

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 811 673**

21 Número de solicitud: 202031185

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

C12R 1/38 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

26.11.2020

43 Fecha de publicación de la solicitud:

12.03.2021

71 Solicitantes:

**BIOBAB R&D, S.L. (100.0%)
Bajada a Vargas, 1 - Finca
35260 Agüimes (Las Palmas) ES**

72 Inventor/es:

**GUTIERREZ ALBANCHEZ, Enrique;
HORCHE TRUEBA, Ignacio;
LUCAS GARCÍA, Jose Antonio;
RAMOS SOLANO, Beatriz y
GUTIERREZ MAÑERO, Francisco Javier**

74 Agente/Representante:

FUENTES PALANCAR, José Julian

Observaciones:

La lista de secuencias está accesible al público en la página web de la OEPM para su descarga en formato electrónico.

54 Título: **PSEUDOMONAS PALMENSIS BBB001 ESTIMULANTE DEL METABOLISMO ADAPTATIVO DE PLANTAS FRENTE A ESTRÉS ABIÓTICO Y MEJORADORA DE LA NUTRICIÓN MINERAL**

57 Resumen:

Cepa bacteriana *Pseudomonas palmensis* BBB001, microorganismo del grupo de las bacterias Gram -, género *Pseudomonas*, estimulante del metabolismo adaptativo de plantas frente a estrés abiótico y mejoradora de la nutrición vegetal en hierro y otros nutrientes. Esta cepa, aislada a partir de la rizosfera de *Nicotiana glauca*, ha sido caracterizada desde el punto de vista morfológico, bioquímico y genético mediante secuenciación total de su genoma, identificándose como nueva especie, disminuye el estrés oxidativo en las plantas induciendo una mayor producción y una mejora en su adaptación a condiciones de estrés abiótico, por ejemplo, por falta de agua o alta salinidad, por lo que puede ser utilizada, sola o en combinación con otras cepas, con objeto de incrementar el fitness de las plantas en especies vegetales de interés agronómico alimentario. Por otra parte, dado que es capaz de mejorar la nutrición de hierro, fósforo y potasio, tiene también aplicación como biofertilizante, tanto en agricultura ecológica como convencional.

ES 2 811 673 A1

DESCRIPCIÓN

***Pseudomonas palmensis* BBB001 estimulante del metabolismo adaptativo de plantas frente a estrés abiótico y mejoradora de la nutrición mineral**

5

La presente invención se refiere a la cepa bacteriana *Pseudomonas palmensis* (BBB001 código interno del laboratorio), como nueva especie del género *Pseudomonas*, para su uso en el tratamiento de plantas con el objeto de mejorar la adaptación a estrés abiótico, disminuyendo el estrés oxidativo de tal forma que aumenta el crecimiento y la producción.

10 Además, es capaz de producir sideróforos, mejorando la nutrición de hierro de las plantas, revirtiendo los síntomas de déficit de hierro, y de estimular la movilización de otros nutrientes como fósforo y potasio, por lo que también resulta de interés como biofertilizante para agricultura ecológica y convencional.

15 Esta cepa ha sido depositada a los fines de patente en La Colección Española de Cultivos Tipo de la Universidad de Valencia (CECT), donde se le ha asignado el número 30222.

CAMPO DE APLICACIÓN

20 La invención se encuadra dentro del campo de la biotecnología agroalimentaria, concretamente dentro de las bacterias reguladoras del crecimiento vegetal, ya que la referida cepa bacteriana puede servir de base para la preparación de diferentes tipos de productos estimulantes del metabolismo adaptativo de plantas. Estos productos mejorarán la adaptación de las plantas a distintas condiciones de estrés abiótico como pueden ser el

25 déficit hídrico o el exceso de salinidad edáfica.

Y también dentro del campo de los biofertilizantes orgánicos, ya que la cepa puede utilizarse para mejorar la nutrición de la planta en general y más específicamente, la absorción de hierro en suelos, especialmente con pH básico, tanto en cualquier formulado bacteriano

30 como con metabolitos bacterianos obtenidos en determinadas condiciones.

Además, puesto que se trata de una cepa perteneciente a una nueva especie, siguiendo la terminología utilizada para la indexación de bacterias del "Manual de Bacteriología Determinante" de Bergey's, edición de marzo de 2001, junto con el análisis genómico

35 realizado, la invención puede clasificarse como una de las especies bacterianas del género *Pseudomonas*.

ESTADO DE LA TÉCNICA

Los mecanismos de acción de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal se pueden resumir en dos tipos: directos, cuando las bacterias o sus metabolitos alteran el metabolismo de la planta (actividad hormonal, estimulación de los mecanismos adaptativos), e indirectos, cuando sintetizan compuestos que facilitan la captación o movilización de nutrientes o evitan el crecimiento de microorganismos patógenos sobre la planta, sin alterar el metabolismo de esta. En el caso de esta patente, ambos resultan de interés. La planta posee un metabolismo secundario, altamente inducible, relacionado con la adaptación de la planta a situaciones adversas a las que tiene que hacer frente durante su vida.

El género *Pseudomonas* es común entre bacterias del suelo. Siguiendo la taxonomía del Manual Bergey's, edición marzo de 2001, esta bacteria se encuadra dentro del Dominio Bacteria, Phylum Proteobacteria, Clase gamma proteobacteria, Orden Pseudomonadales, Familia Pseudomonaceae. El género *Pseudomonas* es muy común en el sistema edáfico, y se ha descrito en repetidas ocasiones como bacteria protectora frente a distintas enfermedades de plantas. Algunas bacterias de este grupo producen pigmentos fluorescentes de colores amarillo-verdosos fácilmente solubles en agua. Entre otras funciones, estos pigmentos actúan como sideróforos (moléculas capaces de capturar el hierro del medio para el metabolismo del microorganismo). Además, presentan una gran versatilidad metabólica debido a un gran número de plásmidos que contienen operones inducibles para la síntesis de enzimas específicas que permitan catabolizar los compuestos presentes en el medio. La presencia de *Pseudomonas* sp. en la rizosfera de distintas plantas afecta de forma beneficiosa a su fisiología indicando que es muy posible su selección por la planta a nivel rizosférico. Los efectos de esta cepa sobre la fisiología de distintas plantas indican que la planta las selecciona en su beneficio.

Existen numerosas referencias en la literatura relativas a composiciones y formulaciones conteniendo cepas del género *Pseudomonas*, solas o en combinación con otros organismos para estimular y mejorar el crecimiento vegetal, o que sirven de base a la formulación de productos fitosanitarios, protectores frente a patógenos o para preservar el buen crecimiento de los cultivos, algunas de las cuales han sido patentadas, caso de las patentes europeas con números de publicación en España ES2707807-T3, 2019-04-05, Nueva *Pseudomonas* fluorescente de la especie *Pseudomonas azotoformans* para la estimulación de la emergencia y el crecimiento de las plantas, y ES2624788-T3, 2017-07-17, Cultivo biológico de una cepa de la especie *Pseudomonas graminis* y uso de dicho cultivo como antagonista

para el control biológico de bacterias patógenas; o la patente nacional ES2572746-B1, 2016-09-21, para Procedimiento de obtención de una composición promotora del crecimiento vegetal que comprende *Pseudomonas putida* y usos de esta.

- 5 En el caso de la presente solicitud de patente las nuevas tecnologías han permitido dirimir una nueva especie, *Pseudomonas palmensis* BBB001, en base a sus características genéticas únicas, que la diferencian de otras cepas de *Pseudomonas* cuando se compara el genoma de BBB001 con los 254 genomas completos y disponibles de *Pseudomonas*.
- 10 Los parámetros que permiten identificar una nueva especie son alguno de los siguientes: i) identidad nucleotídica promedio (ANI) e identidad aminoacídica promedio (AAI), siendo los valores límite para definir una nueva especie menor del 95%; ii) hibridación digital DNA-DNA (dDDH), con valores por debajo del 70%; iii) Contenido guanina-citosina (G+C), valores por encima del 1%; iv) índice de correlación de las frecuencias de uso de tetranucleótidos
- 15 (TETRA), con valores por debajo de 0.99; v) análisis de secuencias multilocus (MLSA), con valores por debajo del 97%.

