BENEMERITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

Centro de Investigación en Ciencias Microbiológicas
CICM-ICUAP

TESIS

"Análisis de la expresión y funcionalidad del gen *cdgD*, que codifica una proteína híbrida de *A.brasilense* Sp 245".

QUE PARA OBTENER EL GRADO:

DOCTOR EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA)

PRESENTA:

MC. JOSÉ FRANCISCO CRUZ PÉREZ

Asesor:

DR. ALBERTO RAMÍREZ MATA.

Co-asesor:

DRA. BEATRIZ EUGENIA BACA.

Puebla, Pue., Junio de 2021

Puebla, Pue. a 2 de junio 2021.

A LA ACADEMIA DEL POSGRADO
EN MICROBIOLOGÍA
CICM-ICUAP
P R E S E N T E.

Por este conducto los abajo firmantes, integrantes del Comité revisor de Tesis de Doctorado del alumno **Josè Francisco Cruz Pèrez,** les informamos que hemos revisado el escrito titulado:

“Anàlisis de la expresión y funcionalidad del gen *cdgD*, que codifica una proteína hìbrida de *Azospirillum brasilense* Sp245”

A nuestro juicio, el alumno **Josè Francisco Cruz Pèrez** puede proceder a la digitalizaciòn de la tesis y a la presentación del examen de grado correspondiente.

Sin más que agregar, nos despedimos afectuosamente de ustedes.

A t e n t a m e n t e.
“Pensar Bien Para Vivir Mejor”

D.C. Irma Herrera Camacho

D.C. Sandra Raquel Reyes Carmona

D.C. Gerardo Santos Lòpez

D.C. Antonino Baez Rogelio

D.C. Miguel Castañeda Lucio

D.C. Candelario Vàzquez Cruz

DECLARATORIA DEL AUTOR.

Declaro que la presente tesis cuyo título es “Análisis de la expresión y funcionalidad del gen *cdgD*, que codifica una proteína híbrida de *A.brasilense* Sp 245”, dirigida por el D.C. Alberto Ramirez Mata y co-dirigida por la D.C. Beatriz Eugenia Baca. Fue realizada en el Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas (CICM-ICUAP) de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, como uno de los requisitos para obtener el grado de Doctor en Ciencias (Microbiología), la cual es de original autoría y no ha sido utilizada para la obtención de algún grado académico en ninguna otra institución educativa. Aunque el contenido incluye información obtenida de otros trabajos publicados, ésta fue utilizada sólo como antecedentes y los autores fueron debidamente citados, por lo cual no infringe en las leyes de los derechos de autor.

Atentamente:

MC. José Francisco Cruz Pérez

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES.

Expreso mi agradecimiento a las instituciones que fueron parte fundamental en el desarrollo de este trabajo, principalmente a la **Benemérita Universidad Autónoma de Puebla** (BUAP) y al **Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas** de la BUAP por haberme abierto sus puertas para continuar mis estudios de posgrado, a la **Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado** (VIEP) y al **Instituto de Ciencias** (ICUAP) por el apoyo económico recibido a través de sus programas de apoyos para congresos y becas profesionales. Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** (CONACYT), por contribuir al financiamiento de este trabajo y por otorgarme una beca de doctorado.

ABREVIATURAS.

DGC	Diguanilato ciclasa
PDE	Fosfodiesterasa
CdgD	Diguanilato ciclasa D
PGPR	Rizobacterias Promotoras del Crecimiento de las Plantas
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
EPS	Exopolisacáridos
di-GMPc	Ácido di-(3'-5') guanosín monofosfato
GTP	Guanosín trifosfato
Km	Kanamicina
Tc	Tetraciclina
LB	Luria Bertani
LB*	Luria-Bertani Modificado
RC	Rojo Congo
Sm	Estreptomicina
Ap	Ampicilina
DO	Densidad óptica
Nfb	Fijación biológica de nitrógeno
BF	Buffer de Fosfatos
RT-PCR	Reversa Transcriptasa - PCR
CV	Cristal Violeta
TMD	Dominio Transmembranal
ARN	Ácido Ribonucleico
RT-qPCR	PCR cuantitativa en tiempo real
TAE	Tris-acetato-EDTA
ATP	Trifosfato de adenosina
cDNA	DNA complementario
DNA	Ácido desoxirribonucleico
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
CLSM	Confocal laser scanning microscopy

ÍNDICE GENERAL.

Declaratoria del autor I
Agradecimientos II
Agradecimientos institucionales III
Abreviaturas IV
Índice general V
Índice de tablas VII
Índice de tablas complementarias VII
Índice de figuras VIII
Índice de figuras complementarias X
Índice de graficas X
Índice de graficas complementarias XI

Resumen 1
Summary 2

1. Introducción 3
   1.1. Rizósfera 4
   1.2. *Azospirillum brasilense* 6
      1.2.1. *Azospirillum brasilense* como PGPB 7
   1.3. Movilidad y Quimiotaxis 9
   1.4. Aerotaxis 10
   1.5. Colonización de *A. brasilense* a las raíces de las plantas 11
      1.5.1. Formación de biopelícula 11
   1.6. di-GMPc 13
      1.6.1. Efectores del di-GMPc 13
      1.6.2. Cuantificación de di-GMPc 15
      1.6.3. Síntesis de di-GMPc 16
      1.6.4. Degradación de di-GMPc 16
   1.7. Proteínas híbridas 17
      1.7.1. Proteínas híbridas presentes en *A. brasilense* Sp245 19
   1.8. Dominio CHASE 20
      1.8.1. Clasificación de dominio CHASE 20
2. Antecedentes 22
3. Justificación 23
4. Objetivo general 24
   4.1. Objetivos particulares 24
   4.2. Objetivos específicos 24
5. Diagrama de trabajo 25

6. Material biológico 26
7. Métodos 28
7.1. Condiciones de crecimiento 28
7.2. Extracción de RNA y eliminación de DNA genómico 28
7.3. Síntesis de cDNA 30
7.4. qPCR 30
7.5. Diseño de iniciadores 31
7.6. Construcción de la fusión trasncripcional cromosómica en *A. brasilense* Sp245 (FPDm1) 31
7.7. Ensayos de biopelícula 32
7.8. Condiciones de crecimiento en plantas, de las cepas de *A. brasilense*, inoculación y visualización de colonización por microscopía de escaneo láser confocal (CLSM) 32
7.9. Condiciones de crecimiento en plantas, de las cepas de *A. brasilense*, inoculación y visualización de la expresión de *cdgD* por microscopía de escaneo láser confocal (CLSM) 33
7.10. Herramientas bioinformáticas para el análisis de la proteína CdgD 34
7.11. Cuantificación de di-GMPc 35
7.12. Cuantificación de la expresión de cdgD por microscopía confocal 35
7.13. Análisis estadístico 35
7.14. Método DDCt 35
8. Resultados 36
8.1. Clasificación de CdgD 36
8.2. Dominios auxiliares de CdgD 38
8.3. Diseño de iniciadores 40
8.4. RT-PCR 42
8.5. Búsqueda e identificación del promotor de *cdgD* 45
8.6. Construcción de la fusión transcripcional FPDm1 46
8.7. Cuantificación de la expresión de *cdgD* por qPCR y fusión trasncripcional 48
8.7.1. Cuantificación de la expresión de *cdgD* en condiciones estáticas 48
8.7.2. Cuantificación de la expresión de *cdgD* en condiciones de agitación 51
8.7.3. Efecto de la agitación en la expresión de *cdgD* 53
8.7.4. Cuantificación de la expresión de *cdgD* en condiciones de crecimiento con diferente fuente de nitrógeno 56

8.7.5. Efecto de la fuente de nitrógeno sobre la expresión de *cdgD* en *A.brasilense* Sp245. 58
8.8. Análisis de la expresión de *cdgD* en asociación con las raíces de trigo 62
8.9. Ensayos de colonización de raíces de plantas de trigo 64
8.10. Determinación de los niveles celulares de di-GMPc 66
8.11. Análisis estructural del dominio CHASE de la proteína CdgD ... 69
9. Discusión 73
10. Conclusión 78
11. Anexos 79
11.1. Anexo 1. Alineamiento de genes de proteínas hibridas en *A.brasilense* Sp.245 79
11.2. Anexo 2. Diseño de iniciadores y sondas para genes del grupo I y II que codifican para proteínas hibridas en *A.brasilense* Sp245 80
11.3. Anexo 3. Videos 84
11.4. Anexo 4. Secuenciación del promotor de *cdgD* 84
11.5. Anexo 5. Locus neutro de la fusión trasncripcional 85
11.6. Anexo 6. Comprobación de la fusión trasncripcional FPDm1 ... 86
11.7. Anexo 7. Parámetros de amplificación de oligos utilizados en el ensayo de qPCR 88
11.8. Anexo 8. Comprobación de fluorescencia de las cepas A.brasilense Sp245, 12-A, C56A y C40A 91
11.9. Anexo 9. Cuantificación de di-GMPc en condiciones de formación de biopelícula 93
11.10. Anexo 10. Medios de cultivo 96
11.11. Anexo 11. Medio NFB 98

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Cepas empleadas 26
Tabla 2. Plásmidos utilizados y construidos 27
Tabla 3. Iniciadores empleados 27
Tabla 4. Condiciones de reacción de PCR punto final 29
Tabla 5. Condiciones de amplificación de PCR punto final 30

ÍNDICE DE TABLAS COMPLEMENTARIAS.

Tabla C1. BLASTn de la región blanco del gen CCC97222.1 80
Tabla C2. BLASTn de la región blanco del gen CCC99416.1 80

Tabla C3. BLASTn de la región blanco del gen CCD03171.1 81
Tabla C4. BLASTn de la región blanco del gen CCC97047.1 81
Tabla C5. BLASTn de la región blanco del gen CCC96788.1 82
Tabla C6. Tamaño de amplicones de los iniciadores del grupo I 82

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Esquema de los componentes presentes en la rizósfera 4
Figura 2. Esquema de la microbioma rizosferica 5
Figura 3. Microscopia electrónica de células de *A. brasilense* Sp245 .. 6
Figura 4. Estimulación de crecimiento de raíces de maíz inoculado con *A.brasilense* 8
Figura 5. Estimulación del crecimiento de pelos radiculares en forraje, inoculado con *A.brasilense* 8
Figura 6. Estimulación del crecimiento de planta de maíz inoculado con *A.brasilense*, bajo condiciones de invernadero 9
Figura 7. Efecto de los lipopolisacaridos bacterianos sobre la actividad morfogenética en callos somáticos de trigo 9
Figura 8. Esquema de quimiotaxis de *A. brasilense* 10
Figura 9. Modelo de colonización bacteriana a las raíces de las plantas 11
Figura 10. Esquema del proceso de formación de biopelícula bacteriana 12
Figura 11. Redes globales de regulación del di-GMPc 13
Figura 12. Diversidad de efectores de unión de di-GMPc 14
Figura 13. Contexto genético del riboswitch Bc 3-5 15
Figura 14. Síntesis y degradación de di-GMPc 17
Figura 15. Proteínas híbridas pertenecientes a las Clase I 18
Figura 16. Proteína híbridas pertenecientes a las Clase II 18
Figura 17. Diferentes dominios de señalización encontrados en proteínas de la superfamilia GGDEF y EAL 19
Figura 18. Esquemas de proteínas con dominio CHASE2 20
Figura 19. Esquemas de proteínas con dominio CHASE3 21
Figura 20. Esquemas de proteínas con dominio CHASE4 21
Figura 21. Alineamientos de secuencias nucleotidicas de dominios GGDEF de diversas proteínas 36
Figura 22. Alineamientos de secuencias nucleotidicas de dominios EAL de diversas proteínas 37
Figura 23. Estructura proteica de CdgD 38

Figura 24. Representación grafica de los dominios presentes en la estructura proteica de CdgD 39
Figura 25. Análisis de la secuencia nucleotidica blanco para el diseño de iniciadores de *cdgD* 40
Figura 26. Electroforetograma en geles de agarosa al 3 % 41
Figura 27. Imágenes al microscopio de cultivos de *A. brasilense* Sp245, bajo diferentes condiciones de formación de biopelícula 43
Figura 28. Electroforetograma en geles de agarosa al 3 % correspondiente al RT-PCR 44
Figura 29. Electroforetograma en geles de agarosa al 3 % correspondiente al RT-PCR 44
Figura 30. Contexto genético del gen *cdgD* 45
Figura 31. Análisis bioinformatico del locus del gen cdgD 45
Figura 32. Análisis bioinformatico de la búsqueda del promotor del gen *cdgD* 46
Figura 33. Construcción de la fusión transcripcional 47
Figura 34. Electroforetograma del PCR obtenido de transconjugantes 48
Figura 35. Análisis de la expresión del gen *cdgD* por qPCR 49
Figura 36. Cuantificación de la cantidad de fluorescencia 50
Figura 37. Análisis de la expresión del gen *cdgD* por qPCR 51
Figura 38. Cuantificación de la cantidad de fluorescencia 52
Figura 39. Observaciones al microscopio con un objetivo de (60 X) de cultivos de de *A. brasilense* 54
Figura 40. Observaciones al microscopio con un objetivo de (60 X) de cultivos de de *A. brasilense* 55
Figura 41. Comparación de los niveles de expresión de *cdgD* 57
Figura 42. Comparación de la cantidad de fluorescencia obtenida por FPDm1 57
Figura 43. Curvas de crecimiento de *A. brasilense* Sp245 59
Figura 44. Observaciones al microscopio con el objetivo (60 X) de un cultivo de *A. brasilense* Sp245 60
Figura 45. Formación de biopelícula con 2 días de crecimiento de la cepa *A.brasilense* Sp245 60
Figura 46. Formación de biopelícula de la cepa *A.brasilense* Sp245 ... 61
Figura 47. Cuantificación relativa de NO_2- 62
Figura 48. Ensayo de expresión del gen *cdgD* en asociación con la raíz 63
Figura 49. Ensayos de colonización de planta de raíz de trigo (hidroponía) 64
Figura 50. Ensayos de colonización de planta de raíz de trigo (suelo) . 65

Figura 51. Ensayos de colonización (bacteria - planta) 66
Figura 52. Mapa de los plasmidos que contienen el riboswitch 67
Figura 53. Micrografias de un cultivo de *A.brasilense* Sp245 con el plásmido pDZ-1 (pFY4535) 67
Figura 54. Determinación de los niveles intracelulares de di-GMPc 68
Figura 55. Modelaje estructural del dominio CHASE de *A.thaliana* 69
Figura 56. Análisis del dominio CHASE 70
Figura 57. Modelaje de monomeros del dominio CHASE 71
Figura 58. Modelaje de homo-dimeros 72

ÍNDICE DE FIGURAS COMPLEMENTARIAS.

Figura C1. Alineamiento de genes que codifican para proteínas hibridas en *A. brasilense* Sp245 79
Figura C2. Alineamiento de sondas tipo taqman 83
Figura C3. Mapa del plásmido pGEMTEASY 84
Figura C4. Alineamiento del promotor de *cdgD* 85
Figura C5. Región en el cromosoma en donde se llevara a cabo la recombinación 86
Figura C6. Comprobación de la región que contiene la secuencia del promotor de *cdgD* 86
Figura C7. Comprobación del gen *TraJ* 87
Figura C8. Comprobación de la clona 25 87
Figura C9. Comprobación de la región interna de la construcción 88
Figura C10. Comprobación de la fluorescencia en *A.brasilense* Sp245 91
Figura C11. Comprobación de la fluorescencia en 12-A 92
Figura C12. Comprobación de la fluorescencia en C56A 92
Figura C13. Comprobación de la fluorescencia en C40A 92
Figura C14. Cuantificación de di- GMPc de la cepa *A.brasilense* Sp245 con el plásmido pDZ-2 93
Figura C15. Cuantificación de di- GMPc de la cepa *A.brasilense* 12- A con el plásmido pDZ-2 94
Figura C16. Cuantificación de di- GMPc de la cepa *A.brasilense* C56A con el plásmido pDZ-2 95
Figura C17. Comparación de los niveles de di-GMPc de la cepas *A.brasilense* Sp245, 12-A y C56A 96

ÍNDICE DE GRÁFICAS.

Gráfica 1. Curvas de crecimiento de *A. brasilense* Sp245, en medio NFB* 42
Gráfica 2. Curvas de crecimiento bajo diferentes condiciones de crecimiento de *A. brasilense* Sp245 54

ÍNDICE DE GRAFICAS COMPLEMENTARIAS.

Gráfica C1. Rango dinámico (10 - 40 ng) de los iniciadores de *gyrA* y *dgcD* 88
Gráfica C2. Rango dinámico (350 - 450 ng) de los iniciadores de *gyrA* y *dgcD* 89
Gráfica C3. Eficiencia de amplificación de los iniciadores de *dgcD*.(10 - 40 ng) 89
Gráfica C4. Eficiencia de amplificación de los iniciadores de *gyrA*. (10 - 40 ng) 90
Gráfica C5. Eficiencia de amplificación de los iniciadores de *dgcD*.(350 - 450 ng) 90
Gráfica C6. Eficiencia de amplificación de los iniciadores de *gyrA*.(350 - 450 ng) 91

APENDICE 1. Trabajos presentados en congresos 108
APENDICE 2. Publicaciones 109

RESUMEN.

Azospirillum brasilense es una bacteria fijadora de nitrógeno, la cual ha sido empleada como un inoculante bacteriano en todo el mundo, por su efecto benéfico sobre las plantas hospederas como maíz, trigo, sorgo, arroz entre otras. Debido a múltiples mecanismos, los cuales se proponen son los responsables de generar un mejor estado nutricional de las plantas, estos mecanismos incluyen efectos directos sobre el metabolismo vegetal, al aportar nutrientes (hierro, fósforo y nitrógeno) y sintetizar moléculas con actividad de fitohormonas (auxinas, citoquininas, giberelinas, óxido nítrico), ó efectos indirectos como un antagonismo frente a fitopatógenos y un aumento de la resistencia a patógenos. Para ello, la bacteria debe de contener una serie de genes que participen en el control de una colonización exitosa de la raíz de la planta, como lo son la quimiotaxis y la formación de biopelícula.

En *A.brasilense* se han descrito varios genes que codifican para proteínas involucradas en la síntesis y degradación del segundo mensajero di-GMPc, el cual controla funciones claves como la formación de biopelícula y la movilidad bacteriana los cuales participan de manera activa en la colonización de los tejidos del hospedero. En este estudio analizamos la expresión y función del gen *cdgD*. Este gen se expresa tanto en bacterias que crecen en condiciones planctónicas, como en condiciones de formación de biopelícula, lo cual fue determinado por ensayos de qRT-PCR. Además se observó una expresión diferencial del gen *cdgD* cuando se agregó al medio mínimo fuentes de nitrógeno diferentes (nitrato de potasio o cloruro de amonio). Para confirmar los valores obtenidos por medio de qRT-PCR, se realizó una fusión transcripcional utilizando el promotor de *cdgD* fusionado a un gen que codifica una proteína autofluorescente (mCherry) generando la cepa (FPDm1), obteniendo valores similares a los obtenidos por qRT-PCR.

La cepa FPDm1 posteriormente fue utilizada para analizar la expresión génica en asociación con raíces de trigo en condiciones hidropónicas y utilizando suelo como sustrato. De manera interesante observamos que *cdgD* se expresa en ambas condiciones, la expresión fue analizada por microscopia de barrido láser confocal (CLSM). Por otra parte se realizó un análisis bioinformático de la estructura de la proteína CdgD para detectar posibles mecanismos que pudieran estar controlando las funciones de DGC/PDE. Por último se implementó una metodología novedosa, para poder cuantificar los niveles intracelulares del segundo mensajero di-GMPc en las cepas WT, 12-A, C56A y C40A.

SUMMARY.

Azospirillum brasilense is a nitrogen fixing bacterium, which has been employed as inoculant world-wide for its beneficial effect on host plants owed to multiples mechanisms, are responsible of a better nutritional status of plants such as corn, wheat, sorghum, rice among others. These mechanisms include direct effects on plant metabolism, by providing nutrients (iron, phosphorus and nitrogen, for example) and synthesizing molecules with phytohormone activity (auxins, cytokinins, gibberellins, nitric oxide), or indirect effects such as an antagonism against phytopathogens and increased resistance to pathogens. To this end, the bacterium has to contain an array of genes participating in controlled of a successful colonization to plant, such as quimiotaxis and biofilm formation, which are the initial steps for the beneficial effects observed in plants of agronomic interest. In *A. brasilense* has been described occurs several genes encoding for proteins involved in biosynthesis and degradation of the second messenger cyclic-di-GMP, which controls key functions such biofilm formation and motility in bacteria and actively could participate in colonization to host-tissues. In this study we analyzed the expression and function of the *cdgD* gene. The *cdgD* gene was expressed both in cell growing under planktonic and biofilm conditions as determined by the qRT-PCR assay. In addition, it was observed a differential expression when the nitrogen source (potassium nitrate or ammonium chloride) was added to minimal media.

A transcriptional fusion using the promoter fused to a gene encoding for an autofluorescent protein (FPDm1), and subsequently used to analyzed the gene expression both under abiotic conditions as well as in association with wheat roots, under hydroponic and soil conditions. Interesting, the gene is expressed under both conditions as analyzed by Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM). On the other hand, a bioinformatic analysis of the structure of the CdgD protein was carried out to detect possible mechanisms that could be controlling the functions of DGC/PDE. Finally, a novel methodology was implemented in order to quantify the intracellular levels of the second messenger di-cGMP in strains WT, 12-A, C56A and C40A.

1. INTRODUCCIÓN.

Debido al aumento de la población mundial, es de vital importancia, desarrollar nuevas tecnologías que nos permitan enfrentar los problemas de abastecimiento de alimentos, el uso de semillas genéticamente modificadas es un tema polémico que se encuentra en discusión a lo largo del mundo, así también el constante deterioro de suelos por el uso indiscriminado de agroquímicos para la obtención de mayores rendimientos, son los principales problemas que se presentan en la actualidad. Es por ello que se debe de enfrentar el problema, desde un punto de vista bioetico, en donde se obtengan mayores rendimientos en los cultivos; sin la necesidad de realizar modificaciones genéticas a las semillas de las plantas de interés agronómico ni tampoco deteriorar el suelo con el uso masivo de agroquímicos. Desde este punto, una posible solución a este problema, es el estudio de la rizósfera y de la inmensa interacción de los microorganismos presentes en el suelo con las raíces de las plantas, reflejados en efectos benéficos hacia la planta, como la obtención de plantas con un estatus nutricional mejor y por consecuencia mejores rendimientos en los cultivos y al mismo tiempo manteniendo los ecosistemas y la biodiversidad de especies que se encuentran en éstos. A estas bacterias que favorecen el crecimiento vegetal, se les denomina Plant Growth Promoting Bacterias “PGPB”, las cuales fueron referidas inicialmente por Kloepper y Schroth en 1978 para describir bacterias del suelo que colonizan la rizósfera de las plantas, y que son organismos capaces de aumentar el crecimiento de las plantas.

En el desarrollo de biofertilizantes a base de microorganismos presentes en el suelo y que favorecen el crecimiento vegetal, se han identificado una gran variedad de bacterias que cumplen con esta función, dentro de las cuales se encuentran los géneros: *Pseudomonas, Azospirillum, Azotobacter, Klebsiella, Enterobacter, Alcaligenes, Gluconacetobacter, Burkholderia, Bacillus* y *Serratia* (Saharan & Nehra, 2011). Los mecanismos descritos, por los que estas bacterias pueden brindar un efecto benéfico a las plantas se dividen en directos, los cuáles modifican el estado nutricional de la planta mediante la solubilización de fosfatos, fijación de nitrógeno, producción de sideróforos y fitohormonas (de Souza *et al*., 2015) y otros que actúan de manera indirecta, favoreciendo la colonización de la planta mediante la actividad antifúngica e inducción de la resistencia sistémica. Es importante resaltar, que el efecto benéfico, es producto de varios mecanismos que se llevan a cabo en conjunto y no es el resultado de un factor, los cuales pueden actuar de manera sincronizada y secuencialmente (Bashan & de Bashan, 2010). Por tanto, es importante el estudio de las bacterias presentes en la rizósfera y la interacción con las raíces de las plantas, así como los mecanismos que pudieran favorecer una mejor interacción con las raíces, con el objetivo de poder desarrollar nuevas estrategias, que nos permitan poder tener una

mejor interacción planta-raíz y que esto resulte en un mayor rendimiento en la producción de alimentos, sin la necesidad de recurrir al uso de agroquímicos que dañen el suelo o al uso de semillas genéticamente modificadas, que pongan en riesgo el equilibrio de los ecosistemas y la biodiversidad.

1.1. RIZÓSFERA.

La rizósfera es una región del suelo, que se caracteriza por la cercanía con las raíces de las plantas, se estima que son escasamente de 3 a 5 milímetros de capa de suelo (Lugtenberg *et al.,* 2009), cuya actividad biológica es influenciada por las raíces de las plantas. Esta región se caracteriza por la presencia de exudados radiculares, agua, minerales y microorganismos, los cuales afectan los procesos químicos de los suelos y provocan efectos nocivos o benéficos a las plantas (de Fatima, 2016). La comunidad de la rizósfera consiste en una microbiota: bacterias, actinomicetos, hongos y algas, también presenta una micro y mesofauna: protozoos, nematodos, insectos y ácaros (Mendes *et al*., 2013). La micro y mesofauna en el proceso de descomposición en ecosistemas, contribuyen significativamente con el catabolismo de sustancias nocivas en la rizosfera.

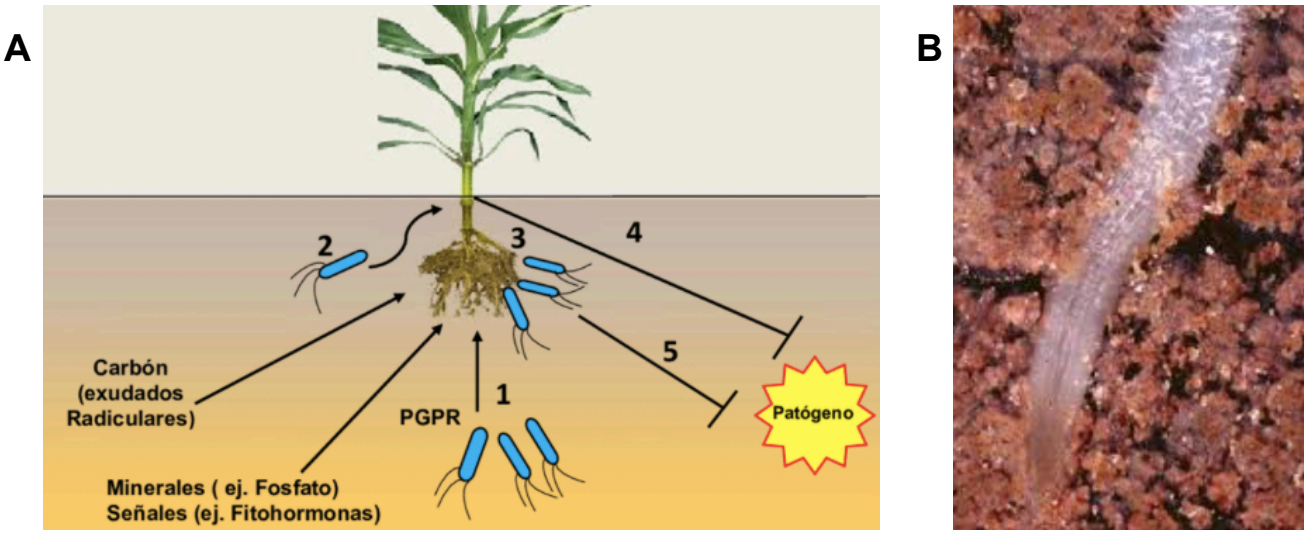


Figura 1: Esquema de los componentes presentes en la rizósfera **(A)** Interacciones planta - bacteria en la rizósfera (Steciow, 2014). **(B)** Foto rizósfera (Dr. Gil Virgen, CUCBA).

En la rizósfera, las bacterias en asociación con las raíces forman comunidades únicas, las raíces de las plantas exudan carbohidratos producto de la fotosíntesis, que sirven como energía para los microorganismos, quienes en retribución les brindan protección ante organismos patógenos y aparte solubilizan los minerales presentes en el suelo, haciéndolos asimilables para las plantas. A cambio las plantas modifican el ambiente

rizosférico proporcionando a los microorganismos sustrato a través de los exudados de la raíz (Lambers *et al*., 2009). Las plantas secretan mas de 40% de sus fotosintatos a través de exudados radiculares (Morgan *et al.,* 2005), en los exudados radiculares se encuentran comúnmente los siguientes compuestos (Steciow, 2014).

- **Aminoácidos:** Todos de ocurrencia natural
- **Ácidos orgánicos:** cítrico, fórmico, acético, etc.
- **Carbohidratos:** fructosa, galactita, glucosa, maltosa, etc.
- **Derivados de ácidos nucleicos:** adenina, guanina, citosinas y uracilo.
- **Vitaminas:** biotina, colina, inositol, ácido pantoténico
- **Enzimas:** amilasa, fosfatasa, invertasa, proteasa, etc.
- **Fitohormonas:** auxinas, entre otras.
- **Otras sustancias:** CO_2, alcohol, glutamina, ácido cianhídrico, entre otras.

Mediante los exudados radiculares, se establecen diferentes interacciones microorganismo-raíz que afectan positiva o negativamente el crecimiento de las plantas, en el primer caso se encuentran: micorrizas, bacterias fijadoras de nitrógeno, bacterias promotoras del crecimiento vegetal y agentes de control biológico; en el segundo caso destacan todos aquellos microorganismos fitopatógenos. Se estima que la concentración de bacterias es de 10 a 1000 veces mayor que en el suelo alejado de esta zona (Barea, 2015). Estas interacciones controlan no solo el crecimiento y desarrollo de las plantas, sino también alteran la susceptibilidad de las plantas a enfermedades y estrés abiótico (Morgan *et al*., 2005).
Se estima que las bacterias presentes en la rizosfera de los distintos ecosistemas, solo se han identificado un 8%. Un número abrumador de estudios ha revelado que muchos microorganismos asociados con plantas pueden tener profundos efectos sobre la germinación de semillas, el vigor de las plántulas, el crecimiento y desarrollo de las plantas, la nutrición, las enfermedades y la productividad (Mendes *et al.* 2013).

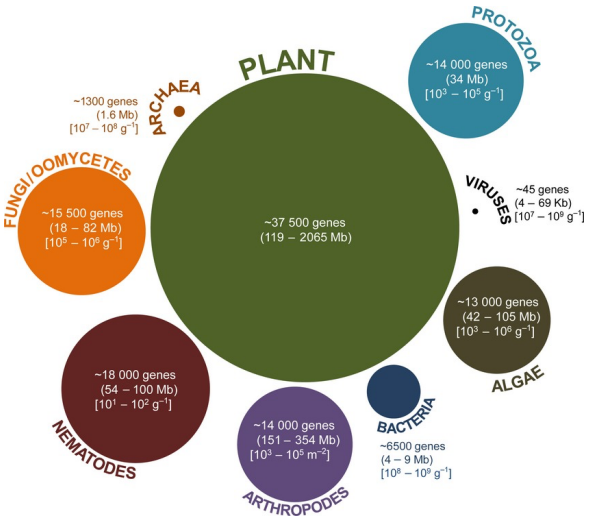


Figura 2: Esquema de la microbioma rizosferica (Mendes *et al.,* 2013).

Dentro de estos microorganismos, se encuentra *Azospirillum brasilense*, una de las bacterias perteneciente al grupo de PGPB, la cual ha sido bastante estudiada por sus mecanismos de fijación biológica de nitrógeno y producción de fitohormonas (Bashan & de-Bashan, 2010). Recientemente se ha incorporado su uso en biofertilizantes, por los efectos benéficos que brinda hacia la planta.

1.2. *Azospirillum brasilense.*

En 1925 fue descrito el microorganismo *Azospirillum*, llamándolo primeramente *Spirillum lipoferum* por Beijernck y colaboradores, pero fue hasta 1973 donde Peña-Cabriales y Döbereiner lo retomaron como objeto de investigación. La bacteria pertenece a la subclase alfa de las proteobacterias de la familia *Rhodospirillaceae*, son Gram negativas heterotróficas, de forma bacilar o vibroide con un diámetro de 1.0 µm x 2.1 a 3.8 µm de largo, su movilidad es en espiral y se debe a la presencia de un flagelo polar, así como también presenta flagelos laterales; contienen cantidades elevadas de poliß-hidroxibutirato (PHB), hasta un 50% del peso seco celular, observándose al microscopio las células jóvenes presentan abundantes gránulos refringentes (Okon *et al*., 1997; Young, 1992), los cuales son empleados por la propia célula como fuentes de carbono y energía durante periodos de inanición e incluso son capaces de formar quistes en condiciones muy desfavorables (Saura *et al*., 2003). Una de las características fenotípicas más ampliamente usadas como criterio para el reconocimiento tentativo del género *Azospirillum,* es el color rojo escarlata que toman las colonias al crecer en un medio adicionado con el colorante rojo Congo (Rodríguez-Caceres, 1982). Son bacterias quimio-organotróficas y utilizan como fuente de carbono azúcares, alcoholes, sales de ácidos orgánicos y como fuente de nitrógeno emplean nitrato, sales de amonio, ciertos aminoácidos; así como también pueden fijar nitrógeno (Holt, 1984).

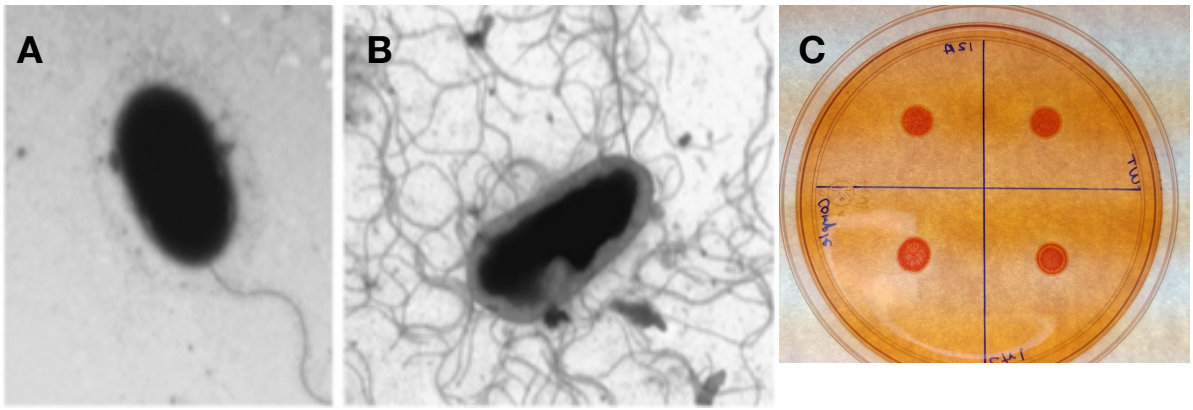


Figura 3. Microscopia electrónica de células de *A. brasilense* Sp245. **(A)** Cultivadas en medio líquido **(B)** Cultivadas en medio sólido.(Vanbleu, E. e*t al*., 2017). **(C)** Colonias de *Azospirillum brasilense* Sp245 en medio mínimo adicionado con rojo congo (Laboratorio de la Interacción Bacteria-Planta CICM-ICUAP. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla).

Las condiciones de baja concentración de oxígeno son las adecuadas para el crecimiento y multiplicación de las células bacterianas, siendo dañinas las altas concentraciones de oxígeno y condiciones anaeróbicas. La aerotaxia parece ser especialmente importante bajo condiciones de fijación de nitrógeno, permitiéndole a las células de *Azospirillum* sp, alcanzar concentraciones de oxígeno lo suficientemente bajas para que se active la actividad nitrogenasa, debido a que esta enzima puede inhibirse en altas concentraciones del mismo (Barak *et al*., 1982)

A. brasilense es móvil y presenta flagelación mixta. El flagelo polar es sintetizado durante el crecimiento en medio líquido y es responsable del movimiento natatorio (Figura 3A); mientras que los flagelos laterales intervienen en el movimiento en "swarming" o de superficie y son inducidos durante el crecimiento en medio sólido y en superficies (Figura 3B). La capacidad de *Azospirillum* de detectar compuestos químicos liberados por la planta y navegar hacia el sistema radicular de la planta favorece la colonización de las raíces de una manera exitosa. Hipótesis que se ha evidenciado al obtener mutantes no quimiotácticas o no móviles, que son severamente alteradas en la colonización de la superficie de raíces de trigo.

Estudios taxonómicos de *S. lipoferum* condujeron a su reclasificación en un género nuevo, *Azospirillum,* donde actualmente están incluidas 20 especies y más de 200 cepas distintas. La especie *A. brasilense* fue descrita en 1978 por Tarrand y colaboradores y se han identificado alrededor de 10 cepas diferentes, una de ellas y la mas estudiada después de *Azospirillum lipoferum*, es *A. brasilense* Sp245.

1.2.1. *Azospirillum brasilense* como PGPB.

El descubrimiento de *Azospirillum* como bacteria promotora del crecimiento vegetal y su aplicación como biofertilizante, ha permitido la obtención de una mayor producción de alimentos para la demanda que se requiere hoy en día. *Azospirillum brasilense* es una bacteria aislada de un número importante de plantas de interés agronómico en las que se observa el efecto benéfico, entre las que se encuentran: cereales, hortalizas, cactáceas y pastos forrajeros. El beneficio de la interacción de microorganismo-planta influye de manera positiva en la salud de la planta, por medio de efectos diversos, entre los que se incluyen: mejor desarrollo del sistema radicular y la proliferación de pelos radiculares, lo que propicia una mejora en la absorción de agua y minerales del suelo, reflejado en un mayor tamaño de la planta (Figuras 4 - 6). Recientemente se ha demostrado, que los lipopolisacaridos (LPS) presentes en los sobrenadantes de cultivos de *A.brasilense* 245 favorecen la formación de callos en explantes vegetales, utilizados en la micropropagación de tejidos vegetales (Figura 7) (Evseeva *et al*., 2017).

Se propone que el beneficio en las plantas se logra por la interacción directa entre la planta hospedera y el microorganismo, o bien indirectamente, debido a su actividad antagonista contra patógenos (Evseeva *et al*., 2017). La estimulación directa incluye varios mecanismos como son la producción de reguladores del crecimiento de las plantas: auxinas (ácido indol-3-acético AIA, ácido indol-3-butírico IBA y ácido fenil acético, AFA), giberelinas, citocininas y óxido nítrico (NO), fijación de nitrógeno y producción de sideróforos. *Azospirillum brasilense*, promueve el crecimiento y el rendimiento de importantes especies de plantas agronómicas y ecológicas (Okon y Labandera-Gonzalez, 1994; Bashan y de-Bashan, 2010). *A. brasilense* produce reguladores del crecimiento de las plantas principalmente ácido indol-3-acético (IAA), que se asocia con los efectos benéficos observados después de la inoculación (Baca & Elmerich, 2007). Los primeros estudios mostraron que los cultivos de *Azospirillum* excretan cantidades apreciables de nitrito (NO_2^-) producido por la respiración del nitrato (NO_3^-), (Didonet & Magalhaes, 1997). Además, el efecto promotor de *Azospirillum* en la formación de pelos radiculares y raíces laterales se debe no solo al AIA, sino también probablemente al NO, como lo sugirieron Zimmer y Bothe 1988. Algunos estudios mostraron que la producción de NO por *A. brasilense* Sp245 fue responsable, al menos en parte, de los efectos sobre el crecimiento y la proliferación de las raíces (Creus *et al*. 2005). El mejoramiento en el rendimiento de plantas inoculadas con *Azospirillum brasilense*, depende de un exitoso mecanismo de colonización, puesto que su capacidad de adherencia a las raíces vegetales permite a la bacteria establecer una asociación permanente con la planta, a este proceso se le conoce como formación de biopelícula. *A. brasilense*, es la mejor especie estudiada de este género, se encuentra en estrecha asociación con muchos cultivos importantes para la agricultura y ejerce efectos benéficos sobre crecimiento y productividad de las plantas (Stets I *et al*., 2015).

Desarrollo del sistema radicular

Figura 4. Estimulación de crecimiento de raíces de maíz inoculado con *A.brasilense* (Caballero *et al.*, 1999).

Proliferación de pelos radicales

Figura 5. Estimulación del crecimiento de pelos radiculares en forraje, inoculado con *A.brasilense* (Vital L *et al*., 2001).

Crecimiento de la planta

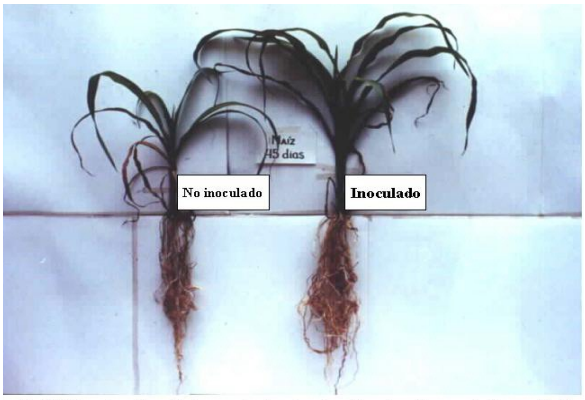


Figura 6. Estimulación del crecimiento de planta de maíz inoculado con *A.brasilense*, bajo condiciones de invernadero (Caballero *et al.,* 1999).

Actividad morfogenica

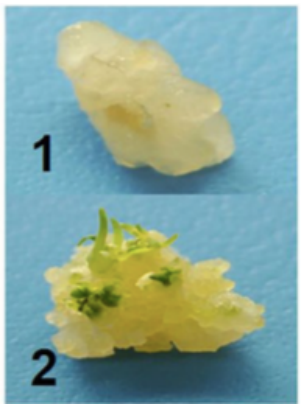


Figura 7. Efecto de los lipopolisacáridos bacterianos sobre la actividad morfogenética en callos somáticos de trigo (Evseeva *et al*., 2017).

1.3. MOVILIDAD Y QUIMIOTAXIS.

La asociación de *Azospirillum* a las raíces de las plantas es un evento inicial importante, la cual solo puede tener éxito si la bacteria sobrevive en el suelo y alcanza poblaciones significativas en el sistema de raíces del hospedero. La movilidad y la quimiotaxis permiten que las bacterias se muevan hacia las raíces de las plantas, donde se benefician de los exudados de las raíces como fuente de carbono y energía (Steenhoudt & Vanderleyden, 2000). Para sobrevivir y competir en las diferentes condiciones ambientales encontradas en la rizósfera, las bacterias deben ajustar rápidamente su comportamiento para nadar a entornos favorables (Bible *et al.,* 2008). Los sistemas de transducción de señales permiten a las células detectar y adaptarse a los cambios ambientales mediante respuestas celulares apropiadas, como la regulación de la expresión génica o la modulación en la movilidad (Bible *et al*., 2008). La movilidad en bacterias responde a un sistema de transducción de señales que transmiten información del entorno al aparato de movilidad. *Azospirillum* modula su patrón de nado hacia una mayor o menor probabilidad de cambio en la dirección de la rotación flagelar en respuesta a repelentes y atrayentes, respectivamente (Mukherjee *et al*., 2016). En *Azospirillum* además se describió, un quimioreceptor transmembranal Tlp1 (Transduction like protein) el cual se demostró que media taxis de energía en *A. brasilense* y que interviene en la colonización de las raíces de las plantas (Greer-Philips *et al*., 2004). Tlp1 cuenta con una región periplásmica N-terminal y un módulo de señalización en la región C-terminal. Contiene un dominio PilZ en su extremo carboxilo. Los dominios PilZ se encuentran presentes en diversos genomas bacterianos y se sabe que unen al segundo mensajero di-GMPc (Russell *et al.,* 2013). Se ha identificado también, el gen *chsA* como parte de la vía de señalización de quimiotaxis en *A. brasilense*. La arquitectura de la proteína codificada contiene un dominio sensorial PAS y un dominio EAL. Se demostró que una mutante nula del gen, mostraba un

fenotipo alterado en la movilidad y la respuesta quimiotáctica, a pesar de no verse afectada la síntesis de flagelos polares y laterales (Carreño *et al.,* 2009). *Azospirillum* crece de manera óptima cuando la fructosa, o ácidos orgánicos como malato o succinato, se utilizan como fuentes de carbono y tiene un pobre crecimiento en aminoácidos como únicas fuentes de carbono. Las raíces de pastos y cereales exudan cantidades significativas de ácidos orgánicos, azúcares y aminoácidos por lo que son compuestos orgánicos que se encuentran en la rizózfera y nutren a la bacteria (Alexandre *et al.,* 2000). Las bajas concentraciones de oxígeno presentes en la rizósfera son también uno de los principales estímulos que atraen a las bacterias a las raíces de las plantas.

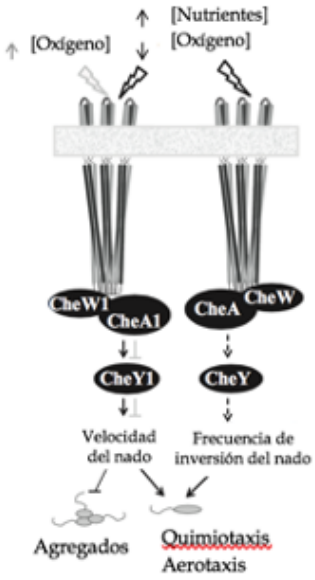


Figura 8. Esquema de quimiotaxis de *A. brasilense (*Russell *et al*., 2013).

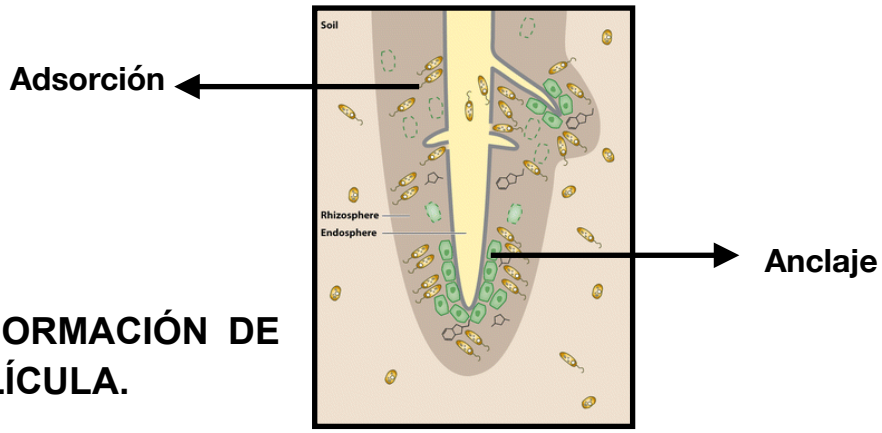
1.4. AEROTAXIS.

La aerotaxis es la capacidad de moverse hacia concentraciones óptimas de oxígeno, es una respuesta importante en *A. brasilense* (Burdman *et al.,* 2000), en la cual, una concentración de oxígeno baja, de 3 a 5 μM, es la concentración de oxígeno óptima para la generación de energía y la fijación de nitrógeno (Alexandre *et al.,* 2000; Russell *et al.,* 2013). Cuando las células se exponen a condiciones de oxígeno elevado en su entorno, las células de *A. brasilense* forman pequeños agregados de bacterias que son inicialmente transitorios, pero, si las condiciones de alta aireación persisten, se pierde la movilidad. (Russell *et al.,* 2013; Bible *et al.,* 2015). Se ha sugerido que estos agregados representan un comportamiento de protección manteniendo un ambiente intracelular microaerofílico que permite la expresión de la nitrogenasa, enzima

responsable de la fijación biológica de nitrógeno y sensible a altas concentraciones de oxígeno (Bible *et al.,* 2015). El agrupamiento de las células se describe como un paso previo para la floculación, en donde las células vibroides o móviles de *Azospirillum* pasan a células más redondas y no móviles, dispuestas en una matriz de exopolisacáridos (EPS) (Bible *et al*., 2015).

1.5. COLONIZACIÓN DE *A.brasilense* A LAS RAÍCES DE LAS PLANTAS.

En relación con la colonización, estudios realizados *in vitro* con *A. brasilense* Sp7 proponen que el mecanismo de adhesión de la bacteria a la raíz de la planta se desarrolla en dos etapas: la primera se denomina fase de adsorción, depende del flagelo polar y consiste en una unión rápida y débil de la bacteria a la superficie de la raíz. A continuación tendría lugar la etapa de anclaje, donde intervienen polisacáridos bacterianos, proteína de membrana (OmpA), así como el flagelo polar responsables de la adhesión de la bacteria a la raíz de una manera más estable, formando microcolonias, agregados y biopelícula (Ramirez *et al*., 2018; Virüega-Góngora *et al*., 2020).

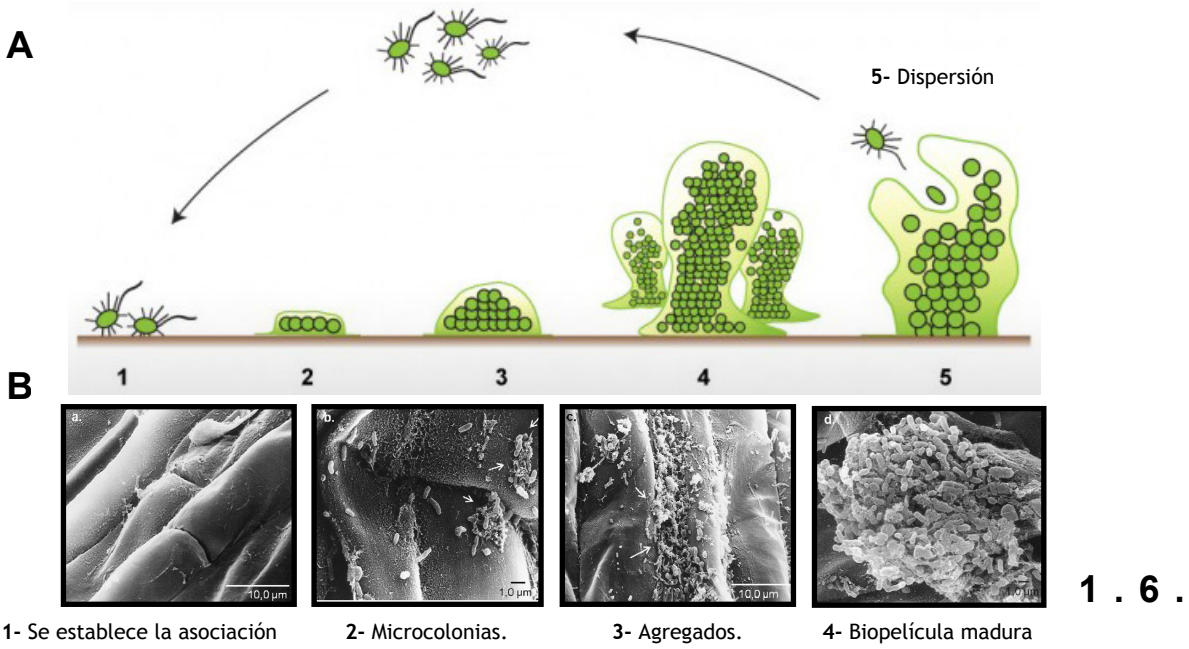


1.5.1. FORMACIÓN DE BIOPELÍCULA.

Figura 9. Modelo de colonización bacteriana a las raíces de las plantas (Villarreal *et al*., 2018).

En su entorno natural los microorganismos se localizan predominantemente asociados a superficies y organizados en comunidades complejas denominadas biopelículas. Las bacterias que crecen en biopelícula difieren de su contraparte “plantónica”, que viven como células únicas; a nivel morfológico, fisiológico y metabólico. Estas diferencias fisiológicas de la célula son reflejo de cambios importantes a nivel de la expresión genética, como se ha descrito ampliamente en varios trabajos de genómica funcional, que comparan las células creciendo en biopelícula o plantónicas (Belion *et al.,* 2004; Beyhan *et al.,* 2006; Sauer *et al.,* 2001).

La regulación de esta forma de vida depende del microorganismo y de la participación de redes de señalización celular complejas, en las que intervienen diversas proteínas que responden a diferentes señales ambientales. En la década de los ochenta, se describió el sistema novedoso de señalización celular en bacterias, dirigido por el nucleótido cíclico di-GMPc, descubierto como un activador alostérico de la enzima celulosa sintasa en *Gluconobacter xylinus* (Clark *et al.,*1987). Posteriormente, se ha descrito como un mecanismo de regulación de varios fenotipos, entre ellos la transición de la célula planctónica a sésil (Belion *et al.,* 2004;). Si los niveles de di-GMPc son altos se favorece la formación de biopelícula y cuando los niveles son bajos, se favorece el estilo de vida plantónica. La concentración intracelular del di-GMPc es regulada por dos actividades enzimáticas antagónicas de síntesis y degradación. Éstas se caracterizan por incluir en su estructura dominios nombrados GGDEF por los residuos de amino ácidos conservados para las proteínas con actividad de diguanilato ciclasa (DGC), mientras que las fosfodiesterasas (PDEs) contienen los dominios EAL o HD-GYP (Belion *et al.,* 2004; Römling *et al*., 2013; Römling *et al*., 2017). Diferentes autores, clasifican la formación de biopelícula en diversos pasos, pero de manera general, se podrían agrupar en 5 etapas: 1.- Asociación o anclaje, 2.- Formación de microcolonias, 3.- Formación de agregados, 4.- Biopelícula madura y 5.- Dispersión de la biopelícula (Steenhoudt y Vanderleyden 2000; Van Puyvelde *et al*., 2011; Arruebarrena Di Palma *et al*., 2013; Russell *et al*., 2013; Romero *et al*., 2013; Bulgarelli *et al*., 2013). En la figura 10 se esquematiza el proceso de formación de biopelícula.



1.6.

Figura 10. Esquema del proceso de formación de biopelícula bacteriana. **(A)** Formación de biopelícula (Steenhoudt y Vanderleyden 2000; Van Puyvelde *et al*., 2011; Arruebarrena Di Palma *et al*., 2013; Russell *et al*., 2013; Romero *et al*., 2013; Bulgarelli, *et al*., 2013) **(B)** Formación de biopelícula en plantas de fresa inoculadas con *Azospirilum*. (Guerrero-Molina *et al.,* 2011).

di-GMPc.

El di-GMPc ha sido considerado como uno de los segundos mensajeros bacterianos mas comunes e importantes (Römling *et al*., 2013). Fue descrito por Benziman en 1987 (Ross *et a*l., 1987), como un activador alostérico de una celulosa sintasa bacteriana de *Gluconacetobacter xylinus* (D'Argenio & Miller, 2004). Más tarde, se describió la celulosa sintasa dependiente de di-GMPc en la alfaproteobacteria *Agrobacterium tumefaciens*, lo que comprueba que el di-GMPc no es una molécula específica de una cepa, sino que tiene una amplia distribución filogenética (Römling *et al*., 2013)**.** Se ha demostrado que el di-GMPc regula la formación de biopelículas, la motilidad, la virulencia, el ciclo celular, la diferenciación y otros procesos (Figura 11). La mayoría de las vías de señalización dependientes de di-GMPc controlan la capacidad de las bacterias para interactuar con superficies abióticas o con otras células bacterianas y eucariotas. El di-GMPc desempeña un papel clave en los cambios en el estilo de vida de muchas bacterias, incluida la transición del estado móvil a sésil, que ayuda al establecimiento de comunidades de biopelículas multicelulares, y del estado virulento en infecciones agudas al estado menos virulento pero más resistente (Römling *et al*., 2013).

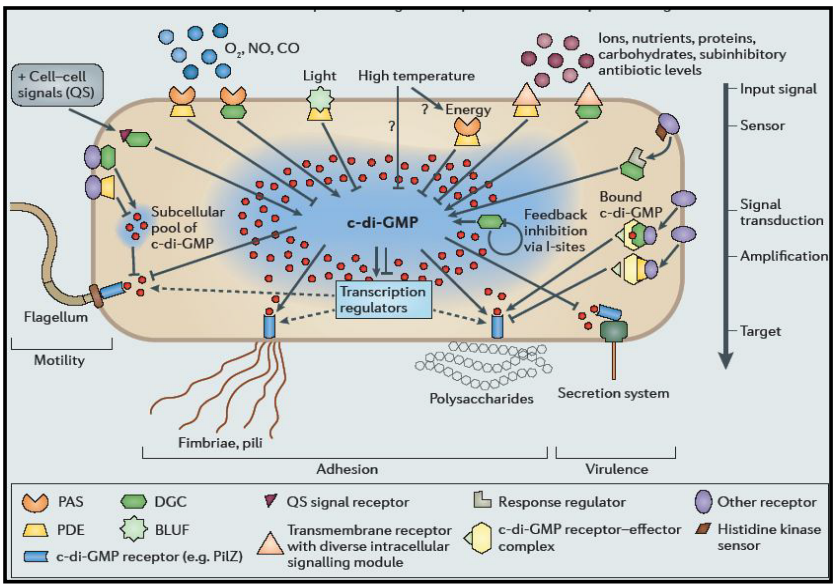


Figura 11. Redes globales de regulación del di-GMPc (McDougald *et al*., 2012).

1.6.1. EFECTORES DEL di-GMPc.

Las enzimas responsables de la síntesis y degradación del di-GMPc son fácilmente identificables por sus dominios característicos, sin embargo, debido a la gran diversidad del efecto del di-GMPc sobre la fisiología de las células y diferentes procesos celulares, estudios realizados sugieren que existen numerosos efectores que

unen al di-GMPc, muchos de los cuales no tienen secuencia o estructura similar entre ellos. Los blancos del di-GMPc identificados incluyen proteínas que contienen dominio PilZ, proteínas que contienen dominios degenerados GGDEF y EAL, receptores de sitio I y otros que incluyen reguladores transcripcionales como los riboswitches (Schirmer & Jenal, 2009; Jenal *et al.,* 2017). Las proteínas con dominio PilZ, uno de los más estudiados, se encuentra unido al carboxilo terminal de los dominios GGDEF, EAL y/o HD-GYP, o vinculado a un dominio enzimático modulado por el segundo mensajero y que participa en la biosíntesis de una molécula particular como el alginato (Hay *et al*., 2009). Estudios bioinformáticos y bioquímicos revelan la presencia de dos secuencias cortas que comprenden el dominio consenso de PilZ, RxxxRx (D/N)x(S/A)xxG. Un análisis estructural reveló que se producen cambios conformacionales durante la unión de la proteína tipo PilZ y el di-GMPc (Römling & Simm, 2009). Otro de los dominios que se considera receptor es el sitio I, en donde el dominio GGDEF no está conservado y carece de actividad enzimática, sin embargo, mantiene la capacidad de unirse al di-GMPc, en ciertas DGCs degeneradas (Mills *et al.,* 2011). Otros dos tipos de proteínas efectoras son FleQ y PelD de *Pseudomonas aeruginosa,* donde en la primera su actividad se reduce al unirse a di-GMPc y la otra actúa de forma contraria activándose por su unión al di-GMPc a través de un sitio similar al motivo del sitio I (Hengge, 2009). El di-GMPc también puede unirse a riboswitches, los cuales son moléculas de RNA, que adoptan una estructura secundaria. Posteriormente a la unión con el RNAm cambia su estructura secundaria, lo que ocasiona cambios en la transcripción, estabilidad del RNAm o la traducción de éste (Römling *et al*., 2013).

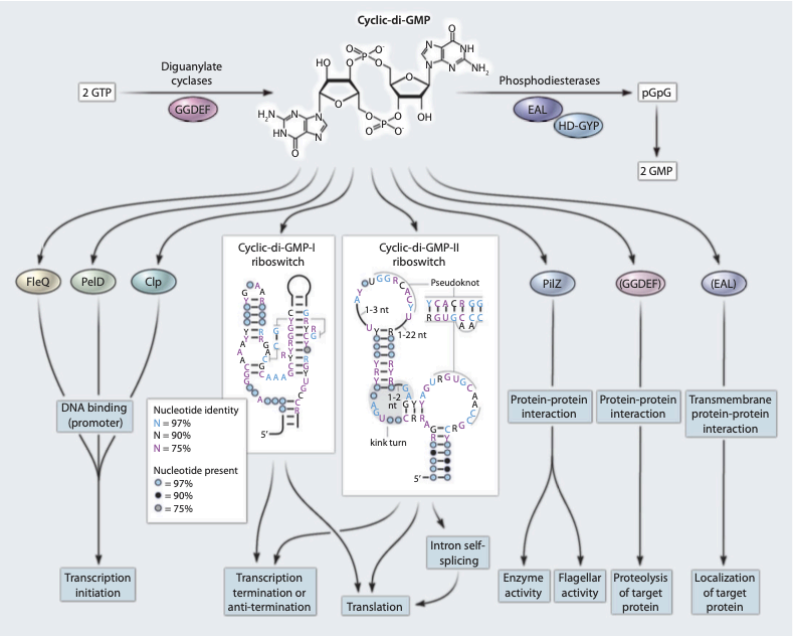


Figura 12. Diversidad de efectores de unión de di-GMPc (Hengge 2010).

1.6.2. CUANTIFICACIÓN DE di-GMPc.

El di-GMPc es un segundo mensajero que está implicado en muchos procesos celulares importantes. Por lo cual, el estudio y principalmente la cuantificación de esta molécula, ha sido un tema de estudio revisado ampliamente. Existen diferentes alternativas para la cuantificación de esta molécula, sin embargo estas presentan una serie de inconvenientes técnicos, debido a que estos métodos generalmente requieren una tediosa purificación de las enzimas DGC e incubación con el sustrato GTP en condiciones favorables de reacción por HPLC (Zhou, 2016). Sin embargo, existen nuevas alternativas que se están utilizando para la cuantificación del di-GMPc. Una opción es el uso de riboswitches que presentan la peculiaridad de unirse especialmente al di-GMPc; estos elementos de ARN reguladores en "*cis*" se localizan en la región 5' no traducida de ARNm bacterianos, los cuales modulan la expresión de genes rio abajo, al unirse a pequeñas moléculas específicas. Estos presentan dos regiones importantes, el aptámero: el cual une directamente a una molécula pequeña (di-GMPc). La segunda región importante es la plataforma de expresión, la cual recibe cambios estructurales en respuesta a los cambios del aptámero, este cambio de la plataforma es lo que regula la expresión génica. Con base en base a estas características y principalmente el descubrimiento de que los riboswitches, tienen la capacidad de unirse al di-GMPc, se comenzaron a utilizar como una herramienta importante para la cuantificación de este segundo mensajero (Breaker *et al*., 2008), describió el primer riboswitch de di-GMPc en eubacterias (c-di-GMP-I) y en *Clostridium difficile* (c-di-GMP-II). Posteriormente Zhou en 2016, en *Bacillus thuringiensis* subs chinensis CT-43, describió 5 riboswitches capaces de detectar concentraciones del di-GMPc y principalmente uno que se encuentra dispuesto en formar de un triple tándem (Bc3-5) (Figura 13).

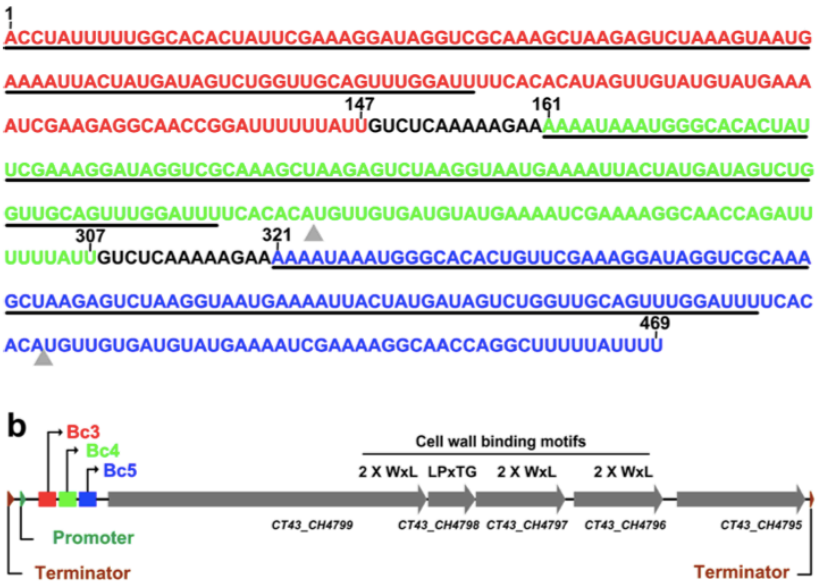


Figura 13. Contexto genetico del riboswitch Bc 3-5 (Zhou *et al* .,2016)

1.6.3. SÍNTESIS DE di-GMPc.

El di-GMPc se produce en una reacción de condensación, catalizada por las DGCs a través de la acción cooperativa de sus dominios catalíticos conservados GG(D/E)EF/AGDEF. Cada monómero GG(D/E)EF se organiza de forma antiparalela y contribuye con un sustrato GTP (guanosín trifosfato) para la formación de un enlace fosfoéster con otra molécula de GTP para dar lugar a la molécula di-GMPc (Figura 14) (Römling & Simm, 2009; Jenal *et al.,* 2017). Los subproductos de la reacción son dos moléculas de pirofosfato (Römling *et al*., 2013).

El primer dominio GGDEF se identificó en 1995 en una proteína de *Caulobacter crescentus,* denominada PleD, descrita como regulador global que controla la transición entre el estilo de vida planctónico y una fase de adherencia del ciclo de vida de la bacteria (D'Argenio & Miller, 2004). El dominio consta de 170 residuos de aminoácidos aproximadamente y fue designado así basado en su motivo de secuencia de aminoácidos característico Gly-Gly-Asp-Glu-Phe, altamente conservado dentro del dominio (Römling & Simm, 2009; Römling *et al*., 2013). Los primeros dos residuos (Gly) están implicados en la unión de GTP, el tercer residuo (Asp/Glu) es indispensable para la catálisis y el cuarto (Glu) en la coordinación de iones metálicos. El sitio activo (sitio A), que corresponde a este motivo GGDEF está involucrado en la unión a GTP y requiere de Mg^{2+} o Mn^{2+} para la formación del enlace fosfodiéster (Römling *et al*., 2013). De manera adicional las DGCs son sujetas a inhibición por retroalimentación, en la cual el di-GMPc se une a un sitio de inhibición llamado sitio I, caracterizado por ser un motivo de cuatro aminoácidos RxxD, encontrado cinco aminoácidos río arriba del motivo GG(D/E)EF (Hengge, 2009). Además del GGDEF, se han encontrado DGCs activas con motivos GGEEF, AGDEF (Dahlstrom & O'toole, 2017).

1.6.4. DEGRADACIÓN DE di-GMPc.

Las fosfodiesterasas (PDE), son las enzimas responsables de la degradación del di-GMPc. La catálisis es llevada a cabo mediante un ataque hidrolítico sobre el enlace fosfodiéster (Figura 11) (Römling *et al.,* 2013). Se han descrito PDEs distintas, las que incluyen el dominio EAL (Glu-Ala-Leu) conservado y recientemente se ha demostrado la actividad catalítica en motivos degenerados como: (ETL, EVL y EGL). Por otra parte existen enzimas que presentan el dominio HD-GYP con motivo conservado His-Asp-Gly-Tyr-Pro (Jenal *et al.,* 2017; Dahlstrom & O'toole, 2017). Las fosfodiesterasas de tipo EAL constan de aproximadamente 250 residuos de aminoácidos y la primera de este tipo, fue descrita en una proteína de *Bordetella pertussis*, BvgR, la cual actúa como reguladora de genes implicados en virulencia (Ramírez *et al.,* 2014). Estas fosfodiesterasas, hidrolizan el di-GMPc produciendo el dinucleótido lineal de 5'-O-phosphonoguanylyl-(3'->5')-guanosine (5-pGpG) (Jenal *et al*., 2017). El proceso

catalítico requiere de Mg^{2+} y Mn^{2+} y es inhibido por Ca^{2+} (Hengge, 2009). Por su parte, las fosfodiesterasas que cuentan con el dominio HD-GYP no tiene similitud de secuencia con el dominio EAL e hidrolizan al di-GMPc para producir 5-pGpG y posteriormente a GMP (Römling & Simm, 2009). Recientes estudios han mostrado que la oligoribonucleasa Orn, es la enzima principal capaz de degradar al pGpG (Jenal *et al*., 2017). A pesar de que se tiene conocimiento sobre la estructura y función de las DGCs y PDEs, sus funciones fisiológicas aún no son claras. Solo algunas señales de entrada se han identificado como oxígeno, luz, óxido nítrico, nutrimentos (Jenal *et al.*, 2017).

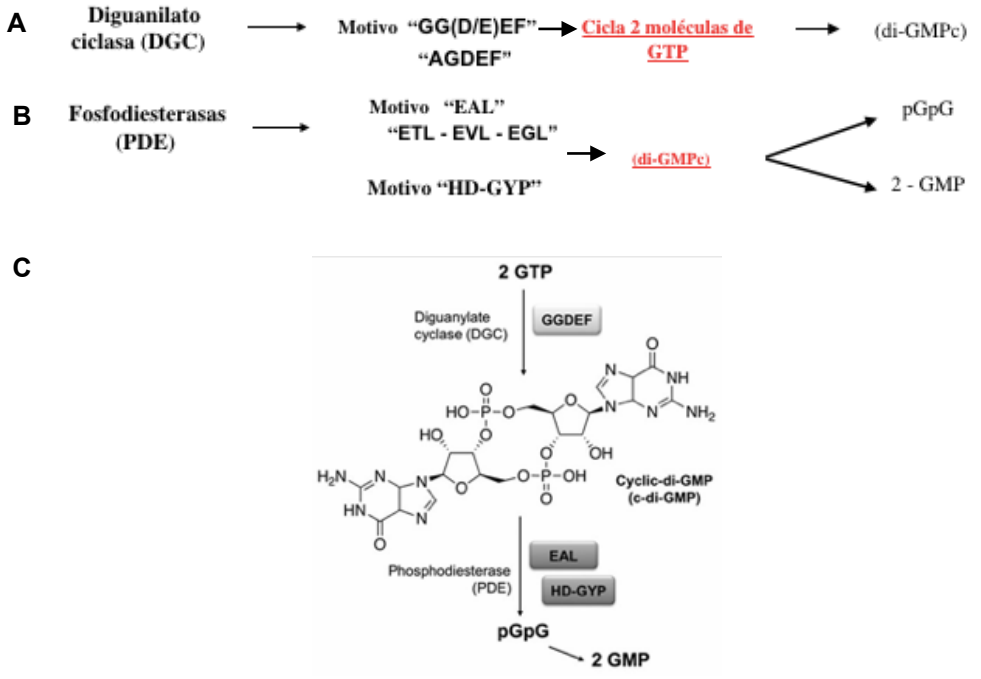


Figura 14. Síntesis y degradación de di-GMPc. **(A)** La cual es catalizada por las DGCs mediante la acción de sus dos dominios catalíticos GGDEF. **(B)** Por su parte las fosfodiesterasas con los dominios EAL o HD-GYP hidrolizan el di-GMPc en guanosina (pGpG) o GMP, respectivamente. **(C)** Diagrama general de la síntesis y degradación de di-GMPc. Una vez formado, el di-GMPc es capaz de regular diversos procesos (Jenal *et al*., 2017).

