduction

Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) arouse great interest in the agroecological field since they are associated with plants' rhizosphere, promoting their growth and development through various metabolic activities [1]. Using PGPR reduces the dependence on chemical fertilizers in crops of commercial interest, leading to sustainable agriculture [2].

One of the bacterial genera most reported as PGPR is *Pseudomonas* [3], which is also among the most abundant in the rhizosphere of plants [4]. Members of this genus exhibit a wide range of PGPR activities, including atmospheric nitrogen fixation, potassium solubilization, production of phosphatases and/or organic acids for phosphate solubilization, synthesis of phytohormones that enhance tissue development, production of siderophores for the uptake of metal ions, such as Fe, Ni, Cu, Zn, etc., as well as the production of

antibiotics and various lytic enzymes that give them the ability to exert biological control over different phytopathogenic fungi [5].

The first report of *Pseudomonas atacamensis* dates back to 2020; this new species was isolated from the rhizosphere of flowering plants in the Atacama Desert, Chile [6]. Currently, 26 genomes belonging to strains within this species have been reported in GeneBank. They have been isolated from different environments, such as urban community gardens [7], clinical isolates [8], cow feces [9], agricultural soil [10] and plant-associated [11–14]. From these genomes, only six have been completely reconstructed. They belong to strains isolated from plants or soil, and some of them also have PGPR characteristics such as the ability to solubilize phosphates on strain SM1 [11] and to exert biological control on phytopathogenic microorganisms in strains B21-026, B21-045 and B21-050 [10].

The strain *Pseudomonas atacamensis* EMP42 was originally described as *Pseudomonas koreensis* strain P1 based on 16S rRNA gene sequencing of amplicons [15]. Due to its various in vitro PGPR features, this strain was further characterized in this work, including biochemical and in vivo PGPR features, sequencing of cloned 16S rRNA gene and a comparative genomic analysis.

2. Materials and Methods

2.1. Culturing and Phenotypic Characterization of the Bacteria

The current strain *P. atacamensis* EMP42 was isolated from the rhizosphere of *Echinocactus platyacanthus* (candy barrel), growing in the semidesert of Querétaro, Mexico [15]. It was cultured in TY liquid medium (tryptone 5 g/L, yeast extract 3 g/L, CaCl_2 1 g/L). The biochemical characterization of the bacteria was carried out with an API 20NE test kit, following the manufacturer's instruction, adding oxidase and catalase tests.

In planta PGPR activity tests were carried out in 3 plant species in the model plant *Arabidopsis thaliana* and two cacti, *Echinocactus platyacanthus* and *Astrophytum capricorne*. In the former case, 3-week-old seedlings of wild-type *A. thaliana*, Columbia ecotype, were immersed (10 min) in a bacterial suspension of *P. atacamensis* EMP42 ($\text{OD}_{600\text{nm}} = 0.6$), while the group of non-inoculated seedlings was immersed in sterile-distilled water [16]. All seedlings were planted in plastic pots $6.5 \times 6.5 \times 8.5$ cm (length $\times$ width $\times$ height), containing a previously tyndalized mixture of peat moss/agrolite/vermiculite (3:1:1). Pots were placed in a growth chamber for 16/8 h of light/dark, temperature 22 ± 3 °C, for 6 weeks. The following plant development parameters were recorded weekly: time of appearance of the main and secondary stems, time of appearance of inflorescences. The total number of stems, total number of inflorescences, survival percentage, diameter of the rosette and height of the aerial body were recorded at the end of the assay [16]. A combined *t*-test was performed to determine statistically significant differences between inoculated and non-inoculated plants.

The second plant assay was a germination test using seeds of the cacti *Echinocactus platyacanthus* and *Astrophytum capricorne*, collected in January 2021 and January 2024, respectively. The seeds (80 seeds from each species) were surface sterilized by immersion in 1% sodium hypochlorite for 15 min and rinsed several times with sterile water; then, they were divided into inoculated and non-inoculated groups. Seeds of the former groups were immersed (10 min) in a bacterial suspension of *P. atacamensis* EMP42 ($\text{OD}_{600\text{nm}} = 0.6$), while seeds of the non-inoculated groups were immersed in sterile-distilled water. Then, the 4 groups of seeds were sown in Petri dishes containing water-agar (1.2%) and incubated at 22 ± 3 °C. Four weeks after sowing, seed germination was recorded. The seedlings were transferred to a growth chamber for 4 more weeks for establishment and then transplanted into plastic trays containing commercial substrate for cacti (forest soil, coconut fiber and agrolite). Survival was evaluated 4 weeks later (12 weeks after the inoculation treatment). Differences in percentages of germination and survival of inoculated and non-inoculated seedlings were evaluated with an χ^2 test.

2.2. Molecular Characterization

Genomic DNA extraction was carried out with the High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, Basel, Switzerland, catalog number 11796828001) following the manufacturer's instructions. The 16S rRNA gene was amplified as previously described [15], and cleaned amplicons were cloned with the p-Gem T-easy kit (Promega, Madison, WI, USA, catalog number A1360), in competent *E. coli* DH5 α cells under the manufacturer's instructions. The transformed cells were selected in LB medium (tryptone 10 g/L, yeast extract 5 g/L, NaCl 10 g/L, agar 1.2%) supplemented with X-Gal (50 μ g/mL), IPTG (0.1 mM) and ampicillin (100 μ g/mL). After incubation at 37 °C for 24 h, transformant colonies were selected, and their respective plasmids were extracted by miniprep [17]. The plasmids were linearized with *Sca*I and their sizes evaluated by electrophoresis in 1.2% agarose gel. The cloned 16S rRNA genes were sent for Sanger sequencing at Macrogen, Korea. The complete gene sequences were uploaded to the 16S-based ID tool of the EzBioCloud web server [18]. A phylogenetic tree was constructed using the Maximum Likelihood method and the Jukes–Cantor as the best nucleotide substitution model [19], according to the jModelTest2 tool [20]. The resulting dendrogram was tested with a Bootstrap analysis of 1000 randomizations, all under the MEGA 11 software package [21].

Genomic DNA was sequenced on the Illumina MiSeq platform, at the Genome Sequencing Unit of CGEB-Integrated Microbiome Resource, Dalhousie University, Canada. A paired-end library was employed according to standard protocols [22]. The obtained reads (SRR29184006) were processed with Geneious Prime [23]. For quality filtering, reads with Phred score ≤ 20 and length < 150 nt were eliminated. The genome was reconstructed with the de novo assembly tool using the pre-established configuration, and the quality of the assembly was evaluated, both under the Geneious prime software (v 2023.2.1) [23]. Contigs > 1000 nt were mapped against the reference genome of *P. atacamensis* SM1 (CP070503.1), and gene order and orientation were determined with Mauve aligner [24]. The reconstructed genome was uploaded into the TrueBacID tool of EZBioCloud [25] for identification and deposited in the GeneBank under the accession number NZ_CP149965.

Finally, the annotation of the genes was performed with the NCBI-PGAP pipeline [26], the graphical representation of the genome was generated in Proksee [27], core-genome taxonomic analysis was performed on the OrthoVenn server [28], phylogenomic analysis was performed with FastTree2 [29] using the Maximum Likelihood method with the Jones–Taylor–Thorton (JTT) amino acid evolution model, with a CAT approximation of the rate of evolution for each site. The pangenome of *P. atacamensis* was determined with the Roary pipeline [30], by using only the complete genomes available of *P. atacamensis*, in order to avoid NP-hard [31]. The 7 genomes used for this analysis came from the following strains: SM1 [11], MGMM4 [32], SWIR7 [12], B21-026, B21-045 and B21-050 [10], and EMP42 (this work).

3. Results

3.1. Phenotypic Characterization

3.1.1. Biochemical Characterization

The strain EMP42 was not capable of reducing nitrates to nitrites or nitrogen, fermenting glucose, hydrolyzing esculin (β -glucosidase activity), producing urease, β -galactosidase or assimilating maltose, adipic acid or acid phenylacetic. However, it showed the ability to assimilate different carbon sources, such as glucose, arabinose, mannose, mannitol, N-acetyl-glucosamine, potassium gluconate, capric acid, malic acid and citrate trisodium. In addition, it was able to form indoles, produce arginine dihydrolase, hydrolyze gelatin (protease activity) and also showed positive oxidase and catalase activities. Some in vitro PGPR capabilities were previously reported as *P. koreensis* P1.2 [4].

3.1.2. In Planta Characterization

The ability of *P. atacamensis* strain EMP42 to promote plant development was assayed in seedlings of the fast-growing model plant *A. thaliana*. The results depicted in Table 1 show that inoculation with strain EMP42 has a beneficial effect on the development of the plant. Most of the quantitative parameters evaluated (i.e., appearance time of main stem and secondary stems, total number of stems, inflorescence appearance time, total number of inflorescences, rosette diameter and aerial body height) showed statistically significant differences, according to a combined *t*-test ($p \leq 0.05$), while the categorical parameters. survival and rosette-forming plants (RF) did not produce significant differences, as tested by χ^2 .

Table 1. Development parameters of *A. thaliana* seedlings inoculated with *P. atacamensis* EMP42. The values correspond to the mean of 15 plants. The parameters with an * show significant differences.

Treatment	Survival (%)	RF (%)	MS * (Weeks)	SS * (Weeks)	IA (Weeks)	NS *	NI *	RD * (cm)	HAB * (cm)
Inoculated	100	100	2.57	4.83	2.57	6.85	36	2.59	13.46
Non-inoculated	91.67	90.91	3.27	5.43	3.27	2.72	15.6	2.23	10.68

Survival after 6 weeks; RF—plant-forming rosette; MS—mean of main stem appearance time; SS—mean of secondary stems appearance time; IA—mean of inflorescence appearance time; NS—mean number of stems; NI: mean number of inflorescences; RD—mean rosette diameter; HAB—mean of height of the aerial body.

In the inoculation assay of cacti seeds, statistically significant differences were found in most of the evaluated parameters, according to an χ^2 test (Table 2). Inoculated seeds of both cacti species showed roughly a significant 15% increase in seed germination percentage, while inoculation of the 3-year-old *E. platyacanthus* seeds produced a two-fold increase in seedling survival, as compared to the non-inoculated groups.

