



Impacto de la citocinina (2-isopentiladenina) en la fisiología de *Azospirillum baldaniorum* Sp 245

Tesis que para obtener el título de Maestro en Ciencias Microbiológicas

Presenta

Q.F.B. Jesús Emiliano Toscano Jiménez

Director de tesis

Dra. Beatriz Eugenia Baca
Laboratorio de interacción bacteria-planta

Maestría en Ciencias Microbiológicas

Área de Bioquímica y Genética Microbiana

Centro de Investigación en Ciencias Microbiológicas, ICUAP

Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Noviembre 2024



BUAP

Puebla, Pue. a 26 de noviembre 2024.

**A LA ACADEMIA DEL POSGRADO
EN MICROBIOLOGÍA
CICM-ICUAP
PRESENTE.**

Por este conducto los abajo firmantes, integrantes del Comité revisor de Tesis de Maestría del alumno **Jesús Emiliano Toscano Jiménez**, les informamos que hemos revisado el escrito titulado:

“Impacto de la citocinina (2-isopentil adenina) en la fisiología de *Azospirillum baldaniorum* Sp245”

A nuestro juicio, el alumno **Jesús Emiliano Toscano Jiménez** puede proceder a la digitalización de la tesis y a la presentación del examen de grado correspondiente.

Sin más que agregar, nos despedimos afectuosamente de ustedes.

Atentamente.
“Pensar Bien Para Vivir Mejor”

D.C. Lucía Soto Urzúa

D.C. Sandra Raquel Reyes Carmona



D.C. Ernesto García Pineda

D.C. Alberto Ramírez Mata

Agradecimientos

Quiero aprovechar este espacio para agradecer a cada uno de los actores que formaron parte de mi experiencia durante la maestría.

A mi madre, que no deja de demostrar un enorme amor incondicional a sus seres queridos y que sin su apoyo constante este logro no valdría la pena.

A mi padre, por siempre demostrarme su amor puro y duro en cualquier circunstancia.

A la Dra. Baca por abrirme las puertas de su laboratorio y depositar su confianza en mi para aceptarme como su alumno tutorado. Ante mis ojos usted siempre será una persona digna de admirar.

Al Dr. Alberto, por depositar su confianza en mi para realizar este proyecto y por todo el apoyo y asesorías brindadas.

A mis hermanos, Marcelo y Victoria por estar siempre ahí para mí.

A todos los miembros del laboratorio de interacción bacteria-planta, su compañía y consejos siempre fueron bienvenidos y bien recibidos. Con especial mención a la Dra. Sandra y la Q.F.B. María Luisa Xiqui, quienes siempre demostraron paciencia y temple para ayudarme en mis actividades diarias en el laboratorio y personales.

A mis compañeros de maestría que demostraron ser un grupo unido y confiable. Gracias por los buenos momentos.

A mis amigos Ángel, Luis Joel, Yamil, Estrella y César, gracias por siempre estar ahí para mí en todo sentido.

A mis mascotas Kofi y Jojo, que sería la vida sin un acompañante peludo para despertar los ánimos en los días más difíciles.

A todos aquellos que ya no están con nosotros, pero siempre fueron y serán parte importante de mí. A mi abuelo Vicente, a mi tía Cora y a mi abuela Piedad.

Por último, quisiera agradecer a CONACHYT por la beca otorgada para poder dedicarme enteramente a mis estudios de posgrado.

cdf _____	I
Lista de tablas _____	VI
Lista de ilustraciones _____	VI
Lista de abreviaciones _____	VII
Resumen _____	VIII
1) <i>Azospirillum</i> spp. _____	1
2) Citocininas _____	2
2.1) Biosíntesis y activación de citocininas. _____	3
2.2) Citocininas bacterianas _____	5
2.3) Papel de las citocininas en la interacción bacteria-planta _____	5
2.4) <i>Azospirillum</i> y citocininas _____	6
3) Antecedentes. _____	7
3.1) Antecedentes directos. _____	7
4) Justificación _____	9
5) Hipótesis _____	10
6) Objetivos _____	11
6.1) Objetivo general _____	11
6.2) Objetivos específicos _____	11
7) Materiales y reactivos _____	12
7.1) Cepas _____	12
7.2) Medios _____	12
7.3) Soluciones y reactivos _____	12
8) Metodología _____	13
8.1) Búsqueda de genes asociados a vías biosintéticas de citocininas en varias plataformas. _____	13
8.2) Uso de isopentiladenina como fuente de carbono. _____	13
8.3) Uso de isopentiladenina como fuente de nitrógeno. _____	13
8.4) Ensayos de quimiotaxis. _____	14
8.5) Ensayos de movilidad. _____	14
8.6) Formación de biopelícula. _____	14
8.7) Curva de crecimiento bacteriano. _____	15
8.8) Ensayos de viabilidad celular. _____	15

9) Resultados y Discusión	16
9.1) Análisis bioinformático relacionado a la síntesis de citocininas en <i>Azospirillum baldaniorum</i> Sp 245	16
9.1.1) Genes <i>ipt</i>	16
9.1.2) Gen <i>miaA</i>	18
9.1.3) Gen <i>miaB</i>	20
9.1.4) Gen <i>miaE</i>	21
9.1.5) Genes <i>log</i>	21
9.1.6) Genes <i>ckx</i>	24
9.1.7) Diseño de oligonucleótidos	25
9.2) Efecto de la iP en la fisiología de <i>Azospirillum baldaniorum</i> Sp 245	26
9.2.1) Isopentiladenina como fuente de carbono o de nitrógeno en <i>Azospirillum baldaniorum</i> Sp 245	26
9.2.1.1) Isopentiladenina como fuente de carbono.	26
9.2.1.2) Isopentiladenina como fuente de nitrógeno	27
9.2.2) Influencia de concentraciones micromolares de isopentiladenina en la fisiología de <i>Azospirillum baldaniorum</i> Sp 245	27
9.2.2.1) Efecto quimiotáctico de concentraciones micromolares de isopentiladenina en <i>Azospirillum baldaniorum</i> Sp 245	28
9.2.2.2) Influencia de concentraciones micromolares de isopentiladenina en la movilidad de <i>Azospirillum baldaniorum</i> Sp 245	29
9.2.2.3) Influencia de concentraciones micromolares de isopentiladenina en la formación de biopelícula de <i>Azospirillum baldaniorum</i> Sp 245	30
9.2.2.4) Influencia de concentraciones micromolares de isopentiladenina en el crecimiento de <i>Azospirillum baldaniorum</i> Sp 245	31
9.2.3) Ensayos de viabilidad celular: células vivas/células muertas	32
9.2.3.1) Efectos de concentraciones micromolares en la viabilidad celular de <i>Azospirillum baldaniorum</i> Sp24	32
9.2.3.2) Efecto de concentraciones sub micromolares en la viabilidad celular de <i>Azospirillum baldaniorum</i> Sp 245	33
9.2.4) Influencia de concentraciones sub micromolares de isopentiladenina en la fisiología de <i>Azospirillum baldaniorum</i> Sp 245	34
9.2.4.1) Efecto quimiotáctico de concentraciones sub micromolares de isopentiladenina en <i>Azospirillum baldaniorum</i> Sp 245	34
9.2.4.2) Influencia de concentraciones sub micromolares de iP en la formación de biopelícula de <i>Azospirillum baldaniorum</i> Sp 245	35
10) Conclusiones	37
11) Anexos	39
12) Bibliografía	41

Lista de tablas

Tabla 1. Resumen de las características de los oligonucleótidos diseñados para evaluar la expresión de los genes relacionados a la síntesis de citocininas.....	25
Tabla 2. Composición de 1L de medio mínimo K-Malato.....	39
Tabla 3. Composición de 1L de medio Difco.....	39
Tabla 4. Composición de 1 L de medio Rojo Congo.....	40
Tabla 5. Composición de 1L de buffer de quimiotaxis.....	40

Lista de ilustraciones

Ilustración 1. Estructura química de las citocininas.....	3
Ilustración 2. Vías de síntesis de las citocininas.....	4
Ilustración 3. Gen <i>izt</i> de <i>A. tumefaciens</i> T37 y gen <i>ipt</i> de <i>A. baldaniorum</i> Sp 245.....	16
Ilustración 4. Conservación del gen tipo <i>ipt</i> a lo largo del género <i>Azospirillum</i> y su parecido con <i>IZT</i> de <i>A. tumefaciens</i>	17
Ilustración 5. Representación gráfica del dominio IPPT de <i>MiaA</i> de <i>Azospirillum baldaniorum</i> Sp 245.....	18
Ilustración 6. Conservación de la proteína <i>MiaA</i> en <i>Azospirillum baldaniorum</i> Sp 245.....	19
Ilustración 7. Representación gráfica del gen <i>miaB</i> de <i>Azospirillum baldaniorum</i> Sp 245.....	20
Ilustración 8. Conservación de la proteína <i>MiaB</i> de <i>Azospirillum baldaniorum</i> Sp 245.....	21
Ilustración 9. Proteínas LOG codificadas en el genoma de <i>A. baldaniorum</i> Sp 245.....	22
Ilustración 10. Clasificación de las proteínas LOG de <i>Azospirillum baldaniorum</i> Sp 245.....	23
Ilustración 11. Clasificación de las proteínas LOG de <i>Azospirillum baldaniorum</i> Sp 245.....	24
Ilustración 12. Crecimiento de <i>Azospirillum baldaniorum</i> Sp 245 en medio mínimo suplementado con <i>iP</i> como fuente de carbono.....	26
Ilustración 13. Crecimiento de <i>Azospirillum baldaniorum</i> Sp 245 en medio mínimo suplementado con <i>iP</i> como fuente de nitrógeno.....	27
Ilustración 14. Ensayos de quimiotaxis en placa con agar suave y plug de agar sólido adicionado con <i>iP</i> en el rango micromolar.....	28
Ilustración 15. Datos de movilidad de <i>Azospirillum baldaniorum</i> Sp 245 en medio mínimo K-Malato adicionado con <i>iP</i> en rangos micromolares.....	29
Ilustración 16. Formación de biopelícula de 72 horas de <i>Azospirillum baldaniorum</i> Sp 245 cultivado en presencia de <i>iP</i> en el rango micromolar.....	30
Ilustración 17. Curva de crecimiento de <i>Azospirillum baldaniorum</i> Sp 245 en medio mínimo K-Malato adicionado con <i>iP</i> en el rango micromolar.....	31
Ilustración 18. Ensayo de viabilidad celular de <i>Azospirillum baldaniorum</i> Sp 245 en cultivos adicionados con <i>iP</i> en el rango micromolar.....	32
Ilustración 19. Ensayo de viabilidad celular de <i>Azospirillum baldaniorum</i> Sp 245 en cultivos adicionados con <i>iP</i> en el rango sub micromolar.....	34
Ilustración 20. Ensayos de quimiotaxis en placa con agar suave y plug de agar sólido adicionado con <i>iP</i> en el rango sub micromolar.....	35
Ilustración 21. Formación de biopelícula de 72 horas de <i>Azospirillum baldaniorum</i> Sp 245 cultivado en presencia de <i>iP</i> en el rango sub micromolar.....	36

Lista de abreviaciones

- 2MeScZ - 2-metiltiol (Z-N6-(4hidroxi-isopentil-adenina)
- 2MeSiP - 2-metiltiol N6-(2-isopentiladenina)
- 2MeStZ - 2-metiltiol (E-N6-(4hidroxi-isopentil-adenina)
- ADP - adenosín monofosfato
- AIA - ácido indol-3-acético
- AMP - adenosín monofosfato
- ARNt - acido ribo nucleico de transferencia
- ATP - adenosín trifosfato
- BLAST - herramienta de alineamiento de secuencias de tipo local
- CHASE - dominio proteico asociado a la detección de citocininas (Cyclases/Histidine kinases Associated Sensory Extracellular)
- cZ- cis zeatina (Z-N6-(4hidroxi-isopentil-adenina)
- DAPI - 4',6-diamidino-2-fenilindol
- di-GMPc - diguanilato monofosfato cíclico
- DMAPP - dimetil-alil pirofosfato
- EAL - motivo proteico asociado a la degradación del di-GMPc (Glu-Ala-Leu)
- GGDEF - motivo proteico asociado a la síntesis de di-GMPc (Gly-Gly-Asp-Glu-Phe)
- GMPc- guanosin monofosfato cíclico
- GTP - guanosín trifosfato
- HD-GYP - motivo proteico asociado a la degradación del di-GMPc (His-Asp Gly-Tyr-Pro)
- HK - proteínas con actividad de cinasa de histidinas
- HMBPP = 4-hidroxi-3-metil-but-2-enil pirofosfato
- iP - N₆-(Δ 2-isopentil-adenina)
- iPR - ribósido de isopentiladenina
- IPT - proteína con actividad de isopentil transferasa
- KOH - hidróxido de sodio
- NH₄Cl - cloruro de amonio
- PDE - proteínas con actividad fosfodiesterasa
- PGPR - rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (Plant Growth Promoting Rhizobacteria)
- tZ- trans zeatina (E-N6-(4hidroxi-isopentil) adenina)
- WT - cepa silvestre (wild type)

Resumen

Las citocininas son un grupo de fitohormonas que se empezaron a investigar a inicios de la década de los 50s y fueron descritas con base a su capacidad de promover la división y diferenciación celular en raíces y brotes (Akhtar et al., 2019; Asami & Nakagawa, 2018; Santner et al., 2009). Actualmente, el papel de las citocininas en la fisiología vegetal está descrito y sus mecanismos bien estudiados, pero a pesar de ser clasificadas como fitohormonas, las citocininas son evolutivamente más ancestrales que las propias plantas y se encuentran presentes en bacterias, amebas, hongos, algas, nematodos, insectos y hasta mamíferos, lo que las convierte en una clase de moléculas de bajo peso molecular altamente conservadas en varios organismos (Akhtar et al., 2019; Fathy et al., 2022; Frébortová & Frébort, 2021). En cuanto a las bacterias, se ha asociado la capacidad de producir citocininas con comportamientos patógenos, como en el caso de *Agrobacterium tumefaciens* que utiliza las citocininas para redirigir el flujo de nutrientes hacia el sitio de infección lo que también propicia un crecimiento “canceroso” de las células vegetales (Akiyoshi et al., 1984; Sakakibara et al., 2005). Sin embargo, los estudios sobre el papel que juegan las citocininas provenientes de bacterias promotoras del crecimiento vegetal son escasos (Zhao et al., 2001; Podlešáková et al., 2013; Frébortová et al., 2017; Wei et al., 2023;). En el presente trabajo se dispuso estudiar los efectos que pudiera tener la presencia de citocininas exógenas en los fenotipos de movilidad y formación de biopelícula de la bacteria promotora del crecimiento vegetal *Azospirillum baldaniorum* Sp 245. Igualmente, se evaluó la posibilidad de que la bacteria fuera capaz de detectar a la fitohormona como un quimioatrayente. Los resultados experimentales del presente trabajo indican que concentraciones de la citocinina isopentiladenina en el rango micromolar generan un efecto tóxico en la célula bacteriana, mermando la movilidad y la capacidad de producir biopelícula, mientras que concentraciones sub-micromolares no generan un efecto detectable en las células. De igual manera, los resultados muestran que la bacteria *Azospirillum baldaniorum* Sp 245 no es capaz de detectar a la isopentiladenina como señal quimiotáctica. Adicionalmente, se llevó a cabo la búsqueda de genes implicados en el metabolismo de citocininas en el

genoma del modelo biológico antes mencionado, utilizando la plataforma BLAST del National Center for Biotechnology Information (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Dicho análisis permitió localizar genes presuntamente relacionados con la síntesis y activación de citocininas.

1) *Azospirillum* spp.

Las Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal, PGPR por sus siglas en inglés, son un grupo de bacterias capaces de entablar una estrecha relación con la raíz de las plantas y estimular el crecimiento de éstas (Esquivel-Cote et al., 2010; Turan et al., 2012). *Azospirillum* es uno de los géneros más estudiados por su asociación con raíces de cereales, leguminosas y hortalizas de importancia comercial (Caballero-Mellado, 1993; Cassán & Diaz-Zorita, 2016).

El género *Azospirillum* pertenece a las alfa-proteobacterias y está compuesto por células gram negativas capaces de fijar nitrógeno y de morfología pleomórfica. El género existe en vida libre con una morfología vibroide de alta movilidad y como una bacteria inmóvil de morfología ovoide (Caballero-Mellado, 1993; Fibach-Paldi et al., 2012). El efecto sobre el crecimiento vegetal que exhibe este género ha sido atribuido a un mecanismo multifactorial debido a su capacidad de fijar nitrógeno, solubilizar fosfatos, secretar sideróforos y producir fitohormonas como ácido indol-3-acético, giberelinas, etileno y citocininas (Esquivel-Cote et al., 2010; Fibach-Paldi et al., 2012).

Para que *Azospirillum* pueda ejercer sus efectos benéficos es indispensable que colonice la superficie rizosférica para formar una biopelícula que tan solo por su estructura permite el flujo de agua y nutrientes hacia todas las partes de la biopelícula y la superficie de la raíz. Por lo tanto, es de vital importancia que *Azospirillum* sea capaz de ubicar un nicho adecuado para su desarrollo. Para lo cual *Azospirillum* cuenta con flagelos polares y peritricos que le permiten trasladarse hacia la rizosfera y un sofisticado sistema de quimiotaxis que rige su movilidad y que es capaz de responder a los exudados radiculares como una señal quimioatrayente (O'Neal et al., 2020).

Los fenotipos antes mencionados que permiten la dispersión y formación de biopelículas se encuentran globalmente regulados por el segundo mensajero diguanilato cíclico, di-GMPc (McDougald et al., 2012). Este es un dinucleótido cíclico sintetizado a partir de dos moléculas de guanosín trifosfato por medio de enzimas diguanilato ciclasas, DGC, que cuentan con un motivo GGDEF (Gly-Gly-Asp-Glu-Phe). Por otro lado, la degradación de di-GMPc a su forma lineal, pGpG, se lleva a cabo por enzimas fosfodiesterasas, PDE, con dominio catalítico EAL o HD-GYP (Dias da et al., 2020; Galperin, 2004).

La creciente concentración intracelular de di-GMPc regula la transición del estilo de vida de *Azospirillum*, de esta manera bajas concentraciones de este mensajero establecen un fenotipo móvil y capaz de sensar su entorno en busca de un nicho ecológico favorable como la superficie rizosférica y anclarse a ella. Conforme la concentración de di-GMPc aumenta la célula adopta un estilo de vida sésil y comienza a expresar rasgos que le permiten establecer una relación mutualista con la raíz de la planta. Principalmente mediante el establecimiento de una biopelícula distribuida a lo largo de la raíz. En este estado las células son propensas a secretar exopolisacáridos y otras sustancias poliméricas que darán estructura al conglomerado de bacterias, además de producir sustancias que regulan el crecimiento vegetal como fitohormonas (Dias da et al., 2020).

2) Citocininas

Las citocininas son un grupo de fitohormonas que se empezaron a investigar a inicios de la década de los 50s y fueron descritas con base a su capacidad de promover la división y diferenciación celular en raíces y brotes (Akhtar et al., 2019; Asami & Nakagawa, 2018; Santner et al., 2009). Actualmente, el papel de las citocininas en la fisiología vegetal está descrito y sus mecanismos bien estudiados. Se les ha relacionado principalmente con la formación y mantenimiento de los meristemos apicales de la raíz y los tallos, movilización de nutrientes, desarrollo floral y del fruto, senescencia foliar, germinación y otros procesos como la acumulación de clorofila, la dominancia apical, proliferación radicular, inmunidad e interacción con el microbioma (Akhtar et al., 2019; Asami & Nakagawa, 2018; Fathy et al., 2022; Hirose et al., 2008; Lindner & Schwartzberg, 2016; Santner et al., 2009). También se describió que las citocininas están relacionadas con la resistencia a patógenos en plantas (Akhtar et al., 2019; Lindner & Schwartzberg, 2016). Derivado de su naturaleza como fitohormona, las citocininas estimulan la división, el agrandamiento celular y la expansión de tejido (Akhtar et al., 2019; Fangchun et al., 2013) por lo que el interés por entender cómo funcionan estas hormonas vegetales en un modelo de asociación entre plantas y bacterias productoras de estas moléculas es esencial para mejorar su papel como inoculante en el sector agrícola.

