

## **Microorganismos de interés para la agricultura del futuro: agentes de biocontrol y fijadores de nitrógeno**

Patricia Bernal\* [ID](#).

Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, Av. Reina Mercedes 6, C.P. 41012, Sevilla, España. Teléfono: +34-954557116; Fax: +34-954557830.

\*Email autor corresponsal: [pbernal@us.es](mailto:pbernal@us.es)

**Recibido:** 31 de diciembre 2020. **Aceptado:** 13 febrero 2021

### **RESUMEN**

La agricultura extensiva, necesaria para cubrir las necesidades nutricionales de los miles de millones de habitantes del planeta, ha requerido de diversos métodos para asegurar la producción a la vez que para evitar pérdidas millonarias. Entre estos métodos, el uso de compuestos químicos como los pesticidas y los fertilizantes nitrogenados ha permitido el abastecimiento de frutas, hortalizas, legumbres y cereales tanto para los animales de granja como para los seres humanos durante las últimas décadas. Por un lado, los pesticidas químicos han sido fundamentales para evitar las grandes pérdidas derivadas de las inevitables plagas que atacan a los cultivos, mientras que los fertilizantes nitrogenados han permitido aumentar enormemente la producción de los mismos, al proveer a los cultivos de su principal limitante para el crecimiento, el nitrógeno en su forma asimilable. Aunque es indudable que estas dos herramientas han sido claves para mantener la agricultura extensiva, ambas tienen graves efectos secundarios para el medio ambiente como la contaminación del subsuelo o la pérdida del microbioma natural tanto del suelo como de la planta. Por esta razón, en los últimos años, se vienen priorizando diferentes iniciativas destinadas a promover una agricultura más sostenible con el medio ambiente, donde la producción no sea el único factor a tener en cuenta y se cuide igualmente la salud de nuestro planeta. En este contexto, el control biológico de las enfermedades producidas por patógenos de plantas (fitopatógenos) y la fijación biológica de nitrógeno (rizobios) se consideran alternativas excelentes a los pesticidas químicos y los fertilizantes nitrogenados para proteger nuestros cultivos y aumentar su producción, respectivamente.

En este artículo, se describen casos de interés tanto de control biológico a través del uso del sistema de

secreción de tipo VI en *Pseudomonas putida* como de fijación biológica de nitrógeno (sistema de secreción tipo III en rizobios) y se discutirán las posibles direcciones que pueden tomar las nuevas investigaciones en este campo desde el punto de vista de la biotecnología agraria.

**Palabras clave:** biocontrol, fijadores de nitrógeno, sistema de secreción tipo VI (T6SS), sistema de secreción tipo III (T3SS), *Pseudomonas putida*, rizobios.

## ABSTRACT

Extensive agriculture necessary to meet the nutritional needs of billions of inhabitants of the planet has required various methods to ensure production as well as to avoid millionaire damages. Among these methods, the use of chemical compounds such as pesticides and nitrogen fertilizers has allowed the supply of fruits, vegetables, legumes and cereals for both farm animals and human beings during the last decades. On one hand, chemical pesticides have been fundamental to avoid the great losses derived from crop pests. On the other hand, nitrogen fertilizers have allowed to greatly increase agriculture production by providing crops with their main limitation for growth, assimilable nitrogen. Although it is clear that these approaches have been key to maintaining extensive agriculture, both have serious secondary effects on the environment including contamination of the soil and the impairment of natural microbiome. For this reason, in recent years, different initiatives have been prioritized to promote sustainable agriculture to preserve our planet. In this context, the biological control of diseases caused by plant pathogens (phytopathogens) and the biological nitrogen fixation are considered excellent alternatives to chemical pesticides and nitrogen fertilizers to protect our crops and increase their production, respectively.

In this article, both, the biological control carried out by *Pseudomonas putida* using the type VI secretion system and the biological nitrogen fixation performed by rhizobia employing the type III secretion system, are described from the point of view of the agricultural biotechnology.

**Keywords:** biocontrol, nitrogen fixing bacteria, type VI secretion system (T6SS), type III secretion system (T3SS), *Pseudomonas putida*, rhizobia.

