

Nota Técnica

ANÁLISIS DEL PANGENOMA EN *Azospirillum brasilense*

Jessica I. Licea-Herrera¹, José L. Hernández-Mendoza², Jesús D. Quiroz-Velásquez²,
Ana V. Martínez-Vázquez² y Alfonso Méndez-Tenorio³

RESUMEN

La bacteria *Azospirillum brasilense* ha sido estudiada por asociarse a la estimulación de crecimiento de plantas por producción de auxinas, especialmente del ácido indol acético, además de la fijación biológica de nitrógeno. El análisis de genomas se emplea para generar una matriz de huella genómica y con ellos construir un árbol para distinguir las diferencias entre especies de este género. El presente análisis se realizó con el método de la huella genómica virtual empleando el programa VAMPhyRE. Se diseñaron sondas para detectar 19 nucleótidos y con los resultados obtenidos se generó una matriz de huella genómica a partir de la cual se construyó un árbol genómico de mínima evolución el cual reveló las relaciones filogenómicas entre las especies del género resaltando que la especie *A. brasilense* está separada en un clado perfectamente diferenciado de las otras especies del grupo. Así mismo, el análisis permitió detectar que el genoma de *A. brasilense* este compuesto de 19,284 genes, equivalentes a 16 % de los genes anotados y conforman el core genome de las cepas analizadas. El 27 % son genes medianamente conservados. Esta es una evidencia de la gran variabilidad genómica de la especie. Además, se generó un gráfico del genoma de la especie. Además, empleando el programa PROKKA y el método de huella genómica virtual se creó una matriz de distancias que generó un árbol filogenómico de mínima evolución, sin raíz, en forma radial mostrando que todas las cepas de *A. brasilense* están alojadas en un mismo clado y separadas de las otras especies de este género.

Palabras clave adicionales: Análisis bioinformático, análisis de genomas, árbol filogenómico, huella genómica

ABSTRACT

Azospirillum brasilense, pangenome analysis

The bacterium *Azospirillum brasilense* has been studied for being associated with the stimulation of plant growth by production of auxins, especially indole acetic acid, in addition to the biological fixation of nitrogen. Genome analysis is used to generate a genome fingerprint matrix and with them build a tree to distinguish the differences between species of this genus. To carry out this analysis, it was carried out with the virtual genomic fingerprinting method using the VAMPhyRE program. Probes were designed to detect 19 nucleotides and with the results obtained, a genomic fingerprint matrix was generated from which a genomic tree of minimal evolution was built, which revealed the phylogenomic relationships between the species of the genus, highlighting that the Brazilian species *A* is separated in a clade perfectly differentiated from the other species of the group. Likewise, the analysis allowed us to detect that the *A. brasilense* genome is composed of 19,284 genes, which is equivalent to 16 % of the genes annotated and make up the core genome of the strains analyzed. Likewise, 27 % are moderately conserved genes. This is evidence of the great genomic variability that the species presents. In addition, a graph of the genome of the species was generated. Also, using the PROKKA program and the virtual genomic fingerprinting method, a matrix of distances and a phylogenomic tree of minimal evolution were generated, without roots, in radial shape showing that all *A. brasilense* strains are housed in the same clade and separated from the other species of this genus.

Additional Keywords: Bioinformatic analysis, genomic fingerprinting, core genome, genome analysis

Editor Asociado: Dra. Iris Pérez Almeida

INTRODUCCIÓN

La bacteria *Azospirillum brasilense* es un habitante de la rizosfera que produce ácido indol

acético (AIA), el principal compuesto auxínico que provoca la estimulación del crecimiento de las plantas inoculadas. Por su parte, algunos aislados

Recibido: Diciembre 20, 2024

Aceptado: Agosto 5, 2025

¹Egresada Maestría en Ciencias Instituto Politécnico Nacional. Centro de Biotecnología Genómica. Col Narciso Mendoza, México. e-mail: jliceah1800@alumno.ipn.mx.