Table 2. Development parameters in cacti seedlings of *E. platyacanthus* and *A. capricorne* inoculated with *P. atacamensis* EMP42. Parameters marked with * show statistically significant differences according a χ^2 test.

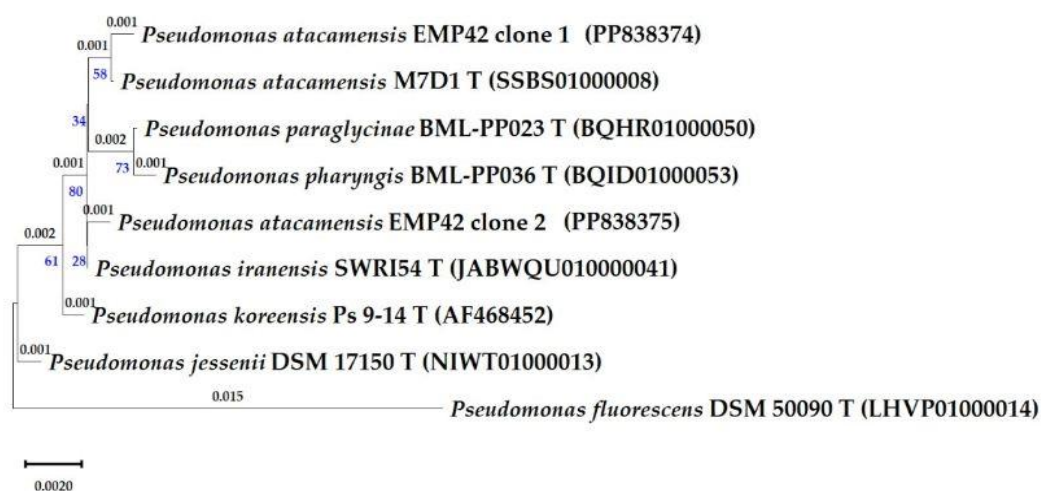
Treatments	<i>E. platyacanthus</i>		<i>A. capricorne</i>	
	Germination * (%)	Survival * (%)	Germination * (%)	Survival (%)
Inoculated	95	92.86	100	81.81
Non-inoculated	80	45	87.5	83.87

3.2. 16S rRNA Gene Sequence Analysis

Sequencing of cloned 16S rRNA genes was meant to produce a more precise identification of strain EMP42. However, the four obtained sequences corresponded to two copies of the 16S rRNA genes, and a comparison with the EzBioCloud database showed that one copy of the 16S rRNA gene has greater similarity to the type strain *Pseudomonas atacamensis* M7D1^T, and copy 2 with *Pseudomonas iranensis* SWRI54^T (Table 3). Furthermore, the phylogenetic relationships of the strain EMP42 and closely related *Pseudomonas* were evaluated with a phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences (Figure 1). As expected, sequences of both copies of the EMP42 16S gene were grouped with the aforementioned type strains. These differences in identification pointed to the need for a deeper characterization based on genome sequencing.

Table 3. Sequence comparison of 2 cloned copies of the 16S rRNA gene of *P. atacamensis* EMP42 according to the 16S-based ID tool from EzBioCloud.

	Closest spp.	Accession Number	Coverage (%)	Similarity (%)
Clone1 (PP838374)	<i>Pseudomonas atacamensis</i> M7D1 ^T	SSBS01000008	100	99.92
Clone2 (PP838375)	<i>Pseudomonas iranensis</i> SWRI54 ^T	JABWQU010000041	100	99.73

**Figure 1.** Phylogenetic tree of the *P. atacamensis* EMP42 and close *Pseudomonas*-type species, as based in partial 16S rRNA gene sequences (1250 pb). Phylogeny was inferred using the Maximum Likelihood method, the tree with the highest log likelihood (−3020.63) is shown. The percentage of trees in which the associated taxa clustered is shown below the branches in blue. The small branch lengths depicting the number of substitutions per site (values above branches) correspond to 1 or 2 variations in the gene sequences.

3.3. Genome Assembly and Annotation

Whole-genome sequencing produced a total of 858,366 paired-end reads, with an average length of 246.7 bases, providing 99× genome coverage. The Phred score quality of 95.1% of the sequences was 30, and they were used to perform the de novo assembly, obtaining 110 good-quality contigs with an N50 length of 923,094 bp, an L50 of 2 contigs and a G+C content of 59.78%. The mapping of the contigs with length > 1000 bp culminated in the reconstruction of a closed genome of 6,145,328 bp size (Figure 2). With the complete genome sequence, a genome-based identification pointed out that strain EMP42 is indeed *P. atacamensis*, with an ANI of 96.82% according to the TruebackID tool [25]. Additionally, reconstruction of the EMP42 genome produced an extra-chromosomal contig with a different fold coverage, a sequence of 36,460 bp corresponding to the genome of a bacteriophage, with some other phage sequences were found scattered along the genome.

The genome annotation predicted 5572 genes, 3 ncRNA loci, 9 regulatory regions of cobalamin, guanidine, trehalose 6-phosphate phosphatases (TPP), S-adenosyl-L-homocystein, *yybP-ykoY* for manganese sensing and flavin mononucleotide (FMN), plus 5 complete rRNA operons showing 99.94% similarity among their 16S sequences. Coding genes and operons associated with PGPR activities are depicted in Table S1.

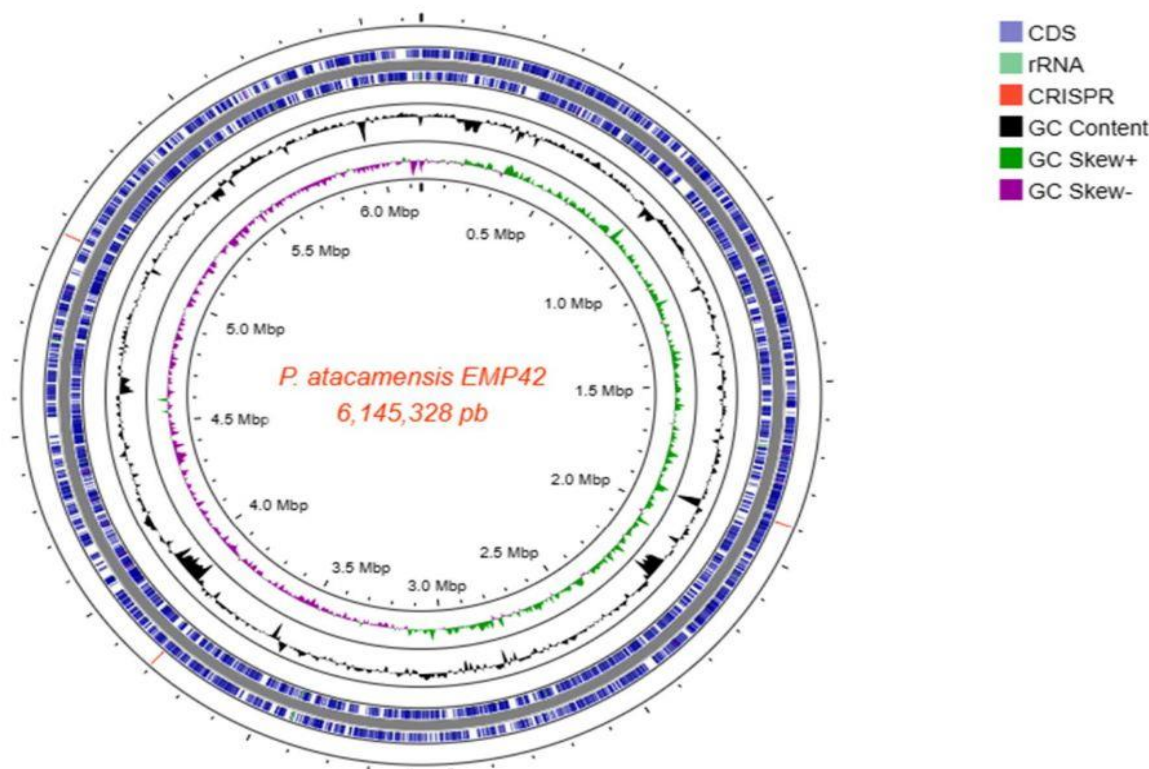


Figure 2. Closed genome map of *P. atacamensis* EMP42 with a length of 6,145,328 bp. From the outside: circle 1 showing the CRISPR-CAS loci (3 red lines); circles 2 and 3 enclose the genes on the main strand and complementary strand respectively; circle 4, the content of GC; circle 5, the GC bias. The scale in Mbp is indicated in the inner circle.

3.4. Comparative Genomics

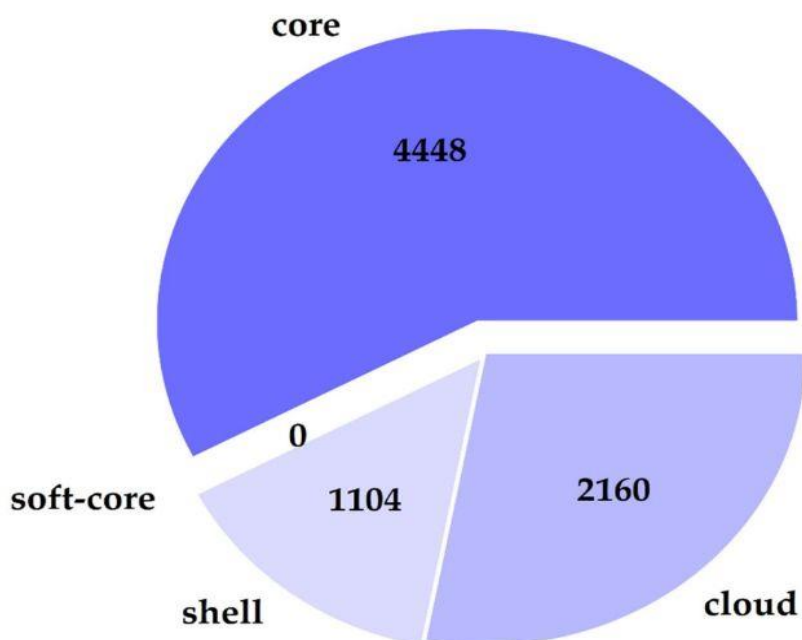
The pangenome analysis of *P. atacamensis* was performed with the seven available complete genomes to avoid additional difficulties related to the use of fragmented assemblies [30] or scaffolding problems that may interfere with the generation of the pangenome [31]. Some genome features of the seven strains used for this analysis can be found in Table 4. *P. atacamensis* has an open and expanding pangenome (Figure S1) composed of 7712 genes, of which 3264 are part of the accessory genome. This latter is made up of 1104 genes shared by most of the genomes (*shell genome*), and 2160 genes shared by a minimal subset of the genomes (*cloud genome*), including those genes present in only one of the genomes (Figure 3A). The strain under study has a *core genome* consistent with the reference strains; interestingly, there is a specific metabolic signature in its cloud genome (Figure 3B), comprising genes for activities, such as the production of transposition proteins for genetic recombination, proteins related to DNA replication and metabolism and other proteins related to copper resistance and cobalt–zinc–cadmium resistance.