## INTRODUCCIÓN

### Agentes de biocontrol como alternativa a los pesticidas químicos

El uso de microorganismos ambientales para erradicar patógenos de plantas es una vieja estrategia que se vio interrumpida tras la introducción de los pesticidas químicos. El uso de estos pesticidas causa muchos efectos negativos, incluyendo la erosión del suelo, la contaminación del agua subterránea y la pérdida de un microbioma saludable tanto del suelo como de la planta. Por ello, la agricultura sostenible se ha convertido en una prioridad en las principales economías del mundo. La agricultura sostenible debe ser capaz de satisfacer las necesidades de una población en rápido crecimiento (se estima que la población mundial será de 9,5 mil millones de personas en el año 2050) al mismo tiempo que se respeta el planeta y sus recursos. De acuerdo con estos principios, el control biológico o biocontrol se está convirtiendo, una vez más, en una alternativa extremadamente interesante para proteger nuestros cultivos de una manera eficiente y sostenible, al tiempo que se evita el uso de pesticidas químicos. El biocontrol consiste en controlar enfermedades producidas por diferentes microorganismos en plantas conocidos como patógenos de plantas o fitopatógenos mediante el uso de un arma biológica, es decir, otro microorganismo con la capacidad de inhibir el crecimiento o incluso

aniquilar al patógeno sin dañar la planta (cultivo de interés). En esta nueva era y para avanzar en este campo de investigación, es crucial comprender de manera íntegra los mecanismos moleculares de control biológico realizados por agentes de biocontrol conocidos y perfectamente establecidos. En este artículo vamos a centrarnos en *Pseudomonas putida*, un modelo de agente de biocontrol acreditado [1].

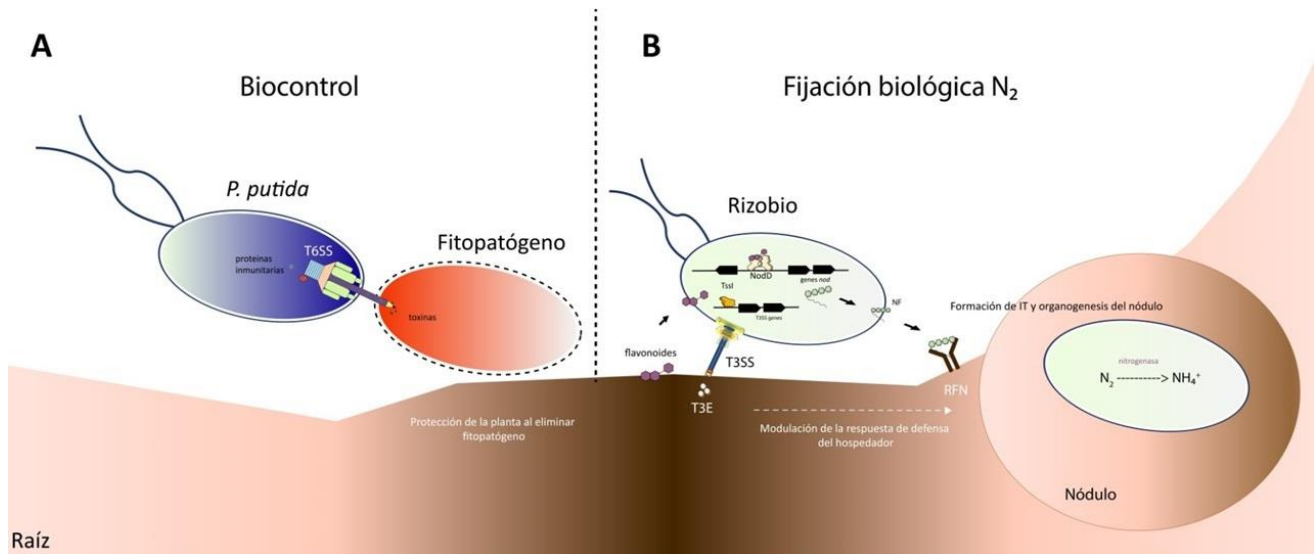
*P. putida* es una bacteria que, durante años, ha sido estudiada extensamente por sus múltiples implicaciones biotecnológicas; es una especie segura y la gran mayoría de sus cepas no producen enfermedades en humanos, animales, ni plantas. Como dato curioso, la estirpe KT2440, el microorganismo modelo de los estudios que se exponen a continuación, fue la primera bacteria en ser patentada (EEUU, 1980). *P. putida* es una bacteria saprófita del suelo con la capacidad de colonizar la raíz de diferentes plantas de cultivo entre ellas el maíz [2]. La colonización llevada a cabo por esta bacteria proporciona ventajas de crecimiento a la planta [3] y, al mismo tiempo, protección contra una gran variedad de fitopatógenos; ya sean otras bacterias, hongos o incluso gusanos [4,5,6], por lo que, como comentábamos anteriormente, es considerada un agente de control biológico.

