

# HONGOS FITOPATÓGENOS MODULAN LA EXPRESIÓN DE LOS GENES ANTIMICROBIANOS *phlD* Y *hcnC* DE LA RIZOBACTERIA *Pseudomonas fluorescens* UM270

PHYTOPATHOGENIC FUNGI MODULATE THE *phlD* AND *hcnC* ANTIMICROBIAL GENES EXPRESSION OF THE RHIZOBACTERIUM *Pseudomonas fluorescens* UM270

Julie E. Hernández-Salmerón<sup>1</sup>, Benjamín R. Hernández-Flores<sup>1</sup>, Ma del Carmen Rocha-Granados<sup>1</sup>, Pedro D. Loeza-Lara<sup>2</sup> y Gustavo Santoyo<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, México. Facultad de Agrobiología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Uruapan, Michoacán, México.

<sup>2</sup> Genómica Alimentaria, Universidad de La Ciénega del Estado de Michoacán de Ocampo, Sahuayo, Michoacán, México.

## RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto antagónico de la rizobacteria promotora del crecimiento vegetal *Pseudomonas fluorescens* UM270 hacia los hongos fitopatógenos *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* y *Rhizoctonia solani*. También, se determinó la expresión de los genes *phlD* y *hcnC* de la cepa UM270 en presencia de los fitopatógenos durante bioensayos de antagonismo *in vitro*. Los resultados muestran que la cepa UM270 logra inhibir el crecimiento del micelio de *B. cinerea* (45%), *F. solani* (25%) y *R. solani* (24%) en diferente grado, mientras que para *F. oxysporum* (1%) no hubo inhibición significativa. Al analizar la expresión del gen *phlD*, se observó que los patógenos la modulan diferencialmente, ya que mientras *B. cinerea* induce su expresión, los demás patógenos la reprimen. En el caso del gen *hcnC*, *B. cinerea* y *F. oxysporum* no afectaron su expresión, mientras que *F. solani* y *R. solani* la inhibieron. Estos resultados sugieren que los fitopatógenos pueden modular la expresión de genes importantes para la síntesis de compuestos antimicrobianos en *Pseudomonas fluorescens* UM270. **Palabras clave:** Biocontrol, 2,4-diacetilfloroglucinol, ácido cianhídrico, rizobacteria.

## ABSTRACT

We evaluated the antagonistic effects of the plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas fluorescens* UM270 against the phytopathogenic fungi *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* and *Rhizoctonia solani*. In addition, we evaluated the expression of the antimicrobial *phlD* and *hcnC* genes of strain UM270 in the presence of phytopathogens. The results show a variable inhibition of the mycelium growth of *B. cinerea* (45%), *F. solani* (25%) and *R. solani* (24%), while *F. oxysporum* (1%) did not inhibit significantly. When analyzing the expression of the *phlD* gene in the bioassays, we found that the fungi differentially modulated this gene. While *B. cinerea* induced its expression, other pathogens repressed it. In the case of the *hcnC* gene, *B. cinerea* and *F. oxysporum* did not affect its expression, while

*F. solani* and *R. solani* repressed it. These results suggest that phytopathogens can modulate the expression of genes important for the synthesis of antimicrobial compounds in *Pseudomonas fluorescens* UM270.

**Key words:** Biocontrol, 2,4-diacetylphloroglucinol, Hydrogen cyanide, rhizobacteria.

## INTRODUCCIÓN

Los cultivos agrícolas son gravemente afectados por hongos fitopatógenos, resultando en grandes pérdidas económicas. La manera más común de combatir las enfermedades causadas por los fitopatógenos es el uso de agroquímicos; sin embargo, es conocido que tales compuestos pueden ser tóxicos para los animales y los humanos, siendo también altamente contaminantes para el ambiente (Adesemoye y Kloepper, 2009). Desde hace décadas, se han buscado estrategias que resulten en menores (o nulas) afectaciones durante el combate de enfermedades vegetales, siendo una opción viable y efectiva el uso de agentes biológicos (Santoyo *et al.*, 2012; Glick, 2014). Así, ha resaltado el uso de bacterias promotoras del crecimiento vegetal o PGPR (por las siglas en inglés de Plant Growth-Promoting Rhizobacteria) por sus capacidades para antagonizar e inhibir el crecimiento de fitopatógenos, y sus efectos nocivos en plantas, mientras que al mismo tiempo, pueden promover de forma directa el crecimiento vegetal. Las actividades de promoción del crecimiento vegetal han sido ampliamente reportados en la literatura, y se han clasificado en mecanismos directos e indirectos (Rashid *et al.*, 2012; Coutinho *et al.*, 2015; Luo *et al.*, 2012; Pandya *et al.*, 2015; Saini *et al.*, 2015; Santoyo *et al.*, 2016). Los mecanismos directos son aquellos en los que las bacterias influyen directamente en el crecimiento de las plantas, ya sea mejorando su nutrición al permitirles adquirir elementos esenciales (como Fe, N o P), modulando los niveles de fitohormonas, o por la síntesis y la excreción de compuestos que potencian la inmunidad de las plantas (Resistencia Sistémica Inducida o ISR) (Ahmad *et al.*, 2008). Los mecanismos indirectos incluyen aquellos en los que las bacterias producen antibióticos con efectos antagónicos

