



**Universitat de les
Illes Balears**

Facultad de Ciencias

Memoria del Trabajo de Fin de Grado

Análisis *multilocus* de especies del género *Pseudomonas* de origen clínico.

Noelia Gutiérrez García

Grado de Biología

Año académico 2013-14

DNI del alumno: 43161600F

Trabajo tutelado por: Dra. Elena García-Valdés Pukkits.
Departamento de Biología, área de Microbiología.

Se autoriza a la Universidad a incluir mi trabajo en el Repositorio Institucional para su consulta en un acceso abierto y difusión en línea con finalidades exclusivamente académicas y de investigación.

Palabras clave del trabajo:

Filogenia molecular, análisis *multilocus* de secuencias (MLSA), DNA ribosómico 16S, *rpoD*, *gyrB*, *Pseudomonas*, dendrograma.

ÍNDICE DE CONTENIDO

Pág.

1. INTRODUCCIÓN GENERAL	
1.1. Descripción del Género <i>Pseudomonas</i> .	5
1.2. Métodos de estudio filogenéticos.	7
1.2.1. Análisis de secuencias <i>Multilocus</i> (MLSA).	7
1.2.1.1. Genes específicos para la amplificación de DNA de <i>Pseudomonas</i> . Cebadores específicos del gen <i>rpoD</i> . Características.	7
1.3. Organización del Género <i>Pseudomonas</i> en linajes, grupos y subgrupos por MLSA.	9
2. OBJETIVOS	11
3. MATERIAL Y MÉTODOS	12
3.1. Cepas utilizadas en este estudio.	12
3.2. Amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	13
3.3. Purificación de los productos de PCR.	14
3.4. Secuenciación.	15
3.5. Análisis filogenético de las secuencias.	16
3.5.1. Alineamiento de las secuencias obtenidas.	16
3.5.2. Concatenado de las secuencias obtenidas.	16
3.5.3. Construcción de árboles filogenéticos.	16
3.5.4. Criterios para discriminar la asignación a nuevas especies.	16
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	18
4.1. Análisis y asignación de las cepas estudiadas a los grupos o subgrupos del Género <i>Pseudomonas</i> .	19
POSIBLES NUEVAS ESPECIES DEL GÉNERO PSEUDOMONAS	20
4.1.1. Análisis de las cepas afiliadas al linaje <i>P. fluorescens</i> .	20
4.1.1.1. Análisis de las cepas afiliadas al subgrupo <i>P. fluorescens</i> .	20
4.1.1.2. Análisis de las cepas afiliadas al grupo <i>P. lutea</i> .	22
4.1.1.3. Análisis de las cepas afiliadas al grupo <i>P. putida</i> .	22
4.1.2. Análisis de las cepas afiliadas al linaje <i>P. aeruginosa</i> .	23
4.1.2.1. Análisis de las cepas afiliadas al grupo <i>P. stutzeri</i> .	23
4.1.2.2. Análisis de las cepas afiliadas al grupo <i>P. oleovorans</i> .	24
4.1.2.3. Análisis de las cepas afiliadas al grupo <i>P. aeruginosa</i> .	25
CEPAS ASIGNADAS A ESPECIES DEL GÉNERO PSEUDOMONAS	27
4.2. Distribución de las cepas estudiadas.	28
4.2.1. Cepas asignadas a especie.	28
4.2.2. Cepas candidatas a nuevas especies.	29
4. CONCLUSIONES	31
5. AGRADECIMIENTOS	31
6. REFERENCIAS	31

RESUMEN

Veintiséis cepas del género *Pseudomonas* fueron aisladas de muestras hospitalarias obtenidas del Hospital Son Espases en Palma de Mallorca y del Departamento de Microbiología de la Universidad de Gotemburgo (Suecia). Los microorganismos que no habían podido ser clasificados a nivel de especie por la metodología de rutina clínica, se propusieron como objeto de estudio. La finalidad de este trabajo es llegar a asignar estas cepas a una especie conocida o identificar posibles especies nuevas. Todas las cepas eran bacterias del género *Pseudomonas*: morfología de bacilo, Gram negativas, con un flagelo de inserción polar, oxidativas estrictas y capaces de crecer a 18-37°C, pH 6-10 y 2-10% de NaCl. Para poder identificar las diferentes cepas, se secuenció el gen *rpoD* y si éste no era suficiente para asignar la cepa a una especie conocida, se secuenciaron dos genes adicionales de cada una de ellas: DNA ribosómico 16S y el gen *gyrB*. Mediante las secuencias de estos tres genes de cada una de las cepas a estudiar y de las secuencias de los genes de 158 cepas tipo conocidas (base de datos de especies conocidas del Laboratorio de Microbiología de la UIB), se realizó un análisis *multilocus* de las secuencias (MLSA). De este modo se pudo comparar y hallar la similitud entre las cepas a identificar y las 158 cepas tipo conocidas. Si el valor de similitud de las cepas a identificar con respecto a las cepas conocidas es mayor al umbral del 97%, establecido para discriminar especies del género *Pseudomonas*, se puede establecer que dicha cepa que presenta un valor mayor del 97% con una determinada cepa tipo, es de esa misma especie. De las veintiséis cepas a estudiar, ocho se han podido asignar a cepas tipo conocidas y el resto, dieciocho, se han establecido en diferentes grupos y se ha considerado que pueden pertenecer a ocho hipotéticas nuevas especies.

ABSTRACT

Twenty-six strains of the genus *Pseudomonas* were isolated from samples obtained from Son Espases Hospital in Palma de Mallorca and of the Clinical Microbiology Department of the Gothenburg University (Sweden). The microorganisms that have not been classified to a known species by routine clinical methodologies were the subject of this work. The purpose was to assign these strains to a known type species or to characterize them phylogenetically as possible new species. All the strains were *Pseudomonas* bacteria: morphologically Gram-negative bacilli with a polarly inserted flagellum, with strictly oxidative metabolism and they were able to grow at 18-37°C, pH 6-10 and 2-10% NaCl. In order to identify the different strains, the *rpoD* gene was sequenced and when this sequence was not sufficient to assign the strain to a known species type strain, two additional genes of each strain were sequenced: 16S ribosomal DNA and *gyrB* genes. Using the nucleotide sequences of these three genes from each of the strains studied and the gene sequences of 158 known type strains (*Pseudomonas* type strains database of the UIB Microbiology Laboratory) a *multilocus* analysis of the sequences was performed (MLSA). The similarities between the strains to be identified and the 158 known type strains were determined. When the value of similarity of the strains to be identified with a known species type strain was higher than the threshold of 97%, which discriminates the *Pseudomonas* species, the strain was assigned to the corresponding species. Of the twenty-six strains studied, eight strains, have been assigned to a known species and the remaining eighteen strains have been assigned to a different groups. There are considered hypothetical eight new species.

1.- INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1.- Descripción del género *Pseudomonas*.

El género *Pseudomonas* fue descrito por primera vez por Migula (1895) de acuerdo con sus características y desde entonces los miembros del género se han aislado de seres humanos, plantas y diversos hábitats como suelos y aguas (Roland y Stroman, 2002; Munsch *et al.*, 2002; Ivanova *et al.*, 2002; Sikorski *et al.*, 2001).

Todas las especies incluidas en el género *Pseudomonas* son bacilos rectos o ligeramente curvados pero no helicoidales que presentan un tamaño de 5-1,0 μm por 1,5-5,0 μm , aunque las células de las diferentes cepas pueden diferir sustancialmente en tamaño y forma. Presentan flagelos polares que pueden ser únicos (**Figura 1**) o múltiples; en algunas especies se puede formar un flagelo lateral (*P. mendocina* y *P. stutzeri*) (Palleroni, 1984). En estudios de Fuerst y Hayward (1969) se han identificado fimbrias de inserción polar en *P. aeruginosa* y *P. alcaligenes*. Raramente son inmóviles.

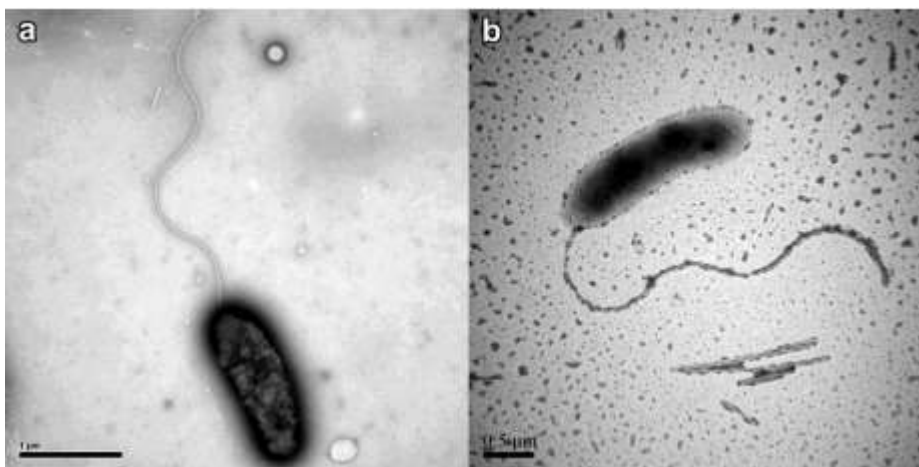


Figura 1.- Micrografía electrónica de transmisión de células de la especie *Pseudomonas yangmingensis* mostrando un único flagelo polar. Bacterias creciendo en a) medio mineral con sulfato y b) medio modificado (Wong *et al.*, 2014).

Son bacterias Gram negativas. Una de las características principales del género es la producción de pigmentos pero en muchos casos, las colonias manifiestan diversos colores que se deben a la acumulación de componentes celulares y no a la presencia de pigmentos. No presentan cubiertas, vainas, apéndices o yemas. No forman esporas (no existen etapas de resistencia conocidas).

La mayoría de especies no acumulan gránulos de polibeta-hidroxibutirato (PHB) (carácter morfológico usado para diferenciar los miembros del género *Pseudomonas* de otras pseudomonadáceas aeróbicas), pero la acumulación de polihidroxialcanoatos (PHA) de monómeros de longitud superior a cuatro carbonos puede ocurrir cuando crecen en medios con alcanos o gluconatos.

Las especies del género *Pseudomonas* son aeróbicas, con un metabolismo estrictamente respiratorio, nunca fermentativo aunque pueden producir pequeñas cantidades de ácido a partir de glucosa anaeróticamente. Utilizan el oxígeno como aceptor de electrones pero en algunos casos el nitrato puede usarse como un aceptor alternativo de electrones, permitiendo el crecimiento anaeróticamente mediante el proceso de desnitrificación.

La mayoría de las especies no requiere factores de crecimiento orgánicos y pueden crecer en medios mínimos con iones de amonio o nitrato como fuente de nitrógeno y con un único compuesto orgánico como fuente de carbono y energía. Pueden producir sideróforos y son muy sensibles a las limitaciones de hierro. No forman gas a partir de glucosa. Algunas especies son quimiolitótrofas y

usan H₂ o CO como único donador de electrones. Otras pueden usar arginina como fuente de energía en anaerobiosis.

Los miembros del género *Pseudomonas* son conocidos por su capacidad de degradación aeróbica de numerosos hidrocarburos, compuestos aromáticos y sus derivados, que son compuestos naturales y productos finales o intermediarios de actividades industriales.

Son oxidasa positivos o negativos y catalasa positivos. Las cepas pueden incluir en sus membranas ácidos grasos hidroxilados y pueden contener ubiquinona 9, usado como marcador quimiotaxonómico. El contenido de G+C del DNA es de 58-69%.

Tienen unos requerimientos nutricionales muy sencillos y crecen quimioorganotróficamente a pH neutro y a temperaturas en el rango de los mesófilos. La temperatura óptima para el crecimiento de la mayoría de las especies es aproximadamente 28°C aunque su rango de crecimiento generalmente oscila entre 18 y 37°C. Algunas especies pueden crecer a temperaturas cercanas a 4°C y por lo tanto, pueden considerarse psicrófilas en este caso. Para otras especies la temperatura máxima a la que pueden crecer es 45°C. Ninguno de los miembros del género tolera condiciones ácidas y el crecimiento es inviable a pH menor a 4.5.

Están ampliamente distribuidas en la naturaleza y se encuentran ubicuamente en suelos y ecosistemas acuáticos y son también importantes por su potencial biotecnológico como degradadores de un elevado número de compuestos orgánicos o por la producción de moléculas bioactivas. Unas se caracterizan por sus interacciones con plantas y asociaciones en la rizosfera que son ventajosas para la agricultura en tanto que otras se presentan como unas de las bacterias más peligrosas, oportunistas patógenos de animales, plantas y humanos.

El género *Pseudomonas* se puede decir que es uno de los géneros ecológicamente más relevantes (Guttman *et al.*, 2004). Las cepas de *Pseudomonas* son ambientalmente importantes en el reciclado de nutrientes, pero también en medicina y biotecnología (Figura 2).