Grouping of all the genes in the pangenome generated 5504 protein-coding clusters. The strain EMP42 shares 5062, of which 4551 constitute the core genome, containing proteins with basic functions related to DNA synthesis, cell division and basic metabolic functions. The phylogenomic tree (Figure 4) showed that *P. atacamensis* strain EMP42 is phylogenomically closer to the strain *P. atacamensis* B21-026, as both strains have a similar number of orthogroups sharing most of them.

Figure 5 shows the exclusive or shared protein clusters present in the accessory genomes of six reference strains. Among the shared protein clusters are those related to PGPR functions, such as phosphatase production, tryptophan biosynthesis, xenobiotic metabolism, biofilm formation, siderophore transport, etc. *P. atacamensis* EMP42 also has

seven exclusive clusters, with three related to DNA binding proteins, transport and response to cadmium stimulation, while the other four have unidentified biological functions.

(A)



(B)

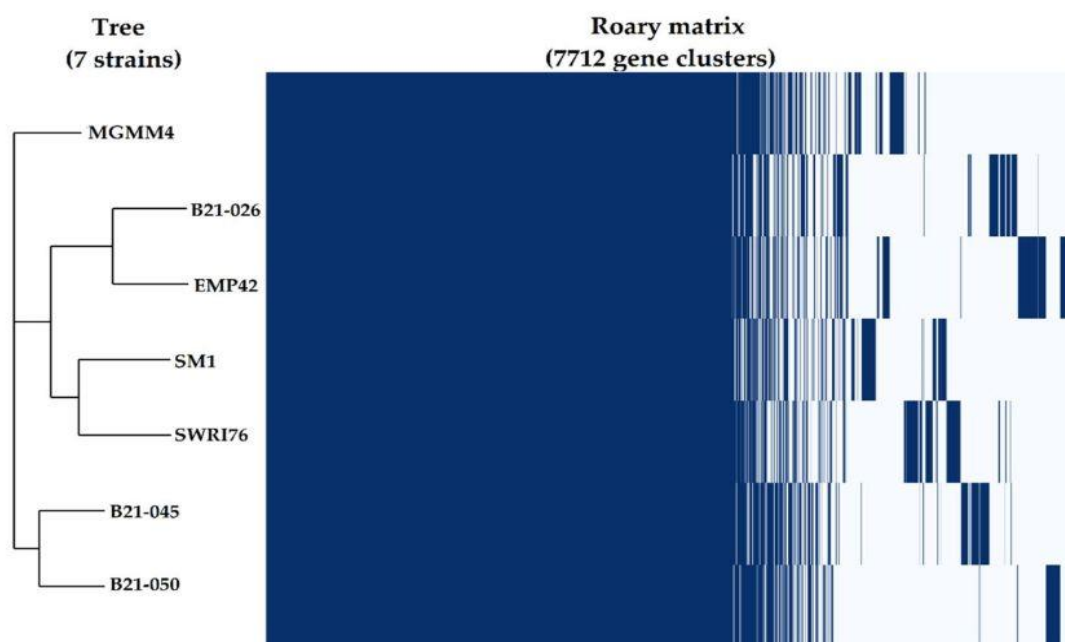


Figure 3. Pangenome representation of *Pseudomonas atacamensis*. (A) Pie chart representing the proportion of genes within the compared genomes. Core genes are found in >99% of the genomes, the shell genome is found in 15–95% and the cloud genome is represented in <15%. (B) Gene presence/absence matrix, each branch of the phylogenomic tree shows the genetic profile of each of the 7 strains compared.

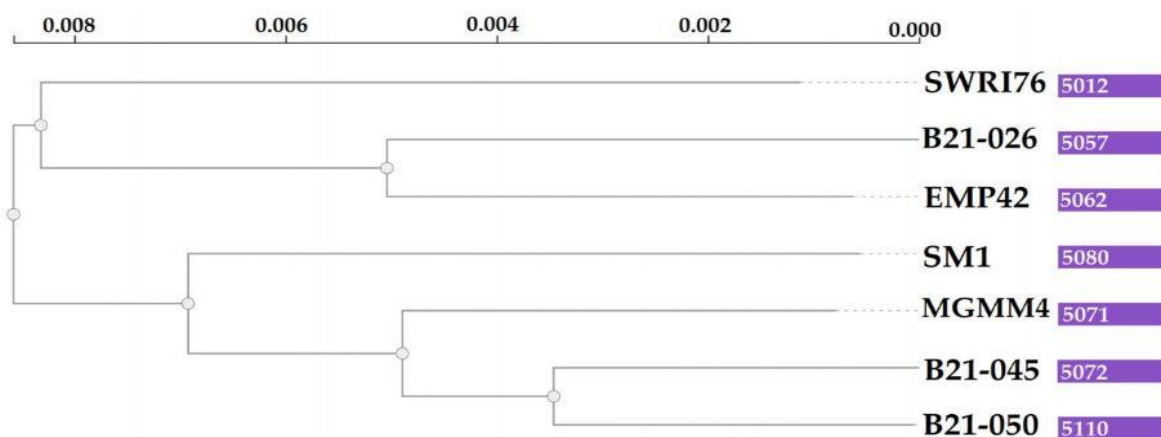


Figure 4. Phylogenomic tree of *P. atacamensis* strains. Values in the purple boxes are the orthogroup numbers of each analyzed strain.

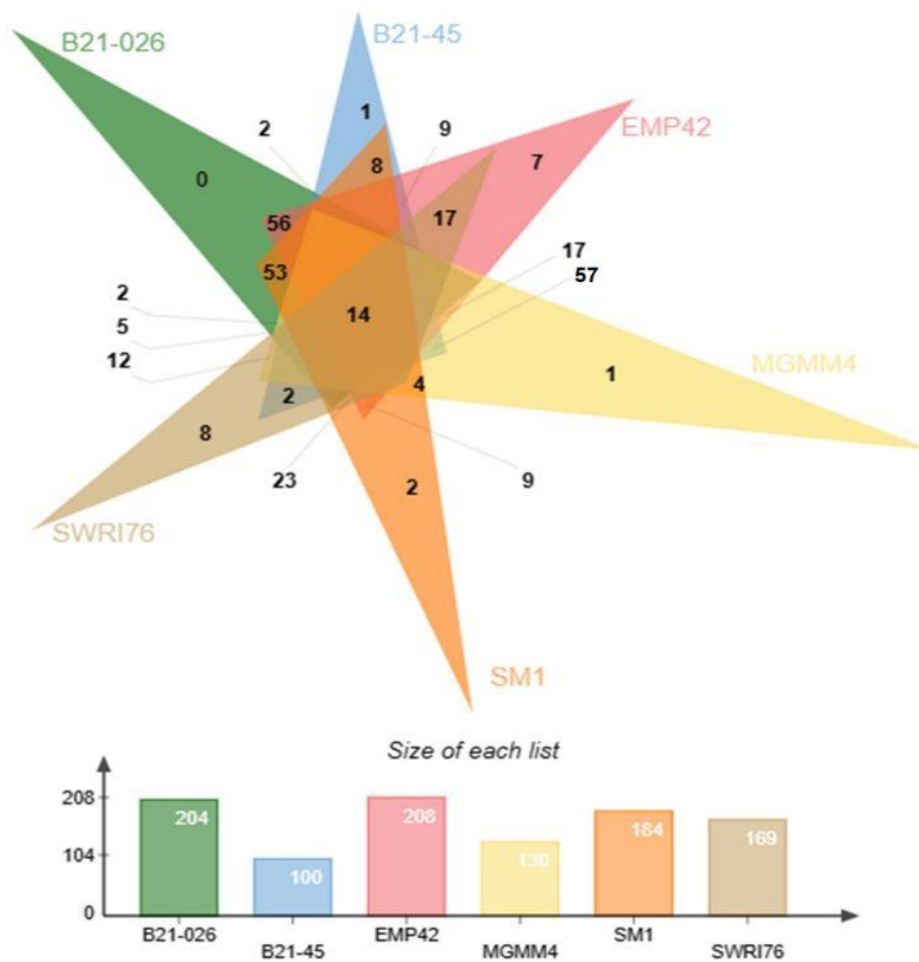


Figure 5. Venn diagram representation of the accessory genome of *P. atacamensis* strains EMP42, B21-026, B21-045, MGMM4, SM1 and SWRI76. Strain EMP42 (in pink) has 208 protein clusters most of them common to the other strains. At the intersections of the triangles the numbers of shared clusters are shown, and the exclusive clusters for each strain are shown in the peaks. The number of clusters from each strain used to construct the Venn diagram are found in the lower bar graph.

Table 4. Basic metrics of the 7 *Pseudomonas atacamensis* complete genomes used in this study. Rhizo strains were obtained from rhizospheric soil of different plants, while strains of series B21 were isolated from agricultural soil.