hacia los patógenos de las plantas, tales como fenazinas, lipopéptidos, sideróforos, el 2,4-diacetilfloroglucinol (DAPG) y compuestos volátiles como la dimetilhexadecilamina (DM-HDA) y el ácido cianhídrico (HCN) (Velázquez-Becerra *et al.*, 2013; Hernández-León *et al.*, 2015).

En nuestro laboratorio se aisló y caracterizó la rizo-bacteria *P. fluorescens* UM270, la cual presenta mecanismos directos e indirectos de promoción del crecimiento vegetal (Hernández-León *et al.*, 2015). La bacteria *P. fluorescens* UM270 tiene la capacidad de producir un gran arsenal de metabolitos secundarios (ácido indolacético, biopelículas, sideróforos, y ACC desaminasa entre otros) que cumplen un papel importante en colonizar la rizósfera (Rojas-Solis *et al.*, 2016) y promover el crecimiento de plantas como *Medicago truncatula*, tomate de cáscara verde (*Physalis ixocarpa*), jitomate (*Lycopersicon esculentum*) y diversas berries (Hernández-León *et al.*, 2015; Rojas-Solis *et al.*, 2016), así como actividad de biocontrol contra el hongo *Botrytis cinerea* (Hernández-León *et al.*, 2015).

Dos de los compuestos producidos por la cepa UM270 son el HCN y DAPG. El gen *hcnC* codifica la subunidad C de la sintasa de ácido cianhídrico o HCN sintasa, que cataliza la reacción para la formación del HCN a partir del aminoácido glicina, el cual es un factor de virulencia conocido en las especies de *Pseudomonas* (Laville *et al.*, 1998). Por otra parte, el gen *phlD* forma parte del operón biosintético del compuesto DAPG, un antibiótico ampliamente reportado en el biocontrol de hongos patógenos de plantas (Yang y Cao, 2012). Dentro del operón *phlACBD*, destaca el gen *phlD*, que codifica para una poliquétido sintasa, como principal responsable de la producción de monoacetilfloroglucinol (MAPG), el cual es el precursor directo de 2,4-DAPG mediante una acetilación llevada a cabo por los productos de los genes *phlA*, *phlB* y *phlC* (Banger y Thomashow, 1999). En un análisis reciente del genoma completo de la cepa UM270, se detectaron los operones completos que codifican para la síntesis de DAPG (*phlACBD*) y HCN (*hcnABC*) (Hernández-Salmerón *et al.*, 2016) En el presente trabajo se determinó la actividad inhibitoria de la cepa UM270 en el crecimiento micelial de importantes fitopatógenos de plantas (*B. cinerea*, *F. oxysporum*, *F. solani* y *R. solani*), además de evaluar la expresión relativa de los genes *phlD* y *hcnC* de la cepa UM270 al interactuar con los fitopatógenos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Bioensayos de antagonismo

Se determinaron los cambios en los niveles de expresión de los genes reportados para la síntesis de compuestos antimicrobianos *phlD* y *hcnC* en la cepa UM270 durante la interacción con los hongos fitopatógenos: *B. cinerea*, *F. oxysporum*, *F. solani* y *R. solani*. Los hongos fueron donados por el Laboratorio de Ecología Microbiana del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Para ello, se realizó un ensayo de antagonismo similar al descrito por Santoyo *et al.*, (2010). Se colocaron cuatro discos de micelio de 1 cm de diámetro de

cada uno de los hongos en puntos equidistantes del centro de una caja de Petri, y se incubó por 24 h previo a la inoculación de la bacteria UM270, que fue crecida previamente en caldo nutritivo (Sigma) hasta una D.O. 1.0 a  $\lambda$  590 nm. La cepa UM270 fue inoculada formando dos diámetros perpendiculares. Para este ensayo se realizó sobre agar nutritivo (AN) y agar dextrosa papa (ADP) a una concentración de 50%. Se incubaron 24 h a 28°C en obscuridad y, transcurrido este tiempo, se midió el diámetro de las colonias de los patógenos, los cuales cumplieron 48 h en el medio. Se determinó el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de acuerdo a la siguiente fórmula: % de inhibición del crecimiento =  $[(A_m - A_t) / A_m] \times 100$ , donde  $A_m$  es el área micelial de control y  $A_t$  es el área micelial con tratamiento (Hernández-León *et al.*, 2015).