²Instituto Politécnico Nacional. Centro de Biotecnología Genómica. Col Narciso Mendoza, México. e-mail: jhernandezm@ipn.mx (autor de correspondencia); jquiroz@ipn.mx; avmartinez@ipn.mx.

³Instituto Politécnico Nacional. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Col Santo Tomas Alcaldía Miguel Hidalgo CDMX., México. e-mail: amendezt@ipn.mx

que poseen los genes *nif* fijan nitrógeno a través de la transformación del indol acetónitrilo (IAN) en AIA liberando compuestos nitrogenados asimilables por las plantas (Fukami *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2019; Koul *et al.*, 2020).

Debido a lo anterior, con esta bacteria se han desarrollado inoculantes que se han empleado en cultivos como arroz, sorgo, maíz y otras gramíneas (Hernández *et al.*, 2018; Domingues *et al.*, 2020; Sanches *et al.*, 2021). *A. brasilense* puede adaptarse a diversas condiciones de suelo y estrés (Wisniewski *et al.*, 2012) porque contiene genes como el *wzm*, localizado en el plásmido pRhico, que induce la síntesis de polisacáridos (Lerner *et al.*, 2009). Posee también los genes *flmA* y *flmB* involucrados en la capacidad de asociación con la raíz (Rossi *et al.*, 2016).

Entre las herramientas génicas de *A. brasilense* involucradas en la síntesis del AIA se encuentran los genes que regulan las rutas Triptófano Dependiente (TRP-D) y la Triptófano Independiente (TRP-I), mismas que pueden tener similitudes con las descritas en hongos como *Trichoderma* spp y algunas especies vegetales (Kaneko *et al.*, 2010; Uribe *et al.*, 2020; Koul *et al.*, 2020).

En el género *Azospirillum* se han descrito 21 especies, en las cuales se ha reseñado una gran heterogeneidad en el número de cromosomas, contigs, scaffolds y otras estructuras génicas. Puede haber replicones de 600 kb hasta 2.500 Kb, con regiones codificantes entre 5.330 y 7.559 y las secuencias relacionadas al 16S ARNr en cromosomas y plásmidos (Kaneko *et al.*, 2010; Wisniewski *et al.*, 2012; Koul *et al.*, 2020). Así, en un análisis comparativo entre *A. brasilense* CBG497, Sp245, *A. lipoferum* 4B, *Azospirillum* sp B510, se encontró que el core genoma está conformado por 2.328 proteínas, contiene genes de origen ancestral (74 %) y el DNA cromosómico varía de 62 a 65 % (Wisniewski *et al.*, 2012). En el caso de *Azospirillum* sp aislado B510, tiene un solo cromosoma (3.311.395 pb) con 2.893 genes potenciales, 45 genes de tRNA y 6 plásmidos que contienen un total de 3.416 genes codificantes de proteínas (Kaneko *et al.*, 2010).

En esta investigación se analizó del genoma de las especies del género *Azospirillum* spp a fin de contribuir al conocimiento de la diversidad genética, del agrupamiento y la distribución de genes en su genoma y con ello conocer el potencial de la bacteria en la producción de metabolitos

secundarios, como compuestos auxínicos y el impacto de éstos en estudios de laboratorio y campo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Análisis bioinformático. Los genomas disponibles de *Azospirillum* spp (Cuadro 1) en el NCBI (en inglés, National Center for Biotechnology Information) fueron descargados usando la herramienta FILEZILLA. Se utilizaron únicamente los genomas que tuvieran secuencia de referencia (RefSeq).