Al comparar el genoma de BBB001 con los 254 genomas disponibles, *Pseudomonas alkylphenolica* es la especie más cercana según los valores de ANI y AAI fueron 83.39% y

20 85.11%, respectivamente, ambos por debajo del 95%, los valores de hibridación digital DNA-DNA (dDDH) 27.10%, por debajo del 70% y el contenido de guanina-citosina (G+C) 3.43%, por encima del 1%. Los valores del índice de correlación de las frecuencias de uso de tetranucleótidos (TETRA) frente a la especie más semejante en este análisis, *Pseudomonas* sp.NZ CP024478.1 (cepa HLS-6), fue de 0.983, por debajo del 0.99. Por otra parte, en el

25 análisis filogenético y delimitación de especies en base al análisis de secuencias multilocus (MLSA) de los genes seleccionados (16S rRNA, gyrB, rpoB rpoD), la mayor estima de similitud es del 91.52% con respecto a *Pseudomonas japónica*, que es la especie más semejante en este análisis; valores por debajo de 97% indican que es una nueva especie. La filogenia de *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) en el conjunto de genes

30 compartidos por todos los genomas de *Pseudomonas* (core genome), reveló que su *core genome* consta de 585 familias génicas, representando tan sólo el 0.05 % del contenido total de familias génicas de este grupo, valor que refuerza su identidad como nueva especie. Y, por último, la filogenia basada en la presencia o ausencia de familias de genes homólogos en el pan-genome, arroja resultados muy similares a los obtenidos en base al análisis de

35 SNPs. En las tablas 2 y 3 del apartado forma de realización de la invención aparecen todos los resultados de similitud entre la nueva especie y las más semejantes a ella.

Por tanto, en base a la aproximación polifásica, se ha descrito una nueva especie para la cual se ha propuesto el nombre de *Pseudomonas palmensis* sp. nov (N.º Depósito CECT 030222). Las características fisiológicas y el análisis genético de esta cepa permiten identificarla inequívocamente, diferenciándola de otras especies del género *Pseudomonas*.

5

La cepa *Pseudomonas palmensis* se caracteriza por sus efectos beneficiosos sobre las plantas: induce el metabolismo implicado en la eliminación de radicales libres producidos en situaciones de estrés, mejorando la adaptación de la planta a dichas condiciones mediante un mecanismo de homeostasis del metabolismo redox y un aumento del potencial hídrico en estas condiciones, claro indicador de la capacidad de esta cepa para inducir un equilibrio hídrico, dando como resultado una mayor capacidad de la planta para resistir condiciones estrés hídrico. Por otra parte, es capaz de mejorar la nutrición férrica de las plantas, mejorando asimismo su crecimiento.

10

Al ser una nueva especie, no existen patentes de *Pseudomonas palmensis* sobre ninguno de los efectos reportados. Con respecto al género *Pseudomonas* hay diversas publicaciones que describen la capacidad de éstas de producir sideróforos y modular el metabolismo implicado en el estrés oxidativo (Bar-Ness et. al., 1991, Journal Iron nutrition and interactions in plants, 271-281; Weger et. al., 1988, DOI: 10.1128/jb.170.10.4693-4698.1988; Ghosh et. al., 2018, DOI: <https://doi.org/10.1007/s13213-018-1366-7>; Vives-Peris et. al., 2018, DOI: <https://doi.org/10.1007/s00299-018-2328-z>). Con respecto a las cepas de *Pseudomonas* que mayor similitud presentan con la nueva especie propuesta en base los criterios anteriormente expuestos, que son *P.alkylphenolica*, *P.japonica* o *Pseudomonas* sp.NZ CP024478.1 (cepa HLS-6), no existe ninguna patente ni publicación sobre estas especies en el campo de aplicación de la presente invención. Existe alguna información sobre *P.japonica* relacionada con la degradación de aceite de industria (*Pseudomonas japonica* sp. nov., a novel species that assimilates straight chain alkylphenols. JOURNAL OF GENERAL AND APPLIED MICROBIOLOGY 2008 54;1 Strain Number cited in this paper: TISTR 1526) y con la capacidad de evitar la adhesión de los moluscos a cualquier superficie (WO2014149324A1), pero no relacionadas con el campo agroalimentario al que se refiere la presente invención.

25

30

LA INVENCION

El objeto de la invención que aquí se describe y que, a la vista del estado de la técnica anterior, se entiende cumple con las condiciones de novedad y actividad inventiva

35

necesarias para poder ser merecedora del derecho de patente, es el aislamiento y caracterización de la cepa bacteriana *Pseudomonas palmensis* BBB001 (CECT 30222), que es un microorganismo del grupo de las bacterias Gram -, género *Pseudomonas*, con capacidad de estimular el metabolismo de adaptación a estrés abiótico de las plantas, disminuyendo el estrés oxidativo mediante inducción del metabolismo implicado en la eliminación de radicales libres producidos en situaciones de estrés, mejorando la adaptación de la planta a dichas condiciones a través de la homeostasis del metabolismo redox, de tal forma que se estimula el crecimiento y producción, además de tener aplicación por la movilización de nutrientes, especialmente para la nutrición de hierro.

Las características fisiológicas y el análisis genético de esta cepa, con un genoma secuenciado conforme a la norma OMPI ST.25 que se integra al final de la presente memoria descriptiva, permiten identificarla inequívocamente, diferenciándola de otras especies del género *Pseudomonas*.

En un screening de bacterias realizado en la rizosfera de *Nicotiana glauca* se aisló una cepa perteneciente al género *Pseudomonas* cuyo análisis genético no permitió situarla en ninguna de las especies conocidas de este género.

Una vez aislada se realizó una caracterización del repertorio de genes únicos de *Pseudomonas* BBB001. En el análisis comparativo de los 254 genomas completos, el programa BPGA identificó un total de 489 genes presentes exclusivamente en *Pseudomonas* BBB001, de los cuales 41 genes fueron asociados a un subsistema concreto. De entre los 41 genes únicos de *Pseudomonas* BBB001 destacan, por su abundancia, los relacionados con la captación y metabolismo del hierro, y los relacionados con la síntesis de aminoácidos y derivados. Estos 41 genes correspondientes a la SEQ ID NO: 1 a 41 de la lista de secuencias, tienen capacidad de codificar formulaciones para la producción de sustancias o compuestos a escala industrial, y pueden ser utilizados para expresión heteróloga en la obtención de productos que contengan materia biológica de la cepa.

Después de su caracterización se realizaron diversas pruebas para poner de manifiesto actividades bioquímicas indicadoras de su potencial capacidad de inducción del metabolismo de adaptación, disminuyendo el estrés oxidativo y promoción del crecimiento vegetal, por una parte, y por otra, su capacidad para mejorar la nutrición férrica. Estas fueron, producción de auxinas, degradación de 1-aminociclopropano-1-carboxilato, solubilización de fosfato y producción de sideróforos y quitinasas, resultando positivo para la

producción de auxinas y sideróforos in vitro. El perfil de BIOLOG Eco indica que es capaz de degradar los ácidos tricarboxílicos málico, hidroxibutírico y ácido glucosamínico, y la degradación de glucosa 1 P, celobiosa, lactosa y N-acetilglucosamina destacan entre los azúcares. Como fuentes de nitrógeno, utiliza putrescina, feniletilamina, serina y ácido glicol-L-glutámico.

Hasta el momento se han realizado experiencias consistentes en la inoculación directa de *Pseudomonas palmensis* en planta modelo (*Arabidopsis thaliana*) donde ha caracterizado el perfil metabólico de enzimas relacionados con el control del estrés oxidativo y equilibrio redox de la planta y la modificación de los parámetros fotosintéticos relacionados con la fluorescencia como un indicador del potencial de estimulación del crecimiento y producción vegetal, y también del estado de salud de la planta como resultado de los efectos sobre equilibrio redox de la planta.

Asimismo, se han realizado inoculaciones directas en plantas de mora (*Rubus* sp. Var Lochness), creciendo en invernaderos de producción. Se ha determinado la producción total acumulada, y se ha determinado el perfil metabólico de enzimas relacionados con el control de estrés oxidativo en hojas de mora, en dos momentos del ciclo (floración y plena producción), realizando dos aplicaciones al mes, durante los 6 meses que dura el ciclo de producción.

Estos dos experimentos realizados en distintas especies vegetales demuestran que la bacteria es capaz de modular el metabolismo implicado en la adaptación de la planta a estrés abiótico, controlando el estrés oxidativo aumentando la capacidad para eliminar los radicales libres de oxígeno (ROS) mediante: 1) un aumento en las actividades de los enzimas de scavenging de ROS, superóxido dismutasa (SOD) o catalasa (CAT), y 2) un aumento de la disipación del exceso de energía fotosintética responsable de la generación de radicales libres ROS (non photochemical quenching, NPQ) en condiciones normales.