Se conocen diferentes mecanismos usados por bacterias para biocontrolar enfermedades en

plantas incluyendo la síntesis de bacteriocinas, antibióticos o la producción de sideróforos [1]. Pero aquí vamos a centrarnos en un nuevo mecanismo de biocontrol descubierto recientemente en *P. putida* KT2440, el sistema de secreción de tipo VI (T6SS, por sus siglas en inglés **Type VI Secretion System**) que confiere a esta estirpe casi la totalidad de su capacidad biocontroladora [7] (Fig. 1A). El T6SS es una nanomáquina bacteriana utilizada para inyectar efectores directamente desde la célula productora hasta el interior de las células diana, donde pueden tener efectos letales sobre las mismas. Es por ello que esta herramienta molecular juega un papel extremadamente importante en la competición entre bacterias y así, las estirpes bacterianas que expresan de forma activa este sistema de secreción presentan grandes ventajas con respecto al resto de organismos presentes en ambientes polimicrobianos complejos [8]. La estructura del T6SS se asemeja a un bacteriófago invertido que se ancla a la membrana a través de un complejo de membrana (TssJ, TssM y TssL) al que se une una placa base (TssE, TssF, TssG y TssK) desde donde polimeriza un tubo (Hcp) rodeado por una cubierta contráctil o vaina (TssB y TssC) y terminada por un complejo formado por la proteína TssA. Por el otro extremo, y a nivel de placa base, el sistema termina en una punta (VgrG y PAAR), que una

vez eyectada perfora las membranas celulares [9] (Fig. 1A). Una vez que se ensambla el sistema, existen señales mayoritariamente desconocidas que producen un cambio conformacional a nivel de placa base y esto se traduce en la contracción de la vaina que expulsa el tubo interno (Hcp) y su punta (VgrG y PAAR), ambos cargados con toxinas (efectores) hacia el exterior celular para ser secretados en el interior de la célula diana (Fig.1A). Con frecuencia, las dianas del T6SS son otras células procariotas y, por ello, se considera una potente arma antimicrobiana [9], aunque también se conocen efectores de tipo VI con dianas eucariotas como células animales [10] y hongos [11].

*P. putida* contiene tres T6SS llamados K1-, K2- y K3-T6SS; cada uno de ellos contiene el número mínimo de componentes necesarios para formar una maquinaria funcional (componentes centrales), componentes denominados accesorios implicados en la regulación del sistema o que confieren alguna variedad en la conformación del mismo y al menos 12 pares de efectores (toxinas) / proteínas inmunitarias (pares EI, del inglés **Effector / Immunity pair**). Entre estos efectores, denominados Tke (del inglés, **T6SS KT2440 effector**), se encuentran nucleasas y colicinas formadoras de poros principalmente y una gran parte de ellos tienen función desconocida [7].



**Figura 1.** Representación esquemática de los procesos de biocontrol y fijación biológica de nitrógeno en la rizosfera de una planta. A) *P. putida* usa su sistema de secreción de tipo VI para inyectar toxinas antimicrobianas y eliminar a un fitopatógeno que de otra forma hubiera causado una enfermedad en la planta. Código de colores del T6SS: rojo (ClpV), morado (Hcp), amarillo (VgrG), negro (PAAR), verde claro (TssJ, TssL, TssM), azul claro (TssB y TssC), rosa claro (TssE, TssF, TssG y TssK), verde oscuro (toxinas) y estrella verde clara (proteínas inmunitarias). B) comunicación entre la planta (flavonoides) y el rizobio (factores de nodulación y T3SS) para promover la formación de nódulos donde la bacteria llevará a cabo la fijación biológica de nitrógeno gracias a la enzima nitrogenasa.