Huella Genómica Virtual. El análisis de los genomas fue realizado con el método de huella genómica virtual empleando el programa VAMPhyRE (Muñoz *et al.*, 2017): Las secuencias obtenidas se concatenaron a otras secuencias ensambladas incompletas (contig o scaffold). Se diseñaron 15.265 sondas de 13 nucleótidos para hibridar en los genomas. El programa VAMPhyRE se empleó para comparar patrones de hibridación o huellas genómicas virtuales; con este mismo programa, además, se obtuvo el número de sitios compartidos. Para evitar una hibridación al azar, los sitios fueron extendidos a 3 posiciones más en ambos lados, es decir, un total de 19 nucleótidos de longitud. Se consideró homología entre dos genomas si los sitios que coincidían eran entre 16 y 19 nucleótidos. Los resultados fueron empleados para generar un archivo con la matriz de distancias genómicas calculadas. Ellas sirvieron de base para generar un árbol filogenómico de mínima evolución, sin raíz en forma radial utilizando el programa MEGAx 10.1.

La anotación de genomas de *Azospirillum brasilense* se realizó con el programa en línea Rapid Annotation using Subsystems Technology (RAST) (Aziz *et al.*, 2008), empleando los archivos concatenados de los genomas completos de *A. brasilense* (cepas Sp7-1, Sp7-2, MTCC4035, MTCC4036, MTCC3038, MTCC4039 y Cd9). Posteriormente, con el mismo programa, se compararon las secuencias genómicas provenientes de las bases de datos y de ahí se generaron archivos de salida con los genes encontrados.

Por su parte, se empleó el programa Rapid Prokaryotic Genome Annotation (PROKKA) para almacenar y procesar los datos obtenidos de los genomas a fin de ser analizados con el programa ROARY para detectar diferencias y semejanzas entre las cepas (Wisniewski *et al.*, 2012; Seemann, 2014) y con ello se estructuró una carpeta con los

genomas de *A. brasilense* de las cepas Sp7-1, Sp7-2, MTCC4035, MTCC4036, MTCC3038, MTCC4039 y Cd (GenBank code GCA_008274965.1).

El programa ROARY sirvió para analizar a gran escala la estructura del pangenoma de *A. brasilense* y a partir de allí identificar los genes centrales y accesorios. Este programa empleó todos los genomas de *A. brasilense*. Para ello, las regiones codificantes se extrajeron y se convirtieron en secuencias de proteínas, y se filtraron para eliminar las secuencias parciales. Esto permitió obtener un conjunto sustancialmente reducido de secuencias de proteínas. Finalmente, se realizó una comparación de las secuencias con un porcentaje de identidad de secuencia definido por el usuario (por defecto 95 %).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En total se descargaron, del portal del NCBI, 13 genomas completos y 36 incompletos, los cuales corresponden a especies analizadas en el estudio fueron *A. brasilense*, *A. thiophilum*, *A. lipoferum*, *A. doebereineriae*, *A. oryzae*, *A. halopraeferens*, *A. humicireducens*, y otros aislados sin identificación a especie (Cuadro 1).

Del análisis realizado se identificaron 14 genomas completos de los cuales solo 7 han sido liberados. Además, se detectaron 19 contigs, 14 scaffolds y 4 cromosomas. Se determinó que el tamaño de los genomas varía de 5.95 en el aislado *Azospirillum* sp. L-25-5w-1 hasta 8.34 Mpb en el caso de *Azospirillum* sp. TSA6c (Cuadro 2). Igualmente se detectó que la estructura genómica del género está conformada por varios replicones, algunos de los cuales pueden ser lineales o circulares con tamaño de 0.16 a 3.1 Mpb (Allardet *et al.*, 1993; Rivera *et al.*, 2014). Asimismo, que el número de éstos puede variar entre especie, e incluso entre aislados, y su número va de 3 a 8 plásmidos (Caballero *et al.*, 1999; Martin *et al.*, 2000; Rivera *et al.*, 2014) (Cuadro 2). En un análisis similar, empleando bacteriófagos (Boyer *et al.*, 2008), se constató que los bacteriófagos de cepas de *A. brasilense* (Cd y Sp7) resultaron idénticos, mientras que no encontraron homologías entre los bacteriófagos de *A. brasilense* y *A. lipoferum*. En el Cuadro 2 se incorpora el tipo de secuenciación empleada, porque de acuerdo con ello la información, producto del análisis, puede variar.