Se ha realizado otro experimento para demostrar la capacidad de estimulación del metabolismo adaptativo a condiciones de estrés por salinidad en plantas de tomate. La cepa, induce una mejora sustantiva en el potencial hídrico con respecto al control, incrementando ligeramente el contenido en prolina, un osmolito compatible. El aumento del potencial hídrico en estas condiciones es un claro indicador de la capacidad de esta cepa para inducir un equilibrio hídrico, generando como resultado una mayor capacidad de la planta para resistir condiciones de salinidad o estrés hídrico.

En otro experimento realizado en olivos en producción en un sistema intensivo y con riego, se ha realizado un experimento con BBB001 para evaluar la capacidad de incrementar la producción en condiciones de riego habitual y con un 25% de reducción en el riego. En un muestreo previo a la cosecha, hemos encontrado un aumento de más de un 40% en el peso fresco medio de los frutos con respecto a su control en condiciones de riego estándar, y con reducción de agua. Por otra parte, el peso de los frutos de las plantas tratadas con BBB001 a nivel radical, alcanzaron los mismos valores en ambos regímenes de riego.

Por otro lado, se han realizado experimentos de reversión de la clorosis por deficiencia de hierro en plantas de tomate. Estos experimentos se han realizado mediante la inoculación directa de *Pseudomonas palmensis* en plantas de tomate en las que se había inducido una deficiencia de hierro y el sustrato se había ajustado a pH básico para asegurar la insolubilización del Fe. Asimismo, se ha ensayado la cepa crecida en un medio específico de producción de sideróforos (medio succinato modificado), con la cepa, y también ensayamos sólo el líquido metabólico. Se han encontrado resultados similares con todos los tratamientos, destacando el efecto sobre la mejora del contenido en hierro, fósforo y potasio, la mejora de la fotosíntesis, un aumento de pigmentos fotosintéticos y, por tanto, una mejora en el crecimiento (aumento de peso seco).

Los referidos experimentos sobre el uso *Pseudomonas palmensis* BBB001 con capacidad de estimular el metabolismo de adaptación a estrés abiótico de las plantas, disminuyendo el estrés oxidativo, por aumento en la actividad de los enzimas relacionados con el *scavenging* de ROS, de tal forma que se estimula el crecimiento y producción, además de tener aplicación como biofertilizante porque estimula la movilización de nutrientes, concretamente la nutrición de hierro, fósforo y potasio, se exponen al final de la presente memoria, dentro del apartado forma de realización.

La finalidad que se persigue, en definitiva, con esta invención y que constituye la ventaja técnica aportada con la misma, es disponer de una bacteria (bioestimulante/biofertilizante) que mejore la capacidad de estimular el metabolismo de adaptación a estrés abiótico de las plantas, disminuyendo el estrés oxidativo, de tal forma que se estimula el crecimiento y producción. Por otra parte, tiene aplicación como biofertilizante porque estimula la movilización de nutrientes, concretamente la nutrición de hierro, fósforo y potasio, haciendo entrar en contacto por cualquier medio disponible a dicha bacteria o alguna de sus partes con la planta, mejorando el efecto con determinadas especies bacterianas.

En consecuencia, con la presente solicitud de patente se reivindica el uso de la cepa *Pseudomonas palmensis* BBB001, o cualquier molécula, fracción o formulación bacteriana derivada de ella, o de los metabolitos del caldo de cultivo de la cepa, en cualquier proporción, para su aplicación en cualquier tipo de especie vegetal, con el fin de incrementar la capacidad de adaptación de las plantas a cualquier condición de estrés abiótico, caso por ejemplo de condiciones de salinidad, aumentando la producción, así como para mejorar la nutrición mineral en hierro, fósforo y potasio de las plantas.

Dicho uso de *Pseudomonas palmensis* BBB001 podrá ser formando parte de cualquier preparado con la cepa, ya sea individualmente o en combinación con otras especies bacterianas u organismos, y por cualquier medio disponible que ponga la bacteria en contacto con la semilla, el sistema radical o aéreo de las plantas.

Particularmente el uso de *Pseudomonas palmensis* BBB001 es adecuado en combinación con *Pseudomonas fluorescens* CECT 9015, o formando parte de cualquier preparado con esta otra cepa, para mejorar la respuesta a estrés salino; y también en combinación con *Arthrobacter oxydans* Código CECT 30231, para mejorar la nutrición mineral en hierro, nitrógeno, fósforo y potasio, tanto en agricultura ecológica como convencional.

FORMA DE REALIZACIÓN.-

La cepa del género *Pseudomonas* que aquí se reseña se aisló estudiando la rizosfera de poblaciones naturales de *Nicotiana glauca* en un transecto de la isla de Las Palmas de Gran Canaria (Islas Canarias). Esta especie vegetal (*Nicotiana glauca*) se seleccionó por ser de la familia Solanaceae, por tener un metabolismo secundario activo y por haber resultado una buena fuente de microorganismos con actividad biológica de interés en agricultura.

Los muestreos de rizosfera para el aislamiento de la cepa bacteriana se realizaron en poblaciones naturales de *Nicotiana glauca* en diciembre de 2017. Como resultado de dicho muestreo se coleccionaron 450 cepas entre las que se encontró *Pseudomonas palmensis* (BBB001, código interno del laboratorio). El aislamiento de dicha cepa se realizó en agar nutritivo (PCA).

En el laboratorio este microorganismo se mantiene con una elevada tasa de supervivencia en glicerol al 20% en caldo nutritivo (Pronadisa) a -80°C o en glicerol al 15% en agua a -

20°C y se recuperan con facilidad en el medio de cultivo utilizado para el aislamiento tanto en fase sólida como en fase líquida a 28°C.

I. Características morfológicas, bioquímicas y genéticas de *Pseudomonas palmensis* BBB001.-

Para la caracterización de la cepa se consideraron diferentes caracteres fenotípicos que se pormenorizan en esta memoria: (i) morfología de las colonias (ii) morfología de las células, (iii) perfil metabólico, iv) Análisis comparativo del genoma de la cepa *Pseudomonas* BBB001 y los genomas completos disponibles del género *Pseudomonas*.

En la Tabla 1 se especifica la morfología de las colonias a las 24 h de incubación a 28° en agar para métodos estándar (PCA).

TABLA 1

	BBB001
Tamaño de la colonia	< 1 mmØ
Forma	circular
Borde	Liso
Transparencia	No
Consistencia	Cremosa
Color	Amarillo

Creciendo en medio líquido (Caldo nutritivo Pronadisa) el color del medio cambia a amarillo desde la fase exponencial de crecimiento a la fase estacionaria de crecimiento.

Los caracteres morfológicos de *Pseudomonas palmensis* BBB001 a las 24 h de incubación a 28° en agar para métodos estándar (PCA) corresponden a un bacilo Gram negativo.

Una vez aislada y caracterizada, con código de referencia interno BBB001, se realizaron diversas pruebas para poner de manifiesto el potencial de esta bacteria. Estas fueron, producción de auxinas, degradación de 1-aminociclopropano-1-carboxilato, solubilización de fosfato y producción de sideróforos y quitinasas, resultando positivo para la producción de sideróforos.

El perfil metabólico (BIOLOG Eco, www.biolog.com/products-portfolio-overview/microbial-community-analysis-with-ecoplates/) indica que es capaz de degradar los ácidos: tricarboxílicos málico, hidroxibutírico y ácido glucosamínico, y la degradación de glucosa 1 P, celobiosa, lactosa y N-acetilglucosamina destacan entre los azúcares. Como fuentes de

5 nitrógeno, utiliza putrescina, feniletilamina, serina y ácido glicol-L-glutámico.