Strain	Isolation Source	GenBank Accession	Length (Mbp)	GC (%)	CDS	Contigs	Coverage	Ref
<i>P. atacamensis</i> EMP42	Rhizo	CP149965.1	6.145	60	5572	1	99x	[15]
<i>P. atacamensis</i> SM1	Rhizo	CP070503.1	5.991	60	5469	2	200x	[11]
<i>P. atacamensis</i> MGMM4	Rhizo	CP123909.1	6.011	60	6011	1	150x	[9]
<i>P. atacamensis</i> SWIR7	Rhizo	CP077081.1	6.084	60	5461	1	121x	[12]
<i>P. atacamensis</i> B21-026	Soil	CP087187.1	5.970	60	5398	1	181x	[10]
<i>P. atacamensis</i> B21-045	Soil	CP087171.1	5.992	60	5405	1	139x	[10]
<i>P. atacamensis</i> B21-050	Soil	CP087167.1	5.940	60	5356	1	216x	[10]

4. Discussion

The results obtained from the biochemical characterization showed that *P. atacamensis* EMP42 has important characteristics as a PGPR, as it is able to assimilate nine different substrates. Bacterial plant growth promotion begins with the ability of bacteria to colonize the rhizosphere of plants, which is influenced by the type of exudates (i.e., sugars, amino acids and organic acids), serving as chemo-attractants and food for bacteria [33–35]. Furthermore, the strain shows the ability to produce metabolites and enzymes related to plant growth promotion activities, such as the production of indoles associated with the production of IAA; protease activity related to the biocontrol of phytopathogens, along with other lytic enzymes such as chitinases, cellulases and glucanases [36]; and the production of catalase that has an antioxidant function reducing oxidative stress in plants [37].

Plant growth-promoting characteristics among members of the *Pseudomonas* genus have been widely reported [5,38], agreeing with the previous evaluation of strain EMP42 regarding its ability to produce indole acetic acid, solubilize phosphates, produce siderophores for various metal ions, and exert biological control on phytopathogenic fungi [4]. In this context, comparison of strain EMP42 with strain *P. atacamensis* M7D1 showed that both share the aforementioned characteristics. However, strain EMP42 stands out for producing a 26% more indole acetic acid (IAA) than strain M7D1. Furthermore, the influence of various *Pseudomonas* species on the growth and development of different crops of commercial interest, such as canola [39], turmeric [40], mung beans [41] and corn [42], has been demonstrated. In model plants, such as *Brassica napa* [43] and *A. thaliana*, improving plants' performance and increasing their biomass [44,45], these features were also observed in the present study. For this reason, members of the genus *Pseudomonas* have become the bioinoculant of choice in many countries worldwide [46].

The inoculation assay with *E. platyacanthus* and *A. capricorne* was focused on evaluating the germination of seeds and the seedling survival of these very slow-growing cacti (i.e., *E. platyacanthus* grows less than 5 cm per year [47]). In addition, *E. platyacanthus* is subject to special protection, and *A. capricorne* is a threatened species according to the Mexican normativity [48]; both species have relatively short germination times and high germination rates [49,50], which allow for timely and effective evaluation. The results show statistically significant increases of 15 and 12.5% in seed germination for *E. platyacanthus* and *A. capricorne*, respectively, as compared with their respective uninoculated controls. Different studies [51,52] have assayed several *Bacillus* spp., *Azospirillum brasilense*, or fungi (*Trichoderma* spp., *Glomus intraradices*), to stimulate the germination of some cacti seeds

(*Mammillaria magnimamma*, *Pachycereus pringlei*, *E. platyacanthus*). Although their results varied according to the plant, bacteria or fungal species used, further differences regarding seed pretreatment or evaluation of germination time complicate making fair comparisons.

Seedling development could be influenced by the production of IAA by bacteria, since this auxin promotes cell division, as well as the elongation of the main root and the formation of secondary roots and root hairs [53]. This could also be related to the survival of plants, particularly for cacti, whose root system has an anchoring function in the rocky shallow soils they commonly inhabit [54]. In this study, a 47.8% increase in the survival of *E. platyacanthus* seedlings inoculated with the EMP42 strain was found, in contrast to the respective uninoculated control.

The molecular basis of the PGP capabilities of *P. atacamensis* EMP42 are related to the presence of genes encoding enzymes and proteins that are either directly or indirectly involved in these activities. Genes, such as *FlaAB* (Flagellin), *FlhAB*, *FliIR* and *FlgDH* (synthesis of flagellar proteins) and *CheAVY* (chemotactic proteins), among others, intervene in the chemotactic response of bacteria and are essential for rhizosphere colonization [3].

In the genome of *P. atacamensis* EMP42, there are various genes involved in several biochemical pathways for IAA production [55], like the nitrilases N2 and N3 for the acetonitrile (IAN) pathway; the AO (monoamine oxidase), involved in the tryptamine (TAM) pathway; and IAD (indole-acetaldehyde dehydrogenase) needed in the indole-3-pyruvate (IPyA) pathway. These findings suggest that strain EMP42 might be capable of producing IAA through three different metabolic pathways, whose activation depends on the environmental stimulus [56]. It is worth mentioning that the IPyA pathway is mostly used by beneficial rhizobacteria [46].

We found other important genes that intervene in the solubilization and assimilation of phosphate from soil: SAP (alkaline phosphatase), IPP (inorganic pyrophosphatase), *phoAPRU* (all make up the *pho* regulon whose products allow for detecting the availability of inorganic phosphate) [57] and *ptsABCS* (coding P transport proteins) [58]. The production of siderophores is represented by the presence of the *acsABCDE* operon that encodes enzymes involved in the production of achromobactin, a siderophore of the citrate/carboxylate family first described in *Erwinia chrysanthemi* [59] and also found in *Pseudomonas* [60]. Additionally, according to PGAP annotation, EMP42 has a set of genes similar to *acs* that could participate in the production of a putative uncharacterized siderophore.

Furthermore, the presence in the cloud genome of strain EMP42 of genes involved in DNA transposition, plus an extrachromosomal bacteriophage sequence, is an interesting finding, since both types of elements may enhance the genetic variability of bacteria [61]. Among the 25 *P. atacamensis* genomes deposited in GeneBank, only that of strain SM1 contains a plasmid or extrachromosomal element, bearing sequences coding for bacteriophage structural proteins, such as stem and baseplate assembly proteins and terminases. However, the phage sequences found in the genomes of both strains do not have homology, either at the DNA level or at the protein level.

5. Conclusions

P. atacamensis strain EMP42 was isolated from the rhizosphere of candy barrel, and it showed both in vitro and in planta growth promotion characteristics, becoming an interesting strain with the potential to be used as a bioinoculant. A genomic comparison with genomes of other *P. atacamensis* strains obtained from rhizospheric or agricultural soils showed that the majority of the genes related to PGPR activities are found in the accessory genome and are not shared by all the strains studied; therefore, it is possible to establish the molecular bases of the differences on the PGPR capabilities of these bacteria.

It is important to further characterize the transposase and bacteriophage elements found in the genome of strain EMP42, in order to define their implications in rearrangements and/or transfer of genetic material, or even its fitness in the rhizosphere, as reported for *P. putida* by Quesada et al. [62].

Finally, given that the PGPR characteristics of *P. atacamensis* EMP42 were evaluated in planta under controlled conditions, the need arises to perform field tests that define its growth promotion capacity under real conditions, which would determine whether the strain could be used as a bioinoculant for crops different than cacti, including those of economic interest.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/microorganisms12081512/s1>, Figure S1: Pan-Core curve, Table S1: Genes involved in the PGPR characteristics of *P. atacamensis* EMP42.

Author Contributions: L.I.S.-V. contributed to the experimentation, bioinformatics and statistical analyses, as well as writing and formatting of the manuscript, M.E.d.I.T.-H. contributed to the writing, discussion, review and correction of the manuscript, J.F.A.-G. contributed to the discussion, review and correction of the manuscript, F.M.-A. contributed with bioinformatic analysis, discussion, review and correction of the manuscript, H.C.R.-S. conceived and designed the study, in addition to performing data analysis, writing, discussion, review and correction of the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by; Convocatorias para el Desarrollo Académico 2022 (UAM-X), project F127; Junta de Andalucía (P20_00047) and Ministerio de Ciencia e Innovación (PID2020-113207GB-I00). L.I. Salinas-Virgen has a PhD scholarship (No. 765704) awarded by CONAHCYT. M.E. de la Torre-Hernandez is a fellow of the CONAHCYT-Researchers for Mexico Program (formerly Cátedras CONAHCYT).

Data Availability Statement: The genome sequence of *P. atacamensis* EMP42 is available in the GenBank database under accession number NZ_CP149965. The raw data are available on the same platform with the accession number SRR29184006. The sequences of cloned 16S rRNA gene have the accession numbers PP838374 and PP838375.