### Análisis de expresión

Una vez mididos los diámetros del micelio en los bioensayos de antagonismo, se procedió a recuperar las colonias bacterianas de la caja, cada una por separado, y se aisló el ARN genómico de la cepa UM270 empleando el reactivo TRI REAGENT® (Sigma). A partir del ARN se sintetizó el ADN codificante (ADNc), siguiendo las instrucciones del Kit comercial GoScript™ Reverse Transcription System (Promega). Posteriormente, se amplificaron los genes de interés mediante una PCR semi-cuantitativa, para lo cual, se emplearon los oligonucleótidos *Phl2a* (5'-GAGGACGTCGAAGACCACCA-3') y *Phl2b* (5'-ACCGCAGCATCGTGATGAG-3') para el gen *phlD* (Raaijmakers y Weller, 2001) 4-diacetylphloroglucinol (*Phl*, y *HcnC* (5'-GCGGGGTGATTTCTTTCGG-3') y *RhcnC* (5'-GTACAGCGCGTTGGATTGC-3') para el gen *hcnC* del complejo de la sintasa de HCN. (ID de la secuencia en GenBank: CP000094.2). Como gen control, de expresión constitutiva, se amplificó la región V1-V3 (500 pb) del gen ribosomal 16S, empleando los oligos FD1 (5'-CCTGGGATTCACCCCTGAC-3') (Weisburg *et al.*, 1991) y P2 (5'-CGGTATCCGGAGAAGAAGCC-3') (Muyzer *et al.*, 1993). Se realizó la PCR semi-cuantitativa eliminando el ciclo de extensión final para medir la expresión relativa en la fase exponencial de la amplificación.

Finalmente, se compararon los niveles de expresión de los genes amplificados de UM270 en presencia y ausencia de los fitopatógenos. Para la estimación estadística se utilizó la prueba de Duncan, con una  $p < 0.05$  y una  $n = 3$ , la cual se realizó en el paquete IBM SPSS Statistics (Statistical Package for the Social Sciences versión 24.0).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de los experimentos de antagonismo mostraron diferencias en cuanto al crecimiento y morfología del micelio de los cuatro hongos cultivados en presencia de *P. fluorescens* UM270. En el caso de la interacción con *B. cinerea*, se observó el mayor efecto de inhibición, alcanzando hasta 45% (Fig. 1). Para *F. solani* y *R. solani*, se presentó una inhibición de 25 y 24% respectivamente. Mientras que no se observó un efecto antagonístico sobre el crecimiento de *F. oxysporum*.

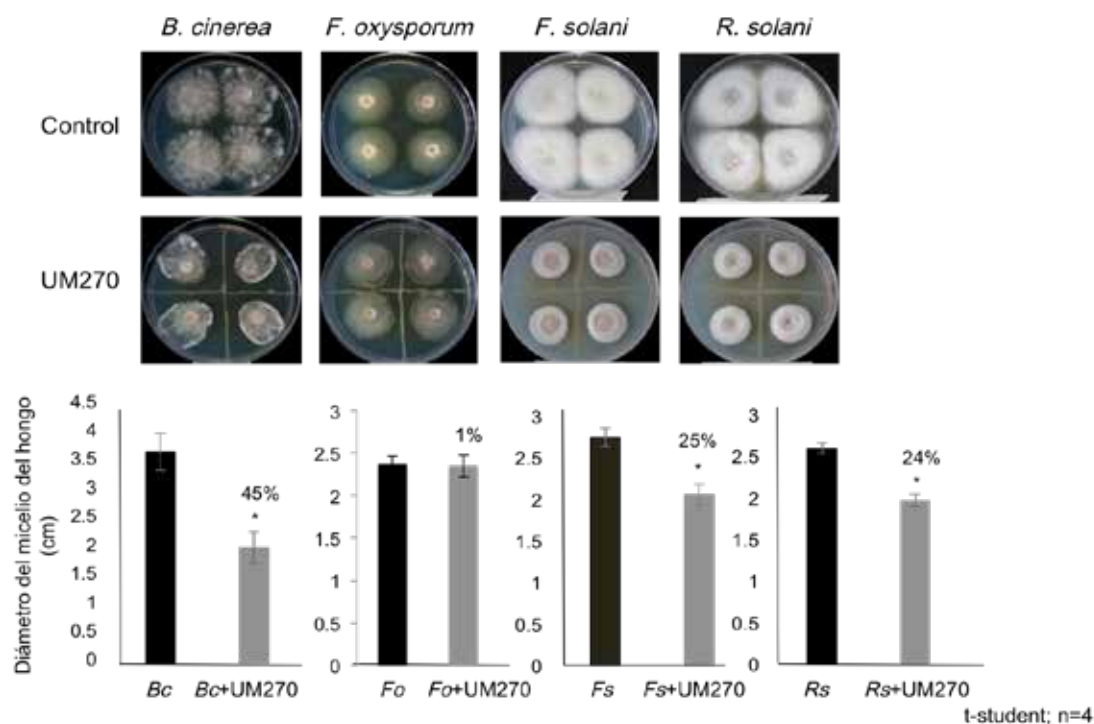
Estos resultados concuerdan con otros trabajos donde