1.7. PROTEÍNAS HÍBRIDAS.

Una proteína es considerada híbrida, sí en su estructura proteica, presenta dominios de síntesis y degradación de di-GMPc, los cuales pueden ser dominios DGC y PDE. Análisis bioinformáticos muestran que, aunque los dominios DGC y PDE presentan actividades enzimáticas opuestas, una proteína híbrida puede tener ambos dominios en su estructura (Dahlstrom & O'toole, 2017; Ramírez *et al.,* 2018). Las proteínas hibridas pueden clasificarse de acuerdo a la actividad enzimática de los dominios DGC y EAL, ya que pueden ser cataliticamente activos o no. Con base en

esta característica, se pueden clasificar en 3 clases, los cuales se describen a continuación.

- **Clase I:** Los dominios GGDEF/EAL son cataliticamente activos, por lo cual su regulación dependerá de diferentes estímulos ambientales o intracelulares, provocando que en algún momento determinado, la actividad de uno de los dos prevalezca sobre el otro. Un ejemplo de esta clase, es la proteína híbrida citoplasmática de *Mycobacterium smegmatis* (MSMEG_2196), la cual presenta dominios GAF-GGDEF-EAL, y se ha demostrado de manera *in vitro*, que puede sintetizar e hidrolizar di-GMPc (Gomelsky *et al*., 2011). Al igual que la proteína MucR de *Pseudomonas aeruginosa* en donde el dominio GGDEF esta involucrado en la regulación positiva de la biosíntesis de alginato y el dominio EAL esta involucrado en la regulación positiva de la dispersión de la biopelícula (Valentini *et al*., 2016).

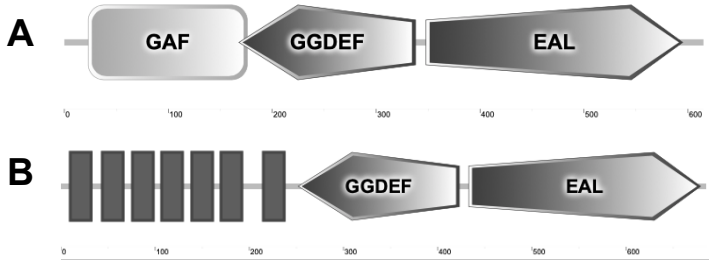


Figura 15. Proteínas híbridas pertenecientes a las Clase I. **(A)** MSMEG_2196 de *Mycobacterium smegmatis* **(B)** MucR de *Pseudomonas aeruginosa*.

- **Clase II:** Uno de los dominios GGDEF/EAL es cataliticamente activo y el otro se encuentra inactivo, donde el dominio sin actividad desarrolla nuevas funciones. Un ejemplo de esta clase es la proteína CC3396 de *C. crescentus*, la cual presenta dominios GGDEF-EAL, donde el dominio GGDEF se encuentra parcialmente degenerado (GEDEF) y carece de actividad catalítica, en su lugar este dominio es capaz de unir a GTP, provocando la activación del dominio EAL (Christen *et al*., 2005).

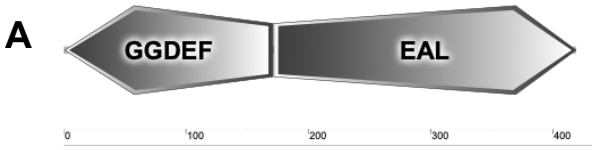


Figura 16. Proteína híbridas pertenecientes a las Clase II **(A)** CC3396 de *C. crescentus*.

- **Clase III:** En esta clase, ambos dominios GGDEF/EAL se encuentran cataliticamente inactivos, por lo tanto pudieran estar actuando como receptores de di-GMPc pudiendo estar regulando alguna función.

El estudio de proteínas hibridas, es sin duda un tema muy importante, debido a la gran versatilidad que estas pudieran presentar, y sobre todo la ventaja que estas pudieran conferir a las bacterias que se encuentran presentes en el suelo, en donde hay una gran competencia y la respuesta rápida a estímulos pudiera ser factor clave para la supervivencia.

1.7.1. PROTEÍNAS HÍBRIDAS PRESENTES EN *A.brasilense* Sp245.

En 2018 Ramirez Mata y colaboradores realizaron un análisis de las proteínas que presentan dominios GGDEF/EAL en genomas de *Azospirillum*, con ayuda de métodos bioinformáticos (RAST, SMART, CLUSTAL), realizó una búsqueda en nueve genomas de *Azospirillum* (Ramirez *et al*., 2018). Con base en a los resultados, se logró determinar que en el genoma de *A.brasilense* Sp 245, se encuentran presentes 10 genes que codifican para proteínas hibridas (GGDEF/EAL): (CCC97222.1, CCC99416.1, CCC97047.1, CCC97824.1, CCD03171.1, CCC96788.1, CCC99238.1, CCDO1243.1, CCDO3331.1 y CCDO0829.1), 20 para proteínas de dominio único GGDEF y 5 para proteínas de dominio único EAL. Se observó que el grupo de las proteínas hibridas, presentan en su estructura regiones que codifican para dominios auxiliares, como lo son: (HAMP, CHASE, MHYT, PAS/PAC y CACHE) (Figura 17), los cuales podrían presentar funciones de censado de algunos estímulos en especifico y estos a su vez regulen la actividad de los dominios (GGDEF ó EAL) (Ramirez *et al*., 2018).

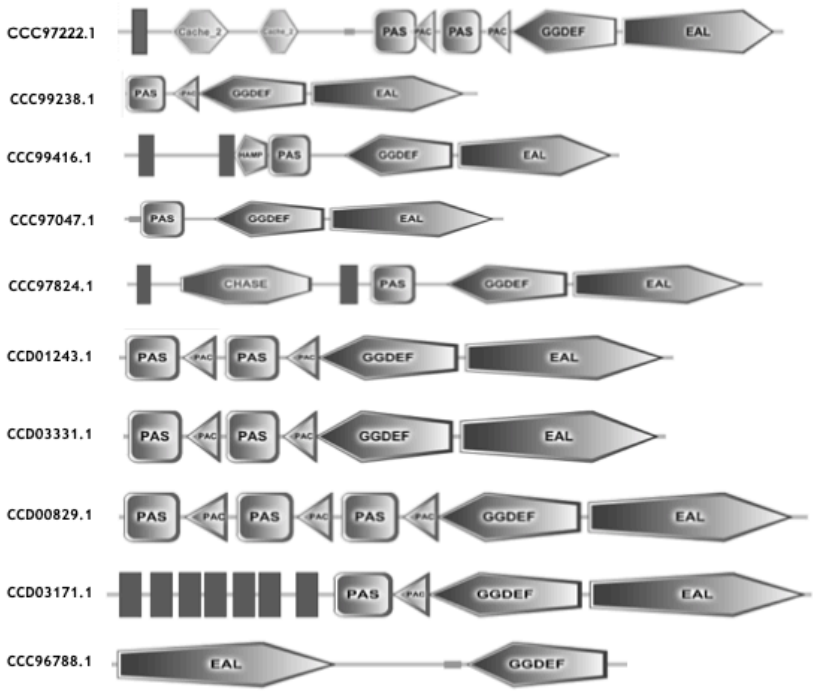


Figura 17. Diferentes dominios de señalización encontrados en proteínas de la superfamilia GGDEF y EAL. Se indican las diez proteínas híbridas presuntivamente localizadas en el genoma de *A.brasilene* Sp245 (Ramirez *et al.*, 2018).

1.8. DOMINIO CHASE.

Denominado como CHASE (cyclases/histidine kinases associated sensing extracellular) debido a que siempre se localiza en regiones extracelulares o periplásmicas, CHASE contiene aproximadamente de 200 a 300 aminoácidos, y se ubica exclusivamente entre dos regiones transmembranales localizado en el extremo N terminal de adenilato ciclasas, diguanilato ciclasas, receptores de quimiotaxis y cinasas histidínicas (Mougel & Zhulin, 2001; Heyl *et al.* 2007). Este dominio se encuentra en receptores transmembranales de bacterias y plantas (Pas *et al.* 2004) y se predice une ligandos de bajo peso molecular como péptidos y la fitohormona citocinina (Pas *et al.* 2004; Ramírez-Mata *et al.* 2018). El dominio CHASE se ha encontrado por bioinformática en varias proteínas, sin embargo, sólo se ha descrito su función en dos proteínas de señalización que controlan el desarrollo en la amoeba *Dictyostelium discoideum*; la histidin cinasa DhkA y la adenil ciclasa ACG. La cinasa DhkA detecta un pequeño péptido, el cual es liberado por las células en tallo, y desencadena la esporulación, en tanto que la cinasa ACG controla la germinación de las esporas de *Dictyostelium*. Este dominio se encuentra también en una histidina cinasa de *Arabidopsis thaliana*, la cual regula la morfogenesis vascular de la raíz (Mougel & Zhulin, 2001¸ Hothorn *et al*. 2012).

1.8.1. CLASIFICACIÓN DE DOMINIO CHASE.

Los dominios CHASE se encuentran distribuidos en una gran variedad de genomas de distintos microorganismos y en el intento por poder clasificarlos, fue propuesta una forma de clasificación, descrita por (Zhang *et al*., 2019). A continuación se describen la clasificación de los dominios CHASE.

- **CHASE2.** Se caracteriza por contar con 250 a 300 residuos de aminoácidos de longitud, presentan 6 alfa hélices y 8 hojas beta plegada. Presentes en 4 clases de proteínas de señalización: cinasas histidinicas, adenilato ciclasa, diguanilato ciclasas y serino/treonina cinasas. El dominio CHASE2 siempre esta seguido de 3 regiones transmembranales.

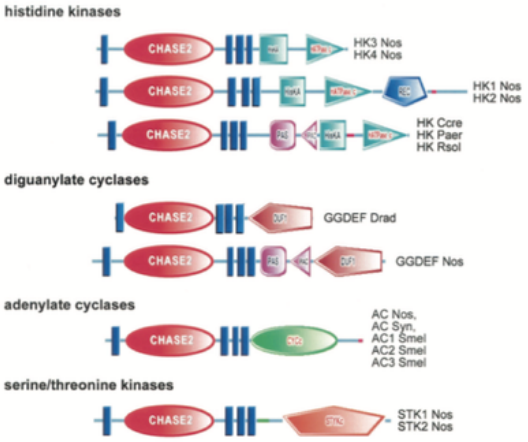


Figura 18. Esquemas de proteínas con dominio CHASE2.

- **CHASE3.** Se caracteriza por contar con 30 a 150 residuos de aminoácidos de longitud, presentan 4 a 6 alfa hélices. Presentes en 4 clases de proteínas de señalización: cinasas histidinicas, adenilato ciclasa, diguanilato ciclasas y proteínas aceptaras de metilos (MCOs). El dominio CHASE3 está flanqueado por 2 regiones transmembranales.

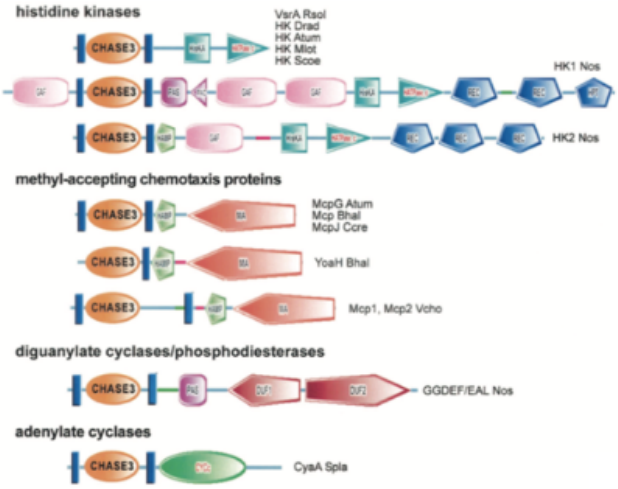


Figura 19. Esquemas de proteínas con dominio CHASE3.

CHASE4. Se caracteriza por contar con 150 a 160 residuos de aminoácidos de longitud, presentan 6 hojas beta, flanqueada por 2 alfa hélices. Están presentes en 2 clases de proteínas de señalización: cinasas histidinicas y proteínas que intervienen en la síntesis y degradación del di-GMPc. El dominio CHASE4 esta flanqueado por 2 regiones transmembranales.

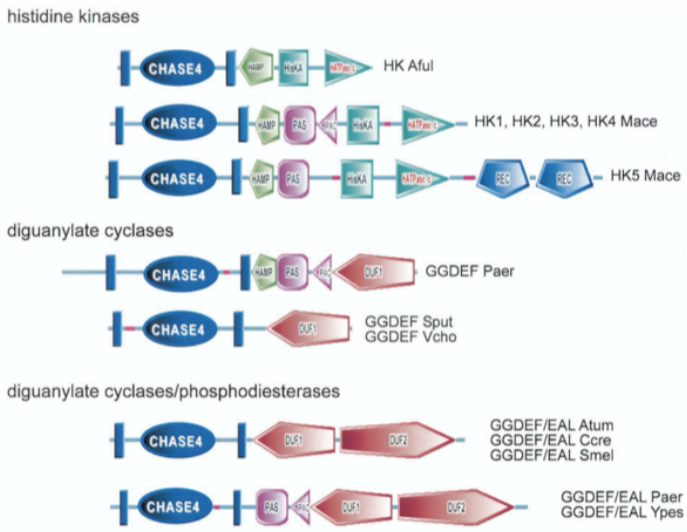


Figura 20. Esquemas de proteínas con dominio CHASE4.

2. ANTECEDENTES.

Gamboa Pérez en 2014 inició con el estudio de algunos genes, uno de ellos fue el gen *cdgD*, seleccionado por la particular arquitectura observada en los dominios que lo constituyen. El estudio se inició con la generación de una mutante de *cdgD* por inserción de un casete de resistencia a kanamicina (*dgcD::KmR*) tanto en *A. brasilense* Sp7, como en, *A. brasilense* Sp245. Posteriormente Ramirez Mendoza en 2016 realizó un análisis fenotípico de ambas mutantes, comparándolas con las cepas silvestres. Dicho análisis mostró que a la mutante *dgcD::Km^R* de *A. brasilense* Sp245 presentó una disminución considerable en la formación de biopelícula y un ligero aumento en la movilidad con diversos quimioatractantes. Lara Oueilhe en 2018 construyó la cepa complementada en *trans,* la cual restauró el fenotipo de la cepa silvestre *A. brasilense* Sp245, demostrando así una posible función DGC/PDE de la proteína CdgD.

Ramirez Mata y colaboradores en 2018 realizó un análisis bioinformatico de las proteínas que presentan dominios GGDEF/EAL en nueve genomas de *Azospirillum*, con ayuda de diversos programas bioinformáticos; RAST, SMART, CLUSTAL. Este trabajo fue publicado en la revista BMC Microbiology, con el titulo “In silico comparative analysis of GGDEF and EAL domain signaling proteins from the *Azospirillum* genomes”.

En el presente estudio se realizará un análisis del comportamiento en la expresión del gen *cdgD*, bajo diferentes condiciones de crecimiento y evaluandolo a través del tiempo. Este trabajo se llevó a cabo por medio de dos metodologías de cuantificación, el primero es por qPCR y el segundo por medio de cuantificación de fluoresencia por medio de una fusión transcripcional en “*cis*”.

3. JUSTIFICACIÓN.

El estudio de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB), es sin duda uno de los temas de mayor interés en la actualidad, diversas investigaciones se han venido desarrollado en los últimos años, sobre los efectos benéficos que estas bacterias les confieren a diversos sistemas vegetales (Figuras 4 - 7). A la par de estas investigaciones, se llevan a cabo trabajos para la incorporación de estas bacterias, en el proceso de elaboración y aplicación de biofertilizantes en suelos, para la mejora de rendimientos de cultivos de interés agronómico (Mahanty *et al*., 2017, Igiehon *et al*., 2017, Schmidt *et al*., 2018 y Wang *et al*., 2019). Sin embargo, el uso de estos productos respecto a los agroquímicos, es hasta ahora muy poco. Ante esta problemática actual, del uso indiscriminado de agroquímicos en la mayoría de los suelos de cultivo, los cuales erosionan los suelos, afectan los mantos acuíferos y provocan enfermedades en humanos (Sekhotha *et al*., 2016), es importante la búsqueda y el desarrollo de nuevas formas de incrementar los rendimientos en los cultivos y que estas sean amigables con el ambiente. Es aquí en donde el estudio de las PGPB, resulta de gran importancia, *Azospirillum* es uno de los mas importantes géneros de PGPB, que se encuentran en todo el mundo, en una amplia variedad de suelos y de condiciones ambientales, *Azospirillum brasilense* es la especie mejor estudiada del genero, la cual se encuentra en estrecha asociación con muchos cultivos importantes para la agricultura y ejerce efectos benéficos (Stets *et al*., 2015).

4. OBJETIVO GENERAL.

Analizar la expresión del gen *cdgD* de *A. brasilense* Sp 245, durante la transición de estilo de vida, móvil a sedentaria y en asociación con las raíces de la planta de trigo.

4.1. OBJETIVOS PARTICULARES.

1.- Determinar la expresión de *cdgD*, durante el proceso de formación de biopelícula y bajo diferentes condiciones de crecimiento.

2.- Determinar la expresión de *cdgD*, en interacción con la raíz de planta de trigo.

4.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS.

1.- Diseño de iniciadores para ensayos de RT-qPCR.

2.- Realizar ensayos de RT-PCR

3.- Identificar de la región promotora correspondientes al gen *cdgD.*

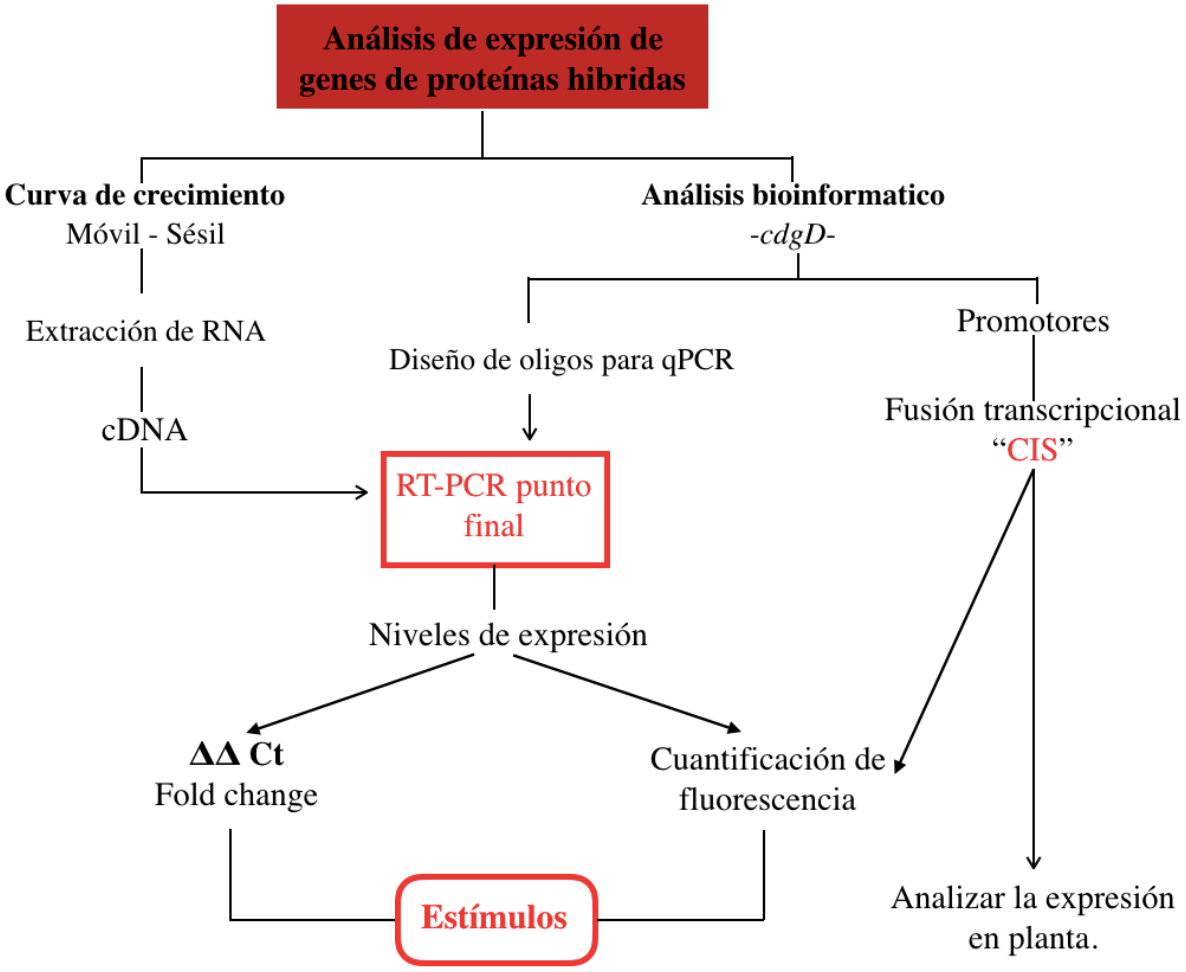
4.- Generar una fusión transcripcional del promotor de *cdgD,* con el gen reportero que codifica para la proteína fluorescente (*mcherry*).

5.- Realizar ensayos de RT-qPCR para evaluar los niveles de expresión de *cdgD,* durante la transición de estilo de vida móvil a sedentaria.

6.- Cuantificación de fluorescencia (microscopio confocal), para evaluar cambios en la expresión de *cdgD*, durante la transición móvil a sésil de *A. brasilense* Sp245.

7.- Cuantificación de fluorescencia (microscopio confocal), para evaluar cambios en la expresión de *cdgD*, en la interacción *Azospirillum*-planta.

5. DIAGRAMA DE TRABAJO.



6. MATERIAL BIOLÓGICO.

Material biológico empleado, construido y utilizado en este trabajo se anotan en las Tablas 1 y 2.

Tabla 1. Cepas empleadas en este trabajo.

Cepas	Genotipo o fenotipo	Referencias
Escherichia coli DH5α	F- *endA*1 *glnV*44 *thi*-1 *recA*1 *relA*1 *gyrA*96 *deoR nupG* Φ80*dlacZ*ΔM15 Δ(*lacZYA-argF*) U169, *hsdR*17(r_{K^-} m_{K^+}), λ−	Hanahan, 1983
Escherichia coli S17.1	*recA, thi, pro, hsdR*-M + RP4-2-Tc::Mu::Km:Tn7	Simon *et al.* 1983
Escherichia coli DH5α (pcdgD-CI)	Cepa conteniendo el promotor del gen *cdgD* en el vector pGEM-T Easy.	Este estudio
Escherichia coli DH5α FPD-pAZBRmChe	Cepa que contiene el plásmido suicida pFPD-pAZBRmChe Km^R Tc^R con la fusión transcripcional (*pcdgD*::*mCherry*)	Este estudio
A. brasilense Sp245	Cepa Wild-type aislada de raíces de trigo	Baldani *et al.* 1983
A. brasilense Sp7	Cepa Wild-type aislada de raíces del pasto *Digitaria decumbens* roots	Baldani *et al.* 1983
A. brasilense T7mCh	Cepa derivada de *A. brasilense* Sp245 con el gen *mCherry* sin promotor, Km^R.	Marcos Jiménez, 2017
A. brasilense 12-A	Cepa derivada de *A. brasilense* Sp245 mutada en el gen *cdgD::Km*^{R}, Km^R.	Gamboa-Pérez, 2014
A.brasilense C56A	Mutante *A. brasilense* 12-A conteniendo (pVK*cdgD*), Km^R , Tc^R .	Lara Oueilhe, 2018
A. brasilense C40A	Mutante 12-A conteniendo el vector pVK100, Km^R , Tc^R	Lara Oueilhe, 2018
A. brasilense FPDm1	Cepa derivada de *A. brasilense* Sp245 con la fusión transcripcional, cromosómica *pdgcD-mCherry* , Km^R.	Este estudio
A. brasilense Sp245 (pMP2449-5)	Cepa derivada de *A. brasilense* Sp245, conteniendo el plásmido pMP2449-5 con el gen *mCherry*, Gm^R	Ramirez-Mata *et al.* 2018
A. brasilense 12-A (pMP2449-5)	Cepa derivada de *A. brasilense* 12-A con en plásmido pMP2449-5 *mCherry*, Gm^R	Lara Oueilhe, 2018
A.brasilense C56A (pMP2449-5)	Cepa derivada de *A. brasilense* C-56A con el plásmido pMP2449-5 *mCherry*, Gm^R	Lara Oueilhe, 2018
A.brasilense C40A (pMP2449-5)	Cepa derivada de *A. brasilense* C40A con el plásmido pMP2449-5 *mCherry*, Gm^R	Lara Oueilhe, 2018
A.brasilense Sp.245 (pFY4535)	Derivada de Sp245, contiene el plásmido pFY4535 Gm^R	Este estudio
A.brasilense 12-A (pFY4535)	Derivada de 12-A, contiene el plásmido pFY4535 Gm^R	Este estudio
A.brasilense C56A (pFY4535)	Derivada de C56A, contiene el plásmido pFY4535 Gm^R	Este estudio
A.brasilense C40A (pFY4535)	Derivada de C40A, contiene el plásmido pFY4535 Gm^R	Este estudio
A.brasilense Sp245-pdz-1	Derivada de Sp245, contiene el plásmido pdz-1 Ap^R	Este estudio
A.brasilense 12-A-pdz-1	Derivada de 12-A, contiene el plásmido pdz-1 Ap^R	Este estudio
A.brasilense C56A-pdz-1	Derivada de C56A, contiene el plásmido pdz-1 Ap^R	Este estudio
A.brasilense Sp245-pdz-2	Derivada de Sp245, contiene el plásmido pdz-2 Cm^R	Este estudio
A.brasilense 12-A-pdz-2	Derivada de 12-A, contiene el plásmido pdz-2 Cm^R	Este estudio
A.brasilense C56A-pdz-2	Derivada de C56A, contiene el plásmido pdz-2 Cm^R	Este estudio

Tabla 2. Plásmidos utilizados y construidos en este trabajo.

Plásmidos	Genotipo o fenotipo	Referencia
pGEM-T-Easy	Vector de clonación *ori* f1, *lacZa* Ap^R	Promega
pCR 2.1 TOPO	Vector de clonación *ori* pUC, *ori* f1, *lacZa* Ap^R Km^R	Thermo Fisher Scietific
pVK100	Cósmido vector de amplio rango de hospedero, fago λ *cos*, Km^R, Tc^R	Knauf & Nester, 1982
pSUP202	Plásmido suicida, pMB1 replicón, mob^+ Ap^R, Cm^R, Tc^R.	Simon *et al* 1983
pBSL98	Vector pBSL contiene el casete de Km^R	Alexeyev *et al.* 1995
pJMS-Km^R	Plásmido suicida, mob^+ Ap^R, Tc^R, Km^R .	Ramirez Mata *et al.* 2016
pFY4535	Derivado de pMMB67EH (Gm) contiene la region hok/sok del biosensor de di-GMPc de pXB300, Gm^R.	Zamorano Sánchez, 2019.
pAB*cdgD*::Km^R	Plásmido suicida derivado de plásmido suicida, con la inserción del casete de Km^R en el gen *cdgD*::Km^R, Ap^R, Tc^R.	Gamboa Pérez, 2014
pVK*pcdgD*	Cósmido vector de amplio rango de hospedero derivado de pVK100 contiene *pcdgD* gen, Tc^R , Km^R .	Lara Oueilhe, 2018
pGEM-*pdgcD*	Plásmido derivado pGEM-TEasy contiene un fragment de 456 bp de la región reguladora del *cdgD* gen. Ap^R.	Este estudio
pAZBR-T7mCh	Construcción derivada del plásmidos suicida pJMS-Km^R, con el gen reportero *mCherry* y terminador ΩT7, insertados entre los genes CCC96879.1 y CCC96880.1 de *A. brasilense* Sp245. Km^R, Tc^R.	Marcos Jiménez, 2017
pAZBR-*pcdgD*T7mCh	Construción derivada pAZBR-T7mCh con el fragmento de 456 bp insertado en 5 ´ del gen reportero *mCherry* Km^R, Tc^R	Este estudio
pMP2449-5	Plásmido pMP2449-5 que porta el gen *mCherry*, Gm^R	Ramirez *et al.* 2018
Pdz-1	Derivado de pMMB67EH (Gm) contiene la region hok/sok del biosensor de di-GMPc de pXB300, Gm^R.	Zamorano Sánchez, 2019.
Pdz-2	Plásmido que contiene el riboswitch biosensor de di-GMPc, Cm^R.	Zamorano Sánchez, 2019.

Ampicilina =Ap^R; Gentamicina =Gm^R; Kanamicina =Km^R; Tetraciclina =Tc^R; Cloranfenicol =Cm^R.

Tabla 3. Iniciadores usados en este estudio.

Notación	Iniciador delantero (5´- 3´)	Iniciador reverso (5´- 3´)	Referencia
M13F/ M13 R	GTA AAA CGA CGG CCA GT	GTC ATA GCT GTT TCC TG	Thermo Fisher Scientific
gyrAF/gyrAR	TCACCGACGAAGAGTTGA TG	CTCTTCGATCTCGGTCTTGG	McMillan & Pereg, 2014
glyAF/ glyAR	GGA GAT CGC CAA GAA GAT CA	GCT CTT GGC GTA GGT CTT GA	McMillan & Pereg, 2014
MTF-*Spe*IF / MTF-*Nco*IR	**CCA TGG** ATG ACC ACG CCC GAC AGC A	CTG GTC GCC GCA CGA GAG CCA G	Este estudio
CMP-*Pst*IF/ CMP-*Kpn*IR	G**CT GCA** GTT GGA CGC CCA TTC GGC CC	**GGT ACC** GGA CGG CGT TCA CCC GAT CA	Este estudio
TraJ/OriT	TCT TCT TGA TGG AGC GCA TGG	CTG CTT CGG GGT CAT TAT AGC	Este estudio
P-cdgD-F/(*Sna*B1) P-cdgD-R/ (XhoI)	**ATA CGT A**GC GGG GGA CGA ACT GCC GTC C	**ACT CGA** GCC CAT GCC GCC CAC CGC C	Este estudio

qRT-cdgDF/ qRT-cdgDR	CCA GAT CCA GGT CTA TGT TCA G	GTT CCA TTC CGT GCG TTT C	Este estudio
4571RC-F 4571DC-R	GTG GCG GGG CGA TGG GGA AGG	GCG GCT GGG TGC GGG ACA AC	Este estudio
F-ORF210 (HindIII) R-ORF-210 (XhoI)	AGA **AAG CTT** AGA TCC TGG GCA TGA TCG AG	AGC **CTC GAG** AGA AGG CGT GGT GAC CTT TC	Este estudio
AZOBR-40391F / AZOBR-40391R	CGC CTT CTA CAC CGA TGA C	TCA GGA TGC GCT TCT TCA T	Este estudio
AZOBR-200212F / AZOBR-200121R	AGC GGA ACC GAC GAT CT	CAG CAG AAC GGC GAT GAA	Este estudio
AZOBR-40216F / AZOBR-40216R	ACC AGG CGT ATC TGG ACT AT	TTG TTG CGC TGG GTC TC	Este estudio
AZOBR-P410089F / AZOBR-P410089R	GAC GGC GAT GCA CTT CA	CGC CAC AGC AAC GTA AAT C	Este estudio
AZOBR-30001F / AZOBR-30001R	TCT GTC CGA GGT GAT CGA G	CGA TGG ATG GGC TGT TGT	Este estudio

7. MÉTODOS.

7.1. CONDICIONES DE CRECIMIENTO.

La cepa *A. brasilense* Sp245 se cultivó a 30 °C en medio K-malato, Luria-Bertani modificado (LB*) o rojo Congo (CR), descrito por (Jijón-Moreno *et al.* 2019). Las cepas de *A. brasilense* 12-A mutante, *A. brasilense* FPDm1 se cultivaron en medios selectivos K-malato, LB* o CR complementados con 50 µg/ ml de kanamicina (Km). *A.brasilense* C-56A se creció en medio CR adicionado con 20 µg/ml de tetraciclina (Tc) y las cepas derivadas de *A. brasilense* marcadas con la proteína mCherry que alberga el plásmido pMP2449-5 se hicieron crecer en CR adicionado con 30 µg/ml de gentamicina (Gm) Las cepas de *Escherichia coli* DH5α y S17.1 se cultivaron a 37 °C en medio LB líquido, pH 7.0, para el medio sólido se agregó agar sólido (agar al 1.5%, p/v). Los medios selectivos para las cepas de *E. coli* se les adicionó ampicilina (Ap), 100 µg/ml; Tc, 10 µg/ml; cloranfenicol (Cm), 25 µg/ml; o Km, 30 µg/ml. La conjugación se realizó en medio LB* y la selección transconjugantes se realizó en medio de malato K sólido con los antibióticos apropiados como se describe en (Jijón-Moreno et al.2019).

7.2. EXTRACCIÓN DE RNA Y ELIMINACIÓN DE DNA GENÓMICO.

A. brasilense Sp245 se cultivó en medio NFB* con KNO_3 o NH_4Cl como fuente de nitrógeno (Arruebarrena e*t al*. 2013) en condiciones de planctónicas y biopelícula durante 10, 18, 24 o 48 horas. Las células en 6 ml del cultivo se centrifugaron y se lavaron con búfer TE (Tris HCl 10 mM, EDTA 1 mM), pH 8,0, los paquetes celulares obtenidos se almacenaron a -70 ºC hasta su uso. El ARN total se extrajo de los paquetes celulares resuspendidos en 550 µl de buffer TE más lisozima 200 µg/ml y se

lisaron por sonicación al 30 % durante 5 segundos (Hielscher UP50H - Compact Lab Homogenizer, 12623 Berlín Alemania). La suspensión celular se mantuvo a 37 °C con agitación durante 35 minutos, se adicionaron 50 µl de SDS al 10% (p/v) más 400 µl de bromuro de cetil trimetilamonio (CTAB 2% en NaCl 2M; CTAB, Sigma-Aldrich). Se mezcló y la suspensión se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se trató con 150 µl de fenol-Tris-HCl, pH 8.0. El ARN presente en el sobrenadante se lavó 4 veces con 400 µl de cloroformo / alcohol isoamílico (v/v 24:1). Posteriormente, el ARN se precipitó con etanol y se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 minutos. El ARN se resuspendió en 50 µl de agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC, Sigma-Aldrich) a una concentración de 0.1% y se almacenó a -70 °C hasta su uso. La concentración y la calidad del ARN se determinaron usando un espectrofotómetro EON-BioTeK (BioTek Instruments Inc.). La integridad del ARN se confirmó en geles de agarosa al 0.8%. Inmediatamente después de la extracción del RNA, se eliminó el DNA genómico de cada muestra de RNA utilizando el sistema comercial TURBO DNA-free Kit (Ambion, Life technologies). El procedimiento consistió en preparar una mezcla de reacción de 50 µl que incluyó los siguientes componentes: 8 µg de RNA, 5 µl de buffer de la DNasa TURBO 10X, 2 unidades de DNasa TURBO y agua libre de nucleasas. Las mezclas de reacción se incubaron por 30 min a 37 ºC. Posteriormente, se agregaron 5 µl de reactivo de inactivación de la DNasa y se incubaron por 5 min a temperatura ambiente. Los tubos se centrifugaron a 10000 rpm por 2 min y los sobrenadantes, los cuales contenían el RNA, se separaron del reactivo de inactivación de la DNasa. La concentración de cada muestra de RNA se volvió a cuantificar como se indicó anteriormente y la integridad del mismo se verificó por electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. Para corroborar la eliminación del DNA genómico, se realizó la PCR utilizando 200 ng de RNA como molde, 200 ng de DNA genómico como control positivo y los iniciadores 27F y 1492R para amplificar el RNAr 16S. Las reacciones de PCR fueron reamplificadas para corroborar la ausencia de cualquier producto de PCR. La ausencia de cualquier producto de PCR indicó que el DNA genómico se eliminó en su totalidad de las muestras de RNA.

Tabla 4. CONDICIONES DE REACCIÓN DE PCR PUNTO FINAL.

Reactivo	[1X]
Buffer Dream Taq	1.5 µl
Forward	0.2 µl (10 mmol)
Reverse	0.2 µl (10 mmol)
dNTPS	0.5 µl (50 mmol)
Taq Pol	0.3 µl

Templado	2µl (~1 µg)
Agua	10.3 µl
	v*F* = 15 µl

Tabla 5. CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN DE PCR PUNTO FINAL.

Ciclos	Temperatura (ºC)	Tiempo
Primer ciclo. (1 repetición)	94 ºC	4´
Segundo ciclo (30 repeticiones)	94 ºC	30´´
	60.5 ºC	35´´
	72 ºC	20´´
Tercer ciclo (1 repetición)	72 ºC	5´
Mantenimiento	4 ºC	∞

7.3. SÍNTESIS DE cDNA.

La síntesis de ADN complementario (cDNA) se realizó por transcripción inversa utilizando el sistema de síntesis de cDNA, Maxima First Strand (Thermo Fisher Scientific) a partir del ARN obtenido. Se preparó una mezcla de reacción de 25 µL, la cual incluye los siguientes componentes: 2 µg de RNA, 4 µL de la mezcla de reacción 5X (Buffer de reacción, dNTPs y oligonucleotidos aleatorios), 2 µL de transcriptasa reversa (Maxima Enzyme Mix) y agua libre de nucleasas. La mezcla se íncubo a 25 ºC por 30 minutos, 50 ºC por 30 minutos, 65 ºC por 30 minutos y finalmente a 85 ºC por 5 minutos para inactivar la transcriptasa reversa. La concentración del cDNA de cada cepa se cuantificó midiendo la absorbancia a una DO de 260 nm en un espectrofotómetro Eon Microplate (BioTek) equipado con una placa microvolumétrica Take3 (BioTek).

7.4. qPCR.

La cuantificación de la expresión de *cdgD* se llevó a cabo por qPCR utilizando el sistema comercial Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific). Se prepararon mezclas de reacción por triplicado con un volumen final de 20 µl cada una que incluyó los siguientes componentes: 10 µl de Maxima SYBR Green/ ROX qPCR Master Mix (2X), (cuyos componentes incluyen SYBR Green, dNTPs, Taq DNA polimerasa Maxima Hot Start, $MgCl_2$ y buffer de PCR), 0.6 µl de cada oligonucleótido preparado a una concentración de 10 pmol/µl (concentración final de

300 mM de cada uno), 2 µl de cDNA preparado a una concentración de 100 ng/µl (concentración final de 10 ng/µl) y 6.8 µl de agua libre de nucleasas. Para cada par de oligonucleótidos se incluyeron reacciones de PCR sin material genético o con 200 ng/µl de RNA no tratado con transcriptasa reversa como controles negativos. La cuantificación de la expresión de *cdgD* se llevó a cabo mediante el método comparativo ΔC_T ($2^{-\Delta\Delta CT}$) en el que el gen *gyrA* se utilizó como gen de referencia. La RT-qPCR se realizó en un termociclador StepOnePlus (Applied Biosystems) siguiendo el siguiente programa térmico: 95 ºC por 10 minutos, 40 ciclos a 95 ºC por 30 segundos y 60.5 ºC por 30 segundos. Una etapa de curva de disociación (melt curve stage) a 95 ºC por 1 minuto, 60.5 ºC por 1 minuto y 95 ºC por 1 minuto. Los datos se colectaron en la etapa de alineamiento. Los resultados fueron analizados con el programa StepOne (Applied Biosystem). El experimento se realizó tres veces, cada uno con muestras biológicas obtenidas de ensayos independientes. En la figuras complementarias se muestran las gráficas de amplificación de *cdgD* y *gyrA* obtenidas por qPCR.

7.5. DISEÑO DE INICIADORES.

Se realizó un análisis de secuencias nucleotidicas y de dominios de los genes de interés, como el grupo de proteínas hibridas (GGDEF/EAL) presentes en *A. brasilense* Sp.245, para poder identificar los posibles sitios blancos dentro de los cuales se realizaran los iniciadores, para la detección de estos genes mediante PCR y qPCR. Para el diseño, se tomaron condiciones ya reportadas sobre las características de iniciadores para qPCR, las cuales se mencionan a continuación: Tamaño de amplicon de entre 50 a 150 pb, una temperatura media de hibridación Tm de 58 a 65 ºC, un porcentaje de GC de entre 45 a 62%, un tamaño de iniciador de 17 a 25 bases y por ultimo la región blanco debe ser una secuencia única. Tomando en cuenta las características antes mencionadas, se realizó una búsqueda de secuencias internas de los genes de interés, que cumplieran con el último punto de la lista anterior. La búsqueda y el diseño de iniciadores, se realizó, con ayuda de los siguientes programas bioinformáticos: SMART, MIST, NCBI, PROSITE, PFAM y IDT Technologies (oligo designe).

7.6. CONSTRUCCIÓN DE LA FUSIÓN TRANSCRIPCIONAL CROMOSÓMICA EN *A. brasilense* Sp245 (FPDm1).

Para el desarrollo de la fusión transcripcional, se realizó un análisis bioinformático de la región promotora del gen *cdgD*, utilizando diferentes plataformas informáticas como sofberry y bprom. Ya identificada la ubicación del promotor, se diseñaron iniciadores específicos para flanquear el promotor, añadiendo secuencias para las enzimas de restricción *Sna*BI y *Xho*I. Por medio de PCR se amplificó y ligó en el vector de mantenimiento pGEM-T Easy un fragmento de 470 pb río arriba del gen *cdgD*, que

se amplificó previamente con los iniciadores P-cdgD-F/(SnaB) y P-cdgD-R/ (*Xhol*), Tabla 2, clonado en la región 5 'del gen *mCherry,* posteriormente clonado en pGEM-TEasy y generar el plásmido pGEM-pdgcD. Tanto los plásmidos pAZOBR-T7mch como pGEM-pdgcD se digirieron con ***Xho*I** y ***Sna*B1**, seguido de clonación para obtener el plásmido pAZBRpcgdD, que se verificó por PCR y secuenciación. Las construcciones pAZBR-T7mch y pAZBRpcgdD se transformaron posteriormente en la cepa movilizadora *E. coli* S17.1, y las cepas resultantes se transfirieron por conjugación a la cepa *A. brasilense* Sp245 (insertado en el locus neutro de la región cromosómica de *A. brasilense*) para obtener el control y las cepas etiquetadas de mCherry, respectivamente. Estas últimas cepas se usaron en experimentos adicionales para determinar la expresión del gen *cdgD* en diferentes condiciones de crecimiento y en interacción con las raíces de plantas de trigo.

7.7. ENSAYOS DE BIOPELÍCULA.

Los cultivos se crecieron toda la noche en medio minino NFB* adicionado con KNO_3 o NH_4Cl como fuente de nitrógeno, con una DO a 600 nm de 0.01. Se cultivaron en agitación (120 rpm) a 30 °C hasta que alcanzaron una DO a 600 de 1.2 - 1.4, como lo describió (Arruebarrena *et al.* 2012). Los cultivos se diluyeron a DO 600 de 0.01 y se inocularon 3 ml en cada uno de los pocillos por cepa en una placa de 24 pocillos. Las placas se incubaron en cámara húmeda a 30 °C durante 48 horas. Cada pocillo se enjuagó con agua, y la biomasa adherente se tiñó por inmersión durante 30 min con 0.5 ml de una solución de cristal violeta (CV) al 0.5% (p/v). El CV adsorbido se solubilizó en 2 ml de ácido acético al 33%, y la absorbancia de esta solución se determinó a 590 nm en un lector de microplacas multi - detección (EONTM Microplate Spectrophotometer Biotek Instrument). Los datos obtenidos se normalizaron con la determinación de proteína total con el ensayo de reactivo Bradford (Sigma-Aldrich Chemical, St. Louis, Missouri, EE. UU.). Los datos se presentan normalizados a los valores de mg / proteína obtenidos dentro de cada experimento. Las cepas: *A. brasilense* Sp245 silvestre, *A. brasilense* 12-A (mutante), *A. brasilense* C-56A (mutante complementada), y mutante con el vector vacío *A. brasilense* C-40A se evaluaron en tres experimentos independientes, cada uno de los cuales incluyó tres réplicas técnicas.

7.8. CONDICIONES DE CRECIMIENTO EN PLANTAS, DE LAS CEPAS DE *A. brasilense*, INOCULACIÓN Y VISUALIZACIÓN DE COLONIZACIÓN POR MICROSCOPÍA DE ESCANEO LÁSER CONFOCAL (CLSM).

Los experimentos con plantas se llevaron a cabo esencialmente como describió (Ramírez-Mata *et al.* 2018) utilizando semillas de la variedad de trigo (*Triticum aestivum*) 'Nana' y tierra obtenida del Campo Agrícola Experimental del Valle de México (INIFAP). Las semillas se esterilizaron superficialmente con hipoclorito de sodio al 1%

(v/v) con agitación (60 rpm) durante 30 minutos después de enjuagar con agua estéril, después las semillas se sumergieron en 40 mL de una solución que contenía 150 µg/ mL de cicloheximida 250 µg/mL de estreptomicina, 20 µg/mL de Tc y 150 µg/mL de fluconazol, con agitación a 60 rpm durante 10 minutos. Se colocaron 10 a 15 semillas estériles en placas de medio agar - agua para su germinación, se cubrieron con papel aluminio y se dejaron por 3 días en obscuridad a 30 ºC. Al final del proceso de desinfección, las semillas se enjuagaron cinco veces con agua estéril desmineralizada durante 10 minutos. Con respecto a la inoculación de las semillas, las cepas de *A. brasilense* Sp245 (pMP2449-5), 12-A (pMP2449-5), C56A (pMP2449-5) y C40A (pMP2449-5) se cultivaron en medio K-malato durante la noche a 30 °C con agitación (150 rpm). Se resuspendieron en medio K-malato 10^9 ufc/ml (OD 600 = 1.2). La suspensión se diluyó 100 veces en medio NFB* esterilizado a una densidad final de aproximadamente 5×10^6 - 5×10^7 UFC/ml. Las plántulas inoculadas se mantuvieron en tubos con 15 mL de solución hidropónica de Hoagland con NH_4NO_3 (4 mM) en la cámara ambiental durante 7 días en un ciclo de día y noche (14 horas de luz a 24 °C y 10 horas de oscuridad a 16 °C) con una humedad del 80% de acuerdo a (Ramírez-Mata *et al.* 2018). A los 7 días después de la inoculación, se determinaron las bacterias colonizadoras mediante análisis por microscopía, se cortaron las muestras de raíz, se humedecieron con agua esterilizada, se colocaron en porta objetos de vidrio con PBS y se cubrieron con cubre objetos de vidrio. Se obtuvieron imágenes utilizando un Nikon C2 + CLSM (Nikon, Tokio, Japón) equipado con un objetivo CFI Plan Apo Lambda 20X y dos láseres de helio-neón para la excitación del fluoróforo mCherry a longitudes de onda de 540 nm y 650 nm y un láser de argón para excitación de autofluorescencia a 488 nm. La morfología celular y la localización de las cepas de *A. brasilense* Sp245 (pMP2449-5), 12-A (pMP2449-5), C56A (pMP2449-5) y C40A (pMP2449-5) se evaluaron en las raíces para evaluar la presencia de bacterias y biopelículas.

7.9. CONDICIONES DE CRECIMIENTO EN PLANTAS, DE LAS CEPAS DE *A. brasilense*, INOCULACIÓN Y VISUALIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE *cdgD* POR MICROSCOPÍA DE ESCANEO LÁSER CONFOCAL (CLSM).

Los experimentos con plantas se llevaron a cabo esencialmente como describió (Ramírez-Mata *et al.* 2018) utilizando semillas de la variedad de trigo (*Triticum aestivum*) 'Nana'. Las semillas se esterilizaron superficialmente con hipoclorito de sodio al 1% (v/v) con agitación (60 rpm) durante 30 minutos después de enjuagar con agua estéril, después las semillas se sumergieron en 40 mL de una solución que contenía 150 µg/ mL de cicloheximida 250 µg/mL de estreptomicina, 20 µg/mL de Tc y 150 µg/mL de fluconazol, con agitación a 60 rpm durante 10 minutos. Al final del proceso de desinfección, las semillas se enjuagaron cinco veces con agua estéril desmineralizada durante 10 minutos. Se colocaron 10 a 15 semillas estériles en placas de medio agar -

agua para su germinación, se cubrieron con papel aluminio y se dejaron por 3 días en obscuridad a 30 ºC. Con respecto a la inoculación de las semillas, las cepas de *A. brasilense* (pAZBRT7mChe) y FPDm1 se cultivaron en medio K-malato durante la noche a 30 °C con agitación (150 rpm). Se resuspendieron en medio K-malato 10^9 ufc/ml (DO 600 = 1.2). La suspensión se diluyó 100 veces en medio NFB* inoculando a una densidad final de aproximadamente 5×10^6 - 5×10^7 UFC/ml. Las plántulas inoculadas se colocaron en placas Petri con fondo de vidrio FluoroDish con solución semisolida hidropónica de Hoagland con NH_4NO_3 (4 mM) en la cámara ambiental con un ciclo de día y noche de (14 horas de luz a 24 °C y 10 horas de oscuridad a 16 °C) con una humedad del 80% de acuerdo a (Ramírez-Mata *et al.* 2018). A partir de las 10 horas post inoculación, se determinó la expresión de *cdgD* mediante análisis por microscopía, se colocaron las placas FluoroDish con las plantulas inoculadas al microscopio para su análisis. Se obtuvieron imágenes utilizando un Nikon C2 + CLSM (Nikon, Tokio, Japón) equipado con un objetivo CFI Plan Apo Lambda 20X y dos láseres de helio-neón para la excitación del fluoróforo mCherry a longitudes de onda de 540 nm y 650 nm y un láser de argón para excitación de autofluorescencia a 488 nm. La morfología celular y la localización de las cepas de *A. brasilense* (FPDm1 y pAZBRT7mCH) se evaluaron en las raíces para evaluar la expresión de *cdgD* en interacción con las raíces de las plantas.

7.10. HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS PARA EL ANÁLISIS DE LA PROTEÍNA CdgD.

La secuencia de la proteína CdgD de *A. brasilense* Sp245 se recuperó de la base de datos NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein; número de acceso; CCC97824.1). Para la anotación inicial utilizando el servidor de tecnología de subsistema (RAST). Las predicciones del dominio de proteínas se adquirieron utilizando SMART (Letunic *et al*., 2015; http://smart.embl-heidelberg.de), HMMER (Finn et al., 2015) y PROSITE (De Castro *et al*. 2007). Para predecir e identificar regiones transmembrana, se utilizaron las herramientas TMHMM (Krogh *et al.* 2001) y TMpred (Hofmann y Stoffel, 1993). La visualización de las hélices transmembranales se realizó con el programa HeliQuest (Gautier *et al*. 2008). Las predicciones de estructura secundaria y tridimensional se realizaron utilizando los programas Phyre2 e I-Tasser para detectar la organización del dominio y para localizar la plantilla adecuada para los dominios CHASE y PAS-GGDEF-EAL (Yang *et al.* 2015). Se obtuvieron modelos tridimensionales de CHASE (residuos 64-327) y PAS-GGDEF-EAL (residuos 378-946) utilizando los paquetes Phyre2 e I-Tasser y se analizaron con el software Chimera (Pettersen *et al.* 2004), utilizando siguientes estructuras cristalinas como plantillas estructurales: el dominio CHASE de histidina quinasa 4 (AHK4) de *Arabidopsis thaliana* (Código PDB: 3T4J) (Hothorn *et al*.

2012) y los dominios PAS-GGDEF-EAL de la proteína RbdA de *Pseudomonas aeruginosa* (PDB Código: 5XGB), (Liu *et al.,*2018).

7.11. CUANTIFICACIÓN DE di-GMPc.

La cepas *A. brasilense* Sp245 (pFY4535), 12-A (pFY4535), C56A (pFY4535) y C40A (pFY4535), fueron crecidas en medio NFB* con 30 µg/ml de Gm e incubadas por 24, 48 y 72 horas a 30 ºC. Las cepas fueron fijadas a la superficie de un cubre objetos y se sellaron con un tapón de agar al 1%. Las imágenes de las células se recogieron a las 24, 48 y 72 horas después de la inoculación utilizando un microscopio Nikon TE2000U equipado con un objetivo 100X (objetivo de inmersión en aceite). El RFI representa la relación entre las intensidades de fluorescencia de TurboRFP y AmCyan y es directamente proporcional a los niveles de c-di-GMP.

7.12. CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE *cdgD* POR MICROSCOPÍA CONFOCAL.

Para la cuantificación de la expresión de *cdgD*, por medio de la cantidad de fluoresencia, se inocularon cepas de *A. brasilense* (pAZBRT7mChe) y FPDm1 en medio minino NFB* adicionado con KNO_3 o NH_4Cl como fuente de nitrógeno, con una DO a 600 nm de 0.01. Se cultivaron en agitación (120 rpm) a 30 °C hasta que alcanzaron una DO a 600 de 1.2 - 1.4, como lo describió (Arruebarrena *et al.* 2012). Los cultivos se diluyeron a DO 600 de 0,01 y se inocularon en placas Petri con un volumen de 3 mL en cada placa. Las placas se incubaron en cámara húmeda en condiciones estáticas a 30 °C y se comenzó a evaluar la expresión a las 10, 18, 24 y 48 horas post inoculación utilizando un Nikon C2 + CLSM (Nikon, Tokio, Japón) equipado con un objetivo CFI Plan Apo Lambda 20X y dos láseres de helio-neón para la excitación del fluoróforo mCherry a longitudes de onda de 540 nm y 650 nm y un láser de argón para excitación de autofluorescencia a 488 nm.

7.13. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los datos se analizaron utilizando el programa Sigma-Plot. La prueba t de Student se utilizó para determinar si la mutante afectó significativamente a todos los fenotipos probados y la expresión del gen *cdgD* en las condiciones de crecimiento analizadas, así como los ensayos de colonización.

7.14. MÉTODO DdCt.

El método DdCt fue uno de los primeros métodos utilizados para calcular los resultados de la PCR en tiempo real. A diferencia de la curva estándar y del método Pfaffl, DdCt es un método de aproximación y reduce mucho el esfuerzo experimental, aparte de ser fácil de implementar y se obtienen resultados de manera similar a otros métodos de no aproximación.

8. RESULTADOS.

8.1. CLASIFICACIÓN DE CdgD.

Para comenzar con el análisis del gen *cdgD* que codifica para una proteína híbrida CdgD, se realizó un análisis bioinformático para poder clasificar a esta proteína, con base en la capacidad catalítica de sus dominios DGC/PDE. Para ello se realizó un alineamiento de la secuencia nucleotidica de los dominios GGDEF y EAL de la proteína CdgD, con proteínas con dominios similares que ya han sido probados en su actividad catalítica y que ya se encuentran cristalizados, para poder evaluar motivos importantes para la actividad catalítica de estos dominios. Para el análisis de dominio GGDEF de CdgD se comparo con los dominios GGDEF de las proteínas WspR de *P. aeruginosa* y PleD de *C. crescentus*. Aunado a estas proteínas se compararon los dominios GGDEF de la misma proteína CdgD presente en otros genomas de *Azospirillum*; (BAI76528.1 de *Azospirillum* B510, WP_045584990 de *A.thiophilum,* WP_014250090 de *A.lipoferum* 4B*,* WP_063635905 de *A.humicireducens,* WP_063922630 de *A.brasilense* Az39 y WP_051140186 de *A.brasilense* Sp7), los resultados se muestran en la figura 21.

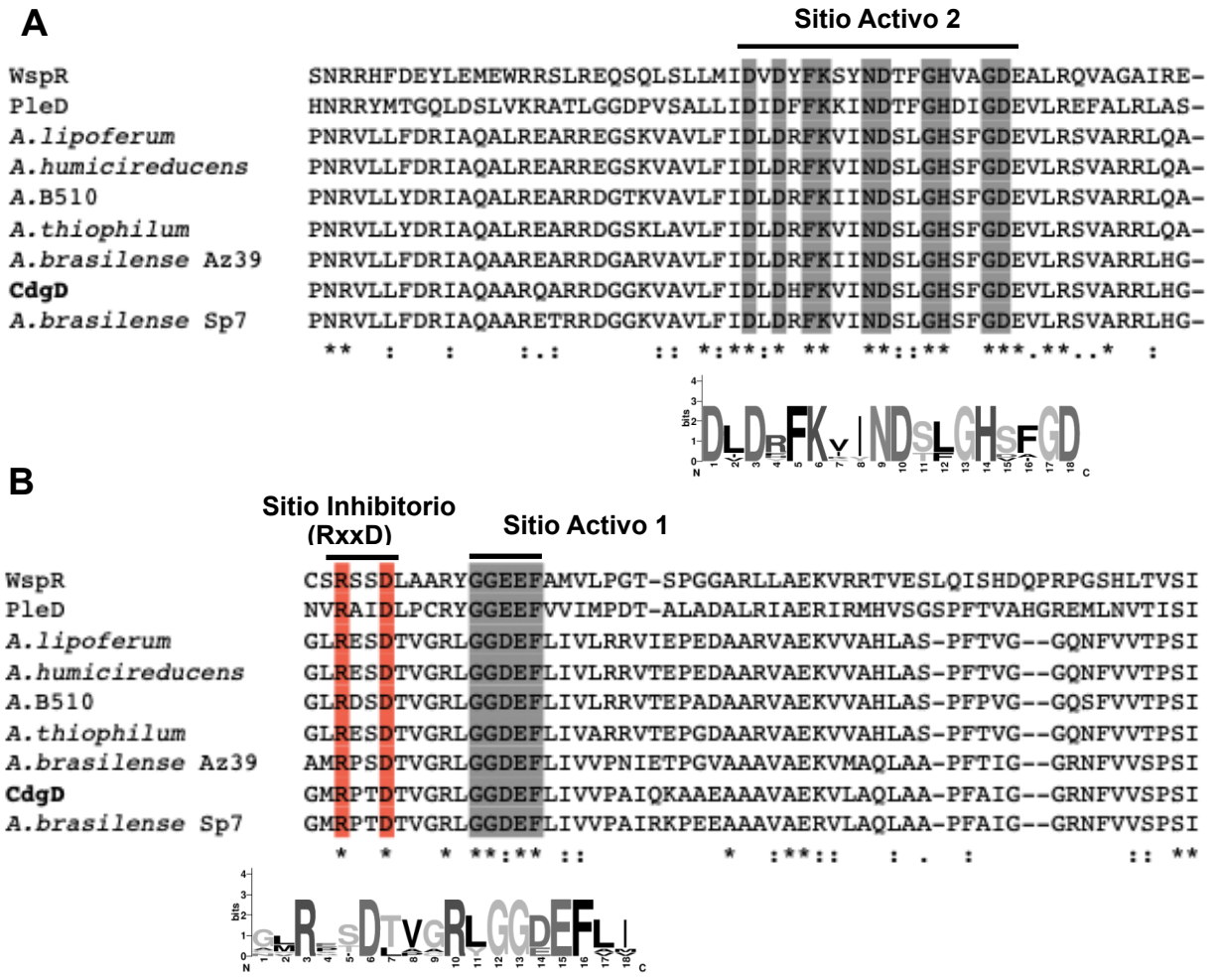


Figura 21. Alineamientos de secuencias nucleotidicas de dominios GGDEF de diversas proteínas **(A)** Alineamiento correspondiente al motivo del sitio activo 2 **(B)** Alineamiento correspondiente al sitio inhibitorio y sitio activo 1 del dominio GGDEF.

Para el análisis del dominio EAL de CdgD, se comparó con el dominio EAL de la proteína RocR de *P. aeruginosa*, al mismo tiempo se realizó una comparación con diferentes genomas de *Azospirillum,* los resultados se muestran en la figura 22.

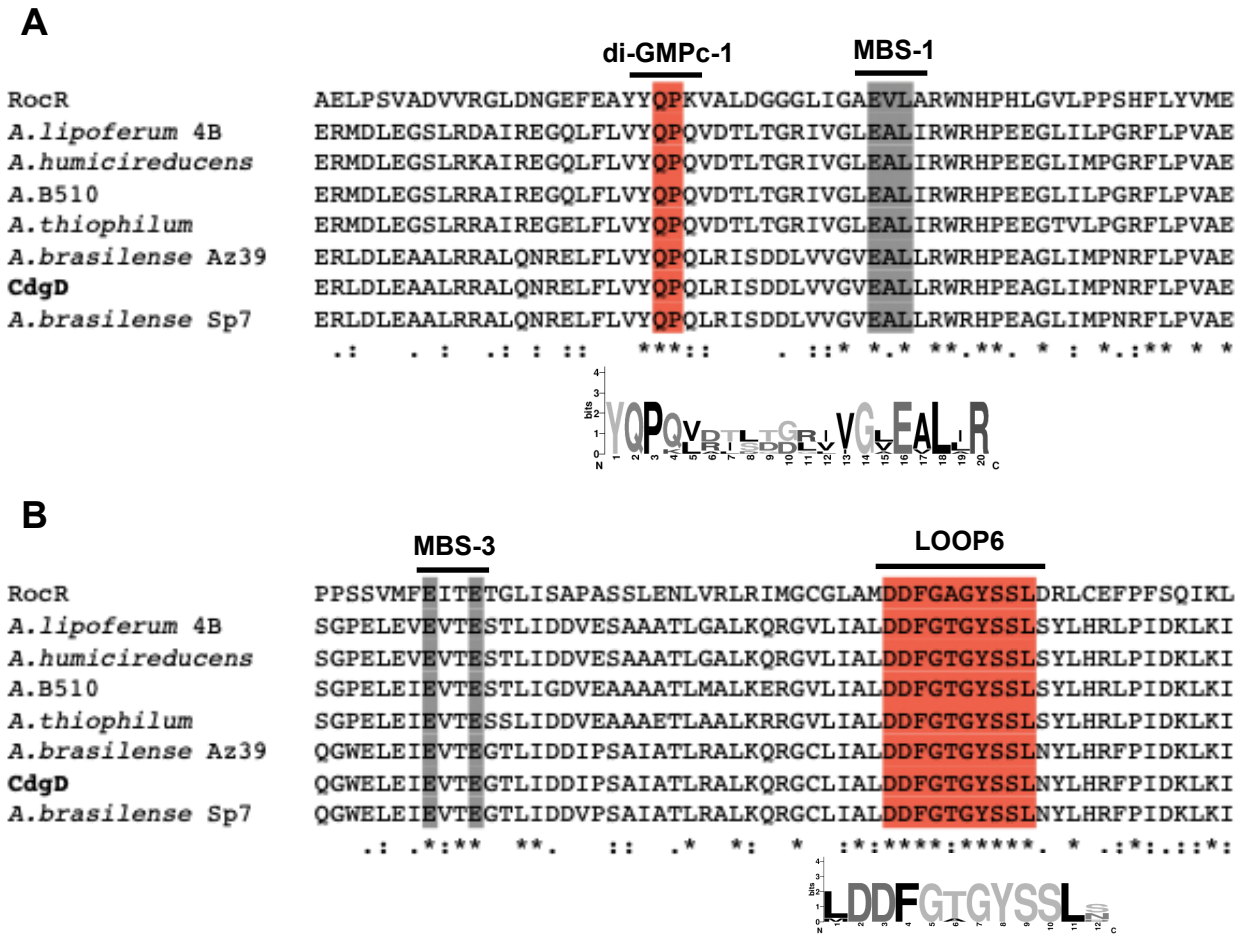


Figura 22. Alineamientos de secuencias nucleotidicas de dominios EAL de diversas proteínas, realizados con el programa CLUSTAL X. **(A)** Alineamiento correspondiente al motivo del sitio activo **(B)** Alineamiento correspondiente al LOOP6.

Como se observa en las figuras 21 y 22, los motivos importantes para poder llevar a cabo una actividad catalítica, ya sea DGC o PDE, se encuentran conservados en la proteína CdgD, por lo cual, con estos resultados podemos confirmar que esta pertenece a la Clase I de la clasificación de las proteínas híbridas, debido a que los dominios GGDEF y EAL de CdgD, pudieran ser cataliticamente activos. De manera adicional, se realizó el mismo análisis a las proteínas híbridas restantes, presentes en *A.brasilense* Sp245, (CCC97222.1, CCC99238.1, CCD03331.1, CCC96788.1) CCC99416.1, CCC97047.1, CCD01243.1, CCD00829.1 y CCD03171.1), cuyos resultados se muestran en la sección de Anexos 1. Es importante mencionar que en este grupo de proteínas híbridas, no encontramos alguna que pertenezca a la Clase III, indicando que en todas, al menos un dominio pudiera encontrarse catalíticamente

activo y por ende la proteína en general puede presentar alguna funcionalidad de DGC o PDE dentro de la bacteria.

8.2. Dominios auxiliares de CdgD.

Para poder tener una visión completa de la proteína CdgD, se realizó un análisis de los dominios auxiliares que esta presenta en su estructura proteica, como se observa en la Figura 23, CdgD presenta varios dominios auxiliares, los cuales resultan de interés, para poder comprender mejor la función que esta proteína pudiera estar desempeñando en la bacteria.

Figura 23. Estructura proteica de CdgD. (SMART©)

CdgD presenta varios dominios en su estructura proteica, los cuales presentan distintas funciones, comenzando con dos dominios transmembranales que se encuentran flanqueando al dominio CHASE, un dominio PAS (Per-Arnt-Sim), los cuales se han descrito frecuentemente en proteínas implicadas en señalización por su capacidad de unir ligandos tipo hemo que a su vez captan oxígeno, óxido nítrico, o bien de ligar compuestos tales como: FAD (Taylor & Zhulin, 1999; Qi et al. 2009). Cuenta también con un dominio CHASE (cyclases/histidine kinases associated sensing extracellular), el cual siempre se localiza en regiones extracelulares o periplásmicas, ubicado exclusivamente entre regiones transmembranales (Mougel & Zhulin, 2001; Heyl *et al.* 2007), este dominio se encuentra en receptores transmembranales de bacterias y plantas (Pas *et al.* 2004) y se predice que une ligandos de bajo peso molecular como péptidos y la fitohormona citocinina (Pas *et al.* 2004; Ramírez-Mata *et al.* 2018; Hothorn *et al*. 2011), se ha descrito su función en dos proteínas de señalización que controlan el desarrollo en la amoeba *Dictyostelium discoideum*; la histidin cinasa DhkA y la adenil ciclasa ACG. La cinasa DhkA detecta un pequeño péptido, el cual es liberado por las células en tallo, y desencadena la esporulación, en tanto que la cinasa ACG controla la germinación de las esporas de *Dictyostelium*. Este dominio se encuentra también en una histidina cinasa de *Arabidopsis thaliana*, la cual regula la morfogenesis vascular de la raíz (Mougel & Zhulin, 2001¸ Hothorn *et al*. 2012). y por ultimo presenta dominios DGC y PDE, los cuales presentan regiones, con motivos GGDEF y EAL respectivamente conservados. El dominio GGDEF consta de motivos conservados incluyendo el sitio catalítico (D/E) y otros residuos involucrados en la unión y coordinación de catión divalente, también se identificó un motivo que actúa como

regulador de la función DGC, denominado sitio de inhibición, el cual presenta un motivo RxxD conservado. Mientras que el dominio EAL presenta los motivos necesarios requeridos para la unión de cationes divalentes, también se identificó una estructura denominada LOOP6, la cual controla la dimerización y la unión del sustrato, necesarios para la actividad catalítica. Para poder visualizar mejor la organización global de CdgD, realizamos un modelo global de esta proteína con todos sus componentes, el cual se muestra a continuación.

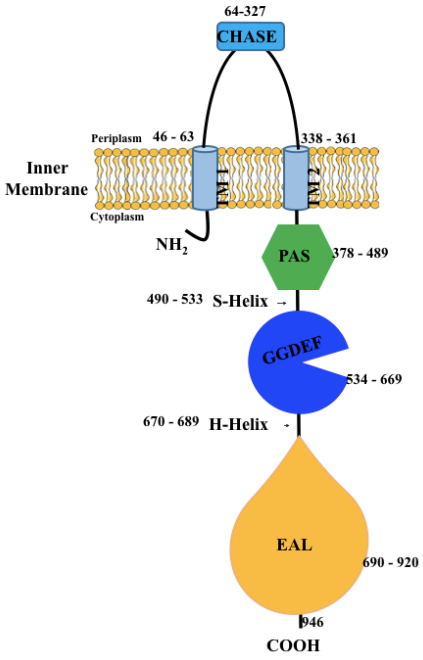


Figura 24. Representación grafica de los dominios presentes en la estructura proteica de CdgD. (SMART©)

Como se observa en la figura 24, están esquematizados todos los componentes presentes en la proteína CdgD, es acá en donde vemos que el dominio PAS esta jugando un papel importante en las modificaciones estructurales, debido a que se encuentra conectando el dominio CHASE que se encuentra en el periplasma y por otra parte esta unido a los dominios catalíticos GGDEF y EAL, posiblemente este dominio este funcionando como un regulador de la función catalítica de esta proteína, esto al estar detectando señales intracelulares o debido a una modificación del dominio CHASE que provoque alteraciones en la estructura de PAS, derivando en la actividad ya sea de DGC o PDE. Esto es solo una hipótesis sobre la regulación de la función de esta proteína, la cuál debe ser ser confirmada por medio de ensayos en trabajos futuros.

8.3. DISEÑO DE INICIADORES.

Con el objetivo de poder realizar ensayos de qPCR de manera correcta, es necesario un excelente diseño de iniciadores para poder evaluar la expresión de *cdgD.* Las características de los iniciadores se han descrito en la sección de métodos, sin embargo, la búsqueda de regiones únicas de *cdgD*, se complica un poco, debido a la similitud en su estructura con otros genes que codifican tanto para proteínas hibridas como de dominio único (Figura 17). Es por ello que se decidió descartar la región común de *cdgD* que comparte con los demás genes, las cuales fueron los dominios GGDEF y EAL, quedando las regiones de los dominios accesorios para dirigir la búsqueda de regiones únicas. En la siguiente figura se representa la región de *cdgD* en donde se realizo el diseño de iniciadores.

A

B

Secuencia nucleotidica blanco. (Inició L50 - Final T140, Tamaño - 270pb).

5´- CTTGCTGGCCGCGCTTCTCCTGACCGCCCTGGCTTGGCACGACACCCGGCAGCG
CGTCGCCGCGGACGCCGAAAGCCGCTTCGCCCTGCGGGTGGAGGAACTGCACC
GCCGGTTCGAGAACCAGATCCAGGTCTATGTTCAGGTGACGCGCTCCGCCGCCGC
CCTGTTCACCGCCTATCCGGAGGTGAAACGCACGGAATGGAACCGCTTCGTGGAC
GGGCTGCACCTCGCGGAGCGCTTCCCGGGCATCACCGCCGTCGCCTTCGCACG - **3´**.