Acknowledgments: The authors thank Terhohuico Nursery for providing the cactus seeds for the experiments.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

- De-Bashan, L.E.; Holguin, G.; Glick, B.R.; Bashan, Y. Bacterias promotoras de crecimiento en plantas para propósitos agrícolas y ambientales. In *Microbiología Agrícola. Hongos, Bacterias, Micro y Macrofauna, Control Biológico, Planta-Microorganismo*; Editorial Trillas: Mexico City, Mexico, 2007; pp. 170–224.
- Sharma, V.; Kaur, J.; Sharma, S. Plant Growth Promoting Rhizobacteria: Potential for sustainable agriculture. *Biot. Veg.* **2020**, *20*, 157–166.
- Zboralski, A.; Filion, M. Genetic factors involved in rhizosphere colonization by phytobeneficial *Pseudomonas* Spp. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **2020**, *18*, 3539–3554. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- de la Torre-Hernández, M.E.; Salinas-Virgen, L.I.; Aguirre-Garrido, J.F.; Fernández-González, A.J.; Martínez-Abarca, F.; Montiel-Lugo, D.; Ramírez-Saad, H.C. Composition, structure, and PGPR traits of the rhizospheric bacterial communities associated with wild and cultivated *Echinocactus platyacanthus* and *Neobuxbaumia polylopha*. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 518239. [[CrossRef](#)]
- Sah, S.; Krishnani, S.; Singh, R. *Pseudomonas* mediated nutritional and growth promotional activities for sustainable food security. *Curr. Res. Microb. Sci.* **2021**, *2*, 100084. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Poblete-Morales, M.; Carvajal, D.; Almasia, R.; Michea, S.; Cantillana, C.; Levican, A.; Silva-Moreno, E. *Pseudomonas atacamensis* sp. nov., isolated from the rhizosphere of desert bloom plant in the region of Atacama, Chile. *Anton. Leeuw.* **2020**, *113*, 1201–1211. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Mafiz, A.I.; He, Y.; Zhang, W.; Zhang, Y. Soil Bacteria in urban community gardens have the potential to disseminate antimicrobial resistance through horizontal gene transfer. *Front. Microbiol.* **2021**, *12*, 771707. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Tohya, M.; Teramoto, K.; Watanabe, S.; Hishinuma, T.; Shimojima, M.; Ogawa, M.; Tada, T.; Tabe, Y.; Kirikae, T. Whole-genome sequencing-based re-identification of *Pseudomonas putida/fluorescens* clinical isolates identified by biochemical bacterial identification systems. *Microbiol. Spectr.* **2022**, *10*, e02491-21. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Lebanese American University—Microbial Pathogenomics Lab ID 1020068—BioProject—NCBI. Available online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA1020068/> (accessed on 21 May 2024).
- Zboralski, A.; Biessy, A.; Ciotola, M.; Cadieux, M.; Albert, D.; Blom, J.; Filion, M. Harnessing the genomic diversity of *Pseudomonas* strains against lettuce bacterial pathogens. *Front. Microbiol.* **2022**, *13*, 1038888. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

11. Elmahi, Y.; Alshamsi, M.S.; Sudalaimuthuasari, N.; Kundu, B.; Almaskari, R.S.; Hazzouri, K.M.; Chandran, S.; Malik, S.S.; Mundra, S.; Amiri, K.M.A. Complete genome sequences of *Pseudomonas atacamensis* strain SM1 and *Pseudomonas toytotomiensis* strain SM2, isolated from the date palm rhizosphere. *Microbiol. Resour. Announc.* **2021**, *10*. [\[CrossRef\]](#)
12. Girard, L.; Lood, C.; Höfte, M.; Vandamme, P.; Rokni-Zadeh, H.; van Noort, V.; Lavigne, R.; De Mot, R. The ever-expanding *Pseudomonas* genus: Description of 43 new species and partition of the *Pseudomonas putida* group. *Microorganisms* **2021**, *9*, 1766. [\[CrossRef\]](#)
13. Dolan, J.R.; Forster, D.; Dunthorn, M.; Bass, D.; Bittner, L.; Boutte, C.; Christen, R.; Claverie, J.; Decelle, J.; Edvardsen, B.; et al. Seedling microbiota engineering using bacterial synthetic community inoculation on seeds. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2024**, *100*, fiae027. [\[CrossRef\]](#)
14. Kaneko, H.; Furuya, T. Draft genome sequences of endophytic *Pseudomonas* strains, isolated from the interior of *Brassicaceae* plants. *Microbiol. Resour. Announc.* **2023**, *12*, e01337-22. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Salinas Virgen, L.I.; De la Torre Hernández, M.E.; Aguirre Garrido, J.F.; Ramírez Saad, H.C. Caracterización molecular de bacterias rizosféricas asociadas a *Echinocactus platyacanthus* en invernadero y silvestres. *Rev. Mex. Cienc. Agrícolas* **2020**, *11*, 531–542. [\[CrossRef\]](#)
16. Salinas-Virgen, L.I. Identificación y Caracterización de la Actividad PGPR de Bacterias Rizosféricas y Endófitas Aisladas de *Echinocactus platyacanthus* (Biznaga Dulce) Creciendo en Condiciones Silvestres y de Invernadero en el Semidesierto Queretano. Master's Thesis, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, Mexico City, Mexico, 2019.
17. Green, M.R.; Sambrook, J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 4th ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, NY, USA, 2012.
18. Yoon, S.H.; Ha, S.M.; Kwon, S.; Lim, J.; Kim, Y.; Seo, H.; Chun, J. Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2017**, *67*, 1613–1617. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
19. Jukes, T.H.; Cantor, C.R. Evolution of protein molecules. *Mamm. Protein Metab.* **1969**, *3*, 21–132.
20. Darriba, D.; Taboada, G.L.; Doallo, R.; Posada, D. JModelTest 2: More models, new heuristics and parallel computing. *Nat. Methods* **2012**, *9*, 772. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
21. Tamura, K.; Stecher, G.; Kumar, S. MEGA11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Mol. Biol. Evol.* **2021**, *38*, 3022–3027. [\[CrossRef\]](#)
22. Integrated Microbiome Resource. Available online: <https://imr.bio/protocols.html> (accessed on 15 November 2022).
23. Kearse, M.; Moir, R.; Wilson, A.; Stones-Havas, S.; Cheung, M.; Sturrock, S.; Buxton, S.; Cooper, A.; Markowitz, S.; Duran, C.; et al. Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* **2012**, *28*, 1647. [\[CrossRef\]](#)
24. Darling, A.C.E.; Mau, B.; Blattner, F.R.; Perna, N.T. Mauve: Multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements. *Genome Res.* **2004**, *14*, 1394. [\[CrossRef\]](#)
25. Ha, S.-M.; Kim, C.K.; Roh, J.; Byun, J.-H.; Yang, S.-J.; Choi, S.-B.; Chun, J.; Yong, D. Application of the whole genome-based bacterial identification system, TrueBac ID, using clinical isolates that were not identified with three matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) Systems. *Ann. Lab. Med.* **2019**, *39*, 530–536. [\[CrossRef\]](#)
26. Tatusova, T.; Dicuccio, M.; Badretdin, A.; Chetvernin, V.; Nawrocki, E.P.; Zaslavsky, L.; Lomsadze, A.; Pruitt, K.D.; Borodovsky, M.; Ostell, J. NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, 6614–6624. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
27. Grant, J.R.; Enns, E.; Marinier, E.; Mandal, A.; Herman, E.K.; Chen, C.Y.; Graham, M.; Van Domselaar, G.; Stothard, P. Proksee: In-depth characterization and visualization of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* **2023**, *51*, W484–W492. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
28. Wang, Y.; Coleman-Derr, D.; Chen, G.; Gu, Y.Q. OrthoVenn: A web server for genome wide comparison and annotation of orthologous clusters across multiple species. *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, W78. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
29. Price, M.N.; Dehal, P.S.; Arkin, A.P. FastTree 2—Approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e9490. [\[CrossRef\]](#)
30. Page, A.J.; Cummins, C.A.; Hunt, M.; Wong, V.K.; Reuter, S.; Holden, M.T.G.; Fookes, M.; Falush, D.; Keane, J.A.; Parkhill, J. Roary: Rapid large-scale prokaryote pangenome analysis. *Bioinformatics* **2015**, *31*, 3691–3693. [\[CrossRef\]](#)
31. Nguyen, N.; Hickey, G.; Zerbino, D.R.; Raney, B.; Earl, D.; Armstrong, J.; Haussler, D.; Paten, B. Building a pangenome reference for a population. In *Research in Computational Molecular Biology*; Sharan, R., Ed.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2014; Volume 8394, pp. 207–221, ISBN 9783319052687.
32. Laboratory of Molecular Genetics and Microbiology Methods. *Pseudomonas atacamensis* Strain: MGMM4 (ID 961102)—BioProject—NCBI. Available online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA961102/> (accessed on 22 May 2024).
33. Kenneth, C. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): A bioprotectant bioinoculant for sustainable agrobiolgy. A Review. *Int. J. Adv. Res. Biol. Sci.* **2017**, *4*, 123–142. [\[CrossRef\]](#)
34. Jeyanthi, V.; Kanimozhi, S. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR)—Prospective and mechanisms: A review. *J. Pure Appl. Microbiol.* **2018**, *12*, 733–749. [\[CrossRef\]](#)
35. Bhat, M.A.; Mishra, A.K.; Jan, S.; Bhat, M.A.; Kamal, M.A.; Rahman, S.; Shah, A.A.; Jan, A.T. Plant Growth Promoting Rhizobacteria in plant health: A perspective study of the underground interaction. *Plants* **2023**, *12*, 629. [\[CrossRef\]](#)
36. Hernández-Hernández, E.J.; Hernández-Ríos, I.; Almaraz-Suarez, J.J.; López-López, A.; Torres-Aquino, M.; Morales Flores, F.J. Caracterización in vitro de rizobacterias y su antagonismo con hongos causantes del damping off en chile. *Rev. Mex. Cienc. Agrícolas* **2018**, *9*, 525–537. [\[CrossRef\]](#)