Dos genes *vgrG* (*vgrG4* y *vgrG5*) y tres genes *hcp* (*hcp4*, *hcp5* y *hcp6*) se encuentran fuera de los clústeres de tipo VI diseminados en el cromosoma y están genéticamente ligados a pares EI (efectores-proteínas inmunitarias) [7]. Es interesante destacar que los genes que codifican las putativas proteínas inmunitarias de tipo VI se encuentran inmediatamente aguas abajo de los genes que codifican las toxinas y en la mayoría de las ocasiones estos genes solapan para asegurar la transcripción de ambos, lo que demuestra la importancia de las

proteínas inmunitarias en estos sistemas. Las proteínas inmunitarias son necesarias para evitar la intoxicación con efectores antimicrobianos sintetizados por la propia célula T6SS<sup>+</sup> y para protegerse del ataque indiscriminado de células hermanas [9] (Fig. 1A). Se ha demostrado que el K1-T6SS de *P. putida* es un potente dispositivo antibacteriano que secreta un efector tóxico con actividad nucleasa (Tke2) [7]. Sorprendentemente, *P. putida* es capaz de matar a una amplia gama de bacterias de una manera dependiente de este

sistema de secreción incluyendo fitopatógenos de importancia comercial tales como *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas savastanoi* y *Xanthomonas campestris* [7]. Además, estos estudios demuestran que la protección se produce también en ensayos *in planta* y que *Nicotiana* está protegida del ataque de *Xanthomonas* en una forma dependiente de T6SS [7]. Como ha quedado demostrado en estas investigaciones, la eficacia de esta nueva arma biológica para el control de plagas es sumamente relevante para futuras aplicaciones biotecnológicas aplicadas a la agricultura, ya que evitaría el uso de pesticidas químicos controlando los fitopatógenos con eficientes agentes de biocontrol sin huella ecológica. Por tanto, este nuevo mecanismo de biocontrol debe ser considerado para la selección de futuros agentes de control biológico con la capacidad de manipular la composición microbiana de la rizósfera y la filósfera.

### **Fijación biológica de nitrógeno como alternativa a los fertilizantes nitrogenados**

La producción eficiente de cultivos de interés agrícola depende en gran medida del uso de fertilizantes nitrogenados químicos, ya que el nitrógeno asimilable es uno de los mayores limitantes del crecimiento de las plantas. Sin embargo, el uso excesivo de estos fertilizantes

tiene un gran impacto negativo en el medio ambiente, siendo considerados uno de los mayores contaminantes de nuestros acuíferos. La aplicación de rizobios simbióticos a los cultivos es una fuente alternativa de nitrógeno para las plantas sin rastro ambiental y barata desde el punto de vista del agricultor, pero su uso está restringido a las legumbres, las únicas plantas hospedadoras de rizobios fijadores de nitrógeno. Entre las especies más representativas se encuentran *Bradyrhizobium japonicum*, *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium etli*, *Mesorhizobium loti* y *Sinorhizobium fredii*. La mayoría de las especies de leguminosas pueden fijar nitrógeno atmosférico a través de rizobios simbióticos pero su eficiencia y rendimiento dependen del par simbiótico, es decir, existe un alto grado de especificidad entre el microorganismo y la planta y la mayoría de las bacterias diazotróficas (fijadoras de nitrógeno) solo pueden formar nódulos efectivos con unas pocas especies de leguminosas [12].

La simbiosis rizobio-leguminosa ha sido ampliamente estudiada durante varias décadas y es la asociación entre un microorganismo y una planta mejor comprendida hasta la fecha. Esta relación simbiótica de fijación de nitrógeno comienza cuando el nivel de nitrógeno limita el crecimiento de la planta leguminosa por ser demasiado bajo. En esta