Para investigar la relación filogenética de la cepa *Pseudomonas palmensis* BBB001 con respecto a las demás especies del género *Pseudomonas* y definir su asignación taxonómica se comparó su genoma completo con los 254 genomas de *Pseudomonas* que se encuentran

10 disponibles y completos en las bases de datos. Se utilizaron tres estrategias principales, según los siguientes criterios definitorios de una nueva especie de bacteria:

1. Estimamos el grado de similitud entre genomas: identidad nucleotídica promedio (ANI), identidad aminoacídica promedio (AAI), hibridación ADN-ADN in silico o dDDH (digital DNA-

15 DNA hybridisation), diferencia en el contenido en guanina-citosina (G+C) y frecuencia de uso de tetranucleótidos (TETRA):

- Los valores de ANI y AAI representan una medida robusta de la distancia evolutiva entre dos genomas; cuando estos valores son inferiores al 95%, se asume que se trata de una nueva especie. Se ha comprobado empíricamente
- 20 que valores ANI y AAI del 95-96 % equivalen a un valor DDH (hibridación ADN-ADN) del 70 %, otro parámetro comúnmente utilizado para delimitar especies procariotas (e.g., Konstantinidis y Tiedje 2005, PNAS 102:2567-2572; Richter y Rosselló-Mora 2009, PNAS 106:19126-19131; Kim et al.2014, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 64:346-351).
- 25 • Las diferencias en el contenido en G+C dentro de una misma especie no son generalmente superiores al 1 %; Meier-Koltho et al. 2014, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 64:352-356).
- El índice dDDH, ha mostrado una mayor correlación con los valores de DDH tradicionales (Auch et al. 2010, Standards in Genomic Sciences 2:1). Por ello, se
- 30 considera que valores de dDDH superiores al 70 % son indicativos de que los genomas comparados pertenecen a la misma especie.
- Los valores TETRA entre el genoma de *Pseudomonas* BBB001 y los 26 genomas más relacionados. Los genomas de cepas estrechamente relacionadas mostrarán, previsiblemente, frecuencias de uso de tetranucleótidos semejantes,
- 35 con índices de correlación (TETRA) iguales o superiores a 0.99, por tanto,

valores de TETRA inferiores a 0.99, son indicadores de una nueva especie (Teeling et al. 2004, *Environmental Microbiology* 6:938947; Richter y Rosselló-Mora 2009, *PNAS* 106:19126-19131).

2. Análisis filogenético y delimitación de especies en base al análisis de secuencias multilocus (MLSA: multilocus sequence analysis):

- La secuenciación del gen ribosomal 16S (16S rRNA) es la herramienta básica en los sistemas actuales de clasificación de especies bacterianas. Generalmente, se acepta que dos especies diferentes presentarán valores de similitud para el gen 16S rRNA inferiores al 98.65-99 % (Kim et al. 2014, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64:346-351). Sin embargo, en muchos casos, el gen 16S rRNA puede ofrecer un poder de resolución limitado. Por una parte, este gen puede presentar una baja capacidad de discriminación entre especies estrechamente relacionadas. Por otra parte, algunas especies pueden mostrar secuencias de 16S rRNA muy similares (<99 %), a pesar de ser claramente diferentes en base a los valores de DDH (Ash et al. 1991, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 41:343-346; Rosselló-Mora y Amann 2001, *FEMS Microbiology Reviews* 25:39- 67). En el caso concreto del género *Pseudomonas*, Mulet y colaboradores han recomendado el análisis de tres genes adicionales (*gyrB*, *rpoB* y *rpoD*) para delimitar especies, identificar nuevas cepas, o resolver las relaciones filogenéticas dentro de este grupo (Mulet et al. 2012a, *Systematic and Applied Microbiology* 35:455-464; Mulet et al. 2012b, *Systematic and Applied Microbiology* 35:145-149; Sánchez et al. 2014, *Systematic and Applied Microbiology* 37:89-94). Mulet y colaboradores establecieron una similitud media del 97 % como criterio para la delimitación de especies en base al MLSA de estos cuatro genes dentro del género *Pseudomonas* (Mulet et al. 2010, *Environmental Microbiology* 12:1513-1530).

3. Análisis filogenético a nivel de genoma completo, basado en la identificación de variantes (single nucleotide polymorphisms, SNPs) en la fracción conservada del genoma (core genome) y en la presencia / ausencia de genes en el pan-genome:

- Filogenia de SNPs (single nucleotide polymorphism) en el conjunto de genes compartidos por todos los genomas de *Pseudomonas* (*core genome*), y filogenia basada en la presencia o ausencia de familias de genes homólogos en el *pan-*

genome. Los avances en la secuenciación y comparación de genomas bacterianos han revelado una inesperada variabilidad en el contenido génico de las distintas especies de un mismo género, e incluso de las distintas cepas de una misma especie. Los genomas de cepas de *Escherichia coli*, por ejemplo, comparten tan solo el 40 % de sus genes (Rasko et al. 2008, Journal of Bacteriology 190:6881-6893). Esto ha llevado a formular el concepto de *core genome* o genoma básico, para definir al conjunto de genes compartido por todas las especies bacterianas de un determinado grupo. Los genes que están ausentes en uno o más miembros del grupo y que, por tanto, no forman parte del *core genome*, se denominan genes accesorios. Por último, el repertorio de genes completo (es decir, la suma del core genome y de los genes accesorios) se ha denominado *pan-genome*.

Por último, como resultado obtenido del análisis del pan-genoma de *Pseudomonas*, se caracterizó el repertorio de genes únicos presentes en la cepa *Pseudomonas* BBB001.

1. Estimaciones del grado de similitud entre genomas.-

1.1. Parámetros identidad nucleotídica promedio (ANI) e identidad aminoacídica promedio (AAI):

La primera etapa de este análisis consiste en la comparación a nivel nucleotídico y aminoacídico del genoma de *Pseudomonas* BBB001 respecto a todos los genomas completos disponibles en la base de datos RefSeq (NCBI Reference Sequence database) para el género *Pseudomonas*.

Las estimaciones de los índices de identidad nucleotídica (ANI) fueron calculadas con el programa OAU.jar.

Para la comparación del contenido aminoacídico (AAI) se utilizó la herramienta CompareM v0.0.23 (<https://github.com/dparks1134/CompareM>). Esta herramienta identifica los genes homólogos y calcula la identidad entre ambos.

1.2. La hibridación ADN-ADN in silico (dDDH) y contenido en G+C:

En base a los resultados del apartado anterior, se seleccionaron los 26 genomas situados en el cuarto cuartil de la distribución de los valores de ANI (i.e., previsiblemente, los más estrechamente relacionados con *Pseudomonas* BBB001), para calcular las distancias intergenómicas y los índices dDDH, utilizando el servidor web GGDC (Genome-to-Genome Distance Calculator). Este servidor también calcula la diferencia del contenido en G+C de los genomas analizados.

1.3. Frecuencias de uso de tetranucleótidos (TETRA):

Se utilizó el software JSpecies (Richter y Rossellò-Mora 2009, PNAS 106:19126-19131) para calcular las diferencias en los perfiles de uso de tetranucleótidos entre el genoma de *Pseudomonas* BBB001 y los 26 genomas más relacionados.

2. Análisis filogenético y delimitación de especies en base al análisis de secuencias multilocus (MLSA: multilocus sequence analysis).-

En el análisis multilocus, realizado también en el subconjunto de 26 genomas, se incluyeron los cuatro genes housekeeping recomendados para la delimitación de especies en el género *Pseudomonas*: 16S, gyrB, rpoD y rpoB (e.g., Mulet et al. 2012a, Systematic and Applied Microbiology 35:455-464).

-16S: Se utilizó un pipeline casero de scripts en lenguaje bash para extraer las múltiples copias de este gen en cada uno de los genomas completos analizados. Estas copias fueron colapsadas en un consenso en el que cada posición variable fue representada como una ambigüedad.

-gyrB, rpoD y rpoB: Los genes gyrB, rpoD y rpoB se extrajeron de los genomas completos en cuestión mediante un mapeo contra referencia utilizando BWA 0.7.12 (Li y Durbin 2010, Bioinformatics 26:589- 595).

Además, para poder comparar la filogenia resultante con la obtenida por Mulet y colaboradores al investigar la posición filogenética de *Pseudomonas alkylphenolica* (Mulet et al. 2015, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 65:4013-4018), se incluyeron en el análisis las secuencias de otras 13 especies o cepas utilizadas en ese trabajo, sin genomas completos publicados.

Para cada uno de los genes mencionados se realizó un alineamiento de todas las secuencias utilizando el programa Mafft v7.310 (Kato et al. 2002, Nucleic Acids Research 30:3059-3066). En cada uno de los 4 alineamientos se eliminaron aquellas regiones que fueran ambiguas (i.e. regiones ausentes en algunas secuencias y/o mal alineadas).

5

Por último, se concatenaron los 4 genes y se estimaron los modelos de sustitución nucleotídica que mejor se ajustaban a cada uno de ellos utilizando PartitionFinder 2 (Lanfear et al. 2012, Molecular Biology and Evolution 29:1695-1701). Para la obtención del árbol filogenético se utilizó MrBayes v3.2 (Ronquist et al. 2012, Systematic Biology 61:539-542).

10

También se realizó un estudio de la similitud de estos 4 genes entre *Pseudomonas* BBB001 y el resto de las especies o cepas, utilizando un módulo de Biopython llamado DistanceCalculator. En el caso del gen 16S, al ser de copia múltiple, se calculó la media de la similitud obtenida para cada copia.