37. Bourahla, M.; Djebbar, R.; Kacy, Y.; Abrous-Belbachir, O. Alleviation of Bleaching Herbicide Toxicity by PGPR Strain Isolated from Wheat Rhizosphere. *Ann. Oradea Univ. Biol. Fascicle* **2018**, *25*, 74–83.
38. Sarkar, B.; Kumar, C.; Pasari, S.; Goswami, B.; Kumar Koshariya, A. Review on *Pseudomonas fluorescens*: A Plant Growth Promoting Rhizobacteria. *J. Posit. Sch. Psychol.* **2022**, *2022*, 2701–2709.
39. Świątczak, J.; Kalwasińska, A.; Brzezinska, M.S. Plant Growth–Promoting Rhizobacteria: *Peribacillus frigoritolerans* 2RO30 and *Pseudomonas sivasensis* 2RO45 for their effect on canola growth under controlled as well as natural conditions. *Front. Plant Sci.* **2023**, *14*, 1233237. [\[CrossRef\]](#)
40. Jagtap, R.R.; Mali, G.V.; Waghmare, S.R.; Nadaf, N.H.; Nimbalkar, M.S.; Sonawane, K.D. Impact of Plant Growth Promoting Rhizobacteria *Serratia nematodiphila* RGK and *Pseudomonas plecoglossicida* RGK on secondary metabolites of turmeric rhizome. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **2023**, *47*, 102622. [\[CrossRef\]](#)
41. Uzma, M.; Iqbal, A.; Hasnain, S. Drought tolerance induction and growth promotion by indole acetic acid producing *Pseudomonas aeruginosa* in *Vigna radiata*. *PLoS ONE* **2022**, *17*, e0262932. [\[CrossRef\]](#)
42. Abbaszadeh-Dahaji, P.; Atajan, F.A.; Omidvari, M.; Tahan, V.; Kariman, K. Mitigation of copper stress in maize (*Zea mays*) and sunflower (*Helianthus annuus*) plants by copper-resistant *Pseudomonas* strains. *Curr. Microbiol.* **2021**, *78*, 1335–1343. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
43. Kang, S.-M.; Adhikari, A.; Lee, K.-E.; Park, Y.-G.; Shahzad, R.; Lee, I.-J. Gibberellin producing rhizobacteria *Pseudomonas koreensis* MU2 enhance growth of lettuce (*Lactuca sativa*) and chiese cabbage (*Brassica rapa*, Chinensis). *J. Microbiol. Biotech. Food Sci.* **2019**, *9*, 166–170. [\[CrossRef\]](#)
44. Kalleku, J.N.; Ihsan, S.; Al-Azzawi, T.N.I.; Khan, M.; Hussain, A.; Chebitok, F.; Das, A.K.; Moon, Y.S.; Mun, B.G.; Lee, I.J.; et al. Halotolerant *Pseudomonas koreensis* S4T10 mitigate salt and drought stress in *Arabidopsis thaliana*. *Physiol. Plant.* **2024**, *176*, e14258. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
45. Rolón-Cárdenas, G.A.; Arvizu-Gómez, J.L.; Pacheco-Aguilar, J.R.; Vázquez-Martínez, J.; Hernández-Morales, A. Cadmium-tolerant endophytic *Pseudomonas rhodesiae* strains isolated from *Typha latifolia* modify the root architecture of *Arabidopsis thaliana* col-0 in presence and absence of Cd. *Braz. J. Microbiol.* **2021**, *52*, 349–361. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
46. Singh, P.; Singh, R.K.; Zhou, Y.; Wang, J.; Jiang, Y.; Shen, N.; Wang, Y.; Yang, L.; Jiang, M. Unlocking the strength of Plant Growth Promoting *Pseudomonas* in improving crop productivity in normal and challenging environments: A review. *J. Plant Interact.* **2022**, *17*, 220–238. [\[CrossRef\]](#)
47. Jiménez-Sierra, C.L.; Eguiarte, L.E. Candy barrel cactus (*Echinocactus platyacanthus* Link & Otto: A traditional plant resource in Mexico subject to uncontrolled extraction and browsing. *Econ. Bot.* **2010**, *64*, 99–108. [\[CrossRef\]](#)
48. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección Ambiental-Especies Nativas de México de Flora y Fauna Silvestres-Categorías de Riesgo y Especificaciones para su Inclusión, Exclusión o Cambio-Lista de Especies en Riesgo; Diario Oficial de la Federación; Secretaría de Gobernación: Mexico City, Mexico, 2010.
49. Sánchez-Salas, J.; Jurado, E.; Flores, J.; Estrada-Castillón, E.; Muro-Pérez, G. Desert species adapted for dispersal and germination during floods: Experimental evidence in two *Astrophytum* species (Cactaceae). *Flora Morphol. Distrib. Funct. Ecol. Plants* **2012**, *207*, 707–711. [\[CrossRef\]](#)
50. Mascot-Gómez, E.; Flores, J.; López-Lozano, N.E.; Yáñez-Espinosa, L. Seed germination of southern Chihuahuan desert cacti: Effect of mucilage, light and phytohormones. *Flora* **2020**, *263*, 151528. [\[CrossRef\]](#)
51. Puente, M.-E.; Bashan, Y.; Puente, M.; Bashan, A. Effect of inoculation with *Azospirillum brasilense* strains on the germination and seedlings growth of the giant columnar cardon cactus (*Pachycereus pringlei*). *Symbiosis* **1993**, *15*, 49–60.
52. Chávez-Ambriz, L.A.; Hernández-Morales, A.; Cabrera-Luna, J.A.; Luna-Martínez, L.; Pacheco-Aguilar, J.R. Aislados de *Bacillus* provenientes de la rizósfera de cactus incrementan la germinación y la floración en *Mammillaria* Spp. (Cactaceae). *Rev. Argent. Microbiol.* **2016**, *48*, 333–341. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
53. Batista, B.D.; Dourado, M.N.; Figueredo, E.F.; Hortencio, R.O.; Marques, J.P.R.; Piotto, F.A.; Bonatelli, M.L.; Settles, M.L.; Azevedo, J.L.; Quecine, M.C. The auxin-producing *Bacillus thuringiensis* RZ2MS9 promotes the growth and modifies the root architecture of tomato (*Solanum lycopersicum* Cv. Micro-Tom). *Arch. Microbiol.* **2021**, *203*, 3869–3882. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
54. Santiago-Sandoval, I.A.; Rosas-López Ulises, Y. Variación natural de la arquitectura de la raíz de *Mammillaria haageana* Pfeiff. In *Avances Internacionales de Cactáceas y Suculentas Manejo y Conservación ante el Cambio Global*; CINVESTAV: Mexico City, Mexico, 2019; pp. 22–26.
55. Singh, P.; Singh, R.K.; Guo, D.J.; Sharma, A.; Singh, R.N.; Li, D.P.; Malviya, M.K.; Song, X.P.; Lakshmanan, P.; Yang, L.T.; et al. Whole genome analysis of sugarcane root-associated endophyte *Pseudomonas aeruginosa* B18—A Plant Growth-Promoting Bacterium with antagonistic potential against *Sporisorium scitamineum*. *Front. Microbiol.* **2021**, *12*, 628376. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
56. Vega Celedón, P.; Martínez, H.; Vergara, M.; Seeger, M. Biosíntesis de ácido indol-3-acético y promoción del crecimiento de plantas por bacterias. *Cultiv. Trop.* **2016**, *37*, 33–39.
57. Monds, R.D.; Newell, P.D.; Schwartzman, J.A.; O'Toole, G.A. Conservation of the *pho* regulon in *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1. *Appl. Environ. Microbiol.* **2006**, *72*, 1910–1924. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
58. Kang, S.M.; Asaf, S.; Khan, A.L.; Lubna; Khan, A.; Mun, B.G.; Khan, M.A.; Gul, H.; Lee, I.J. Complete genome sequence of *Pseudomonas psychrotolerans* CS51, a Plant Growth-Promoting Bacterium, under heavy metal stress conditions. *Microorganisms* **2020**, *8*, 382. [\[CrossRef\]](#)

59. Franza, T.; Mahé, B.; Expert, D. *Erwinia chrysanthemi* requires a second iron transport route dependent of the siderophore achromobactin for extracellular growth and plant infection. *Mol. Microbiol.* **2005**, *55*, 261–275. [[CrossRef](#)]
60. Srivastava, P.; Sahgal, M.; Sharma, K.; El Enshasy, H.A.; Gafur, A.; Alfarraj, S.; Ansari, M.J.; Sayyed, R.Z. Optimization and identification of siderophores produced by *Pseudomonas Monteilii* strain MN759447 and its antagonism toward fungi associated with mortality in *Dalbergia sissoo* plantation forests. *Front. Plant Sci.* **2022**, *13*, 984522. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Schneider, C.L. Bacteriophage-mediated horizontal gene transfer: Transduction. *Bacteriophages Biol. Technol. Ther.* **2021**, *2*, 151–192. [[CrossRef](#)]
62. Quesada, J.M.; Soriano, M.I.; Espinosa-Urgel, M. Stability of a *Pseudomonas putida* KT2440 bacteriophage-carried genomic island and its impact on rhizosphere fitness. *Appl. Environ. Microbiol.* **2012**, *78*, 6963. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Complete genome of the opportunistic pathogen *Nocardia vulneris* strain LPB4002 and its biosynthetic potential

Authors

Janette González-Nava¹, Leilani I. Salinas-Virgen², Horacio Sandoval-Trujillo^{3†}, Ma. Eugenia de la Torre-Hernández^{3,4}, Hugo Ramírez-Saad^{3#}

¹ Estancias Posdoctorales por México, CONAHCYT - UAM-Xochimilco

² Doctorado en Ciencias Agropecuarias, UAM-Xochimilco

³ Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana - Xochimilco, 04969, Mexico City, Mexico

⁴ Investigadores por México, CONAHCYT - UAM-Xochimilco

Running Head: Complete genome of *Nocardia vulneris* strain LPB4002

Corresponding author's email address

#Hugo Ramírez-Saad, hurasa@correo.xoc.uam.mx

†Deceased.

Horacio Sandoval-Trujillo contributed equally to this work.

Abstract

The complete genome sequence of the opportunistic pathogen *Nocardia vulneris* is reported. The strain *N. vulneris* LPB4002 was isolated from a clinical sample of a patient with actinomycetoma. The reported genome comprises a single 9,49 Mb closed chromosome, with 8,584 protein-coding genes and 68% GC content.

Announcement

Nocardia is a genus within the Class *Actinomycetes*, which contains species that are considered pathogenic. Some opportunistic species like *N. wallacei* and *N. vulneris* mainly affect immunosuppressed patients (1-3). Furthermore, *Actinomycetes* are a source of secondary metabolites with diverse biological activities. *Actinomycetes*

have a large number of secondary metabolite biosynthetic gene clusters (BGC) (4). The most studied BGC are the polyketide synthase systems (PKS), and the non-ribosomal polyketide synthases (NRPS) (5).