La señalización de citocininas en plantas es similar a los sistemas de doble componente que normalmente se encuentran en bacterias (Asami & Nakagawa, 2018). En estos sistemas de doble componente, las citocininas son detectadas por un receptor tipo histidina cinasa (HK; histidine kinase, acrónimo del inglés) que cuenta con un dominio CHASE que reconoce a la citocinina y promueve la interacción del receptor con su regulador de respuesta (Asami & Nakagawa, 2018; Lindner & Schwartzberg, 2016; Santner et al., 2009). En *Arabidopsis* los reguladores de respuesta (RR, response regulator, acrónimo del inglés) se dividen en dos categorías: RR tipo B que funcionan como factores de la transcripción y regulan positivamente la señalización de citocininas; los RR tipo A regulan negativamente la señalización de citocininas y son regulados transcripcionalmente por RR-B (Naseem et al., 2014).

Las citocininas estructuralmente representan derivados de adenina de bajo peso molecular con sustituyentes isoprenoides o aromáticos en la posición N6 (Ilustración 1) (Fathy et al., 2022; Frébortová & Frébort, 2021; Lindner & Schwartzberg, 2016; Santner et al., 2009). Las citocininas más estudiadas hasta la fecha son la isopentiladenina (iP), la trans-zeatina (tZ) y la kinetina, principalmente por su abundancia en la cantidad total de citocininas producidas por las plantas. A pesar de ser clasificadas como fitohormonas, las citocininas son evolutivamente más ancestrales que las propias plantas y se encuentran presentes en bacterias, amebas, hongos, algas, nematodos, insectos y hasta mamíferos, lo que las convierte en una clase de moléculas de bajo peso molecular altamente conservadas en varios organismos (Akhtar et al., 2019; Fathy et al., 2022; Frébortová & Frébort, 2021).

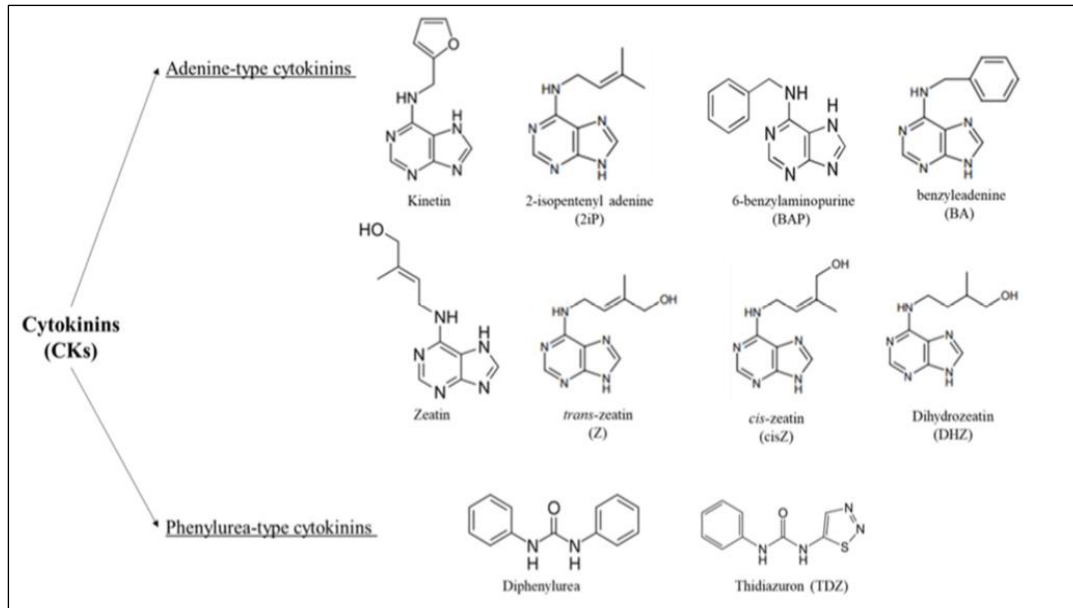


Ilustración 1. Estructura química de las citocininas. (Fathy et al., 2022).

Como se espera de una fitohormona, la actividad de las citocininas está bien documentada en plantas, por lo cual en la última década se ha investigado el efecto de las citocininas en diversos organismos. Fathy y cols. (2022) hacen un breve resumen de estas novedosas propiedades. En su trabajo, describen la actividad antioxidante, antienvjecimiento, anticancerígena, neuroprotectora y antiinflamatoria de las citocininas, aunque la evidencia aun es algo escasa.

2.1) Biosíntesis y activación de citocininas.

Las citocininas se sintetizan en raíz y en los meristemas de las partes aéreas. Mas específicamente, las citocininas tipo trans-zeatina (*tZ*) son sintetizadas en la raíz y transportadas a las flores y hojas de la planta a través del xilema. Por otro lado, las citocininas tipo isopentiladenina (*iP*) se forman principalmente en las hojas y se movilizan al resto de la planta a través del floema (Lindner & Schwartzenberg, 2016).

La biosíntesis de las citocininas, N⁶-(2-isopentil)-adenina (*iP*) y cis/trans-zeatina (*cZ/tZ*), se puede dar a través de dos vías diferentes tal como se muestra en la ilustración 2. En ambos casos la síntesis inicia con la adición de un grupo prenilo en el átomo N⁶ del grupo amino de ya sea nucleótidos de adenina libres (AMP, ADP o ATP) o de nucleótidos de adenina ubicada en el extremo 3' inmediato al codón UNN en ARNt. Esta prenilación se da a través de la acción de dos enzimas diferentes del tipo dimetilalil transferasa (Kieber & Schaller, 2014; Lindner & Schwartzenberg, 2016; Frébortová & Frébort, 2021).

La primera vía descrita es la vía *de novo* o vía directa, ésta utiliza AMP, ADP o ATP como sustrato junto con (DMAPP) como donador del grupo prenilo para sintetizar las formas mono-, di- y tri-fosfatadas de la isopentiladenina-ribósido (*iPRMP*: isopentil

adenosina monofosfato, iPRDP: isopentenil adenosina difosfato, iPRTP: isopentenil adenosina trifosfato). Esta primera reacción es catalizada por la enzima isopentenil transferasa, IPT. Estos iPR pueden ser posteriormente hidroxilados por el citocromo P450 monooxigenasa para formar los ribósidos mono-, di- y trifosfatos de trans-zeatina. Adicionalmente, la tZ puede ser directamente sintetizada si la IPT utiliza HMBPP como donador del grupo prenilo. Los iPR fosfatados son posteriormente convertidos directamente a su forma de base libre (isopentiladenina) por acción de la fosforibohidrolasa específica de citocininas también conocida como “lonely guy” o LOG. Esto último también aplica para la formación de las bases libres de trans-zeatina. A este proceso de liberación de las bases libres se le conoce como activación, pues son las bases libres de estas citocininas, y no sus precursores ribósidos, los que presentan la mayor actividad hormona (Hirose et al., 2008; Kieber & Schaller, 2014; Lindner & Schwartzberg, 2016; Frébortová & Frébort, 2021)

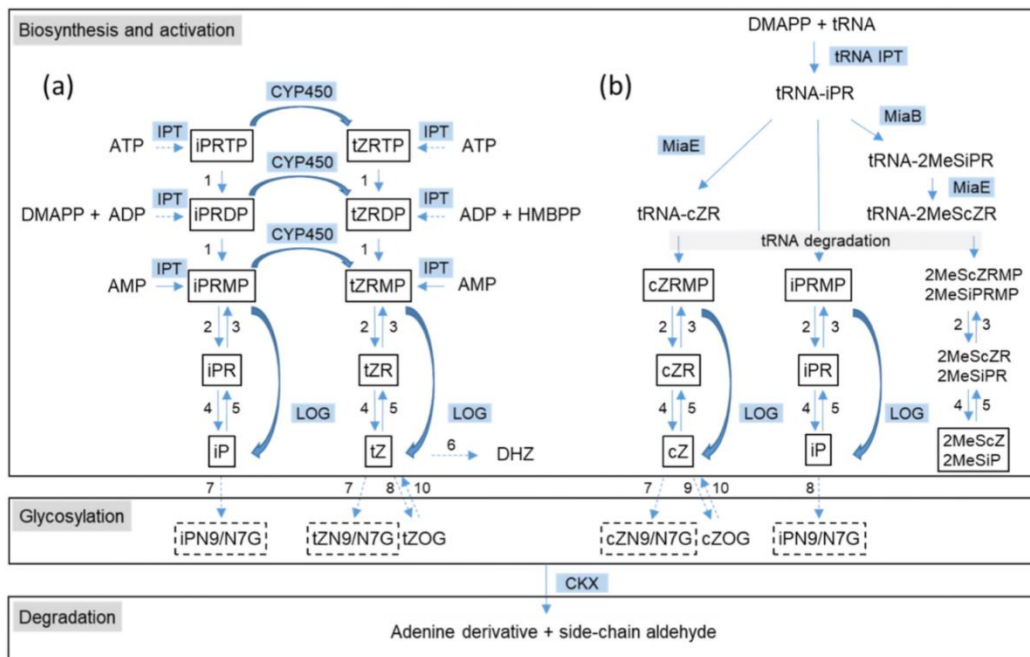


Ilustración 2. Vías de síntesis de las citocininas (Frébortová & Frébort, 2021).

La segunda vía de biosíntesis de las citocininas corresponde a la vía dependiente de ARNt. Esta vía inicia con la actividad catalítica de la enzima isopentil transferasa de ARNt, IPT-ARNt (MiaA), la cual utiliza dimetil-alil difosfato y ARNt que reconoce al codón UNN para modificar un residuo de adenina en su N6 con un grupo prenilo para formar iPR ligado a ARNt (iPR-ARNt). Este residuo modificado del ARNt puede ser escindido en forma de iPRMP por el proceso natural de degradación del ARNt y formar iP libre en última instancia. Este residuo de isopentenil adenina también puede ser modificado por la enzima MiaB que agrega un grupo metiltiol al carbono 2 de la isopentiladenina unida a ARNt para formar 2MeSiP unida a ARNt, que en última instancia formará 2-metiltiol isopentiladenina al ser escindida del ARNt. Alternativamente, el grupo isopentilo puede ser hidroxilado por la enzima MiaE para

formar 2-metilol *cis*-zeatina unida a ARNt, la cual posteriormente puede ser liberada del ARNt (Hirose et al., 2008; Kieber & Schaller, 2014; Frébortová & Frébort, 2021).

En plantas la vía principal de producción de citocininas es la vía directa, la cual también está presente en algunos organismos procariotas que se relacionan con plantas como *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas savastanoi*, *Rhodococcus fascians*, *Erwinia herbicola* y el género *Xanthomonas*. Sin embargo, una gran mayoría de microorganismos gram negativos que también son capaces de sintetizar iP lo hacen a través de la vía dependiente de ARNt (Gray et al., 1996 ;Deb et al., 2021).

2.2) Citocininas bacterianas

A pesar de que las citocininas son consideradas fitohormonas por su amplio rango de efectos en el crecimiento y desarrollo de organismos vegetales, la primera enzima con actividad de isopentenil transferasa y con capacidad demostrada de producción citocininas, fue Tzs (del inglés *trans-zeatin syntethizing*) de *Agrobacterium tumefaciens* (Akiyoshi et al., 1984; Barry et al., 1984). Codificados en la región T-DNA del plásmido Ti de *A. tumefaciens* se encuentran genes relacionados con la síntesis de citocininas y auxinas. La región T-DNA de *A. tumefaciens* es introducida en el genoma nuclear vegetal, lo que propicia altos niveles hormonales en el tejido infectado. Este desbalance hormonal es el responsable de inducir la formación de tumores en plantas (Sakakibara et al., 2005). *Rhodococcus fascians* es otro ejemplo de un microorganismo fitopatógeno que se vale de la producción de citocininas para provocar la sintomatología en su huésped. Al contrario de *Agrobacterium*, *Rhodococcus* es un Gram positivo del cual no se ha podido demostrar que sea capaz de transformar genéticamente a su planta huésped como si lo hace *Agrobacterium*. Sin embargo, *Rhodococcus* hace uso de su plásmido lineal pFiD188 donde se encuentra el operón *fas* asociado al metabolismo de citocininas (Stes et al., 2013). Se ha sido reportado que *R. fascians* D188 produce cinco citocininas: iP, cZ, tZ, 2MeScZ y 2MeStZ. Sin embargo, estas mismas citocininas, mas 2MeSiP, también fueron encontradas, aunque en menor concentración, en una cepa D188 no patógena que carecía del plásmido pFiD188 (Pertry et al., 2009).

En cuanto al rol de las citocininas en la fisiología de bacterias patógenas, se demostró en el modelo uropatógeno *E. coli* UT189, mediante la generación de una cepa mutante en *miaA*, que este gen está relacionado no solamente con los efectos secundarios derivados de la falta de modificación en los ARNt blanco de *miaA* provocando corrimientos en el marco de lectura al momento de la traducción, sino que también está involucrado en los fenotipos de movilidad y formación de biopelícula. Aunque no está claro si estos efectos sobre la movilidad y la formación de biopelícula se derivan de los problemas traduccionales por esta falta de modificaciones en los ARNt blancos de *miaA* o por la ausencia de la isopentiladenina (Fleming et al., 2022).

2.3) Papel de las citocininas en la interacción bacteria-planta

Las citocininas son consideradas fitohormonas, aunque actualmente se sabe que diversos organismos son capaces de sintetizar citocininas, desde bacterias tanto patógenas como promotoras del crecimiento vegetal, hasta hongos, insectos y mamíferos (Gray et al., 1996; Akhtar et al., 2019; Fathy et al., 2022). En el caso de las

bacterias es interesante hacer notar que diferentes grupos han desarrollado la habilidad de producir citocininas con fines opuestos. Las bacterias patógenas se valen de la síntesis de citocininas para movilizar nutrientes a la zona de infección y alterar la respuesta inmune de la planta. El fitopatógeno *Agrobacterium* cuenta con un plásmido que codifica para proteínas que sintetizan citocininas y que provocan en la planta el desarrollo de tumores (Sakakibara et al., 2005; Akiyoshi et al., 1984; Hwang et al., 2013). Por otro lado, también ha sido documentado el caso de bacterias que aportan algún beneficio a la planta a través de la producción de citocininas que promueven la división celular y que en tiempos más recientes han sido relacionadas con la activación de la respuesta inmune de la planta (Esquivel-Cote et al., 2010; Giron et al., 2013; Naseem et al., 2014; Akhtar et al., 2019). Por estas observaciones es que se ha propuesto en varios trabajos que la relación entre el comportamiento patógeno y simbiótico que promueven las citocininas de origen bacteriano en sus huéspedes, responde más bien a la concentración de citocininas a los cuales la bacteria es capaz de exponer a la planta. Asociado con el comportamiento patógeno se suelen encontrar altas concentraciones de citocininas, comúnmente en el rango micromolar. Por otro lado, aquellos organismos que interactúan de manera benéfica con las plantas presentan niveles de citocininas mucho más modestos, regularmente en el rango nanomolar (Podlešáková et al., 2013; Wei et al., 2023).

2.4) *Azospirillum* y citocininas

Como se ha mencionado anteriormente, *Azospirillum* cuenta con una amplia gama de mecanismos que abonan en conjunto para obtener un crecimiento vegetal aumentado en cultivos agrónomicamente importantes. Entre estos mecanismos está su capacidad de producir y secretar sustancias que estimulan el crecimiento de las plantas, como fitohormonas. Entre ellas la más estudiada ha sido el ácido indol acético, una auxina producida por *Azospirillum* en grandes cantidades, sin embargo, también existe evidencia de síntesis de giberelinas, etileno y citocininas (Strzelczyk et al., 1994; Cassán et al., 2014). Se ha documentado el efecto promotor que inducen las citocininas en el crecimiento vegetal. (Zaheer et al., 2022) compararon los efectos sobre el crecimiento vegetal al inocular el trigo con dos cepas de *Azospirillum* no identificadas, una con una alta capacidad de producción de citocininas y otra con una baja capacidad. Las plantas de trigo inoculadas con la variante productora de citocininas dieron un mejor rendimiento que la inoculación con la variante no productora y los controles. En otro ejemplo, (Esquivel-Cote et al., 2010), observaron resultados similares a los de Zaheer al inocular tomates con *Azospirillum lipoferum* AZm5 y *A. brasilense* VS9, que producen altos y bajos niveles de citocininas, respectivamente. Por otro lado, Méndez-Gómez et al. en 2021 demostraron que *Azospirillum* es capaz de evocar la señalización asociada a citocininas en plantas de *Arabidopsis* y promover un crecimiento independiente de auxinas, indicando una posible comunicación bacteria-planta asociada a citocininas (Méndez-Gómez et al., 2021).

3) Antecedentes.

Como ya se ha mencionado anteriormente, los efectos que la isopentenil adenina ejerce sobre organismos vegetales, ya sea endógena o exógena, ya han sido ampliamente estudiados. Sin embargo, respecto a la actividad que pudieran ejercer las citocininas sobre la fisiología de la bacteria se ha descrito muy poco. Adicionalmente, el efecto del AIA como una molécula señal en *Azospirillum baldaniorum* Sp 245 ya ha sido reportado (Van Puyvelde et al., 2011), por lo que resulta interesante preguntarse si las citocininas también juegan una función como moléculas señal en *Azospirillum*.

En 2017 Wang y cols. describieron en el modelo fitopatógeno *Xanthomonas campestris* un receptor tipo histidina cinasa, PcrK, que forma parte de un sistema de doble componente. Demostraron que PcrK se une de manera específica a la iP, provocando un importante descenso de la actividad autocinasa. PcrK es un receptor tipo cinasa histidínica híbrida, que en el extremo amino terminal contiene un dominio sensor CHASE ubicado en el periplasma. PcrK modula los niveles de fosforilación de su regulador de respuesta, PcrR mediante un mecanismo de fosforelevo. Cuando PcrR se encuentra fosforilado presenta actividad fosfodiesterasa a través del dominio tipo HD-GYP que degrada el di-GMPc. Este segundo mensajero está principalmente involucrado en la expresión de fenotipos normalmente asociados con virulencia como la movilidad, quimiotaxis y la capacidad de formar biopelícula. En presencia de concentraciones fisiológicas de iP, la actividad autocinasa de PcrK disminuye de manera importante. Debido a esto la actividad fosfodiesterasa de PcrR también se atenúa, por lo que se promueve la acumulación de di-GMPc lo cual fomenta el agregado celular y baja movilidad. Se reportó también un defecto de crecimiento en las cepas mutantes carentes del dominio CHASE del gen *pcrK*. Sin embargo, no observaron efecto sobre el crecimiento al adicionar iP (Wang , Fang-Fang et al., 2017).

3.1) Antecedentes directos.