15

3. Análisis filogenéticos basados en las secuencias de genomas completos.-

El software BPGA (Chaudhari et al. 2016, Scientific Reports 6:24373) se utilizó para realizar una agrupación por homología de los genes anotados en los 253 genomas completos de *Pseudomonas* y en *Pseudomonas* BBB001. El umbral de agrupación fue del 50% de homología, agrupándose así genes homólogos y también genes que puedan pertenecer a una misma familia. BPGA identifica las familias de genes compartidas por todos los genomas analizados (core genome), los genes accesorios y, además, las funciones únicas, es decir genes que no se han agrupado en ninguno de los clusters creados.

25

3.1. Filogenia de SNPs (single nucleotide polymorphisms) presentes en los genes core:

En primer lugar, se diseñó un pipeline casero de scripts en lenguaje bash para extraer las secuencias nucleotídicas asociadas a los genes identificados como core genome por BPGA.

30

Se analizó la distancia genética de estas secuencias utilizando DistanceCalculator y se generó un alineamiento para cada uno de los genes core utilizando Mafft v7.310 (Kato et al. 2002, Nucleic Acids Research 30:3059-3066). Finalmente, se extrajo la información del contenido de gaps en los alineamientos generados para identificar alineamientos de mala calidad.

35

Para el estudio de los SNPs, es necesario asegurar que todas las posiciones extraídas son posiciones homólogas, por lo que se eliminaron aquellos genes que incluían secuencias con una distancia mayor al 50% y que además incluían un contenido de gaps superior al 10% de la longitud de secuencia.

5

Geneious v10.2.2 (Kearse et al. 2012, Bioinformatics 28:1647-1649) se utilizó para eliminar las posiciones en las que más de un 10% de las secuencias tuvieran un gap y, finalmente, extraer los SNPs en formato PHYLIP.

10 El software RAxML v8.2.9 (Stamatakis 2014, Bioinformatics 30:1312-1313) se utilizó para generar el árbol filogenético de máxima verosimilitud de todos los SNPs concatenados. El soporte de cada nodo se calculó realizando 1000 réplicas de bootstrap.

3.2 Filogenia de la matriz presencia / ausencia de genes o familias de genes en el pan-genome:

15

La matriz de presencia / ausencia de genes producida por BPGA se utilizó para reconstruir un árbol filogenético de máxima verosimilitud utilizando IQTREE (Chernomor et al. 2016, Systematic Biology 65:997-1008). El soporte de cada nodo se calculó realizando 1000

20

4. Caracterización del repertorio de genes únicos de *Pseudomonas* BBB001.-

Para determinar si las funciones exclusivas identificadas no habían sido descritas previamente, se creó una base de datos local de la base de datos de proteínas nr (non-redundant) disponible en la colección de bases de datos del NCBI/EMBL/DDBJ para realizar una búsqueda de estas utilizando el programa BLAST+ 2.6.0 (Camacho et al. 2008, BMC Bioinformatics 10:421).

25

Se utilizó un pipeline casero de scripts escritos en lenguaje bash para extraer la información relevante de la primera correspondencia obtenida en la búsqueda realizada. Los genes exclusivos se presentan en archivo adjunto.

30

5. Discusión de resultados.-

35

Los resultados obtenidos al comparar nuestra cepa con 254 genomas de *Pseudomonas* y que han permitido dirimirla como una nueva especie, *Pseudomonas palmensis* BBB001, se indican a continuación; todos los valores son el resultado de la comparación con la especie más parecida disponible. Así sus características genéticas únicas son: con respecto a

5 *Pseudomonas alkylphenolica*, valores de ANI y AAI de 83.39% y 85.11%, respectivamente (tabla 2), los valores estimados de dDDH de 27.10 %, contenido en G+C, que muestra una diferencia de 3.43 % (tabla 2). Asimismo, presenta unos valores de TETRA de 0.983, frente a la especie más semejante en este análisis *Pseudomonas* sp.NZ CP024478.1 (cepa HLS-6) (tabla 2).

10 La Tabla 2 muestra los resultados de las estimas del grado de similitud entre genomas. Para cada genoma, se especifica su longitud (en pares de bases, pb), el número de genes anotados, y los valores de ANI, AAI, dDDH, distancia intergenómica, diferencia en el contenido en G+C e índice TETRA estimados en la comparación con el genoma de *Pseudomonas* BBB001. En la columna 1, tras el nombre de la especie, se indica el número

15 de acceso del genoma en RefSeq.

TABLA 2

Genomas Comparados	Longitud gen (pb)	Genes anotados	ANI (%)	AAI (%)	DDH (%)	Distancia Intergenómica	Diferencias G+C (%)	Índice TETRA
Valor indicador de nueva especie			<95%	<95%	<70%		1%	<0.99
<i>Pseudomonas alkylphenolica</i> NZ CP009048 1	5764623	5080	83.389	85.110	27.100	0.160	3.430	0.938
<i>Pseudomonas</i> sp NZ CP007012 1	5891313	5129	82.128	81.200	26.100	0.167	0.780	0.978
<i>Pseudomonas monteilii</i> NC 023075 1	6000088	5315	82.126	81.210	25.700	0.169	1.600	0.974
<i>Pseudomonas monteilii</i> NC 023076 1	5945121	5250	81.993	81.290	25.700	0.169	1.570	0.974
<i>Pseudomonas putida</i> NC 015733 1	5984791	5263	81.864	80.810	25.500	0.171	1.740	0.975
<i>Pseudomonas plecoglossicida</i> NZ CP010359 1	6233255	5533	81.871	81.240	25.500	0.170	1.660	0.975
<i>Pseudomonas putida</i> NC 019905 1	5875751	5344	81.843	81.000	25.400	0.171	1.460	0.977
<i>Pseudomonas mosselii</i> NZ CP023299 1	5751089	5029	81.11	81.170	25.400	0.171	0.290	0.981
<i>Pseudomonas mosselii</i> NZ CP024159 1	5742166	5045	81.144	81.140	25.400	0.172	0.360	0.981

<i>Pseudomonas entomophila</i> NC 008027 1	5888781	5055	81.903	81.010	25.200	0.173	0.100	0.982
<i>Pseudomonas</i> sp NZ CP024478 1	5276695	4704	81.961	84.040	25.200	0.173	4.180	0.892
<i>Pseudomonas putida</i> NC 021491 1	6870828	6227	81.515	81.200	25.100	0.173	2.460	0.968
<i>Pseudomonas</i> sp NZ LN847264 1	6012948	5279	82.057	81.000	25.000	0.174	0.130	0.983
<i>Pseudomonas putida</i> NC 021505 1	6156702	5390	81.508	80.980	24.900	0.175	1.730	0.969
<i>Pseudomonas putida</i> NC 009512 1	5959965	5200	81.239	80.930	24.800	0.176	2.200	0.959
<i>Pseudomonas putida</i> NC 017986 1	6085450	5538	81.306	80.750	24.800	0.176	2.290	0.959
<i>Pseudomonas putida</i> NC 002947 4	6181874	5564	81.066	80.570	24.700	0.177	2.530	0.963
<i>Pseudomonas putida</i> NC 017530 1	5731542	5109	81.121	80.950	24.700	0.176	2.320	0.959
<i>Pseudomonas</i> sp NZ CP011525 1	6178826	5399	81.233	80.620	24.700	0.176	2.720	0.961
<i>Pseudomonas putida</i> NC 010322 1	6078431	5398	81.221	80.950	24.600	0.177	2.120	0.969
<i>Pseudomonas mosselii</i> NZ CP009365 1	6247861	5563	81.569	80.540	24.600	0.177	0.670	0.982
<i>Pseudomonas putida</i> NC 010501 1	5774331	5193	81.013	81.220	24.300	0.179	2.620	0.959
<i>Pseudomonas</i> sp NC 022738 1	5644570	5411	80.845	81.030	24.000	0.182	2.230	0.961
<i>Pseudomonas parafulva</i> NZ CP009747 1	5087620	4295	80.865	80.400	23.900	0.183	0.590	0.964
<i>Pseudomonas</i> sp NZ LN865164 1	4835346	4180	79.681	79.980	23.300	0.188	2.380	0.942
<i>Pseudomonas parafulva</i> NZ CP019952 1	4690484	4055	79.923	80.080	23.200	0.188	2.350	0.942

Las estimas de similitud en el análisis de MLSA para el gen 16S rRNA (secuencia depositada en Genbank MW009702) arrojaron valores de entre 98.52 % y 99.42 %, próximos o por encima del valor umbral para ser incluidas en la misma especie, sin embargo, los valores de similitud para los otros tres genes incluidos en el MLSA son, sin embargo, considerablemente inferiores <97% (91.52%, con respecto a *Pseudomonas japónica*, especie más semejante en este análisis, Tabla 3) establecido por Mulet y

colaboradores para la delimitación de especies en base al MLSA de estos cuatro genes dentro del género *Pseudomonas*.

