



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE PUEBLA**



**CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS
POSGRADO EN MICROBIOLOGÍA**

**“PAPEL DE LA INDOL PIRUVATO FERREDOXINA
OXIDORREDUCTASA DE AZOSPIRILLUM BRASILENSE EN LA
PRODUCCIÓN DE ÁCIDO INDOL-3-ACÉTICO Y LA
COLONIZACIÓN AL TRIGO”**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA)**

**CON OPCIÓN EN: BIOQUÍMICA Y GENÉTICA
MICROBIANA**

**PRESENTA:
CYNTHIA MARCOS JIMÉNEZ**

DIRECTORA: D.C. BEATRIZ EUGENIA BACA

ENERO, 2017

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar en estas líneas mi agradecimiento eterno a quienes de alguna u otra forma contribuyeron a la culminación de este proyecto.

Gracias Dios por no dejarme sola durante estos ocho años que he vivido lejos de casa, por darme la fuerza para no desistir y cumplir mis metas.

A mis padres Gilberto Marcos Toledo y Marbella Jiménez Piñon porque nunca me han dejado de apoyar en las decisiones que he tomado, una de estas fue continuar una maestría, agradezco que confíen en mi y que me motiven a no desistir. A pesar de estar lejos siempre están conmigo. Así mismo agradezco a mis hermanos William, Cruz y Yasli por cada palabra de motivación que me han hecho llegar hasta donde estoy este día.

Agradezco a la Dra. Beatriz Eugenia Baca por darme la oportunidad de seguir trabajando bajo su dirección, por su paciencia que sin duda la he puesto a prueba durante varias ocasiones, por los conocimientos que me ha brindado que sin duda son invaluable y que se bien que me serán de ayuda a cualquier lado al que me dirija. Gracias porque he llegado al laboratorio sin ningún conocimiento y después de estos años me doy cuenta que me llevo mucho aprendizaje.

Así también quiero agradecer al D.C Alberto Ramírez Mata y a la Q.F.B María Luisa Xiqui por sus consejos durante la realización del trabajo que sin duda contribuyeron a culminar este proyecto.

No podía faltar agradecerle al M.C Saúl Jijón Moreno por todo el conocimiento que me ha brindado, desde el primer día en el laboratorio hasta el último me has apoyado, por tu amistad que me has brindado incondicionalmente, siempre te estaré agradecida.

A Elvia, Toño, Areli y Lili les agradezco los momentos que hemos pasado juntos, las risas, la convivencia en el laboratorio y fuera del mismo, encontrarnos en este camino ha sido maravilloso, gracias por su amistad.

A todos ellos, ¡muchas gracias!

DEDICATORIA

Con todo mi amor y cariño dedico este trabajo a mis padres Gilberto Marcos Toledo y Marbella Jiménez Piñón. Ustedes son el impulso que me motiva a seguir adelante todos días.

Tabla de contenido

AGRADECIMIENTOS	2
DEDICATORIA	3
TABLA DE CONTENIDO	4
LISTADO DE ABREVIATURAS	7
INDICE DE FIGURAS	8
INDICE DE TABLAS	9
RESUMEN	10
INTRODUCCIÓN	12
Bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) y mecanismos de acción.....	12
Fijación biológica de nitrógeno.....	13
Solubilización de fosfatos.....	13
Producción de sideróforos.....	14
Actividad ACC desaminasa.....	14
Biosíntesis de compuestos antimicrobianos.....	15
Inducción de la respuesta sistémica.....	15
Biosíntesis de fitohormonas.....	15
El AIA como molécula señal.....	16
<i>Azospirillum</i>	16
Producción de AIA en <i>Azospirillum</i>	17
Colonización por <i>Azospirillum</i>	20
ANTECEDENTES	21
OBJETIVOS	23
HIPÓTESIS	23
JUSTIFICACIÓN	24
DIAGRAMA DE TRABAJO	25

MATERIAL Y MÉTODOS	26
Material biológico.....	26
Extracción de DNA y PCR.....	28
Diseño de iniciadores y análisis bioinformático del gen <i>iorA</i>	28
Construcción del plásmido p Δ <i>iorA</i>	29
Construcción de los plásmidos pAZBR-mCh y pAZBR-PiorA y análisis de la expresión del promotor <i>iorA</i>	31
Construcción de los plásmidos pT7mCh y pT7PiorA.....	33
Conjugación y análisis de mutantes.....	34
Microscopía de fluorescencia de las cepas etiquetadas de <i>A. brasilense</i>	35
Curva de crecimiento.....	35
Cuantificación de la producción de AIA por HPLC.....	36
Cuantificación de UFC's.....	36
Ensayo de colonización al trigo.....	37
Microscopía confocal.....	38
RESULTADOS	39
Análisis bioinformático del gen <i>iorA</i>	39
Obtención de la mutante Δ <i>iorA</i> de <i>A. brasilense</i>	42
Curva de crecimiento de las cepas de <i>A. brasilense</i>	44
Cuantificación de la producción de AIA en la cepa mutante Δ <i>iorA</i> y la cepa silvestre <i>A. brasilense</i> Sp7.....	45
Obtención de las cepas etiquetadas AZBR-PiorA y AZBR-mCh de <i>A. brasilense</i>	45
Microscopía de fluorescencia de las cepas <i>A. brasilense</i> AZBR-PiorA y AZBR-mCh.....	47
Obtención de las cepas etiquetadas T7PiorA y T7mCh de <i>A. brasilense</i>	48
Microscopía de fluorescencia de las cepas de <i>A. brasilense</i>	49
Conteo de UFC's en placa.....	56
Ensayo de colonización al trigo.....	57

DISCUSIÓN	60
CONCLUSIÓN	64
PERSPECTIVAS	65
BIBLIOGRAFÍA	66
ANEXO 1. Mapa físico del plásmido PJMS-Km.....	70
ANEXO 2. Southern blot de la cepa mutante <i>A.brasilense</i> Δ iorA.....	71
ANEXO 3. Microscopía confocal de las cepa mutante Δ iorA de <i>A.brasilense</i>	72

LISTADO DE ABREVIATURAS

2-4-diacetilfluoroglucinol (2-4-DAPG)

Ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC)

Ácido indol-3 acético (AIA)

Ácido indol-3-piruvico (IPyA)

Ampicilina (Ap)

Carbono (C)

Elemento de respuesta a auxinas (AuxRE)

Fósforo (P)

Indol piruvato decarboxilasa (IPDC)

Indol-3-acetonitrilo (IAN)

Kanamicina (Km)

Nitrógeno (N)

Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR)

Respuesta sistémica adquirida (RSA)

Respuesta sistémica inducida (RSI)

Tetraciclina (Tc)

Tiamina difosfato (TPP)

Triptamina (TAM)

Triptófano (Trp)

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.-Vías de síntesis de AIA.....	19
Figura 2.- Esquema de la mutante <i>A. brasilense</i> Δ iorA.....	31
Figura 3.- Esquema de las cepas etiquetadas <i>A. brasilense</i> pAZBR-mCh y pAZBR-PiorA.....	33
Figura 4.- Esquema de la construcción de los plásmidos pT7mCh y pT7PiorA.....	34
Figura 5.- Montaje de la muestra para microscopía confocal.....	38
Figura 6.- Análisis de la secuencia del probable promotor del gen <i>iorA</i> de <i>A. brasilense</i> Sp7 y Sp245.....	40
Figura 7.- Diagrama del contexto genético del gen <i>iorA</i> en diversas especies y cepas.....	41
Figura 8.- Análisis de los dominios de la proteína IorA.....	41
Figura 9.- Construcción del plásmido pJMS-mChKm.....	42
Figura 10.- Obtención de la mutante <i>A. brasilense</i> Δ iorA.....	43
Figura 11.- Curva de crecimiento de las cepas de <i>Azospirillum</i>	44
Figura 12.- Determinación de la producción de AIA.....	45
Figura 13.- Análisis de las cepas etiquetadas <i>A. brasilense</i> AZBR-PiorA y AZBR-mCh.....	47
Figura 14.- Microscopía de fluorescencia de las cepas etiquetadas <i>A. brasilense</i> AZBR PiorA y AZBR-mCh	48
Figura 15.- Obtención de las cepas etiquetadas <i>A. brasilense</i> T7PiorA y T7mCh.....	49
Figura 16.- Microscopía de fluorescencia de las cepas de <i>A. brasilense</i>	55
Figura 17.- Conteo de UFC.....	56
Figura 18.- Ensayo de colonización al trigo.....	57
Figura 19.- Microscopía confocal de las cepas de <i>A. brasilense</i>	59

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Cepas y plásmidos utilizados.....	26
Tabla 2.-Oligonucleótidos utilizados.....	29

RESUMEN

El uso indiscriminado de fertilizantes químicos ha traído consigo problemas ambientales graves. La búsqueda de estrategias amigables con el ambiente ha llevado al uso de bacterias promotoras del crecimiento vegetal, conocidas como PGPR. Los miembros del género *Azospirillum* tienen la capacidad de sintetizar fitohormonas, entre las que destaca el ácido indol 3-acético (AIA), el cual promueve el crecimiento de la raíz principal, el desarrollo de raíces laterales y de los pelos radiculares, que aumentan la captación de nutrientes y agua del suelo. La vía de producción de AIA más estudiada es la vía del ácido indol pirúvico, en la que interviene principalmente el gen *ipdC* contribuyendo hasta con el 90% de la síntesis de esta molécula. Se propone que en *Azospirillum brasilense* están presentes otras vías alternas para la producción de esta fitohormona, por lo que en este estudio se analizó la participación del gen *iorA* en la producción de AIA y la colonización al trigo. El análisis se realizó cuantificando la producción de AIA por HPLC en una mutante *iorA*. Mediante microscopía de fluorescencia y confocal se evaluó la expresión del gen en asociación con la planta y el sitio de colonización de la bacteria, así como su potencial de colonización al trigo mediante el conteo de Unidades Formadoras de Colonia (UFC). Los resultados apuntan a que el gen *iorA* contribuye con un 20% de la síntesis de AIA en fase estacionaria temprana, mientras que la mutación de este gen no interviene en la colonización de la bacteria a la planta.