De igual manera, se confirmó la teoría de la multiplicidad de cromosomas ya que su número puede ir de 1 a 4 en múltiples replicones con peso de 600 kb, 1.000 kb, 1.700 kb o uno más, extraño por su peso que es de 2.500 kb (Allardet *et al.*, 1993). Asimismo, todos los genomas contienen componentes accesorios relacionados con la plasticidad genómica que podrían promover la adquisición de ADN extraño o reordenamientos entre replicones, lo que contribuye a explicar las variantes entre cepas asociadas a distintas plantas (Wisniewski *et al.*, 2012). Además, se detectó que las regiones codificantes se encuentran entre 5.330 y 7.559 Kb y que el pangenoma de *A. brasilense* está conformado por 19.248 genes.

Se empleó el programa PROKKA, para almacenar y procesar los datos obtenidos de los genomas, y analizarlos con el programa ROARY, para detectar diferencias y semejanzas entre las cepas (Wisniewski *et al.*, 2012; Seemann, 2014); el análisis de huella genómica virtual que empleó toda la información disponible de las diferentes especies y scaffolds y contigs, y junto con el programa MEGAx 10.1, se generó un árbol filogenómico (Figura 1) donde se destaca que todos los aislados de *A. brasilense* se agrupan en un solo clado y las otras especies están en otro clado bien diferenciado.

Análisis de genes compartidos (ROARY). Los genomas de *A. brasilense*, Sp7-1, Sp7-2, MTCC4035, MTCC4036, MTCC3038, MTCC4039 y Cd; presentan un pangenoma de 19.284 genes (Figura 2). Los genes nucleares, llamados core genes, se definen como los que se encuentran en al menos el 99 % de las muestras y totalizan 3.033 genes, mismos que corresponden al 16 % del total de genes anotados. Por su parte, los genes de la cáscara llamados shell genes, conciernen a los genes restantes moderadamente conservados, presentes desde el 15 % hasta menos del 95 % de los genomas, representando el 27 % de genes encontrados en la anotación previamente mencionada (Figura 2).

Finalmente, los genes nube atañen a los genes raros presentes en menos del 15 % de los genomas, siendo el que obtuvo el mayor porcentaje con 57 % de los genes encontrados en la anotación de las cepas de *A. brasilense* empleadas (Figura 2).

Cuadro 1. Lista de genomas y secuencias del género *Azospirillum* empleadas para la realización de este estudio y obtenidos del NCBI. El tamaño se expresa en mega par de bases (Mpb).