C

	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
☑	Azospirillum brasilense Sp245 chromosome	499	499	100%	3e-137	100.00%	CP022253.1
☑	Azospirillum brasilense Sp245 main chromosome complete genome	499	499	100%	3e-137	100.00%	HE577327.1
☑	Azospirillum brasilense strain Cd chromosome 1, complete sequence	407	407	99%	2e-109	94.03%	CP033318.1

Figura 25. Análisis de la secuencia nucleotidica blanco para el diseño de iniciadores de *cdgD*. **(A)** Región blanco de la búsqueda de iniciadores **(B)** Secuencia nucleotidica de la región blanco **(C)** BLASTn de la región blanco.

Como se observa en los resultados del análisis anterior, logramos encontrar una región única dentro de *cdgD*, la cual se encuentra en entre la primera región transmembranal y el dominio CHASE flanqueada por los aminoácidos L50 y T140, como se observa en

la figura 25 A. Presenta un tamaño de 270 pb (Figura 25 C) y lo principal, se trata de una región única en el genoma de *A.brasilense* Sp245 como lo demuestran los resultados del BLASTn (Figura 25 C). Dentro de esta región se realizó la búsqueda de los iniciadores para la identificación de *cdgD*, los cuales fueron los siguientes qRT-cdgDF y qRT-cdgDR (Tabla 3), el tamaño de amplicón esperado es de 85 pb. De forma adicional se realizó el mismo análisis para los 9 genes restantes de las proteínas híbridas de *A.brasilense* Sp245, los resultados se muestran en la sección de Anexos 2.
Una vez concluidos los análisis bioinformáticos necesarios de los iniciadores, se realizaron diversos ensayos de PCR punto final, para determinar las condiciones optimas de trabajo, en las tablas 4 y 5 de la sección de métodos, se muestran las condiciones estandarizadas de reacción de la PCR. En la figura 26 se muestra los resultados de una PCR con las condiciones estandarizadas de reacción, el cual se realizó utilizando DNA genómico.

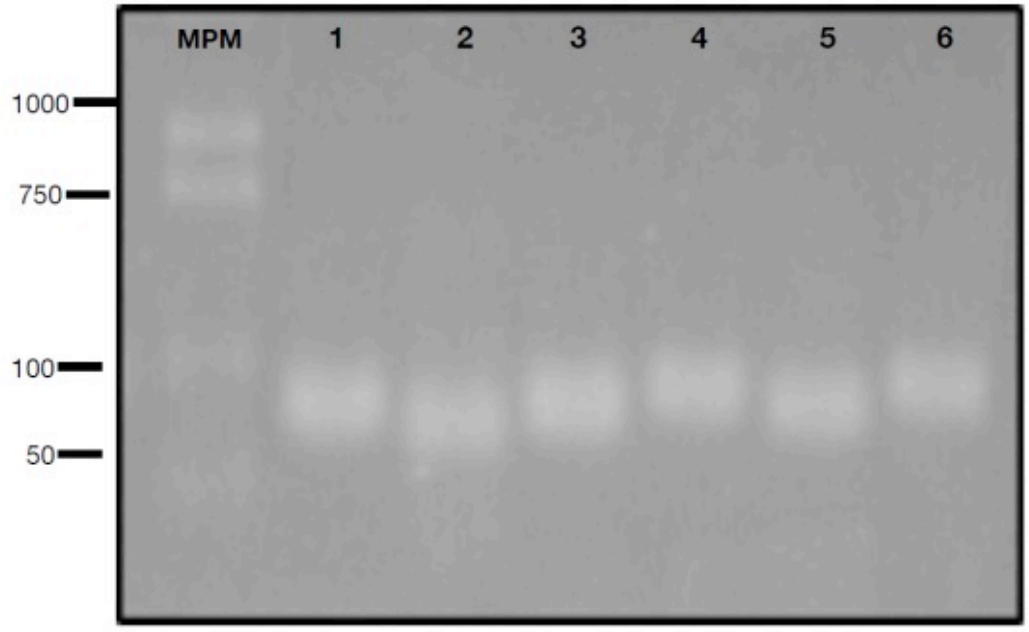
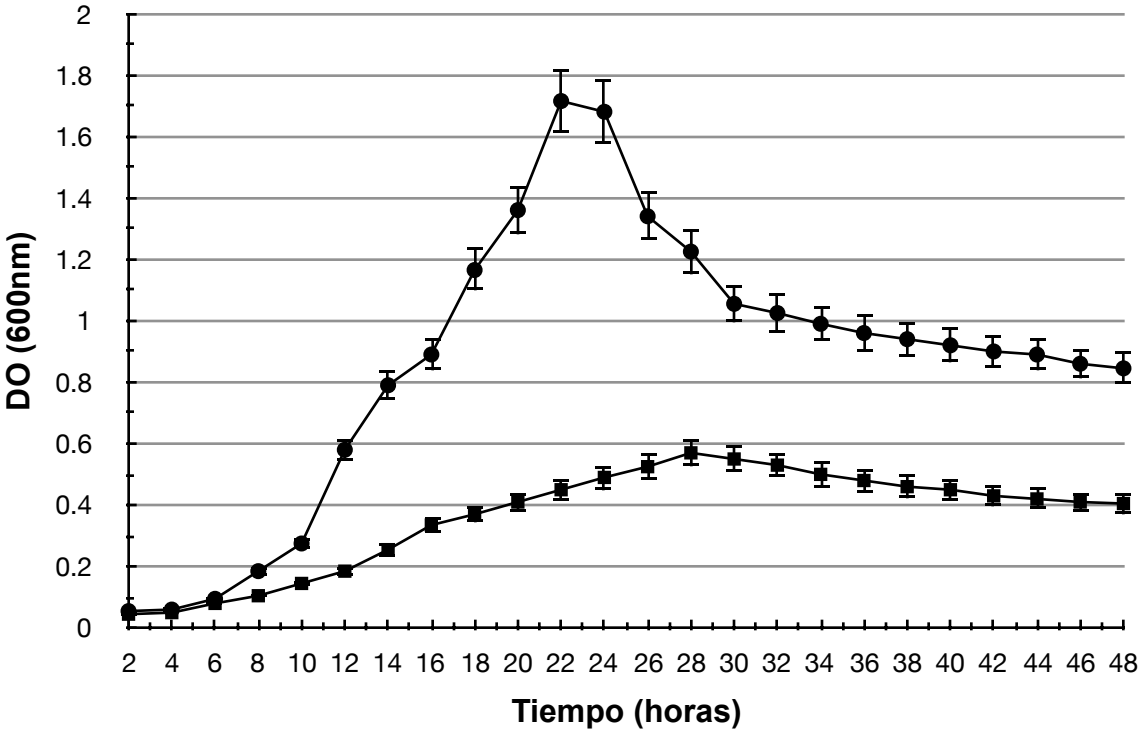


Figura 26. Electroforetograma en geles de agarosa al 3 % carril: **(MPM)** Marcador de peso molecular PB **(1)** CCD03171.1, **(2)** CCC99416.1, **(3)** CCC97222.1, **(4)** CCC97047.1, **(5)** *cdgD* y **(6)** CCC96788.1

En el carril 5 de la figura anterior observamos el amplicón correspondiente a *cdgD*, en el cual no presenta amplificaciones inespecíficas y el tamaño de amplicón es el esperado, por lo cual nos esta confirmando que tanto el diseño de iniciadores y las condiciones de reacción fueron correctas. Con estas condiciones de trabajo estandarizadas, se procedió a realizar ensayos de RT-PCR.

8.4. RT-PCR.

Con el objetivo de poder confirmar que el gen *cdgD* se está expresando en *A.brasilense* Sp245, se realizó un ensayo de RT-PCR. Previo a realizar este ensayo se determinaron los tiempos así como también las condiciones en las cuales será evaluada la expresión de *cdgD.* Para ello se realizaron curvas de crecimiento midiendo densidad óptica (DO) del cultivo, observando el crecimiento de *A.brasilense* Sp245 en condiciones de formación de biopelícula y con agitación, en medio mínimo NFB modificado (NFB*). En la siguiente gráfica se presentan los resultados de tres ensayos independientes de las curvas de crecimiento.



Grafica 1. Curvas de crecimiento de *A. brasilense* Sp245, en medio NFB*, en matraz de 150 ml de medio de cultivo 53 % aire 47% medio. (■) Condiciones de formación de biopelícula (●) En condiciones de agitación.

En la grafica 1 observamos que existen diferencias significativas en la cantidad de DO de los cultivos, en condiciones de crecimiento diferentes, por lo cual se decidió evaluar la expresión de *cdgD* en ambos casos a las 10 horas, que es cuando en ambas gráficas comienzan su fase exponencial y a las 48 horas que de acuerdo a las gráficas ambos cultivos se encuentran en fase estacionaria o fase de detención del crecimiento. Para corroborar que las bacterias han cambiado de estilo de vida, al pasar de un estilo de vida móvil o planctónica a un estado de vida sésil, se realizaron observaciones al

microscopio en los tiempos seleccionados de 10 y 48 horas, las imágenes obtenidas se muestran a continuación.

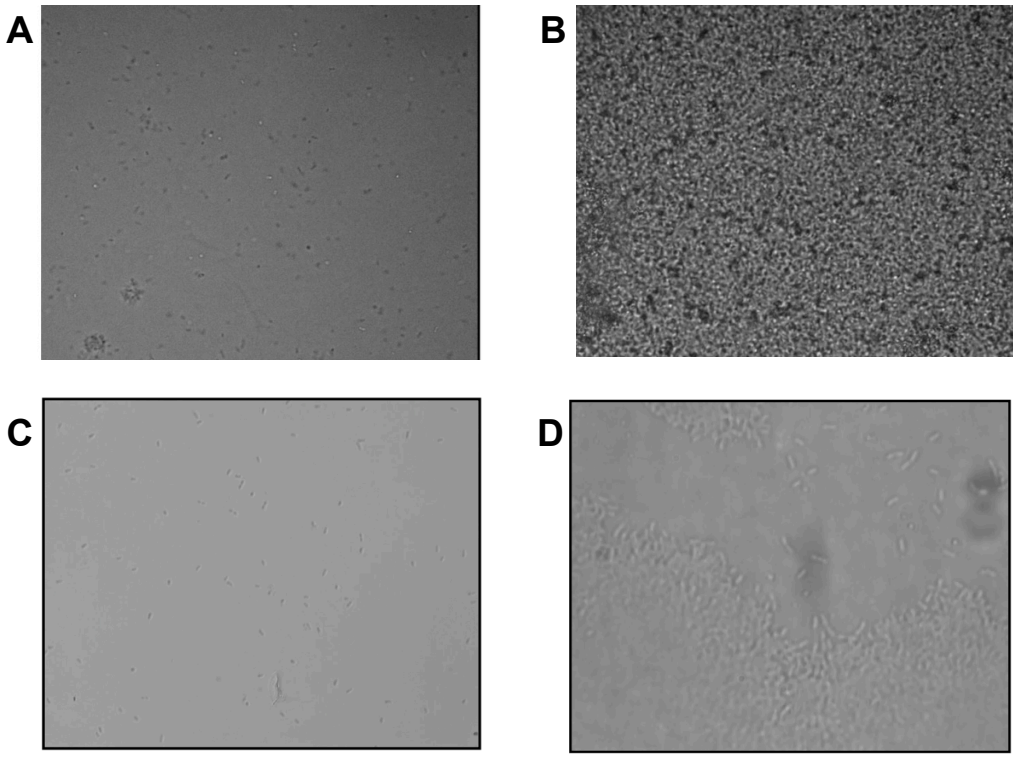


Figura 27. Imágenes al microscopio 60 x, de cultivos de *A. brasilense* Sp245, bajo diferentes condiciones de formación de biopelícula **(A,B)** 10 y 48 horas de cultivo en condiciones de crecimiento estáticas **(C,D)** 10 y 48 horas de cultivo en condiciones de crecimiento con agitación.

Como se observa en las imágenes anteriores, las bacterias se encuentran en estilos de vida diferentes, en ambas condiciones de crecimiento a las 10 horas las bacterias se encuentran móviles mientras que a las 48 horas estas se encuentran formando biopelícula, la bacteria es inmóvil, la mayoría de las células se observaron en forma de quisto y en agrupamientos (datos no presentados, observación al microscopio óptico), en la sección de Anexos 3 se presentan vínculos a videos de los cultivos.

Una vez establecidos los tiempos de extracción de RNA, se procedió a realizar el ensayo RT-PCR, para identificar inicialmente si estos genes se están expresando bajo estas condiciones de crecimiento y en los tiempos determinados anteriormente. La extracción de RNA y su posterior síntesis de cDNA se llevaron a cabo respecto a los protocolos descritos en la sección de métodos. A continuación se presentan los resultados de los ensayos de RT-PCR, de manera adicional se incluyeron al ensayo el resto de los genes correspondientes al grupo 1 de las proteínas híbridas de

A.brasilense Sp245, así también los genes normalizadores *glyA* y *gyrA* descritos por (McMillan *et al* 2014), los cuales serán utilizados en ensayos posteriores de qPCR.

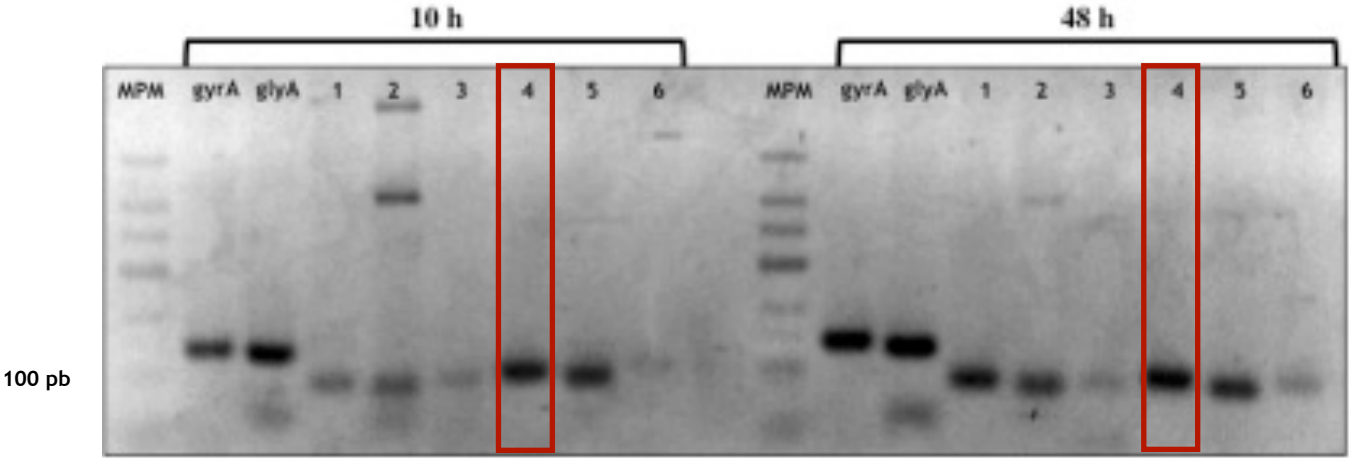


Figura 28. Electroforetograma en geles de agarosa al 3 % correspondiente al RT-PCR de los genes pertenecientes al grupo I, tanto a 10 h y 48 horas. ***gyrA***, ***glyA***, **(1)** CCC97222.1, **(2)** CCC99416.1, **(3)** CCC97047.1, **(4)** *cdgD*, **(5)** CCD03171.1 y **(6)** CCC96788.1. Realizado en medio NFB* en condiciones de formación de biopelícula.

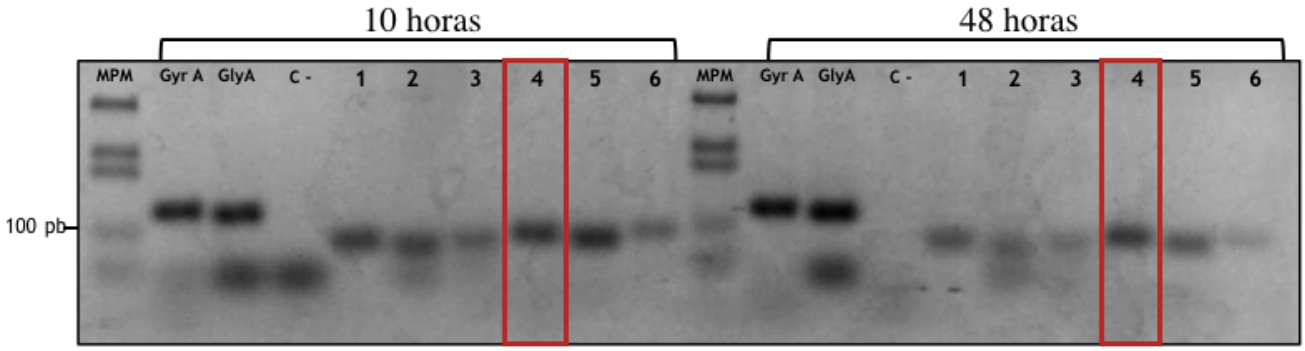


Figura 29. Electroforetograma en geles de agarosa al 3 % correspondiente al RT-PCR de los genes pertenecientes al grupo I, tanto a 10 h y 48 horas. ***gyrA***, ***glyA***, **(1)** CCC97222.1, **(2)** CCC99416.1, **(3)** CCC97047.1, **(4)** *cdgD*, **(5)** CCD03171.1 y **(6)** CCC96788.1. Realizado en medio NFB* en condiciones de agitación.

En las figuras 28 y 29 se observan los resultados del ensayo RT-PCR correspondiente a la expresión de los genes del grupo 1, en condiciones estáticas o de formación de biopelícula y en condiciones de agitación. Los datos obtenidos en este ensayo indican que, tanto a las 10 horas como a las 48 horas, está presente el amplicón correspondiente a *cdgD* (carril 4) y por ende se encuentra expresando bajo estas condiciones. De manera interesante, este ensayo demostró que no solo *cdgD* se esta expresando, sino también el resto de genes del grupo 1 se están expresando bajo estas condiciones. La obtención de estos resultados fueron de gran relevancia para el desarrollo de esté trabajo, debido a que nos brindó la evidencia de que *cdgD* se esta expresando y por consiguiente la bacteria en algún momento lo está utilizando.

8.5. BÚSQUEDA E IDENTIFICACIÓN DEL PROMOTOR DE *cdgD*.

Previo a realizar los ensayos de qPCR se realizó un análisis bioinformático para la localización e identificación del promotor de *cdgD*, el cual será utilizado para la construcción de una fusión transcripcional. Para ello se analizó el contexto genético mediante el programa RAST, del locus dónde se encuentra el gen *cdgD*. Con este análisis se observó que *cdgD* se encuentra en una región con 4 genes que presentan la misma orientación aparte de presentar regiones intergénicas cortas entre ellos (Figura 30). **1.-** RFB (ribose-phosphate pyrophosphokinase), **2.-** MBL(metallo-Beta-Lactamase), **3.-** PH5 (hypothetical protein) y **4.-** AZOBR_100210 (*cdgD*).

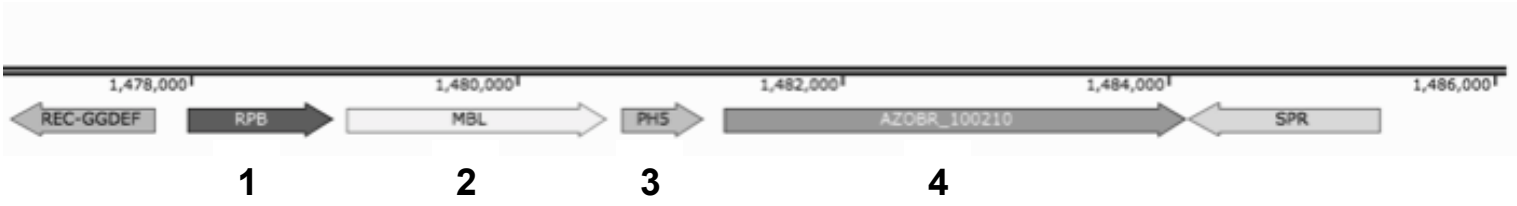


Figura 30. Contexto genético del gen *cdgD*. **(1)** RFB (Ribose-phosphate pyrophosphokinase), **(2)** MBL(Metallo-Beta-Lactamase), **(3)** PH5 (Hypothetical protein) y **(4)** AZOBR_100210 **(*cdgD*).**

Con el objetivo de descartar o confirmar, que este grupo de 4 genes se encuentran formando un operón, se realizó un análisis bioinformatico con el programa BPROM y Softberry. Este análisis demostró que estos genes no se encuentran formando un operon y cada uno de estos genes es una unidad transcripcional independiente, en la figura 31 se muestran los resultados obtenidos.

```
Prediction of potential genes in microbial  genomes
Time:   Tue Jan  1 00:00:00 2005
Seq name: PcdgD
Length of sequence - 6135 bp
Number of predicted genes - 4
Number of transcription units - 2, operons - 1
    N      Tu/Op   Conserved  S             Start          End    Score
                   pairs(N/Pv)
    1     1 Op  1     .       +    CDS          1 -        885    536
    2     1 Op  2     .       +    CDS        964 -       2571   1046
    3     1 Op  3     .       +    CDS       2658 -       3164    351
    4     2 Tu  1     .       +    CDS       3289 -       6129   1789
```

Figura 31. Análisis bioinformatico del locus del gen *cdgD.* (BPROM © , Softberry ©).

Con esta información, se procedió a realizar la búsqueda del promotor del gen *cdgD*, para ello se analizó la región intergénica río arriba del gen, la cual consta de una longitud de 126 pb. Con ayuda de programas bioinformáticos, como BPROM y Softberry, se realizó la búsqueda de promotores en esta región, arrojándonos un posible promotor, el cual corresponde a un promotor de tipo sigma 70, con una caja -10 (GGTTAAGGT) y una caja -35 (TTTTCG), en la siguiente figura se muestran los resultados.

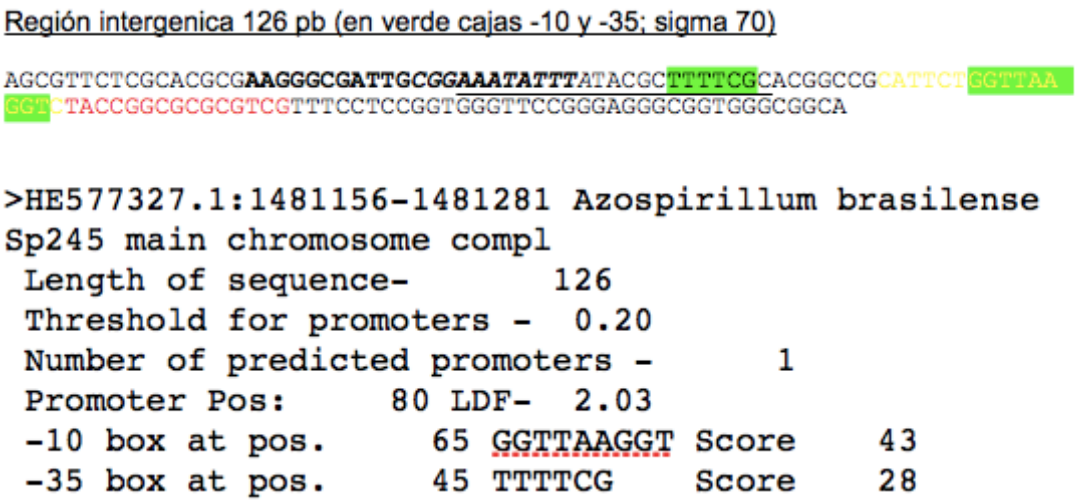


Figura 32. Ubicación del promotor del gen *cdgD*. (BPROM © , Softberry ©).

Analizando los elementos presentes en este promotor, observamos que cumple con las características necesarias para el correcto funcionamiento, las regiones -10 y -35 están separadas por una distancia de 15 pb y los elementos hexaméricos se encuentran a 7 pb del inicio de la transcripción. Este tipo de promotor, es el más común en bacterias ya que esta implicado en la transcripción de la mayoría de los genes en las células en crecimiento.

8.6. CONSTRUCCIÓN DE LA FUSIÓN TRANSCRIPCIONAL FPDm1.

Una vez identificado el promotor de *cdgD*, se clonó un fragmento de 400 pb que contiene la región promotora, en un vector de mantenimiento pGEM-Teasy en donde se amplificó y se envió a secuenciar utilizando los iniciadores M13, con lo cual se identifico él fragmento clonado con un 100% de coincidencia (Anexo 4). Esta secuencia de 400 pb se clonó en el vector suicida pAZBRT7mCherry como se describe en la parte de métodos, generando el plásmido denominado pAZBR-*pcdgD*T7mCh. Este ultimo plásmido junto con el plásmido vacío pAZBRT7mCherry como control negativo, se transformaron en *E.coli* S17.1 y se observó la fluorescencia en las cepas

transformantes obtenidas en *E.coli* S17.1 con pAZBR-*pcdgD*T7mCh y la ausencia de fluorescencia en *E.coli* S17.1 con pAZBRT7mCherry, los resultados se muestran a continuación.

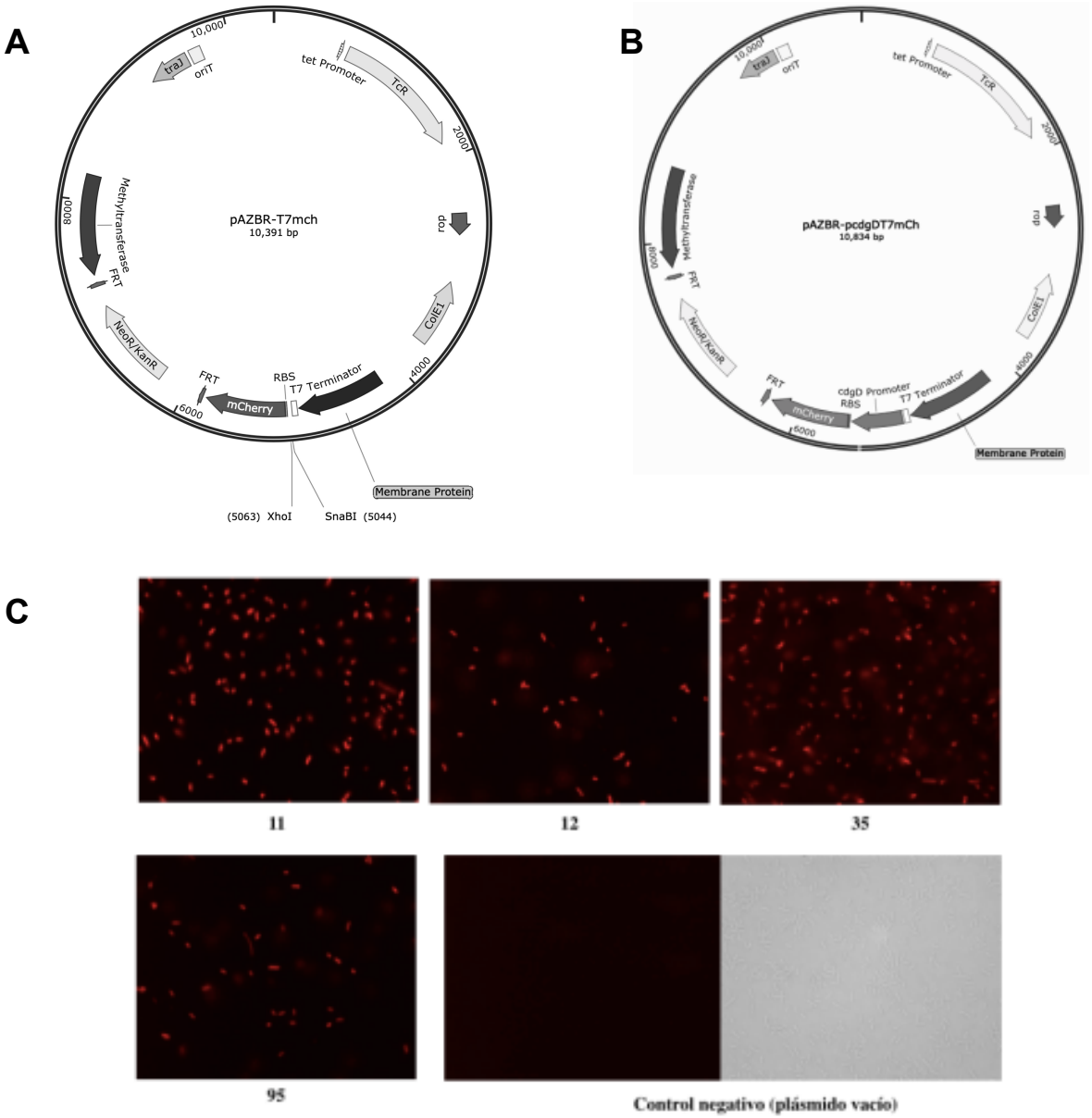


Figura 33. Construcción de la fusión transcripcional. **(A)** Plásmido suicida pAZBR-T7mch. (Marcos-Jiménez C, 2017) **(B)** Plásmido suicida con el promotor de *cdgD* pAZBR-*pcdgD*T7mCh (Este trabajo) **(C)** Transformantes de *E. coli* S17.1, clonas crecidas en LB con Km y Tc, como presión de selección, vista a 24 horas de crecimiento con agitación. Transconjugantes **11**, **12**, **35**, **95** y **control negativo** (vector vacío).

Se llevó a cabo una conjugación entre las cepas donadoras *E.coli* S17.1 (pAZBR-*pcdgD*T7mCh) y *E.coli* (pAZBRT7mCherry) con la cepa receptora *A.brasilense* Sp245. La recombinación se llevó a cabo en el cromosoma bacteriano en un locus neutro entre

un gen que codifica para una proteína de membrana y una metiltransferasa, tal como lo describe Marcos-Jiménez en 2017 (Anexo 5). Generando la cepa con la fusión transcripcional FPDm1 y la cepa *A.brasilense*T7mChe como control negativo. En la figura 34 se muestran los amplicones obtenidos de una PCR punto final realizada a partir de DNA genómico de la transconjugantes obtenidas FPDm1, utilizando los iniciadores MTF-NcoI-R y CMP-PstI-F, los cuales flanquean la región en donde se lleva a cabo la conjugación, el tamaño esperado de amplicon es de 4452 pb (Anexo 6).

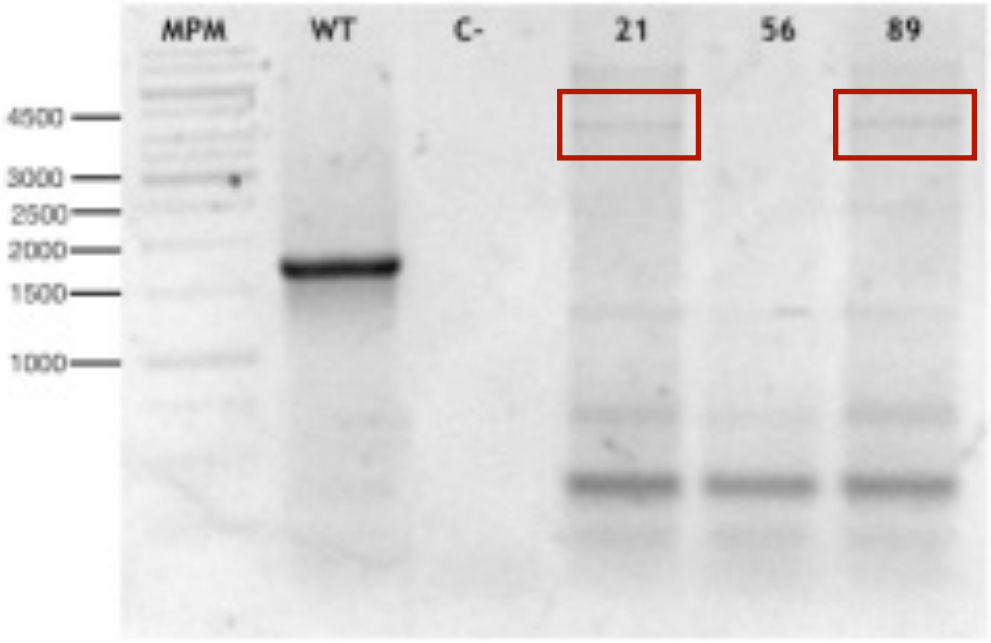


Figura 34. Electroferograma del PCR obtenido de transconjugantes. Carriles **MPM** - Marcador de peso molecular, **WT** - DNA genómico *A. brasilense* Sp245, **21, 56, 89** - Transconjugantes FPDm1. Se amplificó la región que se encuentra entre los genes correspondientes a la proteína de membrana y la metiltransferasa, usando los iniciadores CMP-*Pst*I-F y MTF-*Nco*IR.

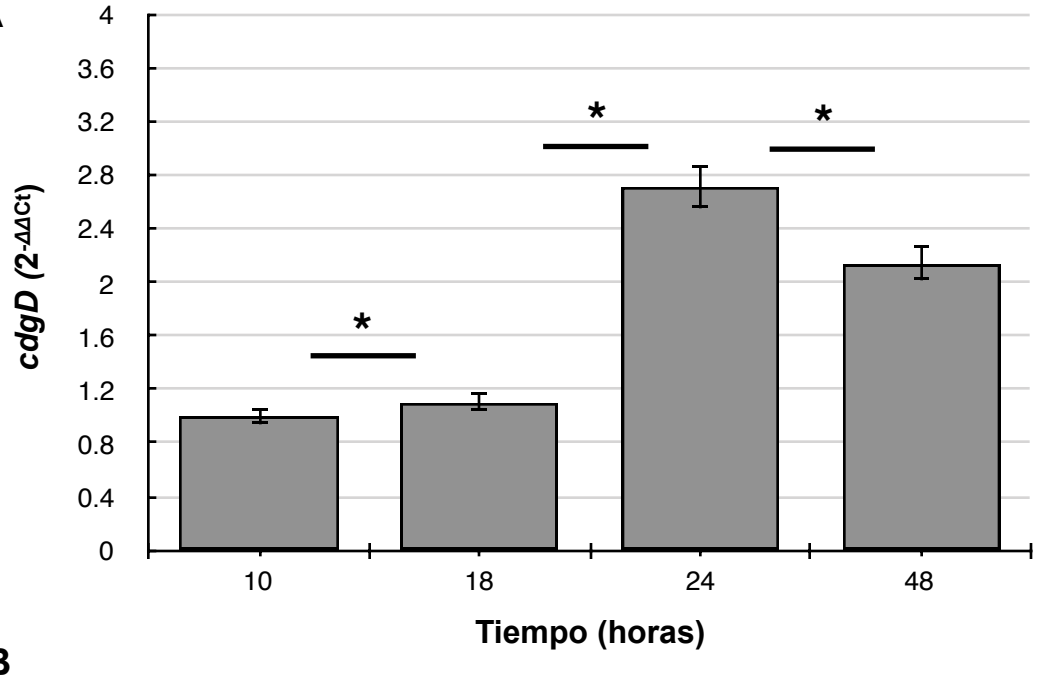
En la figura 34, observamos la comprobación de las transconjugantes FPDm1, las clonas 21 y 89, muestran el tamaño de amplicón esperado de 4452 pb, Sin embargo se realizaron un serie de comprobaciones a las clonas obtenidas, las cuales se presentan en el (Anexo 6). Con estas comprobaciones se tiene evidencia suficiente de que la fusión transcripcional fue realizada de forma correcta, por lo que se procedió a realizar los ensayos de cuantificación de fluorescencia.

8.7. CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE *cdgD* POR qPCR Y FUSIÓN TRANSCRIPCIONAL.

8.7.1. CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE *cdgD* EN CONDICIONES ESTÁTICAS.

Previamente a realizar los ensayos de qPCR se evaluaron los parámetros de rango dinámico y eficiencia de amplificación de los iniciadores utilizados, como se muestra en la sección de métodos. Los iniciadores evaluados fueron gyrAF, gyrAR, qRT-cdgDF y qRT-cdgDR. Los resultados de este análisis se muestran en la sección de Anexo 7. Una vez que se corroboraron que los iniciadores presentan parámetros de funcionamiento adecuados, se realizaron los ensayos de qPCR, como se describe en la sección de métodos, correspondiente a los niveles de expresión de *cdgD,* determinados por el método ΔΔCt, durante el proceso de formación de biopelícula, evaluando la expresión a las 10, 18, 24 y 48 horas de crecimiento de *A.brasilense* Sp245, bajo condiciones de crecimiento estáticas, a 30 ºC y en medio NFB*+KNO_3. De la misma forma se evaluaron los niveles de expresión de *cdgD* por medio de la fusión trasncripcional FPDm1, a los mismos tiempos y bajo las mismas condiciones de crecimiento que en el ensayo de qPCR, cuantificando la cantidad de fluorescencia determinada por el Index y normalizada con la cantidad de proteínas totales, lo cual se encuentra descrito en la sección de métodos. En las siguientes imágenes se muestran los resultados obtenidos.

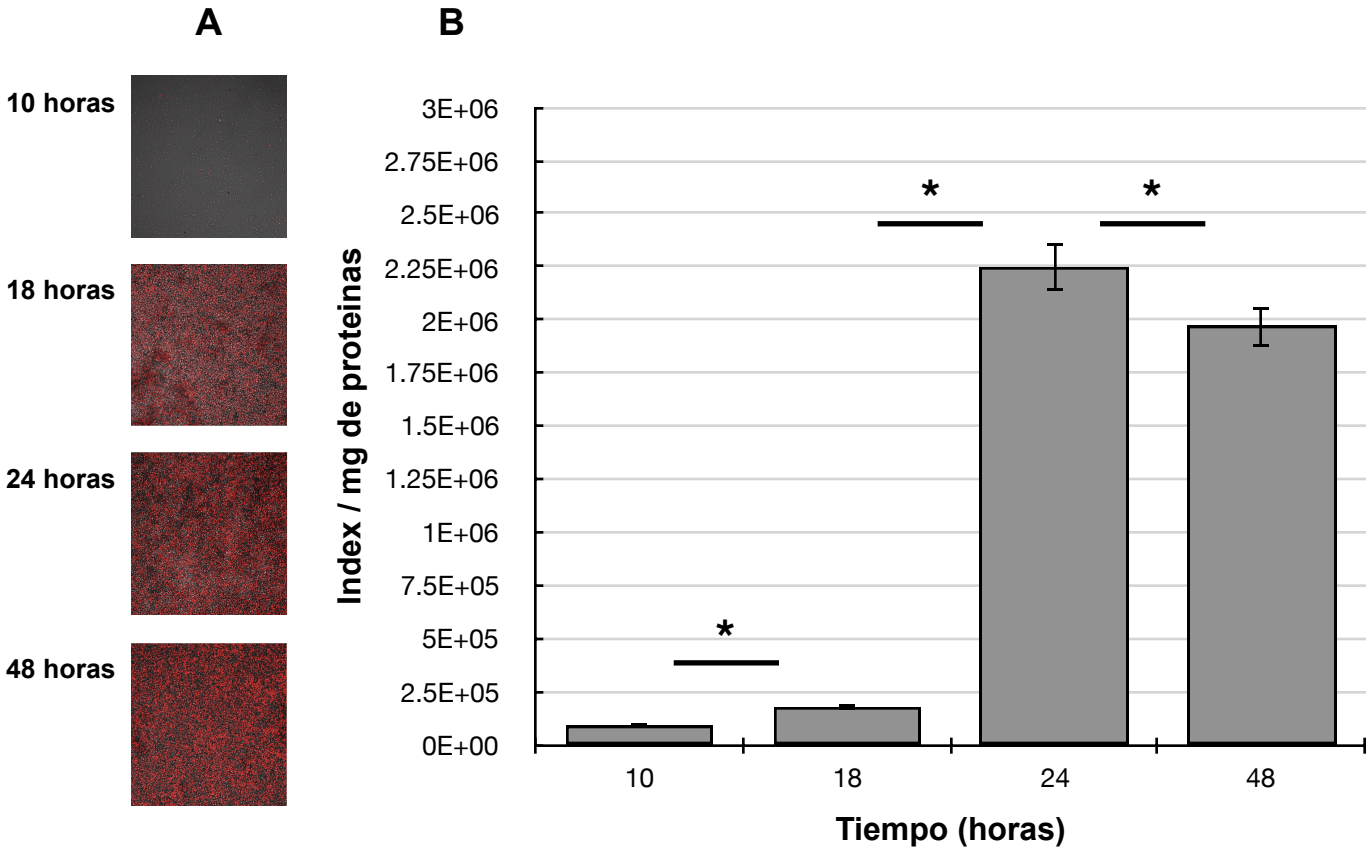
A



B

	Horas			
	10	**18**	**24**	**48**
***cdgD* ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)**	1	1.10	2.72	2.14

Figura 35. Análisis de la expresión del gen *cdgD* por qPCR durante la transición de estilo de vida móvil a sésil de *A. brasilense* Sp245 en medio NFB*+KNO_3 en condiciones de formación de biopelícula. Los niveles de expresión se obtuvieron por el método ΔΔCt, utilizando el sofwere Applied Biosystem (StepOne plus). Los datos presentados corresponden a 3 réplicas biológicas provenientes de tres ensayos independientes y los asteriscos indican valores de referencia significativas ($p<0.05$) usando la prueba T-student. **(A)** Grafica de niveles de expresión de *cdgD* **(B)** Valores de *cdgD* ($2^{-\Delta\Delta Ct}$).



C

	Horas			
	10	18	24	48
Index/mg de proteina	9.4792E+04	1.80736E+05	2.252264E+07	1.966654E+06

Figura 36. Cuantificación de la cantidad de fluorescencia **(A)** Micrografias de fluorescencia de la cepa *A. brasilense* Sp245 (FPDm1), bajo condiciones de formación de biopelícula, en medio NFB*+KNO_3. **(B)** La intensidad de fluorescencia se cuantificó por el sofwere ImageJ y ésta fue normalizada con la cantidad de proteínas totales. Las barras de error representan las desviaciones estándar de tres réplicas biológicas y los asteriscos indican valores significativos ($p<0.05$) utilizando la prueba T-student. **(C)** Cantidad de Index normalizado con la cantidad de proteínas.

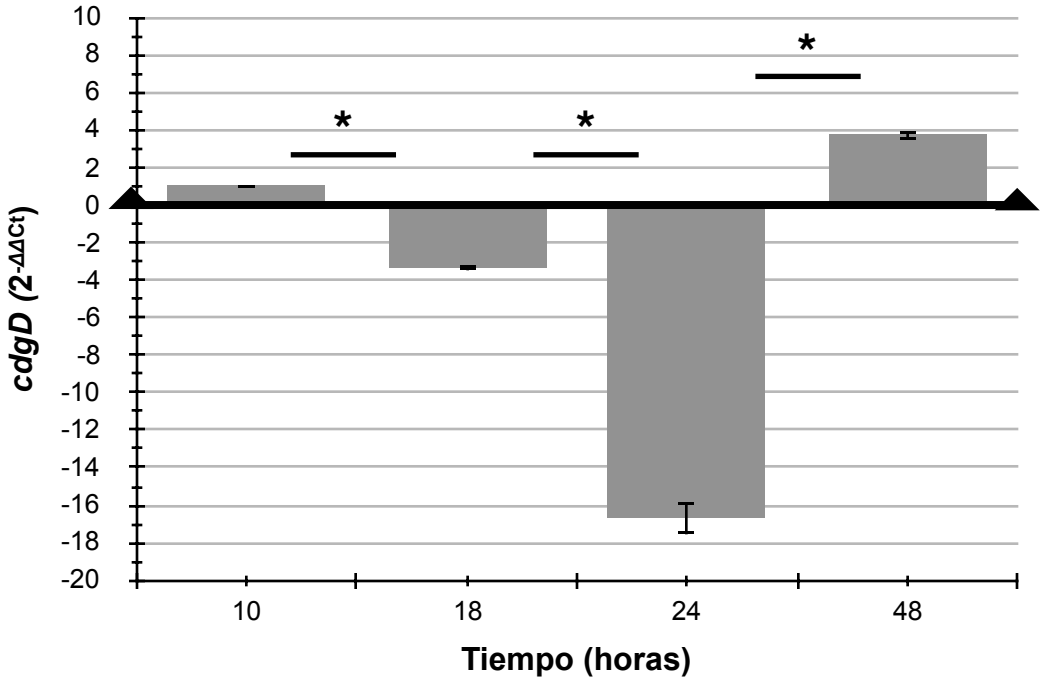
Se analizaron los niveles de expresión de *cdgD*, bajo estás condiciones de crecimiento, obtenidos en los ensayos anteriores, pedemos observar que se obtuvieron patrones de expresión similares en ambas metodologías, en donde se identificó por ambos métodos, un aumento escalonado de la expresión a partir de las 10 horas y hasta las 24 horas, con un decremento considerable a las 48 horas. Por lo tanto, ambos métodos de cuantificación, son confiables para la cuantificación de la expresión de *cdgD*, bajo estás condiciones de crecimiento.

Este patrón de expresión es interesante, debido a que esta indicando que conforme la bacteria se encuentra transitando a un estado de vida de biopelícula, este gen a la par va aumentando su expresión, por lo cual podría ser indicativo de que se encuentre participando de manera activa en el proceso de formación de biopelícula, lo cual reforzaría los resultados obtenidos por Lara en 2018, en donde describe a CdgD con función DGC.

8.7.2. CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE *cdgD* EN CONDICIONES DE AGITACIÓN.

De la misma forma que en los ensayos anteriores de cuantificación de los niveles de expresión de *cdgD* por qPCR y fusión transcripcional, se realizaron los mismos ensayos, pero ahora bajo condiciones de crecimiento de *A.brasilense* Sp245 con agitación a una velocidad de 120 rpm, a 30 ºC y utilizando el mismo medio de cultivo NFB*+KNO_3, como se describe en la sección de métodos. Los resultados obtenidos se muestran a continuación.

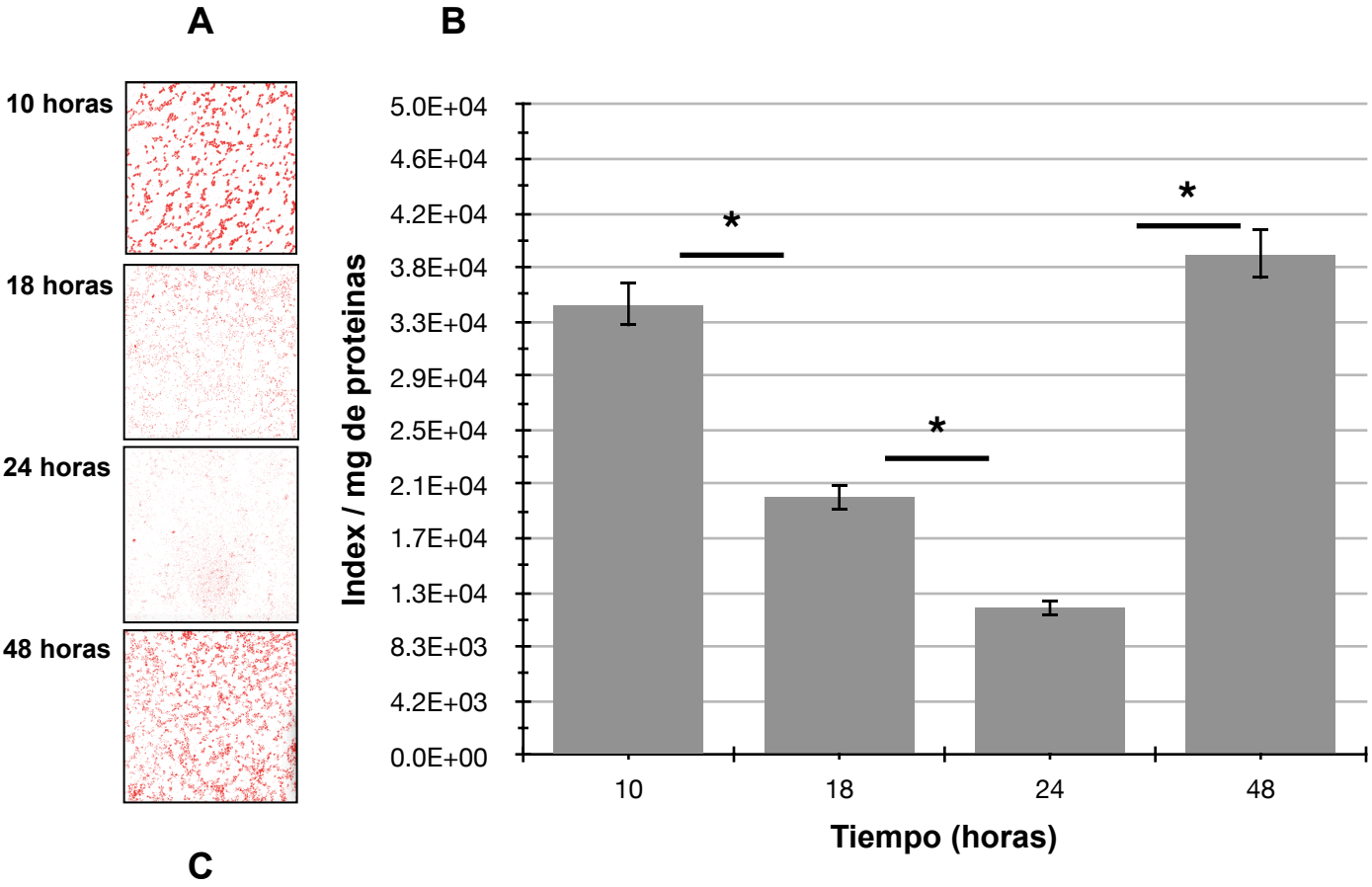
A



B

	Horas			
	10	**18**	**24**	**48**
***cdgD* ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)**	1	-3.37	-16.70	3.70

Figura 37. Análisis de la expresión del gen *cdgD* por qPCR durante la transición de estilo de vida móvil a sésil de *A. brasilense* Sp245 en medio NFB*+KNO_3 en condiciones de agitación. Los niveles de expresión se obtuvieron por el método ΔΔCt, utilizando el sofwere Applied Biosystem (StepOne plus). Los datos presentados corresponden a 3 réplicas biológicas provenientes de tres ensayos independientes y los asteriscos indican valores de referencia significativas, respecto a ($p<0.05$), usando la prueba T-student. **(A)** Grafica de niveles de expresión de *cdgD* **(B)** Valores de *cdgD* ($2^{-\Delta\Delta Ct}$).



C

	Horas			
	10	18	24	48
Index/mg de proteina	3.468E+04	1.984E+04	1.1265E+04	2.8527E+04

Figura 38. Cuantificación de la cantidad de fluorescencia **(A)** Micrografias de fluorescencia de la cepa *A. brasilense* Sp245 (FPDm1), bajo condiciones crecimiento con agitación, en medio NFB*+KNO_3. **(B)** La intensidad de fluorescencia se cuantificó por el sofwere ImageJ y ésta fue normalizada con la cantidad de proteínas totales. Las barras de error representan las desviaciones estándar de tres réplicas biológicas y los asteriscos indican valores significativos ($p<0.05$) utilizando la prueba T-student. **(C)** Cantidad de Index normalizado con la cantidad de proteínas.

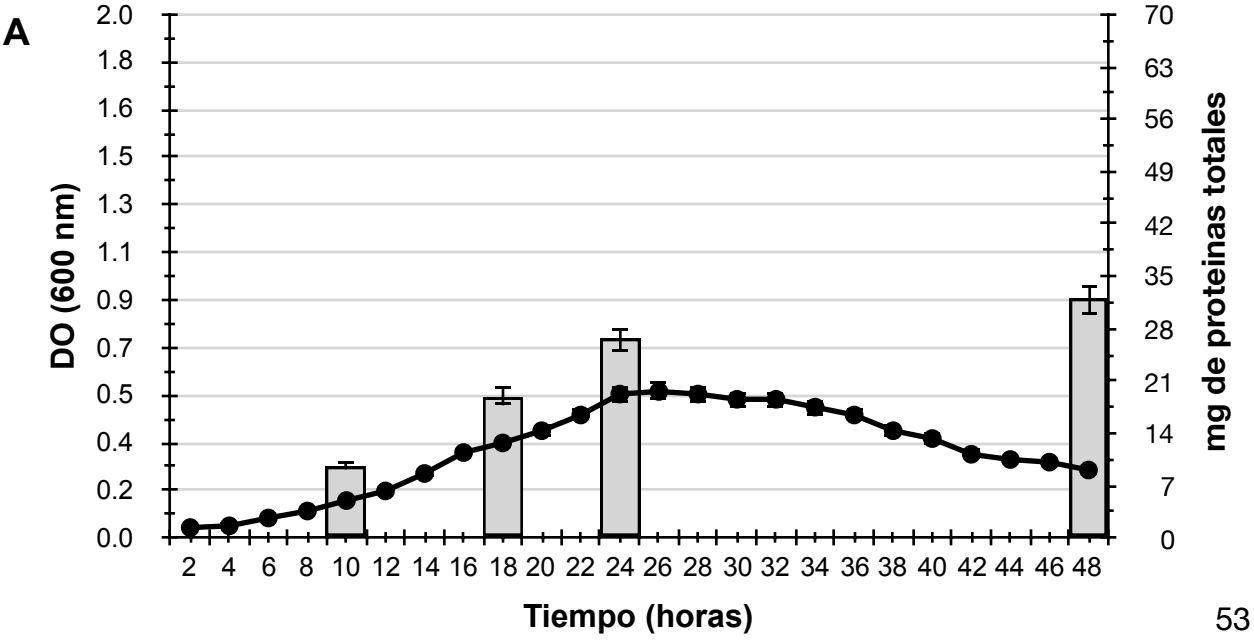
De manera interesante, encontramos que los patrones de expresión de *cdgD*, en condiciones de crecimiento con agitación, presentan niveles de expresión negativas. En la figura 37, podemos observar que este gen no esta siendo activado a partir de las 18 horas y hasta las 24 horas de crecimiento, con valores de hasta -16.7 veces menos, respecto a las 10 horas de crecimiento, para posteriormente aumentar su expresión a las 48 horas con un valor de 3.7 veces mas respecto a las 10 horas. La cuantificación de la expresión por medio de la fusión trasncripcional FPDm1, encontramos patrones de expresión similares a los resultados obtenidos por qPCR, ya que los niveles de

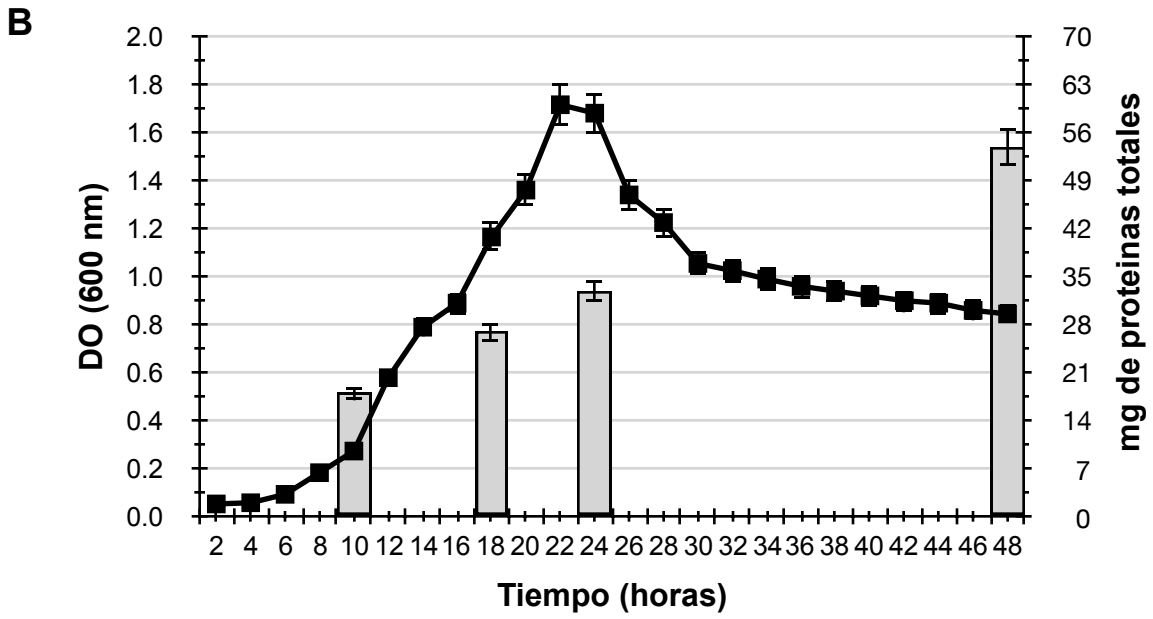
intensidad de fluorescencia por mg de proteína, disminuyeron en dos ordenes de magnitud a las 18 y 24 horas de crecimiento respecto a las 10 horas, para posteriormente aumentar la cantidad de fluorescencia a las 48 horas, dando el mismo patrón de expresión obtenido por qPCR, como se muestra en la figura 38. Por lo cual, estos datos fueron corroborados por dos metodologías, indicándonos que bajo estas condiciones de crecimiento, *cdgD* se encuentra siendo reprimido a las 18 y 24 horas de crecimiento.

Con estos datos, podemos concluir que *cdgD* está presentando diferentes patrones de expresión de acuerdo a las condiciones de crecimiento, en este caso tenemos que *cdgD* presenta un aumento de la expresión de forma escalonada, cuando *A.brasilense* Sp245 es crecida en condiciones estáticas, en medio NFB*+KNO_3 a 30 ºC, mientras que el patrón de expresión es diferente, en condiciones de crecimiento con agitación, en medio NFB*+KNO_3 a 30ºC, ya que la expresión de *cdgD* no se encuentra siendo activado a las 18 y 24 horas de crecimiento.

8.7.3. EFECTO DE LA AGITACIÓN EN LA EXPRESIÓN DE *cdgD*.

Con el objetivo de tratar de comprender del porque de la diferencia en los patrones de expresión de *cdgD*, bajo condiciones de crecimiento estáticas y con agitación, se realizaron curvas de crecimiento y observaciones al microscopio de *A.brasilense* Sp245 en los mismos tiempos evaluados en los ensayos de qPCR y fusión transcripcional. Las curvas de crecimiento se realizaron bajo las mismas condiciones previamente reportadas para cada caso, midiendo en este ensayo la DO de cada cultivo y la cantidad de biomasa reportada con la cantidad de proteínas totales, las observaciones al microscopio se realizaron en un microscopio confocal, a continuación se muestran los resultados obtenidos.





Grafica 2. Curvas de crecimiento bajo diferentes condiciones de crecimiento de *A. brasilense* Sp245, midiendo la densidad óptica (DO) a 600 nm y mg de proteínas totales, en medio NFB*+KNO_3. **(A)** Condiciones de crecimiento estáticas o de formación de biopelícula y **(B)** Condiciones de crecimiento con agitación.

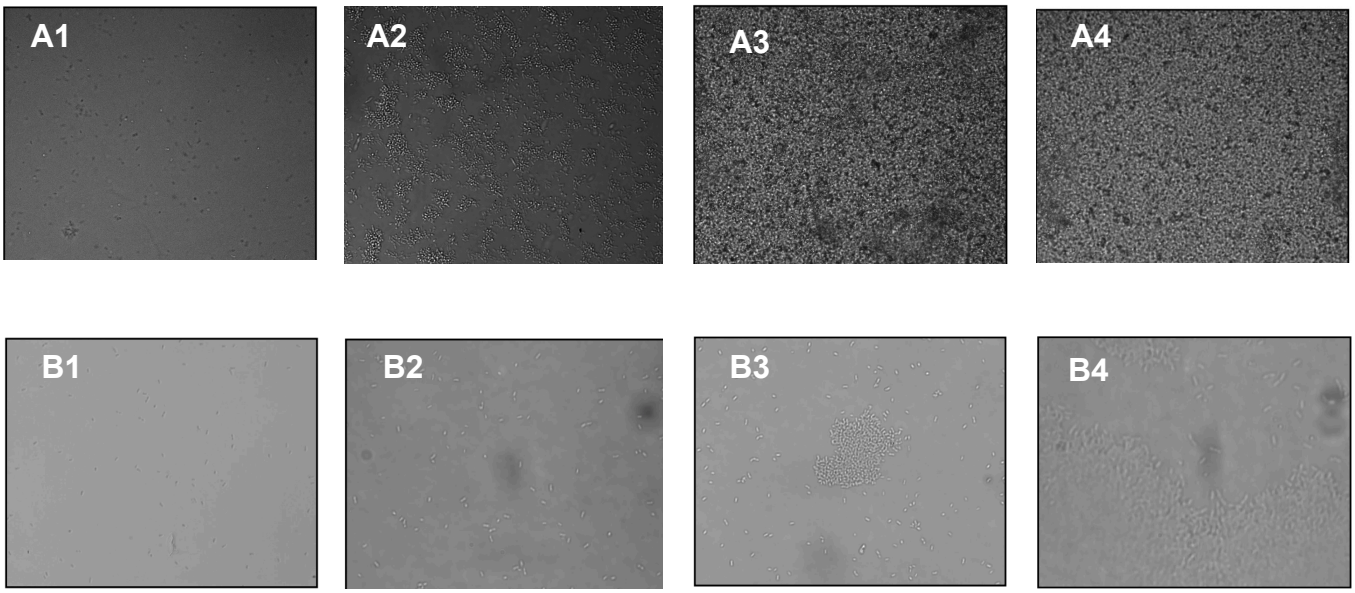


Figura 39. Observaciones al microscopio con un objetivo de (60 X) de cultivos de de *A. brasilense*. Microfotografías obtenidas de alícuotas de cultivos a diferentes tiempos, en medio NFB*+ KNO_3. **(A)** Condiciones de crecimiento estáticas y **(B**) Condiciones de crecimiento con agitación. **(A1, B1)** 10 horas de crecimiento, **(A2, B2)** 18 horas de crecimiento, **(A3, B3)** 24 horas de crecimiento y **(A4, B4)** 48 horas de crecimiento, en condiciones de crecimiento con agitación.

Analizando los resultados anteriores, podemos observar que el comportamiento del crecimiento de *A.brasilense* Sp245 cuando se crece en condiciones de agitación, es muy diferente a cuando se crece en condiciones estáticas o de formación de biopelícula, en la grafica 2 se observan las diferencias en la cantidad de DO, teniendo valores mayores en condiciones de agitación, al mismo tiempo la cantidad de biomasa generada es alrededor de 20 mg mas de proteínas en condiciones de agitación. Respecto a la formación de biopelícula, observamos que existe una mayor formación en condiciones estáticas, ya que desde las 18 horas de crecimiento se comienza a formar, teniendo una biopelícula homogénea a partir de las 24 y hasta las 48 horas, como se observa en la figura 39 (**A1 - A4**). Por el contrario, en condiciones de crecimiento con agitación, la formación de biopelícula no se observa, sino hasta las 24 horas que comienza a formarse y a las 48 horas de crecimiento se observa una biopelícula no homogénea, como se observa en la imagen 39 (**B1 - B4**) Este efecto podría estar siendo atribuido al retraso de formación de la biopelícula, debido a que el cultivo se encuentra en agitación constante, impidiendo que la bacteria se adhiera a las superficies o se agrupe para poder comenzar a formar biopelícula, al igual que las cantidades de oxigeno disuelto en el medio, impide las condiciones necesarias para el desarrollo de biopelícula, debido a que *A.brasilense* Sp245 es microaerofilica. Tomando como referencia los patrones de expresión de *cdgD* en condiciones de formación de biopelícula obtenidos por qPCR y FPDm1 (Figuras 35 y 36), observamos que este gen aumenta su expresión conforme avanza el proceso de formación de biopelícula, esto podría explicar los patrones de expresión negativos que observamos cuando la bacteria el crecida en agitación, ya que debido a que el proceso de formación de biopelícula es mas lento bajo estás condiciones, este gen se encuentra reprimido y es hasta el lapso de las 24 a las 48 horas de crecimiento, cuando se comienzan a presentar estructuras parecidas a biopelículas y en este periodo aumenta considerablemente su expresión (Figuras 37 y 38).

Podemos observar también la presencia de pequeños aglomerados bacterianos a las 24 horas de crecimiento en condiciones de crecimiento con agitación, los cuales han sido denominados como "*flocs*", como se observa en la figura 39 B3 y 40.

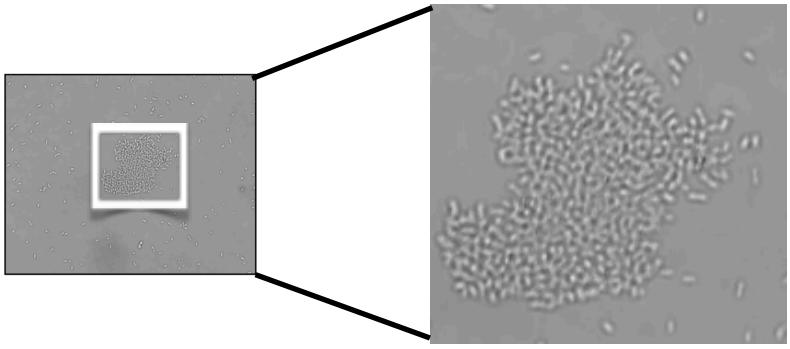
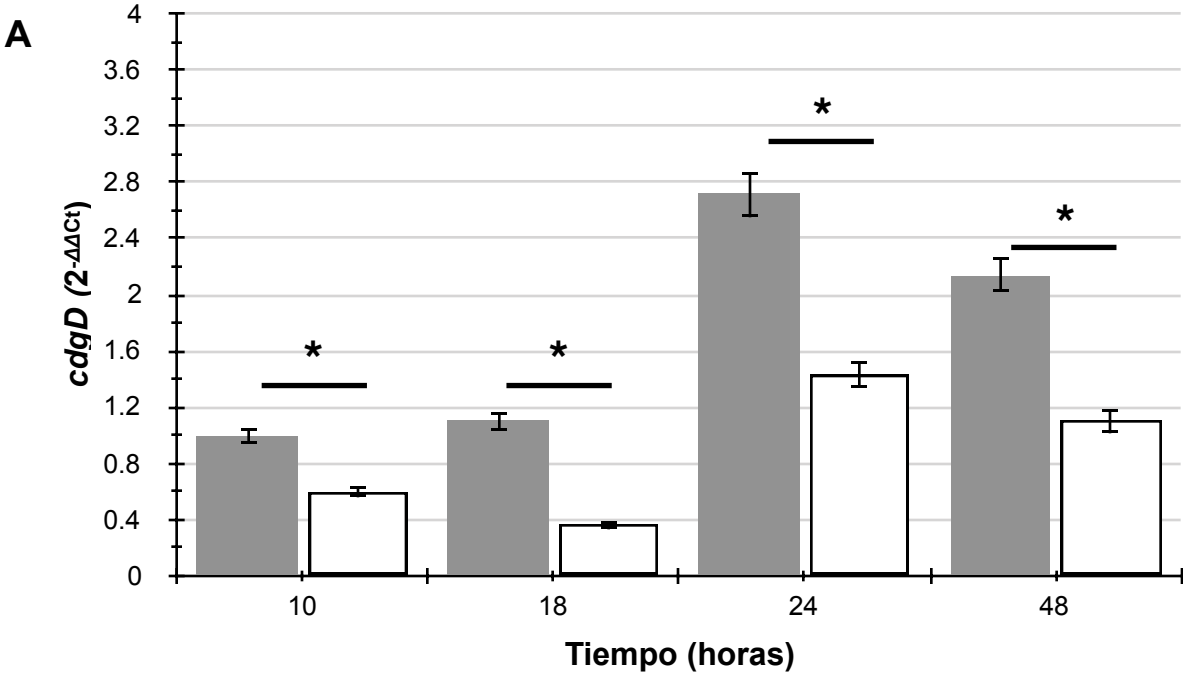


Figura 40. Observaciones al microscopio con un objetivo de (60 X) de cultivos de de *A. brasilense.* Microfotografías de flocs obtenidas de cultivos con 24 horas de crecimiento, en condiciones de crecimiento con agitación y en medio NFB*+ KNO_3.

Estas estructuras denominadas como *flocs* o flóculos han sido descritas previamente por (Alexandre *et al* 2015), en cultivos con agitación de *A.brasilense* Sp245. Estas estructuras han sido descritas como elementos de protección y resistencia ya que limitan la difusión de compuestos, protege a las bacterias de altas concentraciones de oxígeno, aparte de que son estructuras antecesoras de la floculación y dan inició a la formación de biopelícula. La aparición de estas estructuras a las 24 horas de crecimiento en condiciones de agitación, coincide con el aumento en la expresión de *cdgD*, ya que cuando las bacterias generan estas estructuras, pueden controlar los niveles internos de oxígeno y en consecuencia brindando las condiciones necesarias para el desarrollo de biopelícula y por ende los niveles de expresión de *cdgD* comienzan a aumentar, como se muestra en las figuras 37 y 38.

8.7.4. CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE *cdgD* EN CONDICIONES DE CRECIMIENTO CON DIFERENTE FUENTE DE NITRÓGENO.

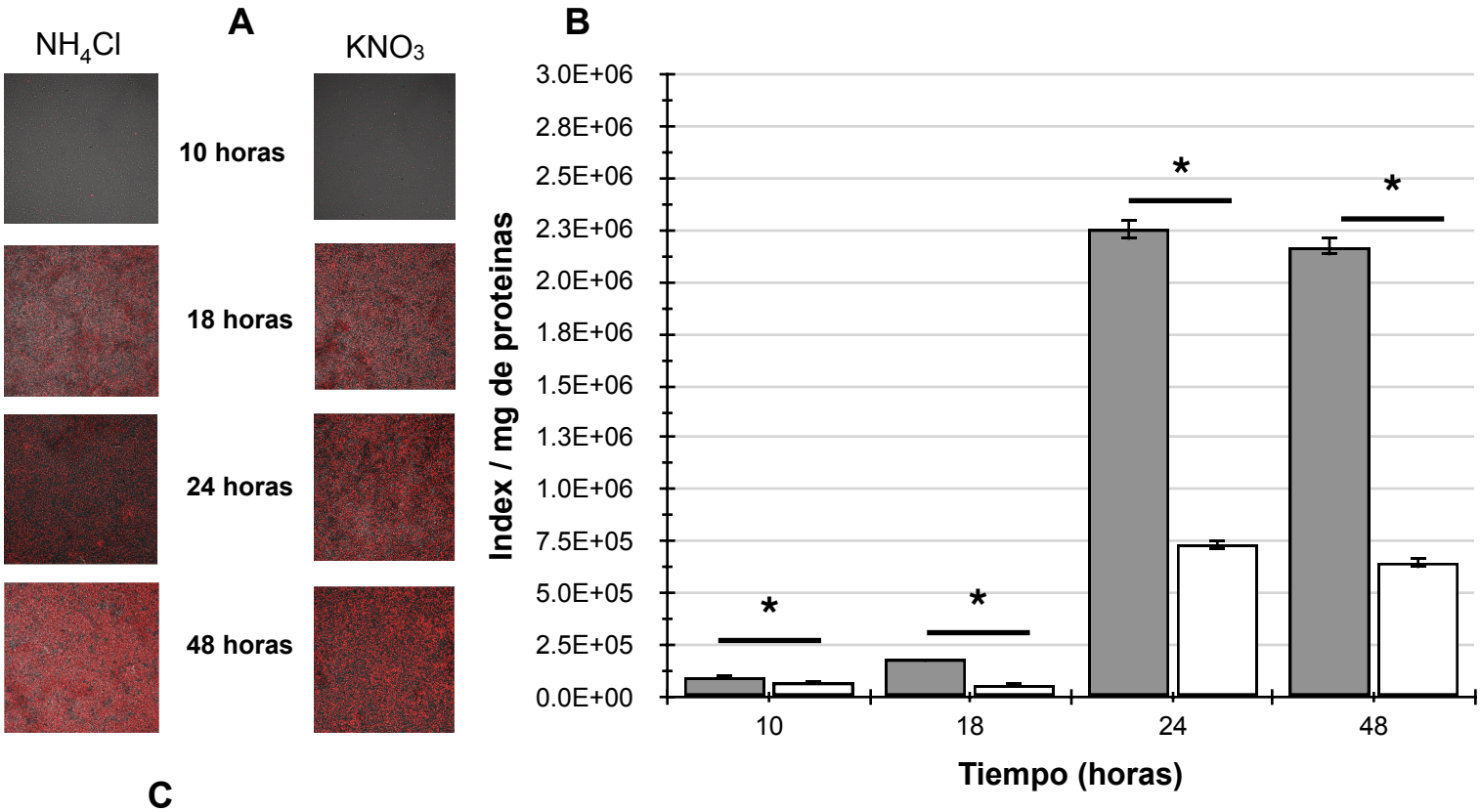
Con el objetivo de analizar el comportamiento de *cdgD* bajo diferentes condiciones de crecimiento, se decidió evaluar la expresión de este gen variando solo la fuente de nitrógeno del medio de cultivo, sustituyendo el medio NFB*+KNO_3 por NFB*+NH_4CL, dejando las condiciones de crecimiento estáticas o de formación de biopelícula y cultivadas a 30 ºC, como se describe en la sección de métodos. Los niveles de expresión de *cdgD* fueron evaluadas por qPCR y por la fusión transcripcional FPDm1, a los mismos tiempos que en los ensayos anteriores 10, 18, 24 y 48 horas. Los resultados obtenidos fueron comparados con los valores de expresión de *cdgD* en medio NFB*+KNO_3, en condiciones de crecimiento estáticas. Los resultados se muestran a continuación.