PAPEL DE LA INDOL PIRUVATO FERREDOXINA OXIDOREDUCTASA DE AZOSPIRILLUM BRASILENSE EN LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO INDOL-3-ACÉTICO Y LA COLONIZACIÓN AL TRIGO.

INTRODUCCIÓN

En el suelo existe una gran cantidad de bacterias que se encuentran colonizando la rizósfera de las plantas, llevando a cabo interacciones simbióticas o parásitas. Estas relaciones se desarrollan debido a que las plantas le proporcionan nutrientes a las bacterias a través de los exudados radiculares, los cuales están constituidos por: iones, enzimas, azúcares, vitaminas, proteínas, hormonas y aminoácidos, mientras que las bacterias, a través de diversos mecanismos, promueven el crecimiento de las plantas (Badri *et al.*, 2009), a estas bacterias se les conoce como: PGPR o PGPB (*plant growth-promoting rhizobacteria* o *plant growth-promoting bacteria*, acrónimos del Inglés, respectivamente) por su capacidad de colonizar y estimular el crecimiento de las plantas (Gündisch *et al.*, 1993; Shih-Yao *et al.*, 2011; Gray y Smith, 2005). Las PGPR pueden actuar modulando el desarrollo de la raíz, los efectos más comunes son el incremento en número y longitud de las raíces laterales y los pelos radiculares, aumentando consigo la nutrición de la planta y modificando la transcripción de genes y la producción de metabolitos (Vacheron *et al.*, 2013). Se han estudiado varios géneros de bacterias PGPR entre las se encuentran representantes de los géneros: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Pseudomonas*, *Azotobacter* y *Azospirillum* (Spaepen *et al.*, 2007).

BACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL (PGPR) Y MECANISMOS DE ACCIÓN

Las PGPR colonizan la rizósfera, aislándose tanto en la superficie de la raíz o incluso al interior de la misma (bacterias endófitas) encontrando un ambiente óptimo para establecerse y ser eficientes en la promoción del crecimiento (Gray y Smith, 2005). Diversos son los mecanismos por los cuales estas bacterias

promueven el crecimiento de las plantas, ya sea actuando de manera directa o indirecta:

Indirectamente cuando las PGPR disminuyen el efecto nocivo que tienen los patógenos que colonizan las plantas, por ejemplo, al producir sustancias antagónicas, o la inducción de factores relacionados a la respuesta sistémica inducida (ISR) en las plantas. De manera directa a través de la producción de auxinas, giberelinas, o facilitando la captación de nutrientes del ambiente como el nitrógeno, hierro por medio de los sideróforos y la solubilización de fosfatos, por mencionar algunos (Beneduzi *et al.*, 2012; Glick, 1995). Brevemente se describen los mecanismos antes mencionados:

➤ Fijación biológica de nitrógeno.

Del total del nitrógeno disponible en la atmósfera, sólo una pequeña porción está disponible en una forma asimilable para las plantas. Una considerable cantidad es suministrada a las plantas a través de los fertilizantes químicos. Las bacterias pueden reducir el dinitrógeno gaseoso (N_2) a amonio (NH_4^+) a través del complejo de la nitrogenasa, éste es un mecanismo en la simbiosis rizobia-leguminosa que hace disponible el NH_4^+ a la planta (Zahran, 1999; Bulgarelli *et al.*, 2013). El interés por las bacterias fijadoras de nitrógeno ha llevado a prestar atención en estos organismos, ya que son una solución ecológica para la restauración de suelos agrícolas (Mandimba, 1995).

➤ Solubilización de fosfatos.

La contribución del nitrógeno así como del fósforo es indispensable para el crecimiento de la planta, menos del 5% de la cantidad de fósforo del suelo se encuentra disponible. Los microorganismos tienen la capacidad de solubilizar el fósforo para que las plantas lo absorban. La solubilización de este elemento se lleva a cabo a través de formación de ácidos orgánicos

como el succinato, citrato, gluconato, los cuales bajan el pH solubilizando el fosfato, o por la acción de fosfatasa (Bulgarelli *et al.*, 2013).

➤ Producción de sideróforos.

La disponibilidad de hierro en el ambiente es baja, los sideróforos son moléculas que captan el ión Fe^{3+} y lo hacen disponible para su adquisición por las plantas. Los sideróforos producidos por rizobacterias promueven el crecimiento de las plantas incrementando la disponibilidad de hierro en la cercanía de la raíz o por la inhibición de la colonización de las raíces por patógenos, al secuestrar el hierro (Lee *et al.*, 2011; Bulgarelli *et al.*, 2013; Abd-Alla, 1999). La presencia de metales pesados en el suelo promueve la biosíntesis de sideróforos en bacterias. Un ejemplo de una planta que requiera la utilización de sideróforos producidos por bacterias es *Avena sativa*, para la adquisición de hierro del ambiente (Crowley *et al.*, 1988).

➤ Actividad ACC desaminasa.

La capacidad de algunas bacterias de convertir ACC (ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico) a amonio y α -cetobutirato mediante la enzima ACC desaminasa provee a las PGPR una ventaja competitiva frente a otros organismos de la rizósfera. Las raíces y semillas de las plantas poseen cantidades significantes de ACC las cuales son aprovechadas por estos organismos, mientras que las plantas se ven beneficiadas al disminuir este compuesto que se convierte en etileno el cual les provoca senescencia. La muerte de árboles de pino que son infectados por *Bursaphelenchus xylophilus* indican que los niveles de etileno aumentan considerablemente durante la infección, los estudios muestran que usando *Pseudomonas putida* UW4 se reducen los niveles de etileno mediante la vía de la ACC desaminasa (Li *et al.*, 2001; Nascimento *et al.*, 2013).

➤ Biosíntesis de compuestos antimicrobianos.

Los microorganismos pueden sintetizar gran cantidad de compuestos con actividad antimicrobiana. El 2-4-diacetilfluoroglucinol (2-4-DAPG), la pirrolnitrina y la viscosinamida son ejemplos de compuestos antimicrobianos producidos por algunas especies de *Pseudomonas*. Las fenazinas son compuestos con un amplio espectro antimicrobiano y han sido identificadas en *Pseudomonas*; *Burkholderia*, *Streptomyces* y *Brevibacterium* (Couillerot *et al.*, 2011; Bulgarelli *et al.*, 2013).

➤ Inducción de resistencia sistémica.

La inducción de la resistencia sistémica es un mecanismo por el cual las plantas se defienden de un amplio espectro de patógenos y parásitos. Existen dos tipos de resistencia sistémica, la resistencia sistémica adquirida (RSA) y la resistencia sistémica inducida (RSI). La RSI es desencadenada por las PGPRs, esta RSI depende de la activación de vías de jasmonato y etileno. Especies de *Pseudomonas* inducen la resistencia sistémica en plantas de *Arabidopsis* (Choudhary *et al.*, 2007; Lavicoli *et al.*, 2003).

➤ Biosíntesis de fitohormonas.

Las fitohormonas son compuestos químicos que promueven el crecimiento de las plantas y se dividen en 5 grupos: citocininas, giberelinas, ácido abscísico, etileno y auxinas. Las auxinas tienen numerosos efectos positivos en el crecimiento de las plantas tales como tropismo hacia la luz, división celular, diferenciación del tejido vascular e iniciación y formación de la raíz. La auxina más importante es el AIA el cuál se forma mediante su precursor el aminoácido triptófano (Trp). Varios estudios demostraron que el AIA es sintetizado por diversas PGPR en particular el género *Azospirillum*; objeto de este estudio, que promueve efectos positivos en el crecimiento de las raíces de las plantas, proporcionando un aumento en la captación de nutrientes y

agua (Bulgarelli *et al.*, 2013; Jaroszuk-Scisel *et al.*, 2014; Tesavkelova *et al.*, 2005; Steenhoudt y Vanderleyden 2000; Ona *et al.*, 2005).

EL AIA COMO MOLÉCULA SEÑAL

El AIA actúa como una molécula señal tanto en plantas como en microorganismos. A pesar de ser organismos diferentes la síntesis de esta auxina es muy similar en ambos. En plantas el AIA tiene un papel tanto en el crecimiento de las partes apicales de plantas como en la senescencia de las mismas, en la respuesta a la luz (fototropismo) y en el desarrollo vascular (Koul *et al.*, 2014). Debido a la importancia que tiene esta molécula en la regulación de distintos procesos en plantas, la regulación es estricta, encontrando que se puede producir por distintas vías o almacenar en forma de otros compuestos (Spaepen *et al.*, 2007). Ensayos realizados con plantas de *Arabidopsis thaliana* en medios suplementados con AIA demostraron el papel de esta molécula en la producción de raíces laterales y adventicias, mientras que mutantes deficientes en la producción de AIA disminuyen la formación de estas raíces (Woodward y Bartel, 2005). En la bacteria, el AIA promueve la expresión de genes relacionados a la adherencia, la virulencia y la adaptación al estrés, así como genes implicados en la misma producción de AIA (Spaepen *et al.*, 2007) resultando en un mecanismo de retro-regulación positiva, un ejemplo de la expresión de genes en presencia de AIA es el gen *ipdC* que codifica para la enzima más importante de la vía del ácido indol-3 piruvico (IPyA) para la producción de AIA el cuál se sobreexpresa en presencia de la fitohormona en *A. brasilense* (Malhotra y Srivastava, 2008; Broek *et al.*, 1999).

AZOSPIRILLUM

Azospirillum pertenece al grupo de las α proteobacterias. Las primeras especies de este género fueron descritas por primera vez por Tarrand en 1978, se han descrito 18 especies entre las que destacan *A. lipoferum* y *A. brasilense* por ser las más estudiadas, sin embargo, *A. amazonense*, *A. halopraeferans*, *A. irakense*, *A.*

largomobile, *A. dobereineriae*, *A. oryzae*, *A. melinis*, *A. canadense*, *A. rugosum*, *A. palatum*, *A. picis*, *A. thiophilum* y *A. zae* (Mehnaz *et al.*, 2007; Cecagno *et al.*, 2015) forman también parte de este género (Massena *et al.*, 2011, Shih-Yao, *et al.*, 2011). Debido a su importancia, el género está en constante revisión (Lin *et al.*, 2014). Recientemente se ha caracterizado la especie *A. agrícola* (Lin *et al.*, 2016).