En el laboratorio de interacción bacteria-planta Cruz-Pérez et al. caracterizaron la proteína CdgD (2021) de *Azospirillum baldaniorum* Sp 245. Esta es una proteína híbrida asociada a membrana con dominios de diguanilato ciclase y fosfodiesterasa (GGDEF y EAL). Adicionalmente, CdgD cuenta con dos dominios transmembranales que flanquean un dominio CHASE periplásmico. En su porción citoplasmática, CdgD cuenta con un dominio PAS además de los dominios GGDEF y EAL. Se observó una identidad del 25% entre las secuencias de los dominios CHASE de CdgD y PcrK. Al llevar a cabo la generación de un modelo estructural del dominio CHASE de CdgD utilizando la estructura de PcrK como molde, se mostró un buen grado de empalme estructural contando incluso con el mismo número de láminas beta y alfa hélices por lo que se le reconoció como un homólogo estructural (Cruz Pérez et al., 2021). Sin embargo, aún no se conoce si el dominio CHASE participa en la activación del dominio DGC y PDE y cuál es la molécula que reconoce para activar esta señal.

Cortés Sotres en 2021 mediante análisis de docking con el modelo del dominio CHASE de CdgD encontró a la iP como probable ligando del mismo, indicio de una posible interacción entre el dominio CHASE de CdgD y la iP. Adicionalmente, ubicó en el genoma de *A. baldaniorum* Sp 245 cinco genes que codifican para proteínas que

presentan en su estructura el dominio CHASE. Entre estas proteínas con dominio CHASE se encuentran dos proteínas guanilato ciclasas (una en el cromosoma principal y otra en el plásmido 5), dos proteínas con un dominio HisKA de dimerización y fosfotransferencia y un dominio HATPase con actividad hidrolasa de ATP, ambas en el cromosoma principal. También se localizó una proteína con un dominio único HATPase en el plásmido 3. Todas las proteínas mencionadas cuentan con dominios transmembranales (Cortés Sotres, 2021).

4) Justificación

En plantas ya se ha descrito el mecanismo de acción de las citocininas, la forma en que interactúan con su receptor y como ésta interacción regula redes de señalización (Argueso et al., 2010; Lomin et al., 2012). Por otro lado, la información disponible en la literatura sobre citocininas de origen bacteriano se centra en citocininas de origen fitopatógeno y su efecto sobre las plantas, pero dejando de lado el efecto que tienen en la fisiología de la propia bacteria que las produce. De manera similar, la información sobre las citocininas producidas por PGPBs y su papel en la interacción bacteria-planta se enfoca en el efecto que estas tienen sobre la planta y no sobre la propia bacteria. En general, la información sobre la influencia de las citocininas en la fisiología bacteriana es escasa, especialmente en el caso de citocininas provenientes de PGPRs. El caso de PrcK de *X. campestris* es el único ejemplo de sistemas que reconocen a la citocinina iP en bacterias (Wang , Fang-Fang et al., 2017). Aunado a lo anterior, también existen reportes en la literatura que evidencian la producción de citocininas en el género *Azospirillum* (Tien et al., 1979; Cacciari et al., 1989; Strzelczyk et al., 1994; Cassán et al., 2014; Kaminek & Conrad, 2014; Zaheer et al., 2022). En este trabajo se propuso evaluar si la presencia de iP tiene un efecto sobre los fenotipos de crecimiento, movilidad, quimiotaxis y formación de biopelícula en la cepa silvestre *Azospirillum baldaniorum* Sp 245.

5) Hipótesis

La adición de iP en *A. baldaniorum* Sp 245 tiene efecto sobre la movilidad, la formación de biopelícula y la quimiotaxis.

6) Objetivos

6.1) Objetivo general

Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de la citocinina, isopentiladenina, sobre los fenotipos de crecimiento, formación de biopelícula, movilidad y quimiotaxis de *Azospirillum baldaniorum* Sp 245.

6.2) Objetivos específicos

- Realizar la búsqueda de probables genes relacionados con la síntesis y metabolismo de citocininas por métodos bioinformáticos.
- Analizar si *Azospirillum baldaniorum* Sp 245 cuenta con la capacidad de usar la isopentiladenina como fuente de carbono o nitrógeno realizando ensayos de crecimiento celular utilizando medio sin fuente de carbono o nitrógeno y en su lugar adicionado con iP.
- Realizar ensayos de quimiotaxis de *Azospirillum baldaniorum* Sp 245 a diferentes concentraciones de iP.
- Analizar la movilidad de *Azospirillum baldaniorum* Sp 245 a diferentes concentraciones de iP.
- Cuantificar la formación de biopelícula de *Azospirillum baldaniorum* Sp 245 en presencia de diferentes concentraciones de iP.
- Cuantificar el crecimiento de *Azospirillum baldaniorum* Sp 245 en presencia de diferentes concentraciones de iP realizando curvas de crecimiento.

7) Materiales y reactivos

7.1) Cepas

En el presente trabajo se utilizó la cepa *Azospirillum baldaniorum* Sp 245.

7.2) Medios

- Medio K-Malato
- Medio Difco
- Medio Rojo congo

7.3) Soluciones y reactivos

- Solución stock de isopentiladenina. La isopentiladenina (Sigma®) fue disuelta a una concentración de 5 mM. La cantidad de fitohormona fue disuelta en una solución esterilizada por filtración de KOH 0.05N.
- Solución stock 15mM de DAPI para ensayos de fluorescencia.
- Solución stock 1.5mM de yoduro de propidio disuelto en agua bidestilada estéril.
- Buffer de fosfatos 1x ph=7.0, para lavado de células.
- Buffer de Quimiotaxis para ensayos de quimiotaxis.

8) Metodología

8.1) Búsqueda de genes asociados a vías biosintéticas de citocininas en varias plataformas.

La estrategia para buscar los genes asociados a las vías de novo y dependientes de ARNt se basó en búsquedas en la base de datos BLAST (Basic Locals Alignment Search Tool), en la plataforma del National Center for Biotechnology Information, NCBI. Para elegir las secuencias de proteínas que se usaron como templatado se realizó una búsqueda en la plataforma de UniProt (<https://www.uniprot.org/>). Se seleccionaron aquellas secuencias que hayan sido caracterizadas ya sea estructural o funcionalmente, ambas en algunos casos: IZT (*izt*, *ipt*, *tmr*, UniProt code: P0A3L6) de *A. tumefaciens* str. T37 ; MiaA (GenBank: NP_418592.1, PDB-ID:2ZXU, Uniprot code: P16384) de *E. coli* K12 substr. MG1655; de MiaB (GenBank: NP_415194.1, Uniprot code: P0AEI1) de *E. coli* K12 substr. MG1655 y LOG3 (GenBank: OAP11691.1, Uniprot code: Q8L8B8) de *Arabidopsis thaliana*. Con estas secuencias se llevó a cabo una segunda búsqueda de tipo BLAST en el genoma de *A. baldaniorum* Sp 245 para encontrar genes con homología a las secuencias query. Posteriormente se validaron los resultados obtenidos analizando las secuencias obtenidas del genoma de *A. baldaniorum* Sp 245 en bases de datos de análisis de dominios conservados (Pfam: <http://pfam.xfam.org/>, InterPro: <https://www.ebi.ac.uk/interpro/>, CDD: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi> y SMART-EMBL: <http://smart.embl-heidelberg.de/>). Posteriormente se recuperaron las secuencias tanto query como las de *A. baldaniorum* Sp 245 en formato FASTA para generar los alineamientos de secuencias múltiples en la plataforma CLUSTAL Omega (<https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/clustalO>) y posteriormente editados en la plataforma, Múltiple Align Show (https://www.bioinformatics.org/sms/multi_align.html).

8.2) Uso de isopentiladenina como fuente de carbono.

Para probar si la isopentiladenina puede ser usada como fuente de carbono se inocularon tubos con 5 mL de medio K-Malato con una única colonia aislada de placas con medio rojo congo. Este precultivo se dejó crecer por 18 h a 30°C en agitación. Posteriormente se utilizó este precultivo para inocular matraces con 20 mL de medio K-Malato adicionados con isopentiladenina 0.1 mM a una D.O. teórica inicial de 0.01. Los cultivos se incubaron a 30°C en agitación y la densidad óptica fue medida a las 24 y 48 h. Las concentraciones de iP usadas en este experimento replican los moles de carbono que se encuentran en la formulación de medio K-Malato (tabla 1).

8.3) Uso de isopentiladenina como fuente de nitrógeno.

Para verificar si la isopentiladenina puede ser usada como fuente de nitrógeno se inocularon tubos con 5 mL de medio K-Malato con una única colonia aislada de placas con medio rojo congo. Este precultivo se dejó crecer por 18 h a 30°C en agitación. Se determinó la densidad óptica del medio a 600 nm y se inocularon tubos con 5mL de medio base K-malato con y sin fuente de nitrógeno como control y medio base K-malato sin NH₄Cl pero adicionado con isopentiladenina 0.1mM como sustituyente del NH₄Cl. Estos fueron incubados por 48 h a 30°C en agitación. Adicionalmente también se incubaron tubos con medio K-Malato sin nitrógeno y medio K-Malato sin nitrógeno y

adicionado con isopentiladenina 0.1 mM por 48 h a 30°C en condiciones estáticas. Se tomaron muestras a las 24 y 48 h para determinar el crecimiento por densidad óptica. Las concentraciones de iP usadas en este experimento replican los moles de nitrógeno que se encuentran en la formulación de medio K-Malato (tabla 1).

8.4) Ensayos de quimiotaxis.

Partiendo de una placa de medio rojo Congo con aislado de la cepa *A. baldaniorum* Sp 245, se inoculó una única colonia aislada en 5 mL de medio mínimo K-Malato. Este precultivo fue incubado por 18 h en agitación a 30°C. Posteriormente se utilizó el precultivo para inocular 150 mL de medio K-Malato a una D.O. inicial de 0.01 y se dejó crecer por aproximadamente 18 h hasta que el medio alcanza una D.O. de entre 1.2-1.5. De este cultivo se centrifugó el volumen suficiente para obtener una suspensión bacteriana con una D.O. teórica de 1.2 en 25 mL, esto para obtener un duplicado de cada grupo evaluado. El pellet del volumen de cultivo centrifugado fue posteriormente lavado tres veces con buffer de quimiotaxis y finalmente resuspendido en 25 mL del mismo buffer. Esta suspensión bacteriana se diluyó 1:1 con buffer de quimiotaxis adicionado con agar suave (0.5%) para una concentración final de agar de 0.25% y una D.O. teórica final de 0.6. La suspensión bacteriana fue teñida con 50 µL de una solución al 10% (w/v) de rojo de fenol para facilitar la visualización del halo de quimiotaxis. Por último, los 50 mL de suspensión bacteriana con agar suave fue vertida en dos placas que contenían un plug de buffer de quimiotaxis con agar 1.0% y adicionado con los diferentes quimioattractantes a evaluar. Las placas fueron incubadas a 30°C por 24 h. Como control positivo se utilizaron discos de agar adicionados con K-Malato 34 mM, como control negativo se utilizó un plug de buffer sin nada adicional y los plugs para los grupos experimentales fueron adicionados con diferentes concentraciones de isopentiladenina.

8.5) Ensayos de movilidad.

Para evaluar el efecto de la iP sobre la movilidad de tipo natatoria se partió de una placa de medio Rojo Congo con aislados de la cepa *A. baldaniorum* Sp 245. Se inoculó una única colonia aislada en 5 mL de medio rico MD, este precultivo se dejó crecer por 18 h a 30°C en agitación. Posteriormente, se utilizó al precultivo para inocular otros 5 mL de medio MD a una densidad óptica inicial de 0.01 y se dejó crecer a 30°C hasta alcanzar una densidad óptica de 0.5 o aproximadamente 20×10^6 UFC/mL. Al llegar a esta densidad óptica se determinan las UFCs y se inoculan 5 µL del cultivo en el centro de una placa con medio mínimo base-K y agar suave (0.25%) adicionada con diferentes concentraciones de iP. Las placas se incubaron a 30°C y los halos de desplazamiento fueron medidos a las 24 y 48 h. El grupo control usado fue la misma cepa inoculada en el mismo medio, pero sin citocininas y adicionado únicamente con un volumen de solución de KOH 0.05 N igual al de la placa adicionada con el mayor volumen de solución de isopentiladenina usado en el grupo experimental.

8.6) Formación de biopelícula.

Para cuantificar la formación de biopelícula en presencia y ausencia de iP se empleó la técnica de Cristal Violeta. Para esto se creció la cepa WT en cultivo líquido MD por 18 h a 30°C. Posteriormente, se leyó la densidad óptica del cultivo y se centrifugó el

volumen de medio suficiente para obtener una suspensión bacteriana en buffer de fosfatos 1x pH=7.0, con una densidad óptica teórica de 2.0. Esta suspensión fue usada para inocular placas de ELISA con medio NFb adicionado con isopentiladenina o el vehículo como control. Las placas se dejaron incubar en condiciones estáticas a 30°C por 72 horas. La biomasa adherida fue teñida por 30 min con solución de cristal violeta al 0.5% y el C.V. adherido fue disuelto en ácido acético al 33% para evaluar la densidad óptica a una longitud de onda de 595 nm. Se determinó la cantidad de biomasa por determinación de proteínas totales usando el método de CBB, por lo que se rasparon los pozos dedicados a medir proteínas para obtener todo el crecimiento celular posible disuelto en el medio. Los resultados de biopelícula cuantificados por espectrofotometría fueron normalizados contra el crecimiento total bacteriano medido como proteínas totales (mg/mL).

8.7) Curva de crecimiento bacteriano.

Se llevó a cabo la determinación de curvas de crecimiento de la cepa *A. baldaniorum* Sp 245 en medio K-malato adicionado con concentraciones crecientes de iP (1 pM, 1 nM, 1 µM, 50 µM, 100 µM y 500 µM) y de la misma cepa WT adicionada únicamente con la solución vehículo (KOH 0.05 M) utilizada para preparar las soluciones de isopentiladenina como control. Se partió de una placa de medio Rojo Congo con aislados de la cepa tras 72 horas de crecimiento en condiciones estacionarias y a 30°C, se tomó una colonia aislada para inocular 5 mL de medio K-Malato y se dejó incubar por 18 horas a 30°C en agitación. Se determinó la densidad óptica del precultivo y se utilizó para inocular 20 mL de medio K-Malato a una densidad óptica inicial de 0.01. Los cultivos se incubaron a 30°C en agitación y el crecimiento bacteriano fue medido cada dos horas por 20 h a una longitud de onda de 600 nm.

8.8) Ensayos de viabilidad celular.

Para determinar posibles efectos citotóxicos de la isopentiladenina sobre *A. baldaniorum* Sp 245 se realizaron experimentos para analizar células viables y no viables por microscopía de fluorescencia. Para esto se utilizaron cultivos de 24 h en medio K-Malato adicionados con diferentes concentraciones de isopentiladenina y el vehículo como control negativo. Se tomaron muestras de estos cultivos y se tiñeron con los fluoróforos DAPI y yoduro de propidio a una concentración final de 300 nM y 100 nM, respectivamente. Las muestras fueron analizadas en un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse TE2000-U con los filtros apropiados para las longitudes de onda de excitación de los fluoróforos utilizados (excitación de yoduro de propidio: 535 nm y DAPI: 358 nm).

9) Resultados y Discusión

9.1) Análisis bioinformático relacionado a la síntesis de citocininas en *Azospirillum baldaniorum* Sp 245

Para analizar la síntesis de citocininas en *A. baldaniorum* Sp 245, se llevó a cabo la búsqueda bioinformática de los probables genes relacionados con el metabolismo de las citocininas en el genoma de este modelo bacteriano. Para la búsqueda de estos genes en *Azospirillum*, se utilizaron las secuencias de proteínas obtenidas de UniProt (<https://www.uniprot.org/>) que de preferencia contara con algún tipo de reporte que avale su actividad catalítica, para servir como plantillas de búsqueda. Las proteínas elegidas fueron IZT (*izt*, *ipt*, *tmr*, UniProt code: P0A3L6) de *A. tumefaciens* str. T37 ; MiaA (GenBank: NP_418592.1, PDB-ID:2ZXU, Uniprot code: P16384) de *E. coli* K12 substr. MG1655; de MiaB (GenBank: NP_415194.1, Uniprot code: P0AE11) de *E. coli* K12 substr. MG1655 y LOG3 (GenBank: OAP11691.1, Uniprot code: Q8L8B8) de *Arabidopsis thaliana*.

9.1.1) Genes *ipt*

Para realizar la búsqueda de probables genes que codifiquen para proteínas con actividad isopentenil transferasa (IPT) dependiente de adenilato, se utilizó como base a la proteína de 240 a.a. codificada en el plásmido pTi-T37 de *A. tumefaciens* str. T37 (*izt*, *ipt*, *tmr*, UniProt code: P0A3L6) (Barry et al., 1984). De esta búsqueda se localizó un gen en el cromosoma de *Azospirillum* que codifica para una presunta proteína de 175 a.a. con dominio IPT (GenBank: WP_103041004.1). El producto de este gen parece no contar con la misma arquitectura de la IPT de *A. tumefaciens* T37. El tamaño del producto proteico del gen tipo *ipt* encontrado en *Azospirillum* es menor al de *Agrobacterium*. Además, el dominio IPT abarca tan solo un 30% de la secuencia total del gen encontrado, mientras que este mismo dominio se dispone a lo largo de toda la secuencia del producto del gen *izt* de *Agrobacterium*. Como se muestra en la ilustración 3.

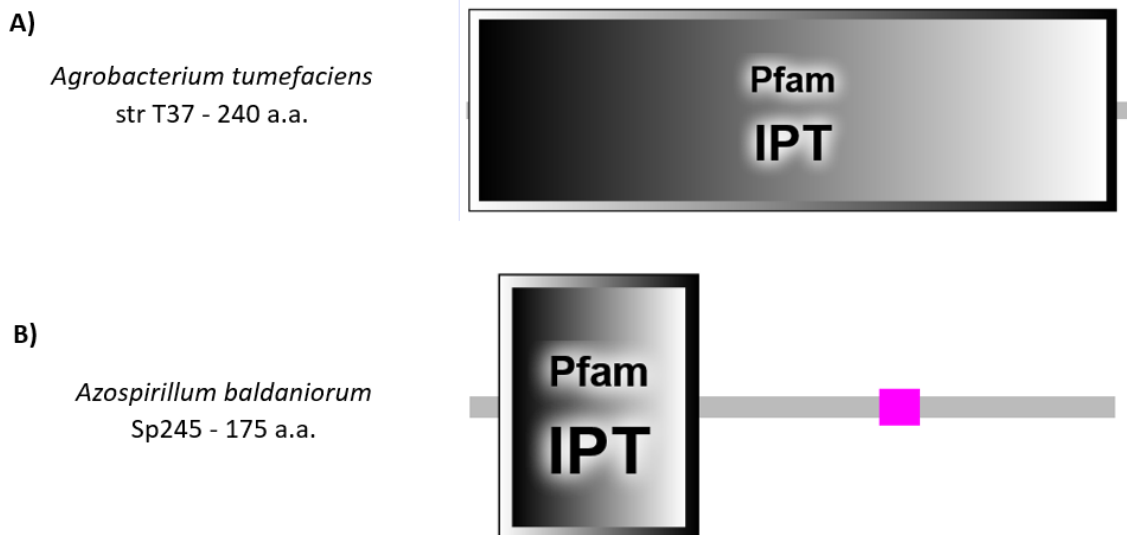


Ilustración 3. Gen *izt* de *A. tumefaciens* T37 y gen *ipt* de *A. baldaniorum* Sp 245.

Tras una búsqueda exhaustiva en las bases de datos de UniProt, CDD y Pfam no se logró dar con algún reporte de una proteína similar a WP_103041004.1. Posteriormente se procedió a buscar la conservación de este probable gen tipo *ipt* a lo largo del género *Azospirillum* y en otros géneros representantes de proteobacterias. De este análisis se obtuvieron secuencias similares en diferentes representantes del género y con las más representativas se generó un alineamiento múltiple de secuencias que se muestra en la ilustración 4. También se encontró esta misma proteína en el género *Caulobacter* y *Mesorhizobium*. Como podemos observar, esta secuencia se encuentra fuertemente conservada en el género *Azospirillum* y guarda un muy bajo porcentaje de identidad con IZT. A pesar de esto, la secuencia conservada GxxxxGK(T/S) asociada a la actividad isopentil transferasa que se encuentra en IZT, también está presente en WP_103041004.1. También se conservan ciertas secuencias además de la anteriormente señalada. Por otro lado, IZT cuenta con una inserción en el extremo carboxilo terminal, que no está presente en las probables IPTs de *Azospirillum*, ni en las probables IPTs de *Caulobacter* y *Mezorhizobium*.