B

	Horas			
	10	**18**	**24**	**48**
cdgD $(2^{-\Delta\Delta Ct})$ **KNO_3**	1	1.10	2.72	2.14
cdgD $(2^{-\Delta\Delta Ct})$ **NH_4Cl**	0.6	0.36	1.43	1.10

Figura 41. Comparación de los niveles de expresión de *cdgD* en condiciones de crecimiento estático con medio NFB*+KNO_3 (■) contra los niveles de expresión de *cdgD* en medio NFB*+NH_4Cl (□). Resultado de tres experimentos independientes. El asterisco * indica la significancia estadística $P < 0.05$ empleando la Student's T. La tabla presenta las relaciones KNO_3/NH_4Cl. **(A)** Comparación grafica de los niveles de expresión del gen *cdgD* **(B)** Tabla de niveles de expresión del *cdgD*.



C

	Horas			
	10	**18**	**24**	**48**
Index/mg de proteina (KNO_3)	9.48E+04	1.81E+05	2.25E+06	2.17E+06
Index/mg de proteina (NH_4Cl)	7.13E+04	6.35E+04	7.37E+05	6.50E+05

Figura 42. Comparación de la cantidad de fluorescencia obtenida por FPDm1. **(A)** Micrografias de fluorescencia de la cepa *A. brasilense* Sp245 (FPDm1), bajo condiciones de formación de biopelícula, en medio NFB*+NH_4Cl y NFB*+KNO_3 **(B)** Grafica **c**omparativa de la intensidad de fluorescencia en medio NFB*+NH_4Cl (□) y NFB*+KNO_3 (■). Se cuantificó la fluorescencia por el sofwere ImageJ y ésta fue normalizada con la cantidad de proteínas totales. Las barras de error representan las desviaciones estándar de tres réplicas biológicas y los asteriscos indican valores significativos ($p<0.05$) utilizando la prueba T-student. **(C)** Cantidad de Index normalizado con la cantidad de proteínas

Analizando los resultados de los ensayos anteriores, se observa claramente una diferencia en los patrones de expresión de *cdgD*, cuando *A.brasilense* Sp245 es crecida con diferentes fuentes de nitrógeno. En la figura 41, correspondiente a la comparación de los niveles de expresión evaluados por qPCR, es notoria una disminución de la expresión de *cdgD* cuando la bacteria es crecida en medio NFB*+NH_4Cl, con una disminución promedio de 1 vez de cambio o *fold change*, respecto a cuando la bacteria es crecida en medio NFB*+KNO_3. Aparte de la disminución en los valores de expresión, el patrón de expresión de *cdgD* en presencia de NH_4Cl en el medio, es diferente, ya que no presenta una expresión progresiva como con el anterior medio, para este nuevo patrón de expresión tenemos un decremento a las 18 horas de crecimiento, posteriormente un aumento considerable a las 24 horas y de nuevo un decremento a las 48 horas.

Respecto a la comparación de los niveles de la expresión de *cdgD* por medio de la fusión transcripcional FPDm1 bajo estas dos fuentes de nitrógeno, encontramos patrones de expresión similares a los obtenidos por qPCR, en la figura 42 observamos los resultados de este ensayo. En la figura 42 B se observan los valores de expresión de *cdgD* para cada medio de cultivo, en donde se presentan niveles de fluorescencia menores cuando la bacteria es crecida en NFB*+NH_4Cl, con una disminución de 1 y hasta 2 ordenes de magnitud respecto a los niveles de expresión cuando es crecida con KNO_3. Los niveles de expresión de *cdgD* obtenidos por la FPDm1, con el medio de cultivo NFB*+NH_4Cl, presentan el mismo patrón de expresión obtenido por qPCR, con un decremento en la expresión a las 18 horas respecto a las 10 horas de crecimiento, para posterior aumentar considerablemente a las 24 horas y disminuir de nuevo a las 48 horas. Con estos resultados se pueden concluir dos cosas, la primera es que los métodos seleccionados para la cuantificación de la expresión son robustos y confiables, aparte de que por ambos métodos estamos obteniendo patrones de expresión similares, lo cual nos da confianza en los resultados obtenidos y la segunda, es que la fuente de nitrógeno, es especifico NH_4Cl puede estar presentando implicaciones metabólicas en el crecimiento de la bacteria, las cuales pueden repercutir directamente en la formación de biopelícula y en consecuencia en la expresión de *cdgD*.

8.7.5. EFECTO DE LA FUENTE DE NITRÓGENO SOBRE LA EXPRESIÓN DE *cdgD* EN *A.brasilense* Sp245.

Con el objetivo de indagar mas acerca del efecto de la fuente de nitrógeno, sobre el crecimiento de *A.brasilense* Sp245 y por consiguiente en las afectaciones a la expresión de *cdgD*, cuando la bacteria es crecida en medio NFB*+NH_4Cl. Se realizaron curvas de crecimiento bacterianas, en ambos medios de cultivo NFB*+KNO_3 y

NFB*+NH_4Cl, en condiciones estáticas o de formación de biopelícula a 30 ºC, midiendo la DO a 600 nm de los cultivos bacterianos, la cantidad de proteínas totales, también se realizaron observaciones al microscopio de los cultivos bacterianos a diferentes tiempos de crecimiento y por último se realizo un ensayo de formación de biopelícula en ambos medios, el protocolo se muestra en la sección de métodos. A continuación se presentan los resultados.

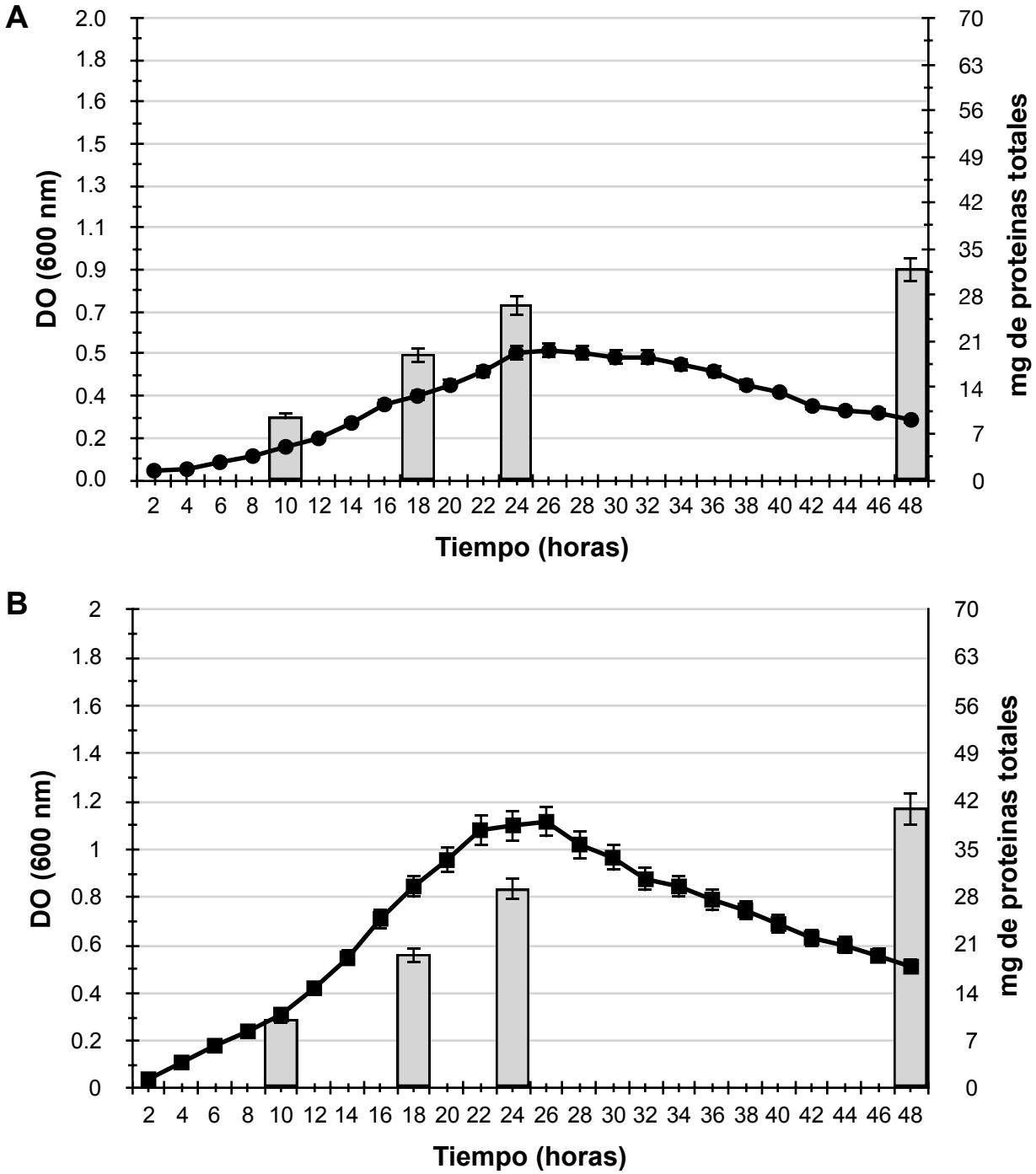


Figura 43. Curvas de crecimiento de *A. brasilense* Sp245, determinando la densidad óptica de los cultivos (DO) a 600 nm y la cantidad de miligramos de proteínas totales, en medio NFB* con diferentes fuentes de nitrógeno **(A)** NFB*+KNO_3 y **(B)** NFB*+NH_4Cl.

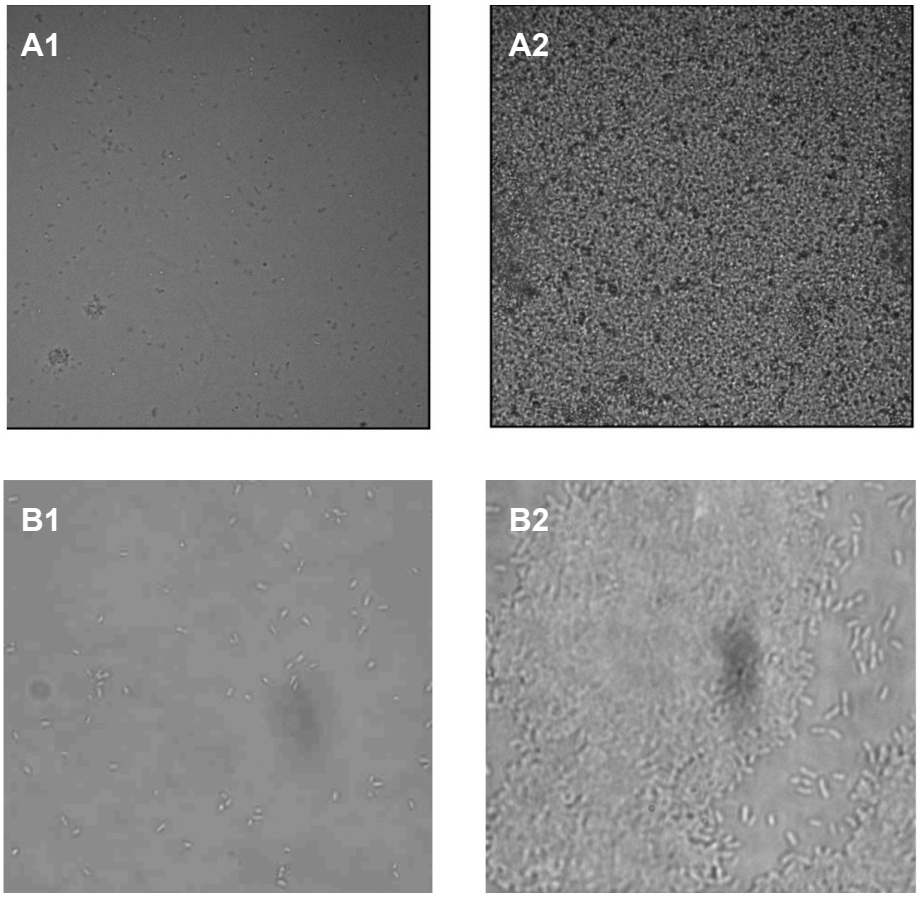


Figura 44. Observaciones al microscopio con el objetivo (60 X) de un cultivo de *A. brasilense* Sp245. Microfotografías obtenidas de alícuotas de cultivos a diferentes tiempos de crecimiento, en medio NFB* con diferentes fuentes de nitrógeno y en condiciones de crecimiento estáticas o de formación de biopelícula **(A1)** 10 horas de crecimiento en medio NFB*+KNO_3, **(A2)** 48 horas de crecimiento en medio NFB*+KNO_3, **(B1)** 10 horas de crecimiento en medio NFB*+NH_4Cl y **(B2)** 48 horas de crecimiento en medio NFB*+NH_4Cl.

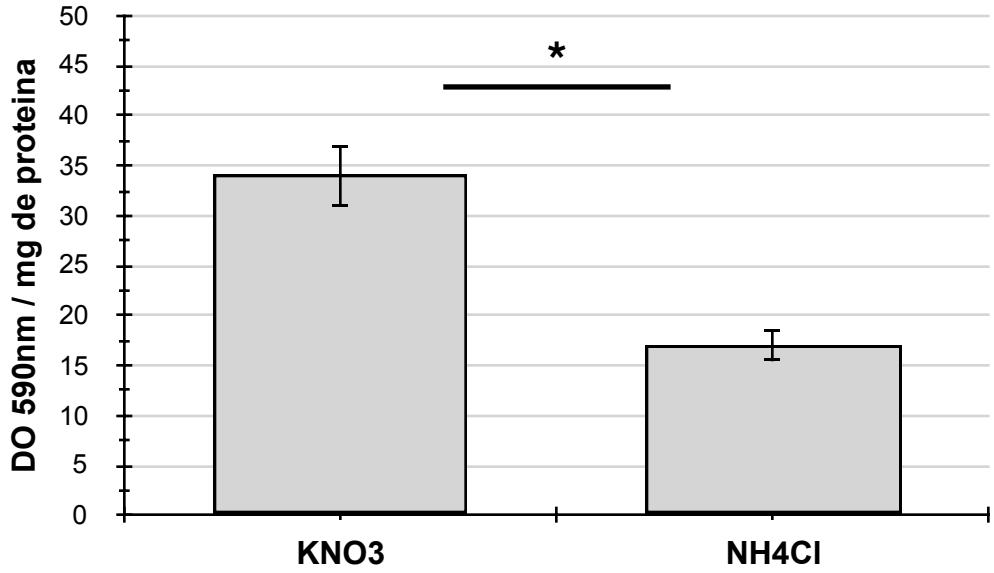


Figura 45. Formación de biopelícula con 2 días de crecimiento de la cepa *A.brasilense* Sp245 en medios de cultivo con diferentes fuentes de nitrógeno. Las barras representan el error de desviación estándar de tres réplicas biológicas y los asteriscos indican valores significativos ($p<0.05$) utilizando la prueba T-student.

En los ensayos anteriores, podemos observar que existe un comportamiento diferente en el crecimiento de *A.brasilense* Sp245, cuando es crecida en medios con fuentes de nitrógeno diferentes. En la figura 43 se observa una mayor cantidad de DO en el cultivo bacteriano con el medio NFB*+NH_4Cl, así también presenta una mayor cantidad de biomasa producida, con alrededor de ≈40 mg de proteínas totales vs ≈32 mg de proteínas totales producidas en el medio NFB*+KNO_3. Respecto a las imágenes de cultivos bacterianos obtenidas por microscopia, se pueden observar diferencias en la formación de biopelícula, los cultivos bacterianos en medio NFB*+KNO_3 presentan una biopelícula uniforme a las 48 horas de crecimiento, como se observa en la figura 44 A2, mientras que la formación de biopelícula al mismo tiempo de crecimiento, pero con el medio NFB*+NH_4Cl presenta una estructura poco uniforme de biopelícula, se observan pequeños agregados individuales, como se observa en la figura 44 B2. Estos últimos resultados fueron complementados con un ensayo de cuantificación de formación de biopelícula por medio de la técnica de cristal violeta, como se muestra en la figura 45, en donde se observa una disminución considerable de formación de biopelícula de *A.brasilense* Sp245 crecida en medio NFB*+NH_4Cl. Estos resultados están sugiriendo que la bacteria esta presentando una deficiencia en la formación de biopelícula cuando es crecida en el medio NFB*+NH_4Cl, probablemente por la presencia o ausencia de exopolisacaridos importantes contribuyentes a la formación de la matriz de la biopelícula, como se describió previamente (Okon & Burman, 2012). Estas deficiencias en la formación de biopelícula, pueden ser las causantes de que los niveles de expresión de *cdgD* se vean reducidos, debido a que esté gen se comienza a expresar cuando la bacteria se encuentra transitando al estilo de vida sesil o de biopelícula.
Resultados similares ya han sido reportados previamente por Arruebarrena en 2012, en donde describió afectaciones importantes en la formación de biopelícula por parte de un cultivo de 5 días de *A.brasilense* Sp245, cuando es crecida en medio NFB*+NH_4Cl, en condiciones de formación de biopelícula, en la figura 46 se presentan los resultados obtenidos por Arruebarrena 2012.

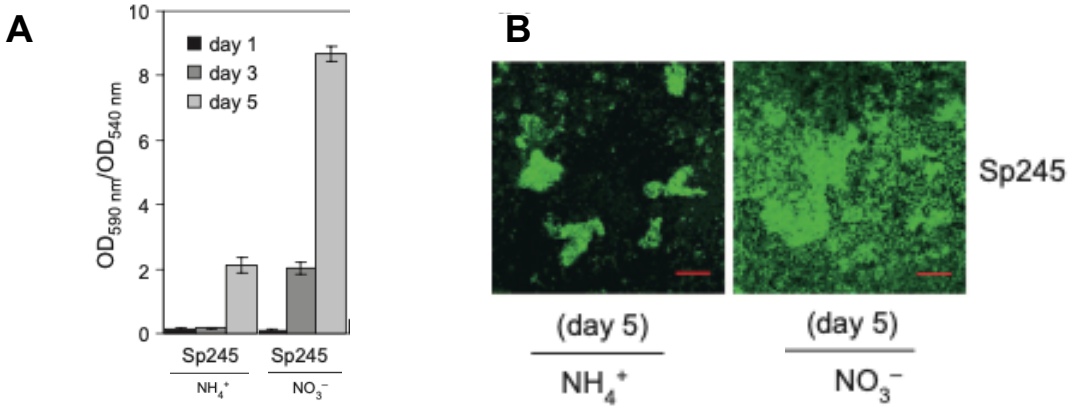


Figura 46. Formación de biopelícula de la cepa *A.brasilense* Sp245, en medio NfB* adicionado con diferentes fuentes de nitrógeno KNO_3 y NH_4Cl) (A) Cuantificación de biopelícula por cristal violeta (B) Imágenes de biopelícula en microscopio confocal (Arruebarrena *et al.,* 2012)

Con base a los ensayos realizados por Arruebarrena, describe las implicaciones que presenta el nitrito (NO_2^-), el cual es un intermediario que resulta de la desnitrificación de KNO_3, presente en el medio NFB*+KNO_3 (NO_3^- - NO_2^- - NO - N_2O) El nitrito (NO_2^-) pareciera estar favoreciendo la formación de biopelícula, debido a que se encuentra en grades concentraciones en el medio de cultivo a los 1, 3 y 5 días de crecimiento y la formación de biopelícula en estas condiciones es mayor (Figura 46 B). Sin embargo estás cantidades de nitrito no están presentes en el cultivo bacteriano cuando se utiliza NH_4Cl como fuente de nitrógeno y la formación de biopelícula se ve afectada como se muestra en la siguiente figura.

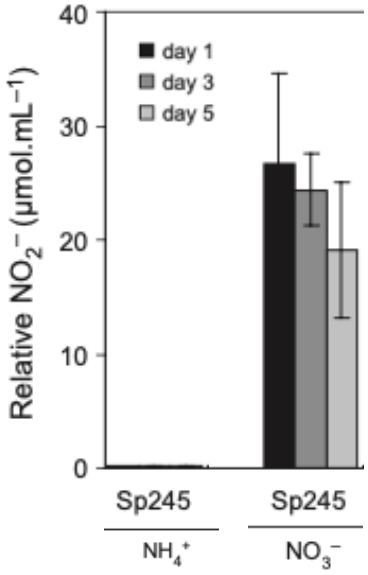


Figura 47. Cuantificación relativa de NO_2- en cultivos bacterianos crecidos con diferentes fuentes de nitrógeno NFB*+NH_4Cl y NFB*+KNO_3 (Arruebarrena *et al.,* 2012).

En la figura 47 podemos observar que las cantidades de NO_2^- en cultivos bacterianos a los 1, 3 y 5 días de crecimiento, en medio NFB*+KNO_3, son hasta 20 veces mas que cuando se crecen los cultivos con NFB*+NH_4Cl. Es por ello que el nitrito esta jugando un papel fundamental en el proceso de formación de biopelícula, aun falta por discernir los mecanismos por los cuales esta molécula esta regulando la formación de biopelícula.

8.8. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE *cdgD* EN ASOCIACIÓN CON LAS RAÍCES DE TRIGO.

Con el objetivo de confirmar o descartar la participación de CdgD durante el proceso de colonización de *A.brasilense* Sp245 a las raíces de la planta de trigo, se llevó a cabo un ensayo de colonización, utilizando la cepa creada FPDm1, la cual

presenta una fusión transcripcional y la cepa *A.brasilense*T7mChe como control negativo. En este ensayo se inocularon ambas cepas por separado a plántulas de trigo y se evaluó la expresión de *cdgD* por medio la expresión de la proteína mCherry cuya fluorescencia es de color rojo, como se indica en la sección de métodos. Este ensayo se llevó a cabo en placas fluorodish, la ventaja de usar estas placas es que nos permite evitar la manipulación de la planta para poder observar al microscopio, con estas placas podemos acoplarlas perfectamente al microscopio y observar las muestras sin necesidad de realizar cortes o tomar las raíces con las manos. Los resultados de este ensayo se muestran a continuación.

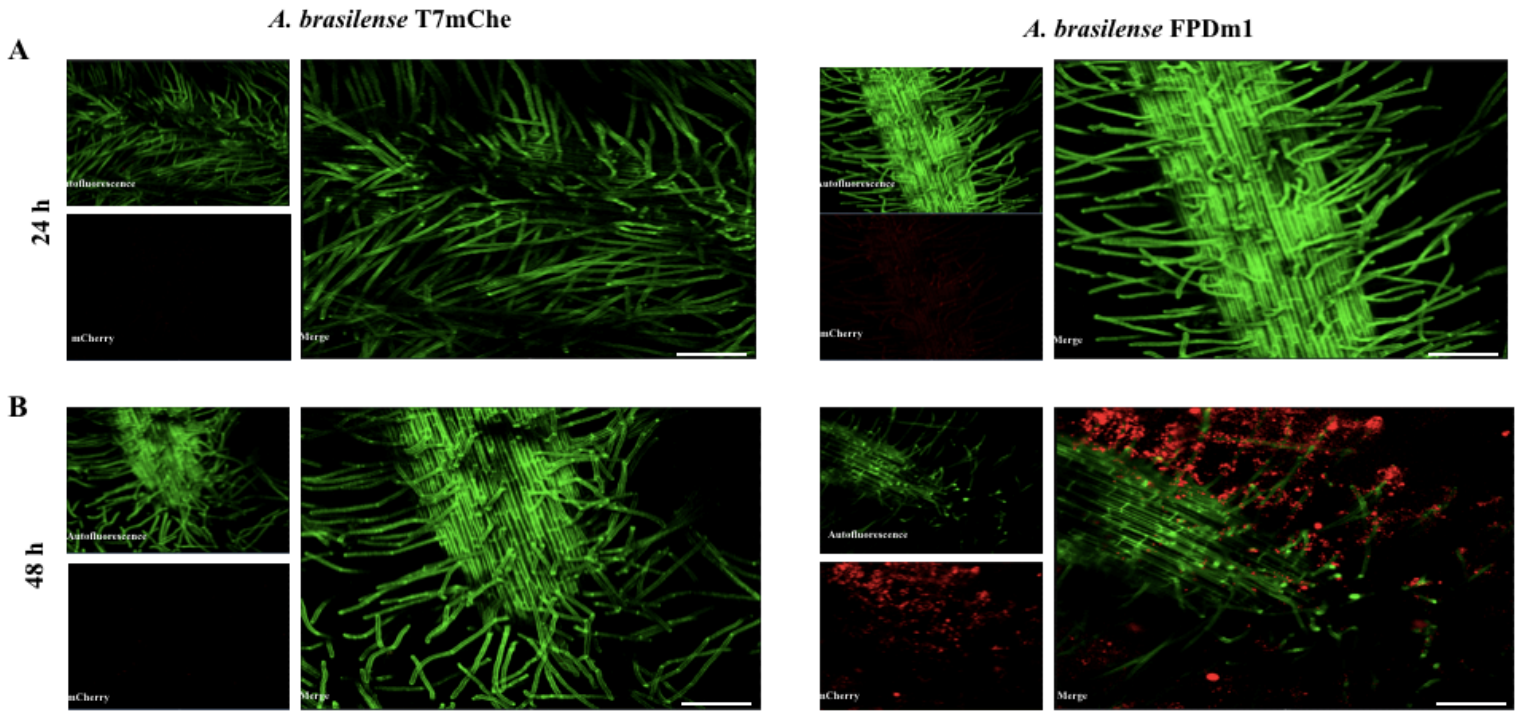


Figura 48. Ensayo de expresión del gen *cdgD* en asociación con la raíz **(A)** 10 horas y **(B)** 48 horas. Expresión de la fusión trasncripcional (FPDm1) de células de *A.brasilense*, inoculadas en solución hidropónica junto con plantas de trigo. Para la visualización de mCherry, se observaron las raíces de las plantas a las 24 horas y 48 horas post – inoculación. A la izquierda, raíces de trigo de plántulas inoculadas con la cepa de control *A. brasilense* T7mCh. Derecha, raíces de plántulas de trigo inoculadas con la cepa *A. brasilense* FPDm1. Las células que exhiben fluorescencia de mCherry se visualizaron usando un CLSM con una longitud de onda de excitación de 561 nm, con emisión de fluorescencia capturada entre 585 nm y 615 nm. Posteriormente, las imágenes se editaron utilizando los elementos NIS estándar en el software Nikon.

Analizando los resultados obtenidos de los ensayos de interacción de FPDm1 y *A.brasilense*T7mChe con las raíces. Se observa que a las 24 horas de interacción post-inoculación, de las cepas con las raíces, en ambos casos no presentan fluorescencia, indicando que aun no hay expresión de *cdgD* y el control negativo de igual forma no se observa fluoresencia roja, lo cual es lo esperado (Figura 48 A). A las 48 horas post-inoculación se observa que FPDm1 comienza a presentar una fluorescencia roja, lo que es indicativo de que *cdgD* se está comenzando a expresar, mientras que el control

negativo permanece sin cambios en la fluorescencia (Figura 48 B), lo cual nos da certeza de que la fluorescencia roja presente en los ensayos con FPDm1, es producto de la expresión de *cdgD*. Con este ensayo podemos asegurar que *cdgD* se esta expresando en interacción con la raíz de la planta y por consecuencia CdgD esta participando en el proceso de colonización de *A. brasilense* Sp245 hacia las raíces de las plantas a partir de las 48 horas de interacción. Los datos obtenidos en este ensayo fueron de gran relevancia para la investigación, ya que se logró registrar y ubicar la expresión del gen *cdgD* en tiempo real en la periferia de las raíces, es de importancia recalcar que existen pocos ensayos de este tipo, en donde se puede evaluar los niveles de expresión en tiempo real y en las condiciones mas cercanas a las naturales, sin alterar las condiciones del sistema vegetal.

8.9. ENSAYOS DE COLONIZACIÓN DE RAÍCES DE PLANTAS DE TRIGO.

Sé decidió evaluar la colonización de la raíz de la planta de trigo con las cepas *A.brasilense* Sp245, la mutante por inserción de *cdgD* 12-A, la cepa complementada C56A y la cepa control C40A, la cual presenta el plásmido vacío en el fondo genético de la mutante 12-A. Para este ensayo se realizó bajo dos condiciones de colonización, la primera fue en solución hidropónica (Figura 49) y la segunda fue usando suelo de uso agrícola del estado de Puebla como sustrato (Figura 50), los detalles de este protocolo se encuentran en la sección de métodos. En las siguientes figuras se presentan los resultados de estos ensayos.

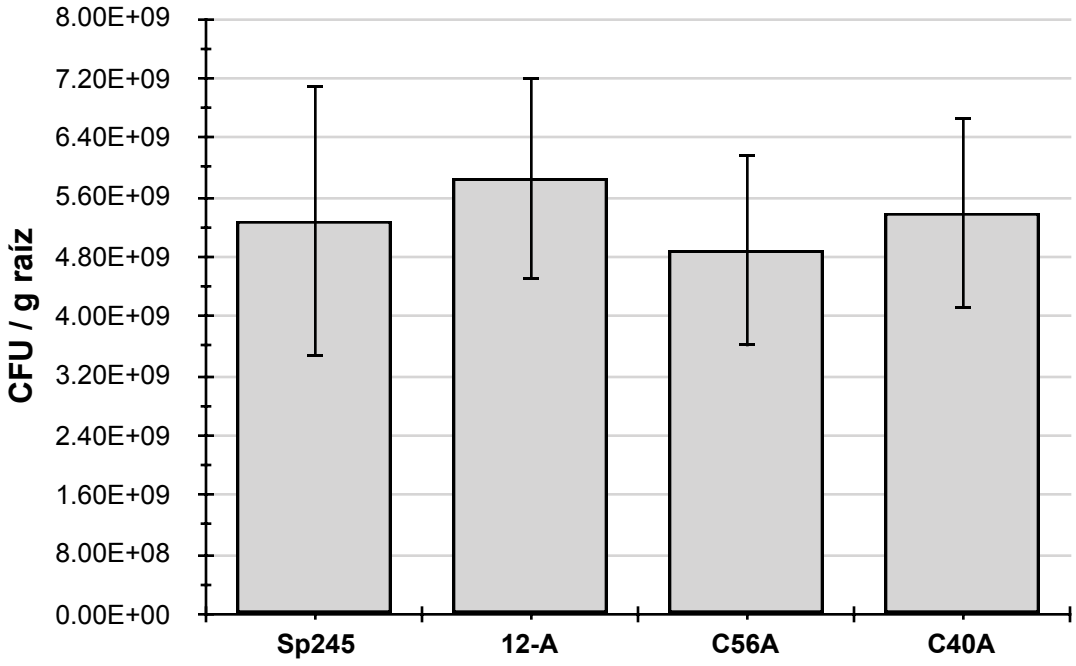


Figura 49. Ensayos de colonización de planta de raíz de trigo. Colonización de la raíz, usando condiciones de crecimiento en solución hidropónica, descritas en la sección de métodos El resultado corresponde el análisis de seis plantas inoculadas con cada las cepas **Sp245**, **12-A**, **C56A** y **C40A**, con aproximadamente 7 x 10^7 ufc/mL, se presenta el resultado de tres ensayos independientes, con la desviación estándar respectiva.

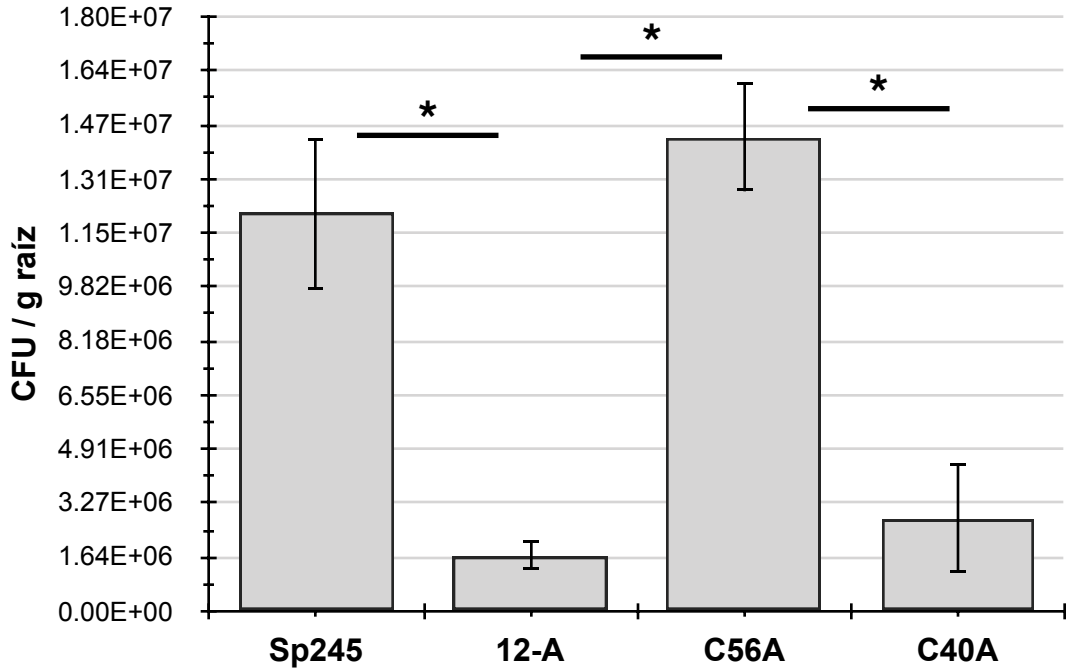


Figura 50. Ensayos de colonización de planta de raíz de trigo. Colonización de la raíz, usando condiciones de crecimiento en suelo, descritas en la sección de métodos El resultado corresponde el análisis de seis plantas inoculadas con cada las cepas **Sp245**, **12-A**, **C56A** y **C40A**, con aproximadamente 7 x 10^7 ufc/mL, se presenta el resultado de tres ensayos independientes, con la desviación estándar respectiva.

Con base a los resultados obtenidos de los ensayos de colonización en solución hidropónica, presentados en la figura 49, se aprecia que las cepas evaluadas, no presentan diferencias significativas en los valores de colonización de la raíz de la planta de trigo, este resultado pudo haberse presentado debido a las fáciles condiciones de colonización que presenta la solución hidropónica, ya que la bacteria puede movilizarse fácilmente a través del medio líquido, favorece la movilización y el contacto con la raíz de la planta. En contraste, en el segundo experimento, donde se utilizaron condiciones de colonización relativamente mas naturales, usando suelo estéril de cultivo como sustrato, los resultados fueron contrastantes, en la figura 50 observamos que la cepa mutante 12-A se encuentra afectada en la colonización de la raíz y a su vez la cepa complementada C56A recupera el fenotipo de colonización a niveles incluso superiores que la cepa silvestre *A. brasilense* 245. Con estos resultados, nos esta reforzando la teoría de que este gen es de importancia en el proceso de colonización, debido a que observamos que se esta expresando a las 48 horas en interacción con las raíces de las plantas y observamos una disminución en la colonización, cuando esté gen se encuentra mutado. Los datos de colonización fueron corroborados por medio de microscopia confocal, ya que contamos en el laboratorio con las cepas *A.brasilense* Sp245, 12-A, C56A y C40A marcadas con la proteína autofluorescente mCherry. Los resultados se muestran a continuación.

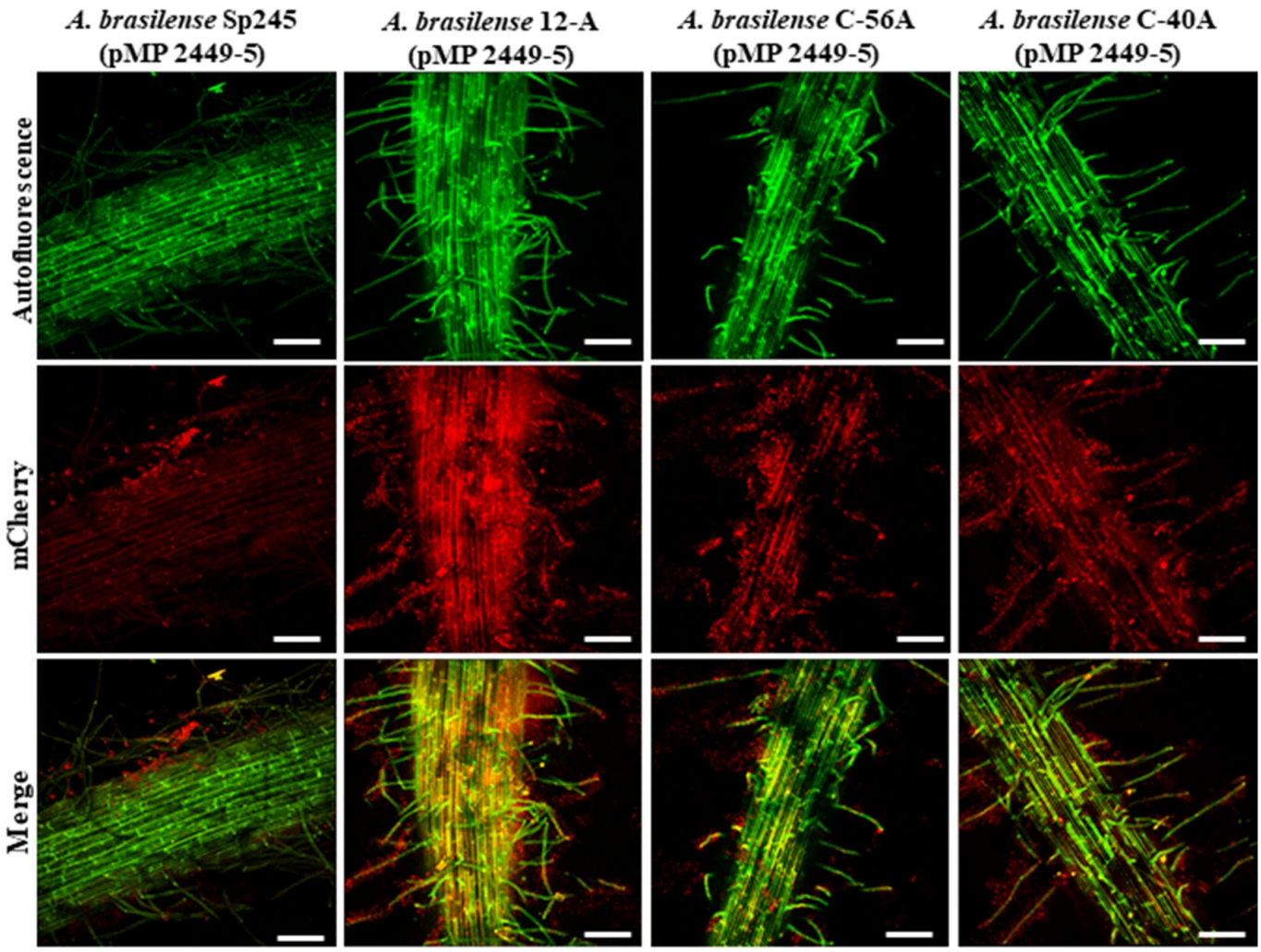


Figura 51. Ensayos de colonización (bacteria - planta), de las cepas marcadas con la proteína fluorescente mCherry **Sp245**, **12-A, C56A y C40A** evaluadas a las 48 horas de interacción con la raíz.

Observando los resultados obtenidos en la figura 51, vemos diferentes patrones de colonización, para la cepa WT, vemos un patrón en donde las bacterias, parecieran encontrarse sobre la superficie de la raíz, posiblemente se encuentren internalizando hacia la raíz de la planta, el mismo efecto es observable con la cepa C56A, en contraste vemos los resultados de la cepa 12-A, en donde la fluorescencia roja pareciera encontrarse mas intensa y dispersa a lo largo de la raíz, pareciera que la cepa 12-A, presenta dificultades para poder internalizar a la raíz, con estos resultados y los anteriores ensayos de colonización, podemos reforzar la idea de que la cepa 12-A se encuentra disminuida en la capacidad de colonizar la raíz.

8.10. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES CELULARES DE di-GMPc.

Con el objetivo de analizar el efecto de la mutante del gen *cdgD A. brasilense* 12-A y comparar lo con las cepas silvestre *A. brasilense* Sp245, y la mutante

complementada *A. brasilense* C56A procedimos a determinar los niveles intracelulares del di-GMPc. Para lo cual se empleó el plásmido reportero pFY4535 donde el riboswitch detecta los niveles del segundo mensajero. Este análisis se realizó cuantificando la intensidad de fluorescencia del riboswitch, derivado del cociente de la intensidad de Turbo RFP y AmCyan , el cual es directamente proporcional a los niveles intracelulares de di-GMPc. Para este ensayo se trabajaron con dos plásmidos, que contienen el riboswitch (Figura 52).

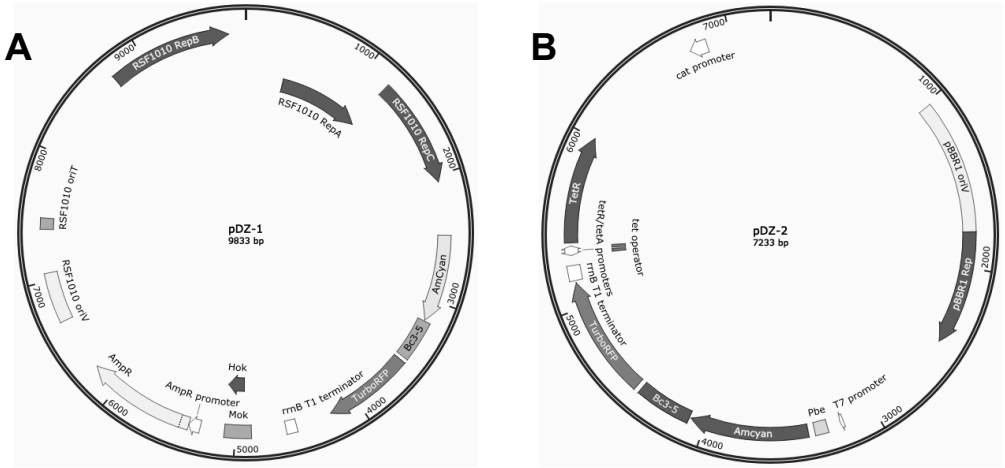


Figura 52. Mapa de los plásmidos que contienen el riboswitch **(A)** pDZ-1 y **(B)** pDZ-2.

Para efectos prácticos del ensayo, se decidió trabajar con el plásmido pDZ-1(pFY4535), por lo cual se transformaron con este plásmido las cepas Sp245, 12-A, C56A y C40A, posteriormente se realizaron observaciones al microscopio de fluoresencia, para detectar una intensidad de señal homogénea de las cepas, las cuales se ven de la siguiente manera (Figura 53).

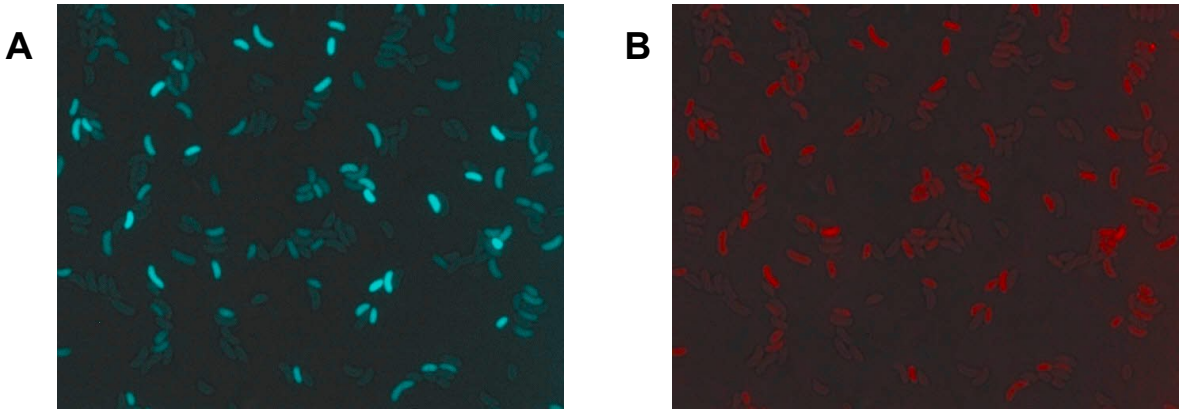


Figura 53. Micrografias de un cultivo de *A.brasilense* Sp245 con el plásmido pDZ-1 (pFY4535) usando Confocal laser scanning microscopy (CLSM) Inverted CLSM (Nikon C2+ confocal microscope system). **(A)** AmCyan y **(B)** Turbo RFP.

Una vez que se corroboró que las cepas presentan fluorescencia (Anexo 8), se evaluaron los niveles de di-GMPc de cultivos en condiciones de agitación, fijándolas en agar suave (Métodos), los resultados se muestran a continuación.

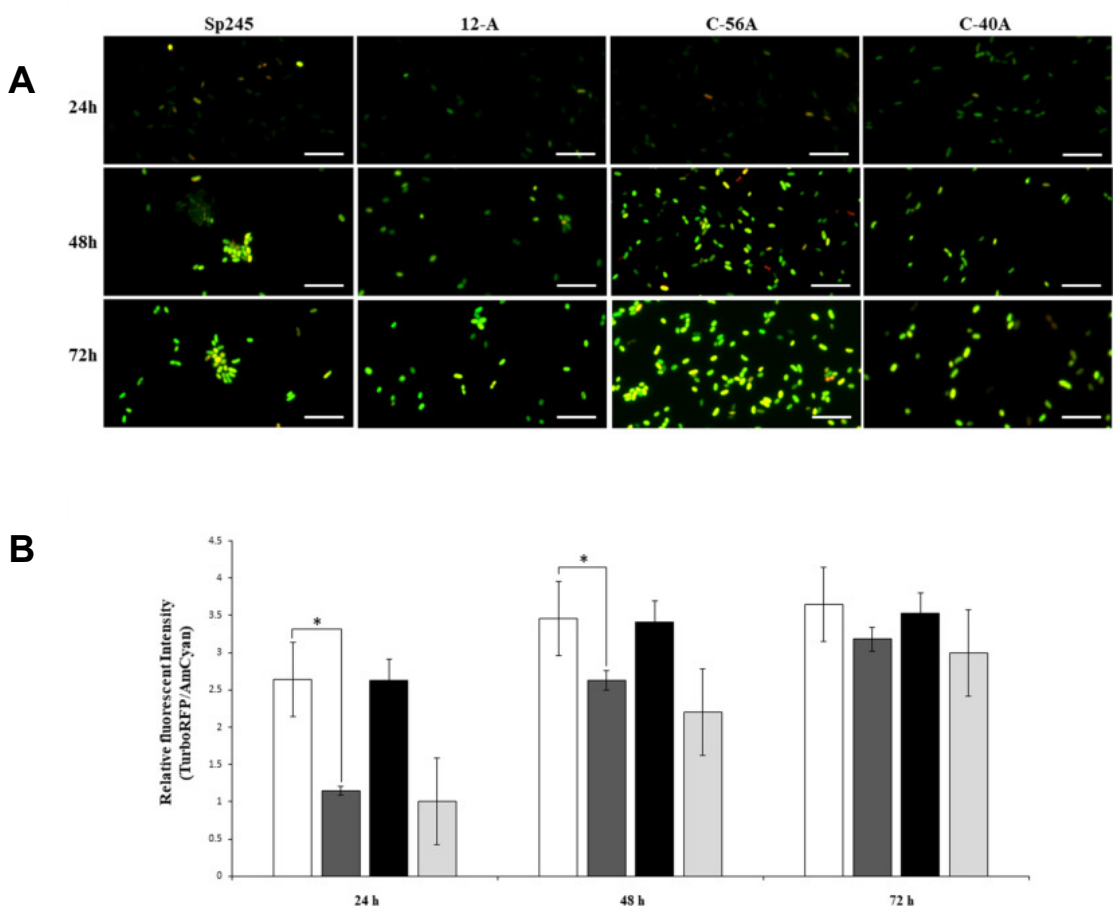


Figura 54. Determinación de los niveles intracelulares del di-GMPc. Las cepas de *A. brasilense* Sp 245 (Blanco), 12-A (Gris obscuro), C56A (Negro) y C40A (Gris claro). Contienen el biosensor de c-di.GMP (pFY4535), éstas se crecieron en medio NFB*+KNO_3 y 30 ug/ml de Gm e incubadas por 24, 48 y 72 h a 30 ºC en agitación. Las cepas fueron fijadas a la superficie de un cubreobjetos y se sellaron con un tapón de agar al 1 %. Las imágenes de las células se tomaron a las 24, 48 y 72 h después de la inoculación utilizando un microscopio Nikon TE2000U equipado con un objetivo 100X. B. El RFI representa la relación entre las intensidades de fluorescencia de TurboRFP y AmCyan y es directamente proporcional a los niveles de c-di-GMP. Los valores de RFI representan las desviaciones estándar de tres réplicas biológicas y son diferencias significativas indicadas en * P <0.05 usando la prueba t de Student.

En la figura 54 B podemos observar el resultado del cociente de la intensidad de fluorescencia de TurboRFP sobre la intensidad de fluoresencia de AmCyan, este cociente es directamente proporcional a la cantidad presente de di-GMPc. Como era de esperar la cepa mutante 12-A mostró una disminución en los niveles de di-GMPc en comparación con la cepa silvestre *A.brasilense* Sp245. Se observó una reducción de aproximadamente un 61% y 24% en los niveles del di-GMPc de la cepa 12-A en comparación de los cultivos de *A.brasilense* Sp245 a las 24 y 48 horas respectivamente. Esta disminución del segundo mensajero se recupera a las 72 horas,

potencialmente debido a los efectos compensatorios de otras proteínas DGC que se encuentran presentes en el genoma de *A.brasilense* Sp245. Por otra parte, la cepa complementada C56A no presenta diferencias significativas en la producción de di-GMPc respecto a la cepa silvestre y el control C40A con el plásmido vacío presenta un comportamiento similar a la mutante 12-A. De manera preliminar se comenzó con la estandarización de la técnica de cuantificación de di-GMPc en condiciones de formación de biopelícula, para la cual por fines de conveniencia del ensayo, se utilizó el plásmido pDZ-2. Se obtuvieron algunos resultados preliminares, los cuales se decidieron no publicar por el momento, hasta que la técnica de cuantificación de di-GMPc en formación de biopelícula en condiciones estáticas sean las idóneas. Estos primeros resultados se muestran en la sección de anexos (Anexo 9).

8.11. ANÁLISIS ESTRUCTURAL DEL DOMINIO CHASE DE LA PROTEÍNA CdgD.

Para realizar el análisis del dominio CHASE se emplearon varias plataformas bioinformáticas, las cuales se describen en la sección de materiales y métodos. Para comenzar se realizó una búsqueda bibliográfica sobre estudios y modelajes previos del dominio CHASE como punto de partida, en donde encontramos que este dominio fue purificado y cristalizado por primera vez en *A. thaliana* por Horton (Hothorn et al. 2011). Este dominio fue descrito como parte de la proteína cinasa histidínica AHK4, los autores infieren que pudiera estar formando un homo - dímero asimétrico, el cual, cada monomero está conformado por dos regiones PAS-like y una alfa hélice (Figura 55 A). Es importante señalar que el cristal correspondiente AHK4 de *A. thaliana* presenta una resolución de 1.7 Å. Respecto a la función y sitio activo de CHASE en esta proteína, los autores proponen que este dominio une a la fitohormona citocinina, mediante puentes de hidrógeno con Asp262 en una de las regiones PAS-like (Hothorn et al. 2011) (Figura 55 B). Posteriormente Lomin demostró, la interacción de las cinasas histidínicas AHK4, AHK3 y ZmHK1 de *A. thaliana* a la trans-zeatina, precursor de las citocininas y péptidos pequeños (Lomin et al; 2015).

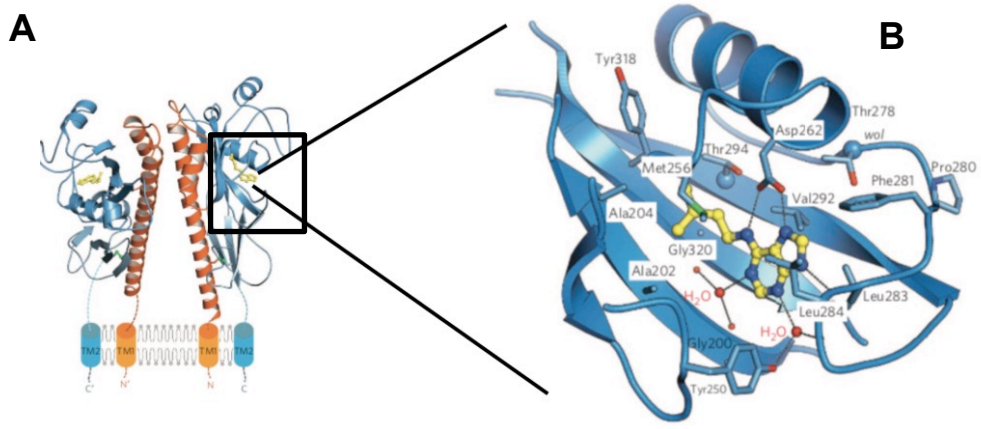


Figura 55. Modelaje estructural del dominio CHASE de *A.thaliana* **(A)** Homodimero de CHASE de la proteina AHK4 de *A.thaliana* **(B)** Sitio activo del homodimero de CHASE, presente en la región PAS-like (Hothorn *et al*. 2011)

Tomando estos antecedentes en consideración, aunado a que tanto la cinasa histidínica AHK4 como CdgD presentan dos dominios transmembranales que flanquean al dominio CHASE (Figura 56 A), se decidió evaluar la viabilidad de emplear al cristal de AHK4 como plantilla en el análisis estructural del dominio CHASE de *A. brasilense* Sp245.

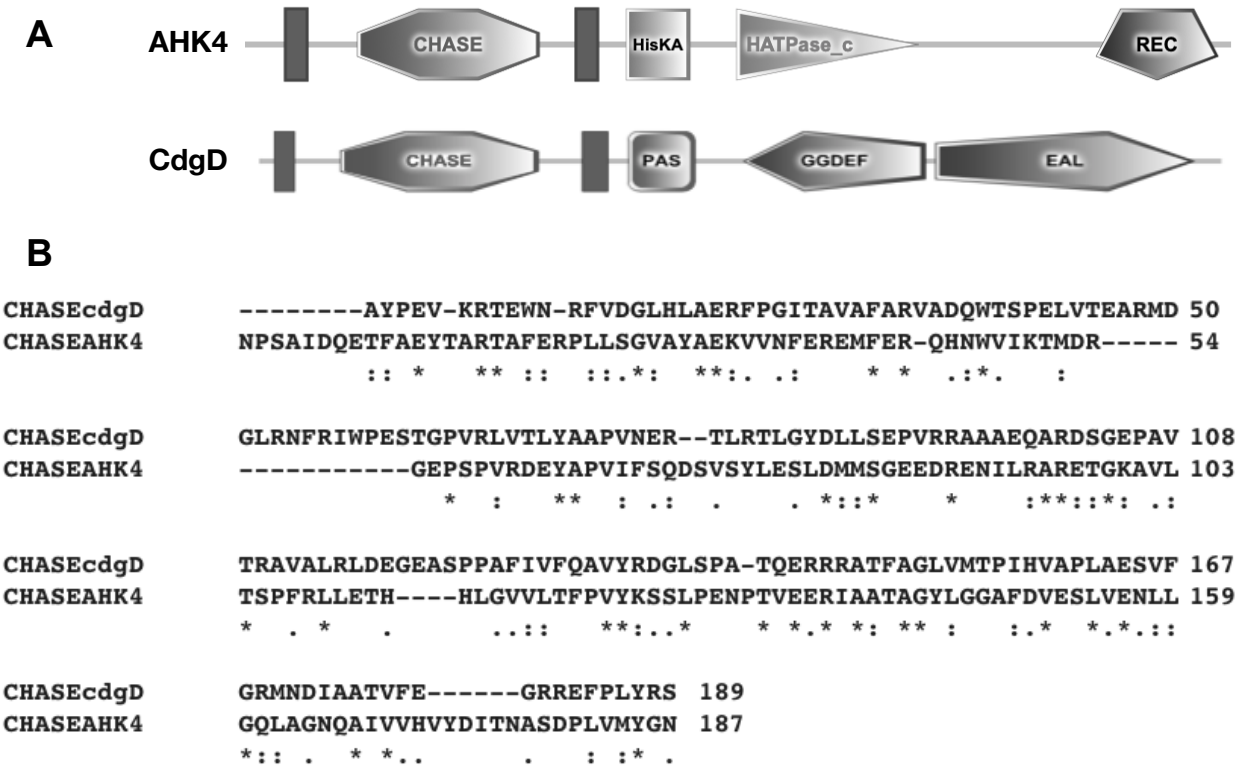


Figura 56. Análisis del dominio CHASE. **(A)** Representación grafica de los dominios presentes en las proteínas AHK4 de *A.thaliana* y CdgD de *A.brasilense* Sp245. **(B)** Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de los dominios CHASE de las proteínas AHK4 y CdgD.

En la figura 56 A, podemos observar que el dominio CHASE de AHK4 y CdgD, son muy parecidos, ya que ambos presentan regiones transmembranales en sus extremos, otra característica importante, es que el tamaño de estos dominios es muy similar, de 189 aa para CdgD y de 187 aa para AHK4, lo cual nos da una ligera certeza de que pudiera funcionar como plantilla para el modelaje de CHASE CdgD. Para reforzar el análisis, se realizó un alineamiento de cada dominio (Figura 56 B), en el cual observamos que existe entre ambos dominios un porcentaje de similitud del 21 %, lo cual se considera bajo, esperando que presentaran un mayor porcentaje de similitud. Sin embargo, en muchos casos, proteínas presuntamente homólogas, presentan una estructura secundaría muy diferentes entre ellas, pero al revisar la estructura terciaria, presentan un alto grado de similitud, por ellos decidimos realizar el modelaje del monomero de

CHASE de AHK4 y del monomero de CHASE de CdgD, mediante el uso de I-TASSER y CHIMERA (Materiales y Métodos), con el objetivo de evaluar el grado de similitud de ambos dominios, en la figura 57 se observan los resultados.

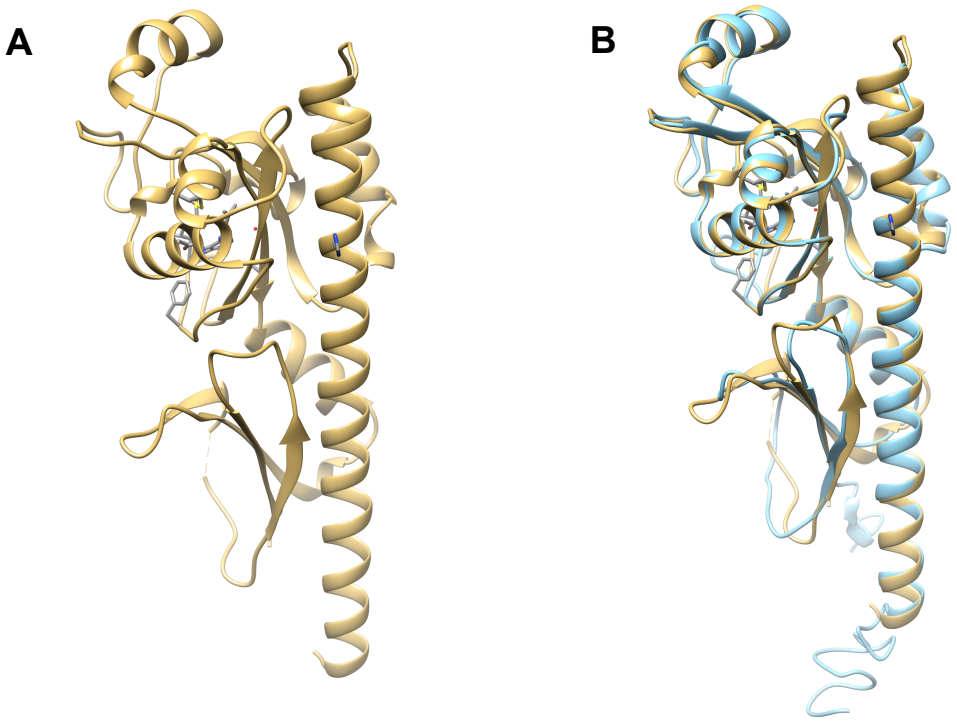


Figura 57. Modelaje de monomeros del dominio CHASE. **(A)** Modelaje del monomero de CHASE (3T4J) de AHK4 **(B)** Superposición del modelo del monomero CHASE de CdgD (Azul) sobre el monomero de CHASE (3T4J) de AHK4 (amarillo).

En la figura 57 A, observamos el modelaje del monomero de CHASE de AHK4 (amarillo), con el cual fue comparado el modelaje del monomero de CHASE de CdgD (Figura 57 B azul), para el que se obtuvieron los siguientes valores: RMSD=1.09, un TM escore de 0.9, estos valores nos están indicando que el modelaje de CHASE de CdgD fue de buena calidad y confiable. Con el objetivo de determinar el porcentaje de similitud entre ambos dominios, se realizó un alineamiento de la estructura terciaria (Figura 57 B), en donde observamos una superposición de los dominios CHASE (AHK4 amarillo y CdgD azul), con esto pudimos determinar que presentan un ~80% de similitud entre ellos, este porcentaje se considera un valor bastante alto y nos da certidumbre de poder decir que ambos dominios son iguales a nivel de estructura terciaría. Continuando con el análisis de estos dominios, se realizó el modelaje del homo-dimero para el CHASE de CdgD, debido a que esta reportado que los dominios CHASE funcionan como homo-dimeros (Hothorn *et al*. 2011) y así poder evaluar y

comparar el acomodo y la arquitectura global de ambos monomeros y analizar el grado de similitud que existe entre el homo dimero cristalizado de CHASE de AHK4 con el CHASE de CdgD. En la imagen 58, se observa el resultado del modelaje de el homo - dimero.

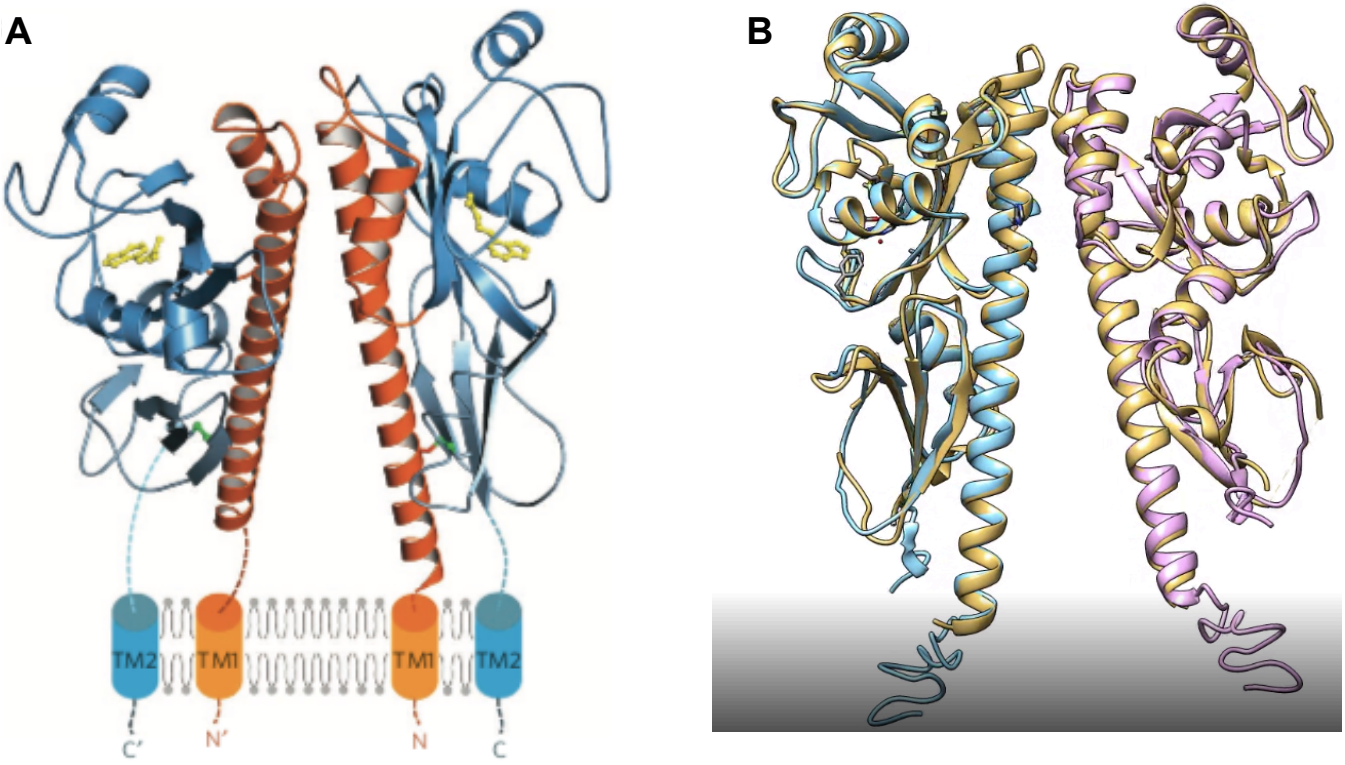


Figura 58. Modelaje de homo-dimeros **(A)** Homo-dimero de CHASE de AHK4 (Hothorn *et al*. 2011) **(B)** Homodimero de CHASE de CdgD.

En la imagen 58, podemos observar que la arquitectura de ambos homo-dimeros, tanto de AHK4 y CdgD, los cuales son muy similares, con un porcentaje de identidad global de ~80%, lo que lo convierte en un modelaje confiable. Se pude inferir que el dominio CHASE de CdgD, pudiera estar presentando funciones similares a las reportadas anteriormente para CHASE de AHK4, como lo son: (Sensado de citocininas y sus precursores, así como peptidos pequeños).

9. DISCUSIÓN.

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB), representan uno de los temas de mayor interés en la actualidad, debido a su capacidad para mejorar el rendimiento en los cultivos (Saharan & Nehra, 2011). Dentro de las PGPB, uno de los géneros de mayor interés es *Azospirillum*, debido a la gran variedad de beneficios que le confiere a la planta entre los que destacan la producción de fitohormonas, la fijación del nitrógeno, la protección ante patógenos y ante diversos tipos de estrés (Pedraza *et al*, 2020). Los beneficios que le otorga *Azospirillum* a la planta dependen de un exitoso mecanismo de colonización, para lo cual, inicialmente la bacteria se adhiere de manera permanente a las raíces de las plantas y la forma en que esta bacteria mantiene dicha interacción es mediante la formación de biopelículas (López *et al* 2010, Viruega *et al.,* 2020) La formación de la biopelícula es un proceso altamente regulado por el segundo mensajero (3´5´) guanosín-monofosfato-cíclico (di-GMPc) del cual depende en gran medida la transición del estilo de vida móvil (planctónica) a sésil (biopelícula) de la bacteria (López *et al* 2010, Pérez-Mendoza & Sanjuán 2019, Muriel *et al,* 2018). Los niveles de di-GMPc están regulados por enzimas con actividad de diguanilato ciclasa (DGC) y/o fosfodiesterasa (PDE), que participan en su síntesis y degradación, respectivamente (Romling *et al.,* 2017). A la fecha, distintos trabajos han ampliado el conocimiento respecto a la función de genes que codifican para proteínas responsables de la biosíntesis y degradación del diGMPc y su participación en la colonización a la planta en distintos géneros bacterianos, sin embargo, no existen reportes de este tipo en *Azospirillum* (Schäper *et al*, 2015, Matilla *et al*, 2011, Little *et al.,* 2019).