se ha observado que cepas de *Pseudomonas* pueden inhibir en diferente grado el crecimiento de bacterias y hongos fitopatógenos (Santoyo *et al.*, 2010; Duke *et al.*, 2017; Habibi *et al.*, 2017; Sun *et al.*, 2017). Los modos de acción de estas *Pseudomonas* pueden ser explicados a través de mecanismos directos e indirectos, y que existe una acción sinérgica de múltiples compuestos contra patógenos de las plantas. Por ejemplo, *Serratia plymuthica* mostró múltiples mecanismos de acción en el control de *B. cinerea* y *Sclerotinia sclerotiorum* (Kamensky *et al.*, 2003). De forma similar, *Pseudomonas brassicacearum* cepa J12 produjo diversos metabolitos antifúngicos contra *Ralstonia solanacearum* (Zhou *et al.*, 2012) y *Pseudomonas chlororaphis* Pa40 exhibió múltiples modos de supresión contra *Rhizoctonia cerealis* (Jiao *et al.*, 2013). En particular, la cepa UM270 en estudios previos ha mostrado que produce diversos metabolitos antifúngicos, tales como fenazinas, sideróforos, compuestos orgánicos volátiles como la dimethylhexadecylamine (DMHDA), dimetil disulfuro (DMDS) y el cianuro de hidrógeno o ácido cianhídrico (HCN), los cuales podrían estar involucrados en la inhibición del crecimiento del micelio de *B. cinerea*, *F. solani* y *R. solani* (Hernández-León *et al.*, 2015).

Con respecto al fitopatógeno *F. oxysporum*, la cepa UM270 no mostró efecto inhibitorio sobre el crecimiento

del micelio. Este efecto diferencial de antagonismo ha sido observado por Hernández-León y colegas (2015), al estudiar cuatro cepas de *Pseudomonas fluorescens*, incluyendo la UM270. Estos autores encontraron diferentes grados de efecto antagónico contra fitopatógenos como *Diaporthe phaseolorum* y *Colletotrichum lindemuthianum*. Esto demostró que un agente antagonista no siempre es capaz de biocontrolar múltiples fitopatógenos y, pueden requerirse varios agentes de biocontrol, específicos para cada fitopatógeno. Adicionalmente, otros factores bióticos (resistencia de fitopatógenos) y abióticos (condiciones ambientales) podrían influir sobre los niveles de eficiencia de biocontrol en condiciones de invernadero o de campo (Santoyo *et al.*, 2017).

El compuesto DAPG, así como el volátil HCN, son dos de los compuestos comúnmente producidos por *Pseudomonas* y que han sido asociados con actividades antifúngicas y de biocotrol de patógenos de plantas (Raaijmakers y Weller, 2001; Haas y Défago, 2005). Por lo tanto, en este estudio nos enfocamos en analizar la expresión de los genes *phlD* y *hcnC*, con el fin de determinar si los fitopatógenos poseen mecanismos de regulación que afecten la expresión de genes antimicrobianos en antagonistas bacterianos, como la cepa UM270.



**Figura 1.** Ensayo de inhibición *in vitro* hacia hongos fitopatógenos por la cepa *P. fluorescens* UM270. El panel superior muestra el crecimiento de los hongos en interacción con *P. fluorescens* UM270 o sin la presencia de la bacteria (Control). Las gráficas del panel inferior muestran el porcentaje de inhibición con respecto a los controles. Bc, *Botrytis cinerea*; Fo, *Fusarium oxysporum*; Fs, *Fusarium solani*; Rs, *Rhizoctonia solani*. T-student  $p < 0,05$ ,  $n = 4$ .

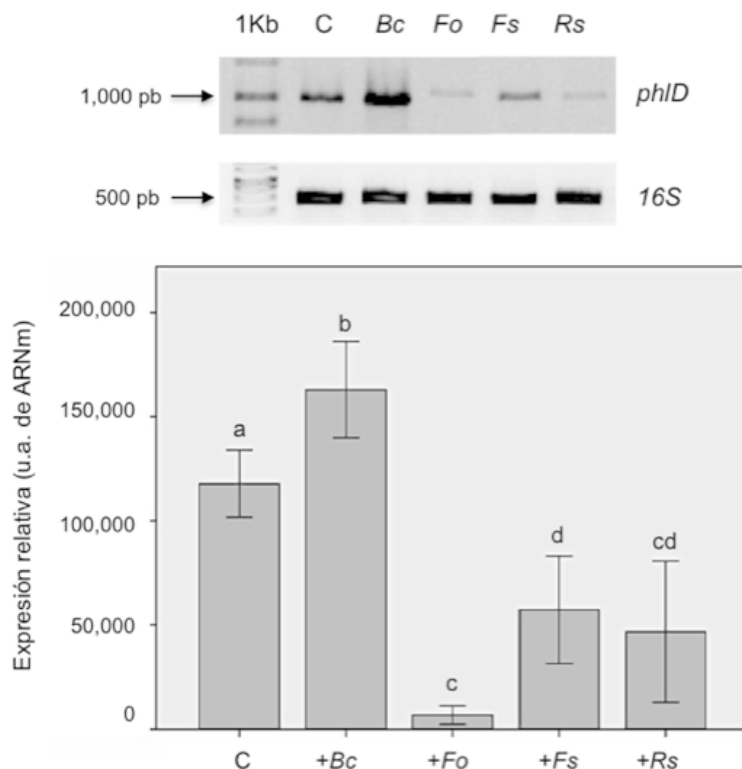
**Figure 1.** In vitro inhibition assay for phytopathogenic fungi by strain *P. fluorescens* UM270. The upper panel shows the growth of the fungi in interaction with *P. fluorescens* UM270 or without bacteria (Control). The graphs in the lower panel show the percentage of inhibition with respect to controls. Bc, *Botrytis cinerea*; Fo, *Fusarium oxysporum*; Fs, *Fusarium solani*; Rs, *Rhizoctonia solani*. T-student  $p < 0,05$ ,  $n = 4$ .