Azospirillum tiene un metabolismo versátil de Carbono (C) y Nitrógeno (N), lo cual sugiere lo bien adaptadas que están a un ambiente competitivo como el de la rizósfera. En condiciones desfavorables como la desecación o la limitación de nutrientes, *Azospirillum* sufre diferenciación celular de la célula vegetativa a una forma de quiste para sobrevivir a condiciones de estrés, al cual está sometido. Ese cambio va acompañado por la producción de una cubierta de polisacáridos y de gránulos de poli- β -hidroxibutirato, que proporcionará una fuente de carbono. Se sabe que algunas especies de *Azospirillum* como *A. brasilense* y *A. lipoferum* presentan un movimiento flagelar mixto compuesto de un flagelo polar que proporciona movilidad en un medio líquido, mientras que los flagelos laterales se desarrollan en medio semisólidos (Steenhoudt y Vanderleyden, 2000).

Dentro de los mecanismos que presenta este género y por los cuales se considera una PGPR se encuentran la producción de sideróforos, la fijación de nitrógeno, la producción de óxido nítrico y principalmente la síntesis de AIA (Steenhoudt y Vanderleyden, 2000).

PRODUCCIÓN DE AIA EN AZOSPIRILLUM

De las fitohormonas producidas por el género *Azospirillum* e implicadas en el proceso de aumento de crecimiento en las plantas están el AIA, sintetizado a partir de 3 vías dependientes de triptófano como precursor, sin embargo ninguna de ellas ha sido totalmente caracterizada (Szkop y Bielawski, 2013). Una de las vías más estudiadas es la que involucra al gen *ipdC*, el cual codifica para la enzima indol-3-piruvato decarboxilasa (IPDC), así como los genes histidinol fosfato aminotransferasa que codifican para las enzimas aromático aminotransferasas. El primer paso en la vía de síntesis del AIA es la conversión del precursor triptófano

por las AAT mediante un proceso de transaminación y posteriormente descarboxilado por la enzima IPDC para convertirse en indol 3-acetaldehído y finalmente a AIA por la enzima indol acetaldehído deshidrogenasa (IAAd) (Fig. 1). Se considera que ésta es la vía principal para la producción del AIA (Spaepen *et al.*, 2007; Patten *et al.*, 2012). Datos experimentales apoyan la existencia de vías alternativas para la producción de este compuesto en *Azospirillum* ya que la interrupción del gen *ipdC* no inhibe completamente la producción de AIA, quedando un 10% de producción de esta fitohormona (Spaepen *et al.*, 2007; Carreño-López *et al.*, 2000). De igual manera mediante ensayos de HPLC se han podido identificar compuestos intermediarios de otras vías (Carreño-López *et al.*, 2000).

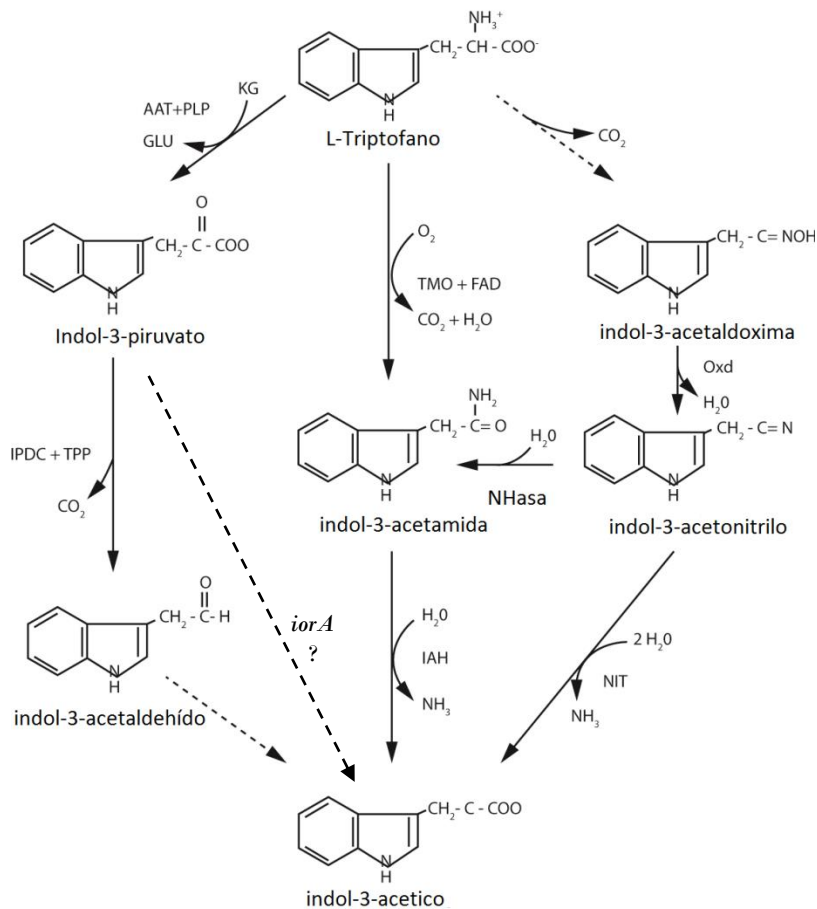


Fig. 1. Vías de síntesis de AIA. La síntesis de AIA requiere del aminoácido Trp como su precursor. Tres vías son las más estudiadas, la vía del indol acetamida, la vía del indol acetamida y la vía del indol pirúvico. Las enzimas AAT (aromático amino transferasas) e IPDC (indol piruvato descarboxilasa) catalizan la conversión de este aminoácido a AIA. Fuente: Patten *et al.*, 2012.

Dentro de estas otras vías propuestas para la síntesis de AIA son las de los intermediarios: indol 3-acetamida, triptamina, e indol 3-acetonitrilo, de las cuales no se conocen todos los genes ni las enzimas que intervienen por lo que no han sido caracterizadas completamente (Spaepen *et al.*, 2007). Debido a la importancia que ha cobrado el género *Azospirillum* se han analizado los genes involucrados en la producción de AIA en las distintas especies. La variedad de plásmidos y el arreglo de los genes en dicho género hacen que existan diferencias en las vías de producción de esta fitohormona (Sant'Anna *et al.*, 2011). En *A. amazonense* los genes de la vía TAM (triptamina) e IAN (indol-3-acetonitrilo) para la síntesis de AIA

están presentes por lo que se sugiere que éstas sean las vías utilizadas por esta bacteria (Cecagno *et al.*, 2015). En *A. brasilense* SM la vía IPyA es la utilizada para sintetizar AIA, no estando presente los genes de la vía IAM (indol-3-acetamida) (Malhotra y Srivastava, 2006). En *A. brasilense* Sp7 las vías IAN y TAM se propone están presentes (Carreño-López *et al.*, 2000).

COLONIZACIÓN POR AZOSPIRILLUM

Los miembros del género *Azospirillum* se encuentra presentes en asociación con plantas de cereales, caña de azúcar, frutales, pastos forrajeros e incluso orquídeas proporcionándole a la planta beneficios para su crecimiento, por lo cual se le considera una PGPR y en algunos países ha sido implementada como biofertilizante, reduciendo así el uso de fertilizantes químicos (Massena *et al.*, 2011). Algunas cepas de *A. lipoferum* y *A. brasilense* son capaces de colonizar el interior de la raíz. El proceso de colonización de la bacteria consta de dos fases: absorción y anclaje. La fase de absorción es rápida y reversible mientras que la segunda es lenta e irreversible. Una vez establecida, la bacteria puede obtener nutrientes mediante los exudados radiculares de la planta. La colonización de la bacteria principalmente se observa como agregados celulares en la superficie de los pelos radiculares y raíces laterales y dependiendo de la cepa pueden observarse diferencias en los sitios de colonización. Las cepa Sp245 de *A. brasilense* se encuentra colonizando el interior de la raíz mientras que la cepa Sp7 únicamente la superficie radicular (Bashan *et al.*, 2004). Concentraciones de 10^5 a 10^6 UFC/ml se han reportado como óptimas para estimular el crecimiento de la planta por estas bacterias (Dobbelaere *et al.*, 1999).

ANTECEDENTES

El estudio del rol que podría tener esta fitohormona en la interacción bacteria-planta llevó a realizar mutaciones en los genes responsables de la producción de esta auxina. En *A. brasilense* se han generado mutantes del gen *ipdC*, el cual es el principal gen en la vía de producción de AIA, encontrando que la producción disminuye drásticamente (Malhotra y Srivastava, 2008; Spaepen *et al.*, 2008). Además, al analizar el promotor de este gen se encontró una región conocida como elemento de respuesta a auxinas (AuxRE), el cual tiene una secuencia conservada **TGTCTC** similar a la localizada en los genes que responden a AIA en plantas. El elemento AuxRE se sabe que es el sitio blanco de factores transcripcionales en plantas (Lambrecht *et al.*, 2000), por lo que la distinta organización del promotor de este gen entre las cepas *A. brasilense* Sp7 y SM indicaría que la regulación podría ser diferente entre las cepas (Malhotra y Srivastava, 2008).

El AIA promueve la expresión de distintos genes, esto fue analizado al realizar un transcriptoma en *A. brasilense* Sp245 adicionando AIA a la cepa silvestre y a una cepa mutante en el gen *ipdC*, se encontró que se expresaron diferencialmente genes relacionados al metabolismo, a la producción de óxido nítrico, al sistema de secreción tipo VI entre otros (Van Puyvelde *et al.*, 2011). En dicho trabajo se observó que el gen *iorA* se sobreexpresa hasta 16 veces más en presencia de AIA en *A. brasilense* Sp245 (Van Puyvelde *et al.*, 2011). Mientras que en *Bradyrhizobium japonicum* se sobreexpresa hasta 30 veces más (Donati *et al.*, 2013). En *Herbaspirillum seropedicae* se propone que la producción de AIA se lleva a cabo por la vía del indol piruvato en donde participan las enzimas triptófano transaminasa e indol piruvato ferredoxina oxidoreductasa (Pedroza *et al.*, 2011). Una indol piruvato oxidoreductasa fue caracterizada en la bacteria termófila *Pyrococcus furiosus*, encontrando que esta enzima utiliza como sustrato al indol piruvato en presencia de su cofactor, la tiamina bifosfato (Mai y Adams, 1994). Mientras que el gen *iorA* de *Rhizobium tropici* se sobreexpresa en presencia de triptófano por lo que se propuso como un gen que podría estar implicado en la síntesis de AIA (Imada *et al.*, 2016).