En el presente trabajo utilizamos como modelo de estudio a *A. brasilense* Sp245, para conocer las bases moleculares de la función del gen *cdgD* que codifica para una proteína híbrida con presunta actividad como DGC. El estudio se realizó bajo condiciones planctónicas y de formación de biopelícula, para posteriormente evaluar su asociación a raíces de trigo. Inicialmente, se evaluó la expresión del gen *cdgD* en la fase estacionaria y exponencial de crecimiento, mediante RT-PCR en presencia de KNO_3 o NH_4Cl como fuentes de nitrógeno en agitación y en condiciones estáticas, además de utilizar a la cepa *A. brasilense* FPDm1 y T7mCh para evaluar dicha expresión mediante fluorescencia. Los resultados mostraron qué en ambos medios, la expresión del gen *cdgD* fue iniciada a las 10 horas y se continuó hasta las 48 horas, en ambas condiciones de crecimiento, lo que indica que la expresión de genes se da al principio del crecimiento bacteriano y continúa hasta la etapa de crecimiento tardía (Figura 36 y 42). La cantidad de fluorescencia producida fue alta en células crecidas en KNO_3 comparado con el NH_4Cl, indicando que la adición de KNO_3 en el medio, incrementa los niveles de expresión relativos de aquellos obtenidos en el medio con NH_4Cl, en el cual la expresión fue incrementada cuando la estructura del biofilm fue

madura (48 horas) (Figura 42). El aumento en la formación de biopelícula en presencia de KNO_3 ha sido reportada anteriormente por Arruebarrena y colaboradores quienes proponen que como resultado de la desnitrificación del KNO_3, la presencia de NO es alta, lo que promueve una mayor formación de biopelícula (Arrebarrena *et al.*, 2013, Singh, *et al.,* 2017). Estos datos indican un papel relevante respecto a la fuente de nitrógeno en la regulación de la expresión génica, la cual puede ser directa o indirecta. Aunado a esto, los datos obtenidos se correlacionaron con la producción de biopelícula (Figura 45), sugiriendo que la CdgD tiene actividad de DGC bajo condiciones estáticas, considerando los elevados niveles celulares de di-GMPc que se observan en la cepa silvestre versus la mutante (Figura 54). Tomando en cuenta estos resultados, se sugiere que la regulación del gen *cdgD* a partir de la fuente de nitrógeno podría ocurrir a nivel transcripcional con la participación de la CdgD como DGC o PDE o ser regulada a nivel postraduccional como se ha observado en otras bacterias (Jones *et al.,* 2015, Matilla *et al.*, 2011, Little *et al.,* 2019). En este sentido, un ejemplo interesante es el de la proteína GlnZ, la cual interactúa con proteínas relacionadas con la síntesis o degradación del di-GMPc, actuando como un regulador maestro. En *A. brasilense* Sp7 se ha descrito que interactúa con una DGC (G8AME0) y una proteína híbrida (G8ATR8) (Gerhardt *et al.*, 2020). Esto toma relevancia debido a que GlnZ se encuentra controlando la función de estas proteínas en presencia de NH_4Cl, pudiendo tener implicaciones en la reducción de formación de biopelícula cuando ésta es crecida en NFB*+NH_4Cl, por la presencia o ausencia de distintos exopolisacaridos que alteren la formación de esta estructura (Okon *et al*., 2012).

Por otra parte, analizando las imágenes obtenidas del crecimiento con las dos fuentes de nitrógeno, observamos diferencias en la agregación de las células. Las células en crecimiento a las 48 horas presentaron en el medio NFB*+NH_4Cl agregación no uniforme sino pequeños agregados individuales, diferente a lo observado al mismo tiempo en el medio NFB*+KNO_3 donde observamos agregación uniforme (Figura 43 y 44). Estos resultados indican la agregación de las células probablemente por la presencia de las sustancias poliméricas extracelulares (Römling *et al*., 2013; Wang *et al*., 2017) importantes contribuyentes a la formación de la matriz de la biopelícula, como se describió previamente (Okon & Burman, 2012). Estas diferencias metabólicas, nos conducen a sugerir que los patrones de expresión diferentes del gen *cdgD*, en respuesta a la presencia en el medio de cultivo adicionado con fuentes de nitrógeno diferente. Tal efecto se refleja en la cuantificación de la producción de biopelícula por el método del cristal violeta y ésta normalizada con la determinación de proteínas totales como se anota en la Figura 45, donde la mayor producción de biopelícula se obtiene en el cultivo adicionado con KNO_3. Estas diferencias metabólicas ya descritas sugieren un efecto diferencial en el crecimiento de la bacteria. Ante la persistencia de altas concentraciones de oxígeno las células móviles de *A. brasilense* se aglomeran por

interacciones célula a célula mediante la adhesión transitoria en el polo no flagelado y de persistir estas condiciones la agregación es más estable y las células permanecen adherentes durante más tiempo. La agregación es un requisito para la floculación, un proceso en el cual las células vibroides de *A. brasilense* se convierten en células redondas inmóviles al interior de una matriz densa de exopolisacaridos. Inicialmente la agregación de *A. brasilense* es causada por la función modificada de la vía de señalización de quimiotaxis Che1 en donde participa la proteína de señalización de aerotaxis Tlp1 anclada a la membrana y con un dominio citoplasmático PilZ que une a el segundo mensajero di-GMPc (Russell *et al*., 2013; Bible *et al*., 2015).

Los datos mostrados previamente, sugieren que la CdgD es capaz de sintetizar di-GMPc y que su función es importante en la formación de biopelícula. En este trabajo, se estimaron los niveles intracelulares del di-GMPc en la cepa silvestre (Sp245), mutante (12-A) y la complementada (C56A) utilizando un reportero fluorescente. Estos análisis fueron realizados cuantificando la intensidad de fluorescencia de un riboswich, el cual es directamente proporcional a los niveles del di-GMPc. Como era de esperarse, en la mutante se identificó un nivel bajo de di-GMPc comparado con la cepa silvestre. Estos datos muestran una reducción del 61% y del 24% a las 24 y 48 horas, respectivamente, el cual fue completamente recuperado en la cepa complementada (Figura 54). Sin embargo, no hubo diferencia significativa en los niveles de di-GMPs comparados con la WT en las células tras 72 horas de crecimiento, posiblemente por los efectos compensatorios de otras DGC presentes en el genoma de *A. brasilense (*Ramirez-Mata *et al*, 2018). En concordancia con los datos obtenidos en la producción de biopelícula, la mutante reduce los niveles del di-GMPc de células en crecimiento en medio NFB*+KNO_3. Estos datos indicaron que la sobreexpresión de la CdgD provoca un aumento en el nivel temporal intracelular del di-GMPc en *A. brasilense*. En un estudio previo realizado *in silico* por Ramirez-Mata y col en 2018, se identificó que la proteína CdgD es una proteína híbrida ya que contiene los dominios GGDEF y EAL en su estructura, y que además todos los aminoácidos del motivo EAL están conservados. En este sentido, los análisis de fenotipos presentes en este estudio fueron incapaces en mostrar que la CdgD funcione como una PDE, por lo que se sugiere realizar estudios enfocados a evaluar la presencia del dominio EAL en la proteína de estudio. Por otro lado, para visualizar la localización de la CdgD *in vivo*, se fusionó el gen mCherry rio arriba del promotor del gen *cdgD (*cepa *A. brasilense* FPDm1) y se evaluó la participación de la proteína DgcD en la colonización a raíces de trigo bajo condiciones hidropónicas y utilizando la cepa T7mCh como control. Esta estrategia permitió observar que en las raíces de las plántulas de trigo, la cepa *A. brasilense* FPDm1 a las 48 horas post inoculación, mostró niveles de fluorescencia significativa, en donde por un lado se observan microcolonias en el rizoplano, lo cual se considera

un paso preliminar en la formación de la biopelícula, y por el otro, zonas con un biofilm maduro, mostrando que además de la exitosa expresión del gen *cdgD,* la proteína que codifica este gen participa en la formación de biopelícula en las etapas tempranas de colonización (48 horas) y que la bacteria es capaz de ingresar a las raíces y colonizar el apoplasto. Estos resultados sugieren que la formación de biopelícula es estimulada como respuesta a la colonización de la rizósfera, mecanismo que coincide con los datos obtenidos en *Pseudomonas fluorescens*, en la cual los genes involucrados en el metabolismo del di-GMPc son expresados durante la colonización de la rizósfera de trigo (Litle *et al*., 2019; Muriel *et al*., 2018), así como en *Pseudomonas putida* KT2440, en la cual el promotor del gen *rup4959* que codifica para una proteína dual GGDEF-EAL se expresa en la rizósfera de plantas de maíz y es regulado por los exudados radiculares de la planta (Matilla *et al.*, 2011). En este sentido, no se tienen reportes previos sobre la expresión de un gen que codifique para una proteína híbrida de *A. brasilense* Sp245 en interacción con las raíces de las plantas, y en donde se pueda evaluar los niveles de expresión en tiempo real, por lo que los aportes de esta estrategia experimental, han permitido relacionar la participación de una proteína con función de DGC en la colonización de *A. brasilense* a las plantas.

Diversos trabajos proponen que los dominios GGDEF y EAL presentes en proteínas que participan en la biosíntesis y degradación del di-GMPc, a menudo albergan una amplia gama de dominios adicionales que son importantes para la función bioquímica (Zhang *et al.,* 2019, Yang *et al.*, 2019, Tiag *et al.,* 2011). La ocurrencia de estos dominios ha sido observada en otras proteínas híbridas, los cuales modulan la función dual de las proteínas con actividad DGC-PDE (Tarutina *et al.,* 2006, Feirer *et al.,* 2015). Por ejemplo, en *Xanthomonas oryzae pv. Oryzae*, una de las bacterias fitopatógenos de mayor impacto en los cultivos de arroz, han sido identificadas a través de análisis bioinformáticos, 23 proteínas con dominios GGDEF-EAL asociadas a diversos dominios sensores (CHASE, PAS, REC, CACHE, GAF, HAMP, entre otros) que modulan su actividad como DGC y/o PDE. Estas proteínas regulan diversos procesos celulares como virulencia, producción de exopolisacaridos, formación de biopelícula, movilidad y adaptación a nivel transcripcional, postraduccional o de interacción proteína-proteína (Yang *et al*., 2019). El dominio CHASE (cyclases/histidine kinases associated sensing extracelular), es un dominio periplásmico definido como un dominio sensor y se considera juega un papel vital en el reconocimiento de moléculas pequeñas en una amplia gama de proteínas y receptores de quimiotaxis (Mougel & Zhulin 2001, Schirmer, 2016) y el cual podría actuar también como un dominio de unión a ligando (LBD) (Ortega, 2017). Por ejemplo, en *P. aeruginosa* la proteína PA0847 con función de DGC, contiene en su estructura dominios adicionales del tipo CHASE, HAMP, PAS y GGDEF, y de los cuales el dominio PAS es requerido para la correcta función del

dominio GGDEF. PA0847 responde a la presencia de diversos aminoácidos como valina, arginina, fenilalanina e isoleucina, por lo que se proponen que la respuesta a estos nutrientes posiblemente está dada por la presencia del dominio CHASE, actuando como un sensor de amplio espectro (Zhang *et al.,* 2019). En un análisis realizado en *L. enzymogenes*, la proteína Le0082 posee una de las actividades como DGC mas intensas en este modelo de estudio y es la única que en su estructura posee un dominio CHASE unido a cuatro dominios transmembranales y seguidos de un dominio conservado GGDEF, lo que podría otorgarle al dominio CHASE un rol vital en la función como DGC de esta proteína (Ren *et al.*, 2020).

Análisis *in silico* previos al presente trabajo, permitieron identificar la naturaleza estructural de la proteína CdgD (Ramirez *et al.*, 2018), la cual esta constituida por un dominio CHASE flanqueado por dos dominios transmembranales (TMD), en la región N-terminal y un dominio PAS, un dominio GGDEF y un dominio PDE en el extremo C-terminal (Figura 58), además de corroborar los dominios presentes, en este trabajo se profundizó en el análisis *in silico* del dominio CHASE, dado la relevancia de los papeles que juega al formar parte proteínas con actividad de DGC. Los análisis estructurales del dominio CHASE presente en la proteína CdgD, fueron realizados utilizando como molde el mismo dominio encontrado en la Cinasa histidínica AHK4 de *Arabidopsis thaliana* (Hothorn, 2011) (consta de 187 aminoácidos, código PDB: Q9C5U0, resolución 1.7 Å, TM-score: 0.9, RMSD: 1.09), el cual es un modelo de referencia que encaja en gran medida con el dominio CHASE de la CdgD (Figura 56). En ambas proteínas, el dominio CHASE esta compuesto por dos dominios PAS (dominio distal y proximal) y contienen el mismo número de β-plegadas y α-hélices, aunque la DgcD muestra solo un 21% de identidad en la secuencia de aminoácidos con la AHK4, a nivel de estructura terciaria éstas comparten un ~80%. Estos resultados sugieren que el dominio CHASE de la CdgD adopta una topología general conservada lo cual es consistente con hallazgos previos (Chen *et al.,* 2019, Hothorn *et al.,* 2011) abriendo la posibilidad de que actúe también como un dominio sensor dentro de la proteína CdgD. El genoma de *S. meliloti* cuenta con 26 adenilato-guanilato ciclasas. Las proteínas CyaD1 y 2 y CyaK, cuentan en su estructura con un péptido señal, un dominio extracelular CHASE2, tres TMD y un dominio catalítico citoplásmico de adenilato/guanilato ciclasas. Se realizó una triple mutante de estas enzimas y los resultados sugieren que el dominio CHASE2 activa de manera constitutiva a la ciclasa CyaD1 lo que contribuye al sensado de señales, a través de una interacción directa con moléculas señal de la planta o de manera indirecta con distintos receptores (Tian *et al*., 2011). Si bien es cierto se trata en este modelo simbiótico de una adenilato ciclasa es también un ejemplo del papel de este dominio en el sensado de señales de la planta para la interacción con la bacteria. Es necesario en el futuro, ahondar en los análisis bioinformáticos para identificar entre

otras cosas, posibles ligandos de esta proteína y del mismo modo abordarlos de manera experimental que permitan o no corroborar la hipótesis de que el dominio CHASE es un dominio sensor que podría regular las funciones de la CdgD como DGC.

10. CONCLUSIÓN.

En función de los objetivos planteados en este trabajo, se lograron cumplir satisfactoriamente cada uno de ellos. Se logró analizar los niveles de expresión del gen *cdgD* durante la transición del estilo de vida móvil a sedentaria o de formación de biopelícula, tanto en condiciones abióticas como en condiciones de interacción con las raíces de las plantas. Incluso aparte de determinar los niveles de expresión, se logró determinar la ubicación de la expresión en asociación con raíces de la planta de trigo, esto mediante la implementación de una técnica de análisis no invasivo del sistema. Aunado a ello se obtuvieron resultados muy interesantes sobre el efecto de la expresión de este gen cuando son alteradas las condiciones de crecimiento y fuentes de nitrógeno. Se logró la incorporación de la bioinformatica en este trabajo, para el estudio *in silicio* del gen CdgD y por último, se logró implementar el uso de riboswitch para la cuantificación de di-GMPc, el cual traerá beneficios en trabajos posteriores. Derivado de los resultados obtenidos en este trabajo, se logró realizar la publicación del articulo científico “Expression and function of the *cdgD* gene, encoding a CHASE-PAS-DGC-EAL domain protein, in *Azospirillum brasilense*”. en la revista científica Scientific Reports DOI:10.1038/s41598-020-80125-3. Y una colaboración en el articulo “In silico comparative analysis of GGDEF and EAL domain signaling proteins from the *Azospirillum* genomes”, en la revista BMC Microbiology DOI:10.1186/s12866-018-1157-0.

11. ANEXOS.

11.1 Anexo 1. Alineamiento de genes de proteínas hibridas en *A.brasilense* Sp245.

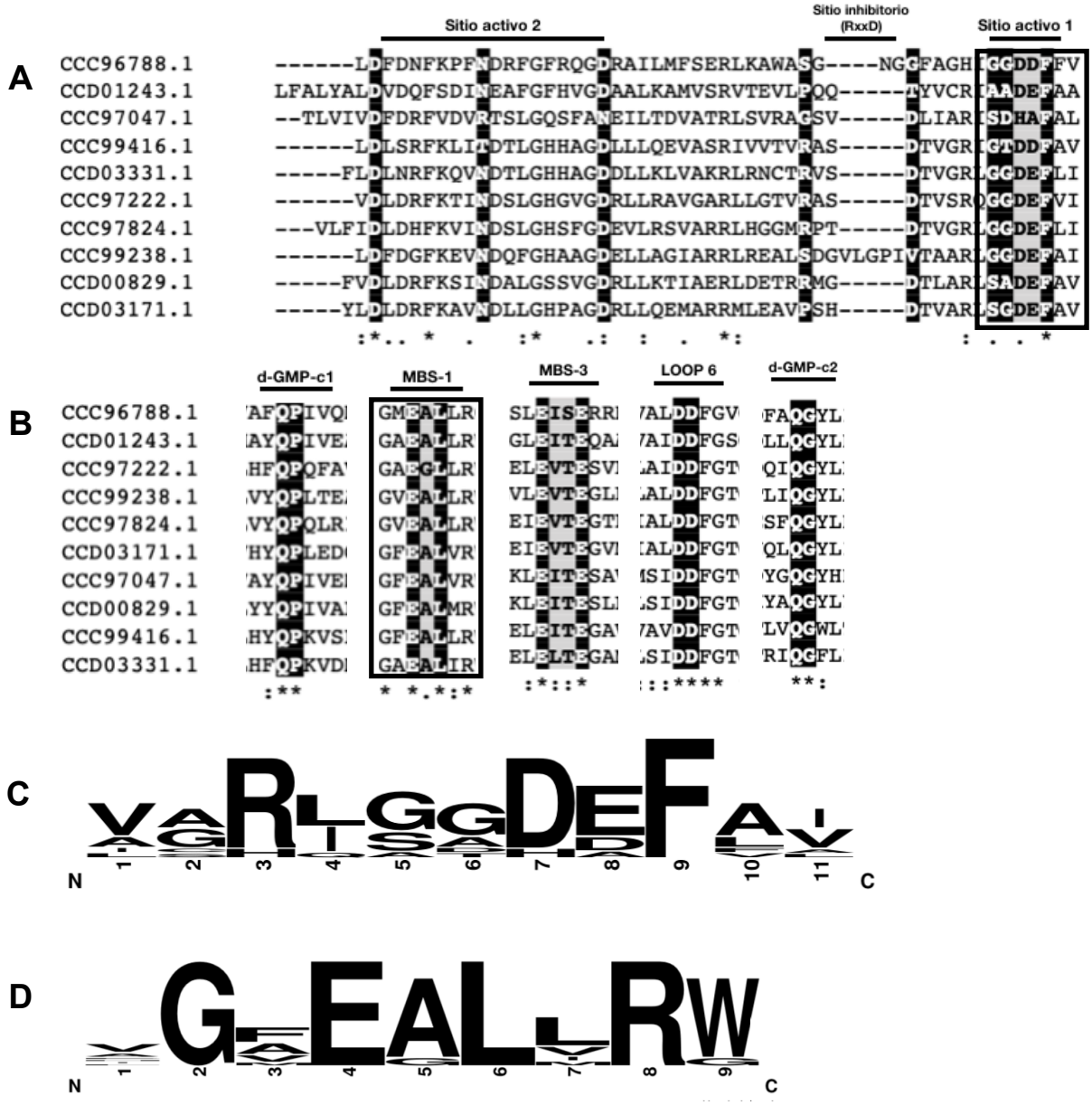


Figura C1. Alineamiento de genes que codifican para proteínas hibridas en *A. brasilense* Sp245. **(A)** Alineamiento del dominio GGDEF **(B)** Alineamiento del dominio EAL **(C)** WebLogo del alineamiento con el dominio GGDEF **(D)** WebLogo del alineamiento con el dominio EAL.

11.2. Anexo 2. Diseño de iniciadores y sondas para genes del grupo I y II que codifican para proteínas hibridas en *A.brasilense* Sp245.

Regiones blanco (Grupo I)

•CCC97222.1

Secuencia nucleotidica blanco (310-39 0aa 240 pb).

GGTGCATCCGGTCACCGGGCGCCCGGCGCCGAAACTGTCCTATGCCACGGCGCC
GGACGTCTGGGGGTGGGTGCTGGTCGCCGGCTTCTACACCGATGACATCGACTCC
GTGCTGGCGCAGCGGCGGGCCGAGATCAGCGCCGGCATGAAGAAGCGCATCCTG
ACCACCGTGGCGGTGCTGGCGCTGGCGCTGGCCGCGTCGGCCGGGGTGTCCTG
GCTGGTCACCGGCTGGGTCCGCCG. BLASTn

	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
☑	Azospirillum brasilense Sp245 chromosome	444	444	100%	1e-120	100.00%	CP022253.1
☑	Azospirillum brasilense Sp245 main chromosome complete genome	444	444	100%	1e-120	100.00%	HE577327.1
☑	Azospirillum sp. TSH58 chromosome, complete genome	405	405	100%	5e-109	97.08%	CP022364.1

Tabla C1. BLASTn de la región blanco del gen CCC97222.1

• CCC99416.1

Secuencia nucleotidica blanco (130-220 aa 270pb).

GCCCTGGGGCTGGGCCATCGCAGCGGCCAGCGGAACCGACGATCTCGATCGCGA
GTTCGCCATGGAGGCCCTGGCCTTCGTCCTGTTCATCGCCGTTCTGCTGGTGCTG
AGCTGGCCGCTGTCGGTGTTCCTGTCGCAGCACGTGCTGGGCCCCATCGAGGCG
CTGTCGGAGCGGATGGAGCGGCTGACCGAAGGGCAGACCGGCATCGACATCCCC
GGCCGCGACCGCAAGGACGAGTTCGGCGCCATGGCCCGCGCCATGGACTATT. BLASTn

	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
☑	Azospirillum brasilense Sp245 chromosome	499	499	100%	3e-137	100.00%	CP022253.1
☑	Azospirillum brasilense Sp245 main chromosome complete genome	499	499	100%	3e-137	100.00%	HE577327.1
☑	Azospirillum brasilense strain Cd chromosome 1, complete sequence	407	407	99%	2e-109	94.03%	CP033318.1

Tabla C2. BLASTn de la región blanco del gen CCC99416.1

- CCD03171.1

Secuencia nucleotidica blanco (100-180 aa 240pb).

CCGCCACGCCATCGGCGGCGGGCGGCTGGCCGCCCCGCTGGGCGGCGCCATCG
CCGGGGCCGCGGCGACGGCGATGCACTTCACCGGCATGGCGGCGCTCCAGGTG
CCGGCCAACCTGCATTATGATCCGATTTACGTTGCTGTGGCGCTGGGCCTGGGCGT
CCTGCTCGCCGGGGCGGGCTTCACCGCCGCCCTGCGGATCGGATCGCTGAAGGG
GCTGGCGGCGGGGGCGGCCCTGCT. BLASTn

	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
☑	Azospirillum brasilense Sp245 plasmid AZOBR_p4 complete genome	444	444	100%	1e-120	100.00%	HE577331.1
☑	Azospirillum brasilense strain Az39 plasmid AbAZ39_p4, complete sequence	377	377	100%	1e-100	95.00%	CP007797.1
☑	Azospirillum brasilense strain Cd chromosome 4, complete sequence	368	368	99%	7e-98	94.54%	CP033322.1

Tabla C3. BLASTn de la región blanco del gen CCD03171.1

• CCC97047.1

Secuencia nucleotidica blanco (260-350 aa 270pb).

CGCCCGGCCGAGCCTGGAACTGCGCGCCGTGCCCGAGCGCTACGGCATCGTCGA
GGAGCTGAACCGCCAGGACCGGCGCAAGCCGAACGAAACCCGCCTCCGTCTGTC
CGAGGTGATCGAGCGGCAGCCGCCGCTGGCCGTCAATTCCCCGAAGACGGAGCT
TCTGGAGTATTTCCGCGGCGACAACAGCCCATCCATCGCCCCCATCGTCGACCGC
CAGCAGCGCCCGCTGGGGCTGATCCGCGAGCGCGACCTGAAGCGCTTCGTCTA. BLASTn

	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
☑	Azospirillum brasilense Sp245 chromosome	499	499	100%	3e-137	100.00%	CP022253.1
☑	Azospirillum brasilense Sp245 main chromosome complete genome	499	499	100%	3e-137	100.00%	HE577327.1
☑	Azospirillum brasilense strain MTCC4036 chromosome	438	438	100%	6e-119	95.93%	CP032330.1

Tabla C4. BLASTn de la región blanco del gen CCC97047.1

• CCC96788.1

Secuencia nucleotidica blanco (260-350aa 270pb).

CGCCCGGCCGAGCCTGGAACTGCGCGCCGTGCCCGAGCGCTACGGCATCGTCGA
GGAGCTGAACCGCCAGGACCGGCGCAAGCCGAACGAAACCCGCCTCCGTCTGTC
CGAGGTGATCGAGCGGCAGCCGCCGCTGGCCGTCAATTCCCCGAAGACGGAGCT
TCTGGAGTATTTCCGCGGCGACAACAGCCCATCCATCGCCCCCATCGTCGACCGC
CAGCAGCGCCCGCTGGGGCTGATCCGCGAGCGCGACCTGAAGCGCTTCGTCTA. BLASTn

	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
☑	Azospirillum brasilense Sp245 chromosome	499	499	100%	3e-137	100.00%	CP022253.1
☑	Azospirillum brasilense Sp245 main chromosome complete genome	499	499	100%	3e-137	100.00%	HE577327.1
☑	Azospirillum brasilense strain MTCC4036 chromosome	438	438	100%	6e-119	95.93%	CP032330.1

Tabla C5. BLASTn de la región blanco del gen CCC96788.1

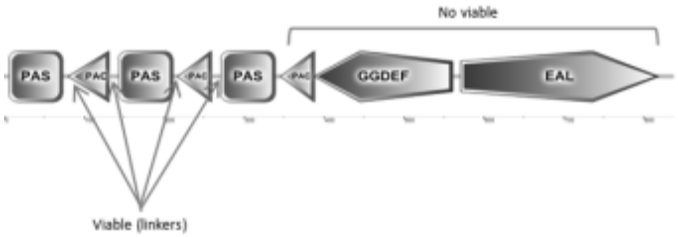
Tamaño de amplicones para los genes del grupo I.

Gen	Tamaño de amplicon (PB)
CCD03171.1	82
CCC99416.1	72
CCC97222.1	83
CCC97047.1	94
CCC97824.1	85
CCC96788.1	98

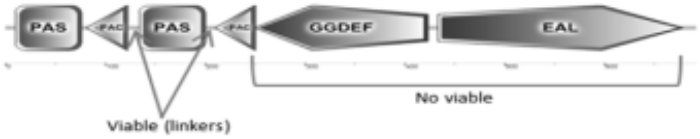
Tabla C6. Tamaño de amplicones de los iniciadores del grupo I.

Regiones blanco del grupo II (SONDAS).

- CCC99238.1



• CCD01243.1



- CCD03331.1

- CCD00829.1

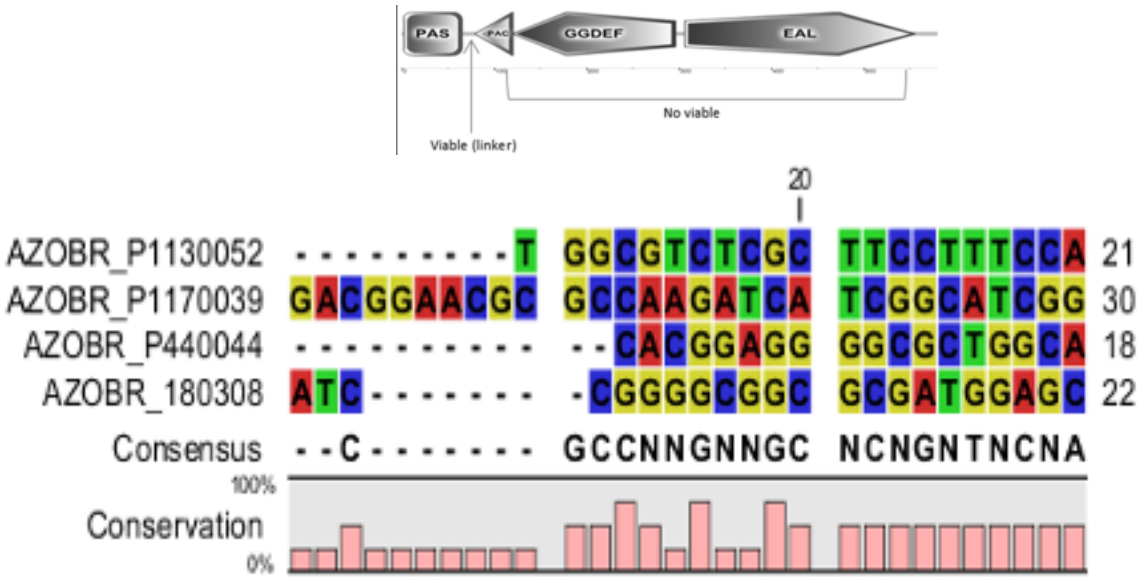


Figura C2. Alineamiento de sondas tipo taqman, que se utilizaran para el análisis de la expresión de genes correspondientes al grupo II.

11.3. Anexo 3. Videos.

https://doi.org/10.1038/s41598-020-80125-3

11.4. Anexo 4. Secuenciación del promotor de *cdgD*.

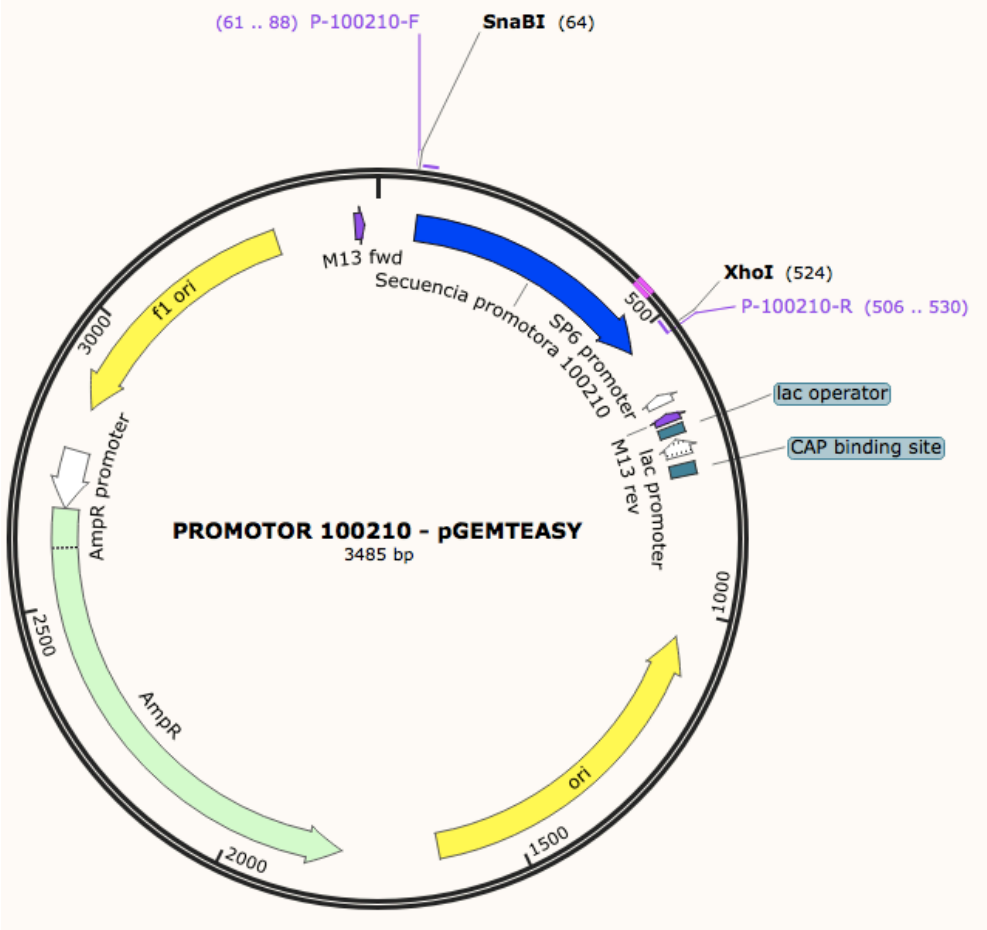


Figura C3. Mapa del plásmido pGEMTEASY con la secuencia que contiene el promotor de *cdgD*.

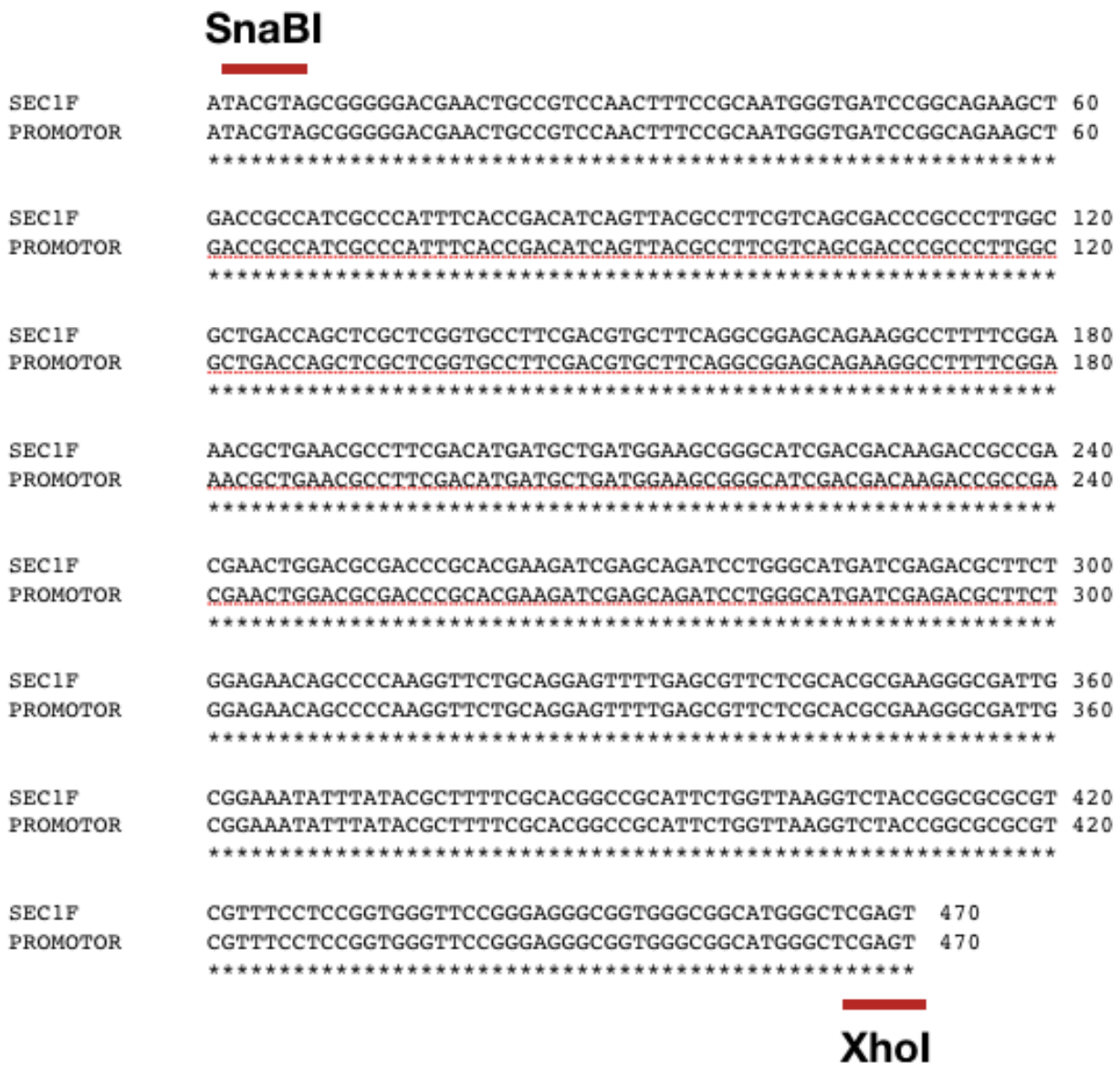


Figura C4. Alineamiento del promotor de *cdgD*, con el resultado de la secuenciación del fragmento clonado en pGEMTEASY.

11.5. Anexo 5. Locus neutro de la fusión transcripcional.

Región en el cromosoma en donde se llevara a cabo la recombinación de la fusión transcripcional.

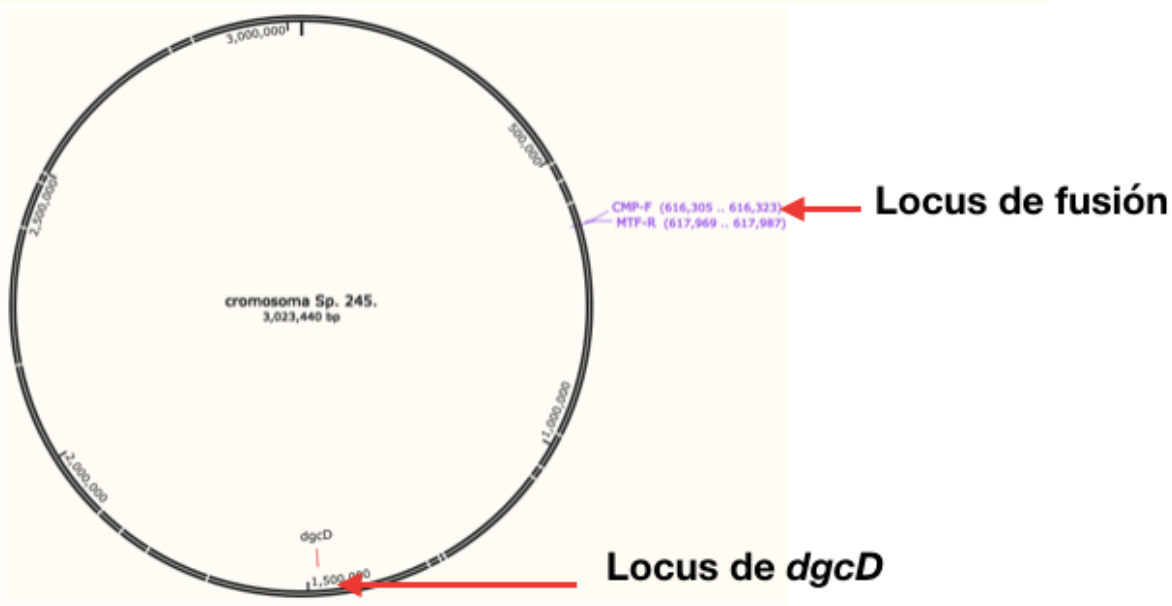


Figura C5. Región en el cromosoma en donde se llevara a cabo la recombinación de la fusión transcripcional.

11.6. Anexo 6. Comprobación de la fusión transcripcional FPDm1

Comprobación de la región que contiene la secuencia del promotor, la cual corresponde a la secuencia que va a recombinar. Tamaño de amplicon esperado de 4452 pb.

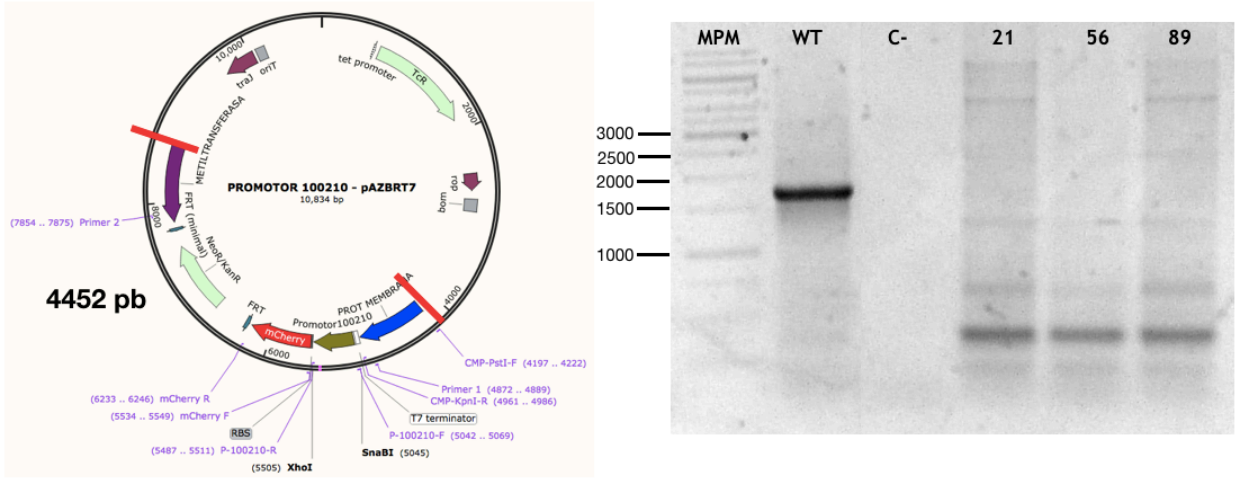


Figura C6. Comprobación de la región que contiene la secuencia del promotor de *cdgD*.

Comprobación del gen *TraJ,* el cual se encuentra fuera de la región que recambian con el cromosoma, se realizo esta comprobación, con el objetivo de comprobar que la región del plásmido que no debe recombinar, haya sido eliminada de la bacteria. El tamaño esperado de amplicon es de 730 pb.

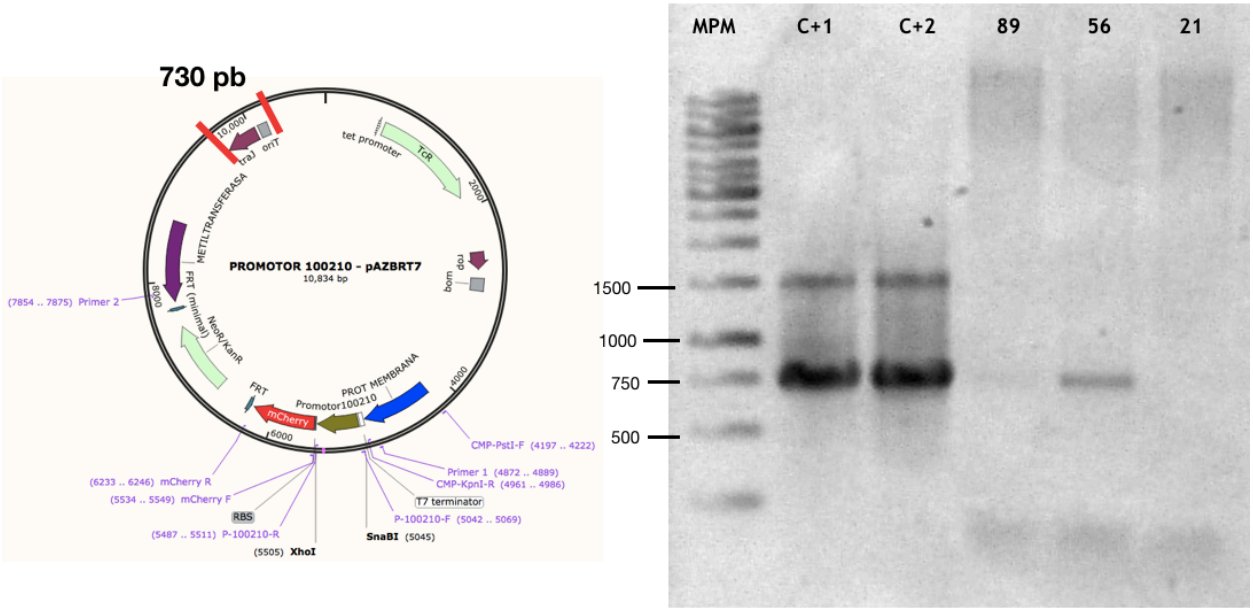


Figura C7. Comprobación del gen *TraJ.*

Comprobación de la clona 25, la cual es el control negativo, ya que no cuenta con la secuencia correspondiente al promotor del gen *cdgD*. El tamaño esperado es de 3998 pb.

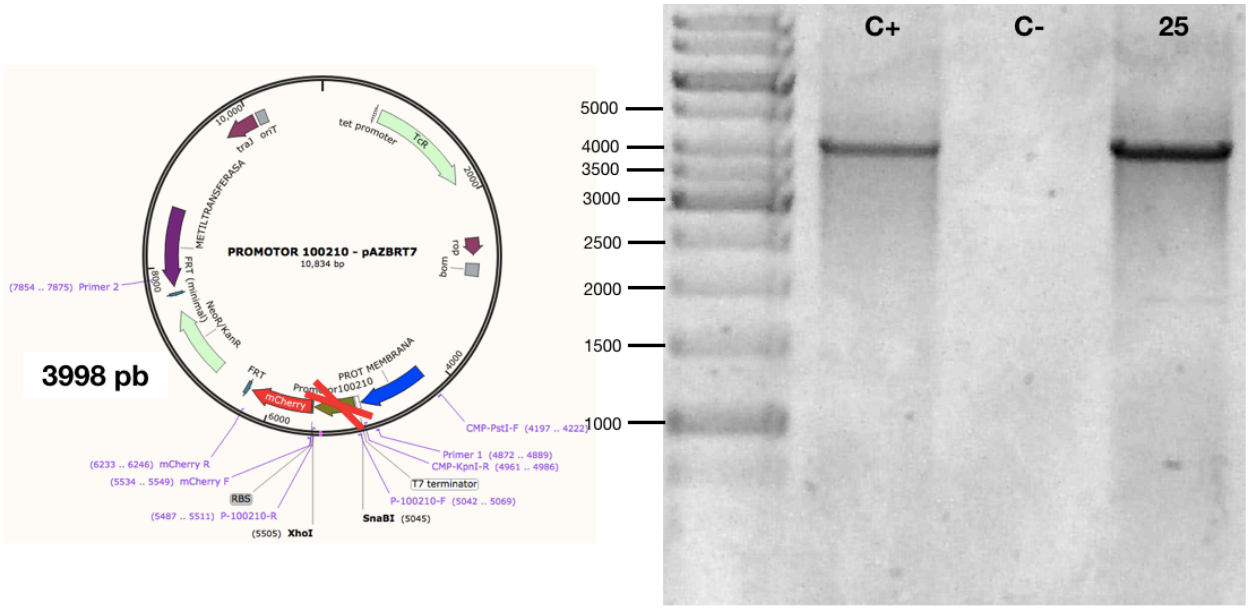


Figura C8. Comprobación de la clona 25 (Control negativo).

Comprobación de la región interna, la cual se recombina en el cromosoma. Se realizo esta comprobación, para verificar que la región que recambian, no haya sufrido modificaciones al momento de que se llevo a cabo la recombinación.

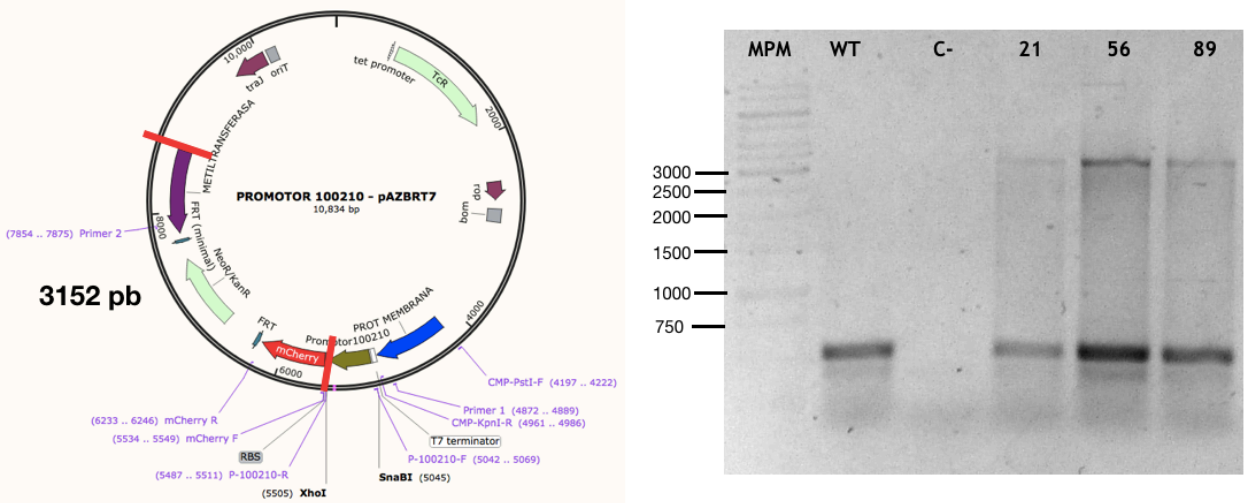
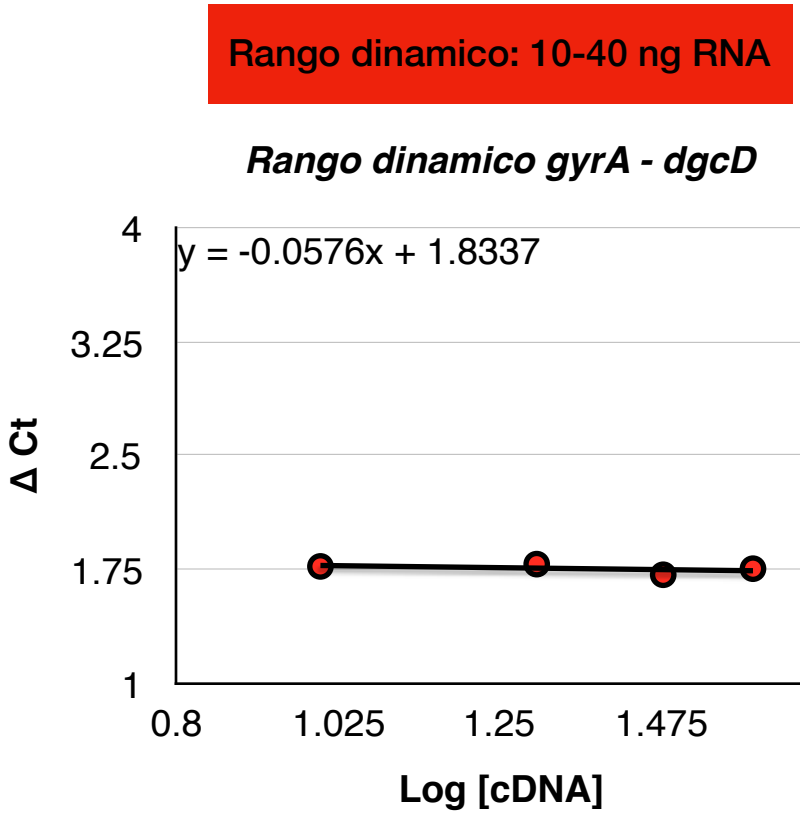


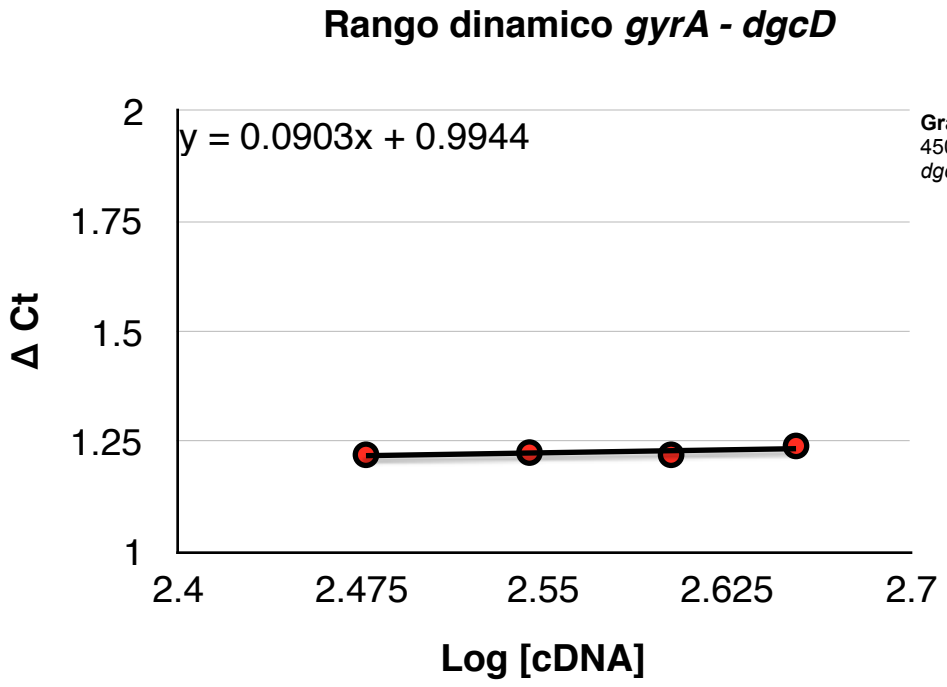
Figura C9. Comprobación de la región interna de la construcción.

11.7. Anexo 7. Parámetros de amplificación de oligos utilizados en el ensayo de qPCR.



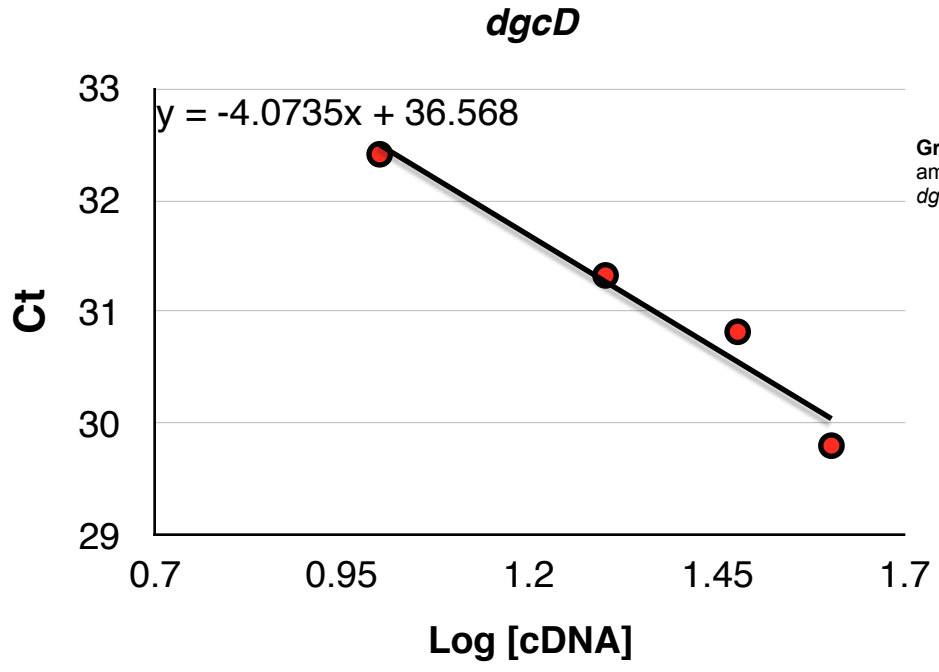
Grafica C1. Rango dinamico (10 - 40 ng) de los iniciadores de *gyrA* y *dgcD*.

Rango dinamico: 350-450 ng RNA

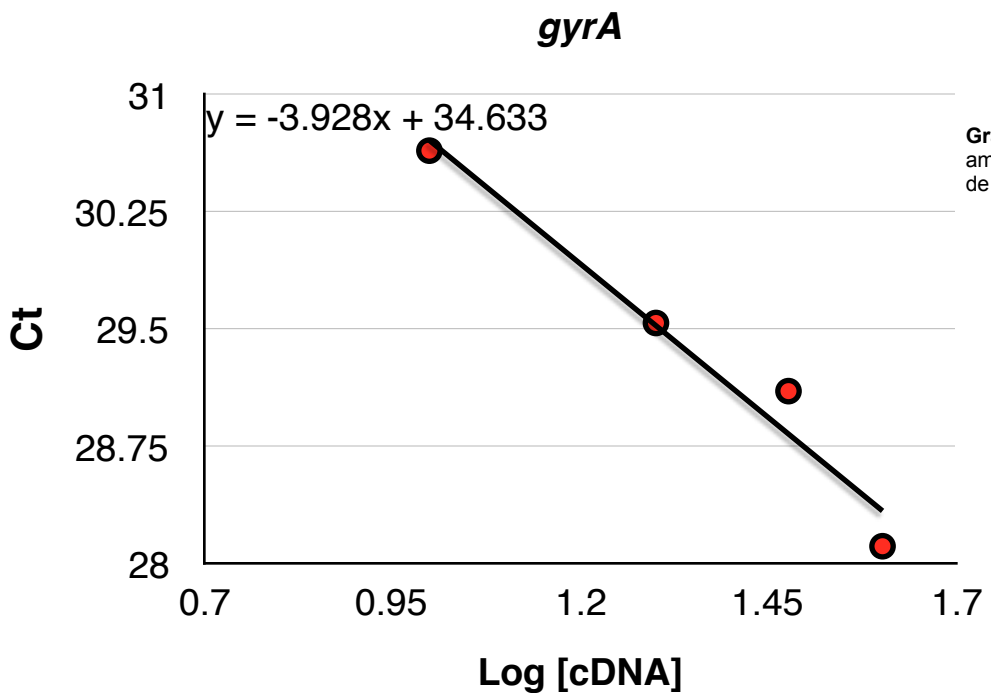


Grafica C2. Rango dinamico (350 - 450 ng) de los iniciadores de *gyrA* y *dgcD*.

Eficiencia de amplificado 10 - 40 ng RNA



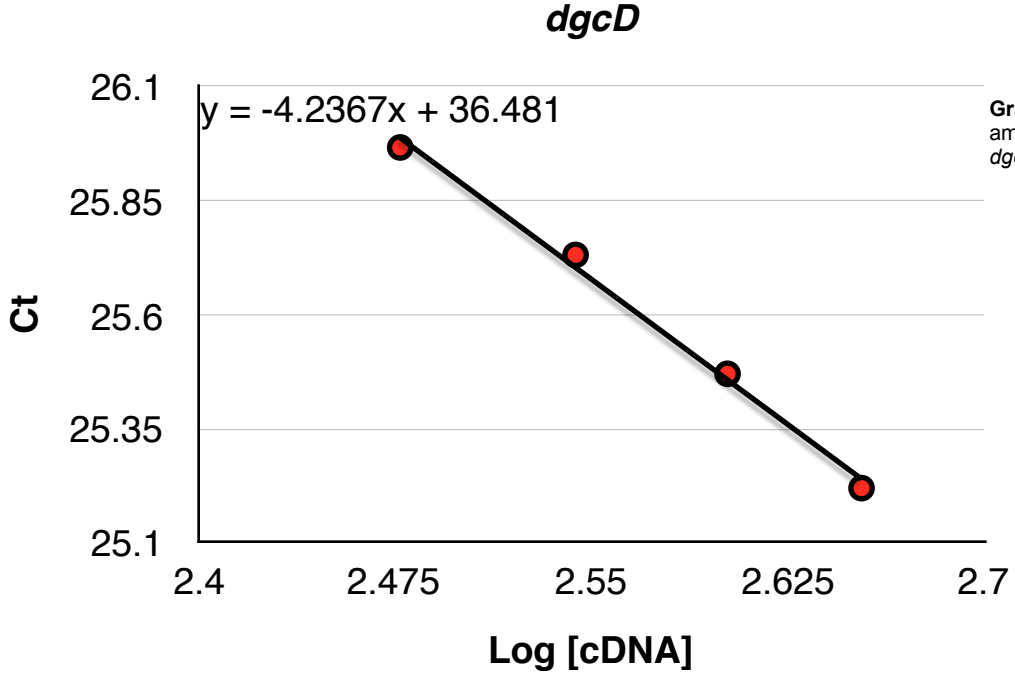
Grafica C3.Eficiencia de amplificación de los iniciadores de *dgcD*.(10 - 40 ng)



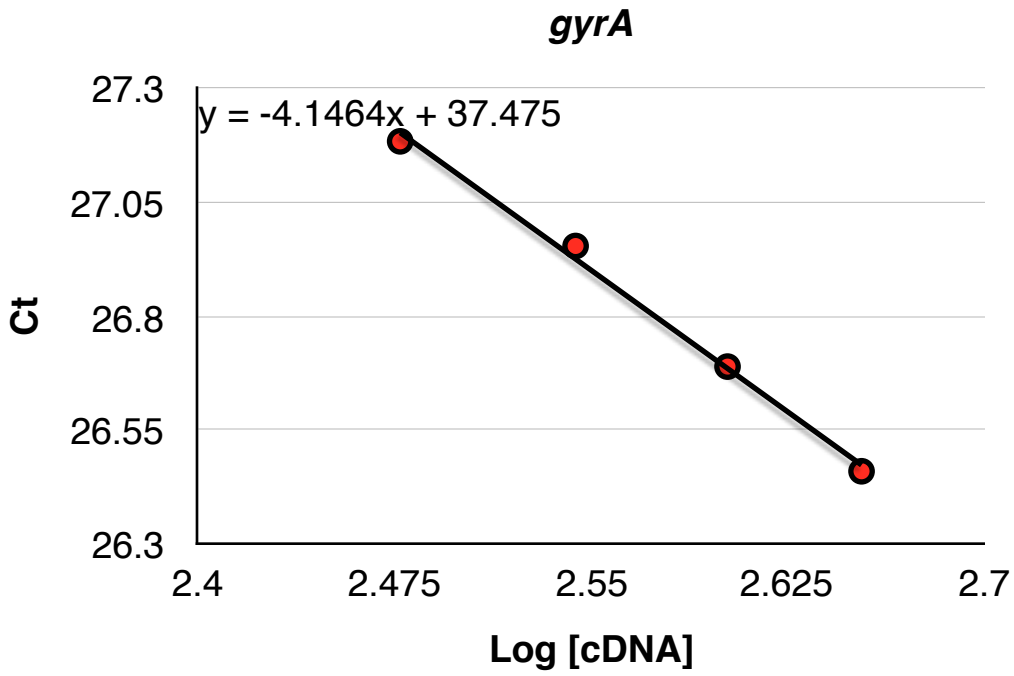
Grafica C4.Eficiencia de amplificación de los iniciadores de *gyrA*. (10 - 40 ng)

PRIMER	% Efi Amp.	R^2
gyrA	101	0.97
dgcD	112	0.97
dgcB	101	0.98

Eficiencia de amplificado 350 - 450 ng RNA



Grafica C5.Eficiencia de amplificación de los iniciadores de *dgcD*.(350 - 450 ng)



Grafica C6.Eficiencia de amplificación de los iniciadores de *gyrA*.(350 - 450 ng)

PRIMER	% Efi Amp.	R^2
gyrA	105	0.995
dgcD	109	0.994
dgcB	108	0.986

11.8. Anexo 8. Comprobación de fluorescencia de las cepas *A. brasilense* Sp 245, 12-A, C56A y C40A.

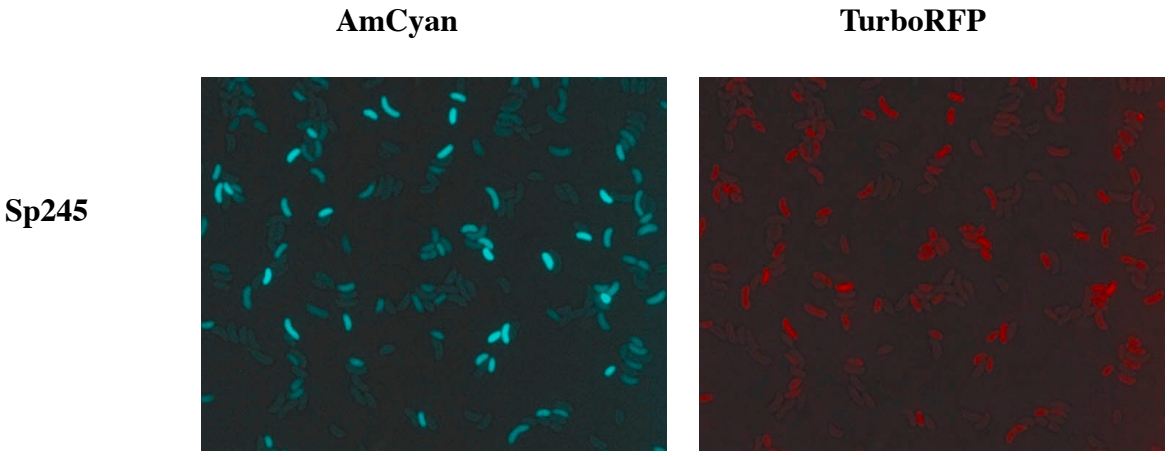


Figura C10. Comprobación de la fluorescencia en *A.brasilense* Sp245.

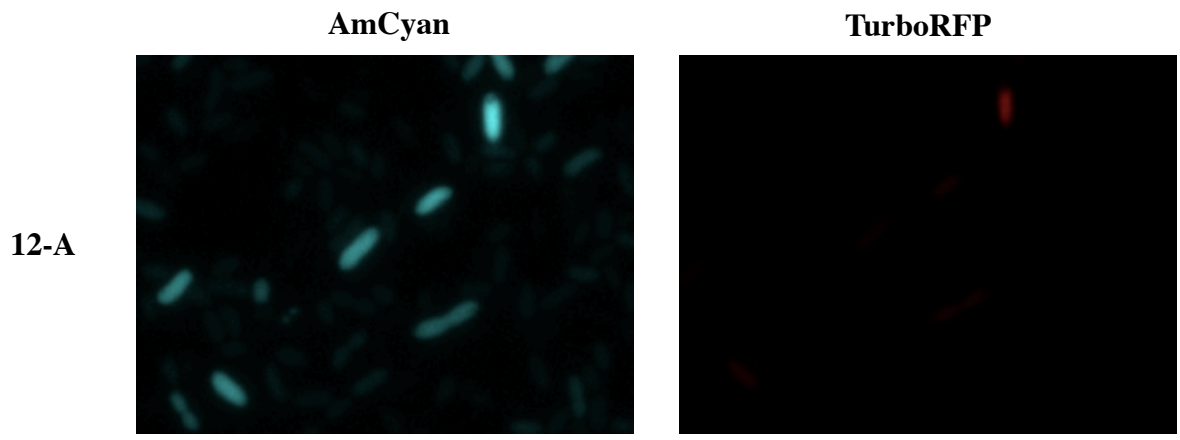


Figura C11. Comprobación de la fluorescencia en 12-A

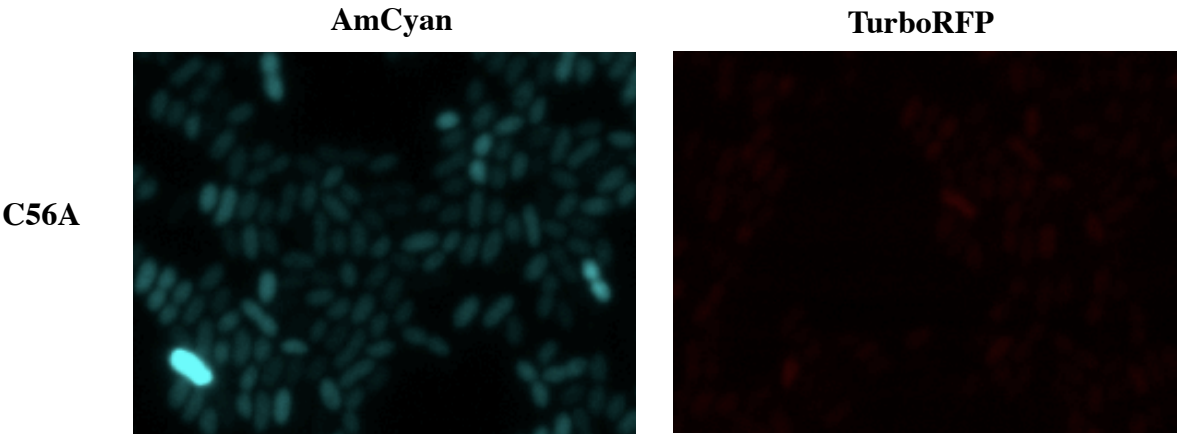


Figura C12. Comprobación de la fluorescencia en C56A

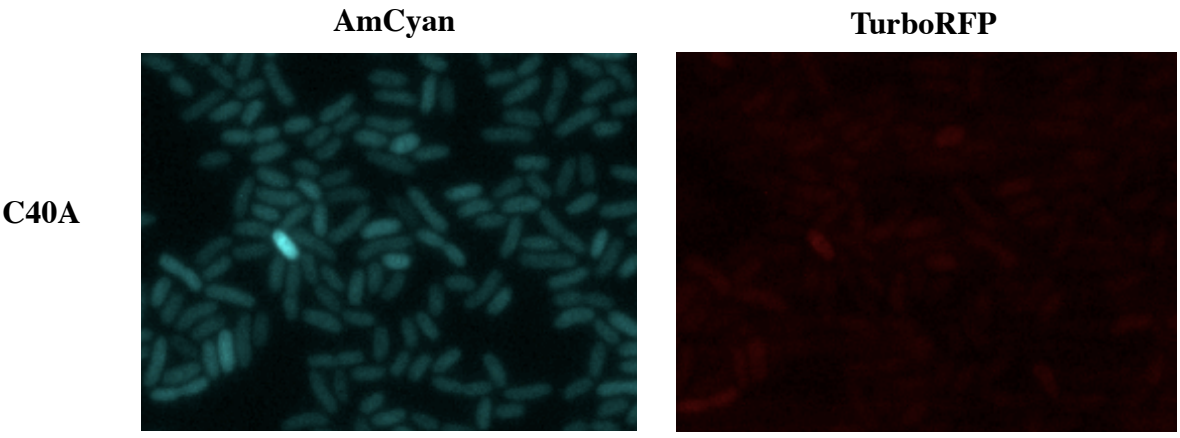


Figura C13. Comprobación de la fluorescencia en C56A

11.9. Anexo 9. Cuantificación de di-GMPc en condiciones de formación de biopelícula.

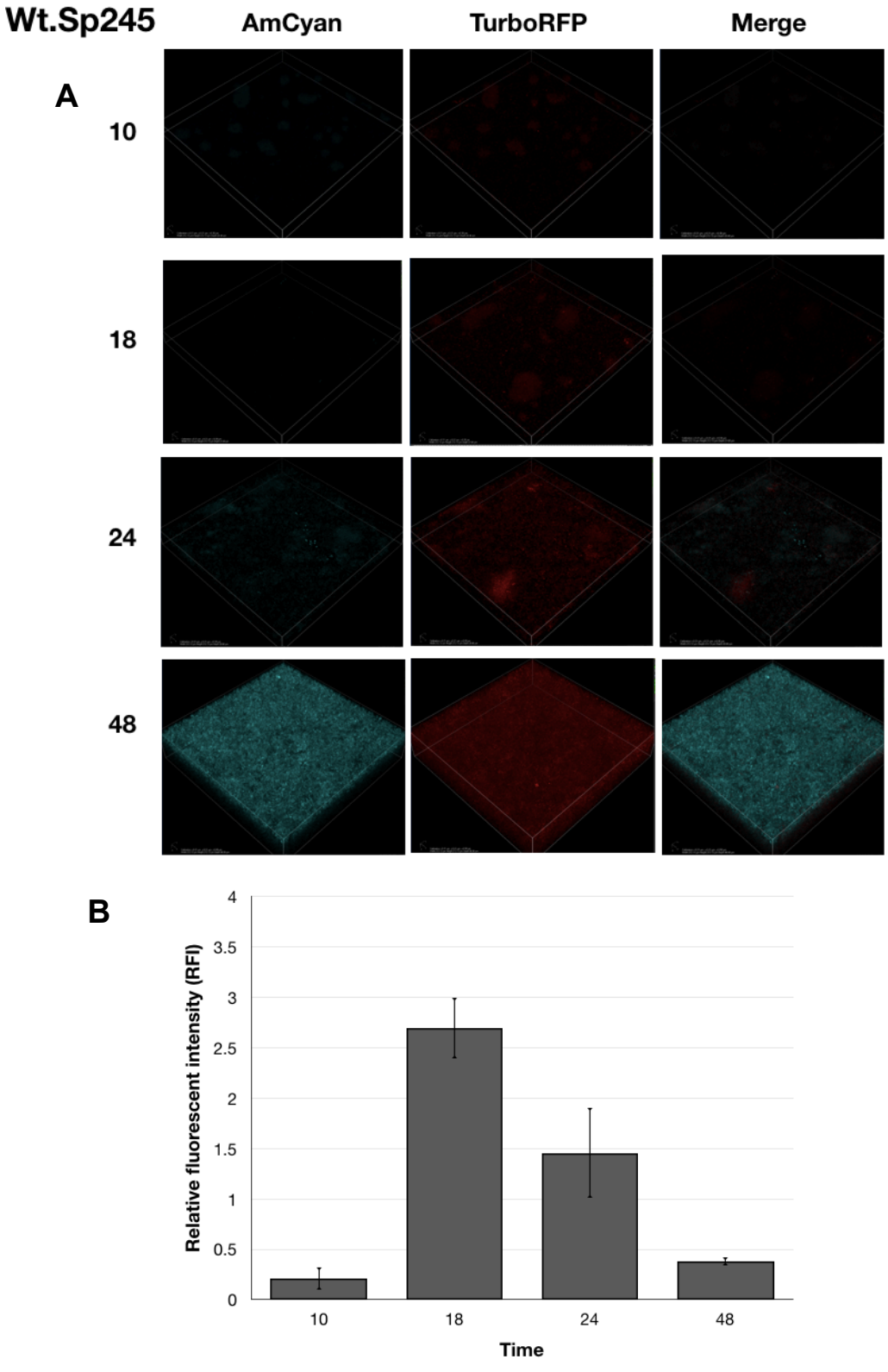
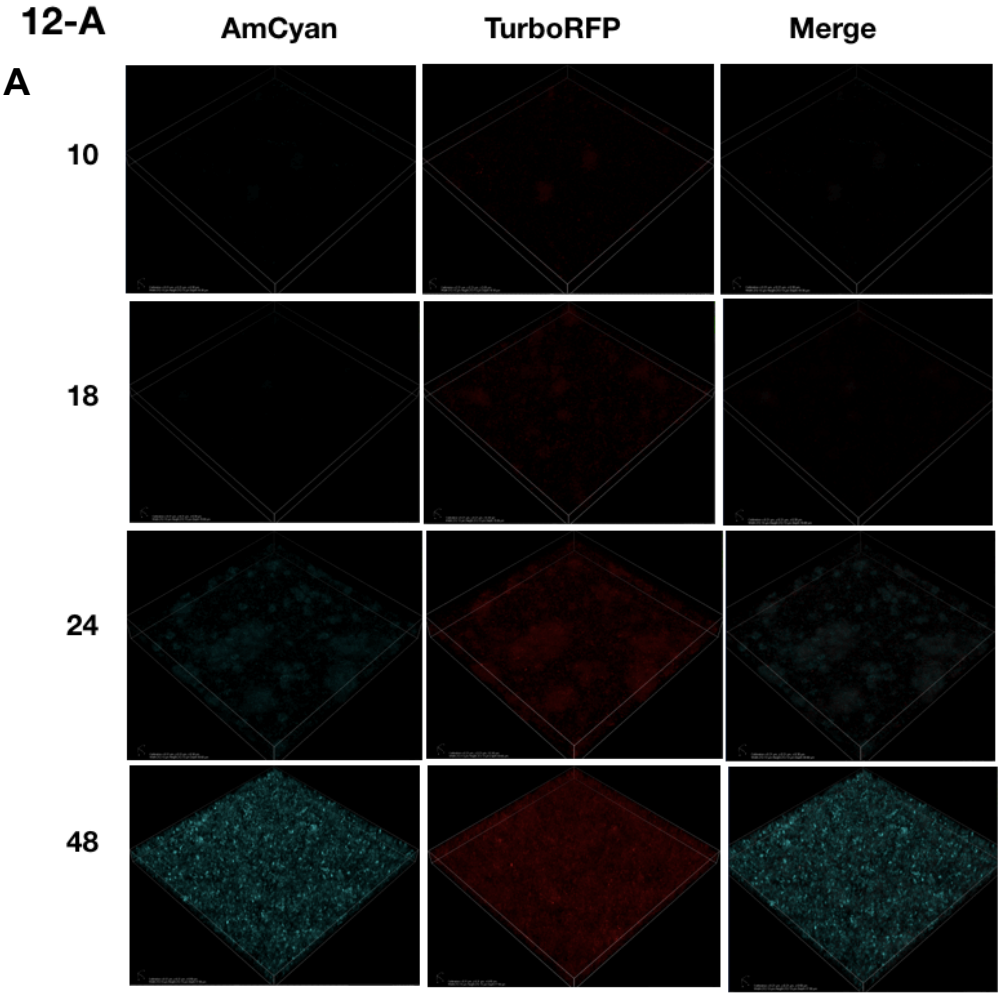


Figura C14. Cuantificación de di-GMPc de la cepa A.brasilense Sp245 con el plásmido pDZ-2. **(A)** Imágenes del cultivo en condiciones de formación de biopelícula. **(B)** Cociente de la relación de la intensidad de fluorescencia de TurboRFP sobre AmCyan.