En la figura 2 se presenta el resultado correspondiente a la expresión del gen *phlD* de *P. fluorescens* UM270 en presencia de los fitopatógenos. Se puede observar un incremento en la expresión del gen *phlD* en interacción con *B. cinerea*, mientras que en presencia de los demás fitopatógenos (*F. oxysporum*, *F. solani* y *R. solani*) fue reducida, comparada con el experimento control. Interesantemente, *F. oxysporum* reprimió casi totalmente la expresión de *phlD*, por lo que este resultado sugiere que los hongos fitopatógenos utilizados modulan de forma diferencial la expresión de *phlD* en *P. fluorescens* UM270.

Con respecto a la determinación de la expresión relativa del gen *hcnC* de UM270, se observó una tendencia al incremento en contacto con el hongo *B. cinerea*, aunque no fue significativa. Los niveles de ARNm de este gen con respecto al resto de especies de hongos fue ligeramente menor, aunque significativamente diferente en presencia de *F. solani*, donde incluso se observa que fue reprimida la expresión del gen (*hcnC*), comparado con el control. Con el resto de los hongos no se observan diferencias significativas, aunque sí se advierten niveles bajos en la expresión, lo cual puede sugerir que la expresión de este gen está siendo modulado por la presencia de los hongos fitopatógenos (Figura 3).

Si bien se han realizado estimaciones por PCR sobre la expresión de los genes *hcnC* y *phlD* en *Pseudomonas*

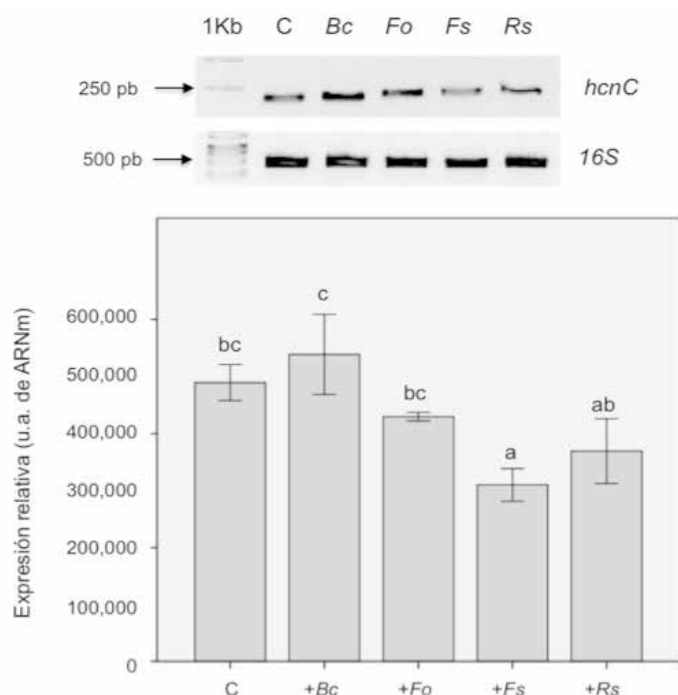
spp., éstas sólo se han determinado a diferentes tiempos de crecimiento de la bacteria (De Coste *et al.*, 2011), y no se han determinado niveles de expresión en presencia de hongos fitopatógenos. Cabe mencionar que el compuesto 2,4-DAPG se ha reportado como una posible molécula señal que induce la expresión de algunos genes de la bacteria *Azospirillum*, importantes en la promoción del crecimiento vegetal (Combes-Meynet *et al.*, 2011), lo cual es viable por su bajo peso molecular y a que tiene efecto a bajas concentraciones. En diversos fitopatógenos que habitan el suelo se conoce que pueden censar la presencia de la planta antes de establecer un contacto físico, posiblemente a través del reconocimiento de los exudados de la raíz. Por lo tanto, los hongos poseen mecanismos de señalización que les permiten detectar señales ambientales y responder mediante cambios en la expresión de sus genes, incluyendo aquellos que conducen no solo a reconocer a su hospedador, también a sobrepasar sus defensas, proliferar dentro de su tejido y establecer la enfermedad (Prieto *et al.*, 2003). Estudios en una amplia gama de hongos patógenos, incluyendo *F. oxysporum*, demostraron que dos cascadas de transducción de señales están conservadas durante la regulación del desarrollo y la virulencia de hongos: una cascada dependiente de cAMP/PKA y una cascada de proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK) (Lengeler *et al.*, 2000). En el caso de