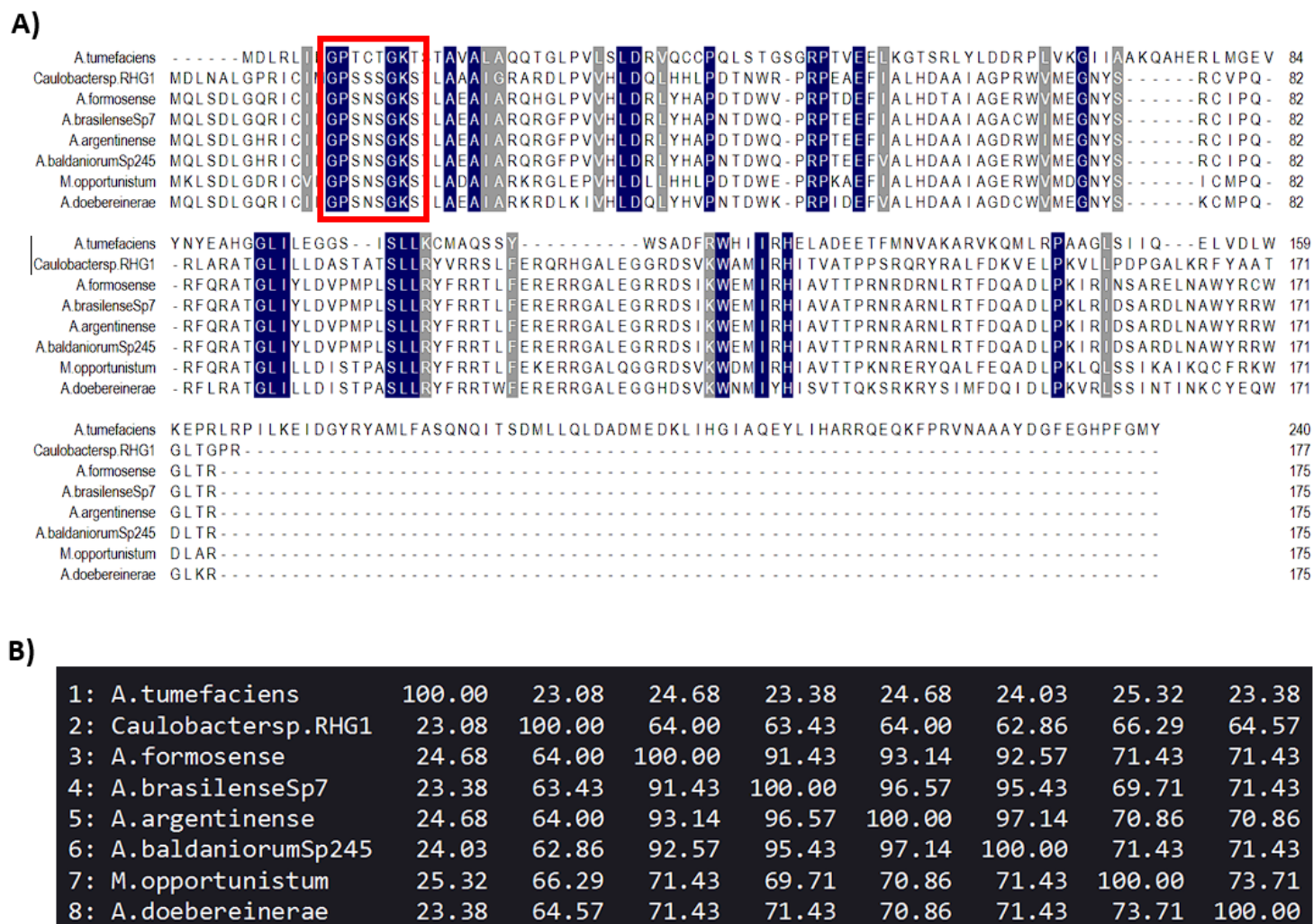


Ilustración 4. Conservación del gen tipo *ipt* a lo largo del género *Azospirillum* y su parecido con IZT de *A. tumefaciens*.

Con esta evidencia no es posible concluir si la probable proteína IPT dependiente de adenilato encontrada en el género *Azospirillum* efectivamente cuenta con dicha actividad enzimática. El análisis de la secuencia de aminoácidos en plataformas de análisis de dominios proteicos, asocian a esta proteína con un probable dominio IPT (SMART-EMBL, PFAM:01745) o la clasifican dentro de la superfamilia de proteínas a las que pertenecen las isopentil transferasas (P-loop NTPasas, CDD: cl38936, InterPro: IPR027417). Sin embargo, InterPro también asoció esta secuencia con un dominio de citidilato cinasa (InterPro: IPR052922), pero es difícil asegurar que esta proteína con dominio IPT de *A. baldaniorum* Sp 245 efectivamente presenta la capacidad de sintetizar citocininas. No obstante, la conservación de residuos importantes sugiere una actividad catalítica como isopentil transferasa.

Es importante tomar en cuenta que las IPTs dependientes de adenilato son escasas entre las bacterias y que son únicamente las bacterias patógenas las que hacen uso de este tipo de ellas para exponer a su huésped a elevados niveles de citocininas, mientras que las bacterias promotoras del crecimiento vegetal suelen contener niveles mucho más bajos de esta hormona para producir efectos benéficos sobre su huésped sin sobre estimularlo (Wei et al., 2023). Por esta razón, no era de esperarse encontrar un gen de esta naturaleza codificado en el genoma de *Azospirillum*. Así pues, resalta haber encontrado una probable isopentil transferasa dependiente de adenilato codificada en el genoma de *Azospirillum*, por lo que resultaría interesante revelar la verdadera identidad catalítica de esta enzima, puesto que cuenta con una secuencia conservada ya asociada a la actividad de las isopentil transferasas aunque no cuenta con la arquitectura típica de estas enzimas.

9.1.2) Gen *miaA*

Para encontrar al gen que codifica para MiaA en *A. baldaniorum* Sp 245 se utilizó como plantilla la secuencia de MiaA de *E. coli* K12 substr. MG1655 (GenBank: NP_418592.1, PDB-ID:2ZXU).

La búsqueda arrojó la secuencia WP_014239992.1 codificada en el cromosoma principal y cuyo producto proteico tiene un tamaño de 330 a.a. y es clasificada como una tRNA A37 isopentenil transferasa MiaA (CDD: COG0324) Ilustración 5.

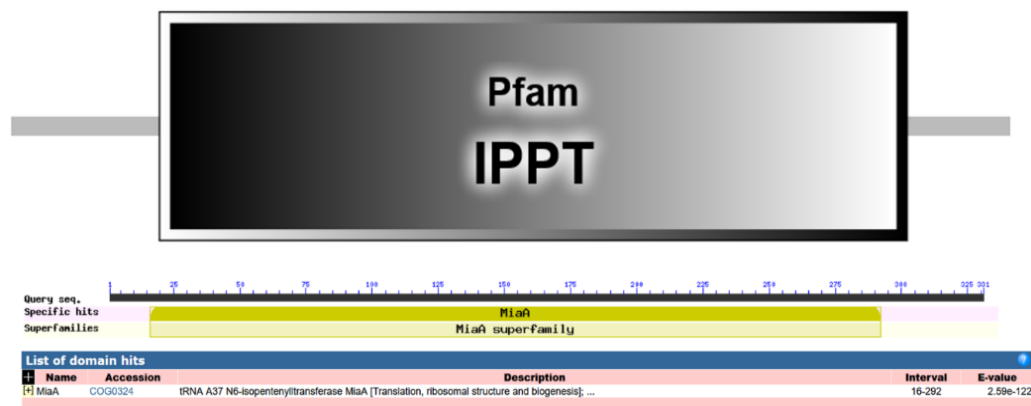
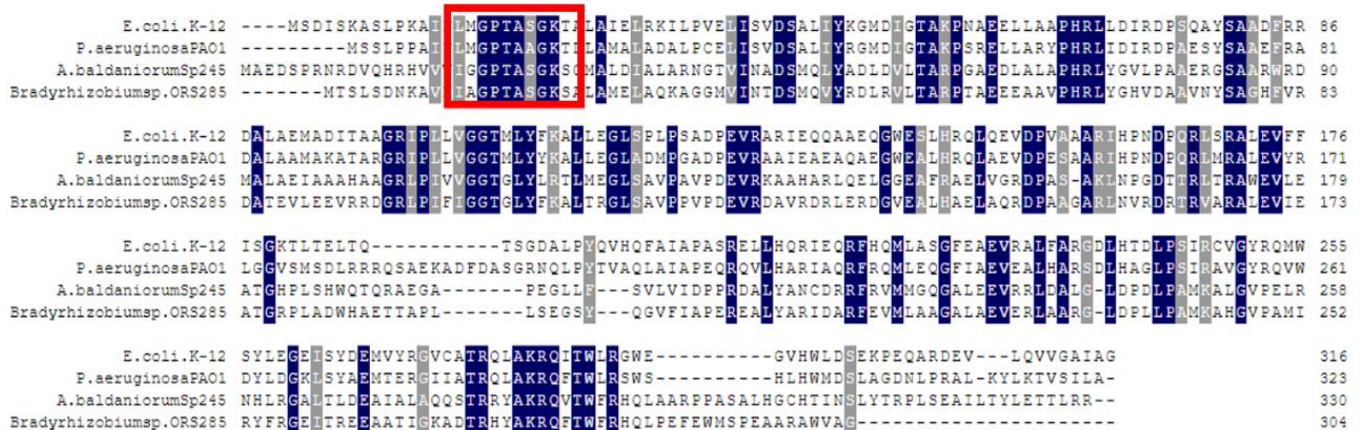


Ilustración 5. Representación gráfica del dominio IPPT de MiaA de *A. baldaniorum* Sp 245

Se llevaron a cabo alineamientos múltiples de secuencias con diferentes proteínas MiaA de actividad confirmada: *E. coli* K12 substr. MG1655 (GenBank: NP_418592.1, PDB-ID: 2ZXU), *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (GenBank: NP_253632.1, PDB-ID: 3CRR) y *Bradyrhizobium* sp. ORS 285 (GenBank: Podlešáková et al., 2013).

A)



B)

1: <i>E. coli</i> .K-12	100.00	64.52	34.20	40.62
2: <i>P. aeruginosa</i> PAO1	64.52	100.00	36.77	38.70
3: <i>A. baldaniorum</i> Sp245	34.20	36.77	100.00	49.50
4: <i>Bradyrhizobium</i> sp.ORS285	40.62	38.70	49.50	100.00

Ilustración 6. Conservación de la proteína MiaA en *Azospirillum baldaniorum* Sp 245.

Los alineamientos que se observan en la ilustración 6 muestran la conservación de una secuencia importante para la actividad de isopentil transferasa dependiente de ARNt, GxTxxGK(T/S). De hecho, esta secuencia comparte similitudes con aquella de las IPTs dependientes de adenilato mencionada en la sección anterior, también se encuentra en la porción del extremo amino terminal. Adicionalmente, los porcentajes de identidad con las secuencias de enzimas con actividad reportada son aproximadamente del 35%, excepto con la de *Bradyrhizobium* con la que comparte casi un 50% de identidad, por lo cual podemos asociar a esta proteína, WP_014239992.1, con una actividad isopentil transferasa dependiente de ARNt.

Es normal encontrar estos genes ampliamente distribuidos en todos los reinos de la vida, menos en arqueas (Frébort et al., 2011), debido a la función de las ARNt-IPTs durante la traducción para mejorar la eficiencia y fidelidad de este proceso. Por esto, era de esperarse encontrar un homólogo de estas proteínas en el genoma de *Azospirillum*.

9.1.3) Gen *miaB*

En el caso de MiaB, la metiltiotransferasa de A37-ARNt, se partió de la secuencia de MiaB de *E. coli* K12 substr. MG1655 (GenBank: NP_415194.1) para la búsqueda tipo BLAST. Esta búsqueda arrojó como resultado una proteína en *A. baldaniorum* Sp 245 con actividad metiltiotransferasa de A37-ARNt (GenBank: AWJ88528.1) con un tamaño de 462 a.a. y codificada en el cromosoma principal. Adicionalmente, el análisis de AWJ88528.1 en la base de datos de Conserved Domains la clasificó como una “tRNA A37 methylthiotransferase MiaB” (CDD: COG0621).



Ilustración 7. Representación gráfica del gen *miaB* de *Azospirillum baldaniorum* Sp 245.

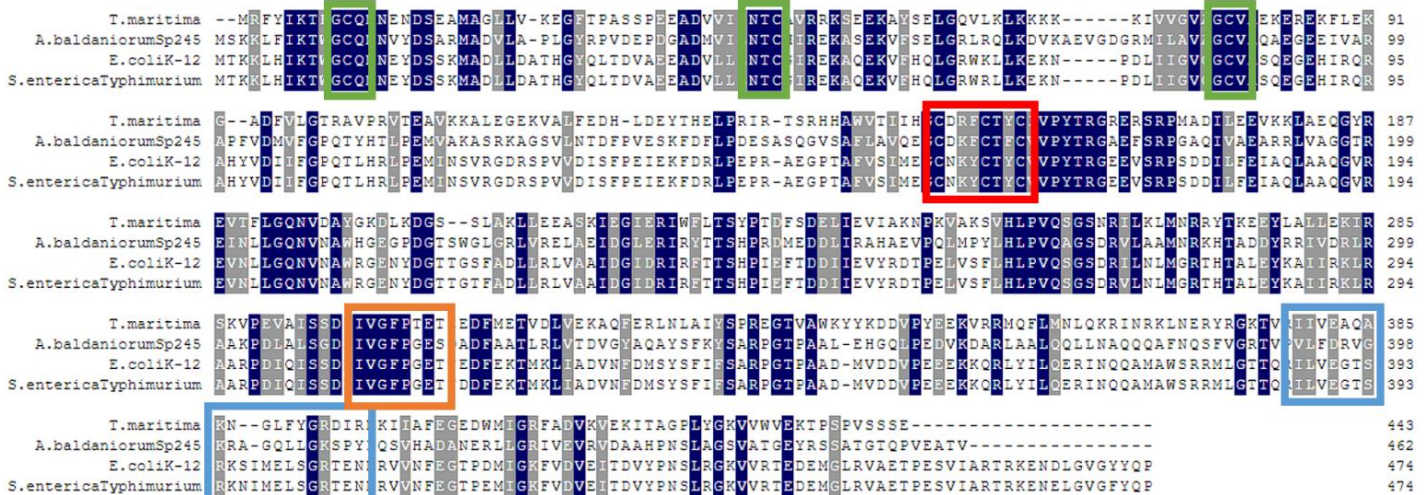
Los dominios que componen a la metiltiotransferasa de *A. baldaniorum* Sp 245 se presentan en la ilustración 7 y son, un dominio TRAM de unión a ARN, un dominio tipo Elp3 de unión a SAM donde se encuentra una tríada de cisteínas importantes para la actividad catalítica de esta enzima y un dominio UPF0004 donde también se encuentra una tríada de cisteínas, más dispersas pero que igual intervienen para coordinar SAM.

También se llevaron a cabo alineamientos múltiples de secuencias con diferentes proteínas MiaB (ilustración 8) con actividad o estructura confirmada, como MiaB de *E. coli* K12 substr. MG1655 (GenBank: NP_415194.1, Esberg et al., 1999), MiaB de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Thyphimurium* str. LT2 (GenBank: NP_459662.1, (Esberg et al., 1999) y MiaB de *Thermotoga maritima* str. ATCC 43589 (GenBank: WP_004081141.1)(Pierrel et al., 2003).

Como se puede apreciar en los alineamientos de la ilustración 8, hay varias zonas de conservación entre las secuencias alineadas, entre estas podemos encontrar secuencias importantes para la actividad catalítica como una tríada de cisteínas dispuestas de la siguiente manera, CxxxCxxC (ilustración 8, recuadro rojo). Esta tríada de cisteínas es importante para coordinar un clúster de Fe-S que participa directamente en la catálisis al permitir la formación de un enlace C-S con SAM como donador del grupo tiol (Gibb et al., 2020). También se forma un segundo clúster Fe-S que coadyuva al primero, en este caso formado por las cisteínas C12, C35 y C74 (Ilustración 8, recuadros verdes). Otra secuencia conservada entre varias proteínas MiaB es IVGFPFET, de función aun no caracterizada (ilustración 8, recuadro naranja) ubicada en la porción carboxilo terminal, también reportada en (Esberg et al., 1999). Por último, en la secuencia de MiaB de *E. coli* y *Salmonella typhimurium* se encuentra una secuencia asociada a la unión de piridoxal fosfato, LVxxTSRKxxxxxxGxTxN (ilustración 8, recuadro azul), dicha secuencia no se encuentra conservada en MiaB de *A. baldaniorum* Sp 245, por lo que se puede asumir que MiaB de *A. baldaniorum* Sp 245

no es responsivo a la presencia de piridoxal fosfato si lo es MiaB de *E. coli* (Lipsett & Peterkofsky, 1966).

A)



B

1: <i>T.maritima</i>	100.00	36.20	41.63	40.95
2: <i>A.baldaniorumSp245</i>	36.20	100.00	47.37	47.81
3: <i>E.coliK-12</i>	41.63	47.37	100.00	98.31
4: <i>S.entericaTyphimurium</i>	40.95	47.81	98.31	100.00

Ilustración 8. Conservación de la proteína MiaB de *A. baldaniorum Sp 245*

9.1.4) Gen *miaE*

Los intentos de encontrar un homólogo de la proteína hidroxilasa de ¹⁶A37, MiaE, fueron infructíferos. En la literatura solo se han caracterizado proteínas MiaE provenientes de modelos bacterianos, entre ellos algunos fitopatógenos, pero no se han reportado en eucariotas ni en *E. coli* (Frébort et al., 2011; Persson & Björk, 1993) y en este trabajo se confirma que tampoco está presente en el género *Azospirillum*.

9.1.5) Genes *log*

Para encontrar los posibles genes *log* que pudieran estar codificados en el genoma de *A. baldaniorum Sp 245* se utilizó la secuencia de LOG3 de *Arabidopsis thaliana* (GenBank: OAP11691.1)(Jeon et al., 2006; Tokunaga et al., 2012). De esta búsqueda se obtuvieron tres secuencias asociadas a un dominio de lisina descarboxilasa, WP_014241640.1, WP_041811148.1 y WP_014242298.1 con un tamaño de 192, 194 y 286 a.a., respectivamente, los dos primeros genes están codificados en el cromosoma principal y el último en el plásmido 4, p04 (ilustración 9A).

Es un error recurrente encontrar anotadas a las proteínas tipo LOG como lisina decarboxilasas, sin embargo, este error de anotación ya ha sido reportado (Naseem, Muhammad et al., 2018). En el presente trabajo se nombró a WP_014241640.1, WP_041811148.1 y WP_014242298.1 como LOG1, LOG2 y LOG3, respectivamente. Entre estas tres proteínas, LOG1 y LOG2 son más parecidas entre sí que con LOG3 (ilustración 9B). Trabajos previos han clasificado filogenéticamente a las enzimas LOG en dos grupos, LOG de tipo I y de tipo II (Naseem, Muhammad et al., 2018; Seo & Kim, 2017). Las LOG de tipo I son enzimas que se ensamblan en dímeros y las de tipo II lo hacen en hexámeros. Adicionalmente, cada grupo de proteínas LOG del tipo I y II se subdividen en subtipos “a” o “b”.