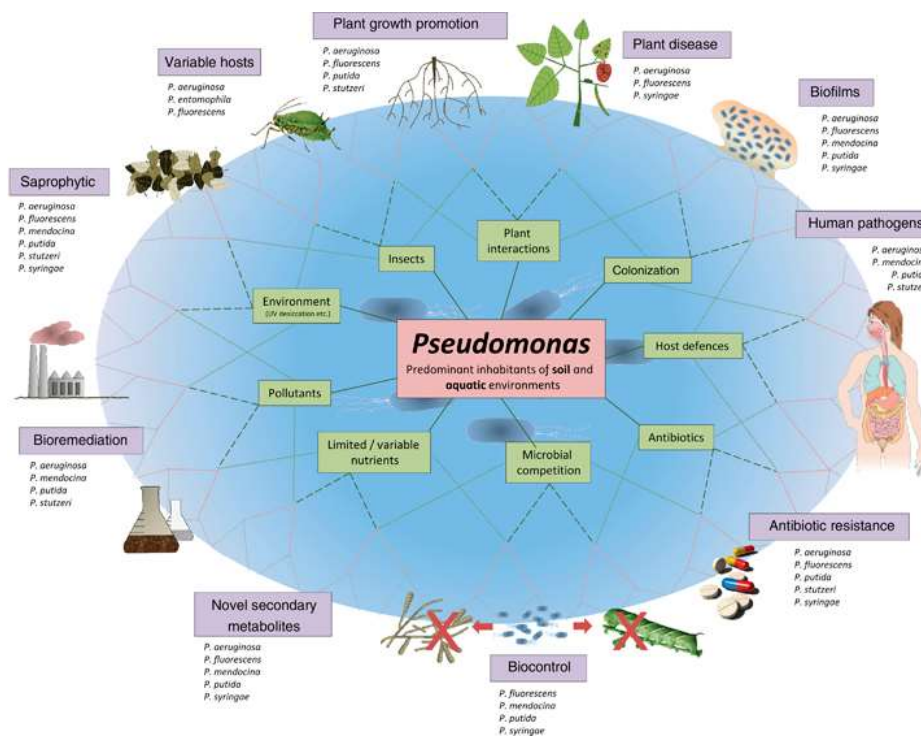


Figura 2.- Visión general de la importancia ecológica del género *Pseudomonas* (Silby *et al.*, 2011).

El género *Pseudomonas* es uno de los más diversos y su taxonomía ha sufrido muchos cambios desde su descubrimiento (Palleroni, 1984). En 1984, el género fue dividido en 5 grupos basándose en los resultados de la hibridación DNA-DNA y de la hibridación rRNA-DNA. Los miembros actuales del género *Pseudomonas* (*sensu stricto*) pertenecen al grupo RNA I, a la clase Gammaproteobacteria.

Desde 1960, el número de nuevas especies conocidas ha crecido debido a la aplicación de técnicas bioquímicas y fisiológicas en el estudio de la taxonomía de las bacterias. Hasta ahora, el género *Pseudomonas* es el género de bacterias Gram negativas con el número más alto de especies: 149 han sido reconocidas (se puede observar en la lista Euzéby de procariotas: <http://www.bacterio.net/pseudomonas.html>). El número de las especies que se describen crece continuamente, por ejemplo en el año 2014 hasta Junio han sido descritas varias especies como: *Pseudomonas hunanensis* (Gao *et al.*, 2014), *Pseudomonas sihuiensis* (Wu *et al.*, 2014), *Pseudomonas helmaticensis* (Ramírez-Bahena *et al.*, 2014) y *Pseudomonas hussainii* (Hameed *et al.*, 2014).

1.2.- Métodos de estudio filogenéticos.

El análisis filogenético de las secuencias permite estimar las relaciones existentes entre las cepas estudiadas y cuál es la distancia evolutiva que las separa.

1.2.1.- Análisis de secuencias *Multilocus* (MLSA).

El análisis de secuencias *Multilocus* se basa en la combinación de múltiples genes para el estudio de las relaciones filogenéticas. Los resultados obtenidos en el MLSA pueden almacenarse en base de datos y ser consultados vía Internet.

Moore y colaboradores (1996) y Anzai y colaboradores (2000) publicaron sus estudios de filogenia de *Pseudomonas* basándose solamente en el análisis del DNA ribosómico 16S. Más tarde, Yamamoto y colaboradores incorporaron el uso de los genes *gyrB* y *rpoD* en la caracterización inicial de cepas de *Pseudomonas putida* y otras 31 especies del género *Pseudomonas* (Yamamoto *et al.*, 1998, 2000) y analizaron filogenéticamente 23 taxones.

Mulet y colaboradores (2010) combinaron las secuencias parciales de los genes DNA ribosómico 16S, *gyrB*, *rpoB* y *rpoD* de 107 cepas del género *Pseudomonas*. El trabajo demostró que los análisis de tres de estos genes concatenados (DNA ribosómico 16S, *gyrB* y *rpoD*) es suficiente para el análisis filogenético del género. En el 2012, se realizó una actualización del trabajo previo, utilizando 138 cepas tipo de *Pseudomonas* incluyendo nuevas cepas tipo de *Pseudomonas* recientemente descritas que fueron analizadas para comprender las relaciones filogenéticas del género *Pseudomonas* (Mulet *et al.*, 2012). Se estableció un criterio para la asignación de una cepa a una nueva especie a partir del 97% de similitud.

1.2. 1.1.- Genes específicos para la amplificación de DNA de *Pseudomonas*.

Diversos genes se han utilizado en el trabajo para delimitar la posición filogenética de especies del género *Pseudomonas*:

-**DNA ribosómico 16S**, marcador universal que permite la adscripción de cepas dentro del género y permite comparaciones con otras bacterias divergentes (Santos *et al.* 2004) aunque se ha demostrado que su resolución a nivel intragenérico es bajo (Moore *et al.* 1996, Anzai *et al.*, 2000; Yamamoto *et al.*, 2000).

-El **gen *gyrB*** codifica para la subunidad β de la DNA girasa, responsable del enrollamiento negativo del DNA. Es una enzima esencial para la viabilidad celular.

-El **gen *rpoD*** es el gen codificante de la subunidad *sigma* 70 de la RNA polimerasa. La unión del factor *sigma* a la RNA polimerasa le confiere especificidad para unirse al promotor en el inicio de la transcripción en procariotas. El factor sigma 70 es el factor *sigma* principal en la síntesis de proteínas.

En la **Figura 3** aparece la estructura de la subunidad β de la DNA girasa, la estructura de la subunidad sigma 70 de la RNA polimerasa y la estructura del DNA ribosómico 16S.

Los tres genes fueron comparados para seleccionar los genes más discriminativos y se usó en un análisis combinado para inferir la filogenia del género (Mulet *et al.*, 2010). Se construyó una matriz de las distancias filogenéticas para cada gen, incluyendo 107 cepas tipo y se determinaron las distancias entre parejas de cepas. El poder discriminativo de cada gen se calculó como el ratio entre la pendiente de *rpoD* y las pendientes de otros genes: *rpoD/gyrB* (2 veces) *rpoD/rpoB* (4 veces) *rpoD/ DNAr 16S* (16 veces). El gen más discriminativo analizado fue el *rpoD*, seguido por el *gyrB*, *rpoB* y finalmente DNA ribosómico 16S.

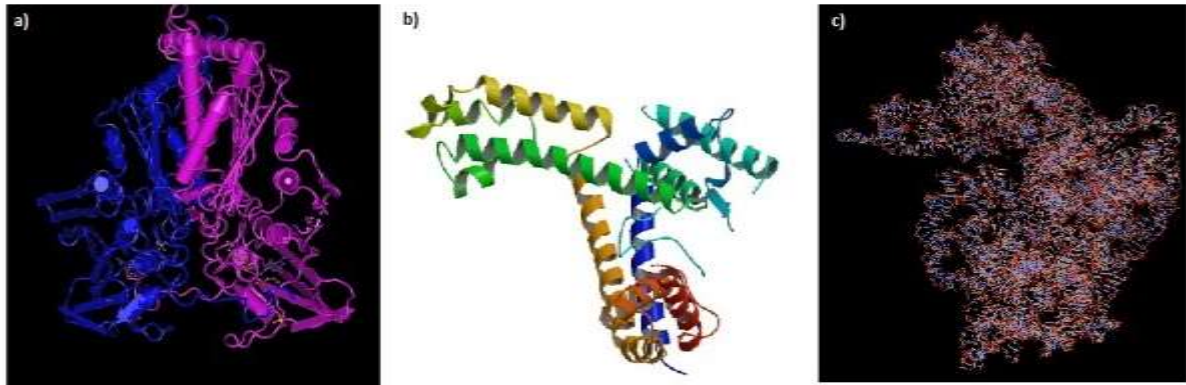


Figura 3.- Genes específicos para establecer la filogenia de *Pseudomonas*. a) Dímero de la subunidad β de la DNA girasa. b) Estructura cristalina de la subunidad sigma 70 de la RNA polimerasa de *Escherichia coli*. c) DNA ribosómico subunidad 16S.

Cebadores específicos del gen *rpoD*. Características.

El uso del DNA ribosómico 16S tiene inconvenientes en el género *Pseudomonas* debido al bajo poder discriminatorio. Para superar dichas limitaciones el Grupo de investigación en el área de Microbiología de la Universitat de les Illes Balears, desarrolló cebadores selectivos para la amplificación del gen *rpoD* (Mulet *et al.*, 2009). Dicho gen evoluciona mucho más rápidamente que los genes codificantes del RNA ribosómico y proporciona una resolución mucho más alta que los análisis de las secuencias de genes DNA ribosómico para la identificación de *Pseudomonas*.

Los cebadores 70F/70R para el gen *rpoD* fueron inicialmente diseñados por Yamamoto y colaboradores para el estudio de cepas de *P. putida* (Yamamoto *et al.*, 1998). Sus análisis combinados de secuencias *gyrB* y *rpoD* fueron estudiados en 30 cepas de *P. putida* y comparados con los resultados de la filogenia del RNA ribosómico 16S. Dichos autores extendieron posteriormente su estudio a otros miembros del género *Pseudomonas*, incluyendo 125 cepas de 31 especies (Yamamoto *et al.*, 2000).

El set de cebadores PsEG30F/PsEG790R se diseñó en el laboratorio de Microbiología de la Universitat de les Illes Balears (Mulet *et al.*, 2009), basándose en las secuencias disponibles del gen

rpoD de *Pseudomonas* de bases de datos que representan 35 especies de todos los clusters filogenéticos intragenéricos de *Pseudomonas*. **Figura 4.**

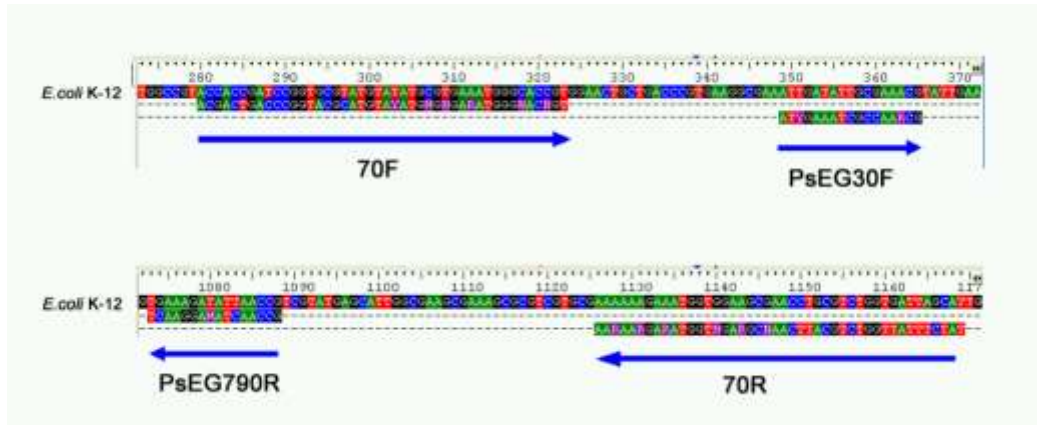


Figura 4.- Cebadores para la amplificación del gen *rpoD* de *Pseudomonas*.

Estos cebadores muestran solamente pocas degeneraciones, precisamente dos para el cebador “forward” y una para el “reverse”, con lo que se aumenta su especificidad. El único género que muestra similitud suficientemente significativa para ambos cebadores pertenece al género *Alcanivorax* (Mulet *et al.*, 2009) pero se ubica en ramas filogenéticamente separadas.

Los cebadores PsEG30F/PsEG790R amplificaron los fragmentos internos del gen *rpoD* de las 96 cepas tipos de *Pseudomonas* conocidos hasta el momento (Mulet y colaboradores, 2009).

1.3.- Organización del Género *Pseudomonas* en linajes, grupos y subgrupos por MLSA.

El género *Pseudomonas* se divide en dos linajes diferentes: linaje *Pseudomonas fluorescens* y linaje *Pseudomonas aeruginosa*.

El primer linaje intragenérico, *Pseudomonas fluorescens*, está dividido en 6 grupos (G) cada uno representado por las especies: *P. fluorescens*, *P. syringae*, *P. lutea*, *P. putida*, *P. anguilliseptica* y *P. straminea*. El grupo de *Pseudomonas fluorescens* a su vez está representado por las especies que designan a los correspondientes subgrupos (SG): *P. fluorescens*, *P. gessardi*, *P. fragi*, *P. mandelii*, *P. jesseni*, *P. koreensis*, *P. corrugata*, *P. chlororaphis* y *P. aspleni*.

El segundo linaje, de *P. aeruginosa*, se dividió en cuatro grupos, representados por las especies *P. aeruginosa*, *P. oleovorans*, *P. stutzeri* y *P. oryzihabitans* (Mulet *et al.*, 2010 y 2012).

En la **Figura 5** se puede observar un árbol filogenético donde se encuentran reflejados los dos linajes del género *Pseudomonas* y los diferentes grupos pertenecientes a cada uno ellos, así como los subgrupos dentro del grupo *P. fluorescens*.