**Figura 2.** Expresión relativa del gen *phlD* en UM270 en interacción con hongos fitopatógenos. A) Gel de agarosa al 2% que muestra las bandas correspondientes al gen *phlD* de un tamaño de 1000 pb en cada una de las condiciones probadas, así como el gen endógeno 16S, región v1-v3 (500 pb). B) Gráficas de expresión relativa, prueba de Duncan  $p < 0.05$ ,  $n = 3$ . Bc, *Botrytis cinerea*; Fo, *Fusarium oxysporum*; Fs, *Fusarium solani*; Rs, *Rhizoctonia solani*.

**Figure 2.** Relative expression of the *phlD* gene in UM270 in interaction with phytopathogenic fungi. A) 2% agarose gel showing the bands corresponding to the *phlD* gene of a size of 1000 bp in each of the conditions tested, as well as the endogenous gene 16S, region v1-v3 (500 bp). B) Graphs of relative expression, Duncan's test  $p < 0.05$ ,  $n = 3$ . Bc, *Botrytis cinerea*; Fo, *Fusarium oxysporum*; Fs, *Fusarium solani*; Rs, *Rhizoctonia solani*.





**Figura 3.** Expresión relativa del gen *hcnC* en UM270 en interacción con hongos fitopatógenos. A) Gel de agarosa al 2% muestra la expresión de *hcnC* de un tamaño de 200pb en cada una de las condiciones, así como el gen endógeno 16S, región v1-v3 (500 pb). B) Gráficas de expresión relativa (inferior), prueba de Duncan  $p < 0.05$ ,  $n = 3$ . Bc, *Botrytis cinerea*; Fo, *Fusarium oxysporum*; Fs, *Fusarium solani*; Rs, *Rhizoctonia solani*.

**Figure 3.** Relative expression of the *hcnC* gene in UM270 in interaction with phytopathogenic fungi. A) 2% agarose gel shows the expression of *hcnC* of a size of 200 bp in each of the conditions, as well as the endogenous gene 16S, region v1-v3 (500 bp). B) Graphs of relative expression (lower), Duncan's test  $p < 0.05$ ,  $n = 3$ . Bc, *Botrytis cinerea*; Fo, *Fusarium oxysporum*; Fs, *Fusarium solani*; Rs, *Rhizoctonia solani*.

estudios que se enfocan en estudiar la señalización entre hongos, oomycetes y bacterias son escasos. Sin embargo, Gaballa y colegas (1997) observaron que el oomycete *Pythium debaryanum* induce la expresión de genes de biocontrol en *P. fluorescens* ATCC 17400. Por otra parte, otra especie de oomycetes del género *Pythium* reprimió la expresión de cinco grupos de genes en *P. fluorescens* F113 (Fedi *et al.*, 1997). Los trabajos anteriores no exploran a detalle los elementos que involucran dicha regulación de genes en bacterias, aunque se podría sugerir que los fitopatógenos censan la presencia de las bacterias de forma similar a la planta, involucrando cascadas de señalización similares y posterior modulación de expresión genética. Aunque esta hipótesis requiere más trabajo, quizás generando mutantes en los fitopatógenos y analizando en interacción el transcriptoma o proteoma en antagonistas bacterianos.

## CONCLUSIONES

Al comparar la expresión de los genes *phlD* y *hcnC* en presencia de cada uno de los hongos, se puede notar lo siguiente: la bacteria en contacto con *B. cinerea*, incrementa los niveles de expresión de *phlD*, por lo que, o bien el hongo no percibe a la bacteria o no cuenta con mecanismos para regular su expresión. Por otro lado, en el caso de *F. oxyspo-*

*rum*, los niveles de *phlD* están siendo reprimidos, mientras que los de *hcnC* se mantienen igual que el control, por lo que es posible que este hongo tenga la capacidad de inhibir la síntesis del compuesto 2,4-DAPG, y a su vez, no ser afectado por el HCN. Finalmente, los hongos *F. solani* y *R. solani* también mostraron diferencias significativas al regular negativamente la expresión de ambos genes, por lo que es posible que dichos compuestos no logren inhibir el crecimiento de estas dos especies. Sin embargo, estas hipótesis requieren más estudios. Finalmente, este trabajo abre la posibilidad de analizar el transcriptoma o proteoma de la cepa UM270 en presencia de fitopatógenos. Lo anterior será de gran relevancia para determinar los mecanismos que subyacen durante la interacción antagonista-patógeno.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México (Proyecto No. 169346) y Coordinación de la Investigación Científica-Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (2016-2017) por apoyar nuestros proyectos de investigación. Agradecemos también a los revisores de este trabajo los atinados comentarios y sugerencias.