Bacteria	Cepa	Secuencias	Tamaño (Thackray, et al., 2008)	GenBank ID*
<i>Azospirillum brasilense</i>	Sp 7-1	Completo	6.58753	GCA_001315015.1
<i>Azospirillum brasilense</i>	Sp 7-2	Completo	7.10024	GCA_008274945.1
<i>Azospirillum brasilense</i>	Az39	Completo	7.39128	GCA_000632475.2
<i>Azospirillum brasilense</i>	MTCC4038	Completo	7.13417	GCA_005222145.1
<i>Azospirillum brasilense</i>	MTCC4035	Completo	7.92866	GCA_005222165.1
<i>Azospirillum brasilense</i>	MTCC4039	Completo	7.19625	GCA_005222205.1
<i>Azospirillum brasilense</i>	Sp 7	Contig	7.08277	GCA_007827425.1
<i>Azospirillum brasilense</i>	V6	Contig	7.09252	GCA_002027445.1
<i>Azospirillum brasilense</i>	Ab-V5	Contig	6.93449	GCA_002940725.1
<i>Azospirillum brasilense</i>	Ab-V6	Contig	7.1972	GCA_002940755.1
<i>Azospirillum brasilense</i>	FP2	Contig	6.88511	GCA_033549865.1
<i>Azospirillum brasilense</i>	REC3	Scaffold	7.22895	GCA_002895265.1
<i>Azospirillum brasilense</i>	2A1	Scaffold	7.25781	GCA_002245955.1
<i>Azospirillum brasilense</i>	HAMBI_31	Scaffold	7.13972	GCA_003349955.1
<i>Azospirillum brasilense</i>	SR80	Scaffold	7.14659	GCA_003584185.1
<i>Azospirillum brasilense</i>	Sp245	Cromosoma	7.53024	GCA_000237365.1
<i>Azospirillum brasilense</i>	Sp245	Cromosoma	7.68239	GCA_003119195.2
<i>Azospirillum brasilense</i>	MTCC4036	Cromosoma	8.1211	GCA_005222185.1
<i>Azospirillum</i> sp.	B510	Completo	7.59974	GCA_000010725.1
<i>Azospirillum</i> sp.	CFH 70021	Completo	6.77631	GCA_003130795.1
<i>Azospirillum</i> sp. M2T2B2	M2T2B2	Completo	6.31626	GCA_003233655.1
<i>Azospirillum</i> sp. TSA2s	TSA2S	Completo	8.10248	GCA_004923315.1
<i>Azospirillum</i> sp. TSH100	TSH100	Completo	7.16638	GCA_004923295.1
<i>Azospirillum</i> sp. TSH58	TSH58	Completo	7.24407	GCA_003119115.1
<i>A. thiophilum</i>	BV-S	Completo	7.60946	GCA_001305595.1
<i>Azospirillum lipoferum</i>	4B	Completo	6.8464	GCA_000283655.1
<i>Azospirillum lipoferum</i>	R1C	Contig	7.77069	GCA_020005195.1
<i>A. doebereineriae</i>	GSF71	Contig	7.00006	GCA_003989665.1
<i>Azospirillum oryzae</i>	A2P	Contig	7.67469	GCA_900177515.1
<i>Azospirillum</i> sp.	K2W22B-5	Contig	6.461	GCA_003590795.1
<i>Azospirillum</i> sp. RU37A	RU37A	Contig	6.13041	GCA_900188305.1
<i>Azospirillum</i> sp. RU38E	RU38E	Contig	6.12876	GCA_900188385.1
<i>Azospirillum</i> sp. Sp 7	Sp 7	Contig	7.09859	GCA_003116055.1
<i>Azospirillum</i> sp. TSH100	TSH100	Contig	7.15373	GCA_003115975.1
<i>Azospirillum</i> sp. TSH20	TSH20	Contig	7.45508	GCA_003115935.1
<i>Azospirillum</i> sp. TSH58	TSH58	Contig	6.98287	GCA_003115995.1
<i>Azospirillum</i> sp. TSH7	TSH7	Contig	7.4476	GCA_003115945.1
<i>Azospirillum</i> sp. TSO22-1	TSO22-1	Contig	7.35389	GCA_003116015.1
<i>Azospirillum</i> sp. TSO5	TSO5	Contig	6.99813	GCA_003116065.1
<i>A. thiophilum</i>	DSM21654	Contig	7.63752	GCA_000960825.1
<i>Azospirillum halopraeferens</i>	DSM 3675	Scaffold	6.51238	GCA_000429625.1
<i>Azospirillum</i> sp.	B2	Scaffold	7.99749	GCA_002573965.1
<i>Azospirillum</i> sp.	B4	Scaffold	7.34536	GCA_000333275.1
<i>Azospirillum</i> sp.	B506	Scaffold	7.2381	GCA_000333595.1
<i>Azospirillum</i> sp.	CAG:239	Scaffold	1.797	GCA_963637695.1
<i>Azospirillum</i> sp.	CAG:260	Scaffold	1.81059	GCA_000436195.1
<i>Azospirillum</i> sp. L-25-5w-1	L-25-5w-1	Scaffold	5.95138	GCA_003966125.1
<i>Azospirillum</i> sp. TSA6c	TSA6c	Scaffold	8.34182	GCA_003115895.1
<i>Azospirillum</i> sp. TSH64	TSH64	Scaffold	7.90115	GCA_003116035.1
<i>Azospirillum</i> sp. TSO35-2	TSO35-2	Scaffold	7.35204	GCA_003116095.1
<i>A. humicireducens</i>	SgZ-5	Cromosoma	6.8627	GCA_001639105.2

* <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/?taxon=191>

Cuadro 2. Lista de genomas empleados para análisis bioinformático. Se describen características propias del genoma (tamaño, plásmidos y proteínas), así como el tipo de secuenciación empleado para su descripción.