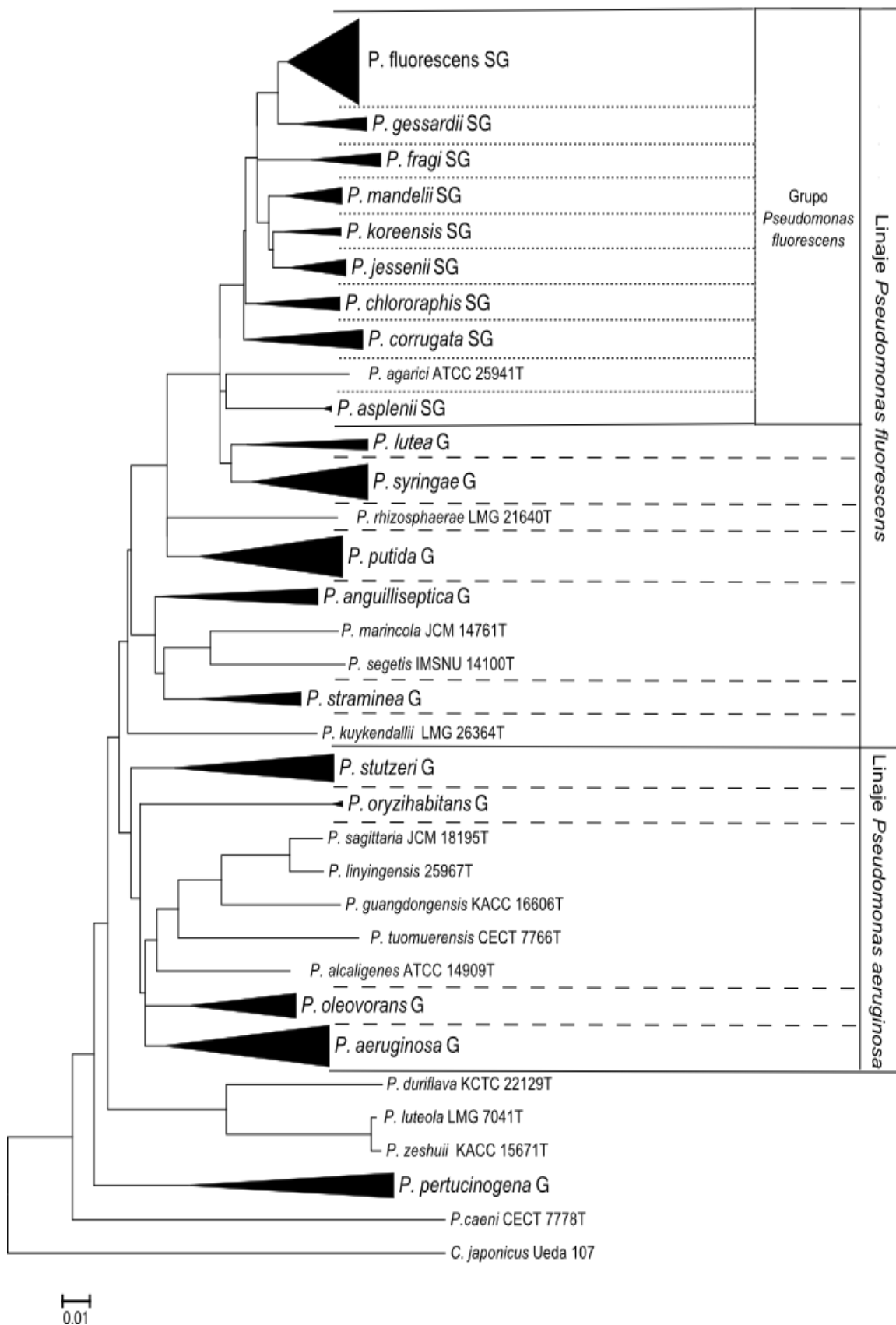


Figura 5.- Árbol filogenético de 158 cepas tipo del género *Pseudomonas*. La matriz de distancias fue calculada con el método Jukes-Cantor. El dendrograma fue generado por neighbor-joining. *Cellvibrio japonicum* Ueda 107 fue usado como "outgroup" (grupo externo). SG: Subgrupo. G: Grupo.

2.- OBJETIVOS

Una de las tareas fundamentales del laboratorio de microbiología clínica es la aplicación de una metodología precisa que permita la identificación de los microorganismos implicados en procesos clínicos asociados a infecciones o de aquellos que tienen relación con el hombre. Los laboratorios microbiológicos de nuestras islas: Son Espases, Son Llätzer, Hospital Comarcal de Inca aíslan numerosos microorganismos, de los cuales no todos pueden ser correctamente determinados por los métodos clásicos como sucede en las siguientes situaciones:

1. Cepas con escasa descripción.
2. Cepas con baja frecuencia de aislamiento
3. Cepas con fenotipos atípicos
4. Cepas de difícil identificación fenotípica
5. Cepas de crecimiento lento o fastidioso
6. Nuevos patógenos
7. Bacterias de difícil cultivo.

Las bacterias del género *Pseudomonas* que se incluyan en estas categorías se convierten en cepas candidatas para ser analizadas en este proyecto. Por otra parte, en el trabajo diario de estos laboratorios se necesitan soluciones rápidas y eficaces para la identificación de los microorganismos de interés médico. Por ello, en los últimos años hemos asistido a un crecimiento importante en la oferta de métodos moleculares rápidos aplicados al diagnóstico microbiológico. En general, acortan los tiempos de respuesta de los denominados métodos convencionales ya que no dependen del cultivo.

El objetivo de este Trabajo final de Grado es:

a) Obtener un determinado número de cepas del género *Pseudomonas* procedentes de Hospitales: Hospital Son Espases en Palma de Mallorca y del Departamento de Microbiología de la Universidad de Gotemburgo (Suecia) que no han podido ser clasificadas a nivel de especie por la metodología de rutina clínica.

b) Aplicar la metodología del análisis molecular de secuencias *Multilocus* para la asignación de estas cepas a especies conocidas de *Pseudomonas*. Se utilizarán para ello los cebadores específicos para la amplificación de los genes: DNA ribosómico 16S, *gyrB* y *rpoD* en la caracterización de nuevos aislamientos.

3.- MATERIAL Y MÉTODOS

3.1.- Cepas utilizadas en este estudio.

A continuación en la **Tabla 1** se especifican las cepas utilizadas en este estudio y se detalla el nombre de la cepa, el código, el año de aislamiento y la identificación de origen.

Tabla 1.- Cepas utilizadas en este estudio.

Cepa	Código	Año	Identificación de origen
CCUG 57209	C1	2012	<i>Pseudomonas</i> novel species
CCUG 62357	C4	2012	<i>Pseudomonas</i> novel species
CCUG 61232	C3	2012	<i>Pseudomonas</i> novel species
CCUG 59542	C15	2014	<i>Pseudomonas fluorescens</i> complex
CCUG 62864	C5	2012	<i>Pseudomonas</i> novel species (<i>P. fluorescens</i> complex)
CCUG 63715	C6	2012	<i>Pseudomonas</i> novel species (<i>P. fluorescens</i> complex)
CCUG 64025	C22	2014	<i>Pseudomonas</i> novel species
CCUG 64104	C23	2014	<i>Pseudomonas</i> novel species
SE2		2013	<i>Pseudomonas fluorescens/P. putida</i>
CCUG 61063	C17	2014	<i>Pseudomonas fluorescens</i> complex
CCUG 64255	C24	2014	<i>Pseudomonas</i> novel species
CCUG 64384	C27	2014	<i>Pseudomonas</i> sp.
CCUG 63225	C21	2014	<i>Pseudomonas graminis</i>
CCUG 59779	C21	2012	<i>Pseudomonas segetis</i>
CCUG 62879	C19	2014	<i>Pseudomonas</i> sp.
CCUG 64416	C28	2014	<i>Pseudomonas</i> sp.
SE1		2013	<i>Pseudomonas fluorescens/P. putida</i>
SE10		2013	<i>Pseudomonas fluorescens/P. putida</i>
CCUG 55707	C8	2014	<i>Pseudomonas peli</i>
CCUG 58342	C11	2014	<i>Pseudomonas</i> sp.
CCUG 58598	C12	2014	<i>Pseudomonas</i> sp.
CCUG 62222	C18	2014	<i>Pseudomonas marginalis</i>
SE4		2013	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
SE9		2013	<i>Flavimonas oryzihabitans</i>
SE5		2013	<i>Pseudomonas fluorescens/P. putida</i>
SE11		2013	<i>Pseudomonas fluorescens/P. putida</i>

Las cepas identificadas con el acrónimo CCUG corresponden a la colección sueca de microorganismos tipo obtenidas en el Hospital de Gotemburgo. Las cepas identificadas con el acrónimo SE corresponden al Hospital Son Espases (Mallorca).

3.2.- Amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Se utilizaron diferentes cebadores que aparecen reflejados en la **Tabla 2** para amplificar los genes DNA ribosómico 16S, *rpoD* y *gyrB* del DNA correspondiente a las distintas cepas.

Tabla 2.- Cebadores utilizados en este estudio.

Gen	Cebador	Secuencia	Referencia
16S rDNA	16F27	GAAGTCGTAACAAGG	Lane, 1991
	16R1492	TACGGYTACCTTGTACGACTT	Lane, 1991
<i>rpoD</i>	<i>PsEG30F</i>	ATYGAAATCGCCAARCG	Mulet <i>et al.</i> , 2009
	70F	ACGACTGACCCGGTACGCATGTAYATGMGN- GARATGGGNACNGT	Yamamoto <i>et al.</i> , 2000
	70R	ATAGAAATAACCA- GACGTAAGTTNGCYTCNACCATYTCYTTYTT	Yamamoto <i>et al.</i> , 2000
	<i>PsEG790R</i>	CGGTTGCTMTCCTTGC	Mulet <i>et al.</i> , 2009
<i>gyrB</i>	APrU	TGTAAAACGACGGCCA- GTGCNNGGRTCYTTYTCYTGRCA	Yamamoto <i>et al.</i> , 2000
	UP1E	CAGGAAACAGCTATGAC- CAYGSNNGGNGNAARTTYRA	Yamamoto <i>et al.</i> , 2000

Y = C o T, M = C o A, R = A o G, K = G o T, N = A, G, C o T.

Se ha especificado el nombre de cada cebador y su secuencia. Todos los cebadores se utilizaron también como cebadores en la reacción de secuenciación. Para los diferentes genes a amplificar, los reactivos utilizados para cada reacción de PCR aparecen en la **Tabla 3**.

Tabla 3.- Reactivos utilizados para cada reacción de PCR.

Reactivos	Cantidad (µl)
Agua destilada estéril milliQ	29,25
Tampón 10x (Amersham)	5
10 mM dNTP (Roche)	8
50 Mm MgCl ₂	1,5
Cebador 1 (10 mM) (Isogen)	2,5
Cebador 2 (10 mM) (Isogen)	2,5
Taq DNA polimerasa (Amersham)	0,25
DNA genómico (0,5µg/µl)	1
VOLUMEN TOTAL	50

Todas las reacciones se realizaron en un termociclador (Eppendorf). La amplificación de todos los genes incluyó una serie de pasos que se encuentran especificados en la **Tabla 4**: un paso de desnaturalización inicial del DNA de cada una de las distintas cepas a 94°C durante 5 minutos, seguido de una serie de ciclos de temperatura que incluyeron la desnaturalización, anillamiento y extensión, con diferentes tiempos y temperaturas según el gen amplificado. Finalmente, en todos los casos se realizó una extensión final. La temperatura de anillamiento para la amplificación del gen *rpoD* fue modificada según la cepa a estudiar.

Tabla 4.- Pasos de la reacción de amplificación con especificaciones según los genes a amplificar.

Procesos		DNAr 16S	<i>rpoD</i>	<i>gyrB</i>
Desnaturalización inicial	Temperatura (°C)	94	94	94
	Tiempo (min)	5	5	5
Ciclos^a		30	30/40	30/40
Desnaturalización	Temperatura (°C)	94	94	94
	Tiempo (min)	1	1	1
Anillamiento	Temperatura (°C)	55	50-55	50-55
	Tiempo (min)	1	1	1
Extensión	Temperatura (°C)	72	72	72
	Tiempo (min)	2	1,5	1,5
Extensión final	Temperatura (°C)	72	72	72
	Tiempo (min)	10	10	10

^a Los ciclos hacen referencia a los pasos de desnaturalización, anillamiento y extensión.

Una vez realizada la amplificación, los productos amplificados fueron visualizados en un gel de agarosa (Roche) 1,5% utilizando como tampón TAE 1x (40 mM Tris-Acetato pH 8, 1 mM EDTA pH 8) a temperatura ambiente en cubetas de electroforesis y aplicando un voltaje de 100 V. Se usaron 5 µl de muestra en todos los casos. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio 10 mg/ml (Sigma–Aldrich) y se visualizaron las bandas con una lámpara ultravioleta (Ultraviolet Transilluminator UVT) para comprobar que la existencia de una única banda de ADN de peso molecular correspondiente al amplicón del gen.

Para los productos de amplificación del gen ARNr 16S y *gyrB* se usó el marcador λ -*EcoRI/HindIII* (Sigma–Aldrich) y para el gen *rpoD* el marcador de 100pb (Amersham Pharmacia Biotech).

3.3.- Purificación del producto de PCR.

Los amplicones obtenidos por PCR se purificaron utilizando el siguiente protocolo:

En un vial eppendorf, se añadieron 250 µl de agua milliQ a 45 µl del producto de la reacción de PCR. Se transfirió todo el volumen a los pocillos de una placa Multiscreen HTS filter plate (Millipore) y se aplicó el vacío para filtrar la mezcla (entre 5 y 12 minutos). Se mantuvo al vacío 30 segundos más después de filtrar. Posteriormente, se añadieron 300 µl de agua milliQ y se volvió a aplicar el vacío para filtrar la mezcla. Se añadieron 25 µl de agua milliQ y se colocó la placa sobre el agitador durante 5 minutos. Finalmente, se resuspendió con la ayuda de la pipeta y se recuperaron las muestras en un nuevo vial eppendorf.

Después de la purificación los productos fueron nuevamente visualizados en un gel de electroforesis de agarosa 1,5% utilizando como tampón TAE 1x (40 mM Tris-Acetato pH 8, 1 mM EDTA pH 8) para comprobar la existencia de una única banda del peso molecular correspondiente al amplicón del gen.

3.4.- Secuenciación.