La Tabla 3 muestra el porcentaje de similitud para cada uno de los cuatro genes incluidos en el MLSA y similitud media calculada para los cuatro genes conjuntamente.

5 **TABLA 3**

Genomas comparados	16S	gyrB	rpoB	rpoD	Similitud Media
<i>Pseudomonas japonica</i> (AB126621.2,GQ996725.1,HE577800.1,HE577795.1)	98.81	89.65	94.04	83.59	91.52
<i>Pseudomonas alkylphenolica</i> NZ CP009048.1	98.95	90.49	94.04	82.57	91.51
<i>Pseudomonas</i> sp NZ CP024478.1	99.42	88.67	91.72	83.93	90.93
<i>Pseudomonas vranovensis</i> (AY970951.1,HE577791.1,HE577799.1,HE577793.1)	98.52	90.63	93.16	80.37	90.67
<i>Pseudomonas</i> sp NZ CP007012.1	98.54	88.67	92.60	79.53	89.84
<i>Pseudomonas mosselii</i> (AF072688.2, FN554207.1, FN554744.1, FN554491.1)	98.24	87.41	93.16	80.37	89.80
<i>Pseudomonas mosselii</i> NZ CP024159.1	98.43	86.99	93.27	80.37	89.77
<i>Pseudomonas mosselii</i> NZ CP023299.1	98.42	86.99	93.27	80.37	89.76
<i>Pseudomonas plecoglossicida</i> NZ CP010359.1	98.63	87.83	92.49	78.00	89.24
<i>Pseudomonas monteilii</i> NC 023075.1	98.62	87.83	92.49	78.00	89.24
<i>Pseudomonas monteilii</i> NC 023076.1	98.62	87.83	92.49	78.00	89.24
<i>Pseudomonas putida</i> NC 019905.1	98.41	88.11	92.27	77.83	89.16
<i>Pseudomonas monteilii</i> (AF064458.1, FN554205.1, AJ717455.1, FN554488.1)	98.38	87.55	92.05	78.34	89.08
<i>Pseudomonas putida</i> NC 015733.1	97.83	87.83	92.49	78.00	89.04
<i>Pseudomonas plecoglossicida</i> (AB009457.1, FN554218.1, AJ717456.1, FN554503.1)	98.52	87.13	92.27	78.00	88.98
<i>Pseudomonas guariconensis</i> (HF674459.1, LN851841.1, LN851843.1, LN851842.1)	97.68	87.55	92.16	78.51	88.98
<i>Pseudomonas putida</i> NC 021505.1	98.55	86.85	92.72	77.16	88.82
<i>Pseudomonas putida</i> NC 010322.1	98.48	87.69	91.94	77.16	88.82
<i>Pseudomonas putida</i> NC 002947.4	98.38	86.71	92.60	77.50	88.80
<i>Pseudomonas</i> sp NZ LN847264.1	98.36	85.59	92.27	78.68	88.73
<i>Pseudomonas putida</i> NC 010501.1	98.19	87.69	91.83	76.99	88.67
<i>Pseudomonas putida</i> (D84020.1, AB039451.1, AJ717474.1, AB039581.1)	97.96	86.85	92.27	77.16	88.56
<i>Pseudomonas putida</i> NC 017530.1	98.40	86.57	92.38	76.82	88.54
<i>Pseudomonas</i> sp NC 022738.1	98.62	85.87	92.38	76.82	88.42
<i>Pseudomonas entomophila</i> NC 008027.1	98.41	85.87	91.72	77.66	88.42
<i>Pseudomonas putida</i> NC 021491.1	98.41	85.45	92.05	77.66	88.40
<i>Pseudomonas taiwanensis</i> (EU103629.2, FJ418634.1, HE577797.1, HE577796.1)	98.52	85.87	92.16	76.82	88.35
<i>Pseudomonas mosselii</i> NZ CP009365.1	98.01	84.90	92.16	78.17	88.31
<i>Pseudomonas putida</i> NC 017986.1	98.49	86.43	91.94	75.97	88.21
<i>Pseudomonas soli</i> (HF930598.1, LN851840.1, HF930596.1, HF930597.1)	97.89	85.03	92.05	77.83	88.20
<i>Pseudomonas</i> sp NZ CP011525.1	98.40	86.85	91.94	75.47	88.17
<i>Pseudomonas putida</i> NC 009512.1	98.47	86.43	91.61	75.97	88.12
<i>Pseudomonas fulva</i> (AB060136.1, AB039395.1, AJ717419.1, AB039586.1)	97.82	85.87	90.73	78.00	88.11
<i>Pseudomonas parafulva</i> (AB060132.1, FN554216.1, AJ717471.1, FN554500.1)	97.82	86.01	90.84	77.33	88.00
<i>Pseudomonas</i> sp NZ LN865164.1	97.88	85.31	90.40	77.83	87.86
<i>Pseudomonas cremoricolorata</i> (AB060137.1, FN554181.1, AJ717476.1, FN554462.1)	98.24	84.76	90.29	76.99	87.57
<i>Pseudomonas parafulva</i> NZ CP019952.1	97.84	83.92	90.29	77.66	87.43

<i>Pseudomonas parafulva</i> NZ CP009747.1	93.89	87.13	90.29	78.00	87.33
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (X06684.1,AB039386.1,AJ717442.1,AB039607.1)	93.61	84.06	89.29	73.60	85.14

Filogenia de SNPs en el conjunto de genes compartidos por todos los genomas de *Pseudomonas* (core genome). La comparación de los 254 genomas completos disponibles para el género *Pseudomonas* y del genoma de *Pseudomonas* BBB001, realizada con el software BPGA, reveló que su core genome consta de 585 familias génicas, representando tan solo el 0.05 % del contenido total de familias génicas de este grupo. La gran mayoría de las familias que constituyen el core genome están asociadas a funciones de traducción y biogénesis de ribosomas, o de metabolismo y transporte de aminoácidos.

Tras extraer del grupo de familias del core genome los genes ortólogos (275 genes), se identificaron un total de 164394 posiciones polimórficas (single nucleotide polymorphisms, SNPs) en los 254 genomas. En base a las SNPs se obtienen cinco grandes grupos bien diferenciados, que concuerdan en general con la filogenia del género *Pseudomonas* presentada en Gomila et al. 2015 (Frontiers in Microbiology 6:214):

- Grupo de *P. aeruginosa*, *P. denitrificans*, *P. knackmussii* y *P. citronellolis*. (102 genomas)
- Grupo de *P. stutzeri*, al que pertenece también *P. balearica*. (11 genomas)
- Grupo de *P. syringae*, en el que se encuentran también *P. amygdali*, *P. savastanoi*, *P. viridiava* y *P. cichorii*. (22 genomas)
- Grupo de *P. fluorescens*, que incluye a otras especies como *P. mandelii*, *P. koreensis*, *P. brassicacearum*, *P. protegens* o *P. fragi*. (57 genomas)
- Grupo de *P. putida*, dentro del que se encuentra *Pseudomonas* BBB001. (43 genomas)
- Otros grupos: (19 genomas)

El grupo de *P. putida* engloba a un total de 43 de los 254 genomas analizados completos y disponibles en bases de datos. Además de todos los genomas pertenecientes a *P. putida*, en este grupo se encuentran otras especies como *P. monteilii* o *P. parafulva*. En concordancia con los resultados del MLSA, *Pseudomonas* BBB001 forma un subgrupo estadísticamente bien apoyado con la especie *P. alkylphenolica* y *Pseudomonas* sp. NZ CP024478.1 (cepa HLS-6). Dentro de este subgrupo no es posible hacer una comparación directa con los resultados del MLSA, ya que las especies *P. japónica* y *P. vranovensis* no

disponen de genomas completos publicados y, por tanto, no están incluidas en el análisis del core genome. Sin embargo, si bien la filogenia del MLSA no permitió resolver la posición filogenética de *Pseudomonas* BBB001 con respecto a las demás especies, la filogenia de SNPs proporcionó mayor resolución, recuperando a *Pseudomonas* BBB001 como el linaje basal de este subgrupo (es decir, *Pseudomonas* BBB001 fue la primera en separarse de *P. alkylphenolica* y *Pseudomonas* sp. cepa HLS-6).