situación, se desencadena un complejo intercambio de señales moleculares, que conduce a variaciones en la expresión de un gran conjunto de genes en ambos beneficiarios de la simbiosis. Esta conversación molecular garantiza que solo los rizobios compatibles con la leguminosa en cuestión infecten con éxito las raíces de las mismas y se alojen dentro de un nuevo tipo de órgano formado por la planta para el microorganismo, el nódulo, donde los rizobios pueden replicarse y llevar a cabo la fijación de nitrógeno [13]. Los flavonoides secretados por las raíces de las leguminosas son las primeras señales de este diálogo simbiótico. Estas moléculas interactúan directamente con NodD, un regulador transcripcional bacteriano que induce la expresión de unos genes específicos involucrados en la nodulación y denominados genes *nod* (Fig. 1B). Los genes *nod* codifican proteínas involucradas en la síntesis de moléculas señal específicas denominadas factores de nodulación o Factores Nod (FN). Los FN son reconocidos por receptores de las leguminosas denominados Receptores de FN (RFN), los cuales activan una cascada de señalización en la planta que induce la formación y progresión de los tubos de infección (IT, por sus siglas en inglés **I**nfection **T**hreads) y el desarrollo de nódulos para introducir y albergar rizobios compatibles, respectivamente (Fig.1B) [14]. Junto con los

FN, las proteínas secretadas a través del sistema de secreción de tipo III (T3SS, de sus siglas en inglés **T**ype **I**II **S**ecretion **S**ystem) también tienen un efecto importante en la eficiencia simbiótica y el rango de hospedadores de nodulación de los rizobios (Fig. 1B). El T3SS está ampliamente distribuido en bacterias Gram-negativas y se utiliza para dirigir proteínas efectoras (T3E) directamente al interior de las células hospedadoras eucariotas donde pueden alterar la señalización de la misma y/o suprimir las respuestas de defensa del hospedador (Fig. 1B). En los rizobios, el T3SS está presente en solo unas pocas especies y los T3E se conocen colectivamente como proteínas Nop (por sus siglas en inglés, **N**odulation **o**uter **p**roteins) [15]. La síntesis y secreción de proteínas Nop están controladas por el regulador transcripcional TtsI, cuya actividad depende de los flavonoides secretados por las leguminosas y del factor transcripcional NodD (Fig. 1B) [16]. Además de NodD y TtsI, otros reguladores transcripcionales alternativos participan en el delicado ajuste de la expresión génica que regula la simbiosis en rizobios, incluyendo NolR y SyrM que controlan la expresión de los genes *nod* específicos uniéndose a sus regiones promotoras y, por tanto, juegan un papel importante en la modulación de la síntesis de factores Nod [17,18].

La ausencia de estos reguladores alternativos altera negativamente pero no bloquea totalmente el proceso simbiótico entre el organismo modelo *Sinorhizobium fredii* HH103 y su planta hospedadora natural, la soja [19–22]. Estos resultados indican que las vías reguladoras simbióticas microbianas y los elementos que determinan el rango de hospedador (FN y T3E) están perfectamente ajustadas y permiten una interacción óptima y específica con su hospedador. Cabe destacar que la ausencia de estos reguladores, aunque disminuye la eficiencia de la fijación de nitrógeno con su par simbiótico, permite extender el rango de hospedadores del rizobio, que en estas condiciones es capaz de inducir la formación de IT y nódulos fijadores de nitrógeno en raíces de plantas hasta ahora consideradas no compatibles (revisado en [23]). Estos descubrimientos abren nuevas perspectivas para abordar el desafío de extender la capacidad de fijación de nitrógeno a otras plantas no leguminosas, incluidas los cereales. Los cereales como el arroz, el maíz y el trigo son los cultivos más importantes para la nutrición humana y curiosamente desarrollan simbiosis con micorrizas arbusculares usando las mismas proteínas que juegan un papel crítico en las etapas iniciales de las simbiosis raíz-nódulo en leguminosas [24], por lo que la nodulación de cereales por rizobios puede ser

una idea plausible. Hasta ahora, la comunidad científica ha centrado sus esfuerzos en el desarrollo de cereales modificados genéticamente para fijar directamente nitrógeno o para fomentar el desarrollo de nódulos con rizobios simbióticos fijadores de nitrógeno [25]. Un enfoque novedoso sería el uso de rizobios "promiscuos" que carezcan de los genes simbióticos específicos que optimizan la especificidad con una leguminosa concreta. Estos rizobios "no-discriminatorios" serían menos eficientes en la fijación de nitrógeno con su hospedador natural, pero estarían más abiertos a la posibilidad de establecer una nueva simbiosis con otros hospedadores, por ejemplo, con cereales.