Cepa	Tamaño	Replicones	Secuenciación	Proteínas
MTCC4035	7.92866	Un cromosoma 8 plásmidos	PacBio RSII	6858
MTCC4038	7.13417	Un cromosoma 6 plásmidos	PacBio RSII	6214
MTCC4039	7.19625	Un cromosoma 5 plásmidos	PacBio RSII	6294
Az39	7.39128	Un cromosoma 5 plásmidos	Illumina- Newbler	6428
Sp7-1	6.58753	Un cromosoma 5 plásmidos	PacBio	5730
Cd GenBank GCA_008274965.1	7.44	4 cromosomas 2 plásmidos	Illumina HiSeq	6599
Sp7-2	7.10	4 cromosomas 2 plásmidos	Illumina HiSeq	6270

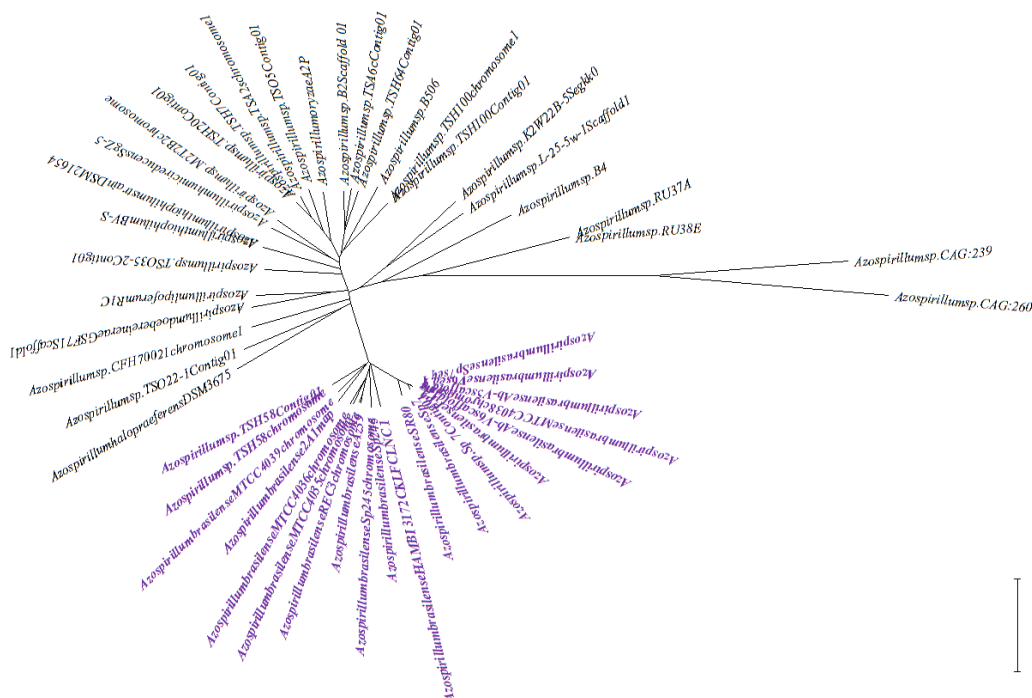


Figura 1. Árbol filogenético del género *Azospirillum*. La especie *A. brasilense* se agrupa en solo clado y las otras especies en el clado separado