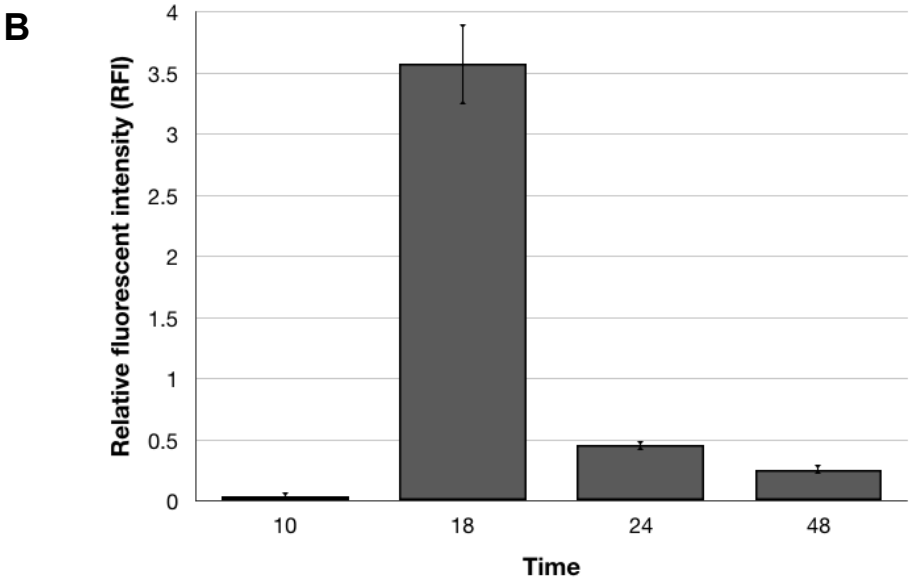


Figura C15. Cuantificación de di-GMPc de la cepa *A.brasilense* 12-A con el plásmido pDZ-2. **(A)** Imágenes del cultivo en condiciones de formación de biopelícula. **(B)** Cociente de la relación de la intensidad de fluorescencia de TurboRFP sobre AmCyan.

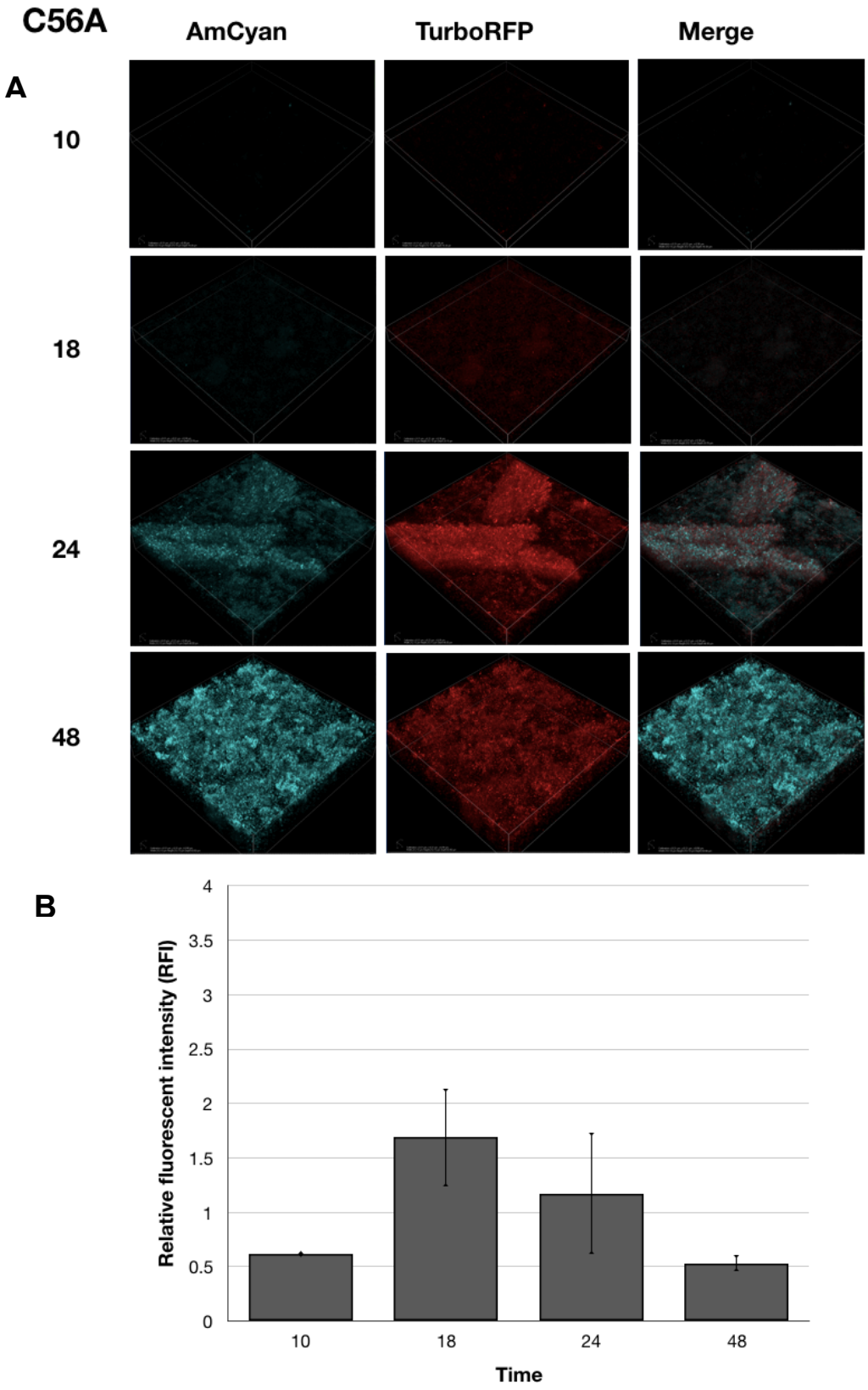


Figura C16. Cuantificación de di-GMPc de la cepa *A.brasilense* C56A con el plásmido pDZ-2. **(A)** Imágenes del cultivo en condiciones de formación de biopelícula. **(B)** Cociente de la relación de la intensidad de fluorescencia de TurboRFP sobre AmCyan.

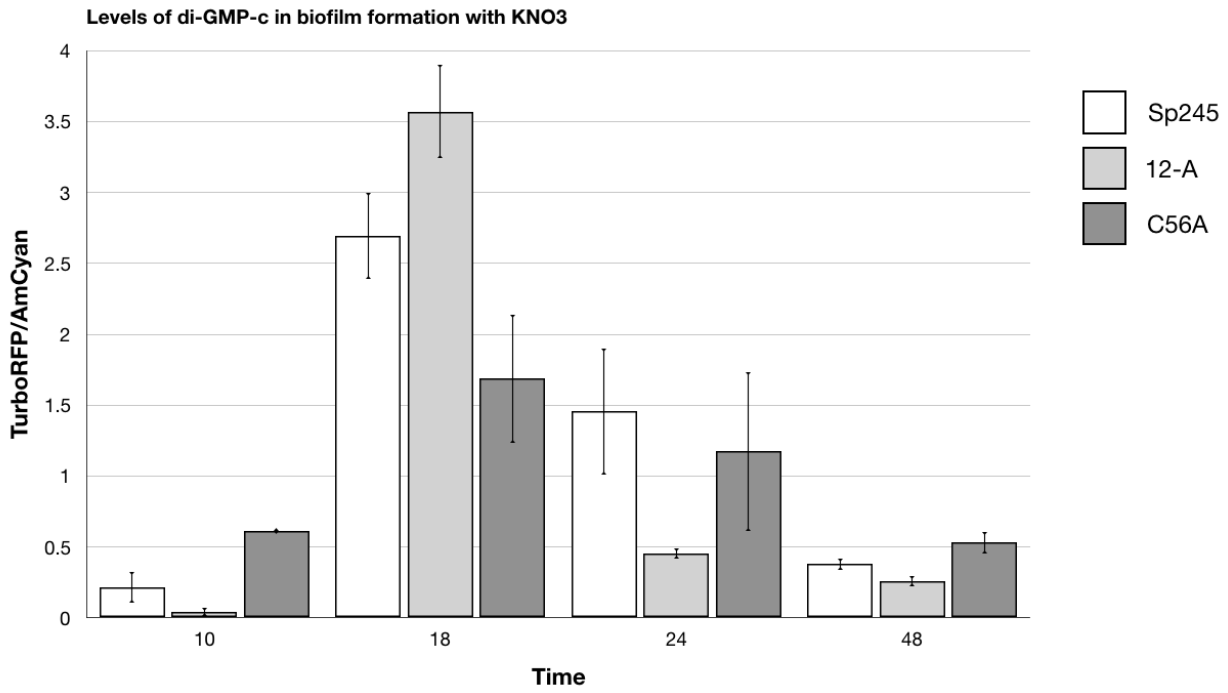


Figura C17. Comparación de los niveles de di-GMPc de la cepas *A.brasilense* Sp245, 12-A y C56A a través del tiempo.

11.10. Anexo 10. Medios de cultivo.

Medio K-Malato

Base para 1000 ml

K_2HPO_4	1.67 g
KH_2PO_4	0.87 g
$MgSO_4*7H_2O$	0.29 g
NaCl	0.48 g
Ácido Málico	4.5326 g
Agar bacteriológico	1.5%

Esterilizar a 15 libras, 121°C por 20 minutos.

<u>Reactivos para complementar</u>

$CaCl_2*2H_2O$ 0.7%	10 ml
$FeCl_3*6H_2O$ 1%	1 ml

$Na_2MoO_4*2H_2O$ 0.5%	1 ml
NH_4Cl 20 %	5 ml
Oligoelementos	10 ml

Esterilizar a 5 libras, durante 30 minutos.

Oligoelementos (1000 ml)

$MnSO_4*H_2O$	0.25g
$ZnSO_4*7H_2O$	0.07g
$CoSO_4*7H_2O$	0.014g
$CuSO_4*5H_2O$	0.0125g
H_3BO_3	0.003g

Esterilizar a 5 libras, durante 30 minutos.

Nota: Se preparan las sales y los oligoelementos por separado para evitar que precipiten durante la esterilización y posteriormente se adicionan a la base en condiciones estériles.

MEDIO LB* (Luria Bertani Modificado)

Para un 1000 ml

Peptona de caseína	10.0 g
Extracto de levadura	5.0 g
Cloruro de sodio (NaCl) 10 mM	0.5848 g
Sulfato de Magnesio ($MgSO_4$) 2.5 mM	0.6162 g
Cloruro de Calcio ($CaCl_2$) 2.5 mM	0.3675 g

Ajustar el pH a 7 con NaOH al 20%

Para medio sólido preparar con agar bacteriológico al 1.5 %
Esterilizar a 15 libras, 121°C por 20 minutos.

11.11. Anexo 11. Medio Rojo Congo (RC)

Para 1000 ml

DL-málico	5.0 g

Extracto de levadura	0.5 g
K_2HPO_4 10 %	5 ml
$MgSO_4*7H_2O$ 10%	2 ml
NaCl 10%	1ml
$FeCl_3*6H_2O$ 1%	1.4 ml
$Na_2MoO_4*2H_2O$ 0.1%	2 ml
KOH	4.0 g
Rojo Congo 0.25%	15 ml

Ajustar el pH a 6.8 con KOH al 10%

Nota: Ajustar el pH antes de agregar el rojo congo.
Para medio sólido preparar agar bacteriológico al 1.5 %
Esterilizar a 15 libras, 121°C por 20 minutos.

11.11. Anexo 11. Medio NFb (Nitrogen Fixation Biological)

Para 1000 ml	
Ácido málico	3.70 g
K_2HPO_4 10%	5 ml
$MgSO_4*7H_2O$ 10%	2 ml
NaCl 10%	1 ml
$CaCl_2*2H_2O$ 1%	2 ml
Micronutrientes	2 ml
Fe-EDTA 1.64%	4 ml
Fuente de Nitrógeno para 1000ml	
KNO_3 1.39 g	
Stock de Micronutrientes	
$Na_2MoO_4*2H_2O$	0.200 g
$MnSO_4*H_2O$	0.235 g
H_3BO_3	0.280 g
$CuSO_4*5H_2O$	0.008 g
$ZnSO_4*7H_2O$	0.024 g
H_2O	200 ml

Ajustar el pH a 6.5 con KOH al 10%

Esterilizar a 15 Lb, 121°C durante 20 minutos.

Nota: Esterilizar las sales a 5 Lb durante 30 minutos, los micronutrientes se preparan en condiciones de esterilidad y con agua inyectable. Adicionar las sales y los micronutrientes a la base en condiciones de esterilidad antes de esterilizar.

12. APÉNDICE: PUBLICACIONES Y CONGRESOS.

12.1. Publicaciones.

1.- José Francisco Cruz-Pérez, Roxana Lara-Oueilhe, Cynthia Marcos-Jiménez, Ricardo Cuatlayotl-Olarte, María Luisa Xiqui-Vázquez, Sandra Raquel Reyes-Carmona, Beatriz Eugenia Baca & Alberto Ramírez-Mata, 2020. Expression and function of the *cdgD* gene, encoding a CHASE–PAS-DGC-EAL domain protein, in Azospirillum brasilense. 10.1038/s41598-020-80125-3.

2.- Alberto Ramírez-Mata, César Millan-Pacheco, **José F Cruz-Pérez**, Martha Minjárez-Sáenz, Beatriz E Baca, 2018. In silico comparative analysis of GGDEF and EAL domain signaling proteins from the Azospirillum genomes. 10.1186/s12866-018-1157-0.

12.2. Congresos.

1.- VI Congreso de Bioquímica y Biología Molecular de Bacterias / XLI Congreso Nacional de Microbiología. Oaxaca, Oaxaca 27 - 31 de Octubre de 2019.

scientific reports

Check for updates

OPEN

Expression and function of the *cdgD* gene, encoding a CHASE–PAS-DGC-EAL domain protein, in *Azospirillum brasilense*

José Francisco Cruz-Pérez, Roxana Lara-Oueilhe, Cynthia Marcos-Jiménez, Ricardo Cuatlayotl-Olarte, María Luisa Xiqui-Vázquez, Sandra Raquel Reyes-Carmona, Beatriz Eugenia Baca & Alberto Ramírez-Mata✉

The plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense* contains several genes encoding proteins involved in the biosynthesis and degradation of the second messenger cyclic-di-GMP, which may control key bacterial functions, such as biofilm formation and motility. Here, we analysed the function and expression of the *cdgD* gene, encoding a multidomain protein that includes GGDEF-EAL domains and CHASE and PAS domains. An insertional *cdgD* gene mutant was constructed, and analysis of biofilm and extracellular polymeric substance production, as well as the motility phenotype indicated that *cdgD* encoded a functional diguanylate protein. These results were correlated with a reduced overall cellular concentration of cyclic-di-GMP in the mutant over 48 h compared with that observed in the wild-type strain, which was recovered in the complemented strain. In addition, *cdgD* gene expression was measured in cells growing under planktonic or biofilm conditions, and differential expression was observed when KNO_3 or NH_4Cl was added to the minimal medium as a nitrogen source. The transcriptional fusion of the *cdgD* promoter with the gene encoding the autofluorescent mCherry protein indicated that the *cdgD* gene was expressed both under abiotic conditions and in association with wheat roots. Reduced colonization of wheat roots was observed for the mutant compared with the wild-type strain grown in the same soil conditions. The *Azospirillum*-plant association begins with the motility of the bacterium towards the plant rhizosphere followed by the adsorption and adherence of these bacteria to plant roots. Therefore, it is important to study the genes that contribute to this initial interaction of the bacterium with its host plant.

Azospirillum brasilense is a species that has been employed as an inoculant worldwide because of its beneficial effects on host plants via multiple mechanisms, which are proposed to be responsible for the improved nutritional status of plants. These mechanisms include both direct effects on plant metabolism by providing nutrients (iron, phosphorus and nitrogen) and synthesizing molecules with phytohormone activity (auxins, cytokinins, gibberellins, and nitric oxide) and indirect effects such as antagonism against phytopathogens and increased resistance to pathogens, which define the mode of action of *Azospirillum* in plant development according to the additive hypothesis[1]. Therefore, this bacterium must contain an array of genes that participate in the control of the successful colonization of plants through such processes as chemotaxis and biofilm formation, which are the initial steps leading to the beneficial effects observed in plants of agronomic interest[2,3].

Investigations into the role of the cyclic dimeric guanosine monophosphate (c-di-GMP) second messenger signaling system have shown that the predominant bacterial trait controlled by this system is the transition from a motile to a sessile lifestyle[4,5] and these studies have indicated that the accumulation of c-di-GMP promotes biofilm formation via the biosynthesis of biofilm matrix components, adhesins, and exopolysaccharides[6–8], while a decrease in c-di-GMP promotes motility, inhibiting this process[9,10]. The enzymes catalyzing c-di-GMP formation are diguanylate cyclases (DGCs), while those degrading c-di-GMP are phosphodiesterases (PDEs), which are identified by their characteristic GGDEF and EAL domains, respectively[11]. In bacteria, genes with translational products that include both domains (GGDEF and EAL) are referred to as hybrid proteins[11].

Laboratorio de La Interacción Bacteria-Planta, Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Avenida San Claudio S/N, Puebla Pue, Mexico. ✉email: alberto.ramirez@correo.buap.mx

Previous work has shown that *A. brasilense* Sp245 contains 35 genes that may encode proteins involved in the metabolism of c-di-GMP[12]. We identified 20 genes encoding presumptive proteins harboring only a GGDEF domain, five harboring only an EAL domain, and ten hybrid proteins with both domains. In addition, almost all of these proteins contained distinct N-terminal sensing and signaling domains, suggesting that their activities in cyclic-di-GMP turnover respond posttranslationally to various intra- and extracellular signals[7,11,12].

Despite extensive studies conducted on other rhizosphere-colonizing bacteria to determine the genes responsible for the biosynthesis and degradation of c-di-GMP and their roles in plant colonization[7,13–15], this information has not been obtained to date in *A. brasilense,* which is an important soil bacterium that is commonly used as an inoculant that promotes beneficial effects in a variety of plants. Thus, the aim of this work was to characterize the *cdgD* gene, which encodes a DGC-EAL hybrid protein referred to as CdgD. We showed that this gene is involved in motility and biofilm formation and demonstrated its expression both under abiotic conditions and in association with wheat roots, suggesting that it plays a prominent role in the interaction with the host plant.

Materials and methods

Strains, plasmids, primers and growth conditions. The strains, plasmids and primers used in this work are listed in Supplementary Tables S1 and S2. The *Azospirillum brasilense* Sp245 strain was grown at 30 °C in K-malate, Luria–Bertani modified (LB*) or Congo red (CR) solid medium as previously described[16]. The *A. brasilense* 12-A mutant, *A. brasilense* FPDm1, and *A. brasilense* T7mCh strains were grown in selective K-malate, LB* or CR solid medium supplemented with 50 µg/mL kanamycin (Km). *A. brasilense* C-56A was grown in CR medium supplemented with 20 µg/mL tetracycline (Tc), and *A. brasilense* derivative strains tagged with the mCherry protein harboring the pMP2449-5 plasmid were grown in CR supplemented with 30 µg/mL gentamicin (Gm). The *Escherichia coli* DH5α and S17.1 strains were grown at 37 °C in liquid LB medium, at pH 7.0, to which solid agar (1.5% agar, w/v) was added to produce solid medium. The selective media utilized for the *E. coli* strains were supplemented with ampicillin (Ap) at 100 µg/mL; Tc at 10 µg/mL; chloramphenicol (Cm) at 25 µg/mL; Gm at 15 µg/mL; or Km at 30 µg/mL. The solid mating medium used for conjugation was produced with LB* medium, and transconjugant selection was performed on solid K-malate medium supplemented with appropriate antibiotics as previously described[16].

Construction and selection of the *A. brasilense* 12-A null mutant, *A. brasilense* C-56A complemented mutant, and *A. brasilense* C-40A control strains. The *A. brasilense cdgD*::Km^R null mutant, referred to as the 12-A strain, was constructed as described previously[16]. Initially, the pAB*cdgD* suicide plasmid was produced by molecular cloning following the molecular biology protocols described by Green and Sambrook[17]. Briefly, a fragment containing the *cdgD* gene was obtained by PCR. The primers used for this purpose were 4571RC-F and 4571DC-R (Supplementary Table S2), and amplification was performed with High-fidelity Platinum *Taq* DNA polymerase (Invitrogen Thermo Fisher Scientific Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). The fragment was cloned into the pCR 2.1 TOPO vector (Thermo Fisher Scientific Life Technologies) to yield the pCR*cdgD* plasmid. The pCR*cdgD* plasmid was digested with the restriction enzyme *Eco*RI, and the fragment was cloned into pSUP202, digested with the same restriction enzyme[18], to yield pAB*cdgD*. The *km*^{R} gene was released from the pBSL98 plasmid with the restriction enzyme *Sma*I[19] and inserted into pAB*cdgD*, which had been digested with the same restriction enzyme; this construct was named pAB*cdgD::km*^{R}. The obtained plasmids were transformed into *E. coli* S17.1 cells[18]. For conjugation assays, *A. brasilense* cells were grown on LB* solid medium[16]. Transconjugants were selected in K-malate medium supplemented with Km at 50 µg/mL. The obtained mutant was verified by PCR and sequencing, which showed that the ORF was disrupted. The *A. brasilense* C-56A complemented mutant was generated from a construct of the *cdgD* gene with its native region promoter obtained with the primers F-ORF210 (*Hind*III) and R-ORF-210 (*Xho*I), containing the restriction enzyme sequences indicated for direct cloning in the pVK100 broad host plasmid[20], which was digested with the same restriction enzymes to yield the construct pVK*pcdgD*. Next, this construct was transformed into *E. coli* DH5α cells and subsequently to the *E. coli* S17.1 (pVK*pcdgD*) donor. This plasmid was then transferred by conjugation to *A. brasilense* 12-A. A control strain carrying the empty plasmid was also constructed to generate the *A. brasilense* C-40A strain. All strains were verified by PCR and sequencing using the described corresponding primers (Supplementary Table S2).

Construction of the *A. brasilense* FPDm1 chromosomal transcriptional fusion for abiotic and plant assays. The pAZBR-T7mCh plasmid was constructed from the pJMS-Km^R suicide vector[21] as follows. The CMP-*Pst*IF/CMP-*Kpn*IR primers (Supplementary Table S2) were used to amplify a 5′ fragment of 700 bp that included the ORF (GenBank accession number CCC96879.1, encoding a membrane protein of unknown function), which was then cloned into pGEM-TEasy (Promega, Madison, WI, USA) to generate the pAB79 plasmid. Subsequently, the MTF-*Spe*IF/MTF-*Nco*IR primers (Supplementary Table S2) were used to amplify a 3′ fragment of 900 bp that include the ORF (GenBank accession number CCC96880.1, encoding a putative SAM-dependent methyltransferase), which was further cloned into pGEM-TEasy to yield the pAB80 plasmid. Both fragments were excised from the plasmids with the corresponding restriction enzymes and cloned into pJMS-Km^R to obtain a suicide plasmid with the *mCherry* gene without a promoter. Subsequently, the amplicon of the terminator of the T7 sequence (T7 iorA, Supplementary Table S2) was introduced between the *mCherry* gene and the CCC96879.1 gene to guarantee the transcription termination of the ORF encoded by this gene. This plasmid was designated pAZBR-T7mCh (Supplementary Fig. S1). In this plasmid, a fragment 456 bp upstream of the *cdgD* gene, including its promoter, which had been previously amplified with the primers P-*cdgD*-F/(*Sna*B1) and P-*cdgD*-R/(*Xho*I) (Supplementary Table S2), was cloned into the 5′ region of the *mCherry* gene, which was previously cloned into pGEM-TEasy to yield the pGEM-*pcdgD* plasmid. Both the pAZBR-T7mCh

and pGEM-*pcdgD* plasmids were digested with *Xho*I and *Sna*B1, followed by cloning to obtain the pAZBR*pcdgD*T7mCh plasmid, which was verified by PCR and sequencing. The pAZBR-T7mCh and pAZBR*pcdgD*T7mCh constructs were subsequently transformed into the mobilizing *E. coli* S17.1 strain, and the resultant strains were then transferred by conjugation into the *A. brasilense* Sp245 strain (cloned into a neutral locus of the *A. brasilense* chromosomal region) to obtain the control and tagged mCherry strains, respectively. These last two strains were used in further experiments to determine the expression of the *cdgD* gene under culture conditions and in wheat plants (Supplementary Table S1 and Fig. S1).

Application of bioinformatics tools for the analysis and modeling of the CdgD protein. The CdgD protein sequence from *A. brasilense* Sp245 was retrieved from the NCBI database (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein; accession number; AZOBR_100210). The Rapid Annotation using Subsystem Technology (RAST, http://RAST.nmpdr.org) server was employed for the initial analysis. Protein domain predictions were made using SMART[22] (http://smart.embl-heidelberg.de), HMMER[23] and PROSITE[24]. To predict and identify transmembrane regions, the TMHMM[25] and TMpred tools were used[26]. The visualization of the transmembrane helices was performed with the HeliQuest helical wheel-drawing program[27]. Secondary and three-dimensional structure predictions were performed using the Phyre2 and I-Tasser programs to detect the domain organization and to identify a suitable template fold for the CHASE and PAS-GGDEF-EAL domains[28]. Three-dimensional models of the CHASE (residues 64–327) and PAS-GGDEF-EAL (residues 378–946) domains were obtained using the Phyre2 and I-Tasser packages and analysed with Chimera software[29] using the following crystal structure as a structural templates: the CHASE domain of the PcrK histidine kinase of *Xanthomonas campestris* pv *campestris* (Protein Data Bank, PDB Code: 6K62)[30], histidine kinase 4 (AHK4) from *Arabidopsis thaliana* (PDB Code: 3T4J)[31], and the PAS-GGDEF-EAL domains of the RbdA protein from *Pseudomonas aeruginosa* (PDB Code: 5XGB)[32], as reference models.

Biofilm assays. Overnight cultures in LB* were subcultured in fresh NFB* supplemented with KNO_3 or NH_4Cl as a nitrogen source to an OD at 590 nm (OD 590) of 0.01 and grown with shaking at 30 °C until they reached an OD 590 of 1.2–1.4, as described previously[33]. The cultures were diluted 1:100, and a 3 mL aliquot was inoculated into each of four wells per strain in a 24-well plate. The plates were incubated in a humidified chamber at 30 °C for 72 h. Then, the adherent biomass was stained via immersion for 30 min in 0.5 mL of a 0.5% (w/v) crystal violet solution. The adsorbed crystal violet was solubilized by immersion in 2 mL of 33% acetic acid, and the absorbance of this solution was determined at 595 nm in a multidetection microplate reader (EON-Biotek Spectrophotometer Biotek Instrument). The biomass of each sample was determined by total protein determination with the Bradford reagent assay (Sigma-Aldrich Chemical, St. Louis, Missouri, USA). The data are presented as ratios normalized to the mg/protein values obtained within each experiment. The wild-type, mutant, and complemented mutant were evaluated in three independent experiments, each of which included three technical replicates.

Motility assays. The motility assays were performed essentially as described previously[21] in media containing 0.25% agar and K-malate, K-fumarate and K-proline as a source of carbon at a 10 mM concentration. The wild-type, mutant, and complemented mutant were evaluated by measuring their motility in cm in three independent experiments, each of which included three technical replicates.

Determination of extracellular polymeric substance (EPS) production. EPS quantification was performed as previously described[21]. Briefly, the *A. brasilense* WT strain, its isogenic mutant, and the complemented strain were grown in NFB* medium supplemented with KNO_3 or NH_4Cl as a nitrogen source to an OD at 590 nm of 0.01 and subsequently grown with shaking at 30 °C until they reached an OD at 590 nm of 1.2–1.4. These cultures were incubated at 30 °C under static conditions for 3 days. The cells (2 mL) were harvested by centrifugation at 10,000 rpm (Biofuge-Heraeus, Thermo Fisher Scientific) for 3 min and resuspended in 1 mL of NFB* medium, to which a 0.005% (w/v) CR colorant solution (Sigma-Aldrich, Chemical) was added to achieve a 40 µg/mL concentration. The cells were incubated with shaking (200 rpm) for 2 h. Next, the samples were pelleted by centrifugation at 10,000 rpm. The amount of CR remaining in the supernatant was determined by measuring the OD 490 nm of the solution and comparing the result with the calibration curve of CR (concentration from 10 to 300 µg/mL) to obtain the µg CR. The protein concentration was determined via the Bradford protein assay. CR binding was expressed as µg CR/mg protein. Each culture was evaluated by measuring the EPS content in three independent experiments, each of which included three technical replicates.

Determination of cyclic-di-GMP levels using a riboswitch biosensor. *Azospirillum brasilense* strains harboring the pFY4535 plasmid containing the c-di-GMP biosensor[34] were constructed via the conjugation of *E. coli* S17.1 (pFY4535) to *A. brasilense* Sp245, *A. brasilense* 12-A, *A. brasilense* C-56A and *A. brasilense* C-40A as described previously[16]. Next, the reporter strains were streaked onto a Congo red agar plate containing 30 µg/ml gentamicin and incubated for 48 h at 30 °C. Two colonies from each plate were inoculated into NFB* + KNO_3 broth containing 30 µg/mL Gm and incubated for 24, 48, and 72 h at 30 °C with shaking at 120 rpm. The *Azospirillum* cells were mounted on a coverslip and sealed with a 1% agar plug. Images were acquired using a Nikon TE2000U microscope equipped with a 100× objective (oil immersion objective). For the AmCyan fluorophore, excitation was performed at 457 nm, and the emission spectrum was obtained at 520 nm (green). For the TurboRFP fluorophore, the excitation spectrum was obtained at 553 nm, and emission was measured at 574 nm (red). The images were edited and analysed with Nikon NIS Elements and ImageJ

software[35], respectively. Relative fluorescence intensity (RFI) values were calculated by dividing the intensity value of TurboRFP by that of AmCyan.

RNA extraction and quantitative RT-qPCR. *Azospirillum brasilense* Sp245 was grown in NFB* medium supplemented with KNO_3 or NH_4Cl as a nitrogen source[33] under planktonic or biofilm conditions for 10, 18, 24 or 48 h as described above. After the cells from 6 mL of the culture were pelleted and washed with TE (10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA) buffer, pH 8.0, the obtained pellets were stored at − 70 °C until use. Total RNA was extracted from the pellets, resuspended in 550 µL of TE buffer plus 200 µg/mL (w/v) lysozyme and lysed by sonication at 30% for 5 s (Hielscher UP50H—Compact Lab Homogenizer, 12623 Berlin Germany). The cell suspension was maintained at 37 °C with shaking for 35 min, and 50 µL of 10% SDS (w/v) plus 400 µL of cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB 2% w/v in NaCl 2 M; CTAB, Sigma-Aldrich) was added. After mixing, the suspension was centrifuged at 10,000 rpm for 10 min. The supernatant was treated by mixing with 150 µL of phenol-Tris–HCl, pH 8.0, and RNA was extracted four times with 400 µL of chloroform/isoamyl alcohol (v/v 24:1). After that step, the RNA was precipitated with ethanol and centrifuged at 10,000 rpm for 10 min. The RNA was resuspended in 50 µL of water treated with diethylpyrocarbonate (DEPC, Sigma-Aldrich) at a concentration of 0.1% (w/v) and stored at − 70 °C until use. The concentration and quality of the RNA were determined using an EON-BioTeK spectrophotometer (BioTek Instruments Inc.). RNA integrity was confirmed by electrophoresis in 0.8% (w/v) agarose gels. Complementary DNA (cDNA) synthesis by reverse transcription (RT-PCR) was performed using the Maxima First Strand cDNA Synthesis system (Thermo Fisher Scientific) from 1 µg of extracted RNA. For RT-qPCR analysis, three liquid culture biological replicates were performed for each gene (*cdgD* and *glyA*). Specific RT-qPCR primers (qRT-*cdgD*F, qRT-*cdgD*R, and glyAF, glyAR[36]); were used to amplify the reference and target genes. The reactions were carried out in triplicate using SYBR Green High ROX master mix (Thermo Fisher Scientific, USA). The thermocycling conditions were as follows: 95 °C for 3 min, 40 repetitions of 95 °C for 30 s and 60.5 °C for 30 s, followed immediately by a melting curve, in a StepOnePlus thermocycler (Applied Biosystems, Foster City, California, USA). Gene expression was normalized to the level of the endogenous housekeeping gene *glyA* and to the wild-type RNA reference sample following the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. The standard curve was constructed (in duplicate) using chromosomal DNA. Melting curve analysis was used to confirm the production of a specific single product by each primer pair.

Plant growth conditions of the *A. brasilense* strains, inoculation, and visualization of colonization by confocal laser scanning microscopy (CLSM). The plant experiments were performed essentially as previously described[37] using seeds of the wheat (*Triticum aestivum*) variety 'Nana' and soil obtained from the Campo Agrícola Experimental del Valle de México (INIFAP). Briefly, the seeds were surface-sterilized with 1% (v/v) sodium hypochlorite with agitation (60 rpm) for 30 min after rinsing with sterile water and were then immersed in 40 mL of a solution containing 150 µg/mL cycloheximide, 250 µg/mL streptomycin, 20 µg/mL Tc, and 150 µg/mL fluconazole, with agitation at 60 rpm for 10 min. At the end of the disinfection process, the seeds were rinsed five times with demineralized sterile water for 10 min. Regarding seed inoculation, the *A. brasilense* Sp245, *A. brasilense* 12-A, *A. brasilense* C-40A and *A. brasilense* C-56A strains harboring the pMP2449-5 plasmid were grown on K-malate medium overnight at 30 °C with shaking (150 rpm). The bacterial cells were resuspended in K-malate medium at a final density of 10^9 colony-forming units (CFU)/mL (OD 600 = 1.2). The bacterial suspensions were diluted 100-fold in sterilized NFB* medium to a final density of approximately 5×10^6–5×10^7 CFU/mL. The inoculated seedlings were maintained in tubes with 15 mL of Hoagland hydroponic solution supplemented with NH_4NO_3 (4 mM) in a growth chamber for 7 days under a day–night cycle of 14 h light at 24 °C and 10 h darkness at 16 °C with humidity of 80% as previously described[37]. At 7 days postinoculation, the colonizing bacteria were evaluated by microscopy analysis, and root samples were cut, soaked in sterilized H_2O, placed on glass slides with PBS and covered with glass coverslips. Confocal images were obtained using a Nikon C2 + CLSM (Nikon, Tokyo, Japan) equipped with a CFI Plan Apo Lambda 20× objective and two helium–neon lasers for the excitation of the mCherry fluorophore at wavelengths of 540 nm and 650 nm and an argon laser for the excitation of autofluorescence at 488 nm. The cell morphology and localization of the *A. brasilense* strains (sample and control) were evaluated in the roots to assess the presence of the bacteria and biofilms.

***cdgD* gene promoter expression in wheat plants determined by confocal microscopy.** Nana wheat seeds were sterilized as described in the previous section and germinated on sterile 1.0% H_2O-agar for 72 h in the dark. The seedlings were then transferred to FluoroDish glass-bottom Petri dishes containing Hoagland hydroponic solution and placed in an environmental chamber (24 °C, 14 h light and 16 °C, 10 h dark photoperiod). The *A. brasilense* T7mCh and *A. brasilense* FPDm1 strains were grown overnight in LB* liquid medium, and the cultures were subsequently diluted in phosphate buffer and used to inoculate 3-day-old seedlings at 1×10^7 CFU/mL. The samples were visualized by confocal microscopy for 24 or 48 h to evaluate *cdgD* gene promoter expression in association with wheat plants. Confocal images were acquired using a Nikon C2 + CLSM (Nikon, Tokyo, Japan) equipped with a CFI Plan Apo Lambda 20× objective and two helium–neon lasers for the excitation of the mCherry fluorophore at wavelengths of 540 nm and 650 nm and an argon laser for the excitation of autofluorescence at 488 nm. The Nikon NIS Elements program provided by Nikon was used to acquire, analyse, and edit the images.

Plant colonization experiments under soil conditions. Wheat seed disinfection and the inoculation of seedlings 3 days after germination were performed as described above. The seedlings were placed in an environmental chamber maintained under a day–night cycle as described above for 3 days. Next, the seedlings were inoculated with 1×10^6–1×10^7 CFU/mL of the *A. brasilense* Sp245, *A. brasilense* 12-A, *A. brasilense* C-56A

or *A. brasilense* C-40A strain, grown in a 50 mL flask with sterile soil for 7 days postinoculation and handled as described above. Subsequently, the plants were carefully washed to remove all adhered soil with sterile water for 40 s. The colonizing bacteria were quantified by colony counting in CR medium supplemented with the appropriate antibiotic (WT, Ap, 150 µg/mL; *A. brasilense* 12-A, Km, 50 µg/mL; C-40A or C-56A, Tc, 20 µg/mL).

Statistical analyses. For all experiments, the overall data were analysed by Student's t-test, to determine whether the mutant significantly affected all phenotypes tested and the expression of *cdgD* gene under the analysed growth conditions as well as the colonization tests. The difference were considered to be significant when the *p* value were < 0.05. Statistical analyses were performed using Sigma plot 11.0 software (Systat software, Sn Jose, CA).

Results and discussion

Homology modeling and in silico analysis. While biofilm formation is often described as a natural mode of microbial growth and the second messenger c-di-GMP is known to be a central molecule regulating the microbial transition from a planktonic (motile) to sessile (biofilm) lifestyle[4,15,38], it is clear that we still lack knowledge regarding the genes encoding the proteins responsible for cyclic-di-GMP biosynthesis and degradation and the roles that they play in host plant colonization by *A. brasilense*.

An initial analysis was conducted to confirm the domains constituting the translational product encoded by the *cdgD* gene (GenBank accession number AZOBR_100210) and further used for structural modeling. Alignments were generated and analysed using the Clustal Omega server (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/) against equivalent domains known to be catalytically active for which a structure has been deposited in the PDB; this approach employed to compare the motifs of the translational product of the *cdgD* gene to the WspR of *Pseudomonas aeruginosa* or the PleD of *Caulobacter crescentus* diguanylate cyclase as a reference for the amino acid motifs of the GGDEF protein domain[39,40] and to RocR from *P. aeruginosa* as a reference for the EAL-containing domain[41] to identify the GGDEF and EAL domains in the CdgD hybrid protein. The identified GGDEF domain consists of highly conserved sequence motifs that include the D/E catalytic site and other residues involved in the substrate binding and coordination of one of the two divalent cations[41]. Moreover, we identified a motif acting as a regulator of DGC function, referred to as the I site, which was determined to contain an RXXD motif immediately preceding the GGDEF catalytic motif[42] (Supplementary Fig. S2a,b). The EAL domain also exhibits all characteristics of the amino acid motif required for the binding of divalent cations and the substrate. In addition, a flexible loop (loop 6) that mediates dimerization and controls substrate and cation binding, which are required for catalytic activity, was also found[42,43], (Fig. 1 and Supplementary Fig. S2a,b). Notable characteristics were also observed in the cytoplasmic region of CdgD, including an α-helical lever (H-helix) that joins the GGDEF and EAL regions as well as a signaling α-helix (S-helix) located immediately adjacent to the GGDEF domain (Fig. 1), which has been shown to be important in the folding and regulation of PDE function of RbdA from *P. aeruginosa*[32]. Therefore, we might categorize both domains as functional based on the presence of conserved amino acid motifs in the active sites of the two domains[11,12]. Moreover, the CdgD protein contains three other domains at the N-terminus, including two transmembrane (TMD) domains, a CHASE domain, and a PAS domain, which is a sensor domain that modulates activities in response to external stimuli such as light or small ligands, including O_2, NO, and CO[44]. This PAS domain was identified using the structure of the cytoplasmic region (cRbdA) of RbdA from *P. aeruginosa* as a model that exhibits a highly conserved structural architecture in the cytoplasmic region of the CdgD protein (residues 241–557; PDB Code: 5XGB, resolution 2.28 Å, TM-score 0.918, RMSD 0.79 Å)[32], (Supplementary Table S3, Figs. S3, S4, S5 and S6).

It has been reported that these GGDEF and EAL domain-containing proteins often harbor a diverse array of additional domains that are important for the biochemical function of the specific protein, such as a CHASE domain, which is a periplasmic domain that is defined as a sensory domain and predicted to play a role in small molecule recognition in a wide range of proteins and various bacterial chemotaxis receptors[45,46] and may be a ligand-binding domain (LBD)[47], (Fig. 1). This CHASE domain was located in the N-terminus of the protein between two TMDs (including 264 amino acid residues); according to the presence of these predicted transmembrane segments, the protein may be associated with the cytoplasmic membrane. Structural analysis of the CHASE domain was performed using the same domain found in *Xanthomonas campestris* pv *campestris* histidine kinase PcrK (residues 39–302; PDB Code: 6K62, resolution 2.55 Å, TM-Score 0.955, RMSD 0.82 Å)[30] as a reference model (Fig. 1 and Supplementary Table S3, Figs. S3a,b and S4a,b). The structure showed the highest-confidence resolution scores (TM 0.928 and RMSD 0.74 Å) and fit well with the CHASE domain, and it was recognized as a structural homologue of the CdgD protein, a notably similar structure showing the predicted formation of a homodimer between the two TMDs, with the predicted function of a binding domain involved in periplasmic signaling (Fig. 1). Such a situation has also been described for the *Arabidopsis thaliana* histidine kinase (AHK4) 4–10 protein (PDB Q9C5U0)[31], which has been experimentally shown to be able to bind with cytokinin and both models to provide structural patterns that match the CHASE domain of the CdgD protein well. It was also predicted that the CHASE domain is composed of two PAS domains (membrane-distal and membrane-proximal PAS domains) displaying the same numbers of ß-strands and α helices, even though CdgD sharing only 25% and 19% sequence identity with PcrK or AHK4, respectively (Fig. 1). These results suggest that the CdgD sensor domain adopts a conserved CHASE topology overall, which is consistent with previous findings[30,31]. The occurrence of CHASE and PAS domains has been observed in other hybrid proteins, in which the module mediating the signaling pathway has an effect on the regulation of the dual function of DGC-PDE proteins[48,49].

Therefore, the high conservation of all these motifs in GGDEF and EAL domains, as determined through the sequence alignment and analysis of the three-dimensional (3D) structure predicted for the translational product of the *cdgD* gene suggest that it is likely bifunctional and may be classified as a class I CdgD hybrid protein[11]. To

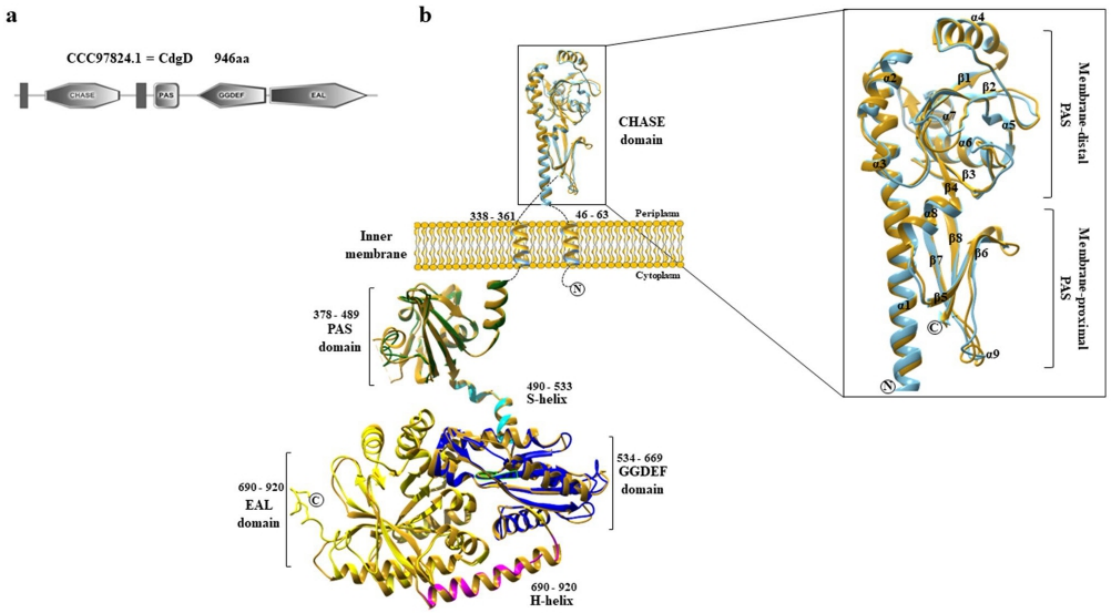


Figure 1. Structural architecture, domain organization, and homology modeling of the CdgD protein of *A. brasilense* Sp245. (**a**) CdgD domains determined by the SMART domain prediction server, with a sequence length of 946 amino acid residues. (**b**) A representation of the CdgD protein with its CHASE sensory domain, two transmembrane domains (TMD), PAS domain, GGDEF domain, EAL domain, the S-helix and H-helix connecting segments crucial for protein dynamics, and key structural features. Overlay of the structures of the periplasmic sensing domains and transmembrane domains of CdgD showing the CHASE domain of PcrK (histidine kinase from *X. campestris* pv *campestris*, PDB code 6K62) in gold and the CHASE domain of CdgD in light blue. cRbdA from *P. aeruginosa* (PDB code 5XGB), shown in gold, was compared with the cytoplasmic region of CdgD. The PAS domain is green, the GGDEF domain is blue, the EAL domain is yellow, and the S-helix and H-helix are cyan and magenta, respectively. The loops that are not included in the structural model are represented schematically by dashed lines. The N and C termini are labeled. Magnification of the CHASE domain showing the membrane-distal PAS subdomains and membrane-proximal PAS subdomains, in which the α-helices and ß-strands are indicated. CdgD and PcrK are light blue and gold, respectively.

verify this hypothesis, an insertional *cdgD::Km*^{R} mutant was constructed (designated as *A. brasilense* 12-A) to test the functions of DGC and PDE to gain further systematic insight into the effect of the mutation on certain phenotypic characteristics (Supplementary material Table S1).

Phenotypic studies of the *cdgD* gene. *Biofilm formation and extracellular polymeric substance (EPSs) production.* To elucidate the molecular basis of the role of the *cdgD* gene of the *A. brasilense* Sp245 strain in biofilm formation, motility and the colonization of wheat roots, we constructed the *A. brasilense* 12-A mutant. Sequence analysis of this mutant showed that the insertion of the Km resistance cassette interrupted the ORF of the translational product. Additionally, we constructed a corresponding complemented mutant strain harboring the wild-type *cdgD* gene to compare the effect of the mutation on biofilm formation and motility against the WT strain. The different strains and plasmids that were constructed and used in this study are shown in Supplementary Table S1. To characterize the differences between *A. brasilense* Sp245 and the derived strains, the strains were grown in NFB* medium supplemented with two different nitrogen sources and cultured under static conditions. Under such conditions, we observed that biofilm formation by the WT was greater in NFB* + KNO_3 than NFB* + NH_4Cl medium (Fig. 2a,b). However, when the bacteria were grown in each type of nitrogen NFB* medium, a marked decrease in the production of biofilm was observed in the mutant compared with the WT, which was recovered in the complemented strain.

Extracellular polymeric substances have been reported[4,6,50,51] to play essential role in the formation of the biofilm matrix. To quantify extracellular polymeric substances such as exopolysaccharides, extracellular DNA (eDNA) and amyloid compounds, we tested their capacity to bind the colorant Congo Red (CR)[8,51–54], and the production of these components was assessed in the strains growing in NFB* medium supplemented with either KNO_3 or NH_4Cl. As anticipated, the mutant growing in NFB* + KNO_3 medium showed a decrease in EPSs production (3.2-fold reduction) compared with the WT, whereas EPSs production similar to that in the WT strain was observed in the complemented strain (Fig. 2c). This data showed that the decreases in biofilm production and extracellular polymeric substance production observed in the mutant strain were corelated in NFB* + KNO_3 medium (Fig. 2a,c). The mutation of the predicted CdgD, which contained a highly conserved

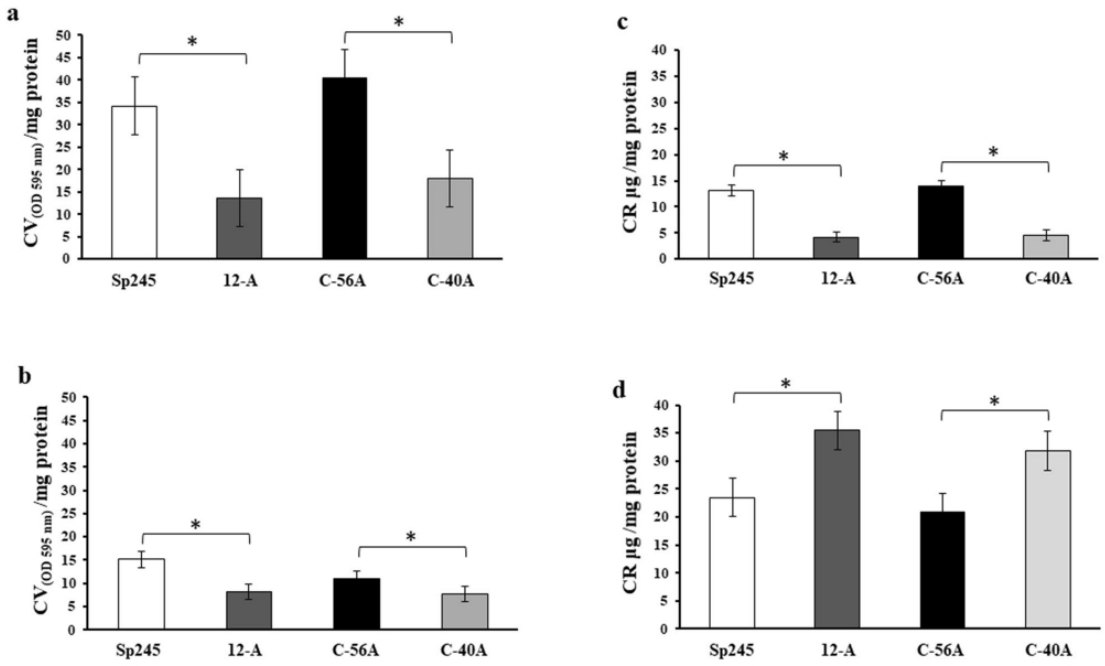


Figure 2. Effects of the mutation of the *cdgD* gene on biofilm and EPS production determined in the *A. brasilense* WT and derivative strains. (**a**) Determination of biofilm formation in NFB* medium supplemented with KNO_3 via the quantification of CV/mg protein values. (**b**) Determination of biofilm formation in NFB* supplemented with NH_4Cl medium via the quantification of CV/mg protein values. (**c**,**d**) Determination of EPS production in the media described above via the quantification of CR/mg protein values in a staining assay. Wild type (Sp245), isogenic mutant (12-A), complemented mutant (C-56A), and empty vector mutant (C-40A). Error bars represent the standard deviations of three biological replicates, and statistically significant differences are indicated at $*P < 0.05$ according to Student's t-test by SigmaPlot (Systat Software, San Jose, CA).

GGDEF motif, decreased biofilm formation and affected the production of EPSs matrix components, as determined by quantification based on staining with CV[53] and CR colorant binding to components of the matrix structure of biofilms[51,54], this results are consistent with this protein being a DGC. However, an unexpected result was obtained when the strains were grown in NFB* + NH_4Cl medium. In effect, the mutant showed an increase in EPS production of 1.6-fold compared with the WT strain (Fig. 2d). In contrast to the data obtained on biofilm formation, in the case of extracellular polymeric substance production, a significant increase was notably observed in the mutant in medium supplemented with NH_4Cl. Furthermore, when the EPSs quantification data for the WT strain were compared to analyse growth in NFB* + KNO_3 and NFB* + NH_4Cl (13.13 µg/mg protein compared with 23.4 µg/mg protein, respectively), 1.7-fold higher production was observed in the medium supplemented with ammonium (Fig. 2c,d). Similar results were obtained for cells of the 12-A mutant growing under the same conditions (4.1 µg/mg protein versus 37.3 µg/mg protein), corresponding to 9.1-fold higher production. These data indicated that the nitrogen source causes changes in cell surface properties that contribute to CR binding (Fig. 2c,d). Therefore, the data obtained in each type of nitrogen-supplemented NFB* medium suggest a differential contribution of the *cdgD* gene to cell surface properties, as demonstrated by changes in binding to CR. These results are notable because amongst the EPS, the production of extracellular polysaccharides in flocs plays an important role in the infection bacterial ability to colonize the surface of plant roots[2,15,54–57]. Furthermore, the nitrogen source had an effect on biofilm formation, which was more significant in presence of KNO_3 compared to NH_4Cl (Fig. 2). These data are in keeping with findings obtained in both *A. brasilense*[58,59] and other bacterial species such as *Pseudomonas stutzeri* A150[52] showing that the nitrogen source affects the formation of biofilms and the production of EPSs, particularly the exopolysaccharide components that allow nitrogen fixation by the bacterium[52,59]. Moreover, in *Cellulomonas* spp., nitrogen source limitation induces biofilm formation, which is coupled to the biosynthesis of a curdlan-type biofilm matrix. However, when a nitrogen source is available, the biofilm curdlan matrix is solubilized and used as a carbon and energy source[60]. In *A. brasilense*, different classes of exopolysaccharides are produced under high carbon source and low nitrogen source availability, which were the conditions applied in this study[56,58]. Furthermore, in terms of functional redundancy, several genes presumably encoding DGCs, PDEs or DGC-PDEs have been described in *A. brasilense*[12,21], this gene products could provide compensatory effects that could be responsible for the production of different exopolymeric substance contributing to the changes in cell surface properties observed in cultures grown in medium supplemented with NH_4Cl

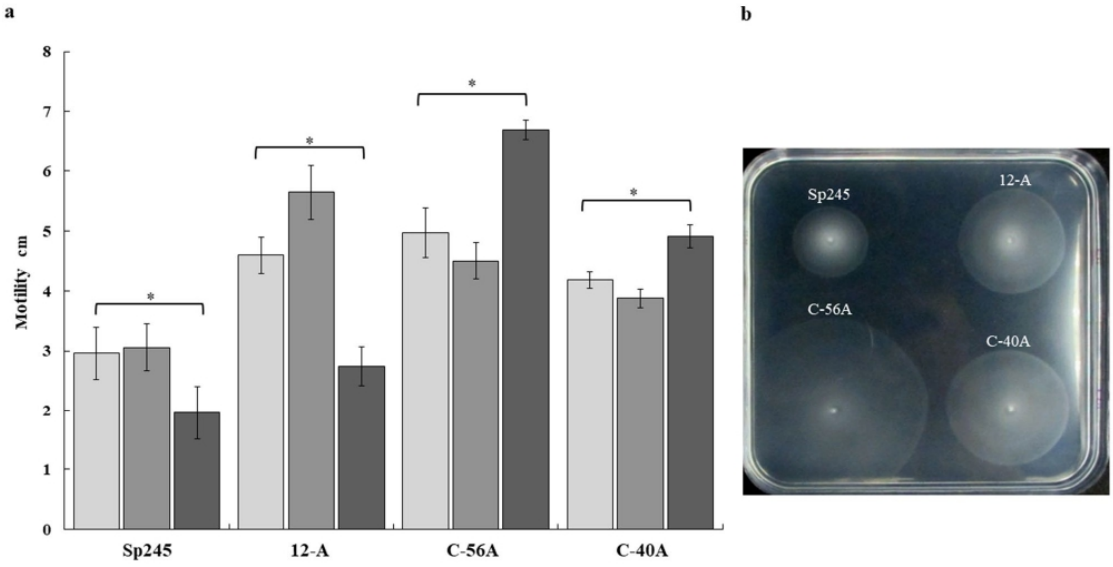


Figure 3. Effects of the mutation and overexpression of the *cdgD* gene on motility determined in *A. brasilense* WT and derivative strains. (**a**) The diameter of the swimming rings in the mutant and the complemented mutant relative to the wild-type strain was measured in minimal medium with the tested carbon sources at 10 mM after 48 h of incubation at 30 °C (□ malate, ▨ fumarate, or ■ proline). Error bars represent the standard deviations of three biological replicates, and the asterisks indicate values that are significantly different from those in the wild type ($P < 0.05$) according to Student's T test by SigmaPlot (Systat Software, San Jose, CA). (**b**) Photograph of a typical agar plate containing minimal medium with 10 mM proline as the carbon source showing the swimming rings of each strain. Wild type (Sp245), isogenic mutant (12-A), complemented mutant (C-56A), and empty vector mutant (C-40A).

as a nitrogen source. It is also possible components of the biofilm matrix in the single-gene mutant are directly or indirectly upregulated in the *A. brasilense* 12-A mutant, as described in other beneficial plant bacteria[7,13,14].

Motility assay. Next, we tested the ability of the 12-A mutant and the complemented C-56A mutant to swim in semisolid agar minimal medium supplemented with malate, fumarate or proline as a carbon source. All strains had been previously tested in NFB* + KNO_3 medium and showed similar growth (Supplementary material Fig. S7). All rings sizes formed by the 12-A mutant or the C56-A are larger than those formed by the wild type strain in all carbon sources tested, however when added to the K-minimal medium, the effect of proline was more pronounced (3.4 times greater than in the WT strain) (Fig. 3a,b).The constructed complemented mutant was generated in the intermediate-copy-number vector pVK100, under which condition the *cdgD* gene was overexpressed and cells grown on soft agar plates exhibited increased swimming motility. Furthermore, cells grown in broth medium exhibited distinct swimming patterns, and the cells of WT strain reduced their motility and began to form small flocs, whereas cells from 12-A mutant or complemented mutant C56-A (Supplemental Movies S1, Movie S2, Movie S3 and Movie S4) continued to move. It has been reported that aerotaxis is a major behavioral response in *A. brasilense*, and the bacterium depends on sensing oxygen gradients. It has also been shown that flocs are formed when oxygen is increased[3,59,61]. Therefore, we suggest that WT cells sensed oxygen more efficiently than the 12-A and C56-A cells did and that they continuously moved mostly without changing the direction of swimming; however, that behavior warrants further research. In addition, it has also been reported that motile cells of *A. brasilense* undergo chemotaxis towards several nutrients found in root exudates, which has been shown to be an essential prerequisite for efficient root colonization[61]. CHASE domains have been observed to sense environmental signals, such as chemoattractants, including organic acids, amino acids and other compounds that are found in root exudates[62,63]. The ability of proline to increase *A. brasilense* motility might be due to the presence of the CHASE domain, which is also able to bind amino acids and other small molecules[47]. Alternatively, other DGCs/PDEs may produce the phenotype in the absence of *cdgD* and perhaps even amplify the effect of CdgD on C-56A. Nevertheless, future studies will clearly establish the nature of the signal recognized by the predicted ligand-binding domain (LBD) of the CHASE domain and elucidate the ligand and signal transduction mechanism.

Determination of cellular cyclic-di-GMP levels using a riboswitch biosensor. Taken together, the results suggest that CdgD is capable of c-di-GMP synthesis, thereby validating its contribution, and indicate that this function is important for biofilm formation and might modulate extracellular polymeric substance production. We estimated the intracellular levels of c-di-GMP in the wild-type (Sp245), 12-A mutant, C-40A control carrying

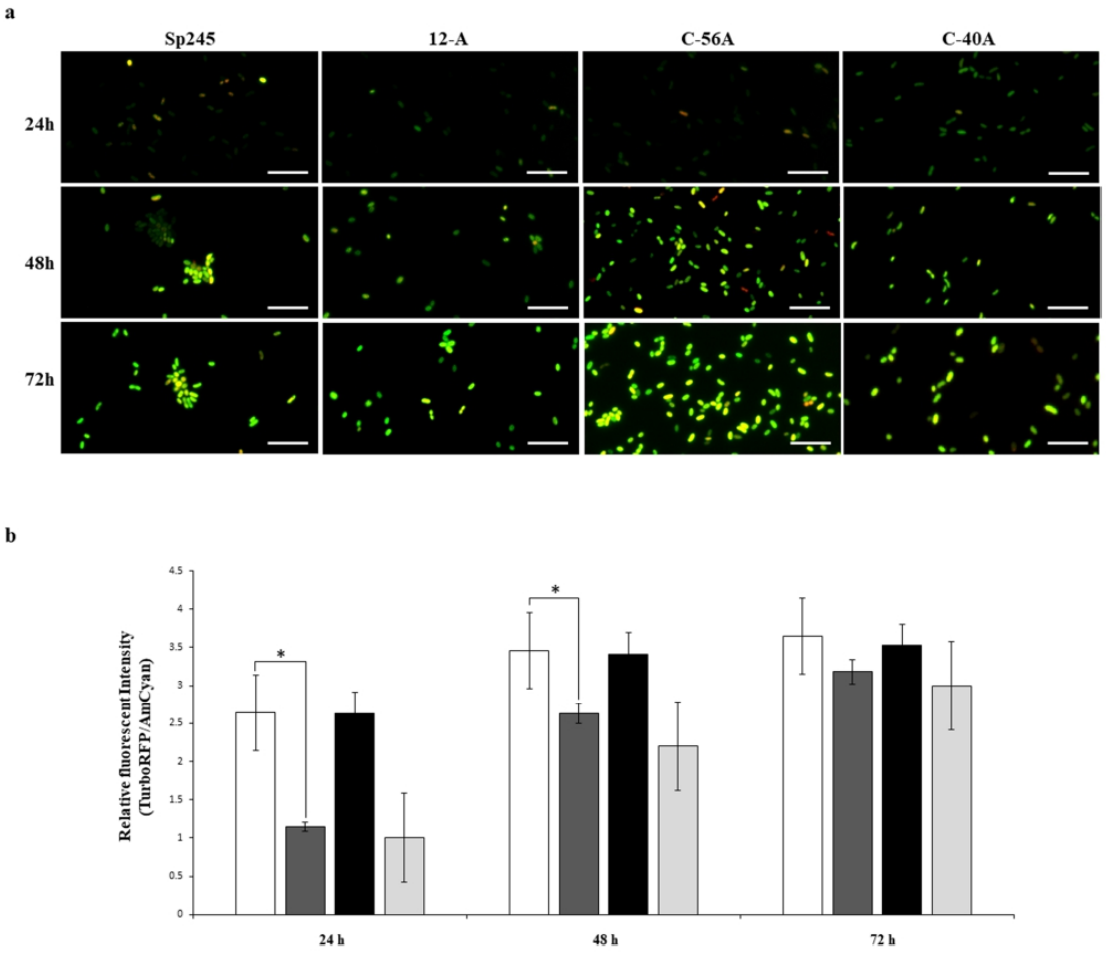


Figure 4. Determination of cyclic-di-GMP levels using a riboswitch biosensor. (**a**) The *A. brasilense* Sp245 ☐, *A. brasilense* 12-A ▩, and *A. brasilense* C-56A ■, and C-40A ▭ strains containing the c-di-GMP biosensor (pFY4535) were grown in NFB* + KNO_3 broth containing 30 µg/mL Gm with incubation for 24, 48, or 72 h at 30 °C. Then, *Azospirillum* cells were attached to the surface of a coverslip and sealed with a 1% agar plug. Cell images were collected at these time points after inoculation using a Nikon TE2000U microscope equipped with a 100× objective (oil immersion objective). Merge images represented the overlay of the fluorescence images AmCyan green, TurboRFP red and both yellow. (**b**) RFI represents the ratio between the TurboRFP and AmCyan fluorescence intensities and is directly proportional to c-di-GMP levels, as analysed using ImageJ software[35]. The RFI values represent the standard deviations of three biological replicates, and significant differences are indicated at $^*P < 0.05$ according to Student's t-test by SigmaPlot (Systat Software, San Jose, CA). The bar corresponds to 10 µm.

out the vector empty and complemented mutant (C-56A) strains using a fluorescent c-di-GMP reporter. This analysis was performed by quantifying the riboswitch fluorescence intensity, which was directly proportional to the c-di-GMP levels[34]. As expected, a low c-di-GMP level was determined in the 12-A mutant compared with the wild-type strain; an approximately 61% or 24% reduction in c-di-GMP levels was observed in the 12-A mutant strain compared with WT cultures at 24 h or 48 h, respectively, which was fully recovered in the complemented mutant. However, there was no significant difference in intracellular c-di-GMP levels compared with the WT strain in the cells after 72 h of growth, potentially due to compensatory effects of other DGCs occurring in the genome of the *A. brasilense* WT strain. In accordance with the data regarding biofilm and EPSs component production from the CR assay, the mutation reduced the levels of c-di-GMP in cells growing in NFB* + KNO_3 medium. These data indicate that overexpression of CdgD allows a temporary intracellular second messenger levels in *A. brasilense* (Fig. 4). Although bioinformatic analysis showed that all amino acid motifs were conserved in the EAL domain, the phenotyping studies were unable to show that CdgD functioned as a PDE protein.