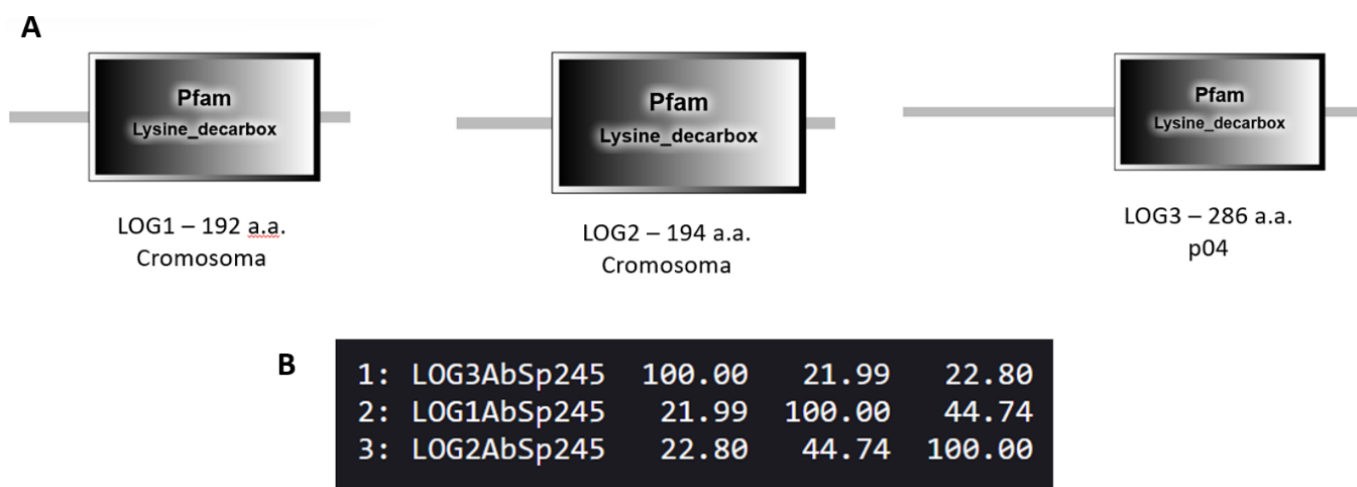


Ilustración 9. Proteínas LOG codificadas en el cromosoma y plásmido p04 de *A. baldaniorum* Sp 245.

Se llevaron a cabo alineamientos de secuencias múltiples con enzimas LOG de tipo I y II para clasificar a las proteínas LOG encontradas. Con este propósito se utilizaron las siguientes secuencias ya caracterizadas de LOGs de tipo I, LOG3 de *A. thaliana*, AtLOG3 (GenBank: OAP11691.1)(Jeon et al., 2006; Tokunaga et al., 2012) y LOGI de *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 CgLOGI (Seo et al., 2016).

En la ilustración 10 se muestran los alineamientos entre las tres posibles proteínas tipo LOG encontradas en *A. baldaniorum* y las proteínas LOG de tipo I antes mencionadas, así como la matriz identidad calculada. Como podemos observar LOG1 y LOG2 presentan un 40% y 50% de identidad con las proteínas LOG de tipo I, respectivamente.

En el alineamiento de la ilustración 10A se puede apreciar la conservación del motivo conservado con actividad catalítica “PGGxGTxxE” (Naseem, Muhammad et al., 2018). Adicionalmente también se encuentra la secuencia conservada “MHxRK” (ilustración 10A, recuadro rojo). Por otro lado, LOG3 no parece guardar parecido con ninguna de las otras secuencias del alineamiento. Estos datos indican que LOG1 y LOG2 son probablemente LOGs de tipo I, pero no LOG3.

A

```

LOG1AbSp245 -----MRICVYAGSN----- 10
LOG2AbSp245 -----MRAPNSVCVYCGSS----- 14
LOG3AbSp245 MKDSRPNHESAAAYRIAFEDRDFLLSEPMRGVRFMLEYAKPESELKAWGIRSTIVVYGSARVPSPERAEQLLRDARTPEER 80
CgLOGI -----MTSLFDAPTLQRVTVFTGSA----- 20
AtLOG3 -----ME--IKGESMQKSKFRRICVFCGSS----- 23

LOG1AbSp245 -----PSTNPAYGEAAEQ LGRHMAERG-----IGLVYGGGR TGLMGRIADSVLAAGGTVTGIIPQFLMDKEVGH 74
LOG2AbSp245 -----SRVAIVHKFAAHMLGDGLARRG-----IQLLYGGGRVGLMGIAADAALAAGGQVVGIIPQFIQAAEIEH 78
LOG3AbSp245 QLAERRAKQFAWYEEARARFGRIVSERGGALAPTEDGQRDNVIATGGGPGLMFAANRGAQEAGAPSIGFNISLPQEPHPNP 160
CgLOGI -----LSSSLYTQAAQTLAKTAVDRG-----IDLVIYGGGKVLGMGIVADAFLESGGEAFGVITELMKGELGH 84
AtLOG3 -----QSKKSYQDAAVDLGNELVSRN-----IDLVIYGGGSI GLMGLVLSQAVHDGGRHVIGIIPKTLMPRELTG 87

LOG1AbSp245 QGLQELR-IVA MHERK LMAELSDGFIA PGGIGTLEE FEVW TWAQLGRHDKPCGLLNASGFYDGLAGFLDHVAGERF 153
LOG2AbSp245 TGLTELH-VVD MHTRKMMVDRADAFVV PGGIGTLEE FEVW TWAQLGRHDKPVVIADVDGYWRPLGLIDHTVAQGF 157
LOG3AbSp245 YSTPELTFRFHFAIRKHLAMRANGLAI PGGFGTFDE FEILNLRNTNKASRLPIVFGVDYWNEVVNFRA-LADHGM 239
CgLOGI EKLTELE-IVPMHIRKRMALGDGFIA PGGAGTLEE FEVW TWAQLGRHDKPVVALYDVGFWQPLLEMLFQMTQRGF 163
AtLOG3 ETVGEVR-AVAMHQKREMAKHSDAFIA PGGYGTLEE LEVITWAQLGRHDKPVGLLNVDGYNSLLESLDKAVEEGF 166

LOG1AbSp245 MQPKHRMLIVRDTAPG LDAFAAYE-----PPAVRK-----WLDEART----- 192
LOG2AbSp245 TQPAHRALYTVVDDVDDVFAALAYEP-----EPALKIPTQKL----- 194
LOG3AbSp245 ISAGDLFLFDIADTAEAWDCMTRLGLKRGNPPLGPAGT-----GMSASEDS 286
CgLOGI IKRDFFCCLIVESDPHALKAMQWT-----PPAPKW----- 195
AtLOG3 ISPTARBEIIVSAPTAKEVVKLEEYA-----PCHERVATKLCWEMERIGYSSEE-- 215

```

B

1: LOG3AbSp245	100.00	24.74	20.10	22.16	21.46
2: LOG2AbSp245	24.74	100.00	41.80	45.95	38.14
3: C. glutamicum	20.10	41.80	100.00	47.03	42.05
4: LOG1AbSp245	22.16	45.95	47.03	100.00	47.92
5: AtLOG3	21.46	38.14	42.05	47.92	100.00

Ilustración 10. Clasificación de las proteínas LOG de *A. baldaniorum* Sp 245 dentro de las proteínas LOG de tipo I.

Para el análisis con proteínas LOG tipo II se utilizaron las secuencias de *C. glutamicum* ATCC 13032 CgLOGII (GenBank: WP_003863794.1) (Seo & Kim, 2017) y LOGII de *Thermus thermophilus* HB8 (GenBank: WP_011015078.1)(Kukimoto-Niino et al., 2004). Como se puede apreciar en la ilustración 11B, LOG3 presenta aproximadamente un 30% de identidad con las proteínas LOG de tipo II, mientras que LOG1 y LOG2 no presentan más del 20% de identidad. LOG3 también cuenta con el motivo conservado “PGGxGTxxE” y la secuencias conservada “F(F/S)xRK” (Naseem, Muhammad et al., 2018). Esto quiere decir que LOG3 probablemente sea una proteína con actividad de citocinina 5’monofosfato fosforibohidrolasa perteneciente a las proteínas LOG de tipo II.

A

```

LOG1AbSp245 -----MRTICVYAGSN 10
LOG2AbSp245 -----MRAPNSVCVYCGSS 14
LOG3AbSp245 MK---DSRPNHESAAAY-----RIAF-----EDRDFLLSEPMRGVRFMLEYAKPESELKAWGIRSTIVVYGSAR 60
Cg1261|5WQ3 MAPKQTPSPEKRNRLVGPVLRQRQTEGTFDQRLLEMRADHNWKHADPWRVLRIQSEFVAGFDALHEM-PK-AVTVRGSAR 78
Tt1465|1WEK -----XPKKPLIDQLHHEDSWRLFRILAEFVEGFETLSEL-QVPLVSVRGSAR 47

LOG1AbSp245 P-----GTNPAYGEAEQLGRHMAERGIG-----LVYGGGRTGLMGRIADSVLA 54
LOG2AbSp245 S-----RVAAVHKEAAHMLGDGLARRGIQ-----LIYGGGRVGLMGIAADAALA 58
LOG3AbSp245 VSPERAEQLLRDARTPEERQLAERRAKQAAYEEARAFGRIVSERGGALAPTEDGQRDNVIATGGGPGIMEAANRCAQE 140
Cg1261|5WQ3 IK-----EDHPYYKAGVELGEKL-----VAADYAVVTGGGPGIMEAPNKGASE 121
Tt1465|1WEK FG-----EGHPAYEAGYRLGRAL-----AEAGFGVVTGGGPGVXEAVNRGAYE 90

LOG1AbSp245 AGGTVTGIIPQFLMDKEVGHQGLQELRI-VA MHERKALMAELSDGFI L PGGIGTLEEL EVWTWALGRHDKPCGLLN 133
LOG2AbSp245 AGGQVVGIIPEHIQAAEIEHTGLTELHV-VD MHTRKMVMDRADA FV L PGGIGTLEEL EILTWKQLGLHDKPVVIAD 137
LOG3AbSp245 AGAPSIIGFNISLPQEPHPNPYSTPELTFRFH FAIRKMLAMRANGLA F PGGFGTFDEA EILNLRNTNKASRLPIV FV 220
Cg1261|5WQ3 ANGLSVGLGIELPHEQHLPYVDLGLNFR-- FFARKMFLKYSQAFV L PGGFGTLEEL EVLCMVGTGKVTNFPVLI 199
Tt1465|1WEK AGGVSVGLNIELPHEQKPNPYQTHALSLR-- FFVRKMLFVRYAVGFV L PGGFGTLEEL EVLVLLQTEKVRHFRFPVFL 168

LOG1AbSp245 ASGFYDGLAGFLDHVAGE-RFMQPKHRDMLIVRDTAPGILDAAAYEPPAVRKWLDEART----- 192
LOG2AbSp245 VDGYYRPLLGLIDHTVAQ-GFTQPAHRALYTVVDDVDDVFAALAYEPEPALKIPTQKL----- 194
LOG3AbSp245 GRDYVNEVVNFRA--LADHGMSAGDLELFDIADTAEAWDCMTRLGLKRGNPPLGPAGTGMSASEDS 286
Cg1261|5WQ3 GTEFWAGLVVDWIRHRLVEEGMIDEKDVDRMLVTDLDLQAVKFI VDAHAGLDVARR----HNLE----- 258
Tt1465|1WEK DRGYWEGLVVRWLAFLRDQK-AVGPEDLQLFRLTDEPEEVVQALKAEAP----PR----- 217

```

B

1: LOG1AbSp245	100.00	44.74	21.58	23.24	26.14
2: LOG2AbSp245	44.74	100.00	23.44	26.34	28.49
3: LOG3AbSp245	21.58	23.44	100.00	30.93	36.32
4: Cg1261 5WQ3	23.24	26.34	30.93	100.00	46.76
5: Tt1465 1WEK	26.14	28.49	36.32	46.76	100.00

Ilustración 11. Clasificación de las proteínas LOG de *A. baldaniorum* Sp 245 dentro de las proteínas LOG de tipo II.

9.1.6) Genes *ckx*

La búsqueda de probables genes que codifican para proteínas con actividad de citocinina oxidasa o deshidrogenasa fue infructífera. No fue posible localizar proteínas con la disposición de dominios normal de las CKX, que consiste en un dominio de unión a FAD y un dominio de unión a citocininas (Dabravolski & Isayenkov, 2021). Sin embargo, si se encontraron proteínas que posiblemente estén evolutivamente relacionadas con las CKX, tal como lo menciona (Dabravolski & Isayenkov, 2021). Sin embargo, no hubo coincidencia en ninguna proteína encontrada en *Azospirillum* con un dominio de unión a citocininas o un dominio de citocinina deshidrogenasa típico.

9.1.7) Diseño de oligonucleótidos

Se llevó a cabo el diseño de oligonucleótidos para evaluar la expresión de los genes relacionados con el metabolismo de citocininas encontrados en este trabajo.

Gen	Oligos (5'-3')	T°m	Tamaño (pb)	%GC	Amplicón (pb)
<i>ipt/cas3</i>	F CGCTGGGTCATGGAGGGAA	60	19	63	124
	R ACAGGGTTCGGCGGAAGTAGC	62	21	62	
<i>miaA</i>	F GCATGTGGTGGTGATCGGCG	62	20	65	134
	R CGGTCAGCACGTCCAAGTCG	61	20	65	
<i>miaB</i>	F TGAACACCGACTTCCCCGTG	60	20	60	105
	F ACTTGTCGCAACCCTCCTGC	61	20	60	
<i>log1</i>	F GGAGGAGCTGTTTCGAGGTGT	59	20	60	116
	R CCACATGGTCGAGGAAGCCG	61	20	65	
<i>log2</i>	F GGTCAGGATCTCGAACGCCTC	60	21	62	143
	R AGATCGAGCACACCGGCCT	62	19	63	
<i>log3</i>	F CTTCAACATCAGCCTGCCGC	60	20	60	131
	R GGAAGATCGCCAGCCCGTT	61	19	63	

Tabla 1. Resumen de las características de los oligonucleótidos diseñados para evaluar la expresión de los genes relacionados a la síntesis de citocininas.

9.2) Efecto de la iP en la fisiología de *Azospirillum baldaniorum* Sp 245

9.2.1) Isopentiladenina como fuente de carbono o de nitrógeno en *Azospirillum baldaniorum* Sp 245

Como parte de los experimentos sobre el efecto de la iP en la fisiología de *Azospirillum*, se analizó si la hormona puede ser utilizada como fuente de carbono o de nitrógeno.

9.2.1.1) Isopentiladenina como fuente de carbono.

Con el propósito de analizar si *Azospirillum baldaniorum* Sp 245 es capaz de utilizar a la isopentiladenina como fuente de carbono, se llevaron a cabo experimentos de crecimiento en medio suplementado con iP 0.5 mM como única fuente de carbono. En la ilustración 12 se observan los datos de crecimiento obtenidos como densidad óptica. Como podemos apreciar *Azospirillum baldaniorum* Sp 245 no parece tener la capacidad de utilizar a la iP como fuente de carbono para su crecimiento, pues a diferencia del control positivo, el cultivo suplementado con iP como fuente de carbono no presenta un aumento en la densidad celular.

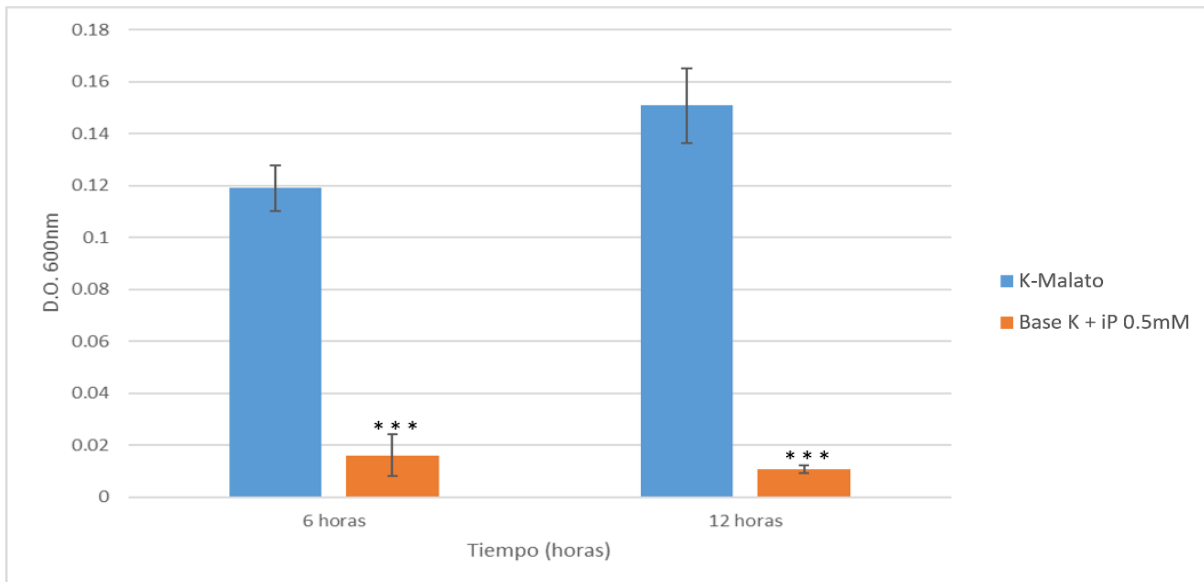


Ilustración 12. Crecimiento de *A. baldaniorum* Sp 245 en medio mínimo suplementado con iP como fuente de carbono

En la literatura solo hay un reporte de otro microorganismo capaz de metabolizar citocininas como fuente de carbono. En (Taylor et al., 2006) se demuestra que *Serratia proteamaculans* es capaz de crecer en medio adicionado con N6-benziladenina e iP como única fuente de carbono. Sin embargo, no se observó esta misma capacidad de metabolizar citocininas en *Azospirillum baldaniorum* Sp 245. Aun así, solo se utilizó iP como fuente de carbono en este experimento en condiciones específicas, esto no excluye la posibilidad de que *Azospirillum baldaniorum* Sp 245 sea capaz de metabolizar otras citocininas.

9.2.1.2) Isopentiladenina como fuente de nitrógeno

Con el propósito de analizar si *A. baldaniorum* Sp 245 es capaz de utilizar a la isopentiladenina como fuente de nitrógeno, se llevaron a cabo experimentos de crecimiento en medio suplementado con iP 1 mM como única fuente de nitrógeno, tanto en condiciones de fijación de nitrógeno como de cultivo en vida libre con aeración. En la ilustración 13 se observan los datos de crecimiento obtenido como densidad óptica. Como se puede apreciar *A. baldaniorum* no parece tener la capacidad de utilizar a la iP como fuente de nitrógeno para propiciar su crecimiento, tanto en condiciones de agitación (indicado como un círculo cerrado en espiral en la ilustración 13) cuando el oxígeno disuelto en el medio inhibe la actividad de la nitrogenasa y por tanto la fijación de nitrógeno, así como en condiciones estáticas (indicado como un círculo con una diagonal cruzada en la ilustración 13) que favorecen la fijación de nitrógeno.

No hay reportes en la literatura sobre metabolismo de citocininas como fuente de nitrógeno. Aunque si hay reportes de efectos diferenciales en la cantidad de citocininas producidas por el modelo *Azospirillum brasilense* ATCC 29710 en función de la disponibilidad de nitrógeno (Kaminek & Conrad, 2014), siendo que la presencia de amonio favorece la producción de citocininas en comparación a cuando *Azospirillum* se encuentra en condiciones de fijación de nitrógeno.