Para llevar a cabo la secuenciación del ADN se utilizó el método descrito por Sanger (1977) basado en el marcaje con fluorocromos. Los productos purificados se marcaron directamente utilizando el kit ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing (3.1) (Applied Biosystems). Los reactivos utilizados se detallan en la **Tabla 5**. La cantidad de DNA purificado y la cantidad de agua estéril dependió de cada muestra. Si la banda observada en el gel de agarosa del amplicón purificado era intensa, la cantidad de DNA utilizada para la secuenciación era de 4 µl y de 2,25 µl de agua destilada; si en cambio, era débil, no se utilizaba agua destilada y la cantidad de DNA purificado utilizada era de 6,25 µl.

Tabla 5.-Reactivos usados en la reacción de secuenciación.

Reactivos	Cantidad (µl) por muestra
DNA purificado	4/6,25
Agua destilada estéril	2,25/-
Tampón 5X (Applied Biosystems)	1,25
Cebador (10µM)	0,5
Kit ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing (3.1) (Applied Biosystems)	2
VOLUMEN TOTAL	10

Las condiciones de la reacción de secuenciación para los distintos genes amplificados se detallan en la **Tabla 6**.

Tabla 6.- Programas de tiempos y temperaturas utilizados para la reacción de secuenciación.

Proceso	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	96	3 min	1
Desnaturalización	96	15 seg	
Anillamiento	50-55	15 seg	25
Extensión	60	4 min	

El programa, para la reacción de secuenciación, es el mismo para todos los genes. La temperatura de anillamiento para cada gen es la misma que la temperatura de anillamiento utilizada en el proceso de amplificación para cada gen. Para cada cepa se secuenciaron las dos cadenas del producto obtenido en la PCR (forward y reverse) utilizando los mismos cebadores que en la reacción de PCR. Todas las reacciones se realizaron en un termociclador (Eppendorf).

Precipitación

Una vez realizada la reacción de secuenciación se procedió a realizar una precipitación de la mezcla, con la finalidad de purificar los productos obtenidos. Para ello se siguió el siguiente procedimiento:

Se añadió en un tubo eppendorf 90 µl de agua milliQ a los 10 µl del producto de la reacción de secuenciación y se pasó todo a un nuevo tubo eppendorf. Posteriormente, se añadió 250 µl de etanol 100% (frío) y 10 µl de acetato sódico (pH 5,2) y se mezcló con el vórtex durante 30 segundos. Se centrifugó en una centrífuga de sobremesa (Eppendorf) durante 30 min a 13000 rpm/16 rcf y se descartó el sobrenadante. Se añadieron 300 µl de etanol 70% sin mezclar con el vórtex y se centrifugó durante 15 minutos a 13000 rpm. Se descartó el sobrenadante y se dejó secar 20-25 minutos (en mesa) o 10-15 (en cabina) y se guardó a -20°C. Finalmente, se resuspendió en 20 µl de agua milliQ (justo

antes de enviar a secuenciar).

Las muestras de ADN amplificado y marcado listas para secuenciar se enviaron al Servicio de Secuenciación de la Universitat de les Illes Balears. El resultado de este proceso es la obtención de una secuencia nucleotídica del gen amplificado y el cromatograma correspondiente.

3.5.- Análisis filogenético de las secuencias.

3.5.1.-Alineamiento de las secuencias obtenidas.

Para realizar el análisis filogenético de las secuencias, es necesario conseguir previamente un buen alineamiento de las secuencias. Bioedit (Hall, 1997) es un programa de edición de secuencias que actúa como interfaz para otros programas como el ClustalX. El programa ClustalX (Thompson *et al.*, 1997) permite generar alineamientos múltiples.

Inicialmente, se realizó un alineamiento de las secuencias de cada uno de los genes amplificados (DNA ribosómico 16S, *gyrB* y *rpoD*). Cada uno de los alineamientos incluyó inicialmente un total de 158 cepas tipo del género *Pseudomonas* de cada uno de los genes. Una vez realizado el alineamiento, se ajustaron los tamaños de todas las secuencias para conseguir el mismo número de pares de bases y así poder compararlas. El alineamiento de las secuencias correspondientes al gen DNA ribosómico 16S estuvo constituido por 1278 nucleótidos. El alineamiento correspondiente al gen *gyrB* tuvo un total de 798 nucleótidos. El alineamiento de las secuencias del gen *rpoD* fue de 668 nucleótidos.

3.5.2.- Concatenado de las secuencias obtenidas.

Los alineamientos recortados de cada uno de los genes se concatenaron en el siguiente orden: DNA ribosómico 16S, *gyrB* y por último, *rpoD* obteniéndose un total de 2744 nucleótidos.

3.5.3.- Construcción de los árboles filogenéticos.

Las similitudes y las distancias evolutivas se calcularon para cada uno de los genes y para el concatenado de los tres genes con programas incluidos en el paquete informático MEGA 5.0. (Tamura K *et al.*, 2011). Las distancias son una estima del número de cambios que han ocurrido entre las secuencias y existen varios algoritmos para calcularlas. En este trabajo, las matrices de distancias se calcularon mediante el método Jukes-Cantor (Jukes and Cantor, 1969). Los dendrogramas se generaron por el método de neighbor-joining. Neighbor- joining es un algoritmo de agrupamiento basado en el principio de evolución mínima, es decir, una vez definida la matriz de distancias entre las secuencias, considera que el mejor árbol es aquel que minimiza la longitud del árbol. Un aspecto importante del método es que genera árboles sin raíz por lo que se hace necesario añadir un “outgroup” (o grupo externo) para enraizarlo. Se llevó a cabo un análisis de “bootstrap” (1000 réplicas) como indicador de la fiabilidad del análisis obtenido que se basa en muestrear el alineamiento repetidas veces (por ejemplo entre 100 y 1000). Las topologías de los árboles generados se visualizaron con el programa MEGA 5.0.

3.5.4.- Criterios para discriminar la asignación a nuevas especies.

El valor de la matriz de distancias que permite discriminar en el género *Pseudomonas* entre una nueva especie y una especie ya conocida es de 96% de similitud para el gen *rpoD* y de 97% para el análisis concatenado de los genes DNA ribosómico 16S, *gyrB* y *rpoD* (Mulet *et al.*, 2010).

4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De las 26 cepas analizadas en este estudio, se amplificó el gen *rpoD* como criterio inicial para discriminar entre cepas que se pueden asignar directamente a una cepa tipo y las que hipotéticamente pueden corresponder a nuevas especies. Si el gen *rpoD* no era suficiente para asignar una cepa a una especie, se amplificaron los genes DNA ribosómico 16S y *gyrB* y se realizó un análisis concatenado, MLSA, para distinguir las cepas que sí podían asignarse a una especie conocida de aquellas que constituyen hipotéticas nuevas especies y para las cuales se necesitan análisis posteriores para poder confirmar que son nuevas especies o para descartar esta hipótesis, constituyendo especies ya conocidas. En la **Tabla 7** aparecen los porcentajes de similitud de las cepas estudiadas con respecto a la especie más próxima, obtenidos para los distintos genes analizados individualmente, así como los valores de porcentaje de similitud del análisis de las secuencias de los tres genes concatenados. Según los resultados obtenidos, las diferentes cepas se han afiliado a los distintos grupos o subgrupos del género *Pseudomonas* (en el caso de las cepas que no se han podido llegar a asignar a ninguna especie en concreto).

Tabla 7.- Porcentajes de similitud entre los diferentes genes estudiados de las distintas cepas a estudiar y los genes de las cepas tipo de *Pseudomonas*. Afiliación de las cepas a estudiar a grupo o subgrupo del género *Pseudomonas*.

Cepa	Código	Genes utilizados/Similitud			Afiliación	MLSA
		16S	<i>rpoD</i>	<i>gyrB</i>		
CCUG 57209	C1	<i>P. extremoaustralis</i> (99,92%)	<i>P. grimontii</i> - <i>P. marginalis</i> (95,85%)	<i>P. salomonii</i> (91,94%)	<i>P. fluorescens</i> SG	<i>P. grimontii</i> (96,32%)
CCUG 62357	C4	C1 (100%)	C1 (99,85%)	C1 (99,96%)	<i>P. fluorescens</i> SG	C1 (99,9%)
CCUG 61232	C3	<i>P. azotoformans</i> (99,76%)	<i>P. synxantha</i> - <i>P. veronii</i> (93,40%)	<i>P. azotoformans</i> (92,908%)	<i>P. fluorescens</i> SG	<i>P. synxantha</i> (96,20%)
CCUG 59542	C15	C3 (99,92%)	C3 (98,02%)	C3 (97,45%)	<i>P. fluorescens</i> SG	C3 (98,70%)
CCUG 62864	C5	C15 (99,76%)	C3 (98,63%)	C3 (98,60%)	<i>P. fluorescens</i> SG	C3 (99,28%)
CCUG 63715	C6	C3 y C5 (99,92%)	C3 (100%)	C3 (97,45%)	<i>P. fluorescens</i> SG	C3 (99,24%)
CCUG 64025	C22	C3 y C5 (100%)	C5 (99,70%)	C3 (99,12%)	<i>P. fluorescens</i> SG	C3 (99,46%)
CCUG 64104	C23	C15 (99,92%)	C3 y C6 (99,09%)	C6 (97,45%)	<i>P. fluorescens</i> SG	C6 (98,88%)
SE2	SE2	C23 (99,92%)	C3 y C6 (99,85%)	C23 (99,24%)	<i>P. fluorescens</i> SG	C23 (99,46%)
CCUG 61063	C17		C22 (100%)		<i>P. fluorescens</i> SG	
CCUG 64255	C24		C15 (100%)		<i>P. fluorescens</i> SG	
CCUG 64384	C27		SE2 (98,48%)		<i>P. fluorescens</i> SG	
CCUG 63225	C21	<i>P. graminis</i> (99,92%)	<i>P. graminis</i> (92,71%)	<i>P. graminis</i> (91,94%)	<i>P. lutea</i> G	<i>P. graminis</i> (95,97%)
SE1	SE1	<i>P. monteillii</i> - <i>P. plecoglossida</i> (99,92%)	<i>P. plecoglossida</i> (89,58%)	<i>P. plecoglossida</i> (90,28%)	<i>P. putida</i> G	<i>P. plecoglossida</i> (94,72%)
SE10	SE10	<i>P. taiwanensis</i> - <i>P. plecoglossida</i> (99,61%)	<i>P. monteilli</i> (89,01%)	<i>P. monteillii</i> (90,14%)	<i>P. putida</i> G	<i>P. monteillii</i> (96,36%)

Cepa	Código	Genes utilizados/Similitud			Afiliación	MLST
		16S	rpoD	gyrB		
CCUG 58779	C2	<i>P. segetis</i> (98,74%)	<i>P. kummingensis</i> (82,71%)	<i>P. azotifigens</i> (86,589%)	<i>P. stutzeri</i> G	<i>P. stutzeri</i> gv1 (90,12%)
CCUG 62879	C19	<i>P. composti</i> (99,21%)	<i>P. chengduensis</i> (85,07%)	<i>P. toyotomiensis</i> (90,270%)	<i>P. oleovorans</i> G	<i>P. toyotomiensis</i> (92,95%)
CCUG 64416	C28	<i>P. resinovorans</i> (98,74%)	<i>P. otitidis</i> (88,19%)	<i>P. guguanensis</i> (88,704%)	<i>P. aeruginosa</i> G	<i>P. otitidis</i> (92,768%)
CCUG 55707	C8	<i>P. peli</i> (100%)			<i>P. peli</i> ^T	
CCUG 58342	C11	<i>P. moraviensis</i> (97,40%)			<i>P. moraviensis</i> ^T	
CCUG 58598	C12	<i>P. otitidis</i> (99,55%)			<i>P. otitidis</i> ^T	
CCUG 62222	C18	<i>P. marginalis</i> (99,85%)			<i>P. marginalis</i> ^T	
SE4	SE4	<i>P. psychrotolerans</i> (98,65%)			<i>P. psychrotolerans</i> ^T	
SE9	SE9	<i>P. oryzihabitans</i> (99,25%)			<i>P. oryzihabitans</i> ^T	
SE5	SE5	<i>P. guariconensis</i> (100%)			<i>P. guariconensis</i> ^T	
SE11	SE11	<i>P. fragi</i> (96,14%)			<i>P. fragi</i> ^T	

Las cepas identificadas con el acrónimo CCUG corresponden a la colección sueca de microorganismos tipo obtenidas en el Hospital de Gotemburgo. Las cepas identificadas con el acrónimo SE corresponden al Hospital Son Espases (Mallorca). SG: Subgrupo. G: Grupo

Con respecto a las últimas cepas de la **Tabla 7** (CCUG 55707, CCUG 58342, CCUG 58598, CCUG 62222, SE4, SE9, SE5, SE11), en la columna de Afiliación no aparece ningún grupo ni subgrupo dentro del género *Pseudomonas* ya que se han podido asignar a una especie en concreto por lo que en vez de aparecer el grupo o subgrupo al que pertenecen, en la tabla aparece la especie en concreto a la que se ha asignado cada cepa.

4.1. Análisis y asignación de las cepas estudiadas a los grupos o subgrupos del género *Pseudomonas*.

En la **Figura 6** se puede observar un árbol filogenético esquemático en el que las diferentes cepas tipo del género *Pseudomonas* (158) y las diferentes cepas a estudiar están agrupadas por subgrupos en el caso del grupo *P. fluorescens* o por grupos. Están reflejadas las diferentes cepas a estudiar que finalmente no se han podido asignar a una cepa tipo en concreto indicando a que grupo pertenece cada una de ellas.