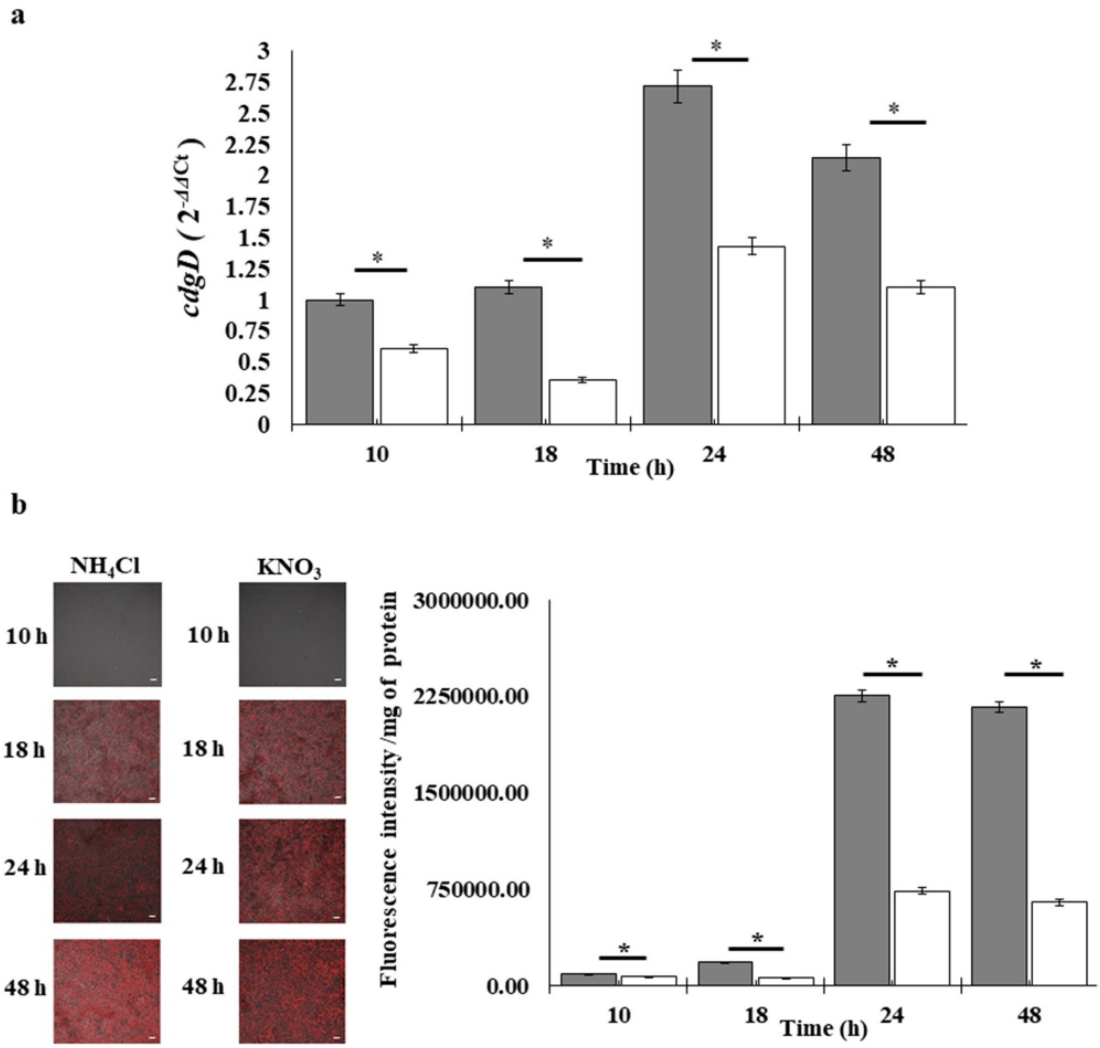


Figure 5. Expression analysis of the *cdgD* gene from planktonic and static cultures of the *A. brasilense* Sp245 strain. (**a**) Determination of *cdgD* gene transcript levels by RT-qPCR. The transcript level data were normalized to those of the reference gene *glyA* and determined relative to the control sample using Applied Biosystems StepOne software. (**b**) Fluorescence micrographs of the *A. brasilense* FPDm1 strain under different culture conditions. Left, bacteria grown in NFB* + KNO_3 media; right, bacteria grown in NFB* + NH_4Cl media. The fluorescence intensity is normalized to total protein values from the *A. brasilense* FPDm1 strain, as analysed using ImageJ[35]. The presented data are the results of three independent experiments with two biological replicates, and the asterisks indicate significant differences from the wild type ($P < 0.05$) according to Student's T test by SigmaPlot (Systat Software, San Jose, CA). The bar corresponds to 10 µm. NFB* + KNO_3, NFB* + NH_4Cl.

Expression of the cdgD gene under abiotic and biotic conditions. Next, we monitored *cdgD* expression by RT-qPCR in exponential- and stationary-phase cultures grown in NFB* supplemented with KNO_3 or NH_4Cl under shaking (10 and 18 h) and static conditions (24 and 48 h) and by using the tagged chromosomal *A. brasilense* FPDm1 strain and *A. brasilense* T7mCh, carrying the *mCherry* gene devoid of the promoter as a negative control. Both strains showed similar growth to the wild-type strain, as determined by the 10^9 CFU/mL value obtained in the exponential phase of growth (18 h), (Fig. 5). In both media, the expression of *cdgD* was initiated at 10 h and continued until 48 h, in cultures growing in planktonic and static conditions. These observations indicate that the expression of the gene is initiated at the beginning of bacterial growth and continues until the later stages of growth. The amount of fluorescence produced was higher in cells growing in NFB* + KNO_3 medium comparative to NFB* + NH_4Cl, (Fig. 5b), indicating that the addition of KNO_3 to the medium increased transcript levels relative to those obtained in presence of NH_4Cl, where expression was further increased when the structure of

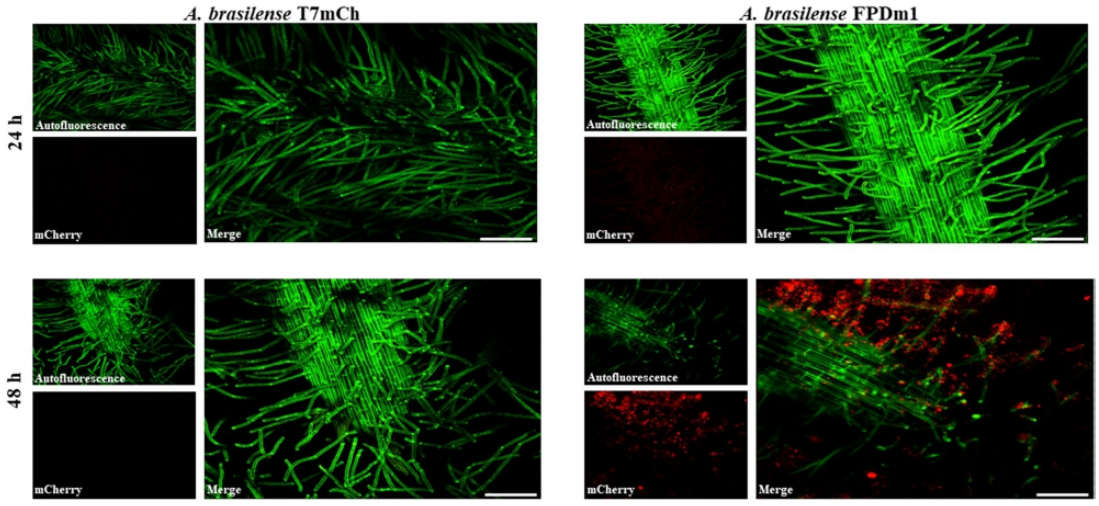


Figure 6. Expression of the *pcdgD-mCherry* transcriptional fusion from *A. brasilense* cells grown under hydroponic conditions and in wheat roots. For the visualization of *mCherry*-expressing *A. brasilense,* cells on wheat roots were observed at 24 h and 48 h postinoculation. Next, the freshly harvested seedling roots were visualized in a FluoroDish. Left, wheat seedling roots inoculated with the *A. brasilense* T7mCh control strain. Right, wheat seedling roots inoculated with the *A. brasilense* FPDm1 strain. The cells exhibiting mCherry fluorescence were visualized using a CLSM with an excitation wavelength of 561 nm, with fluorescence emission captured between 585 and 615 nm. Thereafter, the images were edited using the standard NIS Elements in Nikon software. The bar corresponds to 50 µm.

the biofilm was structurally mature (48 h) (Fig. 5a). Such data indicate a role of the nitrogen source in determining gene expression, which may be direct or indirect. In addition, the data were correlated well with both biofilm production (Fig. 2a) and the production of extracellular polymeric substances (Fig. 2c).This suggests a function for CdgD as a DGC under static culture conditions, which is also supported by elevated cellular c-di-GMP levels (Fig. 4). Considering the data obtained in this study, we suggest that the regulation of the *cdgD* gene by nitrogen source might occur at the transcriptional level with CdgD protein activity as either a DGC or PDE or regulated at the post-translational level, as observed in other bacteria[10,13,14]. However, how signaling involving the CHASE domain modulates the DGC-PDE functions of the CdgD protein remains to be studied.

Next, we attempted to monitor *cdgD* gene promoter expression during the colonization of wheat roots under hydroponic medium conditions by using the tagged chromosomal *A. brasilense* FPDm1 strain and *A. brasilense* T7mCh, carrying the *mCherry* gene devoid of the promoter as a negative control. Both strains showed similar growth to the wild-type strain, as determined by the 10^9 CFU/mL value obtained in the exponential phase of growth (18 h). To visualize the localization of CdgD in vivo, we expressed the m*Cherry* gene fused upstream of the promoter of the *cdgD* gene. In effect, this hypothesis was verified because *A. brasilense* FPDm1 cells that were recovered following 48 h of exposure to the root environment of wheat seedlings showed significant fluorescence in cells maintained on root hairs, and rhizoplane-forming microcolonies were observed, which represent a preliminary step in biofilm formation; zones exhibiting the formation of a mature biofilm were also observed, indicating the expression of the *cdgD* gene, which was clearly lacking in *A. brasilense* T7mCh (Fig. 6). These findings suggest that the activity of the encoded protein is relevant to the early stages (48 h) of colonization in our model rhizosphere assay and that the bacterium is able to enter the roots and thereby colonize the apoplast tissue of wheat roots. In addition, our data suggest that biofilm formation is stimulated as a response to wheat rhizosphere colonization (Fig. 6). This results is in keeping with data obtained in the plant-growth-promoting strain *Pseudomonas fluorescens*, in which genes involved in the metabolism of c-di-GMP are expressed during the colonization of the wheat rhizosphere[14,38], as well as data from *Pseudomonas putida* KT2440, in which the promoter of the *rup4959* gene, encoding a dual GGDEF-EAL protein, was found to be expressed in the maize rhizosphere and upregulated by corn plant root exudates[13].

We further tested the role of the *cdgD* gene in the colonization of wheat roots, and we estimated endorhizosphere colonization by the *A. brasilense* 12-A mutant and compared it with colonization by the WT and complemented *A. brasilense* C-56A mutant strains. Each strain was labeled with the autofluorescent mCherry protein, which was carried by a stable plasmid maintained in *A. brasilense* cells[37]. The plants were grown in glass tubes with Hoagland hydroponic solution and observed by confocal microscopy at 7 days postinoculation. Microscopy observations of these reporter strains indicated that all strains were able to colonize the rhizoplane and root hairs of wheat plants and form biofilms (Fig. 7a). However, differential colonization was visualized in the *A. brasilense* 12-A mutant and its C-40A control strain harboring the empty vector, which exhibited significant rhizosphere colonization. Next, the colonization of the *A. brasilense* 12-A mutant was quantified under two conditions: under hydroponic growth and in sterile soil and compared to the fitness of the WT and the complemented mutant.

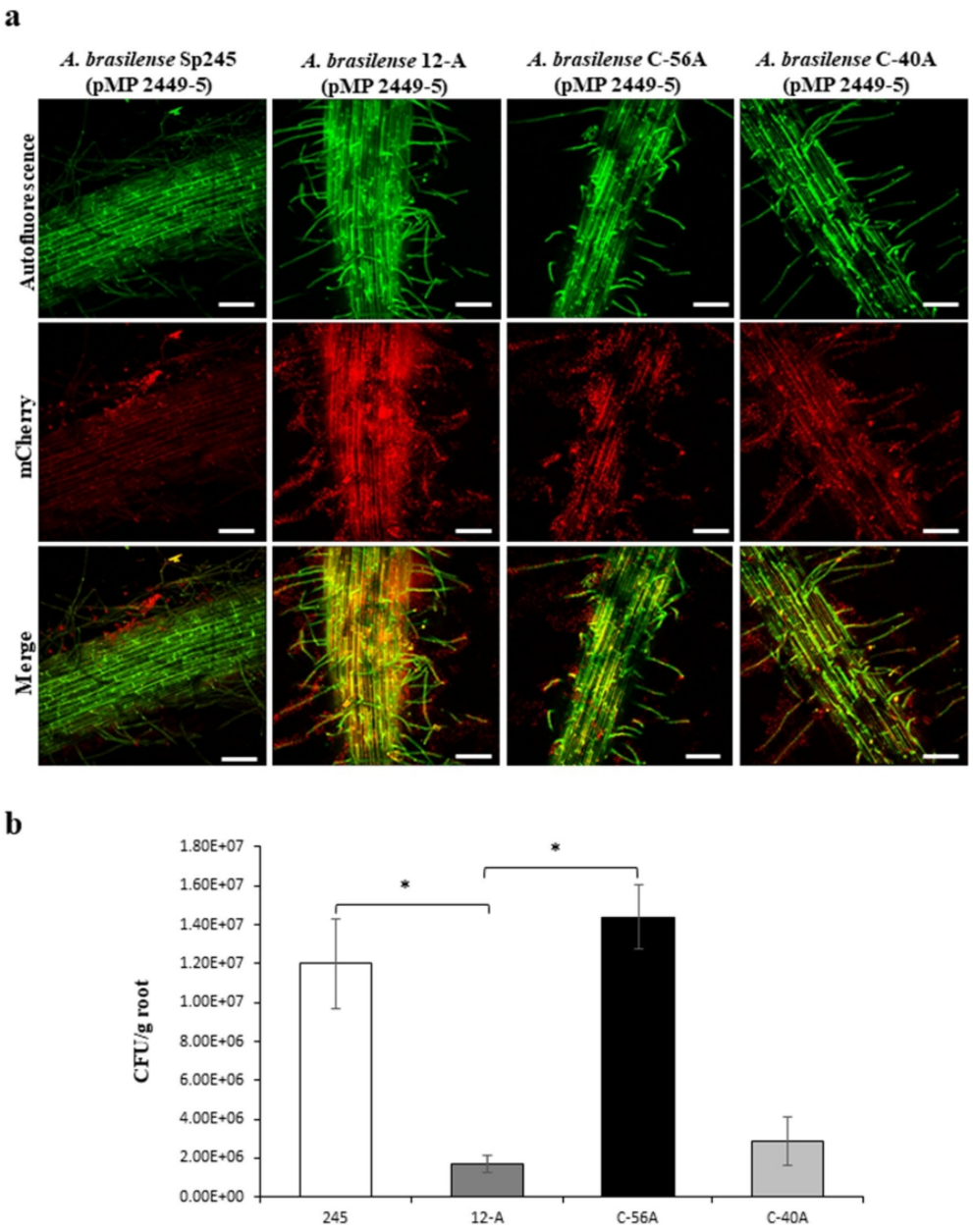


Figure 7. Rhizosphere colonization of *A. brasilense* Sp245, the 12-A mutant, the C-40A control mutant and the C-56A complemented mutant and visualization of tagged colonizing bacteria by CLSM. (**a**) The plants were grown in glass tubes with Hoagland hydroponic solution and examined at 7 days postinoculation with 5×10^6–10^7 CFU/mL of *A. brasilense* Sp245 (pMP2449-5), *A. brasilense* 12-A (pMP2449-5), *A.brasilense* C-40A (pMP2449-5) and *A. brasilense* C-56A (pMP2449-5) (the WT, mutant, and complemented mutant strains, respectively). Subsequently, the cells showing mCherry fluorescence were visualized using CLSM with an excitation wavelength of 561 nm, with fluorescence emission captured between 585 and 615 nm. Thereafter, the images were edited using the standard NIS elements in Nikon software. The bar corresponds to 10 µm. (**b**) The bacterial colonies recovered from the rhizosphere 1 week after inoculation under sterile soil conditions were tested for antibiotic resistance to distinguish the control and mutant strains and were counted. CFU/mL per gram of plant root values are presented on a logarithmic scale. Each experiment was repeated three times with five plants per experiment. Asterisks represent the statistical significance of the data ($P<0.05$) according to Student's t-test by SigmaPlot (Systat Software, San Jose, CA).

The colonization of each strain was determined by counting the colonies obtained at 5 days postinoculation. Nonsignificant differences in fitness and the impairment of colonization were determined in the tested strains under most controlled hydroponic conditions (data not shown). However, the *A. brasilense* 12-A mutant and its control strain harboring the empty vector showed a statistically low ability to colonize wheat roots compared with the WT and complemented mutant C-56A strains tested in sterile soil (Fig. 7b), implying that the *cdgD* gene is involved in the colonization of wheat roots.

However, in our study, the cells of the tagged mutant were observed more frequently than those of the WT and complemented mutant strains in the rhizoplane and rhizosphere (Fig. 7a). This result was surprising because *A. brasilense* Sp245 is an endophytic strain that has been found in the apoplast of plants[63,64]. A different colonization profile was observed in wheat roots associated with the 12-A mutant strain versus the Sp245 or C-56A strain. This effect could be explained by considering that cellulolytic activity might be crucial to the ability of bacteria to penetrate plant roots. Putative complex carbohydrate-degrading enzymes have been found in the analysed genome sequences of three *Azospirillum* species, conferring greater cellulolytic activity[64]. Therefore, these data strongly suggest that the CdgD protein plays a role in bacterial entry into the host plant; however, further research are needed to test this hypothesis.

In addition, under growth in sterile soil conditions, we tested the contribution of the *cdgD* gene to the colonization of the rhizosphere by comparing the ability of the mutant versus the WT and complemented mutant strains to colonize the roots of wheat seedlings. The results indicated less colonization by the mutant compared to the WT and complemented mutant strains, suggesting that unidentified factors, other than motility and biofilm formation, are affected in the 12-A mutant and contribute to the fitness of *A. brasilense* in the rhizosphere colonization (Fig. 7b).

Conclusions

Azospirillum brasilense is a PGPB that has been shown to promote plant growth in several host plants and must therefore successfully colonize the plants, but how colonization is established by the bacterium has not been fully elucidated. Single-gene mutations in predicted related genes encoding DGC and PDE proteins do not result in striking changes in phenotypes that are typically associated with these proteins, such as swimming motility, the production of extracellular polymeric substance components of biofilm matrixes, or host colonization in other bacteria[13–15,38,49,52,63]. Here we show that the inactivation of a gene encoding a hybrid protein that likely behaves as a DGC to decrease c-di-GMP cellular levels functions in motility, production of extracellular polymeric substance components of biofilm matrixes, or plant root surface colonization, indicating its participation in key functions implicated in the interaction of the bacterium with the host plant. Our results also highlights that nutritional status, such as observed here in response to nitrogen availability, has a critical and differential effect on biofilm formation and the production of surface-exposed polymeric substances by *A. brasilense* cells. The increase in the diameter of the swimming motility ring is observed in the presence of proline as a carbon source in the parent and mutant strains overexpressing *cdgD* from a plasmid. These data suggest proline may affect CdgD protein function, possibly through its CHASE signaling domain. Motility mediated by the polar flagellum is critical to the performance of the bacterium swimming in soil water, its chemotaxis towards root exudates and its subsequent attachment to the rhizoplane of root plants, thereby maintaining the sustainable growth of its community in the natural environment. After biofilm formation, the surrounding extracellular matrix provides a structure for the maintenance of biofilm cells, keeping them in long-term close proximity; thus, intense interactions occur with such effects as protecting the community from stresses, such as desiccation, contact with biocides and heavy metals, and ultraviolet radiation, which is essential in the competitive habitat of the soil. An mCherry transcriptional reporter fused to the promoter of the *cdgD* gene confirmed that expression of the *cdgD* gene was increased in the stationary phase under abiotic and biotic conditions in vitro and during the association of *A. brasilense* with wheat roots. This result is consistent with the colonization assay, suggesting that CdgD functions to promote an association with plant roots strong interaction that substantially contributes to better adaptation to changing environmental conditions and guarantees the beneficial effects of the bacterium on the plant host.

Data availability

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation, to any qualified researcher.

Received: 14 January 2020; Accepted: 17 December 2020
Published online: 12 January 2021

References

1. Bashan, Y. & de Bashan, L. How the plant growth-promoting bacterium azospirillum promotes plant growth—A critical assessment. *Adv. Agron.* **108**, 77–136. https://doi.org/10.1016/S0065-2113(10)08002-8 (2010).
2. Pereg, L., de Bashan, L. E. & Bashan, Y. Assessment of affinity and specificity of Azospirillum for plants. *Plant Soil* **399**, 389–414. https://doi.org/10.1007/s11104-015-2778-9 (2016).
3. Russell, M. H. *et al.* Integration of the second messenger c-di-GMP into the chemotactic signaling pathway. *mBio* **4**, e00001–00013. https://doi.org/10.1128/mBio.00001-13 (2013).
4. Lopez, D., Vlamakis, H. & Kolter, R. Biofilms. *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* **2**, a000398. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000398 (2010).
5. Romling, U., Galperin, M. Y. & Gomelsky, M. Cyclic di-GMP: The first 25 years of a universal bacterial second messenger. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* **77**, 1–52. https://doi.org/10.1128/MMBR.00043-12 (2013).
6. Limoli, D. H., Jones, C. J. & Wozniak, D. J. Bacterial extracellular polysaccharides in biofilm formation and function. *Microbiol. Spect.* https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MB-0011-2014 (2015).

7. Schäper, S. *et al.* Cyclic Di-GMP regulates multiple cellular functions in the symbiotic alphaproteobacterium *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **198**, 521–535. https://doi.org/10.1128/JB.00795-15 (2015).
8. Taglialegna, A., Lasa, I. & Valle, J. Amyloid structures as biofilm matrix scaffolds. *J. Bacteriol.* **198**, JB.00122-00116. https://doi.org/10.1128/JB.00122-16 (2016).
9. Guttenplan, S. B. & Kearns, D. B. Regulation of flagellar motility during biofilm formation. *FEMS Microbiol. Rev.* **37**, 849–871. https://doi.org/10.1111/1574-6976.12018 (2013).
10. Jones, C. J. *et al.* C-di-GMP regulates motile to sessile transition by modulating MshA pili biogenesis and near-surface motility behavior in *Vibrio cholerae*. *PLoS Pathog.* **11**, e1005068. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005068 (2015).
11. Romling, U., Liang, Z. X. & Dow, J. M. Progress in understanding the molecular basis underlying functional diversification of cyclic dinucleotide turnover proteins. *J. Bacteriol.* https://doi.org/10.1128/JB.00790-16 (2017).
12. Mata, A. R., Pacheco, C. M., Cruz Perez, J. F., Saenz, M. M. & Baca, B. E. In silico comparative analysis of GGDEF and EAL domain signaling proteins from the Azospirillum genomes. *BMC Microbiol.* **18**, 20. https://doi.org/10.1186/s12866-018-1157-0 (2018).
13. Matilla, M. A., Travieso, M. L., Ramos, J. L. & Ramos-Gonzalez, M. I. Cyclic diguanylate turnover mediated by the sole GGDEF/EAL response regulator in *Pseudomonas putida*: Its role in the rhizosphere and an analysis of its target processes. *Environ. Microbiol.* **13**, 1745–1766. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02499.x (2011).
14. Little, R. H. *et al.* Differential regulation of genes for Cyclic-di-GMP metabolism orchestrates adaptive changes during rhizosphere colonization by *Pseudomonas fluorescens*. *Front. Microbiol.* **10**, 1089. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01089 (2019).
15. Pérez-Mendoza, D. & Sanjuán, J. Cyclic di-GMP regulation in beneficial plant-microbe interactions. In *Microbial Probiotics for Agricultural Systems: Advances in Agronomic Use* (eds Zúñiga-Dávila, D., González-Andrés, F., & Ormeño-Orrillo, E.) 3–17 (Springer, Cham, 2019).
16. Jijon-Moreno, S., Baca, B. E., Castro-Fernandez, D. C. & Ramirez-Mata, A. TyrR is involved in the transcriptional regulation of biofilm formation and D-alanine catabolism in *Azospirillum brasilense* Sp7. *PLoS ONE* **14**, e0211904. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211904 (2019).
17. Green, M. R. & Sambrook, J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2012).
18. Simon, R., Priefer, U. & Pühler, A. A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: Transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Bio/Technology* **1**, 784–791. https://doi.org/10.1038/nbt1183-784 (1983).
19. Alexeyev, M. F., Shokolenko, I. N. & Croughan, T. P. Improved antibiotic-resistance gene cassettes and omega elements for *Escherichia coli* vector construction and in vitro deletion/insertion mutagenesis. *Gene* **160**, 63–67. https://doi.org/10.1016/0378-1119(95)00108-i (1995).
20. Knauf, V. C. & Nester, E. W. Wide host range cloning vectors: A cosmid clone bank of an Agrobacterium Ti plasmid. *Plasmid* **8**, 45–54. https://doi.org/10.1016/0147-619x(82)90040-3 (1982).
21. Ramírez-Mata, A. *et al.* The cyclic-di-GMP diguanylate cyclase CdgA has a role in biofilm formation and exopolysaccharide production in *Azospirillum brasilense*. *Res. Microbiol.* **167**, 190–201. https://doi.org/10.1016/j.resmic.2015.12.004 (2016).
22. Letunic, I., Doerks, T. & Bork, P. SMART: Recent updates, new developments and status in 2015. *Nucleic Acids Res.* **43**, D257-260. https://doi.org/10.1093/nar/gku949 (2015).
23. Finn, R. D. *et al.* HMMER web server: 2015 update. *Nucleic Acids Res.* **43**, W30-38. https://doi.org/10.1093/nar/gkv397 (2015).
24. de Castro, E. *et al.* ScanProsite: Detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in proteins. *Nucleic Acids Res.* **34**, W362-365. https://doi.org/10.1093/nar/gkl124 (2006).
25. Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G. & Sonnhammer, E. L. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: Application to complete genomes. *J. Mol. Biol.* **305**, 567–580. https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4315 (2001).
26. Hofmann, K. TMBASE-A database of membrane spanning protein segments. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **374**, 166 (1993).
27. Gautier, R., Douguet, D., Antonny, B. & Drin, G. HELIQUEST: A web server to screen sequences with specific alpha-helical properties. *Bioinformatics* **24**, 2101–2102. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn392 (2008).
28. Yang, J. *et al.* The I-TASSER Suite: Protein structure and function prediction. *Nat. Methods* **12**, 7–8. https://doi.org/10.1038/nmeth.3213 (2015).
29. Pettersen, E. F. *et al.* UCSF Chimera—A visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* **25**, 1605–1612. https://doi.org/10.1002/jcc.20084 (2004).
30. Chen, P. *et al.* The crystal structure of the phytopathogenic bacterial sensor PcrK reveals different cytokinin recognition mechanism from the plant sensor AHK4. *J. Struct. Biol.* **208**, 69–76. https://doi.org/10.1016/j.jsb.2019.08.001 (2019).
31. Hothorn, M., Dabi, T. & Chory, J. Structural basis for cytokinin recognition by *Arabidopsis thaliana* histidine kinase 4. *Nat. Chem. Biol.* **7**, 766–768. https://doi.org/10.1038/nchembio.667 (2011).
32. Liu, C. *et al.* Insights into biofilm dispersal regulation from the crystal structure of the PAS-GGDEF-EAL region of RbdA from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* https://doi.org/10.1128/JB.00515-17 (2018).
33. Di Palma, A. A. *et al.* Denitrification-derived nitric oxide modulates biofilm formation in *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiol. Lett.* **338**, 77–85. https://doi.org/10.1111/1574-6968.12030 (2013).
34. Zamorano-Sanchez, D. *et al.* Functional specialization in vibrio cholerae diguanylate cyclases: Distinct modes of motility suppression and c-di-GMP production. *mBio*. https://doi.org/10.1128/mBio.00670-19 (2019).
35. Schneider, C. A., Rasband, W. S. & Eliceiri, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* **9**, 671–675. https://doi.org/10.1038/nmeth.2089 (2012).
36. McMillan, M. & Pereg, L. Evaluation of reference genes for gene expression analysis using quantitative RT-PCR in *Azospirillum brasilense*. *PLoS ONE* **9**, e98162. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098162 (2014).
37. Ramirez-Mata, A., Pacheco, M. R., Moreno, S. J., Xiqui-Vazquez, M. L. & Baca, B. E. Versatile use of *Azospirillum brasilense* strains tagged with egfp and mCherry genes for the visualization of biofilms associated with wheat roots. *Microbiol. Res.* **215**, 155–163. https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.07.007 (2018).
38. Muriel, C. *et al.* AmrZ is a major determinant of c-di-GMP levels in *Pseudomonas fluorescens* F113. *Sci. Rep.* https://doi.org/10.1038/s41598-018-20419-9 (2018).
39. De, N., Navarro, M. V., Raghavan, R. V. & Sondermann, H. Determinants for the activation and autoinhibition of the diguanylate cyclase response regulator WspR. *J. Mol. Biol.* **393**, 619–633. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.08.030 (2009).
40. Wassmann, P. *et al.* Structure of BeF3−-modified response regulator PleD: Implications for diguanylate cyclase activation, catalysis, and feedback inhibition. *Structure (London, England: 1993)* **15**, 915–927. https://doi.org/10.1016/j.str.2007.06.016 (2007).
41. Rao, F., Yang, Y., Qi, Y. & Liang, Z. X. Catalytic mechanism of cyclic di-GMP-specific phosphodiesterase: A study of the EAL domain-containing RocR from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **190**, 3622–3631. https://doi.org/10.1128/JB.00165-08 (2008).
42. Navarro, M. V. *et al.* Structural basis for c-di-GMP-mediated inside-out signaling controlling periplasmic proteolysis. *PLoS Biol.* **9**, e1000588. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000588 (2011).
43. Tchigvintsev, A. *et al.* Structural insight into the mechanism of c-di-GMP hydrolysis by EAL domain phosphodiesterases. *J. Mol. Biol.* **402**, 524–538. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.07.050 (2010).
44. Galperin, M. Y., Nikolskaya, A. N. & Koonin, E. V. Novel domains of the prokaryotic two-component signal transduction systems. *FEMS Microbiol. Lett.* **203**, 11–21. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2001.tb10814.x (2001).
45. Mougel, C. & Zhulin, I. B. CHASE: An extracellular sensing domain common to transmembrane receptors from prokaryotes, lower eukaryotes and plants. *Trends Biochem. Sci.* **26**, 582–584. https://doi.org/10.1016/s0968-0004(01)01969-7 (2001).

46. Schirmer, T. C-di-GMP synthesis: Structural aspects of evolution, catalysis and regulation. *J. Mol. Biol.* **428**, 3683–3701. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.07.023 (2016).
47. Ortega, A., Zhulin, I. B. & Krell, T. Sensory repertoire of bacterial chemoreceptors. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* https://doi.org/10.1128/MMBR.00033-17 (2017).
48. Tarutina, M., Ryjenkov, D. A. & Gomelsky, M. An unorthodox bacteriophytochrome from *Rhodobacter sphaeroides* involved in turnover of the second messenger c-di-GMP. *J. Biol. Chem.* **281**, 34751–34758. https://doi.org/10.1074/jbc.M604819200 (2006).
49. Feirer, N. *et al.* A pterin-dependent signaling pathway regulates a dual-function diguanylate cyclase-phosphodiesterase controlling surface attachment in *Agrobacterium tumefaciens*. *mBio* **6**, e00156. https://doi.org/10.1128/mBio.00156-15 (2015).
50. Ma, L., Jackson, K. D., Landry, R. M., Parsek, M. R. & Wozniak, D. J. Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* conditional psl variants reveals roles for the psl polysaccharide in adhesion and maintaining biofilm structure postattachment. *J. Bacteriol.* **188**, 8213–8221. https://doi.org/10.1128/JB.01202-06 (2006).
51. Cimdins, A. *et al.* Alterations of c-di-GMP turnover proteins modulate semi-constitutive rdar biofilm formation in commensal and uropathogenic *Escherichia coli*. *MicrobiologyOpen* https://doi.org/10.1002/mbo3.508 (2017).
52. Wang, D., Xu, A., Elmerich, C. & Ma, L. Z. Biofilm formation enables free-living nitrogen-fixing rhizobacteria to fix nitrogen under aerobic conditions. *ISME J.* **11**, 1602–1613. https://doi.org/10.1038/ismej.2017.30 (2017).
53. O'Toole, G. A. Microtiter dish biofilm formation assay. *J. Visual. Exp. JoVE* https://doi.org/10.3791/2437 (2011).
54. Jones, C. J. & Wozniak, D. J. Congo Red Stain Identifies Matrix Overproduction and Is an Indirect Measurement for c-di-GMP in Many Species of Bacteria. In *Methods in Molecular Biology*, vol 1657. 147–156 (Humana Press, New York, NY, 2017)
55. Khan, M. S. A., Altaf, M. M. & Ahmad, I. Chemical nature of biofilm matrix and its significance. *Biofilms Plant Soil Health*. https://doi.org/10.1002/9781119246329.ch9 (2017).
56. Sadasivan, L. & Neyra, C. A. Flocculation in *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*: Exopolysaccharides and cyst formation. *J. Bacteriol.* **163**, 716–723 (1985).
57. Siuti, P., Green, C., Edwards, A. N., Doktycz, M. J. & Alexandre, G. The chemotaxis-like Che1 pathway has an indirect role in adhesive cell properties of *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiol. Lett.* **323**, 105–112. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02366.x (2011).
58. Skvortsov, I. M. & Ignatov, V. V. Extracellular polysaccharides and polysaccharide-containing biopolymers from Azospirillum species: Properties and the possible role in interaction with plant roots. *FEMS Microbiol. Lett.* **165**, 223–229. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1998.tb13150.x (1998).
59. Bible, A. N. *et al.* Metabolic adaptations of *Azospirillum brasilense* to oxygen stress by cell-to-cell clumping and flocculation. *Appl. Environ. Microbiol.* **81**, 8346–8357. https://doi.org/10.1128/AEM.02782-15 (2015).
60. Young, J. M., Leschine, S. B. & Reguera, G. Reversible control of biofilm formation by *Cellulomonas* spp. in response to nitrogen availability. *Environ. Microbiol.* **14**, 594–604. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02596.x (2012).
61. Alexandre, G., Greer-Phillips, S. & Zhulin, I. B. Ecological role of energy taxis in microorganisms. *FEMS Microbiol. Rev.* **28**, 113–126. https://doi.org/10.1016/j.femsre.2003.10.003 (2004).
62. Oku, S., Komatsu, A., Tajima, T., Nakashimada, Y. & Kato, J. Identification of chemotaxis sensory proteins for amino acids in *Pseudomonas fluorescens* Pf0–1 and their involvement in chemotaxis to tomato root exudate and root colonization. *Microbes Environ./JSME.* https://doi.org/10.1264/jsme2.ME12005 (2012).
63. O'Neal, L., Vo, L. & Alexandre, G. Specific root exudate compounds sensed by dedicated chemoreceptors shape *Azospirillum brasilense* chemotaxis in the rhizosphere. *Appl Environ Microbiol* **86**, e01026-01020. https://doi.org/10.1128/AEM.01026-20 (2020).
64. Wisniewski-Dye, F. *et al.* Azospirillum genomes reveal transition of bacteria from aquatic to terrestrial environments. *PLoS Genet.* **7**, e1002430. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002430 (2011).

Acknowledgements

The authors would like to thank David Zamorano Sánchez, Ph.D. (from the Center for Genome Sciences, Universidad Nacional Autonoma de Mexico) for generously providing the reporter plasmid pFY4535 and Adriana Gamboa for help with the construction of the insertion mutant. This project was completed using funds from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnologia (CONACyT). JFCP, RLO, CMJ, and RCO were supported by a scholarship from CONACyT. This paper is dedicated to Yoav Bashan, who passed away in 2018, for his contributions to research on PGPR.

Author contributions

The authors J.F.C.-P., R.L.-O., R.C.-O., M.L.X.-V., S.R.R.-C. and C.M.-J. performed the experiments. B.E.B. and A.R.-M. contributed to the conception and design of the study, revised the manuscript and acquired the funding. J.F.C.-P. wrote the initial draft of the manuscript. S.R.R.-C. analyzed the data and revised the manuscript. All authors read and approved the manuscript.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at https://doi.org/10.1038/s41598-020-80125-3.

Correspondence and requests for materials should be addressed to A.R.-M.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

© The Author(s) 2021

Mata et al. BMC Microbiology (2018) 18:20
https://doi.org/10.1186/s12866-018-1157-0

BMC Microbiology

RESEARCH ARTICLE Open Access

In silico comparative analysis of GGDEF and EAL domain signaling proteins from the *Azospirillum* genomes

Alberto Ramírez Mata[1†], César Millán Pacheco[2†], José F. Cruz Pérez[1], Martha Minjárez Sáenz[1] and Beatriz E. Baca[1*]

Abstract

Background: The cyclic-di-GMP (c-di-GMP) second messenger exemplifies a signaling system that regulates many bacterial behaviors of key importance; among them, c-di-GMP controls the transition between motile and sessile life-styles in bacteria. Cellular c-di-GMP levels in bacteria are regulated by the opposite enzymatic activities of diguanylate cyclases and phosphodiesterases, which are proteins that have GGDEF and EAL domains, respectively. *Azospirillum* is a genus of plant-growth-promoting bacteria, and members of this genus have beneficial effects in many agronomically and ecologically essential plants. These bacteria also inhabit aquatic ecosystems, and have been isolated from humus-reducing habitats. Bioinformatic and structural approaches were used to identify genes predicted to encode GG[D/E]EF, EAL and GG[D/E]EF-EAL domain proteins from nine genome sequences.

Results: The analyzed sequences revealed that the genomes of *A. humicireducens* SgZ-5^T, *A. lipoferum* 4B, *Azospirillum* sp. B510, *A. thiophilum* BV-S^T, *A. halopraeferens* DSM3675, *A. oryzae* A2P, and *A. brasilense* Sp7, Sp245 and Az39 encode for 29 to 41 of these predicted proteins. Notably, only 15 proteins were conserved in all nine genomes: eight GGDEF, three EAL and four GGDEF-EAL hybrid domain proteins, all of which corresponded to core genes in the genomes. The predicted proteins exhibited variable lengths, architectures and sensor domains. In addition, the predicted cellular localizations showed that some of the proteins to contain transmembrane domains, suggesting that these proteins are anchored to the membrane. Therefore, as reported in other soil bacteria, the *Azospirillum* genomes encode a large number of proteins that are likely involved in c-di-GMP metabolism. In addition, the data obtained here strongly suggest host specificity and environment specific adaptation.

Conclusions: Bacteria of the *Azospirillum* genus cope with diverse environmental conditions to survive in soil and aquatic habitats and, in certain cases, to colonize and benefit their host plant. Gaining information on the structures of proteins involved in c-di-GMP metabolism in *Azospirillum* appears to be an important step in determining the c-di-GMP signaling pathways, involved in the transition of a motile cell towards a biofilm life-style, as an example of microbial genome plasticity under diverse in situ environments.

Keywords: *Azospirillum*, Diguanylate cyclases, Phosphodiesterases, Second messenger cyclic-di-GMP, Biofilm

Background

The *Azospirillum* genus, a member of the Alphaproteobacteria, is composed of nitrogen-fixing species that colonize the rhizosphere of plants; these species have been extensively studied due to their plant growth-promoting properties (PGPB) [1, 2], and recently *Azospirillum* strains were isolated from aquatic and humus-reducing ecosystems [3, 4]. To date, approximately 19 different species, isolated from wide range of geographical regions and from a large variety of soils, especially soils of tropical, subtropical and temperate regions, have been described [1, 2]. The best studied species, *Azospirillum lipoferum* and *Azospirillum brasilense*, were initially isolated from tropical forage grass in Brazil [5]. Nucleotide sequencing of the genomes of a number of *Azospirillum* strains has been performed, enabling researchers to conduct in silico

* Correspondence: beatriz.baca@correo.buap.mx; beatrizebaca@gmail.com
†Equal contributors
[1]Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Edif. IC11, Ciudad Universitaria, Col. San Manuel Puebla Pue, CP72570 Puebla, Mexico
Full list of author information is available at the end of the article

BioMed Central

© The Author(s). 2018 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

analyses of proteins that are potentially important in the interactions of these bacteria with the host plant and in their adaptability to either terrestrial or aquatic environments [6–14].

It is now well established that bacteria in natural environments persist by forming biofilms [15]. Bacteria are able to sense and respond to ecologically distinct abiotic and biotic conditions [15]. These systems are necessary of these bacteria to adapt to changing environmental conditions and to enable survival in highly competitive habitats, such as the plant rhizosphere, soil or aquatic environments. In addition, usually, bacteria must efficiently colonize the root surface and other diverse surfaces, to exert their beneficial effect, which implies that understanding the bacterial traits required for biofilm formation is crucial to understanding the mechanisms involved in colonization. In particular, motility, which involves the flagellar apparatus and the chemotatic response to root exudates, appears to be an important colonization attribute, as do the formation of cell aggregates and the production of capsular polysaccharides. Indeed, several chemotaxis and aerotaxis operons have been identified in *A. brasilense* [6, 16, 17], and different mutant strains are defective in biofilm formation and root surface colonization [18, 19].

Similarly, some of the genetic determinants involved in cell aggregation and flocculation in *A. brasilense* and *A. lipoferum* lead to the differentiation of cyst-like cells [20, 21] and appear to be important for root colonization [22, 23]. Indeed, cell morphology had an effect on the associated root colonization, and importantly, capsular polysaccharides production in the surrounding cells was observed [19, 21]. Moreover, recent data support the hypothesis that the second messenger c-di-GMP (bis-(3′ 5′)-cyclic-dimeric-guanosine monophosphate) plays a role in controlling the chemotactic response and, hence, biofilm formation in *Azospirillum* [24–26].

In several bacteria, c-di-GMP plays an important role in regulating the transition of the cells between a motile state and a sessile biofilm state. In addition, c-di-GMP is relevant in other bacterial functions, such as motility, chemotaxis, capsular polysaccharide formation, and cellulose synthesis [27, 28]. The synthesis and degradation of c-di-GMP are coordinated by the opposing activities of diguanylate cyclases (DGCs), which contain the GGDEF domain, and phosphodiesterases (PDEs), which harbor EAL or HD-GYP domains [28]. The GGDEF, EAL and HD-GYP domains were the first c-di-GMP modules to be identified using bioinformatics analyses, and these domains are widely distributed in bacterial genomes [28–30]. Hybrid proteins that contain both GGDEF and EAL domains have also been identified. In addition, other domains are often present, including sensory and regulatory modules, such as Per/Arnt/Sim (PAS), GAF, HAMP, REC, and MHTY, that modulate their enzymatic activities in response to external stimuli [28, 31]. The identification and functional characterization of c-di-GMP-associated proteins have indicated that the downstream signaling mechanisms of the c-di-GMP pathway might be versatile [32].

Various in silico analyses of proteins have demonstrated in that such studies can contribute to the identification to the function of a specific protein; these analyses have been performed by using a growing number of bioinformatics resources [33]. This work reports an analysis performed on the genomes of nine *Azospirillum* strains: *A. brasilense* Sp245, *A. brasilense* Sp7, *A. brasilense* Az39, *A. lipoferum* 4B, *Azospirillum* sp. B510, and the recently sequenced genomes of *A. thiophilum* BV-S^T, *A. halopraeferens* DSM 3675, *A. oryzae* A2P, and *A. humicireducens* SgZ-5^T. We focused on identifying the genes encoding proteins containing the GG[D/E]EF, EAL and GG[D/E]EF-EAL domains and on characterizing the associated sensing and signaling domains. This work will contribute to our understanding of this important family of proteins that regulate cellular levels of c-di-GMP in *Azospirillum*.

Methods

We constructed the repertoire of genes coding for GG[D/E]EF, EAL and GG[D/E]EF-EAL domain proteins by analyzing nine *Azospirillum* genomes. The accession numbers of the chromosome and the other replicons in the genome of these strains are listed in Table 1.

The genomes were analyzed by performing BLAST searches of the GenBank database of the National Center for Biotechnology Information, with the Rapid annotation using subsystems technology (RAST) server [34], PFAM [35], SMART [36], PROSITE [37], conserved domain database [38], and MiST2.2 [39], websites to search for protein sequences from the Sp245, Sp7, Az39, 4B, B510, BV-S^T, DMS3675, A2P and SgZ-5^T genome sequences. The amino acids of the motifs present in the various domains were identified using conserved domain database [38]. Clustal Omega was used to generate multiple protein sequence alignments [40, 41]. The localization of the signaling motifs was identified using the transmembrane helices in proteins (TMHMM) server to predict transmembrane helices [42]. All programs were used by following the specified parameters for successful analysis. The platform I-Tasser web server was used for automated protein structure and function predictions [43, 44]. Comparisons of the protein sequence domains were performed using the well-characterized homologous protein PleD of *Caulobacter crescentus* as a reference for the amino acid motifs of the GGDEF protein domain [45] and RocR from *Pseudomonas aeruginosa* as a reference for the EAL containing domain [46]. The crystal structures of a DGC (WspR) from *P. aeruginosa* [47] and the EAL domain of

Table 1 Accession numbers of the genomes of the *Azospirillum* sp., strains used in this study and the predicted modular signaling proteins involved in c-di-GMP metabolism

Strain	Chromosome Size (Mbs) [a]CDS [b]DGC/PDE/Hybrid	p1-Size (Mbs) CDS DGC/PDE/Hybrid	p2 Size (Mbs) CDS DGC/PDE/Hybrid	p3- Size (Mbs) CDS DGC/PDE/Hybrid	p4- Size (Mbs) CDS DGC/PDE/ Hybrid	p5-Size (Mbs) CDS DGC/PDE/Hybrid	p6- Size (Mbs) CDS DGC/PDE/Hybrid	p7- Size (Mbs) CDS DGC/PDE/Hybrid	[c]Total Number	R
A. bra. Sp245	NC_016617.1 3.01 2, 690 10/3/6	NC_016594.1 1.76 1748 7/0/2	NC_016618.1 0.912 884 1/1/0	NC_016595.1 0.778 808 1/070	NC_016596.1 0.690 671 1/1/2	NC_016619 0.191 162 -	NC_016597.1 0.167 125 -	–	35	6
A. bra. Sp7	NZ_CP012914 3.01 2690 10/3/5	NZ_CP012915.1 1.75 629 7/0/2	NZ_CP012916.1 0.819 627 1/0/0	NZ_CP012917.1 0.645 555 1/1/2	NZ_CP012918.1 0.206 171 -	NZ_CP012919.1 0.159 110 -	_	_	34	7
A. bra. Az39	NZ_CP007793.1 3.06 2767 10/3/6	NZ_CP007794.1 1.9 1610 7/1/2	NZ_CP007795.1 0.933 754 1/0/0	NZ_CP007796.1 0.686 533 -	NZ_CP007797.1 0.641 558 1/1/2	NZ_CP007798.1 0.163 107 -	_	_	35	8
A. lip 4B	NC_016622.1 2.99 2693 11/4/10	NC_016585.1 1.04 867 1/0/0	NC_016586.1 0.750 619 2/0/2	NC_016623.1 0.648 515 3/1/2	NC_016587.1 0.645 555 1/0/1	NC_016624.1 0.478 384 1/0/1	NC_016588.1 0.295 220 -	–	40	6
Azo B510	NC_013854.1 3.3 2994 13/4/9	NC_013855.1 1.46 1127 2/0/4	NC_013856.1 0.723 613 1/0/0	NC_013857.1 0.681 532 3/1/2	NC_013858.1 0.628 536 0/0/1	NC_013859.1 0.537 422 0/0/1	NC_013860.1 0.261 181 -	–	41	9
A. thio BV-S	NZ_CP012401.1 3.04 17/4/9	NZ_CP012402.1 1.35 5/1/1	NZ_CP012403.1 0.879 1/0/0	NZ_CP012404.1 0.712 0/0/2	NZ_CP012405.1 0518 –	NZ_CP012406.1 0.694 0/0/1	NZ_CP012407.1 0.330 –	NZ_CP012408.1 0.083 –	35	10–11
A. halo DSM3675	NZ_AUCF00000000.1 5.26 4680	–	–	–	–	–	– –	–	38	12
A. oryzae A2P	NZ_FXAK00000000.1 7.67 6669	–	–	–	–	–	–	–	40	14
A. humi SgZ-5	NZ_CP015285.1 3.18 2846	–	–	–	–	–	–	–	29	13

A.bra = *A. brasilense*, *A. lip* = *A lipoferum*, *Azo* = *Azospirillum* B510, *A. thiophilum* BV-S, *A. halopraeferens* DMS3675, *A. oryzae* A2P, and *A. humicireducens* SgZ.5
Chr Chromosome, *p1* plasmid 1, *p2* plasmid 2, *p3* plasmid 3, *p4* plasmid 4, *p5* plasmid 5, *p6* plasmid 6. – no plasmid. *R* references
[a]Total number of protein-coding genes
[b]Number of GGDEF, EAL and hybrids proteins per replicon
[c]Total number of GGDEF, EAL and hybrids proteins per genome

C. crescentus were used for the structural analyses [48] as suggested by the server and the I-Tasser parameters were run [49, 50]. In this study, models exhibited a higher C-scores (better model) were used, and models analyzed against the structure with higher resolution were used to create the corresponding model. The analysis was conducted and figures were made using the Chimera UCSF program [49] and VDM [50].

Results

Number and features of domains identified in the translated products from genes encoding predicted DGC and PDE proteins

A search for genes encoding enzymes involved in c-di-GMP metabolism was performed in the genomes of three strains of *A. brasilense* (Sp245, Sp7 and Az39) and in the genomes of *A. lipoferum* 4B, *Azospirillum* ssp. B510, *A. thiophilum* BV-S^{T}, *A. halopraeferens* DMS3675, *A. oryzae* A2P, and *A. humicireducens* Sg-Z-5^{T} (Table 1). Some of these strains have composite genomes, containing several large plasmid-type replicons designated chromids [51] (because they contain essential genes), in addition to the chromosome (the largest replicon). A systematic analysis and comparison of the 9 genomes (Table 1) was performed as described in the methods section to identify the putative translated products that have diguanylate cyclase (DCG) and phosphodiesterase (PDE) activities and to define the amino acid motifs or signatures involved in catalytic activity, allosteric inhibition and interaction with metals (magnesium or manganese). This survey led to identification of three enzymatic classes of predicted proteins: DGCs, PDEs and hybrid DGC-PDEs. Indeed, even though the GGDEF and EAL domain-containing proteins have opposing activities, these two domains are often found coupled in the same proteins, which are referred to as hybrid proteins because they carry both domains. This nomenclature agrees with the presence of conserved amino acid motifs and with the distinctive secondary structure topology of these proteins [52]. The survey results led to the construction of a catalog of proteins predicted to be involved in c-di-GMP metabolism, as shown in Table 1. The number of genes encoding GGDEF, EAL, and hybrid domain proteins in each genome are as follows: *A. humicireducens*, 29 genes; *A. brasilense* Sp7, 34 genes; *A. brasilense* Sp245, Az39, and *A. thiophilum*, 35 genes each; *A. halopraeferens* 38 genes, *A. lipoferum* 4B and *A. thiophilum* 40 genes each; and *Azospirillum* ssp. B510 41 genes (Tables 1 and 2).

The relative proportions of enzymes from each of the three classes, is shown in Table 2. *Azospirillum* genomes encode for 14 to 20 DGCs enzymes, which contain the GGDEF domain (Table 2 and Additional file 1: Table S1). Four PDE enzymes, which contain the EAL domains, are present in *A. brasilense* Sp7, *A. halopraeferens*, *A. oryzae*, and *A. humicireducens*, whereas five PDE enzymes are found in the other strains (Table 2 and Additional files 1, 2 and 3: Tables S1, S2, S3, and S4). From the third class of enzymes, representing the hybrid proteins, 10 of these hybrid proteins are present in *A. brasilense* Sp245 and Az39 and nine in Sp7. The number of hybrid domain proteins is larger in the other six genomes, which contain 11 to 17 (Table 2 and Additional files 1 and 2: Tables: S2, S3, and S4). There is a core set of fifteen genes that are completely conserved among all nine *Azospirillum* strains; these genes encode for the following proteins: (i) eight DGCs, which belong to the PleD, WspR, or CdgA families [26] and seem to be functionally important independent of host-related or environmental specializations, in the *Azospirillum* strains, (ii) three PDEs, which include ChsA, a protein that was functionally characterized as being involved in chemotaxis and aerotaxis [25, 53]; and (iii) four highly conserved GGDEF-EAL hybrid proteins (Table 3 and Additional file 1: Table S1). The proteins of each class differ in their lengths, architectures, sensor domains and cellular localization, which were predicted by structural analysis (Table 3 and Additional file 3: Table S3). Almost all of the proteins harbor accessory domains at their N-termini, with a few exceptions that will be described later in the manuscript. A similar diversity in the number of proteins and architecture has also been shown in other bacterial genomes [54, 55]. In particular, as observed in the case of *Azospirillum*, proteins encoded by the genomes as containing EAL domains were less frequent than proteins encoded as containing GGDEF domains [54–56].

The subgroup of hybrid proteins containing tandem GGDEF/EAL or EAL/GGDEF domains are classified as DGCs, PDEs or DGC/PDEs (hybrid proteins) depending on the degree of conservation of the critical amino acid residues in their signature domains [28, 45, 46]. It was observed that all *Azospirillum* genomes have predominantly two types of hybrid proteins (Table 3 and Additional files 3 and 4: Tables: S3 and S5). In the first type of hybrid protein, the domains comprise highly conserved amino acid sequences suggesting that these hybrid proteins may exhibit both DGC and PDE activities. Because hybrid proteins also contain a regulatory partner or a sensor domain, these proteins require a mechanism by which to modulate their opposing activities. The associated sensor domain might determine the balance between the dual enzymatic activities via internal or extracellular signaling, as previously described for DcpA, a DGC/PDE protein from *Agrobacterium tumefaciens* that regulates attachment and biofilm formation. BphGL is a photoreceptor from *Rhodobacter sphaeroides* that is capable of both c-di-GMP synthesis and hydrolysis, and MucR is a protein from *P. aeruginosa* that has dual

Table 2 Frequency of occurrence of genes encoding GGDEF, EAL, and hybrid domain proteins in the genomes of *Azospirillum* strains

DOMAIN #	*A.brasilense* 245	*A.brasilense* Sp7	*A.brasilense* Az39	*A.lipoferum* 4B	*Azospirillum* B510	*A.thiophilum* BV-S^T	*A.halopraeferens* DMS3675	*A.oryzae* A2P	*A.humicireducens* Sg-Z-5
GGDEF	20	20	20	19	19	17	20	19	14
EAL	5	5	5	5	5	4	4	4	4
Hybrid	10	9	10	16	17	13	14	17	11
Total	35	34	35	40	41	34	38	40	29

Data extracted from http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins http://, SMART data base http://smart.embl-heidelberg.de/

activity and is involved in alginate biosynthesis via c-di-GMP signaling [57–59].

In contrast, there were hybrid proteins in each *Azospirillum* genome that belonged to the second type of hybrid protein and were predicted to be enzymatically inactive with a "highly degenerate" GGDEF domain (Additional file 2: Table S2). However, the EAL domains of these proteins contain all of the amino acid motifs for PDE activity and are highly conserved [28, 45, 46], which suggests that these proteins correspond to PDEs that are catalytically active. This second type of hybrid proteins, with only a conserved EAL catalytic site, usually also has a signal-sensing partner domain, suggesting distinct modes for the regulation of PDE activity under different contexts, as shown in Table 3 (Additional files 2, 3 and 4: Tables: S2, S3, and S5) and as previously reported [60, 61].

Genomic relatedness between *Azospirillum* strains

Next, we performed a Venn diagram analysis in which each circle contained the memberships of the compared genomes. The relationships between all the putative proteins involved in c-di-GMP metabolism were assessed by considering whether they were conserved or were restricted to only one genome. The *A. brasilense* Sp245, Sp7 and Az39 genomes were compared with the genome of *A. lipoferum* 4B; 21 proteins were shared, but 18 proteins were indicated to be unique to the 4B genome (Fig. 1a). The B510 genome was compared with the genomes of the *A. humicireducens*, *A. thiophilum* and *A. oryzae* strains, and 23 proteins were conserved in all four genomes (Fig. 1b); only seven proteins were unique to the B510 genome, indicating that these genomes were the most closely related. Only 18 proteins were conserved in among the genomes of *A. brasilense* Sp245, Sp7, *A. lipoferum* 4B, and *A. halopraeferens*, and 13 proteins were found to be unique to the genome of *A. halopraeferens* (Fig. 1c). As these proteins are involved in signaling, these finding suggests that *Azospirillum* have evolved diverse transduction pathways, allowing better adaptation to a given niche.

Sensory and regulatory module domains identified in GGDEF, EAL, and hybrid proteins

We further described the domain architectures found in each of the aforementioned sensory signaling domains identified in the GGDEF, EAL, and hybrid proteins; most of the proteins contained at least one predicted sensory domain, as shown in Table 3 (Additional files 2, 3 and 4: Tables: S2, S3 and S5). However, we found some exceptions, i.e., one to three putative GGDEF proteins, two EAL proteins, and one to two predicted GGDEF-EAL proteins were identified in all of the analyzed genomes. Other predicted proteins were seen to have at least one sensory domain. These regulatory or sensory domains detect small molecules, such as redox potential molecules, oxygen, nitric oxide (NO), light, voltage, osmolarity, and nutrients, and are also involved in protein-protein interactions. These domains enable the bacterium to integrate various types of input signals to establish a coordinated cellular output. In addition, all of these domains have regulatory functions that modulate the enzymatic activities of DGCs and PDEs in response to diverse environmental stimuli [28–32, 54, 55, 62, 63]. Indeed, the REC domain, which is a regulatory domain belonging to the CheY-like superfamily, has been identified as a receiver (phosphor-acceptor) domain or module that regulates the output of DGCs that responds to extracellular or intracellular signals transduced by their cognate sensor histidine kinases. The REC domain can be used to determine activity because its drives GGDEF dimerization, a process that is essential for activity and for cellular localization of the protein [28, 45, 64–67]. In addition, a careful examination of at least three databases revealed that some proteins were predicted to have transmembrane domains (TMD) and a peptide signal (signal P). These protein topologies suggested that the putative proteins are anchored to a membrane (Table 3 and Additional files 3 and 4: Tables: S3 and S5).

The PAS domain appears to be prevalent in proteins involved in c-di-GMP synthesis and degradation. In effect, as many as 38 predicted proteins contain one PAS/PAC domain or two or three domains in tandem, as is shown in Tables 3, 3S, and 5S. This domain is the most abundant sensory module found in signal transduction proteins throughout the bacterial kingdom; this domain generally binds small molecules and is the largest superfamily among domains solely dedicated to signal transduction [68]. Moreover, PAS/PAC domains are also involved in the protein-protein interactions that lead to

Table 3 List of the highly conserved GGDEF, EAL and GGDEF-EAL predicted proteins. The organization and domain architectures found in the sequenced *Azospirillum* genomes

DOMAIN ARCHITECTURE	*A. brasilense* Sp245	*A. brasilense* Sp7	*A. brasilense* Az39	*A. lipoferum* 4B	*Azospirillum*B510	*A. thiophilum*	*A. halopraeferens*	*A. oryzae*	*A. himicireducens*
GGDEF-ONLY									
1. WspR family	*	*	*	*	*	*	*	*	*
2.	*	*	*	*	*	*	*	*	*
3.	*	*	*	*	*	*	*	*	*
4.	*	*	*	*	*	*	*	*	*
5.	*	*	*	*	*	*	*	*	*
6. WspR family	*	*	*	*	*	*	*	*	*
7. CdgA family	*	*	*	*	*	*	*	*	_
8. PleD family	*	*	*	*	*	*	*	*	*
9.	*	*	*	*	*	*	*	*	*
EAL-ONLY									
10.	*	*	*	*	*	*	*	*	*
11.	*	*	*	*	*	*	*	*	*
12.	*	*	*	*	*	*	*	*	*
GGDEF – EAL HYBRID									
13.	*	*	*	*	*	*	*	*	*
14.	*	*	*	*	*	*	*	*	*
15.	*	*	*	*	*	*	*	*	_
16.	*	*	*	*	*	*	*	*	*
17.	*	*	*	*	*	*	*	*	*

Conserved predicted proteins containing GGDEF, EAL and GGDEF-EAL domains from all analyzed the genomes. Schematic representation of domain organization of proteins found in the genomes. The domain prediction was performed based on protein sequences derived from the genome sequences of CdgA (diguanylate cyclase A) and ChsA (phosphodiesterase) from the *A. brasilense* Sp7 strain using the simple modular architecture research tool (SMART) program. The GGDEF domains are shown in rose, and the EAL domains are shown in blue. The sensor domains predicted by SMART are shown as follows: PAS/PAC, represented the PAS-fold family (green); transmembrane domains, TMD (gray); CACHE 2, calcium channels and chemotaxis receptor family (pale blue); REC, response regulator receiver (blue). Data were extracted from http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins:
The website is indicated for each protein with its accession number according to BLASTP shown in Additional file 1: Table S1.

dimerization, which is usually essential for DGC activity [26, 28, 54, 55, 64–66]. In addition, PDE enzymes also often form dimers and tetramers, which are required for activity [28, 60, 69]. Thus, if the *Azospirillum* genes encoding DGCs or PDEs are expressed, they may be subjected to different environmental or intracellular signals associated with PAS/PAC domains.

Bioinformatic analysis also identified HAMP domains in some of the DGCs and DGC/PDEs in all *Azospirillum* species (Table 3, Additional files 3 and 4: Tables: S3 and S5). These domains are defined as connectors between the periplasmic and cytoplasmic spaces. In addition, these domains transmit environmental stimuli across cytoplasmic membranes, and the conversion of that information to a signal triggers a change in function [70]. HAMP domains can be found in DGCs and DGC-PDEs that also have a TMD domain, suggesting that they are anchored to a membrane (Additional files 3 and 4: Tables: S3 and S5).

Analysis of features found in selected predicted proteins that are potentially involved in c-di-GMP signaling

In our previous work, we identified the *chsA* gene, which encodes a PDE protein named ChsA that is involved in aerotaxis and chemotaxis [25, 53]. Herein, we found that the *chsA* gene is highly conserved in the genomes of all *Azospirillum* species (Table 3, Additional file 2: Table: S2), showing a 99% to 51% similarity in amino acid residues in relation to *A. brasilense* Sp245. In addition, the DGC named CdgA, which is encoded by the ID: WP_035674663 gene in *A. brasilense* Sp7, was demonstrated to be involved in biofilm formation [26]. In this study, we found that *cgdA* is well conserved in the analyzed genomes (Table 3) and shares considerable identity (from 98 to 60%) with proteins from *A. brasilense* Sp245.

An interesting feature that was observed in the predicted DGCs and hybrid proteins from all nine genome sequences of the *Azospirillum* species is that they include both CACHE and TMDs in tandem domains (Table 3, and Additional files 3 and 4: Tables S3 and S4). The CACHE (calcium channels and chemotaxis receptors) domain is an extracellular sensor domain that is present in bacteria and detects extracellular signals, such as small molecules and nutrients, and this domain is a ligand-binding domain commonly found in bacterial chemoreceptors [71]. These domains have been identified exclusively in proteins that contain output signaling domains, such as the DGC and PDE signal transduction proteins [71]. The majority of known ligands for the dCache_1 domain are amino acid sensors [72], whereas many of the single CACHE domains bind organic acids [73].

Only one highly conserved putative EAL-GGDEF hybrid protein was found in the studied genomes, and this protein had an EAL domain at the N-terminus (Additional files 3 and 4: Tables: S3 and S5). Both the EAL and the GGDEF domains are highly conserved, suggesting that these proteins might exhibit both activities depending on internal cellular signaling.

Several predicted DGCs and hybrid proteins contained both CHASE and TMDs domains at the N-termini (Additional files 3 and 4: Tables S3: and S5). The CHASE domain is a sensory domain named so because it is found in cyclases/histidine kinases with sensory functions. The CHASE domain is predicted to be a periplasmic domain consisting of 362 amino acid residues that serves as a transmembrane receptor and is often found in bacteria and plants. CHASE domains bind small molecules such as peptides and the phytohormone cytokinin [74]. As a bacterium associated with plants, *Azospirillum* might use this protein as a chemotaxis receptor.

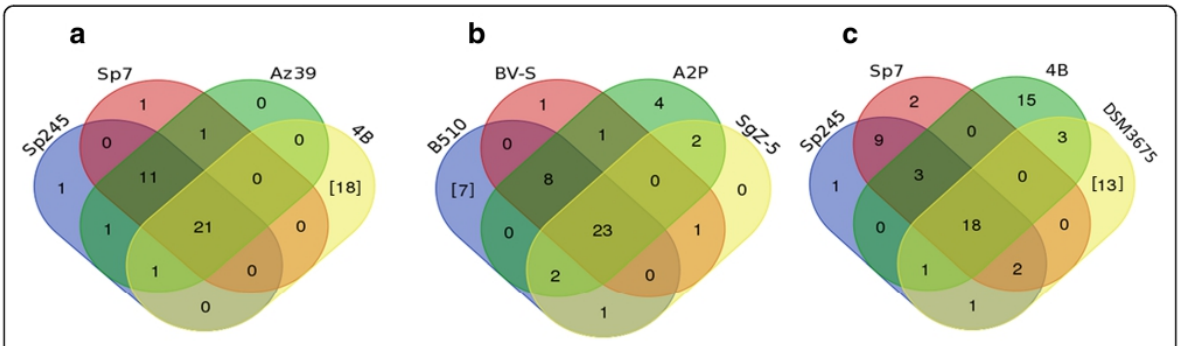


Fig. 1 Venn diagrams showing the distribution of families predicted to be involved in c-di-GMP metabolism from the genomes of *Azospirillum* strains. **a** *A. brasilense* Sp245, Sp7, and Az39 and *A. lipoferum* 4B. **b**. *Azospirillum* sp. B510, *A. thiophilum* BVS-^{T}, *A. oryzae* A2P, and *A. humicireducens* SgZ-5^{T}. **c**. *A. brasilense* Sp245, Sp7, *A. lipoferum* 4B, and *A. halopraeferens* DSM3675. Numbers in black indicate the number of protein families; numbers in parentheses refer to the number of unique proteins in each genome that not found in the other genomes

The predicted hybrid protein (GenBank: Sp245, WP_014199675; Sp7, WP_059399655, and Az39, WP_040138308) found in the *A. brasilense* genomes but not in other genomes showed an interesting structural architecture (Additional file 3: Table S3). This protein possesses an MHYT domain encompassing seven TMDs that are all localized at the N-terminus and has an MHYT motif consisting of four conserved amino acid residues (methionine, histidine, tyrosine, and threonine) that are predicted to be located near the outer face of the inner membrane. It has been suggested that the MHYT domain serves as a sensing domain [31]. The membrane topology of the MHYT domain indicates that the conserved residues of this domain can coordinate one or two copper ions, suggesting that this domain plays a role in sensing oxygen, CO or NO. In addition, the C- terminus includes PAS-GGDEF-EAL domains. The gene encoding this protein is often fused to a LysR-type DNA-binding helix-turn-helix protein, and an investigation of the genome organization showed that the genomic position of this protein was conserved in the genomes of all the *A. brasilense* strains [31, 39]. In *P. aeruginosa,* alginate biosynthesis, formation of highly structured biofilms, and inhibition of swarming motility are regulated by MucR, which is a hybrid MHYT-DGC-PDE protein [75].

Structural and tridimensional topographies

Structural features of the GGDEF and EAL domains of the DGCs, PDEs and hybrids proteins from the A. brasilense Sp7 genome

Next, we determined that the structural features of the predicted proteins found in the *A. brasilense* Sp7 genome confirm previous predictions. All models of the GGDEF, EAL or GGEDF/EAL proteins had C-scores higher than 0.49 (better models had values close to 2) [43, 44]. The C-values of all models are reported in Table 4.

GGDEF-only DGCs and hybrid (GGDEF domain) proteins

The GGDEF protein models were constructed based on the crystal structure of the GGDEF conserved domain of WspR (PDB id: 3BRE), which has a crystallographic resolution of 2.4 Å [47]. Structural alignments, shown in Fig. 2a, were performed using the GGDEF domain of 3BRE from amino acids L170 to Q339. Even though the putative DGC protein (GG[DE]EF-only domain) sequences analyzed did not possess a highly identity percentages (ranging from 30.41 to 48.02%) (Additional file 5: Table: S7a), the proteins contained all the essential conserved amino acid residues that bind the substrate, GTP, to have enzymatic activity [76, 77]. The Web Logo [78] alignment in Fig. 2a shows the characteristic

Table 4 C-score of the predicted structures of EAL and GGDEF proteins

GGDEF only	C score	EAL only	C score	GGDEF hybrid proteins	C score	EAL hybrid proteins	C score
WP_059399097	0.79	WP_059398606	1.53	WP_079285130	1.25	WP_059399067	0.61
WP_051140034	1.53	WP_051140161	1.61	WP_051140186	1.33	WP_079285130	1.83
WP_035675850	0.58	WP_035672792	1.08	WP_051140104	1.28	WP_051140186	1.80
WP_035672942	0.60	WP_035682417	1.83	WP_059398931	1.18	WP_051140104	1.78
WP_035674663	0.58	CAJ18244	1.60	WP_059399067	0.68	WP_059398931	1.73
WP_035674304	0.59			WP_051140628	1.24	WP_051140628	1.82
WP_035671267	0.59			WP_035678503	1.27	WP_035678503	1.65
WP_035671094	0.49			WP_059399655	1.27	WP_059399655	1.72
WP_035671042	1.08			WP_059399677	1.29	WP_059399677	1.71
WP_035670844	0.59						
WP_035670654	0.79						
WP_035676633	0.61						
WP_035671246	0.73						
WP_051140383	0.81						
WP_035678542	0.88						
WP_059399331	0.52						
WP_059399449	1.15						
WP_035682812	0.96						
WP_079285367	0.54						
WP_051140397	0.77						

The data were extracted from the I-TASSER server for protein structure and function. The website is indicated for each gene with is accession number according to BLASTP

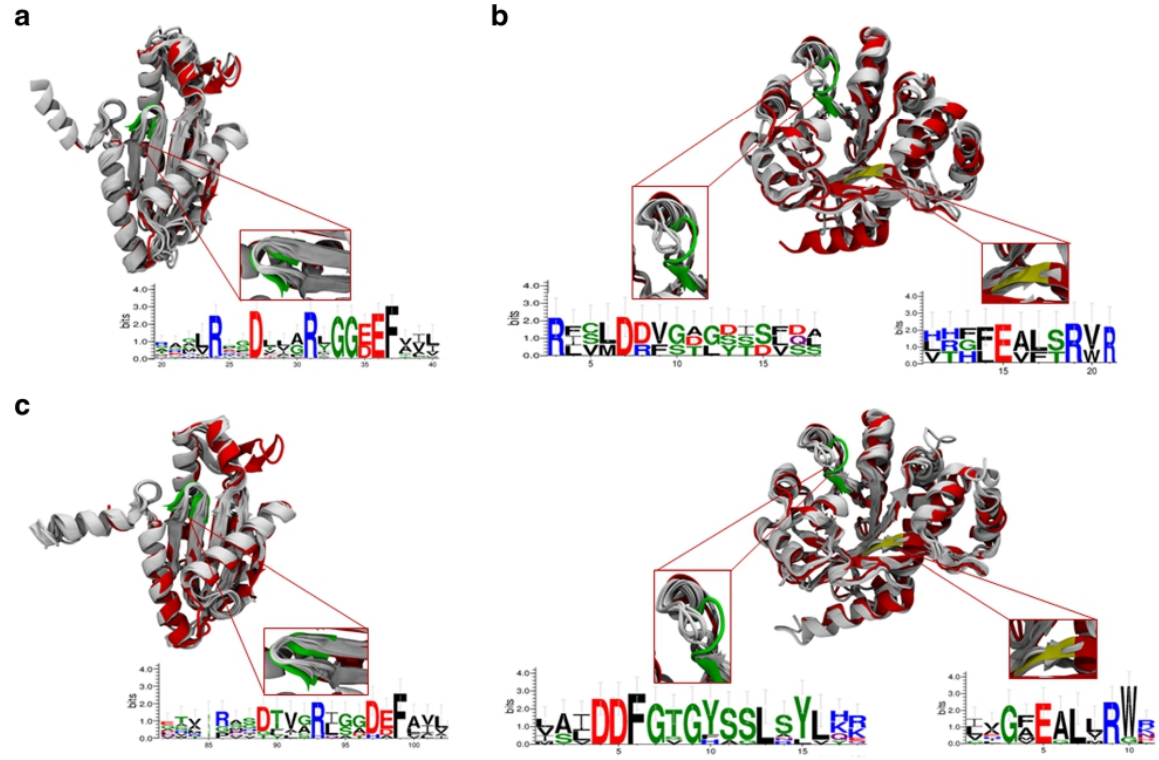


Fig. 2 Models and structural features of GGDEF, EAL and hybrid proteins from the *A. brasilense* Sp7 genome. **a** Diguanylate cyclase domain structures from the *A. brasilense* Sp7 genome. The structures shown correspond to the 20 conserved DGCs sequences indicated in Table 4 in comparison to the crystal structure of WspR (PDB id: 3BRE; red) from *P. aeruginosa* [47]. The domain surface representations are labeled in white, and the bound ligand is labeled in green. The WebLogo sequence [78] is based on the PFAM alignments, which show conserved GG[D/E]F motifs and are colored green-red. **b**. Domain structures of phosphodiesterase from the *A. brasilense* Sp7 genome. The structures shown correspond to the five conserved PDE-EALs indicated in Table 4 in comparison to the crystal structure of PdeA (PDB ID: 3U2E; red) from *C. crescentus* [48]. The domain surface representations are labeled in white, the bound ligands (EAL domain) are shown in yellow, and loop 6 is colored green. The WebLogo sequence [78] is based on the PFAM alignments, which show a conserved motif. The red arrow indicates the visible discrepancies in the 3U2E crystallographic structure. **c**. Structures of the hybrid proteins from the *A. brasilense* Sp7 genome. The structures shown correspond to the nine hybrid sequences indicated in Table 4 in comparison to the crystal structure of WspR (PDB id: 3BRE; red) from *P. aeruginosa* [47]. The domain surface representations are labeled in white, and the bound ligand is labeled in green. The WebLogo sequence [78] is based on the PFAM alignments, which show a conserved GG[D/E]F motifs and are colored green-red. The structures shown correspond to the nine conserved PDE-EALs indicated in Table 4 in comparison to the crystal structure of PdeA (PDB ID: 3U2E; red) from *C. crescentus* [48]. The domain surface representations are labeled in white, the bound ligands (EAL domain) are shown in yellow, and loop 6 is colored green. The WebLogo sequence [78] is based on the PFAM alignments, which show a conserved EAL motif. The red arrow indicates the visible discrepancies in the 3U2E crystallographic structure

secondary structure elements of the DGCs, such as five α helices and seven short β strands ($\alpha_1\beta_1\alpha_2\alpha_3\beta_2\beta_3\alpha_4\beta_4\beta_5$-$\beta_6\alpha_5\beta_7$) [52]. In addition, regions of the sequence were identified with high root main square deviation (RMSD) values, namely, R195 to L203, C240 to L246, P260 to P264, and T275 to F312, as shown in Additional file 5: Table: S7a. High RMSD values were found for most of these regions except for T275 to F312, which corresponded to the loop regions shown in Fig. 2a. The region from T275 to F312 corresponded to a loop region and a β strand that crossed from one side to the other in each of the protein models. In this region, the models exhibited a secondary structure. We suggested that the absence of a secondary structure may be the result of protein model construction and that these structures must be studied by circular dichroism spectroscopy or dynamic simulations in further studies.