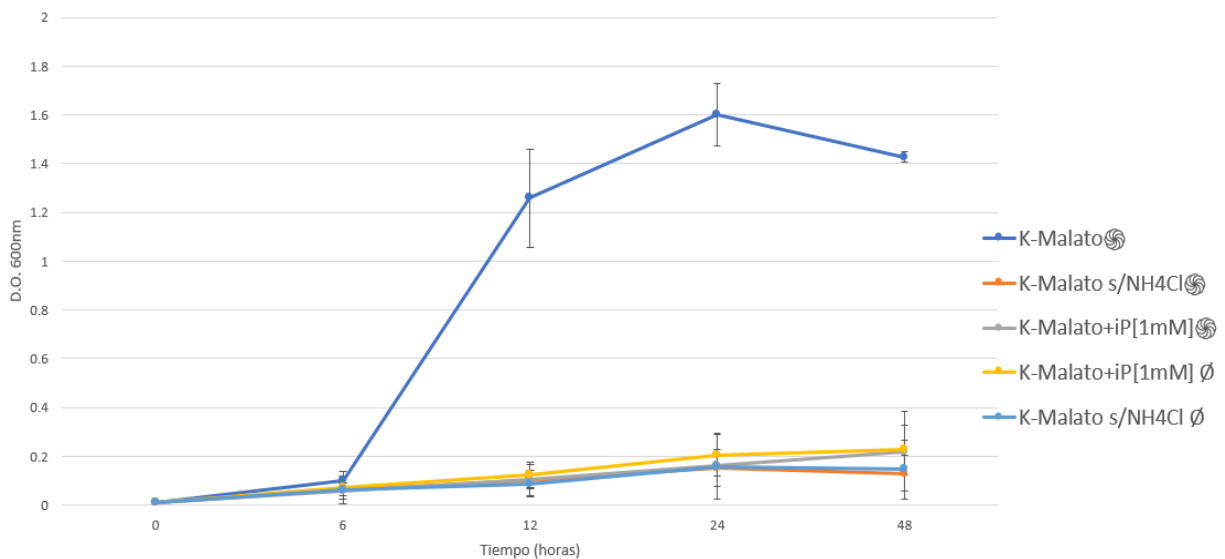


Ilustración 13. Análisis del crecimiento de *A. baldaniorum* Sp 245 en medio mínimo K-Malato suplementado con iP o NH₄Cl como fuente de nitrógeno.

9.2.2) Influencia de concentraciones micromolares de isopentiladenina en la fisiología de *Azospirillum baldaniorum* Sp 245

En cuanto a los ensayos fenotípicos no relacionados al metabolismo de la citocinina, se decidió iniciar con los ensayos de quimiotaxis probando con concentraciones de isopentiladenina en el rango micromolar. Estos ensayos de quimiotaxis permiten probar si la bacteria es capaz de percibir a la fitohormona como una señal quimioatrayente o

quimiorrepelente y consecuentemente trasladarse hacia o en contra de la misma fitohormona. Se realizaron ensayos de quimiotaxis en agar suave con plugs de agar. Brevemente, dentro de una caja petri se embebe un disco de agar sólido, adicionado con el quimioatrayente, en una suspensión bacteriana de alta densidad celular en agar suave al 0.25%. Tras 4 horas de incubación se observará la formación de un halo bacteriano alrededor del disco de agar si es que la sustancia que contiene sirve como señal quimioatrayente para la bacteria.

9.2.2.1) Efecto quimiotáctico de concentraciones micromolares de isopentiladenina en *Azospirillum baldaniorum* Sp 245

Para los primeros ensayos de quimiotaxis, los discos de agar solido fueron adicionados con 500 μM y 50 μM de iP. Como control se utilizó un disco de agar sin ninguna molécula adicionada, compuesto únicamente por el buffer de quimiotaxis en el que se prepara la suspensión bacteriana y agar, esto para probar que ni el buffer ni el agar utilizado para los ensayos tienen algún efecto sobre el comportamiento quimiotáctico de *Azospirillum*. Como control positivo se utilizó un disco de agar adicionado con Malato 34 mM, pues el Malato es la fuente de carbono predilecta de *Azospirillum*. En la ilustración 14 se presentan imágenes representativas de tres experimentos independientes con dos réplicas por experimento. Al haber teñido la suspensión bacteriana con una solución de rojo de fenol al 5% la agregación bacteriana se aprecia con un color rojo intenso alrededor del disco de agar derivado de la conglomeración de las células bacterianas en la suspensión. En la ilustración 14A se ejemplifica como debe apreciarse una respuesta quimiotáctica positiva.

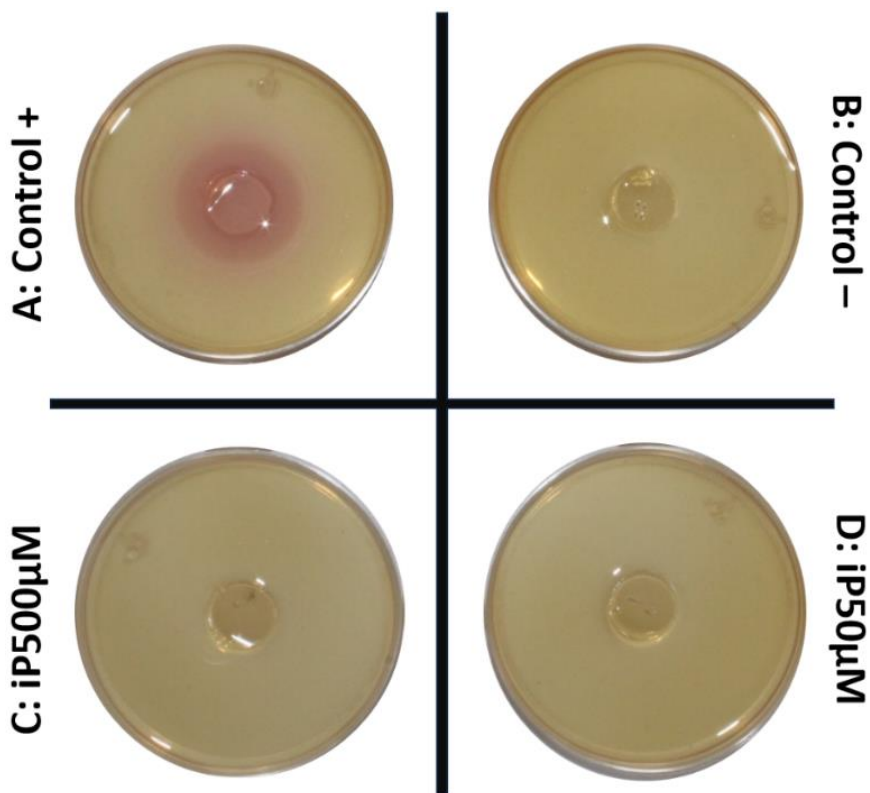


Ilustración 14. Ensayos de quimiotaxis en placa con agar suave y plug de agar solido adicionado con iP en el rango micromolar.

Por otro lado, en la ilustración 14B se ejemplifica como debe apreciarse una respuesta quimioatrayente negativa. En este caso, la bacteria no responde al contenido del disco de agar sólido, por lo que la placa solo se aprecia uniformemente de color naranja por la adición de rojo de fenol, pero no hay conglomeración celular. Los ensayos de quimiotaxis para iP 500 μM y 50 μM (ilustración 14C y 14D) fueron negativos para una respuesta quimioatrayente. Podemos deducir de estos resultados que la iP no funciona como señal quimioatrayente en *Azospirillum* bajo las condiciones ensayadas en este trabajo.

9.2.2.2) Influencia de concentraciones micromolares de isopentiladenina en la movilidad de *Azospirillum baldaniorum* Sp 245

Continuando con los ensayos fenotípicos, las pruebas de movilidad se llevaron a cabo en placa con medio mínimo K-Malato adicionado con agar suave al 0.25% y con diferentes concentraciones de isopentiladenina (50, 100 y 500 μM). Para el grupo control se utilizó medio K-Malato adicionado con un volumen de KOH 0.05 N (solución vehículo) que fuera igual al mayor volumen utilizado de solución de citocinina en los grupos experimentales. Los ensayos se llevaron a cabo en tres experimentos independientes con cuatro réplicas por experimento.

En el gráfico de la ilustración 15A se hace notoria una marcada baja en la movilidad en los grupos adicionados con iP y el nivel de este efecto no parece obedecer a las concentraciones usadas, pues se observa igual en los tres grupos experimentales. Sin embargo, en la ilustración 15B se puede apreciar que el grupo con iP 50 μM ha recuperado el nivel de movilidad natatoria pasadas las 48 horas, de igual manera, el grupo con iP 100 μM alcanza niveles de movilidad similares al del grupo control sin fitohormona. Por otro lado, el grupo experimental con iP 500 μM aun exhibe baja movilidad, hay muy poco cambio en el tamaño de los halos de crecimiento entre las 24 y 48 horas, siendo casi similares.

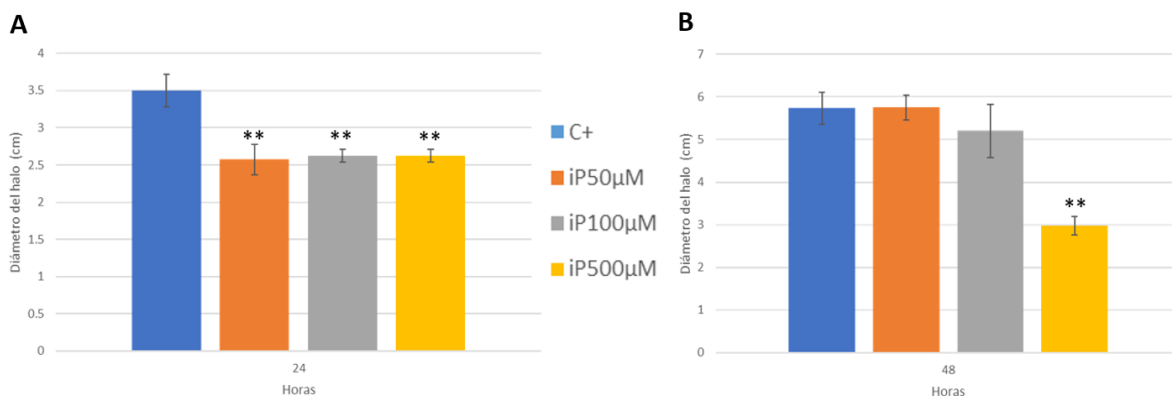


Ilustración 15. Datos de movilidad de *A. baldaniorum* Sp 245 en medio mínimo K-Malato adicionado con iP a una concentración de 50, 100 y 500 μM .

De los datos obtenidos podemos deducir que la isopentiladenina presenta un efecto inhibidor de la movilidad dependiente de la concentración, el cual se exagera a

mayores concentraciones en el medio. Esto pudiera deberse a posibles efectos de la citocinina ya sea sobre la maquinaria flagelar o sobre redes de señalización que regulan la movilidad flagelar. También pudiera ser posible que los niveles de isopentiladenina utilizados estimulen la producción de diGMPc, posiblemente a través de alguna de las proteínas con dominios CHASE mencionadas en la sección de antecedentes directos, pues entre estas se encuentra una proteína híbrida del metabolismo del diGMPc. Otra posibilidad es que la isopentiladenina presente efectos tóxicos en la cepa *Azospirillum baldaniorum* Sp 245 y debido a esto disminuyan los niveles de movilidad. Aunque quedaría por confirmar el mecanismo exacto por el cual la iP inhibe la movilidad en *Azospirillum baldaniorum* Sp 245.

9.2.2.3) Influencia de concentraciones micromolares de isopentiladenina en la formación de biopelícula de *Azospirillum baldaniorum* Sp 245

Para aclarar un poco mejor la naturaleza de los efectos que tiene la isopentiladenina sobre la fisiología bacteriana de *Azospirillum*, se decidió continuar con los ensayos de biopelícula para contrastar los resultados con los de movilidad. Si la iP tiene efectos que promueven la inhibición de la movilidad natatoria en *Azospirillum*, se esperaría encontrar altos niveles de formación de biopelícula bajo las mismas condiciones de exposición a la citocinina. En la ilustración 16 se presentan los resultados de tres experimentos independientes por triplicado.

Sorpresivamente, la cantidad de biopelícula formada por *A. baldaniorum* Sp 245 en presencia de citocininas fue menor en contraste con el control positivo. Efecto que parece ser dependiente de la dosis, pues a mayor concentración de citocinina, parece haber mayor inhibición de formación de biopelícula con respecto al grupo control. Aunque la diferencia no es estadísticamente significativa si parece haber una leve tendencia a la baja.

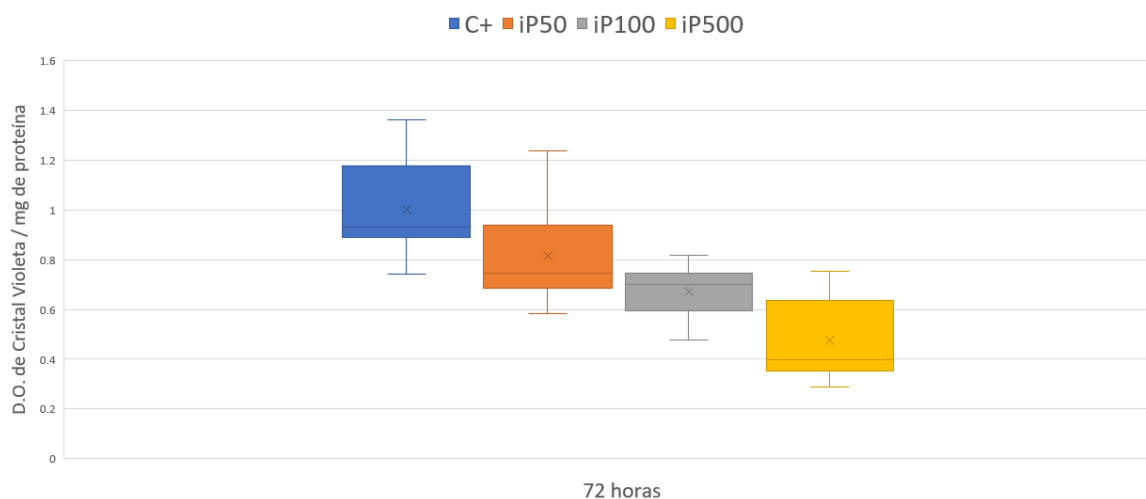


Ilustración 16. Formación de biopelícula de 72 horas de *A. baldaniorum* Sp 245 cultivado en presencia de iP en el rango micromolar. Para medir la biopelícula ésta se tiñó con cristal violeta y se leyó por espectrometría una alícuota

Los datos de los experimentos de movilidad y biopelícula revelan una inhibición de ambos fenotipos en presencia de la isopentiladenina, fenómeno que pudiera parecer contraproducente, pues ambos fenotipos suelen ser regulados de manera proporcionalmente inversa. Esto es, mientras la cepa *A. baldaniorum* Sp 245 se encuentra en estado de agregación y formación de biopelícula, la movilidad se va a encontrar abatida. Caso contrario, cultivos en líquido de *Azospirillum* van a presentar una menor agregación celular y no formarán biopelícula. Con base en esto, los datos parecen más bien sostener la hipótesis de un efecto tóxico de la isopentiladenina sobre *Azospirillum*.

9.2.2.4) Influencia de concentraciones micromolares de isopentiladenina en el crecimiento de *Azospirillum baldaniorum* Sp 245

Derivado de los resultados obtenidos en los ensayos anteriores y con el objetivo de analizar los posibles efectos tóxicos de la iP sobre el crecimiento de *A. baldaniorum* Sp 245, se realizaron curvas de crecimiento en medio mínimo K-malato adicionado con iP 500 μM y 50 μM . De estos ensayos se llevaron a cabo tres experimentos independientes, con duplicados cada uno.

Como se aprecia en la ilustración 17, los niveles de densidad óptica alcanzados por *A. baldaniorum* Sp 245 en presencia de la isopentiladenina son menores a los alcanzados por la cepa en el medio control. La baja densidad óptica pudiera deberse tanto al efecto tóxico propuesto anteriormente como a una alta agregación celular fomentada por la presencia de la citocinina, lo que permitiría bajas densidades ópticas al precipitar los agregados celulares de manera rápida. Sin embargo, los ensayos de biopelícula demuestran que la agregación celular no se encuentra aumentada, todo lo contrario, se observa una disminución pronunciada de la formación de biopelícula, fenotipo fuertemente dependiente de la agregación celular. Por lo tanto, estos datos soportan aún más la hipótesis de un efecto tóxico de la citocinina.

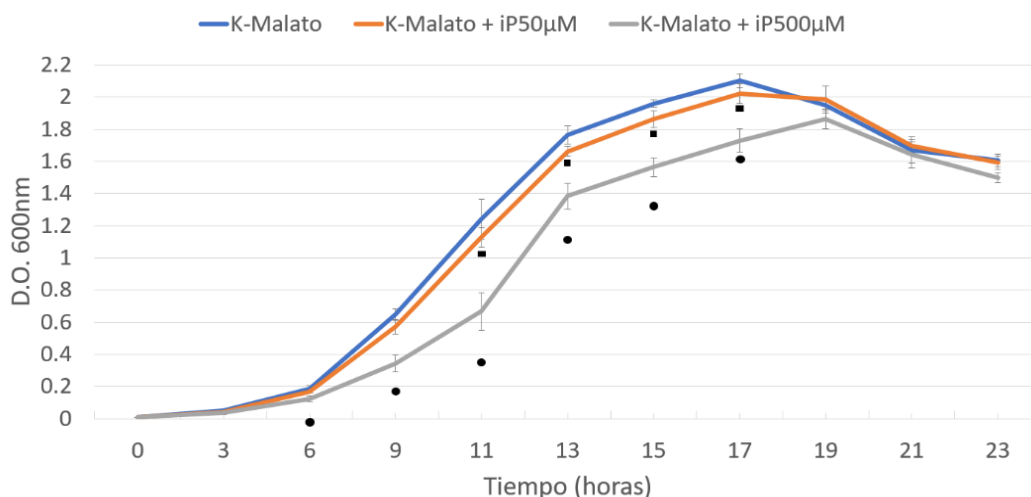


Ilustración 17. Curva de crecimiento de *Azospirillum baldaniorum* Sp 245 en medio mínimo K-Malato adicionado con iP en el rango micromolar.

9.2.3) Ensayos de viabilidad celular: células vivas/células muertas

Debido a que los datos obtenidos de los ensayos fenotípicos sugerían un posible efecto tóxico de la citocinina sobre la célula de *A. baldaniorum* Sp 245, se decidió realizar un ensayo de viabilidad celular por microscopía de fluorescencia. Este ensayo consiste en marcar fluorescentemente el ADN de células vivas con un fluoróforo específico y el de células muertas o no viables con un fluoróforo diferente. Se utilizó DAPI como fluoróforo para teñir células vivas, pues DAPI es capaz de atravesar la membrana celular con facilidad y así teñir de azul las células con membrana celular íntegra. Para el marcado fluorescente de células muertas se utilizó yoduro de propidio, el cual se une con más afinidad al ADN que el mismo DAPI y fluoresce en el espectro rojo. Pero, al contrario del DAPI, el yoduro de propidio no es capaz de atravesar la membrana celular de células viables, por lo que solo va a teñir células con una membrana celular dañada. Por esto se considera que aquellas células marcadas fluorescentemente en rojo son células no viables. Se realizaron tres experimentos de viabilidad celular independientes, donde se observaron diez campos por muestra. Las imágenes son representativas de los campos de estos tres experimentos.