El AIA tiene un papel en la colonización de la bacteria a la planta. En *Pantoea agglomerans* una mutante deficiente en la producción de AIA coloniza deficientemente las raíces de frijol comparada con la cepa silvestre (Spaepen *et al.*, 2007). *A. brasilense* es capaz de colonizar la rizósfera de las plantas, tanto la superficie como el interior de la misma. El papel de AIA en la colonización de *Azospirillum* se analizó en mutantes de la cepa SM superproductoras de AIA observando que las mutantes colonizaban más la superficie de plantas de sorgo, encontrándose mayor número de células adheridas a la superficie y mayor número de pelos radiculares (Kochar y Srivastava, 2012; Malhotra y Srivastava, 2006).

OBJETIVOS:

GENERAL: Evaluar el papel de la indol piruvato ferredoxina oxidoreductasa de *Azospirillum brasilense* en la producción de ácido indol -3-acético y la colonización al trigo.

PARTICULARES:

- Cuantificar la producción de AIA en la cepa mutante $\Delta iorA$ de *A. brasilense* y en la cepa silvestre Sp7.
- Analizar la expresión del gen *iorA* de *A. brasilense* en asociación con la planta de trigo.
- Analizar el efecto de la mutación de la indol piruvato ferredoxina oxidoreductasa en la colonización de *A. brasilense* al trigo.

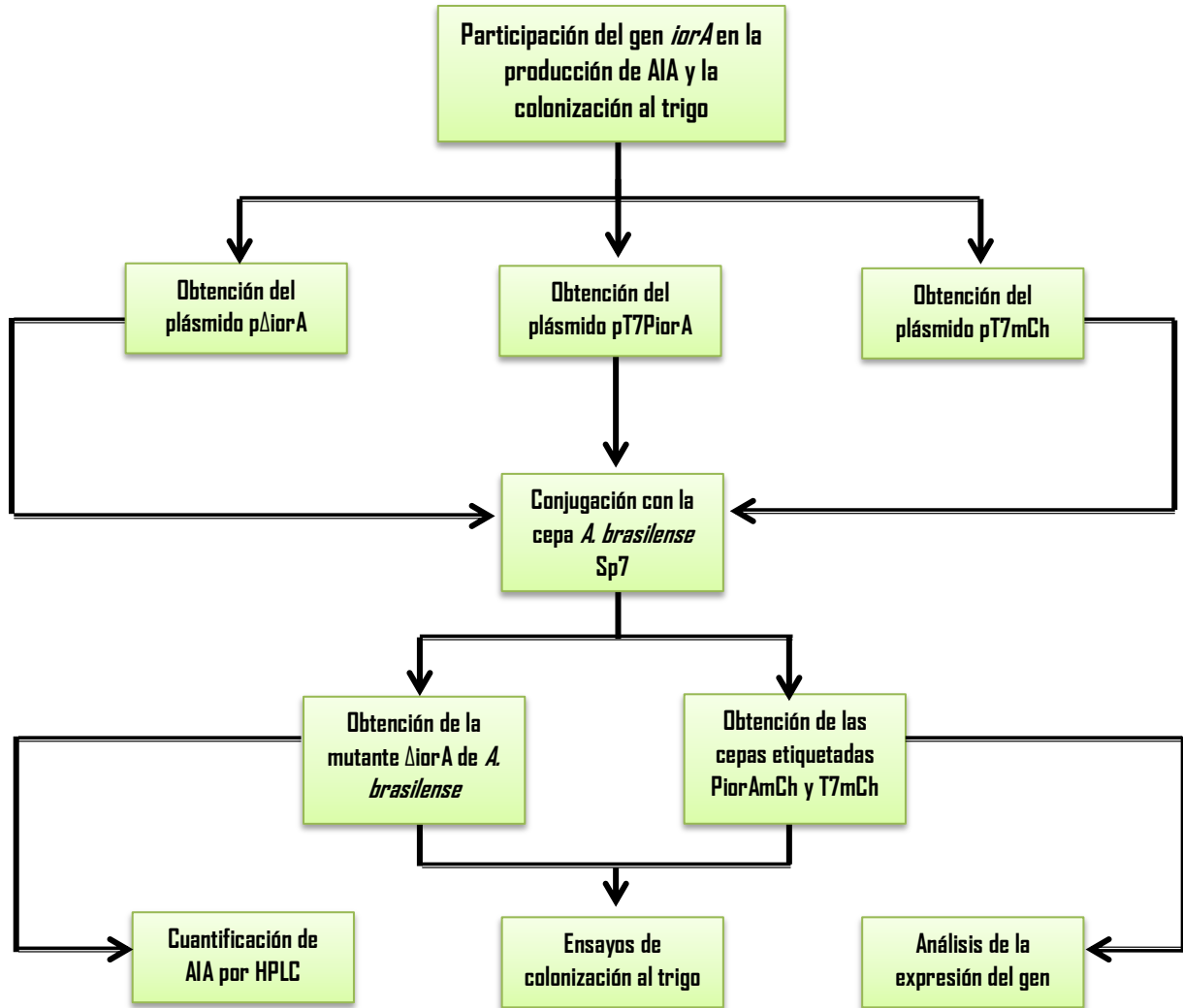
HIPÓTESIS

El gen *iorA* participa en la producción de AIA en *A. brasilense* Sp7 y se expresa en asociación con la planta.

JUSTIFICACIÓN

El descubrimiento de bacterias promotoras del crecimiento vegetal y su aplicación como biofertilizantes, permite obtener una mayor producción de alimento para la demanda que se requiere hoy en día debido al aumento de la población, sin embargo, antes de la aplicación de estos organismos se requiere una investigación de los mecanismos por los cuales la bacteria favorece el crecimiento de los cultivos. Son varios los mecanismos responsables de la promoción del crecimiento en *Azospirillum* pero uno de los más importantes es la producción de AIA. Conocer las distintas vías y los genes que participan en la producción de esta molécula permitirá en un futuro cercano el manejo de las mismas y la sobreexpresión de los genes de la vía, lo que traerá consigo una mejora en la promoción del crecimiento.

DIAGRAMA DE TRABAJO



MATERIAL Y METODOS

➤ Material biológico

Las cepas utilizadas en este trabajo se encuentran descritas en la Tabla 1. Las cepas de *E. coli* se crecieron en medio LB a 37°C con agitación a 150 rpm. Las cepas de *Azospirillum* se crecieron en medio mínimo K-Malato a 30°C durante 18 h, con una agitación a 150 rpm. El medio de cultivo fue adicionado con el antibiótico de selección dependiendo de la resistencia de la cepa: ampicilina (Ap) 100 µg/ml, tetraciclina (Tc) 15 µg/ml o kanamicina (Km) 50 µg/ml (Tabla 1). Para el protocolo de transformación se utilizaron células quimiocompetentes de *E. coli* (DH5α o S17.1) preparadas por el método de CaCl₂ (Sambrook *et al.*, 1989).

Tabla 1. Cepas y plásmidos utilizados en este estudio.

Nombre	Descripción	Referencia
Cepas		
<i>Escherichia coli</i> DH5α	<i>endA1 hsdR17 supE44 thi-1λ-recA1 gyrA96 relA1 ΔlacU169 Ø80 (ΔlacZΔM15)</i>	Invitrogen, Carlsbad, CA
<i>Escherichia coli</i> S17.1	<i>pro, thi hsd, recA,:: RP4-2 Tc:: Mu- Km Tn7</i>	Simon <i>et al.</i> 1983
<i>A. brasilense</i> Sp7	Cepa silvestre	Tarrand <i>et al.</i> (1978)
<i>A. brasilense</i> Sp245	Cepa silvestre	Baldani <i>et al.</i> 1987
<i>A. brasilense</i> Δ <i>iorA</i>	Cepa mutada por delección del gen <i>iorA</i> derivada de la cepa silvestre <i>A. brasilense</i> Sp7, Km ^R	Este trabajo
<i>A. brasilense</i> AZBR-mCh	Cepa etiquetada en cromosoma con el gen de la proteína mCherry. Derivada de la cepa silvestre <i>A. brasilense</i> Sp7, Km ^R	Este trabajo
<i>A. brasilense</i> AZBR-PiorA	Cepa etiquetada en cromosoma contiene el promotor de <i>iorA</i> fusionado al gen de la proteína mCherry. Derivada de la cepa	Este trabajo

<i>A. brasiliense</i> T7PiorA	silvestre <i>A. brasiliense</i> Sp7, Km ^R Cepa etiquetada en cromosoma contiene el promotor del gen <i>iorA</i> fusionado al gen de la proteína mCherry, y terminador T7 río arriba del promotor. Derivada de la cepa silvestre <i>A. brasiliense</i> Sp7, Km ^R , ΩT7.	Este trabajo
<i>A. brasiliense</i> T7mCh	Cepa etiquetada en cromosoma con el gen de la proteína mCherry. Contiene el terminador T7. Derivada de la cepa silvestre <i>A. brasiliense</i> Sp7, Km ^R , ΩT7.	Este trabajo
Plásmidos		
pGEM-T-Easy	Vector de clonación, Ap ^R	Promega
pJMS-Km	Plásmido suicida derivado del vector pSUP202, Km ^R , Tc ^R , Ap ^R	(Ramírez-Mata <i>et al.</i> , 2016)
pJMS-mChKm	Plásmido suicida derivado del vector pJMS-Km, Km ^R , Tc ^R , Ap ^R	Este trabajo
pBluescript-mCh	Plásmido de alto número de copias derivado del vector pBluescript, Ap ^R	Este trabajo
pAZBR	Plásmido suicida derivado del plásmido pJMS que contiene clonado los genes AZBR40048 y AZBR40049 de <i>A. brasiliense</i> Sp245	Este trabajo
pΔiorA	Plásmido suicida que porta los fragmentos 5' y 3' de <i>iorA</i> y el gen de la proteína fluorescente mCherry. Km ^R , Tc ^R	Este trabajo
pAZBR-mCh	Plásmido suicida que porta las regiones homólogas AZBR40048 y AZBR40049, el gen de la proteína fluorescente mCherry y un gen de resistencia a Km. Derivado de pJMS-Km. Km ^R , Tc ^R	Este trabajo
pAZBR-PiorA	Plásmido suicida que porta las regiones homólogas AZBR40048 y AZBR40049, el gen de la proteína fluorescente mCherry fusionado al promotor de <i>iorA</i> y un gen de resistencia a Km. Derivado de pAZBR-mCh. Km ^R , Tc ^R	Este trabajo
pT7PiorA	Plásmido suicida que porta las regiones homólogas	Este trabajo

pT7mCh	<p>AZBR40048 y AZBR40049, el gen de la proteína fluorescente mCherry fusionado al promotor de <i>iorA</i>, un gen de resistencia a Km y un terminador T7. Derivado de pAZBR-mCh. Km^R, Tc^RΩT7.</p> <p>Plásmido suicida que porta las regiones homólogas AZBR40048 y AZBR40049, el gen de la proteína fluorescente mCherry, un gen de resistencia a Km y un terminador T7. Derivado de pT7PiorA. Km^R, Tc^R,ΩT7.</p>	Este trabajo
--------	--	--------------