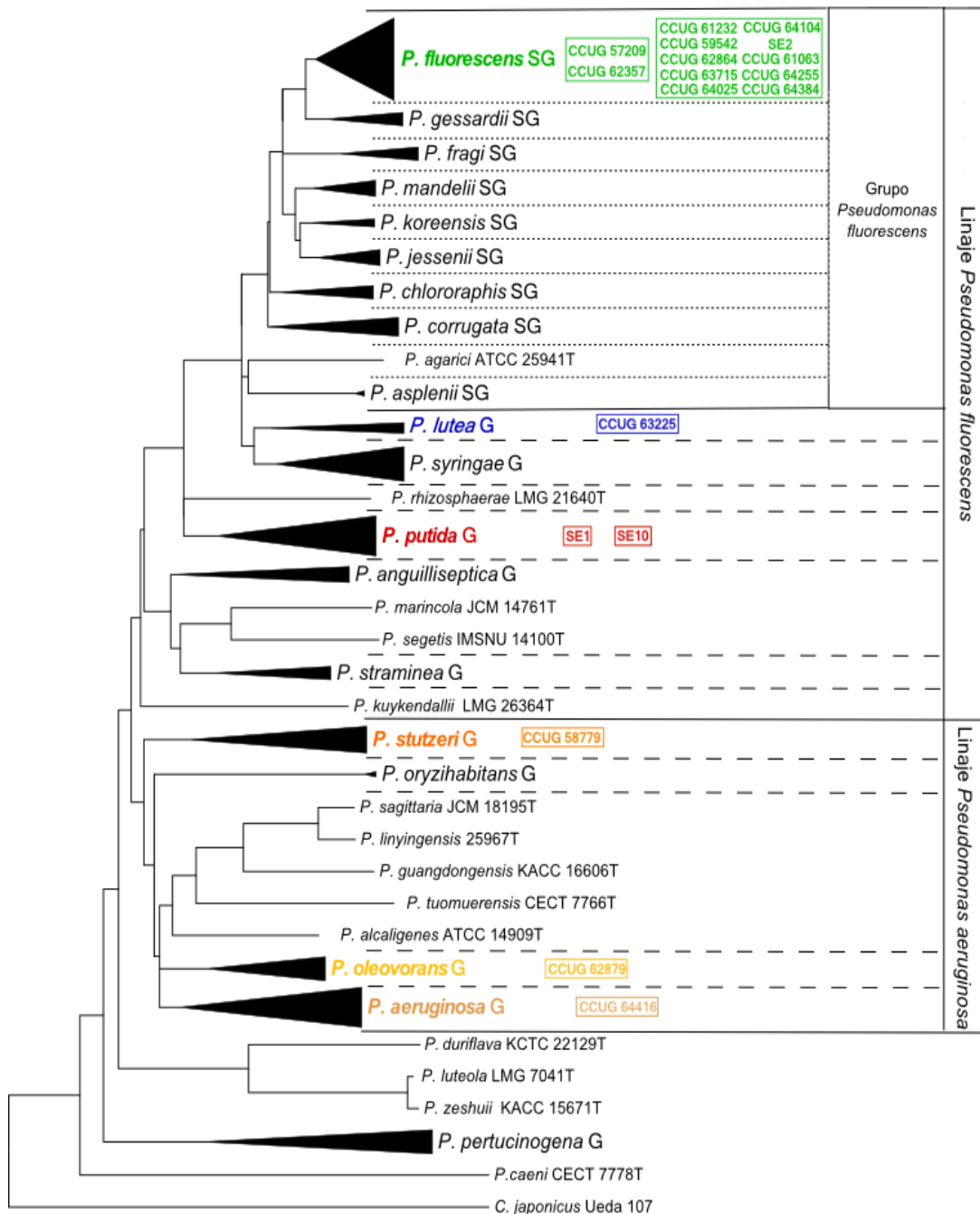


Figura 6.- Árbol filogenético esquemático de 173 cepas de *Pseudomonas* basados en el análisis concatenado de los genes DNA ribosómico 16S, *gyrB* y *rpoD*. La matriz de distancias fue calculada con el método Jukes-Cantor. El dendrograma fue generado por neighbor-joining. *Cellvibrio japonicum* Ueda 107 fue usado como “outgroup”.

POSIBLES NUEVAS ESPECIES DEL GÉNERO *PSEUDOMONAS*

4.1.1. Análisis de las cepas afiliadas al linaje *Pseudomonas fluorescens*.

4.1.1.1.- Análisis de las cepas afiliadas al subgrupo *Pseudomonas fluorescens*.

Análisis de las cepas CCUG 57209 (C1), CCUG 62357 (C4), CCUG 61232 (C3), CCUG 59542 (C15), CCUG 62864 (C5), CCUG 64025 (C22), CCUG 63715 (C6), CCUG 64104 (C23) y SE2.

Todas estas cepas después de someterse al análisis de secuencias MLSA, se han afiliado al grupo *Pseudomonas fluorescens*. En la **Tabla 7** aparecen reflejados los valores de similitud obtenidos por MLSA en este estudio. En la **Figura 7** se representa el árbol filogenético correspondiente.

Análisis de las cepas CCUG 57209 (C1), CCUG 62357 (C4).

La cepa CCUG 57209 y la cepa CCUG 62357 presentan unos porcentajes de similitud del 96,3 y 96,3% respectivamente con *Pseudomonas grimontii*^T. Al no superar el 97%, rango de similitud establecido en el análisis MLSA para asignar una cepa a una especie determinada, no se pueden asignar a dicha especie y podrían constituir una posible nueva especie. La cepa CCUG 62357 presenta un porcentaje de similitud del 99,9% con la cepa CCUG 57209 por lo que probablemente se trata de la misma posible nueva especie.

Análisis de las cepas CCUG 61232 (C3), CCUG 59542 (C15), CCUG 62864 (C5), CCUG 64025 (C22), CCUG 63715 (C6), CCUG 64104 (C23) y SE2.

La cepa CCUG 61232 presenta un porcentaje de similitud de 96,20% con *Pseudomonas synxantha*^T. La cepa CCUG 59542 presenta un porcentaje de similitud de 98,70% con respecto a la cepa CCUG 61232, por lo que se puede confirmar que pertenecen a la misma especie. A su vez, la cepa CCUG 62864 también presenta un porcentaje del 99,28% con respecto a dicha cepa al igual que la cepa CCUG 63715 (con un porcentaje de similitud del 99,24%), la cepa CCUG 64025 (con un porcentaje del 99,46%) y la cepa CCUG 64025 (con un porcentaje del 99,46%).

La cepa CCUG 64104 presenta un porcentaje de similitud del 98,88% con la cepa CCUG 63715 y la cepa SE2 un porcentaje del 99,46% con respecto a la cepa CCUG 64104.

Todos los valores de similitud obtenidos oscilan entre 98,6% y 99,5%, lo que indica que están muy relacionadas entre sí e hipotéticamente podrían constituir la misma especie. Al ser el porcentaje de similitud con respecto a la especie más cercana (*Pseudomonas synxantha*^T) menor del 97% en el análisis MLSA, este grupo de *Pseudomonas* podría constituir una nueva especie.

En el árbol filogenético representado en la **Figura 7** se puede observar que las cepas a estudiar pertenecientes a este subgrupo, *P. fluorescens*, constituyen dos grupos muy definidos que se diferencian de las cepas tipo conocidas por lo que se establece que posiblemente constituyan especies nuevas.

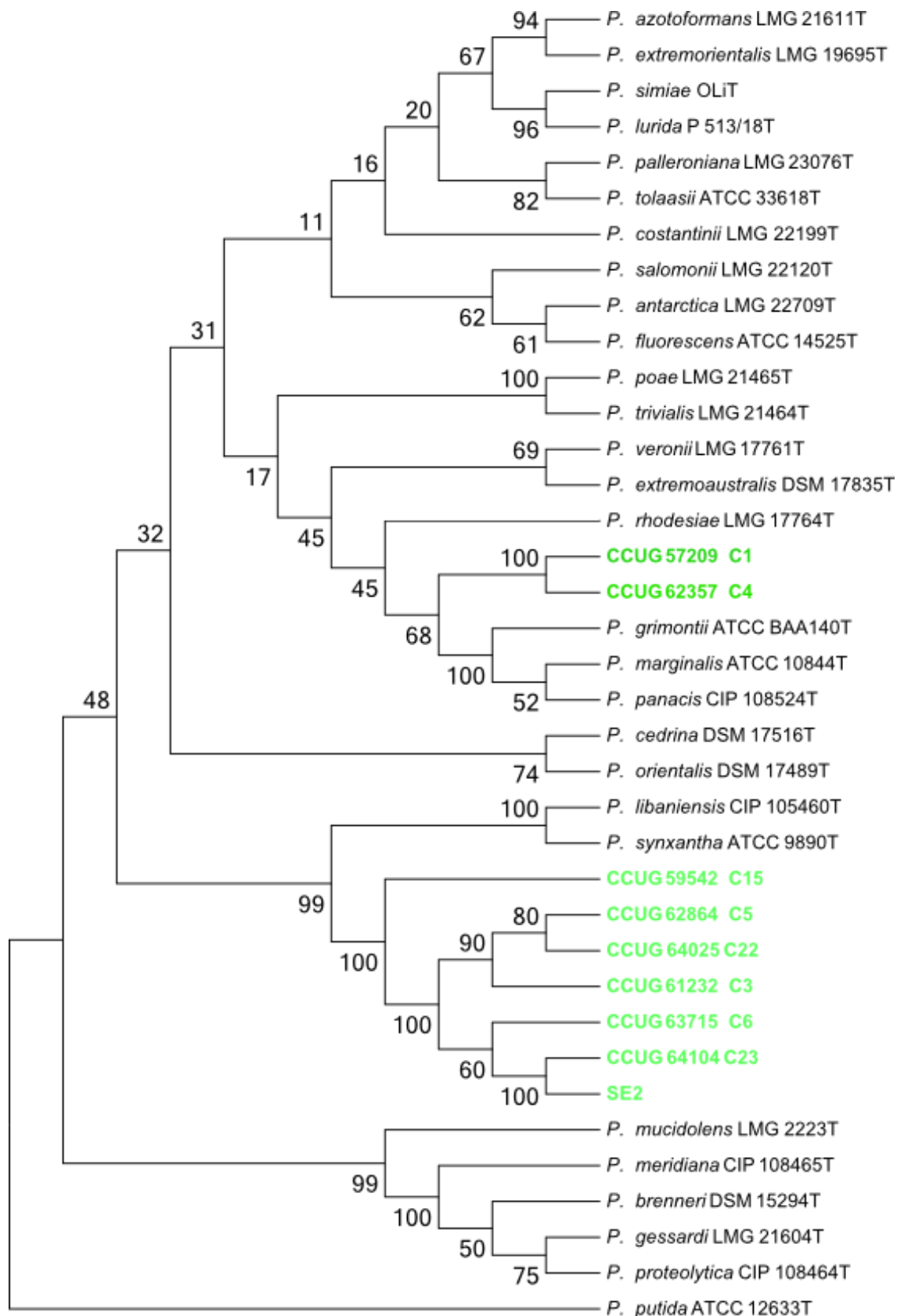


Figura 7.- Árbol filogenético del subgrupo *Pseudomonas fluorescens* y el subgrupo *Pseudomonas gessardi* basados en el análisis concatenado de los genes DNA ribosómico 16S, *gyrB* y *rpoD*. La matriz de distancias fue calculada con el método Jukes-Cantor. El dendrograma fue generado por neighbor-joining. *Pseudomonas putida* ATCC12633^T fue usado como “outgroup”. Las diferentes cepas a estudiar aparecen de color verde.

4.1.1.2. Análisis de las cepas afiliadas al grupo *Pseudomonas lutea*.

Análisis de la cepa CCUG 63225 (C21).

La cepa CCUG 63225 se ha afiliado al grupo de *Pseudomonas lutea* y presenta un porcentaje de similitud del 95,97% con *Pseudomonas graminis*^T, la cepa tipo más próxima, pero al ser inferior a 97% no se puede llegar a asignar a esta especie y constituye una hipotética nueva especie. Se puede observar en la **Figura 8**, donde aparece el árbol filogenético correspondiente al grupo *Pseudomonas lutea* y en el que se han añadido las cepas tipo *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas corrugata*, que la especie más próxima a la cepa CCUG 63225 es *Pseudomonas graminis* pero el análisis MLSA ha permitido considerarla como una hipotética nueva especie.

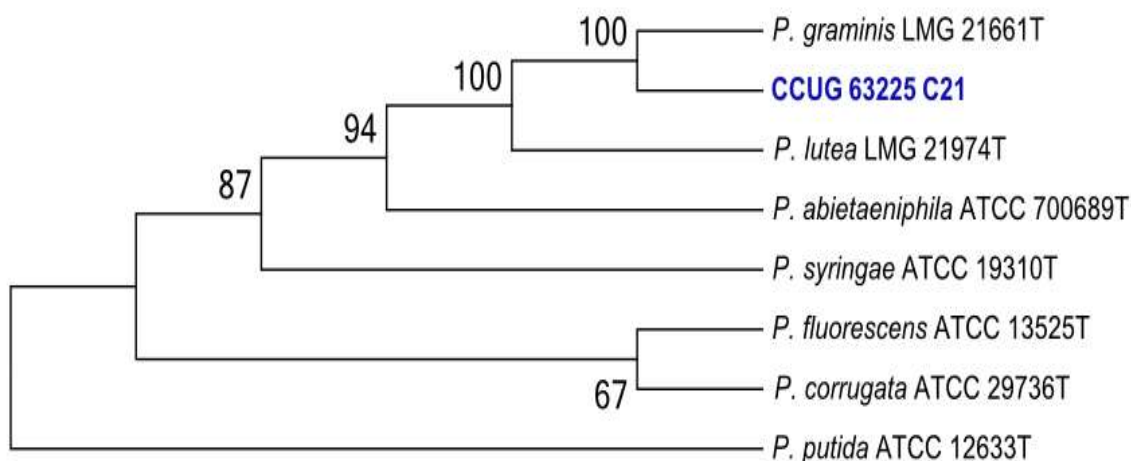


Figura8.- Árbol filogenético del grupo *Pseudomonas lutea* y las cepas tipo *Pseudomonas syringae*^T, *Pseudomonas fluorescens*^T y *Pseudomonas corrugata*^T basado en el análisis concatenado de DNA ribosómico 16S, *gyrB* y *rpoD*. La matriz de distancias fue calculada con el método Jukes-Cantor. El dendrograma fue generado por neighbor-joining. *Pseudomonas putida* ATCC12633^T fue usado como "outgroup". La cepa a estudiar aparece en color azul.