9.2.3.1) Efectos de concentraciones micromolares en la viabilidad celular de *Azospirillum baldaniorum* Sp24

Para los ensayos de viabilidad se inocularon 20 mL de medio mínimo K-Malato suplementado con isopentiladenina 500 μ M y ácido indol-acético 500 μ M. Cabe mencionar que se decidió utilizar AIA 500 μ M ya que en el estudio transcriptómico de (Van Puyvelde et al., 2011) utilizaron AIA 1 mM para ver la respuesta transcriptómica de AIA exógeno en cepas con baja producción de AIA.

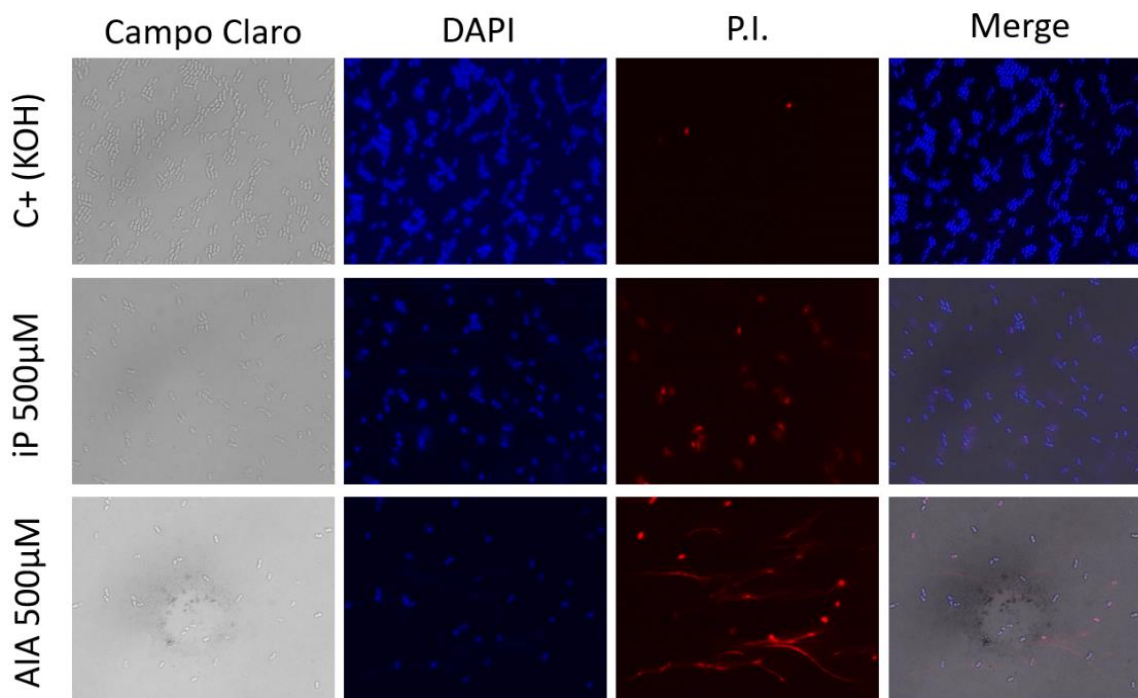


Ilustración 18. Ensayo de viabilidad celular de *A. baldaniorum* Sp 245 en cultivos adicionados con iP en el rango micromolar.

Como se puede apreciar en la ilustración 18, el control positivo sin la adición de fitohormonas es de aproximadamente 1-2 células muertas por campo, mientras que las células no viables en la muestra con iP 500 μM se incrementó a más de 10 por campo. Por lo que se puede afirmar que concentraciones micromolares de isopentiladenina inducen efectos citotóxicos en *A. baldaniorum* Sp 245. Este resultado pudiera indicar que la proteína asociada a un probable dominio con actividad de isopentil transferasa dependiente de adenilato, encontrada en el genoma de *A. baldaniorum* Sp 245 no cuenta con la actividad canónica de dichos dominios. Adicionalmente, en el presente trabajo se demuestra que la misma bacteria es susceptible a las altas concentraciones de citocininas, las cuales se asocian con la actividad de dichas enzimas isopentenil transferasas (Wei et al., 2023). Aunque esto no necesariamente es cierto si dicha enzima mantiene una baja actividad o bajos niveles de expresión. Adicionalmente, no se conoce cual pudiera ser el papel de este tipo de enzimas tanto en interacción con la planta como en vida libre.

En cuanto al AIA, este parece tener un efecto tóxico incluso aun mayor que el de la isopentiladenina y a una concentración dos veces menor que la utilizada por (Van Puyvelde et al., 2011) quienes dentro de sus resultados exponen la expresión diferencial de genes relacionados con el estrés celular cuando comparan el transcriptoma de la cepa mutante que no produce AIA complementada químicamente con la adición de AIA exógeno, con las de cepas sin la adición de AIA. De hecho, es posible apreciar en varios de los campos analizados en estos ensayos de viabilidad largas hebras rojas fluorescentes que podemos apreciar en la ilustración 18 en el panel del AIA con el filtro del yoduro de propidio. Estos probablemente sean hebras de ADN libre resultante de una posible lisis celular aumentada debido al efecto citotóxico del AIA a esta concentración. Adicionalmente, tanto en el grupo adicionado con iP como con AIA se puede apreciar una menor densidad celular en el campo azul comparado con el grupo control. El efecto tóxico del AIA ya ha sido reportado tanto en plantas (Cassán et al., 2014) como en *Azospirillum* (Van Puyvelde et al., 2011).

9.2.3.2) Efecto de concentraciones sub micromolares en la viabilidad celular de Azospirillum baldaniorum Sp 245

Antes de iniciar con los ensayos fenotípicos con concentraciones de isopentiladenina más diluidas, se llevaron a cabo ensayos de viabilidad celular con estas nuevas concentraciones para descartar que el efecto citotóxico se mantenga en estos rangos de concentración.

En la ilustración 19 se exponen los resultados de estos ensayos de viabilidad en donde se aprecian niveles de células muertas similares entre los grupos experimentales con el grupo control. Esto quiere decir que el efecto tóxico se ve reducido al mínimo a partir de una concentración de 1 μM . Así pues, si se llegara a observar un efecto sobre la fisiología de *Azospirillum* con concentraciones de iP menores a 1 μM , en teoría no será resultado de un efecto tóxico.

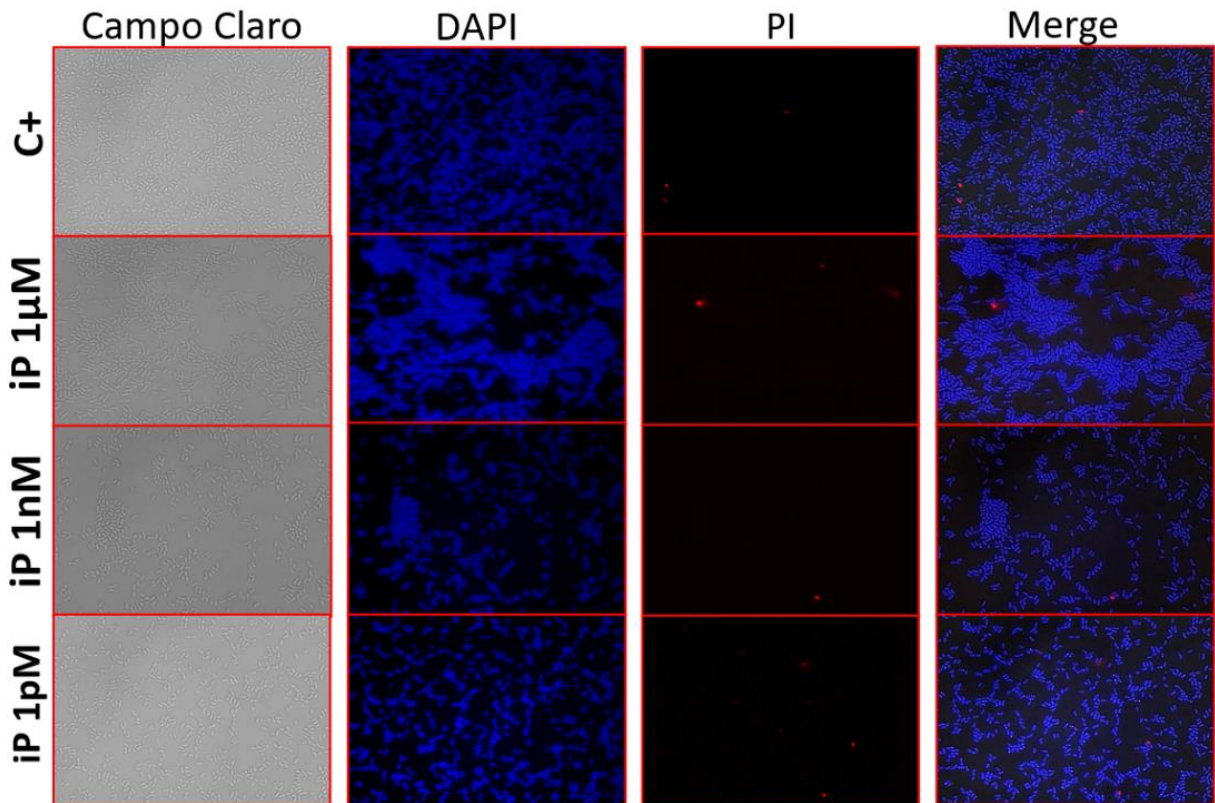


Ilustración 19. Ensayo de viabilidad celular de *Azospirillum baldaniorum* Sp 245 en cultivos adicionados con iP en el rango sub micromolar.

9.2.4) Influencia de concentraciones sub micromolares de isopentiladenina en la fisiología de *Azospirillum baldaniorum* Sp 245

Debido a que los efectos observados en presencia de concentraciones micromolares de isopentiladenina son de naturaleza citotóxica se decidió volver a evaluar los fenotipos de quimiotaxis, formación de biopelícula y viabilidad celular, pero ahora con concentraciones de iP mucho más bajas. Para estos nuevos ensayos se utilizó iP 1 µM, 1 nM y 1 pM.

9.2.4.1) Efecto quimiotáctico de concentraciones sub micromolares de isopentiladenina en *Azospirillum baldaniorum* Sp 245

Una vez descartados posibles efectos tóxicos de las nuevas concentraciones de iP se procedió a realizar nuevamente los ensayos de quimiotaxis utilizando las nuevas concentraciones de iP.

En la ilustración 20 se aprecian los resultados de los nuevos ensayos de quimiotaxis. De igual manera que las concentraciones micromolares, no se aprecia ningún halo indicativo de un comportamiento quimiotáctico hacia la isopentiladenina. Por lo que se confirma que la isopentiladenina no demuestra comportarse como una señal

quimioattractante en *A. baldaniorum* Sp 245. Esto va en línea con los resultados de obtenidos anteriormente en los ensayos de uso de iP como fuente de carbono y de nitrógeno, pues los compuestos quimioattractantes suelen ser sustancias metabolizables por los mismos organismos que las perciben. En este trabajo se demostró que la iP no sirve como fuente de carbono o de nitrógeno para *A. baldaniorum* Sp 245, por lo que no era probable observar un efecto quimiotáctico hacia esta citocinina por parte de *Azospirillum*.

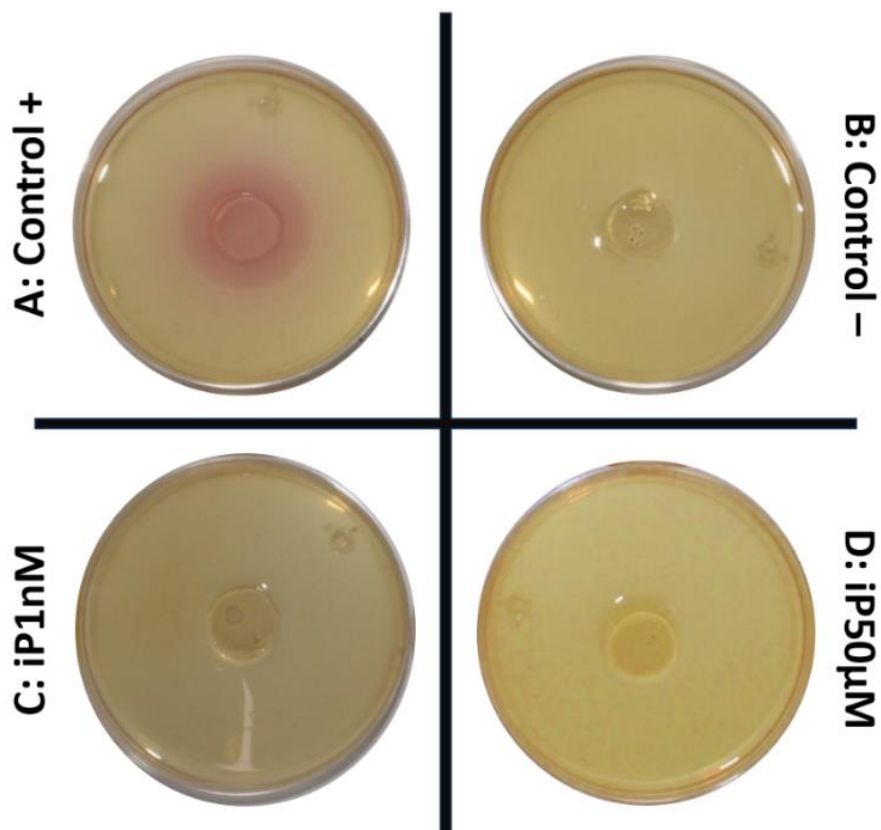


Ilustración 20. Ensayos de quimiotaxis en placa con agar suave y plug de agar sólido adicionado con iP en el rango sub micromolar.

9.2.4.2) Influencia de concentraciones sub micromolares de iP en la formación de biopelícula de *Azospirillum baldaniorum* Sp 245

Una vez descartados posibles efectos tóxicos de las nuevas concentraciones de iP se procedió a realizar nuevamente los ensayos de formación de biopelícula. En la ilustración 21 se presentan los datos obtenidos de los ensayos con las nuevas concentraciones.

Como se observa en la ilustración 21, no hay indicios de que la isopentiladenina tenga algún efecto sobre la capacidad de *Azospirillum* de generar una biopelícula madura, independientemente de la concentración. En la literatura no hay reportes sobre la influencia de las citocininas en la formación de biopelícula, aunque si hay reportes de

la influencia de las citocininas en la nodulación tal y como se reporta en (Podlešáková et al., 2013) donde una cepa mutante en *miaA* generó defectos en la nodulación en *Aeschynomene*.

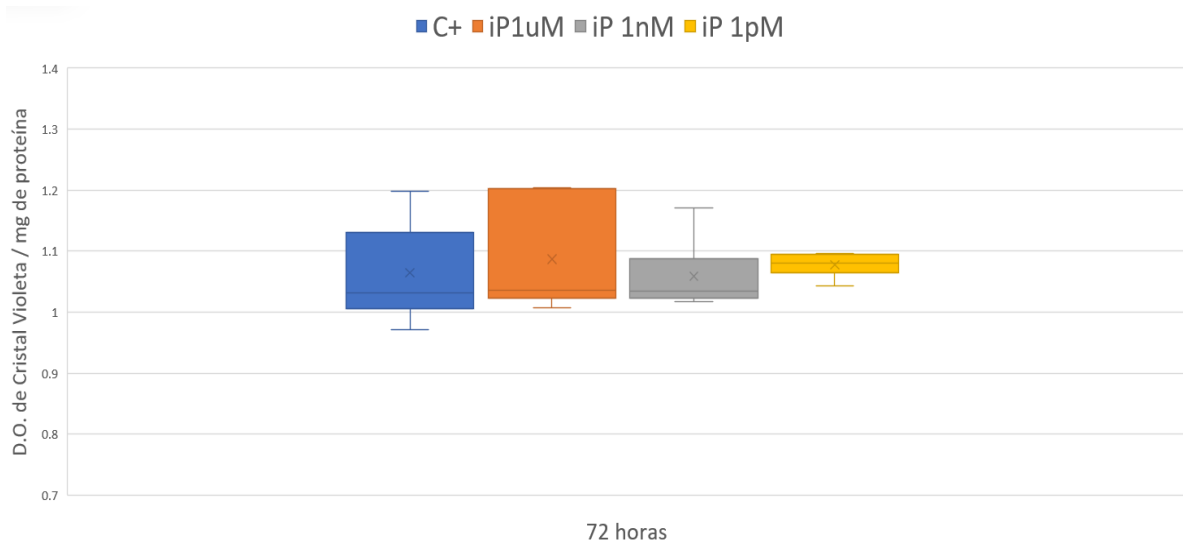


Ilustración 21. Formación de biopelícula de 72 horas de *Azospirillum baldaniorum* Sp 245 cultivado en presencia de iP en el rango sub micromolar.

10) Conclusiones

Las citocininas son moléculas pequeñas que están presentes en varios reinos de la vida, exceptuando a las arqueas. Aun así, éstas son principalmente catalogadas como fitohormonas por los marcados efectos que poseen las citocininas sobre el desarrollo de organismos vegetales. A pesar de esto e irónicamente, la primera enzima con actividad de sintetizar citocininas es la del producto de *tmr* de *A. tumefaciens*. Resulta particularmente interesante el hecho de que microorganismos tanto fitopatógenos como promotores del crecimiento vegetal modifican los niveles de citocininas para promover efectos completamente contrarios. Por un lado, y como ya se ha comentado, los microorganismos patógenos hacen uso de isopentil transferasas dependientes de adenilato para producir niveles elevados de citocininas en el huésped. Por otro lado, los organismos que son benéficos para las plantas se valen de la producción de niveles más modestos de citocininas a través de una isopentil transferasa dependiente de ARNt, que permite un estímulo moderado hacia el huésped y no promueve una sobreestimulación descontrolada que afecte el estado fisiológico del huésped.

De acuerdo con la información encontrada en la literatura, la vía biosintética que era más probable encontrar en *A. baldaniorum* Sp 245 es la dependiente de ARNt. En línea con esto, los análisis bioinformáticos confirmaron la presencia de los genes *miaA*, *miaB* y tres genes *log* diferentes. Sin embargo, no se encontraron posibles homólogos para *miaE*, por lo cual es probable que *Azospirillum* no sea capaz de sintetizar cis-zeatina. Aunado a esto, en la literatura hay reportes de producción de compuestos de zeatina en *Azospirillum* por lo cual es probable que esta sea trans-zeatina derivada de una vía de síntesis directa. Respecto a este aspecto, los análisis bioinformáticos llevados a cabo en este trabajo permitieron ubicar una proteína con probable actividad de isopentil transferasa típico de las IPTs dependientes de adenilato, por lo que no se descarta que *Azospirillum* sea capaz de sintetizar citocininas a través de esta vía y que sea éste el origen de las sustancias tipo zeatina reportadas en la literatura. Aunque esto aún queda por confirmar. También sería de esperarse encontrar citocininas metiloladas en *Azospirillum* debido a la presencia de un gen homólogo a *miaB*. En cuanto a las demás proteínas encontradas en *Azospirillum* involucradas en el metabolismo de citocininas, se torna interesante especular sobre el origen y utilidad de tres genes que codifican para enzimas LOG. Adicionalmente, también resalta el hecho de no haber encontrado genes que codifiquen para proteínas con actividad de citocinina oxidasa.

En cuanto a los ensayos fenotípicos, en primer lugar, los datos obtenidos en los ensayos de crecimiento celular, movilidad, biopelícula y viabilidad celular sugieren que la iP en concentraciones micromolares altas muestra un efecto tóxico en *A. baldaniorum* Sp 245.

Con los datos generados en los ensayos de uso de iP como nutriente se evidenció que *A. baldaniorum* Sp 245 no es capaz de utilizar la isopentiladenina como fuente de carbono o de nitrógeno, ya sea en condiciones de vida libre o en formación de biopelícula. De manera similar, los ensayos de quimiotaxis demostraron que la iP no sirve como una señal quimioatrayente en *A. baldaniorum* Sp 245. Retomando los experimentos de viabilidad celular, se demostró que el efecto tóxico generado por la iP

no parece ser considerable a concentraciones iguales a 1 μM o inferiores. Por último, a estas concentraciones sub micromolares, no parece haber un efecto visible sobre la capacidad de *A. baldaniorum* Sp 245 de formar biopelícula, al menos de manera cuantitativa.