➤ Extracción de DNA y PCR

La extracción de DNA plasmídico y genómico se realizó de acuerdo al protocolo de Sambrook *et al.* (1989). Las condiciones de PCR fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 95°C x 5 min, segunda desnaturalización a 95°C x 30 s, alineamiento 1 min x la temperatura de cada iniciador, extensión 72°C x 1 kb/min, extensión final 72°C x 10 min, almacenamiento a 4°C x ∞.

➤ Diseño de iniciadores y análisis bioinformático del gen *iorA*

Debido a que no se contaba con la secuencia del genoma de *A. brasilense* Sp7 se procedió con el análisis del gen *iorA* a partir de la secuencia genómica liberada de *A. brasilense* Sp245. Para la búsqueda del gen homólogo (*iorA*) de la cepa Sp7 se utilizó la herramienta BLAST de la plataforma bioinformática NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

El diseño de iniciadores para la amplificación del gen *iorA* y el promotor del mismo se realizó con los programas PRIMER3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/>) y SnapGene Viewer (Tabla 2).

Para evaluar la similitud entre los promotores de las cepas Sp7 y Sp245 se utilizó la herramienta CLUSTALW de la plataforma bioinformática EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). El análisis de los promotores para la búsqueda de las cajas -10 y -35 y factores transcripcionales se realizó en el

programa Virtual Footprinting (Prodoric Database 8.9, http://www.prodoric.de/vfp/vfp_promoter.php) y BPROM (<http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=bprom>). Las secuencias repetidas invertidas se buscaron en el programa e-inverted (EMBOSS), para la búsqueda de los terminadores transcripcionales se utilizó el programa DOOR² (Database of Operons Regulators).

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

Nombre del oligonucleótido	Secuencia 5'-3'
PiorA-AF	5'-GGGGTACCTGCGCTGGACCATCAGCATC-3'
iorA-AF	5'-CCGGTACCATCGAAACCGTGCTGAACAA-3'
iorA-AR	5'-AGCTCGAGTGTTCCATCCCCTTTGTGGC-3'
iorA-BF	5'-GTAGGCCTCGATCATGGGCGAAATCCT-3'
iorA-BR	5'-GCACTAGTGCGCGCTATTTTCATCACCAC-3'
iorA-AFSp7	5'-TCGGTACCTCATCGTGCTGACCGCCAACG-3'
T7iorA	5'-AGGTACCCTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAG GGGTTTTTTGCGGCCGCTACGTACCTGCGCTGGACCATCAGCA-3'
PiorA-R2	5'-ACTCGAGAATCGAATTCATCTATACGTATGTTCCATCCCCTTTGTGG C-3'
CMP- <i>Pst</i> I	5'-GGCTGCAGTTGGACGCCCATTCGGCCC-3'
CMP- <i>Kpn</i> I	5'-CCGGTACCGGACGGCGTTCACCCGATCA-3'
MTF- <i>Spe</i> I	5'-CGACTAGTCGCTCTGGTTTATTGGAGCTTT-3'
MTF- <i>Nco</i> I	5'-TTCCATGGATGACCACGCCCGACAGCA-3'

➤ Construcción del plásmido Δ iorA

La generación de la mutante del gen *iorA* se realizó con la construcción del plásmido p Δ iorA (Tabla 1). El plásmido suicida generado en este estudio se derivó

de pJMS-km (Ramírez-Mata *et al.*, 2016), el cual contiene el gen de resistencia a Km flanqueado por sitios únicos de restricción *KpnI*, *XhoI*, *StuI*, *SpeI*, *SnaBI*, *BglII* y *SacI* (Anexo 1). Al plásmido pJMS-Km se le insertó un gen que codifica para la proteína fluorescente mCherry, extraído de pBluescript-mCh con las enzimas *XhoI* y *SmaI* y subclonado en pJMS-Km río arriba del gen de resistencia a km para obtener el vector pJMS-mChKm. Posteriormente se clonaron los fragmentos 5' y 3' del gen (Figura 2). El fragmento 5' fue amplificado con los iniciadores iorA-AFSP7/iorA-AR y el fragmento 3' iorA-BF/iorA-BR, posteriormente fueron clonados en pGEM-T-Easy (Promega). Los iniciadores iorA-AFSP7 e iorA-AR fueron diseñados con sitios de restricción *KpnI* y *XhoI*, respectivamente. Mientras que los iniciadores iorA-BF e iorA-BR con los sitios *SmaI* y *SpeI*, respectivamente. Una vez clonados en pGEM-T-Easy fueron liberados con las enzimas *KpnI* y *XhoI* para el fragmento 5' y *SmaI* y *StuI* para el fragmento 3' y clonados en los sitios *KpnI/XhoI* y *SmaI/SpeI* del plásmido pJMS-mChKm para obtener a p Δ iorA (Figura 2). La presencia del plásmido fue comprobado mediante PCR y análisis por restricción con las enzimas *EcoRI*, *SaII* y *HindIII*.

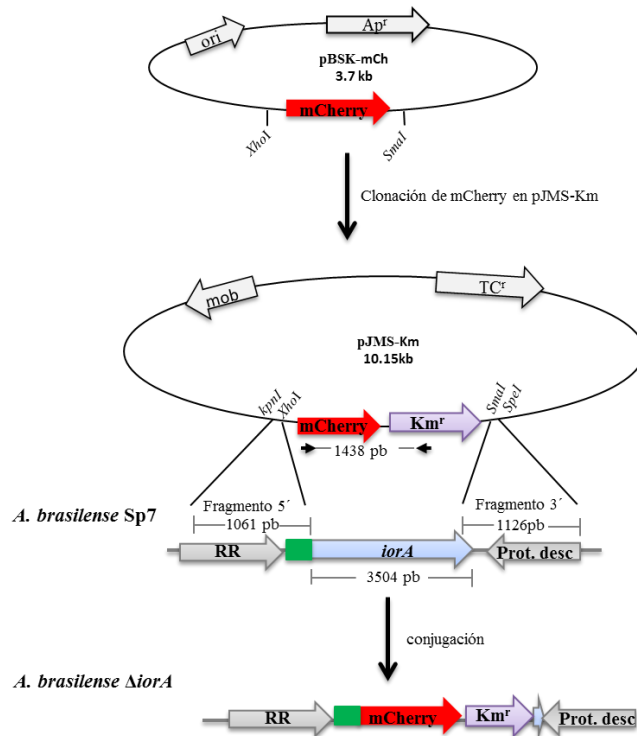


Figura 2. Esquema de la mutante *A. brasilense* Δ *iorA*. El gen de la proteína fluorescente mCherry fue clonado río arriba del gen de resistencia a Km del vector pJMS-Km. Posteriormente los fragmentos 5' y 3' (mostrados arriba) fueron clonados flanqueando ambos genes. Una vez construido el plásmido este fue transferido a la cepa conjugativa *E. coli* S17.1 y mediante conjugación con la cepa silvestre *A. brasilense* Sp7 se obtuvo la cepa mutante *A. brasilense* Δ *iorA*.

- Construcción de los plásmidos pAZBR-mCh y pAZBR-PiorA y análisis de la expresión del promotor *iorA*.

Para el análisis de la expresión del gen *iorA* de la bacteria en asociación con la planta se realizó con las construcciones pAZBR-mCh y pAZBR-PiorA. La recombinación homóloga en el fondo genético de *A. brasilense* Sp7, se realizó como sigue: se clonaron dos regiones homólogas al genoma de *A. brasilense* Sp245 en pJMS, (versión modificada del vector suicida pSUP202 al que se le incorporó un sitio múltiple de clonación). En la clonación de la región homóloga AZBR- 40048 se utilizaron los iniciadores CMP-*Pst*I/ CMP-*Kpn*I y amplificaron por PCR el fragmento de 768 pb y posteriormente se clonó en el vector pGEM-T-Easy, mientras que el fragmento que corresponde al gen AZBR-40049 se amplificó

con los iniciadores MTF-SpeIF/MTF-NcoIR obteniendo un amplificado de 897 pb que de la misma manera fue clonado en pGEM-TEasy. Ambos fragmentos fueron digeridos, con las enzimas *Pst*I y *Kpn*I para el fragmento AZBR-40048 y *Spe*I y *Nco*I para el fragmento AZBR-40049 y ligados en pJMS en los mismos sitios de restricción para obtener el plásmido pAZBR, a continuación se digirió el vector pJMS-mChKm liberando con las enzimas *Kpn*I y *Spe*I el gen mCherry y el gen de resistencia a Km (2.2 kb), el fragmento obtenido se clonó en los mismos sitios de pAZBR para así obtener el plásmido pAZBR-mCh, utilizado control negativo de la expresión del promotor del gen. Una vez comprobado pAZBR-mCh mediante PCR y restricción se efectuó la digestión del mismo con las enzimas *Kpn*I y *Xho*I, posteriormente se clonó el promotor del gen *iorA*, el cual fue amplificado por PCR con los iniciadores PiorA-R/iorA-AR obteniendo un fragmento de 511 pb, este se clonó en pGEM-T-Easy, posterior a ello, se digirió con las enzimas *Kpn*I y *Xho*I, y se clonó en pAZBR-mCh y para así monitorear la expresión del gen. La correcta construcción de pAZBR-PiorA se comprobó tanto por PCR como por restricción. (Figura 3).