4.1.1.3. Análisis de las cepas afiliadas al grupo *Pseudomonas putida*.

Análisis de las cepas SE1 y SE10.

Las cepas SE1 y SE10 se han afiliado al grupo de *Pseudomonas putida*. La cepa SE1 presenta un porcentaje de similitud del 94,72% con *Pseudomonas plecoglossida*^T y la cepa SE10 un porcentaje de similitud del 96,36% con *Pseudomonas monteilii*^T. Dichos valores de similitud son inferiores al 97% por lo que se podrían considerar nuevas especies.

En la **Figura 9** se puede observar el árbol filogenético donde aparecen las cepas SE1 y SE10 y las cepas tipo conocidas del grupo *Pseudomonas putida*. Las cepas a estudiar no constituyen un grupo en el árbol filogenético por lo que no se trata de la misma especie y además ambas se diferencian claramente de las especies que tienen más próximas por lo que posiblemente constituyan nuevas especies.

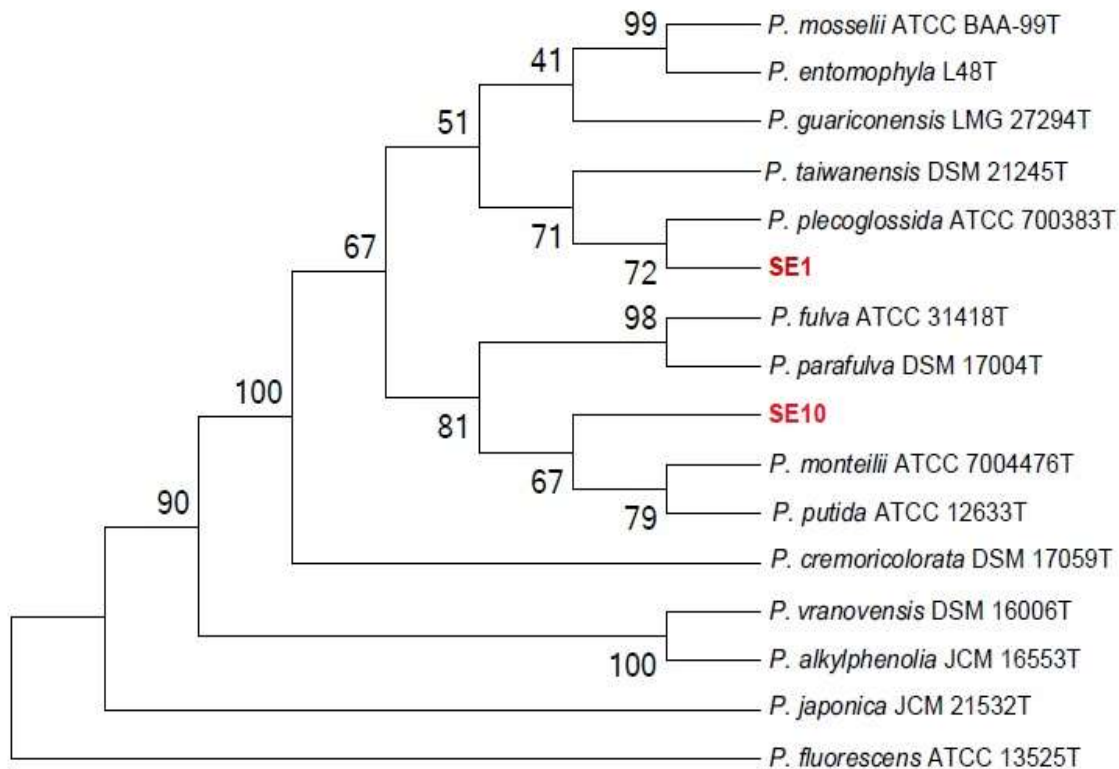


Figura 9.- Árbol filogenético del grupo *Pseudomonas putida* basados en el análisis concatenado de DNA ribosómico 16S, *gyrB* y *rpoD*. La matriz de distancias fue calculada con el método Jukes-Cantor. El dendrograma fue generado por neighbor-joining. *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525^T fue usado como “outgroup”. Las cepas a estudiar presentan color rojo.

4.1.2. Análisis de las cepas afiliadas al linaje *Pseudomonas aeruginosa*.

4.1.2.1.- Análisis de las cepas afiliadas al grupo *Pseudomonas stutzeri*.

Análisis de la cepa CCUG 58779 (C2).

La cepa CCUG 58779 ha sido afiliada al grupo *Pseudomonas stutzeri* y presenta un porcentaje de similitud del 90,12% con *Pseudomonas stutzeri* ATCC 27951^T, por lo que se podría asignar a una nueva especie dado que su porcentaje de similitud, al ser inferior a 97% en el análisis de secuencias MLSA está dentro del rango establecido para considerarse una nueva especie.

La **Figura 10** corresponde al árbol filogenético que incluye la cepa CCUG 58779 y las cepas tipo del grupo *Pseudomonas stutzeri*. Se puede observar que la cepa a estudiar se distancia mucho de las cepas del grupo *P. stutzeri*, lo que provoca que el porcentaje de similitud con una cepa de este grupo sea tan bajo (90,12%).

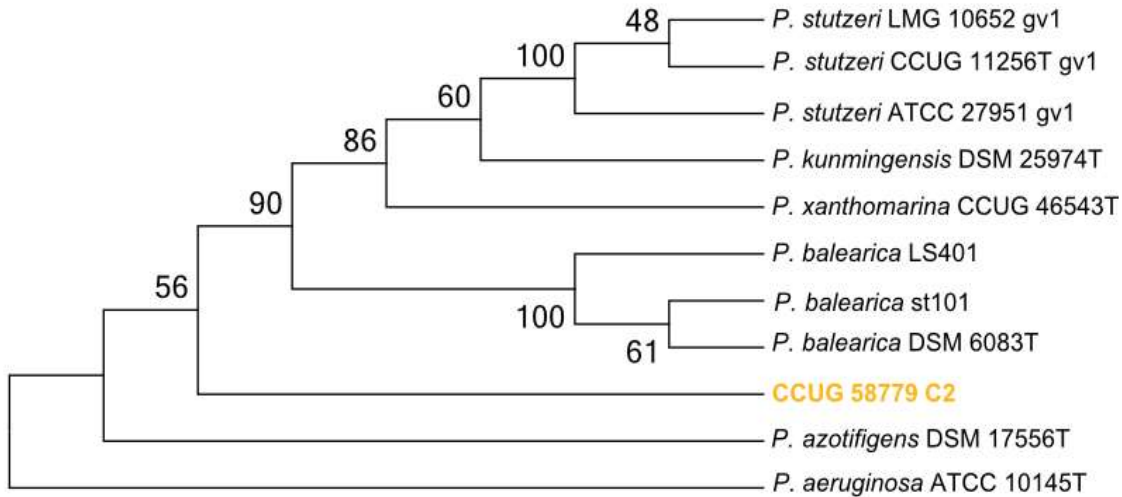


Figura 10.- Árbol filogenético del grupo *Pseudomonas stutzeri* basado en el análisis concatenado de DNA ribosómico 16S, *gyrB* y *rpoD*. La matriz de distancias fue calculada con el método Jukes-Cantor. El dendrograma fue generado por neighbor-joining. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC10145^T fue usado como “outgroup”. La cepa a estudiar aparece de color naranja oscuro.

4.1.2.2.- Análisis de las cepas afiliadas al grupo *Pseudomonas oleovorans*.

Análisis de la cepa CCUG 62879 (C19)

La cepa CCUG 62879 se ha afiliado al grupo *Pseudomonas oleovorans* y presenta un porcentaje de similitud del 92,95% con *Pseudomonas toyotomiensis*^T. Este valor de similitud es inferior a 97% por lo que se podría asignar a una nueva especie.

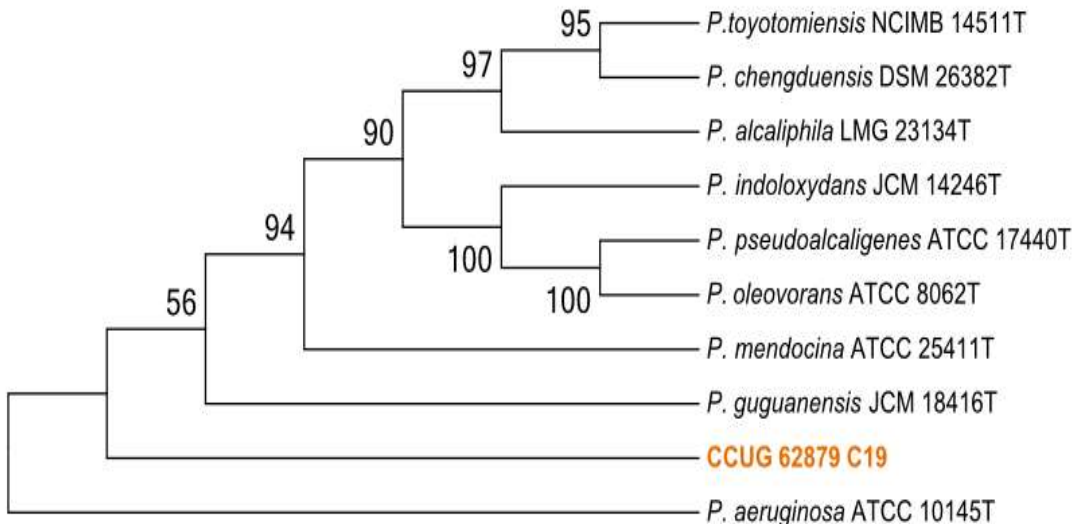


Figura 11.- Árbol filogenético del grupo *Pseudomonas oleovorans* basado en el análisis concatenado de DNA ribosómico 16S, *gyrB* y *rpoD*. La matriz de distancias fue calculada con el método Jukes-Cantor. El dendrograma fue generado por neighbor-joining. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC10145^T fue usada como “outgroup”. La cepa a estudiar aparece de color naranja.

El árbol filogenético de la **Figura 11** muestra que la cepa CCUG 62879 se encuentra muy distanciada de las cepas tipo conocidas del grupo *P. oleovorans*, lo que determina que el porcentaje de

similitud con las cepas de dicho grupo sea bajo y por lo tanto, que se pueda considerar como una nueva especie.

4.1.2.3.- Análisis de las cepas afiliadas al grupo *Pseudomonas aeruginosa*.

Análisis de la cepa CCUG 64416 (C28).

La cepa CCUG 64416 se ha afiliado al grupo *Pseudomonas aeruginosa* y al presentar un porcentaje de similitud del 92,77% con *Pseudomonas otitidis*^T no se ha podido asignar a dicha especie. En la **Figura 12** se presenta el árbol filogenético que incluye la cepa CCUG 64416 y las cepas tipo del grupo *P. aeruginosa*. Se puede observar que la cepa tipo conocida más próxima a la cepa a estudiar es *P. otitidis*^T pero el análisis bootstrap es del 49%, lo que indica que esta relación no es muy fiable. Además, el porcentaje de similitud indica claramente que se trata de especies diferentes y por lo tanto que la cepa a estudiar probablemente constituya una nueva especie.

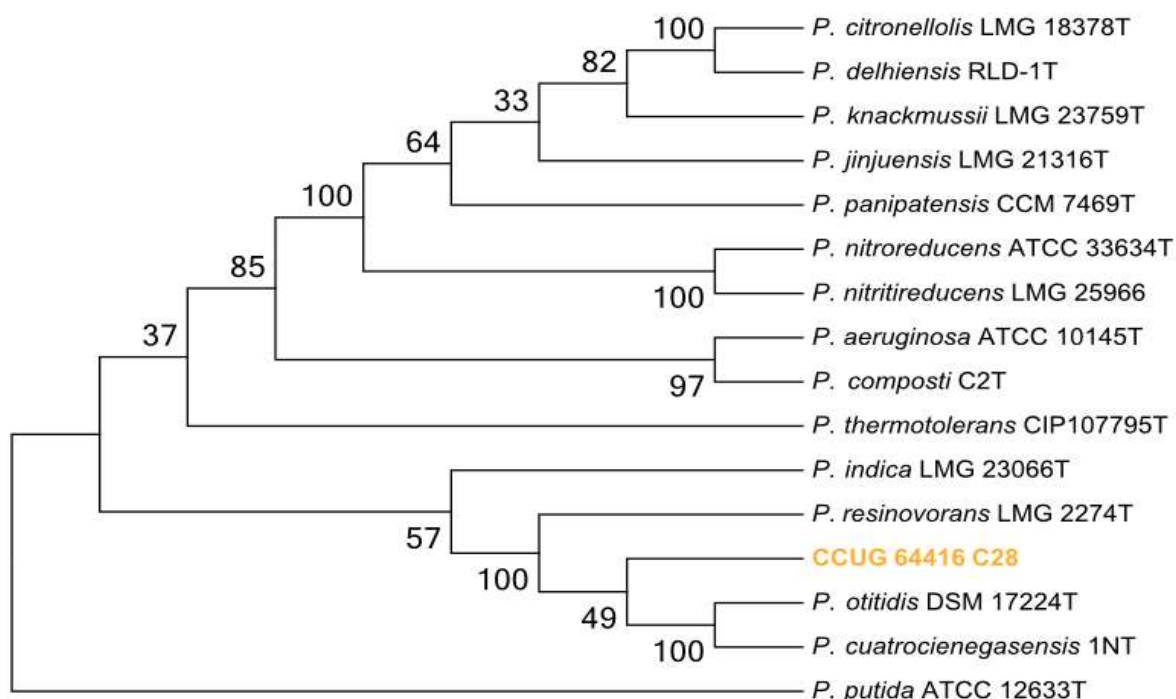


Figura 12.- Árbol filogenético del grupo *Pseudomonas aeruginosa* basado en el análisis concatenado de DNA ribosómico 16S, *gyrB* y *rpoD*. La matriz de distancias fue calculada con el método Jukes-Cantor. El dendrograma fue generado por neighbor-joining. *Pseudomonas putida* ATCC 12633^T fue usado como “outgroup”. La cepa a estudiar se presenta de color naranja claro.