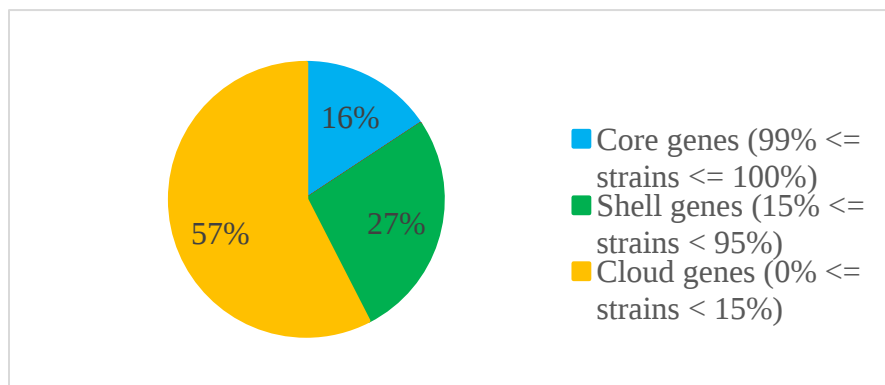


Figura 2. Análisis del pangenoma de *A. brasilense*. Únicamente el 16 % de los 19.284 genes anotados, se encuentran en el core genoma.

CONCLUSIONES

El análisis genómico de las secuencias disponibles en bases de datos mostró que el pangenoma de *A. brasilense* es de 19.284 genes, de los cuales 3.033 genes corresponden al core genoma. El árbol filogenómico realizado mostró que la especie está bien diferenciada de las otras 21 especies de este género y se organiza en un solo clado con distancias génicas cortas entre ellas.

AGRADECIMIENTOS

Trabajo financiado por el Instituto Politécnico Nacional a través de proyectos SIP IPN. Hernández Mendoza, Quiroz Velásquez, Martínez-Vázquez y Méndez-Tenorio son EDI-IPN y miembros del Sistema Nacional de Investigadores.

LITERATURA CITADA

- Allardet-Servent, A., S. Michaux-Charachon, E. Jumas-Bilak, L. Karayan y M. Ramuz. 1993. Presence of one linear and one circular chromosome in the *Agrobacterium tumefaciens* C58 genome. *Journal of Bacteriology* 175(24): 7869-7874.
- Aziz, R.K., D. Bartels, A.A. Best, A. DJongh, M. Disz, T Edwards, K Formsma *et al.* 2008. The RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology. *BMC Genomics* 9(1): 75.
- Boyer, M., J. Haurat, S. Samain, B. Segurens, F. Gavory, V. González *et al.* 2008. Bacteriophage prevalence in the genus *Azospirillum* and analysis of the first genome sequence of an *Azospirillum brasilense* integrative phage. *Appl. Environ. Microbiol.* 74(3): 861-74.
- Caballero-Mellado, J., L. López-Reyes y R. Bustillos-Cristales. 1999. Presence of 16S rRNA genes in multiple replicons in *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiology Letters* 178(2): 283-288.
- Domingues-Duarte, C.F., U. Cecato, T. Tretto-Biserra, D. Mamédio y S. Galbeiro. 2020. *Azospirillum* spp. en gramíneas y forrajeras. Revisión. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias* 11: 223-240.
- Fukami, J., P. Cerezini y M. Hungria, 2018. *Azospirillum*: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation. *AMB Expr* 8: 73.
- Hernández-Mendoza, J.L., J.D.C. Quiroz-Velásquez, J.G. García-Olivares, C. Lizarazo-Ortega; M.C. Martínez-Rodríguez, M.Á. Ibarra-Rodríguez. 2018. Análisis económico del uso de biofertilizantes comerciales en el cultivo del sorgo. *Revista de la Facultad de Agronomía de Zulia* 35:4.
- Hungria, M, RA Ribeiro y MA. Nogueira. 2018. Draft Genome Sequences of *Azospirillum brasilense* Strains Ab-V5 and Ab-V6, Commercially Used in Inoculants for Grasses and Legumes in Brazil. *Genome Announc.* 17;6(20): e00393-18.