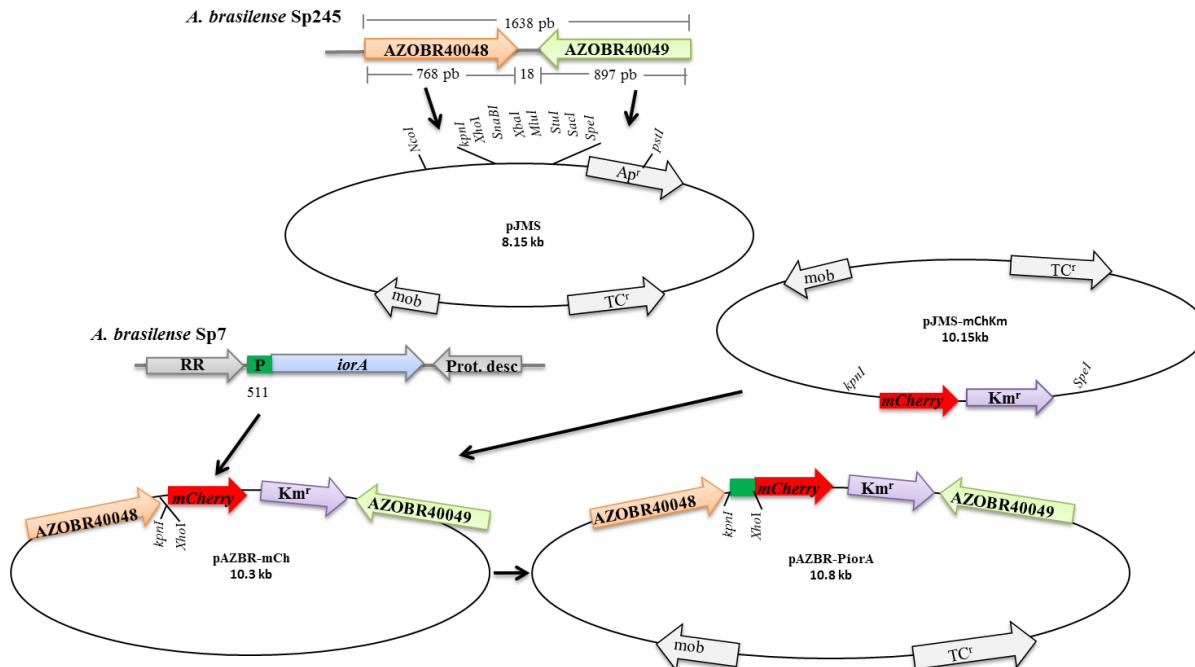


Figura 3. Esquema de las cepas etiquetadas *A. brasilense* pAZBR-mCh y pAZBR-PiorA. Dos regiones homólogas al genoma de *Azospirillum* fueron clonadas en el plásmido pJMS para poder llevar a cabo la recombinación genética, así como un gen de resistencia a Km y el gen mCherry para obtener el plásmido pAZBR-mCh. El promotor del gen *iorA* fue clonado río arriba del gen de la proteína fluorescente construyendo una fusión transcripcional (pAZBR-PiorA). Una vez construidos los plásmidos estos fueron transferidos a la cepa conjugativa *E. coli* S17.1 y mediante conjugación con la cepa silvestre *A. brasilense* Sp7 se obtuvieron las cepas etiquetadas *A. brasilense* AZBR-mCh y AZBR-PiorA.

➤ Construcción de los plásmidos pT7mCh y pT7PiorA.

La construcción de pT7PiorA y pT7mCh se realizó adicionando un terminador transcripcional (Ω) a pAZBR-mCh y pAZBR-PiorA. Se amplificó el promotor de *iorA* con los iniciadores T7iorA / PiorA-R2. El iniciador T7iorA posee la secuencia codificante del terminador T7 (BBa_K731721 www.parts.igem.org), los sitios de restricción *KpnI*, *NotI* y *SnaBI*. El tamaño del amplificado fue de 580 pb. El amplicón se clonó en pGEM- T- Easy y se digirió con las enzimas *KpnI* y *XhoI* y se subclonó en pAZBR-mCh el cual de igual manera se digirió con las enzimas *KpnI*/*XhoI*, obteniendo así a pT7PiorA (10.9 kb), que fue corroborado por PCR y restricción. Una vez clonado el promotor de *iorA* se procedió a digerir el plásmido con la enzima *SnaBI* y religarlo, eliminando con esto el promotor y conservando el terminador T7, se obtuvo el plásmido control pT7mCh de 10.3 kb (Figura 4).

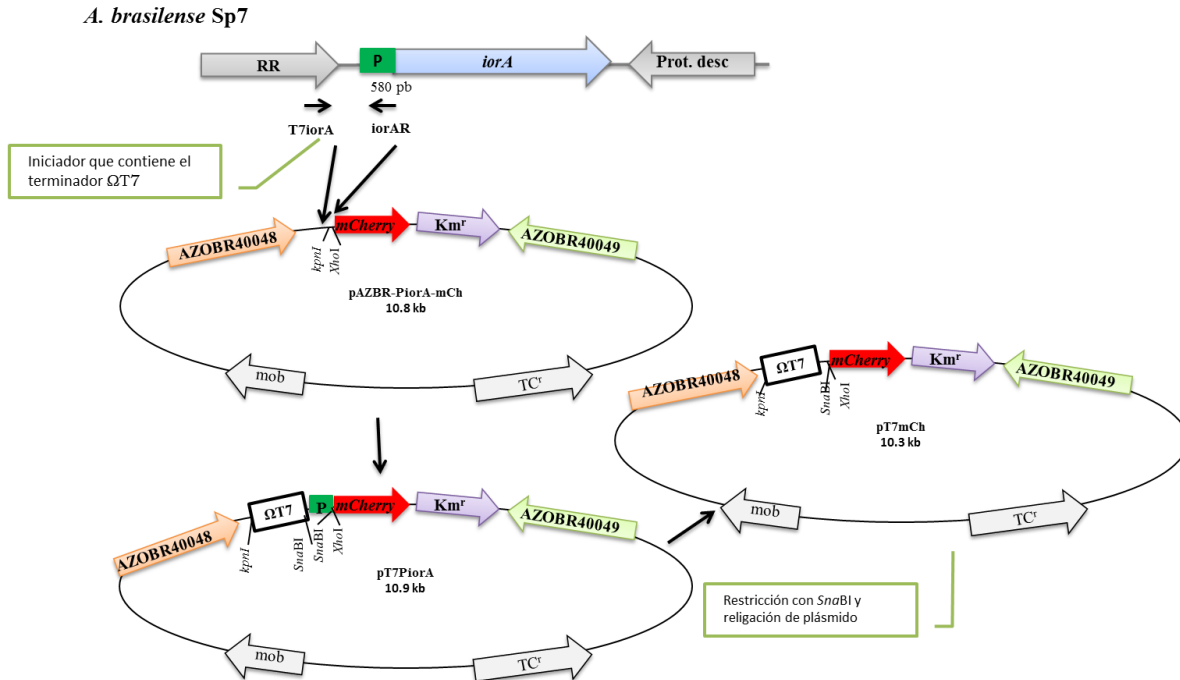


Figura 4. Esquema de la construcción de los plásmidos pT7mCh y pT7PiorA. Al plásmido pAZBR-mCh se le clonó el promotor del gen *iorA* que fue amplificado con un iniciador que contenía en su secuencia el terminador T7 para obtener el plásmido pT7PiorA, este último fue religado para eliminar el promotor y obtener el plásmido pT7mCh. Una vez construidos los plásmidos estos fueron transferidos a la cepa conjugativa *E. coli* S17.1 y mediante conjugación con la cepa silvestre *A. brasilense* Sp7 se obtuvieron las cepas etiquetadas *A. brasilense* T7mCh y T7PiorA.

➤ Conjugación y análisis de mutantes

Los plásmidos recombinantes fueron introducidos por transformación a células quimiocompetentes de la cepa *E. coli* DH5 α , analizados por PCR y restricción y posteriormente transferidos en la cepa movilizada *E. coli* S17.1 para su posterior conjugación con la cepa silvestre de *A. brasilense* Sp7. La cepa receptora *A. brasilense* Sp7 fue crecida en 5 ml de medio LB* a 30°C, con agitación a 150 rpm, hasta una DO de 0.3, mientras que la cepa receptora *E. coli* S17.1 se creció en 5 ml de medio LB modificado (LB*) a 37°C sin agitación. Ambos cultivos fueron centrifugados a 7000 rpm durante 3 min, resuspendidos y mezclados en 40 μ l de medio LB*, se colocaron 20 μ l en una placa del mismo medio. Después de 36 h con un asa bacteriológica se levantaron los puntos y resuspendieron en 1 ml de medio mínimo K-malato (pH 6.8), posteriormente se realizaron diluciones seriadas de las que se tomaron 100 μ l para sembrar en cajas de medio K-malato adicionado con los antibióticos adecuados para cada plásmido. Una vez transcurrido el tiempo las

colonias obtenidas de *Azospirillum* fueron analizadas por PCR y por Southern blot (Anexo 2) para comprobar la presencia de la cepa mutante y por PCR las cepas etiquetadas.

➤ Microscopía de fluorescencia de las cepas etiquetadas de *A. brasilense*

Para llevar a cabo la microscopía de fluorescencia se inocularon las cepas etiquetadas (*A. brasilense* AZBR-mCh, AZBR-PiorA, T7PiorA, T7mCh) la cepa mutante (*A. brasilense* Δ iorA) y la cepa silvestre (*A. brasilense* Sp7) sin antibiótico en 5 ml de medio mínimo K-malato + Km, después de 18 h de cultivo este preinóculo se utilizó para inocular un matraz con 10 ml de medio mínimo K-malato, ajustando la DO_{600} inicial a 0.01 de cada cepa y cultivándolas durante 36 h para proceder a tomar las imágenes de fluorescencia. Se tomó una alícuota de 1 ml y fue resuspendida en 300 μ l de medio mínimo K-malato y colocada la muestra sobre un portaobjetos. Las imágenes fueron tomadas en un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse TE200U) a 400 ms de exposición con el objetivo 100 X.