## REFERENCES

- Adesemoye, A.O. y Kloepper, J.W. 2009. Plant-microbes interactions in enhanced fertilizer-use efficiency. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 85, 1-12.
- Ahmad, F., Ahmad, I. y Khan, M.S. 2008. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological Research*. 163:173-181.
- Bangera, M.G. y Thomashow, L.S. 1999. Identification and characterization of a gene cluster for synthesis of the polyketide antibiotic 2,4-diacetylphloroglucinol from *Pseudomonas fluorescens* Q2-87. *Journal of Bacteriology*. 181, 3155-3163.
- Combes-Meynet, E., Pothier, J.F., Moëgne-Loccoz, Y. y Prigent-Combaret, C. 2011. The *Pseudomonas* secondary metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol is a signal inducing rhizoplane expression of *Azospirillum* genes involved in plant-growth promotion. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 24, 271-284.
- Coutinho, B.G., Licastro, D., Mendonça-Previato, L., Cámara, M. y Venturi, V. 2015. Plant-influenced gene expression in the rice endophyte *Burkholderia kururiensis* M130. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 28:10-21.
- DeCoste, N. J., Gadkar, V. J. y Filion, M. 2011. Relative and absolute quantitative real-time PCR-based quantifications of *hcnC* and *phlD* gene transcripts in natural soil spiked with *Pseudomonas* sp. strain LBUM300. *Applied and Environmental Microbiology*. 77: 41-47.
- Duke, K.A., Becker, M. G., Girard, I.J., Millar, J.L., Fernando, W.D., Belmonte, M.F. y Kievit, T.R. 2017. The biocontrol agent *Pseudomonas chlororaphis* PA23 primes *Brassica napus* defenses through distinct gene networks. *BMC genomics*, 18: 467.
- Fedi, S., Tola, E., Moenne-Loccoz, Y., Dowling, D.N., Smith, L.M., y O'Gara, F. 1997. Evidence for signaling between *Pythium ultimum* and *P. fluorescens* F113-*P. ultimum* represses the expression of genes in *P. fluorescens* F113, resulting in altered ecological fitness. *Applied and Environmental Microbiology*. 63:4261-4266.
- Gaballa, A., Abeyasinghe, P.D., Urich, G., Matthijs, S., De Greve, H., Cornelis, P. y Koedam, N. 1997. Trehalose induces antagonism towards *Pythium debaryanum* in *Pseudomonas fluorescens* ATCC 17400. *Applied and Environmental Microbiology*. 63:4340-4345.
- Glick, B.R. 2014. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological Research*. 169: 30-39.
- Haas, D. y Défago, G. 2005. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature Reviews Microbiology*. 3:307.
- Habibi, R., Tarighi, S., Behravan, J., Taheri, P., Kjølner, A. H., Brejnrod, A. y Sørensen, S. J. 2017. Whole-Genome sequence of *Pseudomonas fluorescens* EK007-RG4, a promising biocontrol agent against a broad range of bacteria, including the fire blight bacterium *Erwinia amylovora*. *Genome announcements*. 5:e00026-17.
- Hernández-León, R., Rojas-Solís, D., Contreras-Pérez, M., del Carmen Orozco-Mosqueda, M., Macías-Rodríguez, L. I., Reyes-de la Cruz, H. y Santoyo, G. 2015. Characterization of the antifungal and plant growth-promoting effects of diffusible and volatile organic compounds produced by *Pseudomonas fluorescens* strains. *Biological Control*. 81:83-92.
- Hernández-Salmerón, J. E., Hernández-León, R., Orozco-Mosqueda, M. D. C., Valencia-Cantero, E., Moreno-Hagelsieb, G. y Santoyo, G. 2016. Draft genome sequence of the biocontrol and plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas fluorescens* strain UM270. *Standards in Genomic Sciences*. 11:5.
- Jiao, Z., Wu, N., Hale, L., Wu, W., Wu, D. y Guo, Y. 2013. Characterisation of *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* strain Pa40 with the ability to control wheat sharp eyespot disease. *Annals of Applied Biology*. 163:444-453.
- Kamensky, M., Ovadis, M., Chet, I. y Chernin, L. 2003. Soil-borne strain IC14 of *Serratia plymuthica* with multiple mechanisms of antifungal activity provides biocontrol of *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum* diseases. *Soil Biology and Biochemistry*. 35:323-331.
- Keel, C., D.M. Weller, A. Natsch, G. Défago, R.J. Cook. y Thomashow, L.S. 1996. Conservation of the 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis locus among fluorescent *Pseudomonas* strains from diverse geographic locations. *Applied and Environmental Microbiology*. 62, 552-563.
- Laville, J., Blumer, C., Von Schroetter, C., Gaia, V., Défago, G., Keel, C. y Haas, D. 1998. Characterization of the *hcnABC* gene cluster encoding hydrogen cyanide synthase and anaerobic regulation by ANR in the strictly aerobic biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Journal of Bacteriology*. 180:3187-3196.
- Luo, S., Xu, T., Chen, L., Chen, J., Rao, C., Xiao, X., Wan, Y., Zeng, G., Long, F., Liu, C. y Liu, Y. 2012. Endophyte-assisted promotion of biomass production and metal-uptake of energy crop sweet sorghum by plant-growth-promoting endophyte *Bacillus* sp. SLS18. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 93:1745-1753.
- Muyzer G, De Waal E.C. y Uitterlinden A.G. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*. 59:695-700.
- Pandya, M., Rajput, M. y Rajkumar, S. 2015. Exploring plant growth promoting potential of non rhizobial root nodules endophytes of *Vigna radiata*. *Microbiology*. 84:80-89.
- Pietro, A. D., Madrid, M. P., Caracuel, Z., Delgado-Jarana, J., y Roncero, M.I.G. 2003. *Fusarium oxysporum*: exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus. *Molecular Plant Pathology*. 4:315-325.
- Raaijmakers, J.M. y Weller, D.M. 2001. Exploiting genotypic diversity of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas* spp.: characterization of superior root-colonizing *P. fluorescens* strain Q8r1-96. *Applied and Environmental Microbiology*. 67: 2545-2554.
- Rashid, S., Charles, T.C. y Glick, B.R. 2012. Isolation and characterization of new plant growth-promoting bacterial endophytes. *Applied Soil Ecology*. 61:217-224.
- Rojas-Solís, D., Hernández-Pacheco, C. E. y Santoyo, G. 2016. Evaluation of *Bacillus* and *Pseudomonas* to colonize the rhizosphere and their effect on growth promotion in tomato (*Physalis ixocarpa* Brot. ex Horm.). *Revista Chapingo Serie Horticultura*. 22:45-57.
- Saini, R., Dudeja, S.S., Giri, R. y Kumar, V. 2015. Isolation, characterization, and evaluation of bacterial root and nodule endophytes from chickpea cultivated in Northern India. *Journal of Basic Microbiology*. 55:74-81.