Estas líneas de investigación con microorganismos beneficiosos de alto interés en la biotecnología agrícola nos acercan a la agricultura del futuro que se enfrenta al gran reto de alimentar a un planeta superpoblado de forma sostenible. Estas nuevas aproximaciones, respetuosas con el medio ambiente, ofrecen soluciones a los graves problemas actuales de contaminación por productos químicos de forma que la agricultura sostenible, basada principalmente en el uso de microorganismos, pueda ser una realidad en un futuro muy cercano.



## CONFLICTO DE INTERESES

La autora declara no tener conflictos de intereses.

## REFERENCIAS

[1] Weller DM. *Pseudomonas* Biocontrol Agents of Soilborne Pathogens: Looking Back Over 30 Years. *Phytopathology* 2007;97:250–6. <https://doi.org/10.1094/phyto-97-2-0250> PMID - 18944383.

[2] Espinosa-Urgel M, Salido A, Ramos J-L. Genetic Analysis of Functions Involved in Adhesion of *Pseudomonas putida* to Seeds. *J Bacteriol* 2000;182:2363–9.

<https://doi.org/10.1128/jb.182.9.2363-2369.2000> PMID - 10762233.

[3] Molina L, Segura A, Duque E, Ramos J-L. The versatility of *Pseudomonas putida* in the rhizosphere environment. *Adv Appl Microbiol* 2019.

<https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2019.12.002>.

[4] Nascimento FX, Vicente CSL, Barbosa P, Espada M, Glick BR, Mota M, et al. Evidence for the involvement of ACC deaminase from *Pseudomonas putida* UW4 in the biocontrol of pine wilt disease caused by *Bursaphelenchus xylophilus*. *BioControl* 2013;58:427–33. <https://doi.org/10.1007/s10526-012-9500-0>.

[5] Validov S, Kamilova F, Qi S, Stephan D, Wang JJ, Makarova N, et al. Selection of

bacteria able to control *Fusarium oxysporum* f. sp. radicis-lycopersici in stonewool substrate. *J Appl Microbiol* 2007;102:461–71. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03083.x> PMID - 17241352.

[6] Matilla MA, Ramos JL, Bakker P, Doornbos R, Badri D v, Vivanco JM, et al. *Pseudomonas putida* KT2440 causes induced systemic resistance and changes in *Arabidopsis* root exudation. *Env Microbiol Rep* 2010;2:381–8. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2009.00091.x> PMID - 23766110.

[7] Bernal P, Allsopp LP, Filloux A, Llamas MA. The *Pseudomonas putida* T6SS is a plant warden against phytopathogens. *ISME J* 2017;11:972–87. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.169> PMID - 28045455.

[8] Allsopp LP, Bernal P, Nolan LM, Filloux A. Causalities of war: The connection between type VI secretion system and microbiota. *Cell Microbiol* 2020;22. <https://doi.org/10.1111/cmi.13153>.

[9] Cianfanelli FR, Monlezun L, Coulthurst SJ. Aim, Load, Fire: The Type VI Secretion System, a Bacterial Nanoweapon. *Trends Microbiol* 2016;24:51–62. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.10.005> PMID - 26549582.

[10] Hachani A, Wood TE, Filloux A. Type VI secretion and anti-host effectors. *Curr Opin*

Microbiol 2016;29:81–93.

<https://doi.org/10.1016/j.mib.2015.11.006>.

[11] Trunk K, Peltier J, Liu YC, Dill BD, Walker L, Gow NAR, et al. The type VI secretion system deploys antifungal effectors against microbial competitors. *Nat Microbiol* 2018;3:920–31.

<https://doi.org/10.1038/s41564-018-0191-x>.

[12] Andrews M, Andrews ME. Specificity in Legume-Rhizobia Symbioses. *Int J Mol Sci* 2017;18:705.

<https://doi.org/10.3390/ijms18040705> PMID - 28346361.

[13] Oldroyd GED. Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nat Rev Microbiol* 2013;11:252–63.

<https://doi.org/10.1038/nrmicro2990> PMID - 23493145.