➤ Curva de crecimiento

Se realizó la curva de crecimiento en medio mínimo K-malato durante 28 h. De un precultivo de 18 h de las cepas etiquetadas (*A. brasilense* T7PiorA, T7mCh), la cepa mutante (*A. brasilense* Δ iorA) y la cepa silvestre (*A. brasilense* Sp7) se tomó una alícuota de 200 μ l, se inoculó un matraz que contenía 25 ml de medio mínimo ajustando la DO_{600} inicial a 0.01. Los cultivos fueron monitoreados a partir de las 0 h hasta las 28 h tomando alícuotas cada 2 h y midiendo la DO_{600} . Los datos fueron graficados para obtener la curva de crecimiento.

➤ Cuantificación de la producción de AIA por HPLC

La cantidad de AIA producida por la cepa *A. brasilense* Δ iorA y la cepa silvestre *A. brasilense* Sp7 se cuantificó por HPLC de acuerdo al protocolo establecido por Szkop y Bielawski (2013). La preparación del inóculo se realizó un precultivo de las cepas en 5 ml de medio mínimo K-malato, el cual fue crecido durante 18 h, a 30 °C con agitación a 150 rpm. Se tomó una alícuota de 100 μ l y se inocularon matraces que contenían 20 ml del mismo medio adicionado con 100 μ g/ml de triptófano (DO_{600nm} 0.01). Se cultivó durante 48 h tomando dos alícuotas de 1 ml a las 14, 24, 36 y 48 h. Una alícuota fue centrifugada a 13000 rpm durante 10 min a 4°C, el sobrenadante se aspiró con una jeringa y se pasó por un filtro de 0.22 μ m (EMD Millipore, Billerica, MA). La muestra se inyectó al cromatógrafo (HPLC Agilent 1200; Agilent Technologies, Santa Clara, CA) en una columna C-18 de fase reversa (Beckman Coulter, Brea CA). La fase móvil constó de acetonitrilo 40% y 60% de ácido acético al 1%, con un tiempo de corrida de 6 min y una tasa de flujo de 1 ml min⁻¹. La detección de los compuestos se realizó a 280 nm. La segunda alícuota se utilizó para realizar la determinación de proteínas totales por el método de Bradford, ajustando así los datos obtenidos de la producción de AIA. El ensayo de HPLC se realizó por triplicado para cada muestra. Los datos fueron analizados con el software estadístico Prism 3.0. Se realizó una prueba no paramétrica de Mann-Whitney con un intervalo de confianza del 95%.

➤ Cuantificación de UFC

Para la cuantificación de las unidades formadoras de colonias (UFC), se partió de un precultivo de 18 h de las cepas etiquetadas (*A. brasilense* T7PiorA, T7mCh), la cepa mutante (*A. brasilense* Δ iorA) y la cepa silvestre (*A. brasilense* Sp7), se tomó una alícuota de 200 μ l para inocular 25 ml de medio mínimo, ajustando la DO_{600} inicial a 0.01. Se crecieron durante 12 h tomando alícuotas de 1 ml a las 10, 11 y 12 h de cultivo. Se realizaron diluciones seriadas (10^{-1} hasta 10^{-8}) en 900 μ l de medio mínimo ajustando a un volumen final de 1 ml con la muestra. Se inocularon 5 réplicas de 10 μ l cada una en placas de medio rojo Congo y se dejaron incubando

durante 36 h, a 30 °C. Una vez transcurrido el tiempo se realizó el cálculo de la cantidad de bacterias mediante UFC/ml. El ensayo de UFC se realizó por triplicado para cada cepa.

➤ Ensayo de colonización al trigo

Se utilizaron semillas de trigo (*Triticum aestivum* var. Nana-F2007), las cuales fueron esterilizadas con hipoclorito de sodio al 1% durante 30 min en agitación constante y una mezcla de antibióticos [Tc (20 µg/ml), estreptomicina (Sm, 250 µg/ml)] y antifúngicos (cicloheximida, 150 µg/ml y fluconazol, 150 µg/ml). Las semillas fueron colocadas en placas de agar-agua al 0.6% y almacenadas a 30°C durante 48 h para su germinación, Posteriormente las semillas germinadas fueron transferidas a tubos de vidrio que contenían 13 ml de solución hidropónica (Solución madre: 100 mM KH₂PO₄, 50 mM K₂HPO₄, 100 mM MgSO₄·7H₂O, 2 mM Fe-EDTA, 500 mM NH₄NO₃, microelementos, pH 6.3), por 7 días e incubados en una cámara ambiental a 24 °C, con una humedad de 50% y un fotoperiodo de 16 h luz/ 8 h oscuridad.

Se realizó un precultivo de las cepas T7PiorA, Δ iorA y Sp7 de *A. brasilense* en 5 ml de medio mínimo K-malato, el cual fue utilizado para ajustar matraces de 25 ml de medio K-malato a una DO₆₀₀ 0.01. Los cultivos fueron crecidos con una agitación de 150 rpm durante 12 h a una DO₆₀₀ de 0.6 (1x10⁻⁸ UFC). De estos cultivos se tomaron alícuotas de 2 ml para inocular las plántulas a los 7 días de crecimiento. Se corroboraron las UFC inoculadas en las plántulas mediante el conteo de UFC en placa. Ocho días después de la inoculación, las raíces de las plantas se pesaron en una balanza analítica y se maceraron en un mortero con 900 µl de solución reguladora Z, durante un 1 min. Se tomaron 100 µl de la muestra y se realizaron diluciones de 1x10⁻² hasta 1x10⁻⁶, de las cuales fueron sembrados 10 µl en placas de medio rojo Congo e incubadas durante 36 h para obtener las UFC/g de raíz. El ensayo de colonización se realizó cuatro veces, utilizando un total de 28 plantas por cada cepa. Los datos obtenidos de las UFC/g de raíz fueron analizados

estadísticamente mediante el programa GraphPad Prism 3.0 utilizando ANOVA como método estadístico.

➤ Microscopía confocal

Las plantas de trigo var. Nana-F2007 crecidas durante 15 días en solución hidropónica fueron utilizadas para analizar la colonización de las cepas T7PiorA, Δ iorA y Sp7 de *A. brasilense* mediante microscopía confocal. Se cortaron secciones de aproximadamente 1 cm de raíz que corresponde a la región de la cofia, la parte media de la raíz y la parte basal (cercana a la semilla) y se montaron en un portaobjetos, el cual se selló con esmalte para evitar la desecación de la muestra (Fig 5). La muestra fue observada en un microscopio confocal Nikon Eclipse Ti con un láser de Argón a 488 nm, un láser de Helio-Neón de 594 nm y un objetivo Plan Apo λ 20X para analizar la formación de agregados bacterianos y el sitio de colonización.

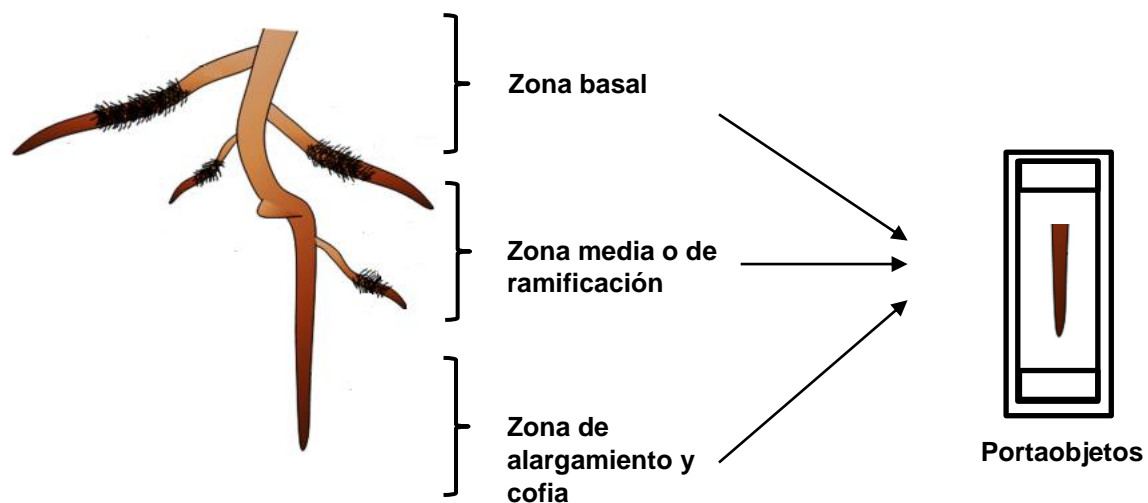


Figura 5. Montaje de la muestra para microscopía confocal. Esquema que muestra las 3 zonas distintas de la raíz de las plantas que fueron cortadas (aproximadamente 1 cm) y colocadas en un portaobjetos para poder ser analizadas al microscopio y observar la colonización de las cepas de *A. brasilense*.

RESULTADOS

➤ Análisis bioinformático del gen *iorA*

El análisis de la participación del gen *iorA* en la producción de AIA y la colonización al trigo se realizó con la construcción de una mutante por eliminación de un segmento de 3299 pb. El gen *iorA* (AMK58_05340) se encuentra codificado en la cadena complementaria, en el cromosoma de *A. brasilense* Sp7. Tiene un tamaño de 3504 pb y codifica para una proteína de 1167 aminoácidos. Río arriba de *iorA* se localiza el gen que codifica para un regulador de respuesta de 1008 pb y río abajo un gen de una probable proteína de 927 pb (Fig. 7).