9. Kaneko, T., .K. Minamisawa, T. Isawa, H. Nakatsukasa, H. Mitsui, Y. Kawaharada, *et al.* 2010. Complete Genomic Structure of the Cultivated Rice Endophyte *Azospirillum* sp. B510. *DNA Research* 17(1): 37-50.
10. Koul, V., D. Srivastava, P.P. Singh y M. Kochar. 2020. Genome-wide identification of *Azospirillum brasilense* Sp245 small RNAs responsive to nitrogen starvation and likely involvement in plant-microbe interactions. *BMC Genomics* 21: 821.
11. Lerner, A., Y. Okon y S. Burdam 2009. The *wzm* gene located on the pRhico plasmid of *Azospirillum brasilense* Sp7 is involved in lipopolysaccharide synthesis. *Microbiology* 155: 791-804.
12. Martin-Didonet, C.C.G., L.S. Chubatsu, E.M. Souza, M. Kleina, F.G.M. Rego, U. Liu *et al.* 2000. Genome Structure of the Genus *Azospirillum*. *Journal of Bacteriology* 182(14): 4113-4116.
13. Muñoz-Ramírez, Z.Y., A. Mendez-Tenorio, I. Kato, M.M. Bravo, C. Rizzato K. Thorell *et al.* 2017. Whole Genome Sequence and Phylogenetic Analysis Show *Helicobacter pylori* Strains from Latin America Have Followed a Unique Evolution Pathway. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 7: 50.
14. Rivera, D., S. Revalle, R. Molina, J. Gualpa, M. Puente, G. Maroniche, *et al.* 2014. Complete Genome Sequence of the Model Rhizosphere Strain *Azospirillum brasilense* Az39, Successfully Applied in Agriculture. *Genome Announc.* 24;2(4): e00683-14.
15. Rossi, F.A., D.B. Medeot, J.P. Liaudat, M. Pistorio y E. Jofré, 2016. *Azospirillum brasilense*, mutations in *flmA* or *flmB* genes affect polar flagellum assembly, surface polysaccharides, and attachment to maize roots, *Microbiological Research* 190: 55-62.
16. Sanches-Santos, M., M.A. Nogueira y M. Hungria. 2021. Outstanding impact of *Azospirillum brasilense* strains Ab-V5 and Ab-V6 on the Brazilian agriculture: Lessons that farmers are receptive to adopt new microbial inoculants. *Revista Brasileira de Ciencia do Solo* 45:e0200128.
17. Seemann, T. 2014. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* 30(14): 2068-2069.
18. Thackray, S.J., C. Bruckmann, J.R. Anderson, L.P. Campbell, R. Xiao, L. Zhao y S.K. Chapman. 2008. Histidine 55 of tryptophan 2, 3-dioxygenase is not an active site base but regulates catalysis by controlling substrate binding. *Biochemistry* 47(40): 10677-10684.
19. Uribe-Bueno, M., J.L. Hernández-Mendoza, C.A. García, V. Ancona y V. Larios-Serrato. 2020. Independent Tryptophan pathway in *Trichoderma asperellum* and *T. koningiopsis*: New insights with bioinformatic and molecular analysis. *BioRxiv* 07.
20. Wisniewski-Dyé, F., L. Lozano, E. Acosta-Cruz, S. Borland, B. Drogue, C. Prigent-Combaret y P. Mavingui. 2012. Genome sequence of *Azospirillum brasilense* CBG497 and comparative analyses of *Azospirillum* core and accessory genomes provide insight into niche adaptation. *Genes (Basel)* 3(4): 576-602.
21. Zhang, P., T. Jin, S. Kumar-Sahu, J. Xu, Q. Shi, H. Liu y Y. Wang. 2019. The Distribution of Tryptophan-Dependent Indole-3-Acetic Acid Synthesis Pathways in Bacteria Unraveled by Large-Scale Genomic Analysis. *Molecules* 10;24(7): 1411.