Filogenia basada en la presencia o ausencia de familias de genes homólogos en el pan-genome. El análisis comparativo de los 254 genomas reveló la presencia de un total de 65137 familias de genes accesorios en el pan-genome. La información sobre la presencia o ausencia de genes en cada genoma fue transformada en una matriz binaria.

En general, la filogenia obtenida a partir de la información sobre la presencia / ausencia de genes en el pan-genome fue similar a la obtenida en base al análisis de SNPs, aunque se observó alguna diferencia significativa. Por ejemplo, el grupo de *P. stutzeri*, que según la filogenia de SNPs es más cercano al grupo de *P. putida* que *P. aeruginosa*, aparece como el grupo basal, el más divergente de todos los analizados, en base a su contenido de genes accesorios.

En la filogenia del pan-genome, *Pseudomonas* BBB001 forma parte también del grupo de *P. putida*, constituyendo un subgrupo bien diferenciado junto a *P. alkylphenolica* y *Pseudomonas* sp. NZ CP024478.1 (cepa HLS-6). En este caso, al contrario que en la filogenia de SNPs, el análisis establece, con un valor de apoyo significativo, una relación más estrecha entre *Pseudomonas* BBB001 y *Pseudomonas* sp. (cepa HLS-6). Es probable, por tanto, que el repertorio de genes accesorios de *Pseudomonas* BBB001 sea más similar al de *Pseudomonas* sp. (cepa HLS-6) que al de *P. alkylphenolica*.

II. Pruebas de *Pseudomonas palmensis* como estimulante del metabolismo adaptativo de las plantas frente a estrés abiótico y mejoradora de la nutrición de hierro. –

1º. Experimento de inoculación directa de *Pseudomonas palmensis* en planta modelo (*Arabidopsis thaliana*). Experimento realizado en cámara de experimentación en condiciones controladas de luz humedad y temperatura sobre un total de 42 plantas y un N = 3, con un modelo de bloques aleatorios- se inoculó una suspensión celular de la cepa en plántulas pregerminadas de *A.thaliana* a las 2 y 5 semanas de la germinación. A las 6 semanas se

midieron los parámetros fotosintéticos de fluorescencia (F0, Fv/Fm, PSII, NPQ) se cosecharon las plantas, y se pesaron y se analizaron las actividades enzimáticas relacionadas con el *scavenging* de ROS (SOD, APX, CAT), y ciclo del Ascorbato glutathion (dehidroascorbato reductasa - DHR, monodehidroascorbato reductasa-MDHR, glutatión reductasa-GR). Se observó un aumento significativo de la capacidad de disipar energía (Non photochemical quenching-NPQ) y el perfil metabólico de enzimas relacionados con el control del estrés oxidativo consiste en un aumento significativo de la actividad catalasa (CAT) y glutatión reductasa (GR), y una disminución de la actividad APX. Se registró un aumento de peso fresco.

2°. Experimento de inoculación directa de *Pseudomonas palmensis* en mora (*Rubus* var. Lochness) en invernaderos de producción. Experimento realizado en condiciones reales de producción en campo sobre un total de 120 plantas y n=3, con un modelo experimental de bloques aleatorios. Se aplicaron suspensiones celulares de la cepa a nivel radical durante los 6 meses que dura el ciclo de producción, dos veces al mes de octubre a marzo. Se recogió la producción total y se determinaron dos momentos de muestreo, el floración y fructificación plenas. En cada momento se midieron los parámetros fotosintéticos de fluorescencia (F0, Fv/Fm, PSII, NPQ) y se cogieron hojas, donde se analizaron los pigmentos fotosintéticos y las actividades enzimáticas relacionadas con el *scavenging* de ROS (SOD, APX, CAT), y ciclo del Ascorbato-glutation (dehidroascorbato reductasa-DHR, monodehidroascorbato reductasa-MDHR, glutatión reductasa-GR); se valoró el potencial antioxidante (capacidad de inhibir la oxidación del B-caroteno) y los niveles de malondialdehído-MDA, indicador del estado oxidativo de la célula. Se observó un aumento significativo de la capacidad de disipar energía (Non photochemical quenching-NPQ) y una disminución en clorofila B en ambos momentos de muestreo; el perfil metabólico de enzimas relacionados con el control del estrés oxidativo consiste en un aumento significativo de la actividad superóxido dismutasa (SOD) y monodehidroascorbato reductasa (MDHA), y una disminución de la actividad ascorbato peroxidasa (APX), asociado a una mejora en el potencial antioxidante y un nivel de malondialdehído ligeramente inferior al control en fructificación. Se registró un aumento en la producción de fruta.

3°. Experimento de estimulación del metabolismo adaptativo en condiciones de salinidad en tomate (var Casillas). Este experimento se realizó en invernadero en condiciones controladas de luz humedad y temperatura sobre un total de 336 plantas, 4 tratamientos, 3R por tratamiento, n=28, organizado en bloques aleatorios. Se germinaron las semillas de tomate en macetas, realizando 3 aplicaciones con una suspensión bacteriana a las 2, 4 y 6

semanas de la germinación; se aplicó una solución de NaCl 500 mM en el riego durante una semana, se mantuvo el riego normal durante una semana más, tras la cual se midió el potencial hídrico con cámara Scholander y se determinó el peso seco de raíz, de parte aérea y altura. Se observó una disminución significativa de la altura y el peso aéreo, un aumento del potencial hídrico y un aumento de prolina, osmolito relacionado con la resistencia a estrés hídrico. En este experimento se ensayó también la combinación de *P.palmensis* con otra pseudomonas *P.fluorescens* CECT9015. Se observó que la combinación de ambas producía aumentos significativos en altura y peso seco de raíz, así como un aumento en el potencial hídrico y un aumento significativo en la prolina, siendo este efecto sinérgico según Colby (<http://www.jstor.org/stable/4041058>) ya que la cepa CECT9015 de forma individual no era responsable de estos incrementos.

4°. Se realizó un experimento en olivo superintensivo de regadío, reduciendo el riego un 25% sobre lo habitual (eliminando un riego de cada 4). Se ensayó la cepa de *Pseudomonas* BBB001 en aplicación radical. Las aplicaciones se realizaron cada 15 días desde abril hasta septiembre (12 aplicaciones). El número de plantas en el ensayo eran 20 por tratamiento (3 más el control, con los dos regímenes de riego, (100% agua y 75% agua). El muestreo de seguimiento (septiembre) previo a la cosecha indicó que la cepa BBB001 aplicada a nivel radical provocaba un incremento de peso fresco en las aceitunas del 44.52% sobre el control con agua (peso medio de 20 frutas, n=3), y de un 45.96% sobre el control con reducción de agua, alcanzando el mismo peso las aceitunas tratadas con BBB001 en los dos regímenes de riego.

5°. Experimento de reversión de clorosis férrica en plantas de tomate (var. Casillas). Experimento realizado en invernadero en condiciones controladas de luz humedad y temperatura sobre un total de 216 plantas, 9 tratamientos, 24 plantas por tratamiento organizadas en 3 réplicas, siguiendo un modelo experimental de bloques aleatorios. El sustrato se mantuvo a pH básico con tampón bicarbonato sódico 5mM durante todo el experimento. Se germinaron las semillas en macetas de sustrato, regando con solución de Hoagland sin hierro una vez a la semana, durante 8 semanas, hasta que apareció la clorosis. Desde que apareció la clorosis, se empezaron a regar con Hoagland con Fe, aportando el Fe en forma insoluble (Cl_3Fe), manteniendo un control con solución de Hoagland completo con Fe soluble; se aplicaron 3 dosis de bacterias con una diferencia de 4 días entre aplicaciones. A las 2 semanas, se había revertido la clorosis, se midieron los parámetros fotosintéticos de fluorescencia (F_0 , F_v/F_m , PSII, NPQ) y se cosecharon las plantas. Se analizó el peso seco, pigmentos fotosintéticos, y análisis foliar de nutrientes. Se

observó un aumento en F_o , F_v/F_m y ΦPSR , y una disminución en la disipación energética (NPQ), junto con un aumento en pigmentos fotosintéticos (clorofila a, b y carotenos) indicando una mejora en el fitness de la planta. El análisis de nutrientes indicó un aumento en la concentración de hierro de un 25%, así como una mejora en el contenido en Zinc, y un aumento del 8,46% y 1,3% en el análisis de la absorción del fósforo y potasio, respectivamente.