Nocardia vulneris LPB4002 was isolated from a patient with actinomycetoma, and remained for 35 years as part of the strain collection of the “Laboratorio de Productos Biológicos”, at UAM- Xochimilco, Mexico. Most members of this series remained unidentified until recently, when some of them were identified by 16S rRNA gene sequencing using the primers 27F and 1492R (27F:5’AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3’), (1492R:5’-TACGGYTACCTTGTTAYGACTT-3’) (6). Strain LPB4002 showed 99.72% similarity and 99% coverage with *N. vulneris* strain NBRC108936^T, according to the 16S-based ID tool of the EzBioCloud web server (7). Due to the detection of PKS and NRPS systems in genomic DNA of the strain PPB4002, and the absence of similar BGC reported the 2 available genome sequences of *N. vulneris*, it was decided to sequence its genome.

N. vulneris strain LPB4002 was grown in Sabouraud agar medium at 37°C under aerobic conditions for 15 days. The genomic DNA was extracted with the Isolate II genomic DNA kit (BIOLINE, Cat.BIO-52066) following the manufacturer's protocol. Whole genome sequencing was performed at Plasmidsaurus (Eugene, OR, USA), using the Oxford Nanopore Technology platform (<https://www.plasmidsaurus.com/index/>), in a PromethION 24 device. The Library Prep Kit SQKRBK114.96 kit (ONT) was used, with minimal fragmentation (no ligation, no shearing, and no size DNA selection) of the genomic DNA, that was loaded in a sequence independent-manner, in an R10.4.1 flow cell, obtaining >99% data. Base calling was done with ONT Dorado-for-PromethION v7.1.4, on super-accurate mode. Raw reads with Qscore <10 were filtered, and adapters were trimmed by ONT software. The *de novo* genome assembly was done with Flye v2.9.1 (8), as implemented in Geneious Prime (2024.0.4), under the default parameters set by Geneiuos. The values of N50 and L50 were obtained. Genome annotations were done with the PGAP version 6.6 (9).

Genome sequencing of *N. vulneris* strain LPB4002 produced 305,972 reads with an average length of 1,980bp, Q30 of 74.9% according to the Phred factor, and a 60x coverage. A single closed contig of 9,489,173bp with 68%GC content was obtained, the N50 value was equivalent to the length of the contig (9.48Mbp), and L50=1. The total number of protein-coding genes was 8,583, with 3 RNA operons, containing 50

tRNA genes. The genome of *N. vulneris* has 48 putative biosynthetic genes for PKS and NRPS.

Data availability

The genome sequence of *Nocardia vulneris* strain LPB4002 was deposited in GenBank at the

following sections: WGS with accession number CP146527 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/CP146527.1/>), BioProject accession number PRJNA1080626 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA1080626>), BioSample accession number SAMN40143144 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/biosample/SAMN40143144>), and for the assembly the accession GCA_037081825.1 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/GCF_037081825.1/). The accession number for the 16S rRNA gene sequence is PQ043844.

Acknowledgments

Janette González Nava is fellow from the CONAHCYT program “Estancias Posdoctorales por México” with fellowship number 642931.

Ma. Eugenia de la Torre-Hernández is fellow from the CONAHCYT program “Investigadores por México”, formerly called “Cátedras por México”.

References

1. Martínez-Barricarte R. 2020. Isolated nocardiosis, an unrecognized primary immunodeficiency? Front Immunol 11:590239.
2. Qiu F, Ma Z, Zhong R, Huang H, Wang Y, Liu H. 2022. Case report: disseminated nocardiosis caused by *Nocardia vulneris* in a patient with macroglobulinemia. Front Public Health 10:866420.
3. Lasker BA, Bell M, Klenk HP, Spröer C, Schumann C, Schumann P, Brown JM. 2014.

Nocardia vulneris sp. nov., isolated from wounds of human patients in North America. Anton Leeuw 106:543–553.

4. Al-Shaibani MM, Radin Mohamed RMS, Sidik NM, Enshasy HAE, Al-Gheethi A, Noman E, AlMekhlafi NA, Zin NM. 2021. Biodiversity of secondary metabolites compounds isolated from phylum Actinobacteria and its therapeutic applications. *Molecules (Switzerland)* 26(15):504.
5. Sharma P, Thakur D. 2020. Antimicrobial biosynthetic potential and diversity of culturable soil actinobacteria from forest ecosystems of northeast India. *Sci Rep* 10(1):4104.
6. Johnson JS, Spakowicz DJ, Hong BY, Petersen LM, Demkowicz P, Chen L, Leopold SR, Hanson BM, Agresta HO, Gerstein M, Sodergren E, Weinstock GM. 2019. Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. *Nat Commun* 10:5029.
7. Yoon SH, Ha SM, Kwon S, Lim J, Kim Y, Seo H, Chun J. 2017. Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *Int J Syst Evol Microbiol* 67:1613–1617.
8. Kolmogorov M, Yuan J, Lin Y, Pevzner PA. 2019. Assembly of long, error-prone reads using repeat graphs. *Nat Biotechnol* 37(5):540-546.
9. Li W, O'Neill KR, Haft DH, DiCuccio M, Chetvernin V, Badretdin A, Coulouris G, Chitsaz F, Derbyshire MK, Durkin AS, Gonzales NR, Gwadz M, Lanczycki CJ, Song JS, Thanki N, Wang J, Yamashita RA, Yang M, Zheng C, Marchler-Bauer A, Thibaud-Nissen F. 2021. RefSeq: expanding the Prokaryotic Genome Annotation Pipeline reach with protein family model curation. *Nucleic Acids Res* 49(D1): D1020-D1028.

Artículo enviado a la revista Microbiology Resource Announcements bajo el siguiente estatus:

Stage	Start Date
With Editor - No Decision Yet	2024-07-30 11:34:53
Referred to Editor	2024-07-30 11:34:53
Initial QC	2024-07-29 15:38:49
Manuscript Submission Incomplete	2024-07-29 13:23:18

Certificado de asistencia

WINTER SCHOOL Y WINTER GENOMICS CERTIFICAN QUE

Leilani Salinas Virgen

ha completado exitosamente el curso

"Ensamblado y anotación de Genomas Bacterianos"

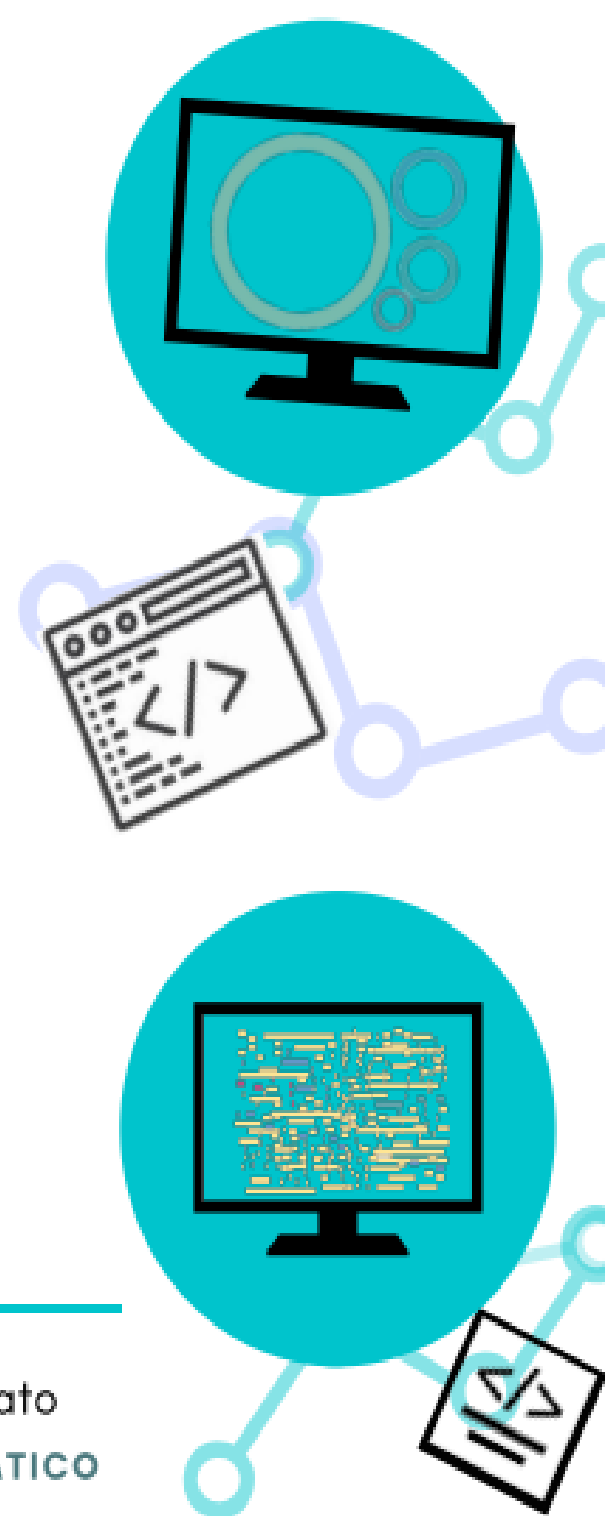
los días 12 y 13 de diciembre 2019, con una duración total de 20 horas



Dr. Ryosuke Watanabe
CEO WINTER GENOMICS



Dra. Violeta Larios Serrato
CONSULTOR BIOINFORMÁTICO





03.02.2020

Leilani Itzel Salinas Virgen

completó con éxito

Introducción a Data Science: Programación Estadística con R

un curso en línea sin crédito autorizado por Universidad Nacional Autónoma de México
y ofrecido a través de Coursera

Carlos Ernesto López Natarén
Técnico Académico
Instituto de Física

COURSE CERTIFICATE



Verifícalo en coursera.org/verify/D92S3RLBFX85

Coursera confirmó la identidad de esta persona y su
participación en el curso.



Nov 16, 2023

Leilani Itzel Salinas Virgen

completó con éxito

**Whole genome sequencing of bacterial genomes -
tools and applications**

un curso en línea sin crédito autorizado por Technical University of Denmark (DTU) y
ofrecido a través de Coursera

A handwritten signature in black ink, reading 'Lina Covaco'.

Lina Covaco

A handwritten signature in black ink, reading 'Pimlapas Leekitcharoenphon'.