Derivado de estos datos obtenidos sobre la fisiología de *A. baldaniorum* Sp 245 en presencia de diferentes rangos de concentración de isopentiladenina, se demostró que la exposición a la citocinina no genera un cambio evidente en el fenotipo de formación de biopelícula. Por lo que esta estrategia no logró evidenciar posibles implicaciones de la isopentiladenina sobre el comportamiento de *Azospirillum*. Sin embargo, tras un exhaustivo análisis de la literatura se propone que la mejor manera de continuar con esta línea de investigación es la generación de cepas mutantes de *Azospirillum baldaniorum* Sp 245 que hayan sido desprovistas de su capacidad de sintetizar citocininas o que sean capaces de mantener niveles muy bajos de esta hormona.

11) Anexos

- Medios de cultivo

Medio mínimo K-malato	
KH ₂ PO ₄	0.87 g
K ₂ HPO ₄	1.67 g
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	0.2 g
NaCl	0.1 g
Acido málico	5.0 g
KOH	Ajustar a pH 6.8
Ajustar a pH 6.8 con KOH 10% y esterilizar a 5 lb por 30 minutos y dejar enfriar. Finalmente agregar las siguientes soluciones:	
CaCl ₂ [2%]	1.0 mL
FeCl ₃ [1%]	1.0 mL
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O [0.2%]	1.0 mL
NH ₄ Cl [20%]	5.0 mL
Solución de oligoelementos	1.0 mL
Dejar en prueba de esterilidad 24 horas.	

Tabla 2. Composición de 1L de medio mínimo K-Malato

Medio Difco (MD)	
Medio Difco	8.0 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.25 g
KCl	1.0 g
MnCl ₂ 4H ₂ O	0.10 g
Ajustar a pH 7.0 con NaOH 1 N y esterilizar a 15 lb por 30 minutos. Dejar en prueba de esterilidad 24 horas.	

Tabla 3. Composición de 1L de medio Difco.

Medio Rojo Congo	
K ₂ HPO ₄	0.5 g
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	0.2 g
NaCl	0.2 g
Extracto de levadura	0.5 g
Acido málico	5.0 g
KOH	4.0 g
FeCl ₃ 1%	1.4 mL
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O 0.1%	2.0 mL
Ajustar a pH 6.8 con KOH 1N y agregar las siguientes soluciones:	
Rojo Congo 0.25%	1.0 mL
Agar bacteriológico	15 g
Esterilizar a 5 lb por 30 minutos y dejar enfriar. Someter a prueba de esterilidad por 24 horas.	

Tabla 4. Composición de 1 L de medio Rojo Congo

Buffer de quimiotaxis	
K ₂ HPO ₄	1.70 g
KH ₂ PO ₄	1.36 g
EDTA	0.30 g
Ajustar a pH = 7.0 con KOH y HCl y esterilizar a 15 lb por 30 minutos.	

Tabla 5. Composición de 1L de buffer de quimiotaxis.

12) Bibliografía

- Akhtar, S. S., Mekureyaw, M. F., Pandey, C., & Roitsch, T. (2019). Role of cytokinins for interactions of plants with microbial pathogens and pest insects. *Frontiers in Plant Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2019.01777>
- Akiyoshi, D. E., Klee, H., Amasino, R. M., Nester, E. W., & Gordon, M. P. (1984). T-DNA of *Agrobacterium tumefaciens* encodes an enzyme of cytokinin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81(19), 5994–5998. <https://doi.org/10.1073/pnas.81.19.5994>
- Argueso, C. T., Raines, T., & Kieber, J. J. (2010). Cytokinin signaling and transcriptional networks. *Current Opinion in Plant Biology*, 13(5), 533–539.
- Asami, T., & Nakagawa, Y. (2018). Preface to the Special Issue: Brief review of plant hormones and their utilization in agriculture. *Journal of Pesticide Science*, 43(3), 154–158. <https://doi.org/10.1584/jpestics.M18-02>
- Barry, G. F., Rogers, S. G., Fraley, R. T., & Brand, L. (1984). Identification of a cloned cytokinin biosynthetic gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81(15), 4776–4780. <https://doi.org/10.1073/pnas.81.15.4776>
- Caballero-Mellado, J. (1993). El género *Azospirillum*. Programa de Ecología Molecular y Microbiana, Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, UNAM.
- Cacciari, I., Lippi, D., Pietrosanti, T., & Pietrosanti, W. (1989). Phytohormone-like substances produced by single and mixed diazotrophic cultures of *Azospirillum* and *Arthrobacter*. *Plant and Soil*, 115, 151–153.
- Cassán, F., & Diaz-Zorita, M. (2016). *Azospirillum sp.* in current agriculture: From the laboratory to the field. *Soil Biology & Biochemistry*, 103, 117–130.
- Cassán, F., Vanderleyden, J., & Spaepen, S. (2014). Physiological and agronomical aspects of phytohormone production by model Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) belonging to the genus *Azospirillum*. *Journal of Plant Growth Regulation*, 33(2), 440–459. <https://doi.org/10.1007/s00344-013-9362-4>

- Cortés Sotres, D. R. (2021). Análisis del dominio CHASE de la proteína híbrida codificada por el gen *cdgD* de *Azospirillum baldaniorum* Sp245.
- Cruz Pérez, José Francisco, Lara-Oueilhe, Roxana, Marcos Jiménez , Cynthia, Cuatlayotl Olarte, Ricardo, Xiqui Vázquez , Maria Luisa, Reyes Carmona, Sandra Raquel, Eugenia Baca, Beatriz, & Ramirez Mata, Alberto. (2021). Expression and function of the *cdgD* gene, encoding a CHASE-PAS-DGC-EAL domain protein, in *Azospirillum brasilense*. *11*(520). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80125-3>
- Dabravolski, S. A., & Isayenkov, S. V. (2021). Evolution of the cytokinin cehydrogenase (CKX) domain. *Journal of Molecular Evolution*, *89*(9–10), 665–677. <https://doi.org/10.1007/s00239-021-10035-z>
- Deb, S., Kumar, C., Kumar, R., Kaur, A., Ghosh, P., Patil, P. B., Chatterjee, S., Patel, H. K., & Sonti, R. V. (2021). A bacterial derived plant-mimicking cytokinin hormone regulates social behaviour in a rice pathogen. <https://doi.org/10.1101/2021.07.05.451090>
- Dias da, P. A., Marins de, A. N., Guarany de, A. G., Francisco de, S. R., & Rodrigues, G. C. (2020). The world of cyclic dinucleotides in bacterial behavior. *Molecules*, *25*(10). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES25102462>
- Esberg, B., Leung, H.-C. E., Tsui, H.-C. T., Björk, G. R., & Winkler, M. E. (1999). Identification of the *miaB* gene, involved in methylthiolation of isopentenylated A37 derivatives in the tRNA of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, *181*(23), 7256–7265. <https://doi.org/10.1128/JB.181.23.7256-7265.1999>
- Esquivel-Cote, R., Ramírez-Gama, R. M., Tsuzuki-Reyes, G., Orozco-Segovia, A., & Huante, P. (2010). *Azospirillum lipoferum* strain AZm5 containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase improves early growth of tomato seedlings under nitrogen deficiency. *Plant and Soil*, *337*(1–2), 65–75. <https://doi.org/10.1007/S11>
- Fangchun, L., Shangjun, X., Hailin, M., Zhenyu, D., & Bingyao, M. (2013). Cytokinin-producing, plant growth-promoting rhizobacteria that confer resistance to drought stress in *Platycladus orientalis* container seedlings. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *97*(20), 9155–9164.

- Fathy, M., Saad Eldin, S. M., Naseem, M., Dandekar, T., & Othman, E. M. (2022). Cytokinins: Wide-spread signaling hormones from plants to humans with high medical potential. *Nutrients*, *14*(7). <https://doi.org/10.3390/nu14071495>
- Fibach-Paldi, S., Burdman, S., & Okon, Y. (2012). Key physiological properties contributing to rhizosphere adaptation and plant growth promotion abilities of *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiology Letters*, *326*(2), 99–108. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02407.x>
- Fleming, B. A., Blango, M. G., Rousek, A. A., Kincannon, W. M., Tran, A., Lewis, A. J., Russell, C. W., Zhou, Q., Baird, L. M., Barber, A. E., Brannon, J. R., Beebout, C. J., Bandarian, V., Hadjifrangiskou, M., Howard, M. T., & Mulvey, M. A. (2022). A tRNA modifying enzyme as a tunable regulatory nexus for bacterial stress responses and virulence. *Nucleic Acids Research*, *50*(13), 7570–7590. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac116>
- Frébort, I., Kowalska, M., Hluska, T., Frébortová, J., & Galuszka, P. (2011). Evolution of cytokinin biosynthesis and degradation. *Journal of Experimental Botany*, *62*(8), 2431–2452. <https://doi.org/10.1093/jxb/err004>
- Frébortová, J., & Frébort, I. (2021). Biochemical and structural aspects of cytokinin biosynthesis and degradation in bacteria. *Microorganisms*, *9*(6). <https://doi.org/10.3390/microorganisms9061314>
- Frébortová, J., Plíhal, O., Florová, V., Kokáš, F., Kubiasová, K., Greplová, M., Šimura, J., Novák, O., & Frébort, I. (2017). Light influences cytokinin biosynthesis and sensing in *Nostoc* (cyanobacteria). *Journal of Phycology*, *53*(3), 703–714. <https://doi.org/10.1111/jpy.12538>
- Galperin, M. Y. (2004). Bacterial signal transduction network in a genomic perspective. *Environmental Microbiology*, *6*(6), 552–567. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2004.00633.x>
- Gibb, M., Kisiala, A. B., Morrison, E. N., & Emery, R. J. N. (2020). The origins and roles of methylthiolated cytokinins: Evidence from among life kingdoms. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *8*, 605672. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.605672>

- Giron, D., Frago, E., Glevarec, G., Pieterse, C. M. J., & Dicke, M. (2013). Cytokinins as key regulators in plant-microbe-insect interactions: Connecting plant growth and defence. *Functional Ecology*, 27(3), 599–609. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12042>
- Gray, J., Celvin, S. B., Meilan, R., & Morris, R. O. (1996). Transfer RNA is the source of extracellular isopentenyladenine in a Ti-plasmidless strain of *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiol*, 110, 431–438.
- Hirose, N., Takei, K., Kuroha, T., Kamada-Nobusada, T., Hayashi, H., & Sakakibara, H. (2008). Regulation of cytokinin biosynthesis, compartmentalization and translocation. *Journal of Experimental Botany*, 59(1), 75–83. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm157>
- Hwang, H.-H., Yang, F.-J., Cheng, T.-F., Chen, Y.-C., Lee, Y.-L., Tsai, Y.-L., & Lai, E.-M. (2013). The Tzs protein and exogenous cytokinin affect virulence gene expression and bacterial growth of *Agrobacterium tumefaciens*. *Phytopathology*, 103(9), 888–899. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-01-13-0020-R>
- Jeon, W. B., Allard, S. T. M., Bingman, C. A., Bitto, E., Han, B. W., Wesenberg, G. E., & Phillips Jr., G. N. (2006). X-ray crystal structures of the conserved hypothetical proteins from *Arabidopsis thaliana* gene loci At5g11950 and AT2g37210. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 65(4), 1051–1054. <https://doi.org/10.1002/prot.21166>
- Kaminek, M., & Conrad, K. (2014). The cytokinin production of *Azospirillum* and *Klebsiella* and its possible ecological effects. <https://www.researchgate.net/publication/256111462>
- Kieber, J. J., & Schaller, G. E. (2014). Cytokinins. *The Arabidopsis Book* (pp. 1–35). <https://doi.org/10.1199/tab.0168>
- Kukimoto-Niino, M., Murayama, K., Kato-Murayama, M., Idaka, M., Bessho, Y., Tatsuguchi, A., Ushikoshi-Nakayama, R., Terada, T., Kuramitsu, S., Shirouzu, M., & Yokoyama, S. (2004). Crystal structures of possible lysine decarboxylases from *Thermus thermophilus* HB8. *Protein Science*, 13(11), 3038–3042. <https://doi.org/10.1110/ps.041012404>

- Lindner, A., & Schwartzenberg, K. (2016). Cytokinins. *eLS*, 1–10. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0020095.pub2>
- Lipsett, M. N., & Peterkofsky, A. (1966). Enzymatic thiolation of *E. coli* sRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 55(5), 1169–1174.
- Lomin, S. N., Krivosheev, D. M., Steklov, M. Yu., Osolodkin, D. I., & Romanov, G. A. (2012). Receptor properties and features of cytokinin signaling. *Acta Naturae*, 4(3), 31–45. <https://doi.org/10.32607/20758251-2012-4-3-31-45>
- McDougald, D., Rice, S. A., Barraud, N., Steinberg, P. D., & Kjelleberg, S. (2012). Should we stay or should we go: Mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. *Nature Reviews Microbiology*, 10(1), 39–50. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2695>
- Méndez-Gómez, M., Castro-Mercado, E., López-Bucio, J., & García-Pineda, E. (2021). *Azospirillum brasilense* Sp245 triggers cytokinin signaling in root tips and improves biomass accumulation in *Arabidopsis* through canonical cytokinin receptors. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 27(8), 1639–1649. <https://doi.org/10.1007/s12298-021-01036-9>
- Naseem, M., Wolfling, M., & Dandekar, T. (2014). Cytokinins for immunity beyond growth, galls and green islands. *Trends in Plant Science*, 19(8), 481–484.
- Naseem, Muhammad, Bencurova, Elena, & Dandekar, Thomas. (2018). The cytokinin activating LOG-family proteins are not lysine decarboxylases. 43(4), 232–236. <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.tibs.2018.01.002>
- O’Neal, L., Vo, L., & Alexandre, G. (2020). Specific root exudate compounds sensed by dedicated chemoreceptors shape *Azospirillum brasilense* chemotaxis in the rhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(15). https://doi.org/10.1128/AEM.01026-20/SUPPL_FILE/AEM.01026-20-SM002.MPG

- Persson, B. C., & Björk, G. R. (1993). Isolation of the gene (*miaE*) encoding the hydroxylase involved in the synthesis of 2-methylthio-cis-ribozeatin in tRNA of *Salmonella typhimurium* and characterization of mutants. *Journal of Bacteriology*, *175*(24), 7776–7785.
- Pertry, I., Václavíková, K., Depuydt, S., Galuszka, P., Spíchal, L., Temmerman, W., Stes, E., Schmölling, T., Kakimoto, T., Van Montagu, M. C. E., Strnad, M., Holsters, M., Tarkowski, P., & Vereecke, D. (2009). Identification of *Rhodococcus fascians* cytokinins and their modus operandi to reshape the plant. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(3), 929–934. <https://doi.org/10.1073/pnas.0811683106>
- Pierrel, F., Hernandez, H. L., Johnson, M. K., Fontecave, M., & Atta, M. (2003). MiaB protein from *Thermotoga maritima*. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(32), 29515–29524. <https://doi.org/10.1074/jbc.M301518200>
- Podlešáková, K., Fardoux, J., Patrel, D., Bonaldi, K., Novák, O., Strnad, M., Giraud, E., Spíchal, L., & Nouwen, N. (2013). Rhizobial synthesized cytokinins contribute to but are not essential for the symbiotic interaction between photosynthetic *Bradyrhizobia* and *Aeschynomene legumes*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*[®], *26*(10), 1232–1238. <https://doi.org/10.1094/MPMI-03-13-0076-R>
- Sakakibara, H., Kasahara, H., Ueda, N., Kojima, M., Takei, K., Hishiyama, S., Asami, T., Okada, K., Kamiya, Y., Yamaya, T., Yamaguchi, S., & MacMillan, J. (2005). *Agrobacterium tumefaciens* increases cytokinin production in plastids by modifying the biosynthetic pathway in the host plant. *PNAS July*, *12*(28), 9972–9977.
- Santner, A., Calderon-Villalobos, L. I. A., & Estelle, M. (2009). Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. *Nature Chemical Biology*, *5*(5), 301–307. <https://doi.org/10.1038/nchembio.165>
- Seo, H., & Kim, K.-J. (2017). Structural basis for a novel type of cytokinin-activating protein. *Scientific Reports*, *7*(1), 45985. <https://doi.org/10.1038/srep45985>

- Seo, H., Kim, S., Sagong, H.-Y., Son, H. F., Jin, K. S., Kim, I.-K., & Kim, K.-J. (2016). Structural basis for cytokinin production by LOG from *Corynebacterium glutamicum*. *Scientific Reports*, 6, 31390. <https://doi.org/10.1038/srep31390>
- Stes, E., Francis, I., Pertry, I., Dolzblasz, A., Depuydt, S., & Vereecke, D. (2013). The leafy gall syndrome induced by *Rhodococcus fascians*. *FEMS Microbiology Letters*, 342(2), 187–195. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12119>
- Strzelczyk, E., Kampert, M., & Li, C. Y. (1994). Cytokinin-like substances and ethylene production by *Azospirillum* in media with different carbon sources. *Microbiological Research*, 149(1), 55–60. [https://doi.org/10.1016/S0944-5013\(11\)80136-9](https://doi.org/10.1016/S0944-5013(11)80136-9)
- Taylor, J. L., Zaharia, L. I., Chen, H., Anderson, E., & Abrams, S. R. (2006). Biotransformation of adenine and cytokinins by the rhizobacterium *Serratia proteamaculans*. *Phytochemistry*, 67(17), 1887–1894. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.06.016>
- Tien, T. M., Gaskins, M. H., & Hubbell, D. H. (1979). Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). *Applied and Environmental Microbiology*, 37(5), 1016–1024.
- Tokunaga, H., Kojima, M., Kuroha, T., Ishida, T., Sugimoto, K., Kiba, T., & Sakakibara, H. (2012). *Arabidopsis* lonely guy (LOG) multiple mutants reveal a central role of the LOG-dependent pathway in cytokinin activation. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 69(2), 355–365. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04795.x>
- Van Puyvelde, S., 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. *Microbial Ecology*, 61(4), 723–728. <https://doi.org/10.1007/s00248-011-9819-6>

- Wang , Fang-Fang, Cheng, Shou-Ting, Wu, Yao, Ren, Bao-Zhen, & Qian, Wei. (2017). A bacterial receptor PcrK senses the plant hormone cytokinin to promote adaptation to oxidative stress. *21*, 2940–2951. <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.celrep.2017.11.017>
- Wei, X., Moreno-Hagelsieb, G., Glick, B. R., & Doxey, A. C. (2023). Comparative analysis of adenylate isopentenyl transferase genes in plant growth-promoting bacteria and plant pathogenic bacteria. *Heliyon*, *9*(3), e13955. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e13955>
- Zaheer, M. S., Ali, H. H., Iqbal, M. A., Erinle, K. O., Javed, T., Iqbal, J., Hashmi, M. I. U., Mumtaz, M. Z., Salama, E. A. A., Kalaji, H. M., Wróbel, J., & Dessoky, E. S. (2022). Cytokinin production by *Azospirillum brasilense* contributes to increase in growth, yield, antioxidant, and physiological systems of wheat (*Triticum aestivum L.*). *Frontiers in Microbiology*, *13*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.886041>
- Zhao, J., Leung, H.-C. E., & Winkler, M. E. (2001). The *miaA* mutator phenotype of *Escherichia coli* K-12 requires recombination functions. *Journal of Bacteriology*, *183*(5), 1796–1800. <https://doi.org/10.1128/JB.183.5.1796-1800.2001>