The GGDEF hybrid proteins had a sequence conservation percentages ranging from 24.11 to 33.14% (Additional file 5: Table: S7b). As indicated by the high RMSD values, these regions corresponded to sequence gaps or insertions, primarily from R195 to Q202 and S280 to L294. The ALJ36098 protein (GenBank ID: WP_059398931) was found to have the most different

sequence in the characteristic of GGDEF motif (Additional file 2: Table: S2 b3). Indeed, ALJ36098 had an SDHAF motif; this variation is divergent in the sizes and charges of the amino acid residues involved in enzymatic activity, suggesting that this predicted protein lacks catalytic activity [64–66, 76, 77]. Additionally, an electrostatic potential analysis mapped on the protein surfaces showed that the SDHAF motif changed the charge distribution. These changes may confer on the protein a different affinity for its ligand compared to the affinity of GGDEF proteins (Fig. 3) [76, 77].

EAL-only PDEs and hybrid (EAL domain) proteins

EAL-only proteins

EAL proteins from the *A. brasilense* Sp7 genome were compared to the crystal structure of the EAL domain of PdeA from *C. crescentus* (PDB ID: 3U2E), which has a crystallographic resolution of 2.32 Å [48]. When compared to 3U2E, the EAL-only proteins had lower sequence conservation, ranging from 19.50 to 36.44%, than the EAL hybrid proteins. (Additional file 5: Table: S7c). As indicated in Fig. 1b, the regions with high RMSD-backbone values are located in different sections across the structures, e. g, the first ten amino acids at the amino terminus; these regions are A327 to G350, W369 to P393 and R464 to V501. As indicated in Fig. 1b, some loops from the EAL-only proteins with visible discrepancies were included in the comparison to the crystallographic structure. However, as shown in Fig. 2b, the crystal structures of the EAL domains show that the proteins possess the conserved signature motif (EAL) in addition to the flexible loop ("loop 6"), which has been extensively characterized in (β/α) barrel proteins, and that both of these features are required for catalytic activity in a functional protein [60, 69, 76, 79, 80].

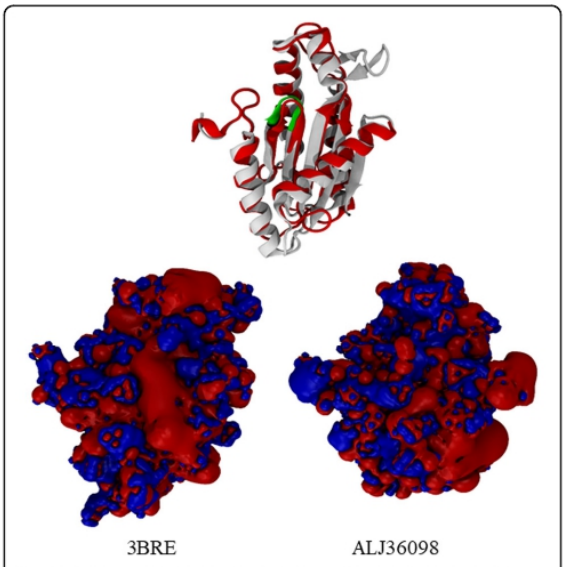


Fig. 3 Structure of ALJ36098 from the *A. brasilense* Sp7 genome. **a** The model superimposed with WspR (PDB id: 3BRE) from *P. aeruginosa* [47]. The 3BRE structure is colored red. The GGDEF motif is colored green, and the SDHAF motif is shown superimposed. **b** The electrostatic potential (+/- 4kT/e) calculated with the APBS of both proteins in the same orientation, as indicated above (**a**). The positive amino acid residues are colored blue, and the negative amino acid residues are colored red. The potential difference in the binding site changes in ALJ36098

EAL-hybrid proteins

The sequence conservation percentages for these proteins ranged from 29.02 to 43.20%. The lowest conservation percentage corresponded to ALJ36617 (GenBank ID: WP_059399067) and the highest to ALJ36098 (GenBank ID: WP_059398931). Moreover, the low sequence conservation appeared not to be a factor for model prediction by I-Tasser. As shown in Fig. 2c, the structural alignment of 3U2E against all of the EAL hybrid proteins gave a low RMSD value for the backbone atoms. The amino acid residues, when present, had high RMSD values for residues from T368 to T380 (3U2E sequence numbering) (Additional file 5: Table: S7d). These regions presented greater sequence fluctuation, including gaps in some of the sequences; however, the amino acid residues involved in the ligand-metal binding of c-di-GMP and enzymatic activity are highly conserved in all sequences [48, 60, 76, 79–81] (Fig. 2c). In addition, residue M358 exhibited some changes, including-change from a methionine in 3U2E to hydrophobic residues (such as valine, leucine or alanine) in a majority of the analyzed sequences and to threonine in ALJ39102 (GenBank ID: WP_059399677).

Discussion

It is well documented that in the bacterial kingdom c-di-GMP signaling is linked to biofilm formation and several other phenotypes that are important to the lifestyle of bacteria. We advanced our understanding of c-di-GMP signaling in the most important species of *Azospirillum*, e.g., those that are used as inoculants to promote plant growth or in soil bioremediation, by studying how many domain architectures and tridimensional structures were contained in the predicted proteins of genes encoding DCGs, PDEs and DGC-PDEs; these genes are widespread and are found in other environmental and soil bacteria. Indeed, approximately 29 to 41 genes encoding these modular signaling proteins were identified in the *Azospirillum* genomes, establishing that the distribution of this genes in *Azospirillum* is comparable to that in other bacteria from soil or marine environmental bacteria, such as *Sinorhizobium meliloti* [82], other species of *Rhizobium* [83], *Pseudomonas putida* [62], *Shewanella*

oneidensis [63, 84], and *Burkholderia lata* SK875 [85], which reportedly encode a considerable number of proteins predicted to be involved in c-di-GMP metabolism.

The comparisons of the genomes showed that 15 proteins shared a significant percentage of identity at the amino acid residue level (the genes comprising the core), indicating the genetic relatedness among *Azospirillum* strains as previously described [6, 67, 86]. In addition, some of the genes were duplicated and identified at different genetic locations (chromosome or chromids) in the same genome, indicating that they might be derived from the duplication of a common ancestral gene that then diverged from the parent copy by mutation and selection, as proposed by the phylogenetic analysis. This evolution suggests that these genes were paralogs and that they were likely acquired by horizontal transfer (HGT), as defined for the *A. brasilense* and *A. lipoferum* genomes [6, 67, 86, 87]. Notably, it was observed these genomes possessed genes that encoded for ChsA, a PDE involved in chemotaxis and aerotaxis, and it has been well established by Russell et al. [25] that *Azospirillum* uses chemotaxis to navigate through the soil to find optimal surroundings for survival. Thus, the control of cellular motility by c-di-GMP signaling is the best illustration, to date, of the importance of a c-di-GMP-controlled rapid response to changing environmental conditions. Based on with phylogenic analysis, the genomes were clustered in three groups: strains of *A. brasilense* (Sp245, Sp7 and Az39) included in the same clade; strain *A. lipoferum* 4B, which clustered with *Azospirillum* B510, *A. humicireducens* SgZ-5^T, *A. thiophilum* BV-S^T, and *A. oryzae* A2P; and *A. halopraeferens* DSM3675, the genes of which were the most divergent. This is in agreement with previous studies on the whole-genomes of *Azospirillum* strains [6–14]. In addition, it was interesting to note that proteins encoded by the *A. halopraeferens* genome showed very complex structural features, as indicated in Table 5S (Additional file 4). *A. halopraeferens*, isolated from the rhizoplane of Kallar grass (*Leptochl oa fusca* L. Kunth), is a salt tolerant bacterium [88]. The bacterium was inoculated to an oilseed halophyte *Salicornia bigelovii* Torr plant in salt-contaminated, infertile areas, and under these detrimental stress conditions, the plant-growth-promotion was significantly improved [89]. Therefore, the data obtained here strongly suggest host specificity and environment-specific adaptation.

The domain architectures of the deduced amino acid sequences of DGC and PDE proteins from *Azospirillum* genomes were also predicted that to included diverse sensor domains, such as REC, PAS/PAC, CHASE, GAF, MHYT and CACHE, that are involved in activity regulation by driving the protein dimerization process, which is essential for activity, or by sensing small molecules commonly found in rhizospheric or aquatic habitats [28–32, 69, 90]. These predictions are useful to predict how bacteria are able to monitor the internal metabolic status of a cell as well sense environmental cues, such as those from root exudates or the rhizosphere, or signals associated with a particular environment [57–59, 62, 63, 83, 91].

Furthermore, the cellular localization of some proteins was assessed by the presence or absence of transmembrane helices; the cellular localization of these proteins might indicate that the cellular c-di-GMP pool is localized to support functional micro-compartmentalization, which may be participate in the response to different environmental signals or may allow membrane localization of the protein after a spatial signal is sensed, thereby regulating its enzymatic activity with the corresponding co-localization of DGC, as previously described in several studies [28, 57, 59, 65, 77].

The analysis of structural architecture has proven to be very informative with regard to putative functions of signalling proteins. It was mentioned that a majority of hybrid proteins have conserved EAL catalytic sites, and these predicted proteins contribute to the total PDE cellular activity. The inactive GGDEF domains of these proteins function by regulating hydrolytic activity, as previously described in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* [91], or by acting as "trigger enzymes" with a dual function of either hydrolyzing c-di-GMP, or acting as an effector that binds to a transcriptional regulator that acts on a promotor involved in a signaling cascade. This signaling cascade controls matrix production in the biofilm; or can also control its own transcription, as described for PdeR and PdeL from *Escherichia coli* [92, 93]. This is the case for the ALJ36098 protein from *A. brasilense* Sp7 which is predicted to lack catalytic activity [76, 77]; however, this protein might exhibit regulatory or effector functions by binding c-di-GMP or GTP, as previously described for some hybrid proteins [70, 89–92], or may act as an effector in the c-di-GMP signaling cascade as previously described [92–94]. Considering the data presented here, we suggest that this structural analysis provides important information to predict the function of these proteins containing GGDEF, EAL, and hybrid domains, and creates a paradigm for future studies on the evolution of enzymes involved in c-di-GMP metabolism.

Conclusions

In summary, compared to other plant-associated bacteria *Azospirillum* were found to contain a number of similar genes (29 to 41) encoding DGCs and PDEs in their genomes. Our findings help elucidate the functions of the predicted hybrid multi- domain proteins, which allow the bacteria to integrate different signals via significant signaling plasticity. Indeed, this significant

flexibility might reflect differentially regulated c-di-GMP signaling mechanisms in *Azospirillum* that enable responses to distinct environmental and cellular signals. Therefore, in silico analysis of the ligand binding domains in the genomic sequences is a pre-requisite for further experimental characterization and evaluation of biological function. Thus, these conserved signaling proteins might be ecologically relevant and may explain how *Azospirillum* adapts to its specific ecological niche. An interesting question is raised regarding involvement of these proteins in physiological regulation. Future phenotypic and biochemical studies are needed to answer this question.

Additional files

Additional file 1 Table S1. Accession numbers of GGDEF, EAL and hybrid proteins encoded by genes conserved in all analyzed *Azospirillum* genomes. Data extracted from http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins. (DOCX 24 kb)

Additional file 2 Table S2. Accession numbers and classifications of GGDEF, EAL and hybrid proteins predicted based on the conservation of signature motifs that were found in all analyzed genomes. Data extracted from http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins and http:// and http://smart.embl-heidelberg.de/ following the notation from Römling et al. (2017). (DOCX 109 kb)

Additional file 3 Table S3 and **Table S4.** Table S3. Repertoire of GGDEF, EAL and GGDEF-EAL predicted proteins, organization, and domain architectures found in the selected *Azospirillum* spp. genomes. Table S4. Accession numbers of GGDEF, EAL and hybrid proteins encoded by genes of select the analyzed *Azospirillum* genomes. Data extracted from http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins and http:// and http://smart.embl-heidelberg.de/. (DOCX 268 kb)

Additional file 4 Table S5 and **Table S6.** Table 5. Repertoire of GGDEF and GGDEF-EAL (hybrid) predicted proteins, organization, and domain architectures represented exclusively in the *A. halopraeferens, A. thiophilum*, and *A. oryzae* genomes. Table 6. Accession numbers of GGDEF and hybrid proteins encoded by genes exclusively found in *A. halopraeferens, A. thiophilum*, or *A. oryzae* genomes. Data extracted from http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins and http://smart.embl-heidelberg.de/. (DOCX 162 kb)

Additional file 5 Table S7. The alignments, root main square deviations (RMSDs) and sequence conservation percentages of proteins with GGD[E]EF, EAL and hybrid domains encoded by genes found in the *A. brasilense* Sp7 genome. Table 7Sa data including the GGD[E]EF proteins; Table 7Sb, data including the EAL proteins; Table 7Sc and 7Sd, data including the hybrid proteins. Data extracted from http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins. (DOCX 6071 kb)

Abbreviations

BLAST: Basic local alignment search tool; c-di-GMP: Cyclic-di-GMP; DGCs: Diguanylate cyclases; MiST2.2: Microbial signal transduction database; PDEs: Phosphodiesterases; PFAM: Protein domain database; PGPB: Plant-growth-promoting bacteria; PROSITE: Protein domain database for functional characterization; RAST: Rapid annotation using subsystems technology; RMSD: Root main square deviations; SMART: Simple modular architecture research tool; VMD: Visual molecular dynamics

Acknowledgements

The authors are grateful to Dr. C. Elmerich, of Institute Pasteur Paris, France, for her constructive suggestions. We would like to thank all of the reviewers and the Senior Editor for their analysis of our manuscript and for their very helpful recommendations.

Author contributions

The work presented here was carried out as a collaboration among all authors. BEB conceived the study, supervised the research, and drafted the manuscript. ARM and, CMP supervised and participated in the genomic and structural analyses, and revised the manuscript. JFCP and MMS retrieved the data from the database, performed the genomic and phylogenetic analyses and revised the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

This research project including the design of the study, data retrieval, analysis, data interpretation, and the writing of the manuscript, was funded by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), grant CB201-154914Z, Programa para el mejoramiento del profesorado, grant PROMEP/103.5/13/8869, and the financial support of Vicerrectoría de investigación y estudios de posgrado (VIEP). JFCP and MMS received a scholarship from CONACyT.

Availability of data and materials

All data generated or analyzed during this study are presented within the manuscript and/or additional files.

Ethics approval and consent to participate

Not applicable

Consent for publication

Not applicable

Competing interests

All authors declare that they have no competing interests.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details

[1]Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Edif. IC11, Ciudad Universitaria, Col. San Manuel Puebla Pue, CP72570 Puebla, Mexico. [2]Facultad de Farmacia, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Av. Universidad #1001, Col. Chamilpa, C.P, 62209 Cuernavaca, Morelos, Mexico.

Received: 4 September 2017 Accepted: 9 February 2018
Published online: 09 March 2018

References

1. Bashan Y. De-Bashan LE, Prabhu SR. Hernandez JP. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). Plant Soil. 2014;378:1–33.
2. Okon Y, Labandera-Gonzalez CA. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. Soil Biol Biochem. 1994; 26:1591–601.
3. Lavrinenko K, Chernousova E, Gridneva E, Dubinina G, Akimov V, Kuever J, et al. *Azospirillum thiophilum* sp. nov., a diazotrophic bacterium isolated from a sulfide spring. Int J Syst Evol Microbiol. 2010;60:2832–7.
4. Zhou S, Han L, Wang Y, Yang G, Li Zhuang L, Hu P. *Azospirillum humicireducens* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from a microbial fuel cell. Int J Syst Evol Microbiol. 2013;63:2618–24.
5. Tarrand J, Krieg N, Döbereiner J. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. Nov., and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. Can J Microbiol. 1978;24:967–80.
6. Wisniewski-Dyé F, Borziak K, Khalsa-Moyers G, Alexandre G, Sukharnikov LO, et al. *Azospirillum* genomes reveal transition of Bacteria from aquatic to terrestrial environments. PLoS Genet. 2011;7:e102430. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002430
7. Shin YG. et al. School of Applied Biosciences, College of Agriculture and Life Sciences, Kyungpook National University. 2015. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ nuccore/
8. Rivera D, Revale S, Molina R, Gualpa J, Puente M, al e. Complete genome sequence of the model rhizosphere strain *Azospirillum brasilense* Az39, successfully applied in agriculture. Genome Announc. 2014;2:e00683-14.

9. Kaneko T, Minamisawa K, Isawa T, Nakatsukasa H, Mitsui H, et al. Complete genomic structure of the cultivated rice endophyte *Azospirillum* sp. B510. DNA Res. 2010;17:37–50.
10. Fomenkov A, Vincze T, Grabovich M, Anton BP, Dubinina G, et al. Complete Genome Sequence of a Strain of *Azospirillum thiophilum* Isolated from a Sulfide Spring. Genome Announc. 4(1):e01521–15. https://doi.org/10.1128/genomeA.01521-15.
11. Kwak Y, Shin JH. First *Azospirillum* genome from aquatic environments: whole genome sequence of *Azospirillun thiophilum* BV-S^{T} a novel diazotroph harboring a capacity of sulfur chemolithotrophy from sulfide spring. Mar Genomics. 2016;25:21–4.
12. Kyrpides N, Huntemann M, Han J, Chen A, Mavromatis K, Markowitz V. et al. *Azospirillum halopraeferens* DSM 3675 G472 DRAFT_scaffold00001.1_C, whole genome shotgun sequence. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation_prok/
13. Zhou S, Han L, Wang Y, Yang G, Li Zhuang L, Azospirillum HP. *humicireducens* strain SgZ-5, complete. Genome. 2016; https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation_prok/
14. Varghese N. *Azospirillum oryzae* strain A2P, whole genome shotgun sequence. 2017. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation_prok/
15. Jonas C, Melefors Ö, Römling U. Regulation of c-di-GMP metabolism in biofilms. Future Microbiol. 2009;4:341–58. https://doi.org/10.2217/fmb.09.7.
16. Bible AN, Stephens BB, Ortega DR, Xie Z, Alexandre G. Function of a chemotaxis-like signal transduction pathway in modulating motility, cell clumping, and cell length in the alphaproteobacterium *Azospirillum brasilense*. J. Bacteriol. 2008;190:6365–75.http://dx.doi.org. https://doi.org/10.1128/JB.00734-08.
17. Mukherjee T, Kumar D, Burriss N, Xie Z, Alexandre G. *Azospirillum brasilense* chemotaxis depends on two signaling pathways regulating distinct motility parameters. J Bacteriol. 2016;198:1764–72. https://doi.org/10.1128/JB.00020-16.
18. Greer-Phillips SE, Stephens BB, Alexandre G. An energy taxis transducer promotes root colonization by *Azospirillum brasilense*. J Bacteriol. 2004;186:6595–604.
19. Pereg Gerk L, Paquelin A, Gounon P, Kennedy IR, Elmerich C. A transcriptional regulator of the LuxR-UhpA family, FlcA, controls flocculation and wheat root surface colonization by *Azospirillum brasilense* Sp7. Mol Plant-Microbe Interact. 1998;11:177–87.
20. Sadasivan L, Neyra CA. Flocculation in *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*: exopolysaccharides and cyst formation. J Bacteriol. 1985;163:716–23.
21. Bashan Y, Mitiku G, Whitmoyer RE, Levanony H. Evidence that fibrillar anchoring is essential for *Azospirillum brasilense* cd attachment to sand. Plant Soil. 1991;132:73–83.
22. Burdman S, Jurkevitch E, Okon Y. Surface characteristics of *Azospirillum brasilense* in relation to cell aggregation and attachment to plant roots. Crit Rev Microbiol. 2000;26:91–110.
23. Fibach-Paldi S, Burdman S, Okon Y. Key physiological properties contributing to rhizosphere adaptation and plant growth promotion abilities of *Azospirillum brasilense*. FEMS Microbiol Lett. 2012;326:99–108.
24. Drogue B, Sanguin H, Borland S, Prigent-Combaret C, Wisniewski-Dyè F. Genome wide profiling of *Azospirillum lipoferum* 4B gene expression during interaction with rice roots. doi:https://doi.org/10.1111/1574-6941.12244.
25. Russell MH, Bible AN, Fang X, Gooding JR, Campagna SR, Gomelsky M, Alexandre G. Integration of the second messenger c-di-GMP into the chemotactic signaling pathway. MBio. 2013;4:e00001-13.
26. Ramírez-Mata A, López Lara LI, Xiqui-Vázquez ML, Romero Osorio A, Saúl Jijón-Moreno S, Baca BE. The cyclic-di-GMP diguanylate cyclase CdgA has a role in biofilm formation and exopolysaccharide production in *Azospirillum brasilense*. Research Microbiol. 2016; https://doi.org/10.1016/j.resmic.2015.12.004.
27. Alexandre G. Chemotaxis control of transient cell aggregation. J Bacteriol. 2015;197:3230–7. https://doi.org/10.1128/JB.00121-15.
28. Römling U, Galperin MY, Gomelsky M. Cyclic di-GMP: the first 25 years of a universal bacterial second messenger. Microbiol Mol Biol Rev. 2013;77:1–52.
29. Schirmer T, Jenal U. Structural and mechanistic determinants of c-di-GMP signalling. Nat Rev Microbiol. 2009;7:724–35.
30. Römling U, Gomelsky M, Galperin MY. C-di-GMP: the dawning of a novel bacterial signalling system. Mol Microbiol. 2005;57:629–39.
31. Galperin MY, Nikolskaya AN, Koonin EV. Novel domains of the prokaryotic two-component signal transduction systems. FEMS Microbiol Lett. 2001;203:11–21.
32. Mills E, Pultz IS, Kulasekara HD, Miller SI. The bacterial second messenger c-di-GMP: mechanisms of signalling. Cell Microbiol. 2011;13:1122–9.
33. Byungwook L, Doheon L. Protein comparison at the domain architecture level. BMC Bioinformatics. 2009;10(Suppl 15):S5. https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-S15-S5 PMid:19958515 PMCid:2788356
34. Aziz RK, Bartels D, Best AA, De Jongh M, Disz T, et al. The RAST server: rapid annotations using subsystems technology. BMC Genomics. 2008; https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-75.
35. Finn RD, Mistry J, Tate J, Coggill P, Heger A, et al. The Pfam protein families database. Nucleic Acids Res. 2010;38:D211–22.
36. Letunic I, Doerks T, Bork P. SMART 7: recent updates to the protein domain annotation resource. Nucleic Acids Res. 2012;40:D302–5.
37. Sigrist CJA, de Castro E, Lorenzo Cerutti L, Cuche BA, Hulo N. New and continuing developments at PROSITE. Nucleic Acids Res. 2012:1–4. https://doi.org/10.1093/nar/gks106.
38. Marchler-Bauer A, Lu S, Anderson JB, Chitsaz F, Derbyshire MK, et al. CDD: a conserved domain data base for the functional annotation of proteins. Nucleic Acids Res. 2011;39:D225–9. https://doi.org/10.1093/nar/gkq1189. PMID:21109532
39. Ulrich LE, Zhulin IB. The MiST2 database: a comprehensive genomics resource on microbial signal transduction. Nucleic Acids Res. 2010; https://doi.org/10.1093/nar/gkp940.
40. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, Mc Gettigan PA, et al. Clustal W and Clustal X version2.0. Bioinformatics. 2007;23:2947–8. PMID:17846036
41. Goujon M, McWilliam H, Li W, Valentin F, Squizzato S, et al. A new bioinformatics analysis tools frame work at EMBL-EBI. Nucleic Acids Res. 2010;38:W695–9. https://doi.org/10.1093/nar/gkq313. PMID:20439314
42. Krogh A, Larsson B, von Heijne G, Sonnhammer EL. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. J Mol Biol. 2001;305:567–80.
43. Zhang Y. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. BMC Bioinformatics. 2008;9(1):40. https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-40
44. Yang J, Yan R, Roy A, Xu D, Poisson J, Zhan Y. The I-TASSER suite: protein structure and function prediction. Nat Methods. 2015; https://doi.org/10.1038/nmeth.3213.
45. Wassmann P, Chan C, Paul R, Beck A, Heerklotz H, et al. Structure of BeF3–modified response regulator PleD: implications for diguanylate cyclase activation, catalysis, and feedback inhibition. Structure. 2007;15:915–27.
46. Rao F, Yang Y, Qi Y, Lian ZL. Catalytic mechanism of cyclic di-GMP-specific phosphodiesterase: a study of the EAL domain-containing RocR from *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol. 2008;190:3622–31.
47. De N, Pirruccello M, Krasteva PV, Bae N, Raghavan RV, Sondermann H. Phosphorylation-independent regulation of the diguanylate cyclase WspR. PLoS Biol. 2008;6(3):e67. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060067
48. Filippova EV, Minasov G, Shuvalova L, Kiryukhina O, Massa C, et al. EAL domain from *Caulobacter crescentus* in complex with 5′-pGpG and Mg^{++}. 2011; https://doi.org/10.2210/pdb3u2e/pdb. http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do
49. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, et al. UCSF chimera–a visualization system for exploratory research and analysis. J Comput Chem. 2004;25:1605–12. https://doi.org/10.1002/jcc.20084
50. Humphrey W, Dalke A, Schulten K. VMD - visual molecular dynamics. J Molecular Graphics. 1996;14:33–8.
51. Harrison PW, Lower RPJ, Kim NKD, Young JPW. Introducing the bacterial 'chromid': not a chromosome, not a plasmid. Cell Press. 2010; https://doi.org/10.1016/j.tim.2009.12.010.
52. Whiteley CG, Lee DJ. Bacterial diguanylate cyclases: Structure, function and mechanism in exopolysaccharide biofilm development. Biotechnol Adv. 2014; https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.11.010
53. Carreño-López R, Sánchez A, Camargo N, Elmerich C, Baca BE. Characterization of *chsA*, a new gene controlling the chemotactic response, in *Azospirillum brasilense* Sp7. Arch Microbiol. 2009;191:501–7.
54. Cruz DP, Huertas MG, Lozano M, Zárate L, Zambrano MM. Comparative analysis of diguanylate cyclase and phosphodiesterase genes in *Klebsiella pneumoniae*. BMC Microbiol. 2012;12:139.
55. Povolotsky TL, Hengge R. Genome-based comparison of cyclic di-GMP signaling in pathogenic and commensal *Escherichia coli* strains. J Bacteriol. 198:111–26. https://doi.org/10.1128/JB.00520-15.
56. Seshasayee ASN, Fraser GM, Luscombe NM. Comparative genomics of cyclic-di-GMP signalling in bacteria: post-translational regulation and catalytic activity. Nucleic Acids Res. 2010;38:5970–81.
57. Feirer N, Xu J, Allen KD, Koestler BJ, Bruger EL, et al. A pterin-dependent signaling pathway regulates a dual-function diguanylate cyclase-phosphodiesterase controlling surface attachment in *Agrobacterium tumefaciens*. MBio. 2015;6:e00156.

58. Tarutina M. Ryyenkov DA, Gomelsky D. An unorthodox bacteriophytochrome from *Rhodobacter sphaeroides* is involved in turnover of the second messenger c-di-GMP. J Biol Chem. 2006;281:34751-8.
59. Wang Y, Hay ID, Rehman ZU, Rehm BHA. Membrane-anchored MucR mediates nitrate-dependent regulation of alginate production in *Pseudomonas aeruginosa*. Appl Microbiol Biotechnol. 2015;99:7253–65.
60. Chen MW, Kotaka M, Vonrhein C, Bricogne G, Rao F, et al. Structural insights into the regulatory mechanism of the response regulator RocR from *Pseudomonas aeruginosa* in cyclic di-GMP signaling. J Bacteriol. 2012;194:4837–46.
61. Christen M, Christen B, Folcher M, Schauerte A, Jenal U. Identification and characterization of a cyclic di-GMP-specific phosphodiesterase and its allosteric control by GTP. J Biol Chem. 2005;280:30829–37.
62. Österberg S, Åberg A, Herrera-Seitz MK, Wolf-Watz M, Shingle V. Genetic dissection of a motility-associated c-di-GMP signalling protein of *Pseudomonas putida*. Environ Microbiol Reports. 2013;5:556–65.
63. Sundararajan A, Kurowski J, Yan T, Klingeman DM, Joachimiak MP, et al. *Shewanella oneidensis* MR-1 sensory box protein involved in aerobic and anoxic growth. Appl Environ Microbiol. 2011;77:4647–56.
64. De N, Navarro MV, Raghavan RV, Sondermann H. Determinants for the activation and autoinhibition of the diguanylate cyclase response regulator WspR. J Mol Biol. 2009;393:619–33.
65. Paul R, Weiser S, Amiot NC, Chan C, Schirmer T, Giese B, Jenal U. Cell cycle-dependent dynamic localization of a bacterial response regulator with a novel di-guanylate cyclase output domain. Genes Dev. 2004;18:715–27.
66. Paul R, Abel S, Wassmann P, Beck A, Heerklotz H, Jenal U. Activation of diguanylate cyclase by phosphorylation-mediate dimerization. J Biol Chem. 2007;282:29170–7.
67. Borland S, Oudart A, Prigent-Combaret C, Brochier-Armanet C, Wisniewski-Dyé F. Genome-wide survey of two-component signal transduction systems in the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum*. BCM Genomics. 2015; https://doi.org/10.1186/s12864-015-1962-x.
68. Henry JT, Crosson S. Ligand-binding PAS domains in a genomic, cellular, and structural context. Annu Rev Microbiol. 2011;65:261–86. https://doi.org/10.1146/annurev-micro-121809-151631.
69. Phippen CW, Mikolajek H, Schlaefli HG, Keevil CW, Webb JS, Tews I. Formation and dimerization of the phosphodiesterase active site of the *Pseudomonas aeruginosa* MorA, a bi-functional c-di-GMP regulator. FEBS Lett. 2014;588:4631–6.
70. Parkinson JS. Signaling mechanisms of HAMP domains in chemoreceptors and sensor kinases. Annu Rev Microbiol. 2010;64:101–22.
71. Upadhyay AA, Fleetwood AD, Adebali O, Finn RD, IB ZN. Cache domains that are homologous to, but different from PAS domains comprise the largest superfamily of extracellular sensors in prokaryotes. PLoS Comput Biol. 2016;12:e1004862. https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004862.
72. Webb BA, Hildreth S, Helm RF, Scharfa BE. *Sinorhizobium meliloti* chemoreceptor McpU mediates chemotaxis toward host plant exudates through direct proline sensing. Appl Environ Microbiol. 2014;80:3401–15.
73. García V, Reyes-Darias JA, Martín-Mora D, Morel B, Matilla MA, Krell T. Identification of a chemoreceptor for C2 and C3 carboxylic acids. Appl Environ Microbiol. 2015;81:5449–57.
74. Pas J, von Grotthuss M, Wyrwicz LS, Rylowski J. Barcisewiski. Structure prediction, evolution and ligand interaction of CHASE domain. FEBS Lett. 2004;576:287–90.
75. Hay ID, Remminghorst U, Rehm BHA. MucR, a novel membrane-associated regulator of alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. Appl Environ Microbiol. 2009;75:1110–20.
76. Römling U, Liang ZX, Dow JM. Progress in understanding of the molecular basis underlying functional diversification of cyclic di-nucleotide turnover proteins. J Bacteriol. 2017; https://doi.org/10.1128/JB.00790-16.
77. Schirmer T. C-di-GMP synthesis: Structural aspects of evolution, catalysis and regulation. J Mol Biol. 2016; https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.07.023.
78. Crooks GE, Hon G, Chandonia JM, Brenner SE. WebLogo: a sequence logo generator. Genome Res. 2004;14:1188–90. https://doi.org/10.1101/gr.849004.
79. Newell PD, Monds RD, O'Toole GA. LapD is a bis-(3,′ 5′)-cyclic dimeric GMP-binding protein that regulates surface attachment by *Pseudomonas fluorescens*. PNAS-USA. 2009;106:3461–6.
80. Rao F, Qi Y, Chong HS, Kotaka M, Li B, Li J, et al. The functional role of a conserved loop in EAL domain-based cyclic di-GMP-specific phosphodiesterase. J Bacteriol. 2009;191:4722–31.
81. Tchigvintsev A, Xu X, Singer A, Chang C, Brown G, Proudfoot M. Structural insight into the mechanism of c-di-GMP hydrolysis by EAL domain phosphodiesterases. J Mol Biol. 2010;402:524–38. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.07.050
82. Wang Y, Xu J, Aimin J, Wang Y, Zhu J, et al. GGDEF and EAL proteins play different roles in the control of *Sinorhizobium meliloti* growth, motility, exopolysaccharide production, and competitive nodulation on host alfalfa. Acta Biochim Biophys Sin. 2010;42:410–41.
83. Gao S, Romdhane SB, Beullens S, Kaever V, Lambrichts I, et al. Genomic analysis of cyclic-di-GMP-related genes in rhizobial type strains and functional analysis in *Rhizobium etli*. Appl Microbiol Biotechnol. 2014;98:4589–602.
84. Chao L, Rakshe S, Leff M, Spormann AM. PdeB, a cyclic di-GMP-specific phosphodiesterase that regulates *Shewanella oneidensis* MR-1 motility and biofilm formation. J Bacteriol. 2013;195:3827–33.
85. Jung HI, Kim YJ, Lee YJ, Lee HS, Jung-Kee Lee JK, Kim SK. Mutation of the cyclic di-GMP phosphodiesterase gene in *Burkholderia lata* SK875 attenuates virulence and enhances biofilm formation. J. Microbiol. 2017;55:800. https://doi.org/10.1007/s12275-017-7374-7
86. Wisniewski-Dye F, Lozano L, Acosta-Cruz E, Borland S, Drogue B, et al. Genome sequence of *Azospirillum brasilense* CBG497 and comparative analyses of *Azospirillum* core and accessory genomes provide insight into niche adaptation. Genes (Basel). 2012;3:576–602.
87. Orlandini V, Emiliani G, Fondi M, Maida I, Perrin E, Fani R. Network analysis of plasmidomes: The *Azospirillum brasilense* Sp245 case. International J. Evolutionary Biol. 2014; https://doi.org/10.1155/2014/951035
88. Reinhold B, Hurek T, Fendrik I, Pot B, Gillis M, M.; Kersters K. et al. J. Int J Syst Bacteriol 1987, 37, 43–51.
89. Bashan Y, Moreno M, Troyo E. Biol Fertil Soils. 2000;32:265–72. https://doi.org/10.1007/s003740000246.
90. Ereño-Orbea J, Oyenarte I, Martínez-Cruz LA. CBS domains: ligand binding sites and conformational variability. Arch Biochem Biophs. 2013;540:70–81.
91. Wei C, Jiang W, Zhao M, Ling J, Zeng X. et al. A systematic analysis of the role of GGDEF-EAL proteins in virulence and motility in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*. Nature Reports. 2016. doi:https://doi.org/10.1038/srep23769.ris.
92. Hengge R. Trigger phosphodiesterases as a novel class of c-di-GMP effector proteins. 2016; https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0498.
93. Lindenberg S, Klauck G, Pesavento C, Klauck E, Hengge R. The EAL domain protein YciR acts as a trigger enzyme in a c-di-GMP signalling cascade in *E. coli* biofilm control. EMBO J. 2013;32:2001–14.
94. Spurbeck RR, Tarrien RJ, HLT M. Enzymatically active and inactive phosphodiesterases and diguanylate cyclases are involved in regulation of motility or sessility in *Escherichia coli* CFT07. 2012; https://doi.org/10.1128/mBio.00307-12.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

BioMed Central

Bioquímica y Biología Molecular de Bacterias
Asociación Mexicana de Microbiología

Ciudad de México a 12 de agosto de 2019

José Francisco Cruz Pérez
Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiologicas Icuap
Universidad Autónoma de Puebla
Presente

Estimado (a) Congresista:

Se le informa que su trabajo:

Expression and function of cdgD gene encoding a hybrid DGC-EAL protein from *Azospirillum brasilense*

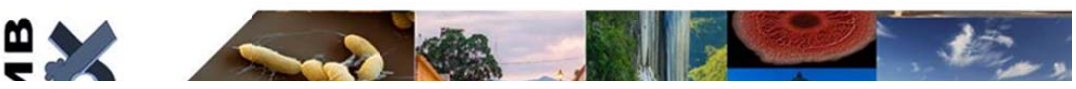
por:

José Francisco Cruz Pérez, Roxana Lara Oueilhé, Cynthia Marcos-Jiménez, Adriana Gamboa Pérez, Ricardo Cuatlayotl Olarte, Beatriz Eugenia Baca, Alberto Ramirez Mata

ha sido aceptado para su presentación durante el VI Congreso de Bioquímica y Biología Molecular de Bacterias y XLI Congreso Nacional de Microbiología, a llevarse a cabo del 27 – 31 de octubre de 2019 en la ciudad de Oaxaca, Oax. En fechas próximas se le comunicará modalidad y horario asignado.

Atentamente
Por el Comité Organizador

Dr. José Luis Puente García **Dra. María de Lourdes Girard Cuesy**



ASOCIACIÓN MEXICANA DE MICROBIOLOGÍA
1949-2019 - 70 ANIVERSARIO

BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE BACTERIAS
SOCIEDAD MEXICANA DE BIOQUÍMICA

Se otorga la presente

CONSTANCIA a:

José Francisco Cruz Pérez

Quien asistió y presentó el trabajo:

Expression and function of cdgD gene encoding a hybrid DGC-EAL protein from *Azospirillum brasilense*

por:
José Francisco Cruz Pérez, Roxana Lara Oueilhé, Cynthia Marcos-Jiménez, Adriana Gamboa Pérez,
Ricardo Cuatlayotl Olarte, Beatriz Eugenia Baca, Alberto Ramirez Mata

En la modalidad de cartel durante el
VI Congreso de Bioquímica y Biología Molecular de Bacterias y XLI Congreso Nacional de Microbiología
27 – 31 de octubre de 2019 en la ciudad de Oaxaca, Oax.

Atentamente
Por el Comité Organizador

Dr. José Luis Puente García

Dra. María de Lourdes Girard Cuesy

13. Bibliografia.

1. Alexandre G, Greer SE, Zhulin IB. 2000. Energy taxis Is the dominant behavior in *Azospirillum brasilense*. J Bacteriol 182:6042-6048.

2. Alexandre G. (2015). Chemotaxis Control of Transient Cell Aggregation. Journal of bacteriology, 197(20), 3230–3237. https://doi.org/10.1128/JB.00121-15

3. Arruebarrena Di Palma A, Pereyra CM, Moreno Ramírez L, Xiqui Vázquez ML, Baca BE, Pereyra MA, Lamattina L, Creus CM. 2013. Denitrification-derived nitric oxide modulates biofilm formation in *Azospirillum brasilense.* FEMS Microbiol Lett 338:77-85.

4. Barak, P., Chen, Y. (1982). Iron Nutrition of Plants in Calcareous Soils. https://doi.org/10.1016/S0065-2113(08)60326-0

5. Barea, J. M., Pozo, M. J., López, J.A., Aroca, R. (2015). Arbuscular Mycorrhizas and their Significance in Promoting Soil-Plant System Sustainability against Environmental Stresses. Beneficial Plant-microbial Interactions (pp.353-387)

6. Bashan Y, de-Bashan LE. 2010. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth—a critical assessment. Advances in Agronomy 108:77-136.

7. Bellion, M., Courbot, M., Jacob, C., Blaudez, D., & Chalot, M. (2006). Extracellular and cellular mechanisms sustaining metal tolerance in ectomycorrhizal fungi. *FEMS microbiology letters*, *254*(2), 173–181. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2005.00044.x

8. Bible AN, Khalsa-Moyers GK, Mukherjee T, Green CS, Mishra P, Purcell A, Aksenova A, Hurst GB, Alexandre G. 2015. Metabolic adaptations of *Azospirillum brasilense* to oxygen stress by cell-cell clumping and flocculation. Appl Environ Microbiol 81:8346-8357.

9. Bible AN, Stephens BB, Ortega DR, Xie Z, Alexandre G. 2008. Function of a chemotaxis-like signal transduction pathway in modulating motility, cell clumping, and cell length in the alphaproteobacterium *Azospirillum brasilense*. J Bacteriol 190:6365-6375.

10. Breaker, R.R., Sudarsan, N., Lee, E.R., Weinberg, Z., Moy, H., Kim, J.N., Link, K.H. (2008). Riboswitches in Eubacteria Sense the Second Messenger Cyclic Di-GMP. Vol. 321, Issue 5887, pp. 411-413

11. Bulgarelli, D., Schlaeppi, K., Spaepen, S., Ver Loren van Themaat, E., & Schulze-Lefert, P. (2013). Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. *Annual review of plant biology*, *64*, 807–838. https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120106

12. Burdman S, Okon Y, Jurkevitch E. 2000. Surface characteristics of *Azospirillum brasilense* in relation to cell aggregation and attachment to plant roots. Crit Rev Microbiol 26:91-110.

13. Caballero-Mellado J, M Carcano, Montiel MG, Mascarua-Esparza MA. 1999. Field inoculation of wheat (*Triticum aestivum*) with *Azospirillum brasilense* under temperate climate. Symbiosis 13:243-253.
14. Carreño-López R, Sánchez A, Camargo N, Elmerich C, Baca BE. 2009. Characterization of chsA, a new gene controlling the chemotactic response in *Azospirillum brasilense* Sp7. Arch Microbiol 191:501-507.
15. Christensen, K. E., Mirza, I. A., Berghuis, A. M., & Mackenzie, R. E. (2005). Magnesium and phosphate ions enable NAD binding to methylenetetrahydrofolate dehydrogenase-methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase. *The Journal of biological chemistry*, *280*(40), 34316–34323.
16. Clark A.H., Ross-Murphy S.B. (1987) Structural and mechanical properties of biopolymer gels. In: Biopolymers. Advances in Polymer Science, vol 83. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/BFb0023332
17. Creus CM, Graziano M, Casanovas EM, Pereyra MA, Simontacchi M, Puntarulo S, Barassi CA, Lamattina L. 2005. Nitric oxide is involved in the *Azospirillum brasilense*-induced lateral root formation in tomato. Planta 221:297-303.
18. D'Argenio DA, Miller SI. 2004. Cyclic di-GMP as a bacterial second messenger. Microbiology 150:2497-2502.
19. Dahlstrom KM, O'toole GA. 2017. A Symphony of Cyclases: Specificity in diguanylate cyclase signaling. Annu Rev Microbiol 71:179-195.
20. De Souza R, Ambrosini A, Passaglia LM. 2015. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. Genet Mol Biol 38:401-419.
21. Didonet, A.D., Magalhaes, A.C. (1997) Growth and nitrite production by Azospirillum strains subjected to different levels of dissolved oxygen in the medium, Vol.29, Issues 11-12, pages 1743 – 1746.
22. Elmerich, C., and Baca, B. E. 2000. Physiological evidence for differently regulated tryptophan-dependent pathways for índole-3-acetic acid shyntesis in *Azospirillum brasilense.* Mol. Gen. Genet. 264:521-530.
23. Evseeva, N. V., Tkachenko, O. V., Burygin, G. L., Matora, L. Y., Lobachev, Y. V., & Shchyogolev, S. Y. (2017). Effect of bacterial lipopolysaccharides on morphogenetic activity in wheat somatic calluses. *World journal of microbiology & biotechnology*, *34*(1).
24. Fatima, K.; Imran, A.; Amin, I.; Khan, Q. M.; Afzal, M., 2016. Plant species affect colonization patterns and metabolic activity of associated endophytes during phytoremediation of crude oil-contaminated soil. Environ. Sci. Pollut. Res., 23 (7): 6188-6196
25. Fibach-Paldi S, Burdman S, Okon Y. 2012. Key physiological properties contributing to rhizosphere adaptation and plant growth promotion abilities of *Azospirillum brasilense*. FEMS Microbiol Lett 326:99-108.
26. Finn, R. D., Clements, J., Arndt, W., Miller, B. L., Wheeler, T. J., Schreiber, F., Bateman, A., & Eddy, S. R. (2015). HMMER web server: 2015 update. *Nucleic acids research*, *43*(W1), W30–W38. https://doi.org/10.1093/nar/gkv397

27. Gamboa, A. (2014). PARTICIPACIÓN DE PROTEÍNAS CON DOMINIOS GGDEF EN CRECIMIENTO DE *Azospirillum brasilense.* CICIM, ICUAP, BENEMERITA UNIVERSIDAD AUTONOMA DEL ESTADO DE PUEBLA.
28. Gautier, R., Douguet, D., Antonny, B., & Drin, G. (2008). HELIQUEST: a web server to screen sequences with specific alpha-helical properties. *Bioinformatics (Oxford, England)*, *24*(18), 2101–2102. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn392
29. Gerhardt, E., Parize, E., Gravina, F., Pontes, F., Santos, A., Araújo, G., Goedert, A. C., Urbanski, A. H., Steffens, M., Chubatsu, L. S., Pedrosa, F. O., Souza, E. M., Forchhammer, K., Ganusova, E., Alexandre, G., de Souza, G. A., & Huergo, L. F. (2020). The Protein-Protein Interaction Network Reveals a Novel Role of the Signal Transduction Protein PII in the Control of c-di-GMP Homeostasis in Azospirillum brasilense. mSystems, 5(6), e00817-20.
30. Gherrero - Molina, M, F., Winik, B. C., Pedraza, R.O. (2011). More than rhizosphere colonization of strawberry plants by Azospirillum brasilense. 10.1016/j.apsoil.2011.10.011.
31. Gomelsky M. (2011). cAMP, c-di-GMP, c-di-AMP and now cGMP: bacteria use them all. *Molecular microbiology*, *79*(3), 562–565. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07514.x
32. Greer-Phillips SE, Stephens BB, Alexandre G. 2004. An energy taxis transducer promotes root colonization by *Azospirillum brasilense*. J Bacteriol 186:6595-6604.
33. Hay ID, Remminghorst U, Rehm BHA. 2009. MucR, a novel membrane-associated regulator of alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. Appl Environ Microbiol 1110-1120.
34. Hengge R. (2010). Cyclic-di-GMP reaches out into the bacterial RNA world. *Science signaling*, *3*(149), pe44. https://doi.org/10.1126/scisignal.3149pe44
35. Hengge R. 2009. Principles of c-di-GMP signaling in bacteria. Nat Rev Microbiol 7:263-273.
36. Hengge R. 2009. Principles of c-di-GMP signaling in bacteria. Nat Rev Microbiol 7:263-273.
37. Heyl A, Wulfetange K, Pils B, Nielsen N, Romanov GA, Schmülling T. 2007. Evolutionary proteomics identifies amino acids essential for ligand-binding of the cytokinin receptor CHASE domain. BMC Evol Biol 7:1-8.
38. Holt R. D. (1984). Spatial Heterogeneity, Indirect Interactions, and the Coexistence of Prey Species. *The American naturalist*, *124*(3), 377–406. https://doi.org/10.1086/284280
39. Hossain, S., Nisbett, L. M., & Boon, E. M. (2017). Discovery of Two Bacterial Nitric Oxide-Responsive Proteins and Their Roles in Bacterial Biofilm Regulation. *Accounts of chemical research*, *50*(7), 1633–1639. https://doi.org/10.1021/acs.accounts.7b00095
40. Hothorn, M., Dabi, T., & Chory, J. (2011). Structural basis for cytokinin recognition by Arabidopsis thaliana histidine kinase 4. *Nature chemical biology*, *7*(11), 766–768. https://doi.org/10.1038/nchembio.667

41. Hothorn, M., Dabi, T., & Chory, J. (2012). Structural basis for cytokinin recognition by Arabidopsis thaliana histidine kinase 4. *Nature chemical biology*, *7*(11), 766–768. https://doi.org/10.1038/nchembio.667
42. Hothorn, M., Dabi, T., & Chory, J. (2012). Structural basis for cytokinin recognition by Arabidopsis thaliana histidine kinase 4. *Nature chemical biology*, *7*(11), 766–768. https://doi.org/10.1038/nchembio.667
43. Igiehon, N. O., & Babalola, O. O. (2017). Biofertilizers and sustainable agriculture: exploring arbuscular mycorrhizal fungi. *Applied microbiology and biotechnology*, *101*(12), 4871–4881. https://doi.org/10.1007/s00253-017-8344-z
44. Jenal U, Reinders A, Lori C. 2017. Cyclic di-GMP: second messenger extraordinaire. Nat Rev Microbiol 15:271-284.
45. Jijón-Moreno, S., Baca, B. E., Castro-Fernández, D. C., & Ramírez-Mata, A. (2019). TyrR is involved in the transcriptional regulation of biofilm formation and D-alanine catabolism in *Azospirillum* brasilense Sp7. *PloS one*, *14*(2), e0211904. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211904
46. Kloepper JW, Schroth MN. 1978. Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. In: Proceedings of the IVth International conference on plant pathogenic bacteria station de pathologie végétale et Phytobactériologie. Angers 2:879-882.
47. Koul, V., Srivastava, D., Singh, P. P., & Kochar, M. (2020). Genome-wide identification of Azospirillum brasilense Sp245 small RNAs responsive to nitrogen starvation and likely involvement in plant-microbe interactions. BMC genomics, 21(1), 821. https://doi.org/10.1186/s12864-020-07212-7
48. Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G., & Sonnhammer, E. L. (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *Journal of molecular biology*, *305*(3), 567–580. https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4315
49. Lambers, H., Mougel, C., Jaillard, B. *et al. (2009).* Plant-microbe-soil interactions in the rhizosphere: an evolutionary perspective. *Plant Soil* 321, 83–115 (2009). https://doi.org/10.1007/s11104-009-0042-x
50. Lao, D. M., Arai, M., Ikeda, M., & Shimizu, T. (2002). The presence of signal peptide significantly affects transmembrane topology prediction. Bioinformatics (Oxford,England), 18(12),1562–1566. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/18.12.1562
51. Lara, R. (2018). Estudio fenotipico del locus AZOBR_100210 de *Azospirillum brasilense* Sp245. CICIM, ICUAP, BENEMERITA UNIVERSIDAD AUTONOMA DEL ESTADO DE PUEBLA.
52. Letunic, I., Doerks, T., & Bork, P. (2015). SMART: recent updates, new developments and status in 2015. *Nucleic acids research*, *43*(Database issue), D257–D260. https://doi.org/10.1093/nar/gku949
53. Li, Q., & Zhou, J. M. (2016). The microbiota-gut-brain axis and its potential therapeutic role in autism spectrum disorder. *Neuroscience*, *324*, 131–139. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.03.013
54. Lim, B., Beyhan, S., Meir, J., & Yildiz, F. H. (2006). Cyclic-diGMP signal transduction systems in Vibrio cholerae: modulation of rugosity and biofilm

formation. *Molecular microbiology*, *60*(2), 331–348. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05106.x
55. Liu, C., Liew, C. W., Wong, Y. H., Tan, S. T., Poh, W. H., Manimekalai, M., Rajan, S., Xin, L., Liang, Z. X., Grüber, G., Rice, S. A., & Lescar, J. (2018). Insights into Biofilm Dispersal Regulation from the Crystal Structure of the PAS-GGDEF-EAL Region of RbdA from Pseudomonas aeruginosa. *Journal of bacteriology*, *200*(3), e00515-17. https://doi.org/10.1128/JB.00515-17
56. Lomin, S. N., Krivosheev, D. M., Steklov, M. Y., Arkhipov, D. V., Osolodkin, D. I., Schmülling, T., & Romanov, G. A. (2015). Plant membrane assays with cytokinin receptors underpin the unique role of free cytokinin bases as biologically active ligands. *Journal of experimental botany*, *66*(7), 1851–1863. https://doi.org/10.1093/jxb/eru522
57. Lugtenberg, B., & Kamilova, F. (2009). Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annual review of microbiology*, *63*, 541–556. https://doi.org/10.1146/annurev.micro.62.081307.162918.
58. Mahanty, T., Bhattacharjee, S., Goswami, M., Bhattacharyya, P., Das, B., Ghosh, A., & Tribedi, P. (2017). Biofertilizers: a potential approach for sustainable agriculture development. *Environmental science and pollution research international*, *24*(4), 3315–3335. https://doi.org/10.1007/s11356-016-8104-0
59. Marcos, C. (2017). “Papel de la Indol Piruvato Ferredoxina Oxidoreductasa putativa en la producción de ácido Indol-3-Acetico y la colonización al trigo”. CICIM, ICUAP, BENEMERITA UNIVERSIDAD AUTONOMA DEL ESTADO DE PUEBLA.

60. McMillan, M., Pereg, L. (2014). Scoping the potential uses of beneficial microorganisms for increasing productivity in cotton cropping systems. Soil Biology and Biochemistry 80.

61. Mendes R, Garbeva P, Raaijmakers JM. 2013. The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. FEMS Microbiol Rev 37:634-63.
62. Mills E, Pultz IS, Kulasekara HD, Miller SI. 2011. The bacterial second messenger c-di-GMP: mechanisms of signalling. Cell Microbiol 13:1122-1129.
63. Morgan, J. A., Bending, G. D., & White, P. J. (2005). Biological costs and benefits to plant-microbe interactions in the rhizosphere. *Journal of experimental botany*, *56*(417), 1729–1739. https://doi.org/10.1093/jxb/eri205
64. Mougel, C, & Zhulin IB. 2001. CHASE: an extracellular sensing domain common to transmembrane receptors from prokaryotes, lower eukaryotes and plants. Trends Biochem Sci 26:582-584.
65. Mukherjee T, Kumar D, Burriss N, Xie Z, Alexandre G. 2016. *Azospirillum brasilense* chemotaxis depends on two signaling pathways regulating distinct motility parameters. J Bacteriol 198:1764-1772.
66. Okon, Y, Labandera-González CA. 1994. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. Soil Biol Biochem 26:1591-1601.

67. McDougald, D., Rice, S., Barraud, N. *et al.* Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. *Nat Rev Microbiol* **10,** 39–50 (2012).

68. Okon, Y., Kigel, J., Burdman, S. (1997). Effects of *Azospirillum brasilense* on nodulation and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). https://doi.org/10.1016/S0038-0717(96)00222-2

69. Pas J, von Grotthuss M, Wyrwicz LS, Rylowski L, Barcisewiski J. 2004. Structure prediction, evolution and ligand interaction of CHASE domain. FEBS Lett 576:287-290.

70. Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., & Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of computational chemistry*, *25*(13), 1605–1612. https://doi.org/10.1002/jcc.20084

71. Puyvelde SV, Cloots L, Engelen K, Das F, Marchal K, Vanderleyden J, Spaepen S. 2011. Transcriptome analysis of the rhizosphere bacterium *Azospirillum brasilense* reveals an extensive auxin response. Microb Ecol 62:723-728.

72. Qi Y., Rao F., Luo Z., Liang Z.X. (2009).A flavin cofactor-binding PAS domain regulates c-di-GMP synthesis in AxDGC2 from *Acetobacter xylinum*. Biochemistry. Vol.48, P.p. 10275–10285.

73. Ramírez-Mata A, Fernández-Domínguez IJ, Nuñez-Reza KJ, Xiqui-Vázquez ML, Baca BE. 2014. Redes de señalización en la producción de biopelículas en bacterias: quorum sensing, di-GMPc y óxido nítric. Asociación Argentina de Microbiología. 46:242-255

74. Ramírez-Mata A, Millán-Pacheco C, Cruz-Pérez JF, Minjárez-Sáenz M, Baca BE. 2018. In silico comparative analysis of GGDEF and EAL domain signaling proteins from the *Azospirillum* genomes. BMC Microbiology 18:1-14.

75. Ramírez, D. (2016). ANÁLISIS FENOTÍPICO DE LAS MUTANTES EN EL GEN dgcD::KmR QUE CODIFICAN PARA UNA DIGUANILATO CICLASA PUTATIVA EN CEPAS Sp7 Y Sp245 DE *Azospirillum brasilense*. CICIM, ICUAP, BENEMERITA UNIVERSIDAD AUTONOMA DEL ESTADO DE PUEBLA.

76. Rodríguez-Cáceres EA. 1982. Improved medium for isolation of *Azospirillum* spp. Appl Environ Microbiol 44:990-991.

77. Romero A, Aguilar JJ, Xiqui ML, Sandoval JO, Baca BE. 2013. The *hisC1* gene, encoding aromatic amino acid aminotransferase-1 in *Azospirillum brasilense* Sp7, expressed in wheat. Plant Soil 356:139-150.

78. Römling U & Simm R. 2009. Prevailing concepts of c-di-GMP signaling. Contrib Microbiol 16:161-181.

79. Römling U, Galperin MY, Gomelsky M. 2013. Cyclic di-GMP: the First 25 years of a universal bacterial second messenger. Microbiol Mol Biol Rev 77:1-52.

80. Römling, U., & Galperin, M. Y. (2017). Discovery of the Second Messenger Cyclic di-GMP. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, *1657*, 1–8. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7240-1_1

81. Ross, P., Weinhouse, H., Aloni, Y., Michaeli, D., Weinberger-Ohana, P., Mayer, R., Braun, S., de Vroom, E., van der Marel, G. A., van Boom, J. H., & Benziman, M. (1987). Regulation of cellulose synthesis in Acetobacter xylinum by cyclic diguanylic acid. *Nature*, *325*(6101), 279–281. https://doi.org/10.1038/325279a0

82. Russell MH, Bible AN, Fang X, Gooding JR, Campagna SR, Gomelsky M, Alexandre G. 2013. Integration of the second messenger c-di-GMP into the chemotactic signaling pathway. mBio 4, e00001-00013.

83. Saharan BS, Nehra V. 2011. Plant growth promoting rhizobacteria: A Critical Review. Life Sciences and Medicine Research 21:1-30

84. Salcedo, F., Pereyra, C.M., Arruebarrena Di Palma, A., Lamattina, L., Creus, M. (2012). Methods for Studying Biofilms in *Azospirillum* and Other PGPRs. Handbook for Azospirillum (pp.199-229).

85. Sauer H, Wartenberg M, Hescheler J: (2001) Reactive Oxygen Species as Intracellular Messengers During Cell Growth and Differentiation. Cell Physiol Biochem, 11:173-186. doi: 10.1159/000047804

86. Saura, J., Tusell, J. M., & Serratosa, J. (2003). High-yield isolation of murine microglia by mild trypsinization. *Glia*, *44*(3), 183–189. https://doi.org/10.1002/glia.10274

87. Schirmer T, Jenal U. 2009. Structural and mechanistic determinants of c-di-GMP signalling. Nat Rev Microbiol 7:724-735.

88. Schmidt, J. E., & Gaudin, A. (2018). What is the agronomic potential of biofertilizers for maize? A meta-analysis. *FEMS microbiology ecology*, *94*(7), 10.1093/femsec/fiy094. Wang, M., Li, S., Chen, S., Meng, N., Li, X., Zheng, H., Zhao, C., & Wang, D. (2019). Manipulation of the rhizosphere bacterial community by biofertilizers is associated with mitigation of cadmium phytotoxicity. *The Science of the total environment*, *649*, 413–421.

89. Schmidt, J. E., & Gaudin, A. (2018). What is the agronomic potential of biofertilizers for maize? A meta-analysis. *FEMS microbiology ecology*, *94*(7), 10.1093/femsec/fiy094. Wang, M., Li, S., Chen, S., Meng, N., Li, X., Zheng, H., Zhao, C., & Wang, D. (2019). Manipulation of the rhizosphere bacterial community by biofertilizers is associated with mitigation of cadmium phytotoxicity. *The Science of the total environment*, *649*, 413–421.

90. Sekhotha, M. M., Monyeki, K. D., & Sibuyi, M. E. (2016). Exposure to Agrochemicals and Cardiovascular Disease: A Review. *International journal of environmental research and public health*, *13*(2), 229.

91. Singh, S., Adapa, L. M., & Hankins, N. (2017). Influences of ammonium and phosphate stimulation on metalworking fluid biofilm reactor development and performance. New biotechnology, 39(Pt B), 240–246. https://doi.org/10.1016/j.nbt.2017.09.002

92. Steciow, M. M., Lara, E., Paul, C., Pillonel, A., & Belbahri, L. (2014). Multiple barcode assessment within the Saprolegnia-Achlya clade (Saprolegniales,

Oomycota, Straminipila) brings order in a neglected group of pathogens. *IMA fungus*, *5*(2), 439–448. https://doi.org/10.5598/imafungus.2014.05.02.08
93. Steenhoudt O, Vanderleyden J. 2000. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. FEMS Microbiol Rev 24:487-506.
94. Steenhoudt O, Vanderleyden J. 2000. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. FEMS Microbiol Rev 24:487-506.
95. Stets, M. I., Alqueres, S. M., Souza, E. M., Pedrosa, F., Schmid, M., Hartmann, A., & Cruz, L. M. (2015). Quantification of *Azospirillum brasilense* FP2 Bacteria in Wheat Roots by Strain-Specific Quantitative PCR. *Applied and environmental microbiology*, *81*(19), 6700–6709.
96. Tarrand JJ, Krieg NR, Döbereiner J. 1978. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two especies, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. Nov Can J Microbiol 24:967-980.
97. Taylor B.L. & Zhulin IB. (1999). PAS Domains: Internal Sensors of Oxygen, Redox Potential, and Light. Microbiology and Molecular Biology Reviews. Vol.63, P.p.469-506.
98. Valentini, M., & Filloux, A. (2016). Biofilms and Cyclic di-GMP (c-di-GMP) Signaling: Lessons from Pseudomonas aeruginosa and Other Bacteria. *The Journal of biological chemistry*, *291*(24), 12547–12555. https://doi.org/10.1074/jbc.R115.711507
99. Vanbleu, E., Marchal, K., Lambrecht, M., Mathys, J., & Vanderleyden, J. (2004). Annotation of the pRhico plasmid of Azospirillum brasilense reveals its role in determining the outer surface composition. *FEMS microbiology letters*, *232*(2), 165–172. https://doi.org/10.1016/S0378-1097(04)00046-1
100. Viruega-Góngora, V. I., Acatitla-Jácome, I. S., Reyes-Carmona, S. R., Baca, B. E., & Ramírez-Mata, A. (2020). Spatio-temporal formation of biofilms and extracellular matrix analysis in Azospirillum brasilense. *FEMS microbiology letters*, *367*(4), fnaa037. https://doi.org/10.1093/femsle/fnaa037
101. Yang, J., Yan, R., Roy, A. *et al.* (2015) The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nat Methods* 12, 7–8. https://doi.org/10.1038/nmeth.3213
102. Young J. P. W., 1992. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms, p. 43-86. Stacey G., Burris H., and Evans H. J. Biological Nitrgen Fixation, Chapman and Hall, New York., N. Y.
103. Zhang, F., Peng, W., Yang, Y., Dai, W., & Song, J. (2019). A Novel Method for Identifying Essential Genes by Fusing Dynamic Protein¯Protein Interactive Networks. *Genes*, *10*(1), 31. https://doi.org/10.3390/genes10010031
104. Zhang, Y., Guo, J., Zhang, N., Yuan, W., Lin, Z., & Huang, W. (2019). Characterization and analysis of a novel diguanylate cyclase PA0847 from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Infection and drug resistance*, *12*, 655–665.

105. Zimmer W, Wesche M, Timmermans L. 1998. Identification and isolation of the indole-3-pyruvate decarboxylase gene from Azospirillum brasilense Sp7: sequencing and functional analysis of the gene locus. Curr Microbiol 36:327-331.
106. Pedraza-Herrera, L. A., Lopez- Carrascal, C. E., & Uribe Vélez, D. (2020). Mecanismos de acción de Bacillus spp. (Bacillaceae) contra microorganismos fitopatógenos durante su interacción con plantas. Acta Biológica Colombiana, 25(1), 112 - 125. https://doi.org/10.15446/abc.v25n1.75045
107. López D, Vlamakis H, Kolter R. Biofilms. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2010 Jul;2(7):a000398. doi: 10.1101/cshperspect.a000398. Epub 2010 Jun 2. PMID: 20519345; PMCID: PMC2890205.
108. Pérez-Mendoza, D., Felipe, A., Ferreiro, M. D., Sanjuán, J., & Gallegos, M. T. (2019). AmrZ and FleQ Co-regulate Cellulose Production in *Pseudomonas syringae* pv. Tomato DC3000. *Frontiers in microbiology*, *10*, 746. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00746.
109. Schaper, F., & Rose-John, S. (2015). Interleukin-6: Biology, signaling and strategies of blockade. *Cytokine & growth factor reviews*, *26*(5), 475–487. https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2015.07.004.
110. Matilla, M. A., Travieso, M. L., Ramos, J. L., & Ramos-González, M. I. (2011). Cyclic diguanylate turnover mediated by the sole GGDEF/EAL response regulator in Pseudomonas putida: its role in the rhizosphere and an analysis of its target processes. *Environmental microbiology*, *13*(7), 1745–1766. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02499.
111. Gerhardt A (2020) Sensitivity towards Nitrate: Com- parison of Groundwater versus Surface Water Crustaceans. J Soil Water Sci 4(1):112-121.
112. Jones, C. J., Utada, A., Davis, K. R., Thongsomboon, W., Zamorano Sanchez, D., Banakar, V., Cegelski, L., Wong, G. C., & Yildiz, F. H. (2015). C-di-GMP Regulates Motile to Sessile Transition by Modulating MshA Pili Biogenesis and Near-Surface Motility Behavior in Vibrio cholerae. *PLoS pathogens*, *11*(10), e1005068. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005068.
113. Little, R. H., Woodcock, S. D., Campilongo, R., Fung, R., Heal, R., Humphries, L., Pacheco-Moreno, A., Paulusch, S., Stigliano, E., Vikeli, E., Ward, D., & Malone, J. G. (2019). Differential Regulation of Genes for Cyclic-di-GMP Metabolism Orchestrates Adaptive Changes During Rhizosphere Colonization by *Pseudomonas fluorescens*. *Frontiers in microbiology*, *10*, 1089. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01089.
114. Bible, A. N., Khalsa-Moyers, G. K., Mukherjee, T., Green, C. S., Mishra, P., Purcell, A., Aksenova, A., Hurst, G. B., & Alexandre, G. (2015). Metabolic adaptations of Azospirillum brasilense to oxygen stress by cell-to-cell clumping and flocculation. *Applied and environmental microbiology*, *81*(24), 8346–8357. https://doi.org/10.1128/AEM.02782-15.
115. Muriel, C., Arrebola, E., Redondo-Nieto, M., Martínez-Granero, F., Jalvo, B., Pfeilmeier, S., Blanco-Romero, E., Baena, I., Malone, J. G., Rivilla, R., & Martín, M. (2018). AmrZ is a major determinant of c-di-GMP levels in Pseudomonas fluorescens F113. *Scientific reports*, *8*(1), 1979. https://doi.org/10.1038/s41598-018-20419-9.

116. Tarutina, M., Ryjenkov, D. A., & Gomelsky, M. (2006). An unorthodox bacteriophytochrome from Rhodobacter sphaeroides involved in turnover of the second messenger c-di-GMP. *The Journal of biological chemistry*, *281*(46), 34751–34758. https://doi.org/10.1074/jbc.M604819200.
117. Feirer, N., Xu, J., Allen, K. D., Koestler, B. J., Bruger, E. L., Waters, C. M., White, R. H., & Fuqua, C. (2015). A Pterin-Dependent Signaling Pathway Regulates a Dual-Function Diguanylate Cyclase-Phosphodiesterase Controlling Surface Attachment in Agrobacterium tumefaciens. *mBio*, *6*(4).
118. Schirmer T. (2016). C-di-GMP Synthesis: Structural Aspects of Evolution, Catalysis and Regulation. *Journal of molecular biology*, *428*(19), 3683–3701. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.07.023.
119. Ortega, Á., Zhulin, I. B., & Krell, T. (2017). Sensory Repertoire of Bacterial Chemoreceptors. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, *81*(4), e00033-17. https://doi.org/10.1128/MMBR.00033-17.