Las diferentes cepas a estudiar aparecen distribuidas en la **Tabla 8** según si ha sido posible asignarlas a una cepa tipo conocida como son las cepas CCUG 55707, CCUG 58342, CCUG 58598, CCUG 62222, SE4, SE9, SE5, SE11 que aparecen en las casillas de color verde al final de la tabla o si no ha sido posible asignarlas a una cepa tipo conocida y constituyen posibles nuevas especies. Estas posibles nuevas especies están separadas en la **Tabla 8** por grupos del género *Pseudomonas* y también según la nueva especie que probablemente constituyan (I, II, III...). Las cepas CCUG 58779, CCUG 62879 y CCUG 64416 aparecen en la tabla con un rango de color naranja y todas pertenecen al linaje *P. aeruginosa*. Se han afiliado a los grupos *P. stutzeri*, *P. oleovorans* y *P. aeruginosa* respectivamente y constituyen 3 posibles nuevas especies diferentes designadas como VI, VII y VIII. El resto de cepas que aparecen en la tabla pertenecen al linaje *P. fluorescens*. Las cepas que aparecen de color verde, en las primeras filas de la tabla, pertenecen al grupo y subgrupo *P. fluorescens* y constituyen dos grupos

de nuevas especies. Las cepas CCUG 57209 y CCUG 62357 constituyen hipotéticamente la misma nueva especie y es designada como especie I. Con el análisis MLSA de las secuencias (genes DNA ribosómico 16S, *rpoD* y *gyrB*) las cepas CCUG 61232, CCUG 59542, CCUG 62864, CCUG 63715, CCUG 64025, CCUG 64104 y SE2 se han constituido como una probable nueva especie (II) y se agrupan dentro de un mismo conjunto. A su vez, las cepas CCUG 61063, CCUG 63255 y la cepa CCUG 64384 pertenecen al mismo grupo y constituyen la posible nueva especie II. De estas tres cepas sólo se ha realizado el análisis del gen *rpoD* porque con los resultados de las secuencias de éste ya es suficiente para englobarla en el grupo de la especie II. Al tener un porcentaje de similitud mayor al 96% para el gen *rpoD* con el resto de cepas, se considera que pertenece al grupo de la especie II. La cepa CCUG 63225 se encuentra afiliada al grupo *Pseudomonas lutea* y constituye la hipotética nueva especie III. La cepa SE1 y la cepa SE10 están afiliadas al grupo *Pseudomonas putida* y constituyen dos posibles nuevas especies, en la tabla denominadas como nueva especie IV y V respectivamente.

El estudio del gen *rpoD* de las cepas que se han asignado directamente a una especie del género *Pseudomonas* conocida ha sido suficiente para asignarlas. Esto se debe a que mediante el análisis de dicho gen, los porcentajes de similitud resultantes han sido superiores al 96% y por tanto, ya se han asignado directamente a una especie conocida, lo que se comentará en el apartado siguiente.

Tabla 8.- Asignación a posibles nuevas especies por el análisis MLSA o *rpoD*.

Cepa	Iniciales	Afiliación	MLSA	Probable nueva especie
CCUG 57209	C1	<i>P. fluorescens</i> SG	<i>P. grimontii</i> (96,32%)	I
CCUG 62357	C4	<i>P. fluorescens</i> SG	<i>P. grimontii</i> (96,31%)	I
CCUG 61232	C3	<i>P. fluorescens</i> SG	<i>P. synxantha</i> (96,20%)	II
CCUG 59542	C15	<i>P. fluorescens</i> SG	C3 (98,69%)	II
CCUG 62864	C5	<i>P. fluorescens</i> SG	C3 (99,28%)	II
CCUG 63715	C6	<i>P. fluorescens</i> SG	C3 (99,24%)	II
CCUG 64025	C22	<i>P. fluorescens</i> SG	C3 (99,46%)	II
CCUG 64104	C23	<i>P. fluorescens</i> SG	C6 (98,88%)	II
SE2	SE2	<i>P. fluorescens</i> SG	C23 (99,46%)	II
CCUG 61063	C17	<i>P. fluorescens</i> SG	-	II
CCUG 64255	C24	<i>P. fluorescens</i> SG	-	II
CCUG 64384	C27	<i>P. fluorescens</i> SG	-	II
CCUG 63225	C21	<i>P. lutea</i> G	<i>P. graminis</i> (95,97%)	III
SE1	SE1	<i>P. putida</i> G	<i>P. plecoglossida</i> (94,72%)	IV
SE10	SE10	<i>P. putida</i> G	<i>P. montellii</i> (96,36%)	V
CCUG 58779	C2	<i>P. stutzeri</i> G	<i>P. stutzeri</i> gv1 (90,12%)	VI
CCUG 62879	C19	<i>P. oleovorans</i> G	<i>P. toyotomiensis</i> (92,95%)	VII
CCUG 64416	C28	<i>P. aeruginosa</i> G	<i>P. otitidis</i> (92,77%)	VIII
CCUG 55707	C8	<i>P. peli</i> ^T	-	-
CCUG 58342	C11	<i>P. moraviensis</i> ^T	-	-
CCUG 58598	C12	<i>P. otitidis</i> ^T	-	-
CCUG 62222	C18	<i>P. marginalis</i> ^T	-	-
SE4	SE4	<i>P. psychrotolerans</i> ^T	-	-
SE9	SE9	<i>P. oryzihabitans</i> ^T	-	-
SE5	SE5	<i>P. guariconensis</i> ^T	-	-
SE11	SE11	<i>P. fragi</i> ^T	-	-

CEPAS ASIGNADAS A ESPECIES DEL GÉNERO *PSEUDOMONAS*

De las cepas que aparecen en la siguiente tabla se analizó únicamente el gen *rpoD*. Dado que los valores obtenidos eran superiores al 96%, no fue necesario realizar análisis adicionales que incluyeran los genes DNA ribosómico 16S y *gyrB*, ya que fueron asignadas a especie conocida directamente.

Tabla 9.- Cepas a estudiar distribuidas según el linaje, grupo y subgrupo al que pertenecen y la correspondiente cepa tipo asignada con el porcentaje de similitud hallado a partir del análisis del gen *rpoD*.

Cepas de estudio	Linaje	Grupo	Subgrupo	Especie asignada	Porcentaje similitud (%)
CCUG 62222	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. marginalis</i> ^T	99,85
CCUG 58342			<i>P. koorensis</i>	<i>P. moraviensis</i> ^T	97,40
SE11			<i>P. fragi</i>	<i>P. fragis</i> ^T	96,14
SE5		<i>P. putida</i>	-	<i>P. guariconensis</i> ^T	100
CCUG 55707		<i>P. anguilliseptica</i>	-	<i>P. pelis</i> ^T	100
SE9	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. oryzihabitans</i>	-	<i>P. oryzihabitans</i> ^T	99,25
SE4			-	<i>P. psychrotolerans</i> ^T	98,65
CCUG 58598		<i>P. aeruginosa</i>	-	<i>P. otitidis</i> ^T	99,55

Los microorganismos que aparecen en la **Tabla 9** al presentar un porcentaje de similitud mayor del 96% para el análisis del gen *rpoD*, cuyo rango va 96,14% a 100% se consideran pertenecientes a las especies que aparecen en misma tabla, en la columna “Especie asignada”.

Las cepas CCUG 62222, CCUG 58342, SE11, SE5 y CCUG 55707 se han afiliado al linaje *P. fluorescens*. De ellas, las cepas CCUG 62222, CCUG 58342 y la SE11 se han afiliado al grupo *P. fluorescens*. La cepa CCUG 62222 se encuentra dentro del subgrupo *P. fluorescens* y se ha afiliado a *P. marginalis*^T debido a que presenta un porcentaje de similitud del 99,85% con respecto a ella. La cepa CCUG 58342 pertenece al subgrupo *P. koorensis*^T y se ha afiliado a *P. moraviensis*^T con un 97,40%. La cepa SE11 se ha afiliado a la especie conocida *P. fragis*^T que pertenece al subgrupo *P. fragi* con un porcentaje de similitud del 96,14%. La cepa SE5 se ha afiliado al grupo *P. putida*, concretamente se ha asignado a *P. guariconensis*^T debido a que el porcentaje de similitud con ella es del 100%. La cepa CCUG 55707 se ha afiliado al grupo *P. anguilliseptica* y se ha asignado a la especie *P. pelis*^T con un porcentaje de similitud del 100%.

Las cepas SE9, SE4 y CCUG 58598 se han afiliado al linaje *P. aeruginosa*. Las cepas SE9 y SE4 se han afiliado ambas al grupo *P. oryzihabitans*. La cepa SE9 ha sido asignada a la especie conocida *P. oryzihabitans*^T con un porcentaje de similitud del 99,25% y la cepa SE4 a *P. psychrotolerans*^T con un porcentaje de similitud del 98,65%. Por último, la cepa CCUG 58598 se ha afiliado al grupo *P. aeruginosa* y concretamente a la especie *P. otitidis*^T con un porcentaje del 99,55%.

4.2.- Distribución de las cepas estudiadas

En este estudio, de las 26 cepas analizadas, 8 han podido ser asignadas a una cepa tipo conocida constituyendo el 31% de cepas estudiadas. El resto de cepas, 18, son cepas candidatas a nuevas especies y constituyen el 69% del total.



Figura 13.- Distribución de las cepas estudiadas.

4.2.1.- Cepas asignadas a especie.

El número de cepas asignadas a una cepa tipo conocida en este estudio fue de ocho cepas.

Cinco de las cepas asignadas a una cepa tipo conocida pertenecen al linaje *P. fluorescens* constituyendo el 62% de las cepas asignadas. De éstas, 3 de ellas pertenecen al grupo *P. fluorescens*: *P. marginalis*^T (CCUG 62222), perteneciente al subgrupo *P. fluorescens*; *P. moraviensis*^T (CCUG 58342) perteneciente al subgrupo *P. koorensis* y *P. fragi*^T (SE11) del subgrupo *P. fragi*. Estas cepas (las pertenecientes al grupo *P. fluorescens*) constituyen el grupo mayoritario con un 36 % del total tal y como aparece en la **Figura 14**. Dentro del mismo linaje, también se encuentra una cepa perteneciente al grupo *P. putida*, *P. guariconensis*^T (SE5) y otra cepa perteneciente al grupo *P. anguilliseptica*, *P. peli*^T (CCUG 55707) ambas con un porcentaje del 13% con respecto al total.

En el linaje correspondiente a *P. aeruginosa* podemos encontrar 3 cepas. Dos de las cuales, *P. oryzihabitans*^T (SE9) y *P. psychrotolerans*^T (SE4), pertenecen al grupo *P. oryzihabitans* con un 25%. En este mismo linaje, en el grupo *P. aeruginosa* se encuentra la cepa *P. otitidis*^T (CCUG 585989) que representa el 13% de las cepas asignadas a una especie conocida.

Cepas asignadas a una cepa tipo conocida

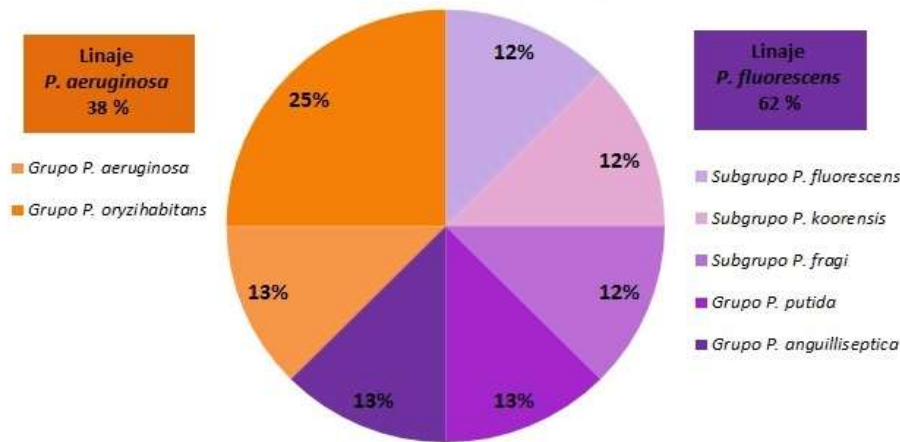


Figura 14.- Cepas asignadas a una cepa tipo conocida.

4.2.2.- Cepas candidatas a nuevas especies.

El número de cepas candidatas a nuevas especies es 18.

De estas 18 cepas, 15 pertenecen al linaje *P. fluorescens* y constituyen el 83% de las cepas candidatas a nuevas especies. Una de las 15 cepas pertenece al grupo *P. lutea*, es decir, constituye el 5% de todas las cepas candidatas a nuevas especies. Dos de las 15, pertenecen al grupo *P. putida* constituyendo un 11% del total. El resto de las 15 cepas, es decir, 12 pertenecen al grupo *P. fluorescens*, un 67% del total, convirtiéndose en el grupo mayoritario.

Por otro lado, 3 de las 18 cepas son del linaje *P. aeruginosa*. Dentro de dicho linaje se encuentra una cepa del grupo *P. stutzeri*, una del grupo *P. oleovorans* y una del grupo *P. aeruginosa* constituyendo cada una de ellas el 5-6% del total de cepas estudiadas que resultan como cepas candidatas a nuevas especies.