[14] Broghammer A, Krusell L, Blaise M, Sauer J, Sullivan JT, Maolanon N, et al. Legume receptors perceive the rhizobial lipochitin oligosaccharide signal molecules by direct binding. *P Natl Acad Sci USA* 2012;109:13859–64.

<https://doi.org/10.1073/pnas.1205171109>

PMID - 22859506.

[15] Downie JA. The roles of extracellular proteins, polysaccharides and signals in the interactions of rhizobia with legume roots.

*FEMS Microbiol Rev* 2010;34:150–70.

[https://doi.org/10.1111/j.1574-](https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00205.x)

[6976.2009.00205.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00205.x) PMID - 20070373.

[16] Krause A, Doerfel A, Göttfert M. Mutational and Transcriptional Analysis of the Type III Secretion System of *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol Plant Microbe In* 2002;15:1228–35.

<https://doi.org/10.1094/mpmi.2002.15.12.1228> PMID - 12481995.

[17] Kondorosi E, Pierre M, Cren M, Haumann U, Buiré M, Hoffmann B, et al. Identification of NolR, a negative transacting factor controlling the nod regulon in *Rhizobium meliloti*. *J Mol Biol* 1991;222:885–96.

[https://doi.org/10.1016/0022-2836\(91\)90583-r](https://doi.org/10.1016/0022-2836(91)90583-r)

PMID - 1840615.

[18] Barnett MJ, Rushing BG, Fisher RF, Long SR. Transcription start sites for syrM and nodD3 flank an insertion sequence relic in *Rhizobium meliloti*. *J Bacteriol* 1996;178:1782–7.

[https://doi.org/10.1128/jb.178.7.1782-](https://doi.org/10.1128/jb.178.7.1782-1787.1996)

[1787.1996](https://doi.org/10.1128/jb.178.7.1782-1787.1996) PMID - 8606148.

[19] Jiménez-Guerrero I, Acosta-Jurado S, Medina C, Ollero FJ, Alias-Villegas C, Vinardell JM, et al. The *Sinorhizobium fredii* HH103 type III secretion system effector NopC blocks nodulation with *Lotus japonicus* Gifu. *J Exp Bot* 2020;71:6043–56.

<https://doi.org/10.1093/jxb/eraa297> PMID -

32589709.

- [20] Vinardell J, Ollero FJ, Hidalgo Á, López-Baena FJ, Medina C, Ivanov-Vangelov K, et al. NodR Regulates Diverse Symbiotic Signals of *Sinorhizobium fredii* HH103. *Mol Plant Microbe Interactions*® 2004;17:676–85. <https://doi.org/10.1094/mpmi.2004.17.6.676> PMID - 15195950.
- [21] Acosta-Jurado S, Alias-Villegas C, Navarro-Gómez P, Almozara A, Rodríguez-Carvajal MA, Medina C, et al. *Sinorhizobium fredii* HH103 *syrM* inactivation affects the expression of a large number of genes, impairs nodulation with soybean and extends the host-range to *Lotus japonicus*. *Environmental Microbiology* 2020;22:1104–24. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14897> PMID - 31845498.
- [22] Jiménez-Guerrero I, Pérez-Montaña F, Monreal JA, Preston GM, Fones H, Vioque B, et al. The *Sinorhizobium (Ensifer) fredii* HH103 Type 3 Secretion System Suppresses Early Defense Responses to Effectively Nodulate Soybean. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 2015;28:790–9. <https://doi.org/10.1094/mpmi-01-15-0020-r> PMID - 25775271.
- [23] Jiménez-Guerrero I, Moreno-De Castro N, Pérez-Montaña F. One door closes, another opens: when nodulation impairment with natural hosts extends rhizobial host-range. *Environmental Microbiology* 2020. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15353>.
- [24] Gutjahr C, Banba M, Croset V, An K, Miyao A, An G, et al. Arbuscular Mycorrhiza-Specific Signaling in Rice Transcends the Common Symbiosis Signaling Pathway. *Plant Cell* 2008;20:2989–3005. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.062414> PMID - 19033527.
- [25] Rosenblueth M, Ormeño-Orrillo E, López-López A, Rogel MA, Reyes-Hernández BJ, Martínez-Romero JC, et al. Nitrogen Fixation in Cereals. *Front Microbiol* 2018;09:1794. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01794> PMID - 30140262.