Pimlapas Leekitcharoenphon
PostDoc
Research Group for Genomic Epidemiology, DTU Food

**COURSE
CERTIFICATE**



Verify at:

<https://coursera.org/verify/XXBG5JWMQH82>

Coursera confirmó la identidad de esta persona y su
participación en el curso.



Casa abierta al tiempo
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
METROPOLITANA

DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS



Otorgan la presente

CONSTANCIA

A: Leilani Itzel Salinas Virgen

Por su asistencia al:

Curso-Taller

“Cromatografía de líquidos de alta resolución aplicada a cuantificar fármacos y marcadores químicos en extractos herbales estandarizados”

Impartido en la Sala de Juntas del UIDIS (P.B.) y Área Instrumental de uso común del Departamento de Sistemas Biológicos, los días 20 y 21 de febrero de 2024, con una duración de 14 horas.

Dra. Liliana Schifter Aceves
Jefa del Departamento de
Sistemas Biológicos

Dr. Abraham Faustino Vega
Miembro del Comité Organizador

M. En C. Marcela Hurtado y
de la Peña
Miembro del
Comité Organizador

Dr. Carlos Tomás Quirino Barreda
Miembro del
Comité Organizador

QFB. Gustavo Rocha Ceballos
Miembro del
Comité Organizador

DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

Jefaturas de Áreas de Investigación



17. CONGRESOS.

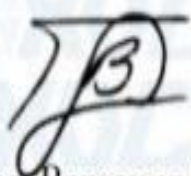
Otorgan la presente **CONSTANCIA** a:

L. I. Salinas Virgen, M. E. de la Torre Hernández, J. F. Aguirre Garrido, H. C. Ramírez-Saad

Por presentar el cartel titulado

“CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA Y MOLECULAR DE BACTERIAS PROMOTORAS
DEL CRECIMIENTO VEGETAL AISLADAS DE LA RIZÓSFERA DE *Echinocactus platyacanthus*”

En el IX Congreso del Departamento de Sistemas Biológicos
Realizado en la Ciudad de México, los días 13 y 14 de octubre de 2022



Dr. Esteban Barranco Florido
Jefe del Departamento de Sistemas Biológicos



M en C Alejandro Palma Ramos
Jefe del Área de Productos Biológicos

15. CONGRESOS

19 de agosto de 2023

A quien corresponda.

Presente

Tenemos el gusto de informarle que el trabajo con folio: **CBI_337** y cuyo título es:

Stenotrophomonas maltophilia P31, bacteria aislada de biznaga dulce, con características promotoras del crecimiento vegetal

de los autores **L. I. Salinas-Virgen, M. E. de la Torre-Hernández, J. F. Aguirre-Garrido y H. C. Ramirez-Saad** ha sido aceptado para presentarse dentro del programa del VIII Congreso Internacional de las Mujeres en las Ciencias, las Humanidades y todas las Disciplinas de manera presencial los días 23, 24 y 25 de agosto de 2023. Más adelante podrá consultar en la página del evento la fecha y el lugar de su ponencia.

Agradecemos ampliamente su aportación y enviándole cordiales saludos, queda de Usted.

ATENTAMENTE
"CASA ABIERTA AL TIEMPO"



Mtra. Gabriela del Valle
Coordinadora General



Dra. Yadira Alatraste
Miembro del Comité Organizador



Dr. Inti Pineda
Miembro del Comité Organizador

21 de agosto de 2023

A quien corresponda.

Presente

Tenemos el gusto de informarle que el trabajo con folio: **CBI_345** y cuyo título es:

**Efecto promotor del crecimiento vegetal de Pseudomonas atacamensis P42
sobre semillas y plántulas de Echinocactus platyacanthus**

de las autoras **Lluvia Isabel García Córdoba, Leilani Itzel Salinas Virgen, María Eugenia de la Torre Hernández y Hugo César Ramírez Saad** ha sido aceptado para presentarse dentro del programa del VIII Congreso Internacional de las Mujeres en las Ciencias, las Humanidades y todas las Disciplinas de manera presencial los días 23, 24 y 25 de agosto de 2023. Más adelante podrá consultar en la página del evento la fecha y el lugar de su ponencia.

Agradecemos ampliamente su aportación y enviándole cordiales saludos, queda de Usted.

ATENTAMENTE
"CASA ABIERTA AL TIEMPO"



Mtra. Gabriela del Valle
Coordinadora General



Dra. Yadira Alatríste
Miembro del Comité Organizador



Dr. Inti Pineda
Miembro del Comité Organizador

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

El comité multidisciplinario y organizador otorgan la presente

CONSTANCIA

a:

Leilani Itzel Salinas Virgen

Por su participación como **ponente** con el tema:

*Stenotrophomonas maltophilia P31, bacteria aislada de biznaga dulce,
con características promotoras del crecimiento vegetal*

En el "VIII Congreso de Avances de las Mujeres en las Ciencias, las Humanidades y todas las disciplinas" Cambio Climático, Educación y Desarrollo Científico.
Celebrado en la Ciudad de México los días 23, 24 y 25 de agosto del 2023,
En la Universidad Autónoma Metropolitana Metropolitana, Unidad Xochimilco.



Mtra. Gabriela del Valle Díaz Muñoz
Coordinadora General



Dr. Inti Pineda Calderón
Comité Multidisciplinario y Organizador

LA SOCIEDAD MEXICANA DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

EXTIENDE LA CONSTANCIA A:

M. EN C. LEILANI ITZEL SALINAS VIRGEN

Por su asistencia al XX Congreso Nacional de Biotecnología y
Bioingeniería

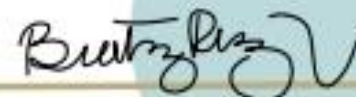
Ixtapa Zihuatanejo, Gro, a 11 - 15 de septiembre del 2023



DRA. ROMINA RODRÍGUEZ SANOJA
PRESIDENTA MDN 2022-2024



DR. LUIS FLORES COTERA
PRESIDENTE DEL CONGRESO



DRA. BEATRIZ RUIZ VILLAFÁN
SECRETARIA MDN 2022-2024



**CONGRESO NACIONAL
DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA**

10 - 15 de
SEPTIEMBRE 2023



LA SOCIEDAD MEXICANA DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

EXTIENDE LA CONSTANCIA A:

L. I. Salinas-Virgen, M. E. de la Torre-Hernández, J. F. Aguirre-Garrido, H. C. Ramírez-Saad

Por su participación en la sesión de carteles con el trabajo:

**EVALUACIÓN IN VITRO E IN PLANTA DE RIZOBACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO
VEGETAL AISLADAS DE ECHINOCACTHUS PLATYACANTHUS**

Ixtapa Zihuatanejo, Gro, a 11 - 15 de septiembre del 2023

DR. ROMINA RODRÍGUEZ SANOJA
PRESIDENTA MDN 2022-2024

DR. LUIS FLORES COTERA
PRESIDENTE DEL CONGRESO

DR. BEATRIZ RUIZ VILLAFÁN
SECRETARIA MDN 2022-2024

LA SOCIEDAD MEXICANA DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

OTORGA LA PRESENTE CONSTANCIA A:

**L. I. Salinas-Virgen, M. E. de la Torre-Hernández, J. F. Aguirre-Garrido, H. C.
Ramírez-Saad**

Por su participación en la sesión de trabajos libres orales con el resumen:

**COMPARACIÓN GENÓMICA DE BACTERIAS DEL GÉNERO STENOTROPHOMONAS CON
DIFERENTES CAPACIDADES PGPR**

del 11 al 15 de septiembre de 2023
Ixtapa Zihuatanejo, Gro.



DRA. ROMINA RODRÍGUEZ SANOJA
PRESIDENTA MDN 2022-2024



DR. LUIS FLORES COTERA
PRESIDENTE DEL CONGRESO



DRA. BEATRIZ RUIZ VILLAFÁN
SECRETARIA MDN 2022-2024



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Xochimilco

Coordinación de la Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica

16. RETRIBUCIÓN SOCIAL

X.DCBS.QFB.128.24

2 de julio de 2024

MCA. Leilani Itzel Salinas Virgen
UAM-Xochimilco
P r e s e n t e.

Asunto: Agradecimiento por impartir temas a Módulo

Por este conducto quiero agradecer a usted su participación al impartir dos temas a los alumnos del módulo 11° Obtención de Metabolitos de Interés Industrial para la Salud.

"Técnicas de Biología Molecular y Genómica". El día 17 de mayo de 2024 relacionado a los contenidos 4.4.3 y 4.4.4

"Organismos Modificados Genéticamente". El día 21 de mayo de 2024 relacionado a los contenidos 4.4.6 y 4.4.7 .

Sin otro particular, reciba un cordial saludo.

A t e n t a m e n t e

CASA ABIERTA AL TIEMPO

Dra. Norma Angélica Noguez Méndez
Coordinadora de la Licenciatura en Q.F.B.



*apm

Ciudad de Mexico a 31 de julio del 2024

A QUIEN CORRESPONDA

CONSTANCIA

Por medio de la presente, se hace constar que Frida Naymee Lira Canseco, alumna de la Licenciatura de Químico Farmacéutico Biotecnólogo (QFBT) de la Universidad del Valle de México (Campus Coyoacán) con número de matrícula 340377017, terminó satisfactoriamente su servicio social en el Laboratorio de Ecología Molecular, Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, en el periodo comprendido entre el 1 de febrero de 2024 y el 31 de julio de 2024.

Durante este periodo, Frida Naymee Lira Canseco desarrolló el trabajo titulado "Estandarización de protocolos para la detección y cuantificación de sideróforos producidos por bacterias PGPR", bajo la supervisión de la M. en C. A. Leilani Itzel Salinas Virgen, Investigadora Doctorante en dicho laboratorio.

Se expide la presente constancia para los fines que la interesada considere pertinentes.

Atentamente



Campus Coyoacán

31 JUL 2024

**Coordinación de
Prácticas Profesionales**
Mtra. Martínez Torres Lourdes Mariana
Coordinadora de campos clínicos y servicio social
Campus UVM-Coyoacán.
55.99.26.00 ext. 34606
lourdes.martinez@uvmnet.edu