Cepas candidatas a nuevas especies

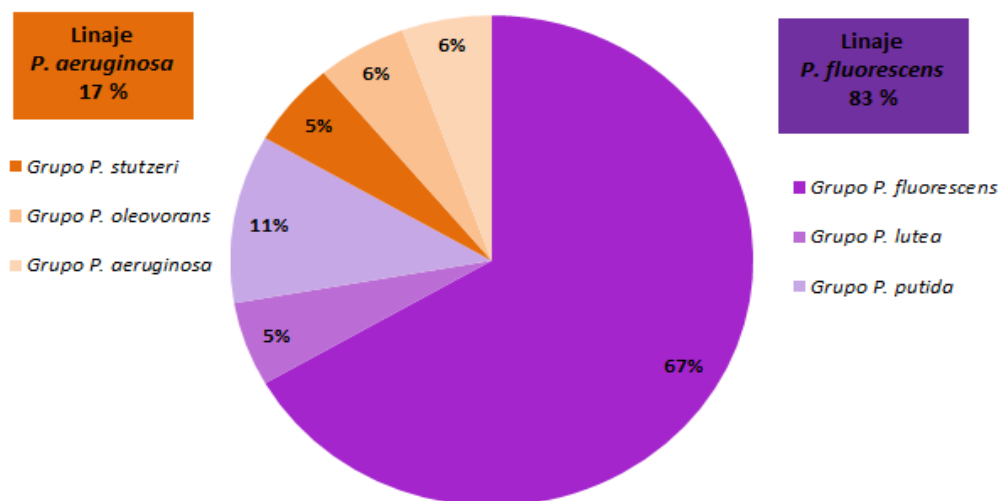


Figura 15.- Cepas candidatas a nuevas especies.

Por último es importante mencionar que es impresionante el número tan elevado de hipotéticas especies nuevas halladas en este estudio. En este estudio de 26 cepas, tan sólo 31% de ellas han podido ser asignadas a una cepa tipo conocida mientras que el resto se han considerado candidatas a nuevas especies y es necesario realizar análisis adicionales para afirmar que se trata de nuevas especies o si por el contrario, se pueden asignar finalmente a especies ya conocidas. También llama la atención que la mayoría de las especies estudiadas tanto candidatas a nuevas especies como asignadas a especies ya conocidas pertenecen al linaje *P. fluorescens* y dentro de éste, al grupo *P. fluorescens*. Esto es debido a que a pesar de la inmensa cantidad de grupos diversos existentes dentro del género *Pseudomonas*, el que tiene mayor diversidad de especies es el grupo de *Pseudomonas fluorescens* como se puede ver en la **Figura 5**.

Es interesante observar que dentro del conjunto de cepas que se consideraran hipotéticas especies nuevas, hay una serie de cepas en un grupo que constituyen la posible nueva especie en este trabajo denominada especie II en el que hay 10 cepas de las cuales 9 pertenecen a la colección de Gotemburgo (CCUG) y una proviene de Son Espases, concretamente la cepa SE2. Este hecho puede llevar a la conclusión de que aunque no haya sido descrita la especie, las cepas han podido ser aisladas en sitios muy distantes por lo que posiblemente la hipotética especie II sea muy común en ámbito hospitalario ya que de hecho 10 de las 26 cepas de estudio son esta misma especie.

Para afirmar que las cepas que se han considerado en este trabajo como posibles nuevas especies lo son, o para refutar la hipótesis, es necesaria la realización de más análisis adicionales. Existen diferentes métodos de estudio de la taxonomía en *Pseudomonas*: métodos de estudio fenotípico, métodos de estudio genotípicos y métodos de estudio filogenéticos (son los realizados en el presente trabajo).

Los métodos de estudio fenotípicos se utilizan como punto de inicio para la descripción formal de una nueva especie. La caracterización bioquímica y fisiología es esencial para poder discriminar entre diferentes especies. Debido a la gran versatilidad tanto fisiológica como metabólica existente dentro del género *Pseudomonas*, existen un gran número de datos fenotípicos que pueden ser utilizados para la taxonomía y descripción de nuevas especies. Entre los posibles análisis fenotípicos posteriores que se podrían realizar está el análisis de la huella del organismo entero. Las técnicas de espectroscopía fingerprinting-pyrolysis mass (PyMS) y espectroscopía Matrix-assisted laser desorption time of flight (MALDI-TOF) se basan en la generación de productos volátiles de bajo peso molecular o ionización de componentes celulares generando complejas huellas de cada célula. Los datos deben ser analizados por métodos computacionales debido a su gran complejidad y pueden ser usados para la identificación a nivel de especie o subespecie (Owen, 2004). Otra técnica que se podría utilizar en análisis posteriores es el análisis de ácidos grasos, whole-cell fatty acid methyl ester (FAME) analysis que consiste en el análisis por cromatografía de gases del contenido celular de ácidos grasos. Otro análisis adicional sencillo que se podría realizar para la caracterización bioquímica y fisiológica es el API 20NE que consiste en un sistema estandarizado para la identificación de bacterias Gram-negativas no entéricas.

Dentro de los métodos de estudio genotípicos está el estudio de la similitud en la hibridación DNA-DNA (DDH) que es el resultado de la estabilidad de híbridos de DNA y se utiliza como estándar para la delimitación de especies. Un nivel de hibridación del 70% o más indica que las secuencias presentan un alto grado de similitud y las cepas pueden ser consideradas como miembros de la misma especie. Niveles inferiores al 20% indican que las cepas son muy distantes y que se encuentran en géneros diferentes.

4.- CONCLUSIONES

El análisis de las secuencias del gen *rpoD* ha permitido asignar ocho de las veintiséis cepas objeto de estudio del presente trabajo que provenían de muestras clínicas que resultaban difíciles de identificar por metodologías tradicionales en un laboratorio clínico. Las cepas que se han podido asignar a cepas tipo conocidas concretas son CCUG 55707, CCUG 58342, CCUG 58598, CCUG 62222, SE4, SE9, SE5, SE11 que se han asignado a *P. peli*^T, *P. moraviensis*^T, *P. otitidis*^T, *P. marginalis*^T, *P. psychrotolerans*^T, *P. oryzihabitans*^T, *P. guariconensis*^T y *P. fragi*^T respectivamente. Cinco de estas cepas que se han podido asignar a especie pertenecen al linaje *P. fluorescens* y el resto, tres, pertenecen al linaje *P. aeruginosa*.

El análisis de las secuencias del gen *rpoD* de las dieciocho cepas restantes no fue suficiente para asignarlas a una cepa tipo conocida por lo que fue necesario un análisis más complejo englobando a los genes DNA ribosómico 16S y *gyrB* para comprobar si se podían identificar con una especie conocida o si se constituían como especies candidatas a nuevas especies. Se realizó un análisis *multilocus* de las secuencias de los genes de las cepas y se hallaron ocho posibles nuevas especies. Las cepas CCUG 57209 y CCUG 62357 constituyen hipotéticamente la misma nueva especie perteneciente al subgrupo *P. fluorescens*. Las cepas CCUG 61232, CCUG 59542, CCUG 62864, CCUG 63715, CCUG 64025, CCUG 64104, SE2, CCUG 61063, CCUG 64255 y CCUG 64384 constituyen un gran grupo perteneciente al subgrupo *P. fluorescens* e hipotéticamente la misma nueva especie diferente. La cepa CCUG 63225 constituye una posible nueva especie perteneciente al grupo *P. lutea*. Las cepas SE1 y SE10 pertenecen al grupo *P. putida* pero constituyen dos posibles nuevas especies diferentes. Las cepas CCUG 58779, CCUG 62879 y CCUG 64416 del linaje *P. aeruginosa*, afiliadas a los grupos *P. stutzeri*, *P. oleovorans* y *P. aeruginosa* respectivamente, son probablemente tres especies nuevas diferentes. Todas estas dieciocho cepas que no han podido ser asignadas a especies conocidas precisan estudios posteriores para poder confirmar que se trata de especies nuevas o si se pueden finalmente asignar a especies conocidas.

5.- AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Elena García-Valdés Pukkits y la Dra. Magdalena Mulet Pol. Al Dr. Antonio Ramírez del Hospital “Son Espases”, y el Dr. Edward Moore del Departamento Clínico de la Universidad de Gotemburgo, por suministrar las cepas clínicas de difícil identificación del género *Pseudomonas*.

6.- REFERENCIAS

- Anzai Y, Kim H, Park J, Wakabayashi H, Oyaizu H (2000). Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *Int J Syst Evol Microbiol*, 50: 1563-89.
- Bennasar A, Rosselló-Mora R, Lalucat J, Moore ERB (1996). 16 rRNA gene sequence analysis relative to genomovars of *Pseudomonas stutzeri* and proposal of *Pseudomonas balearica* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol*, 46: 200-5.
- Gao J, Li B, Wang H, Liu Z (2014). *Pseudomonas hunanensis* sp. nov., isolated from soil subjected to long-term manganese pollution. *Curr Microbiol*. 69(1):19-24.
- Hall T (1997). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT *Nucleic Acids Symposium Series*, 41: 95-98.
- Hameed A, Shahina M, Lin SY, Liu YC, Young CC (2014). *Pseudomonas hussainii* sp. nov., isolated from droppings of a seashore bird, and emended descriptions of *Pseudomonas pohangensis*, *Pseudomonas benzenivorans* and *Pseudomonas segetis*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 64:2330-7.
- Ivanova EP, Gorshkova NM, Sawabe T, Hayashi K, Kalinovskaya NI, Lysenko AM, Zhukova NV, Nicolau DV, Kuznetsova TA, Mikhailov VV, Christen R (2002). *Pseudomonas extremorientalis* sp. nov., isolated from a drinking water reservoir. *Int J Syst Evol Microbiol*, 52: 2113-20.

- Jukes T, Cantor C (1969).** Evolution of protein molecules. In: *Mammalian Protein Metabolism*, pp. 21-132. Edited by HN Munro, Academic Press, Inc, NY.
- Migula W (1895).** *Bacteriaceae* (Stabchenbakterien). In: *Die Naturlichen Pflanzenfamilien*, pp. 20-30. Edited by A Engler and K Prantl. Leipzig, W Engelmann, Leipzig, Teil I, Abteilung Ia.
- Mulet M, Bannasar A, Lalucat J, García-Valdés E (2009).** An rpoD-based PCR procedure for the identification of *Pseudomonas* species and for their detection in environmental samples. *Molecular and Cellular Probes*, 23: 140-147.
- Mulet M, Lalucat J, García-Valdés E (2010).** DNA sequence-based analysis of the *Pseudomonas* species. *Environmental Microbiology*, 12 (69): 1513–1530.
- Munsch P, Alatosava T, Marttinen N, mMeyer JM, Christen R, Gardan L (2002).** *Pseudomonas constantinii* sp. nov., another causal agent of brown blotch disease, isolated from cultivated mushroom sporophores in Finland. *Int J Syst Evol Microbiol*, 52: 1973-83.
- Owen JR (2004).** Bacterial Taxonomics. In: *Methods in molecular biology*, pp. 353-383. Edited by N Woodford and A Johnson, Humana Press Inc, Totowa, NJ.
- Palleroni NJ (1984).** Genus I *Pseudomonas* Migula 1894. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2, pp. 323-79. Edited by NR Krieg and JG Holt. The Williams & Wilkins Co, Baltimore. Maryland, USA.
- Ramírez-Bahena M, Cuesta M, Flores-Félix J, Mulas R, Rivas R, Castro-Pinto J, Brañas J, Mulas D, González-Andrés F, Velázquez E, Peix A (2014).** *Pseudomonas helmanticensis* sp. nov., isolated from forest soil. *Int J Syst Evol Microbiol*, 64 (7):2338-45.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977).** DNA sequencing chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad Sci USA*, 74(12): 5363-7.
- Santos SR, Ochman H (2004).** Identification and phylogenetic sorting of bacterial lineages with universally conserved genes and proteins. *Environ Microbiol*, 6: 754-9.
- Sarkar SF, Guttman DS (2004).** Evolution of the Core genome of *Pseudomonas syringae*, a highly clonal, endemic plant pathogen. *Appl Environ Microbiol* 70: 1999-2012.
- Scotta C, Gomila M, Mulet M, Lalucat J, García-Valdés E (2013).** Whole-cell MALDI-TOF mass spectrometry and multilocus sequence analysis in the discrimination of *Pseudomonas stutzeri* populations: three novel genomovars. *Microb Ecol*, 66:522-32.
- Sikorski J, Stackebrandt E, Wackernagel W (2001).** *Pseudomonas kilonensis* sp. nov., a bacterium isolated from agricultural soil. *Int J Syst Evol Microbiol*, 51: 1549-55.
- Silby M. W., Winstanley C., Godfrey S. A., Levy S. B., Jackson R. W. (2011).** *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable. *FEMS Microbiol. Rev.* 35, 652–680.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, and Kumar S (2011).** MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28: 2731.2739
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997).** The CLUSTALX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res*, 25: 4876-82.
- Wong B, Lee D (2014).** *Pseudomonas yangmingensis* sp. nov., an alkaliphilic denitrifying species isolated from a hot spring. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 117: 71-4
- Wu M, Wen J, Chang M, Yang G, Zhou S (2014).** *Pseudomonas sihuiensis* sp. nov., isolated from a forest soil in South China. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 105(4):781-90.
- Yamamoto S, Harayama S (1998).** Phylogenetic relationships of *Pseudomonas putida* strains deduced from the nucleotide sequences of *gyrB*, *rpoD* and 16S rRNA genes. *Int J Syst Bacteriol*, 48: 813-9.
- Yamamoto S, Kasai H, Arnold DL, Jackson RW, Vivian A, Harayama S (2000).** Phylogeny of the genus *Pseudomonas*: intragenetic structure reconstructed from the nucleotide sequences of *gyrB* and *rpoD* genes. *Microbiology*, 146: 2385-2394.