- Santoyo, G., Hernández-Pacheco, C., Hernández-Salmerón, J. y Hernández-León, R. 2017. The role of abiotic factors modulating the plant-microbe-soil interactions: toward sustainable agriculture. A review. Spanish Journal of Agricultural Research, 15:03-01.
- Santoyo, G., Moreno-Hagelsieb, G., del Carmen Orozco-Mosqueda, M. y Glick, B. R. 2016. Plant growth-promoting bacterial endophytes. Microbiological research. 183:92-99.
- Santoyo, G., Orozco-Mosqueda, Ma. del C. y Govindappa, M. 2012. Mechanisms of biocontrol and plant growth-promoting activity in soil bacterial species of *Bacillus* and *Pseudomonas*: a review. Biocontrol Science & Technology. 22:855-872.
- Santoyo, G., Valencia-Cantero, E., Orozco-Mosqueda, Ma. del C., Peña-Cabriales, J.J. y Fariás-Rodríguez, R. 2010. Papel de los sideróforos en la actividad antagónica de *Pseudomonas fluorescens* zum80 hacia hongos fitopatógenos. Terra Latinoamericana. 28:53-60.
- Sun, D., Zhuo, T., Hu, X., Fan, X. y Zou, H. 2017. Identification of a *Pseudomonas putida* as biocontrol agent for tomato bacterial wilt disease. Biological Control. 114:45-50.
- Velázquez-Becerra, C., Macías-Rodríguez, L. I., López-Bucio, J., Flores-Cortez, I., Santoyo, G., Hernández-Soberano, C. y Valencia-Cantero, E. 2013. The rhizobacterium *Arthrobacter agilis* produces dimethylhexadecylamine, a compound that inhibits growth of phytopathogenic fungi *in vitro*. Protoplasma. 250:1251-1262.
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A. y Lane, D. J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. Journal of Bacteriology. 173:697-703.
- Yang, F. y Cao, Y. 2012. Biosynthesis of phloroglucinol compounds in microorganisms. Applied Microbiology and Biotechnology. 93:487-495.
- Zhou, T., Chen, D., Li, C., Sun, Q., Li, L., Liu, F., Shen, Q. y Shen, B. 2012. Isolation and characterization of *Pseudomonas brassicacearum* J12 as an antagonist against *Ralstonia solanacearum* and identification of its antimicrobial components. Microbiological Research. 167:388-394.