En este mismo experimento, se ensayaron 1) *P. palmensis* crecida en caldo nutritivo (resultados indicados arriba), y 2) *P. palmensis* crecida en medio de producción de sideróforos, 3) metabolitos bacterianos contenidos en el medio de cultivo responsables de la movilización de Fe insoluble (medio de sideróforos). En general, los resultados fueron similares para peso seco y pigmentos, destacando siempre *P. palmensis*. También se ensayaron todos estos tratamientos, combinados con una cepa de la especie *Arthrobacter oxydans* Código CECT productora de auxinas. En general, los resultados fueron similares para peso seco y pigmentos, destacando siempre *P. palmensis* sola; sin embargo, la combinación *P. palmensis* con *Arthrobacter oxydans* Código CECT tuvo un efecto sinérgico según Colby (<http://www.jstor.org/stable/4041058>) en la absorción de Fe, incrementando un 36.4% el contenido en Fe con respecto al control y al efecto de cada cepa de forma individual. Así mismo se observó un aumento del 1,5%, 9,7% y 9,5% en el análisis de la absorción del nitrógeno, fósforo y potasio.

APLICACIÓN INDUSTRIAL. –

Dadas las propiedades arriba apuntadas de *Pseudomonas palmensis* BBB001 como estimulador del metabolismo adaptativo a estrés abiótico mejorando el balance oxidativo de la planta, modulando la actividad de los enzimas relacionados con el scavenging de ROS y por su capacidad de movilizar nutrientes, concretamente hierro, nitrógeno, fósforo y potasio, esta cepa bacteriana tiene una aplicación específica en la industria agroalimentaria, química y farmacéutica, al poder ser utilizada formando parte de cualquier preparado (de forma individual o en combinación con otros microorganismos) y haciéndolas entrar en contacto (a la cepa o cualquier parte de ella) con la semilla, el sistema radical o aéreo de las plantas por cualquier medio disponible, en cualquier especie vegetal, o en cualquier forma de cultivo in vitro, para incrementar la capacidad de adaptación de la cepa a condiciones de estrés abiótico y mejorar la nutrición mineral, concretamente hierro, nitrógeno, fósforo y potasio.

REIVINDICACIONES

- 5 **1. Cepa bacteriana *Pseudomonas palmensis* BBB001 (Número de depósito CECT 30222)**, microorganismo del grupo de las bacterias Gram –, género *Pseudomonas*, **caracterizada** por comprender una secuencia de nucleótidos correspondiente a la SEQ ID NO: 1 a 41, donde uno o varios de estos 41 genes únicos característicos de la cepa aislada codifican formulaciones para la producción de sustancias o compuestos a escala industrial.
- 10 **2. Cepa bacteriana *Pseudomonas palmensis* BBB001 (CECT 30222)**, según reivindicación 1, **caracterizada** por su capacidad estimulante del metabolismo adaptativo a estrés abiótico en especies vegetales, modulando la respuesta oxidativa mediante inducción del metabolismo implicado en la eliminación de los radicales libres producidos en la situación de estrés, mejorando el crecimiento y la producción vegetal.
- 15 **3. Cepa bacteriana *Pseudomonas palmensis* BBB001 (CECT 30222)**, según reivindicación 2, **caracterizada** por su capacidad de aumento de la actividad de los enzimas de scavenging de ROS en especies vegetales.
- 20 **4. Cepa bacteriana *Pseudomonas palmensis* BBB001 (CECT 30222)**, según reivindicación 2, **caracterizada** por su capacidad de aumento de la disipación del exceso de energía fotosintética responsable de la generación de radicales libres ROS (NPQ) en especies vegetales.
- 25 **5. Cepa bacteriana *Pseudomonas palmensis* BBB001 (CECT 30222)**, según reivindicación 1, **caracterizada** por su capacidad estimulante de la absorción de hierro, fósforo y potasio, mejorando la nutrición mineral.
- 30 **6. Uso de *Pseudomonas palmensis* BBB001 (CECT 30222)**, o cualquier molécula o formulación bacteriana derivada de ella, o de los metabolitos del caldo de cultivo de la cepa, en cualquier proporción, según reivindicaciones 1 y 2, para su aplicación en cualquier tipo de cultivo agrario o forestal, a fin de mejorar la adaptación de la planta a cualquier condición de estrés abiótico.
- 35 **7. Uso de *Pseudomonas palmensis* BBB001 (CECT 30222)**, o cualquier molécula o formulación bacteriana derivada de ella, o de los metabolitos del caldo de cultivo de la cepa,

en cualquier proporción, según reivindicaciones 1 y 2, para su aplicación en cualquier especie vegetal en condiciones de salinidad.

5 **8.** Uso de *Pseudomonas palmensis* BBB001 (CECT 30222), o cualquiera de sus partes, según reivindicaciones 1 y 2, para su aplicación en cualquier especie vegetal, con el objeto de mejorar la respuesta frente a estrés, aumentando la producción.

10 **9.** Uso de *Pseudomonas palmensis* BBB001 (CECT 30222), o cualquier molécula o formulación bacteriana derivada de ella, o de los metabolitos del caldo de cultivo de la cepa, en cualquier proporción, según reivindicaciones 1 y 5, para su aplicación en cualquier especie de plantas para mejorar la nutrición mineral, en hierro, fósforo y potasio.

15 **10.** Uso de *Pseudomonas palmensis* BBB001 (CECT 30222), o cualquier molécula o formulación bacteriana derivada de ella, según reivindicaciones 1 a 7, formando parte de cualquier preparado, ya sea individualmente o en combinación con otros organismos, y por cualquier medio disponible que ponga la bacteria en contacto con la semilla, el sistema radical o aéreo de las plantas.

20 **11.** Uso de *Pseudomonas palmensis* BBB001 (CECT 30222), o cualquier molécula o formulación bacteriana derivada de ella, según reivindicación 10, en combinación con *Pseudomonas fluorescens* (CECT 9015), o formando parte de cualquier preparado con *Pseudomonas fluorescens* (CECT 9015), para mejorar la respuesta a estrés salino.

25 **12.** Uso de *Pseudomonas palmensis* BBB001 (CECT 30222), o cualquier molécula o formulación bacteriana derivada de ella, según reivindicación 10, en combinación con *Arthrobacter oxydans* (CECT 30231), o formando parte de cualquier preparado con *Arthrobacter oxydans* (CECT 30231, para mejorar la nutrición mineral en hierro, nitrógeno, fósforo y potasio, tanto en agricultura ecológica como convencional.

30 **13.** Uso de genes específicos de *Pseudomonas palmensis* BBB001 (CECT 30222), según reivindicación 1, para expresión heteróloga para obtener productos que contengan materia biológica de la cepa.



- ②① N.º solicitud: 202031185
②② Fecha de presentación de la solicitud: 26.11.2020
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **C12N1/20** (2006.01)
C12R1/38 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	FERREIRA MARIA J et al. "Siderophore-Producing Rhizobacteria as a Promising Tool for Empowering Plants to Cope with Iron Limitation in Saline Soils: A Review". Pedosphere, 20190718 ELSEVIER, AMSTERDAM, NL. , 18/07/2019, Vol. 29, Nº 4, Páginas 409 - 420, ISSN 1002-0160, <DOI: doi:10.1016/S1002-0160(19)60810-6>. (ver Tabla 1)	1-12
A	RAJKUMAR M BRUNO L B BANU J R. "Alleviation of environmental stress in plants: The role of beneficial <i>Pseudomonas</i> spp.". Critical Reviews in Environmental Science and Technology 20170319 Taylor and Francis Inc. usa. , 19/03/2017, Vol. 47, Nº 6, Páginas 372 - 407, ISSN 1064-3389 (print) ISSN 1547-6537 (electronic), <DOI: doi:10.1080/10643389.2017.1318619>. todo el documento.	1-12
A	SAH STUTI et al. "Iron acquisition in maize (<i>Zea mays</i> L.) Using <i>Pseudomonas</i> siderophore". 3 Biotech MAY 31 2017. 31/05/2017, Vol. 7, Páginas Article No.: 121, ISSN 2190-572X(print) ISSN 2190-5738(electronic), <DOI: doi:10.1007/s13205-017-0772-z>. Todo el documento.	1-12
A	ADITI BHATTACHARYA. "Siderophore mediated metal uptake by <i>Pseudomonas fluorescens</i> and its comparison to iron (III) chelation". Ceylon Journal of Science (Biological Sciences), 01/01/2010, Vol. 39, Nº 2, Páginas 147-155. todo el documento.	1-12

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☐ para todas las reivindicaciones

☒ para las reivindicaciones nº: 1-12

Fecha de realización del informe
04.03.2021

Examinador
M. d. García Coca

Página
1/2

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N, C12R

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE/NLM, XPESP, EMBASE/Elsevier y Bases de Datos TXT