Para analizar la región promotora del gen *iorA*, se diseñaron iniciadores (PiorA-F/*iorA*-AR) en base a la secuencia liberada de *A. brasilense* que amplificaran el promotor del gen en la cepa Sp7 (Figura 6). El amplicón de la cepa Sp7 correspondió a un tamaño menor (74 pb) al de la cepa Sp245 por lo que fue secuenciado. El promotor de Sp7 presentó dos deleciones con respecto a la cepa Sp245, lo que hace que su tamaño sea 511 pb (Figura 6).

Al contar con la secuencia del promotor de la cepa *A. brasilense* Sp7 se pudieron localizar con la ayuda de los programas BPROM y Footprinting las cajas -10 y -35 lo que sugirió que el factor Sigma 70 podría estar regulando la transcripción del gen (Figura 6).

Se ha descrito en plantas la existencia de una secuencia conservada conocida como elemento de respuesta a auxinas (AuxRE), la cual es reconocida por factores transcripcionales para así regular la transcripción de los genes (Ulmasov *et al.*, 1995). Se ha descrito la presencia de este elemento en el gen *ipdC* el cual está involucrado en la producción de AIA. La secuencia **TGTCTC** característica de este motivo, se localizó también en el promotor de *iorA*, ubicado a 202 pb del codón de inicio (Fig. 6).

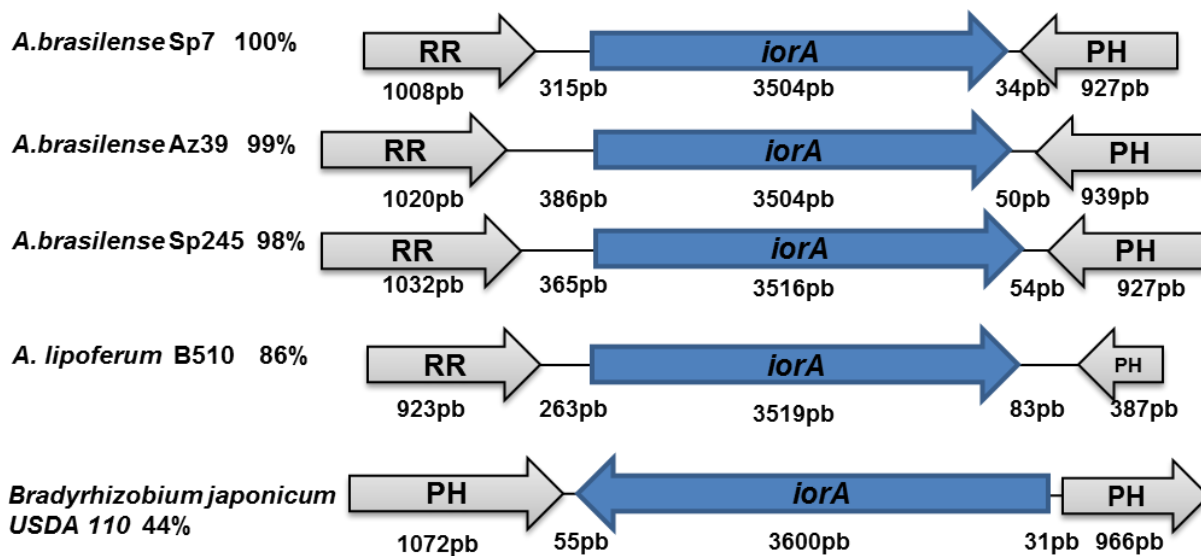


Figura 7. Diagrama del contexto genético del gen *iorA* en diversas especies, géneros y cepas. PH= Proteína Hipotética, RR= Regulador de Respuesta. Las flechas indican el sentido de la transcripción de los genes.

La proteína presenta en su estructura un dominio de unión al cofactor tiamina difosfato (TPP) similar a IPDC de los aminoácidos 426 a 606 el cual le permite a la proteína tener actividad y un dominio característico de la familia de las piruvato oxidoreductasas (PorG) que se extiende del nucleótido 1278 al 1812. Además, en su estructura se pueden encontrar una subunidad α del nucleótido 55 al 2034 y una subunidad β del nucleótido 2157 al 2778 (Figura 8).

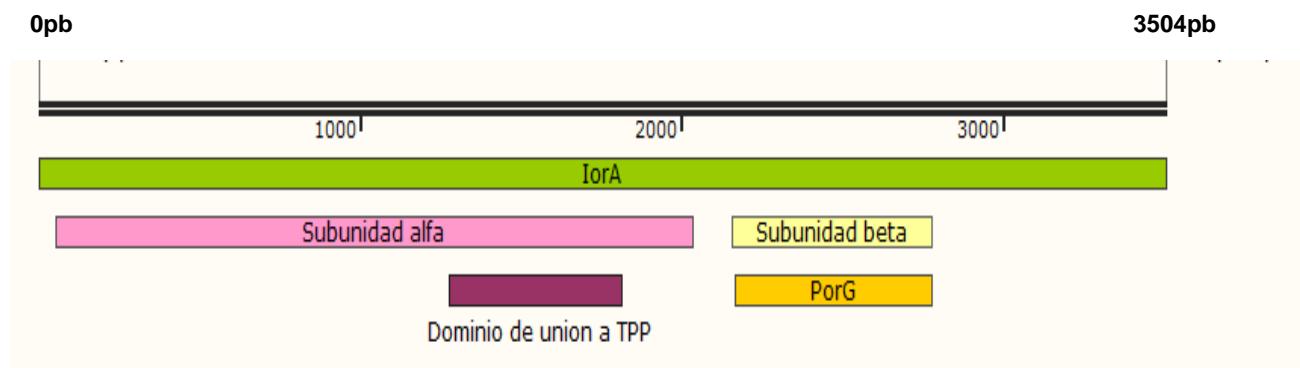


Figura 8. Análisis de los dominios de la proteína IorA. Se pueden observar los dominios que presenta la proteína IorA de *A. brasilense* Sp7. El análisis se realizó en el programa BLASTp y SnapGene Viewer.

➤ Obtención de la mutante $\Delta iorA$ de *Azospirillum brasilense*

La mutante $\Delta iorA$ se obtuvo mediante la construcción del plásmido p $\Delta iorA$ clonando el gen de la proteína roja fluorescente mCherry en el plásmido pJMS-Km. Para corroborar la inserción del gen se realizó una PCR con los iniciadores mCherryF y KmR obteniendo un amplificado de 1.5 kb (Figura 9b). Una vez comprobada la inserción del gen de la proteína fluorescente se procedió a insertar los fragmentos 5' y 3' que flanquean al gen *iorA* (Figura 9a). Los fragmentos fueron clonados en el plásmido pJMS-mChKm que se verificó por PCR de ambos fragmentos con los iniciadores *iorA*-AFSp7/*iorA*-AR (fragmento 5') e *iorA*-BF/*iorA*-BR (fragmento 3') (Figura 9c). Además, se realizaron restricciones al plásmido con las enzimas *EcoRI* (4481 pb, 7830 pb), *SaI* (4159 pb, 8152 pb) y *HindIII* (5297 pb, 7014 pb) obteniendo los amplificados esperados (Figura 9d).

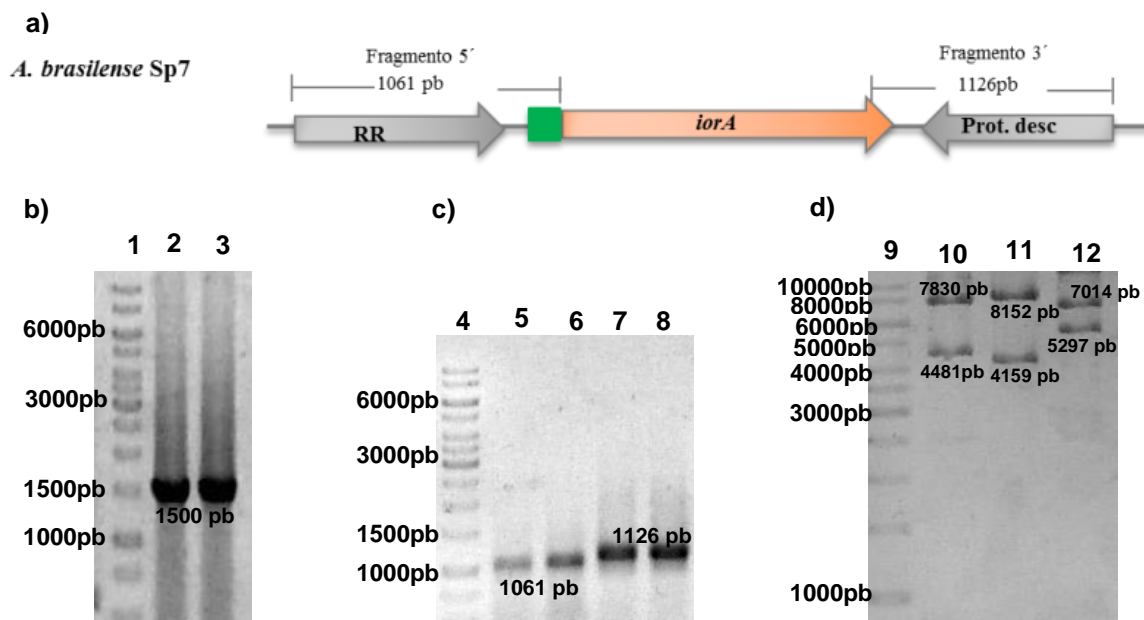


Figura 9. Construcción del plásmido pJMS-mChKm. 9a) imagen que muestra los fragmentos 5' y 3' clonados en el plásmido pJMS-mChKm. 9b) amplicón de mCherry-Km de 1500 pb (Carriles: 1 y 2). 9c). Amplicón del fragmento 5' (carriles 5 y 6), amplicón del fragmento 3' (carriles 7 y 8). 9d) Restricciones del plásmido p $\Delta iorA$ con las enzimas *EcoRI* (carril 10) *SaI* (carril 11) y *HindIII* (carril 12).

El vector transformado en *E. coli* S17.1 se conjugó con *A. brasilense* Sp7. La mutante se corroboró por PCR (Figura 10b) e hibridación utilizando una sonda para km y otra de un fragmento del gen *iorA*, pudiendo verificar la obtención de la mutante (ver anexo 2). Se realizó microscopía de fluorescencia a la cepa mutante para verificar la expresión de mCherry (Fig. 10c)

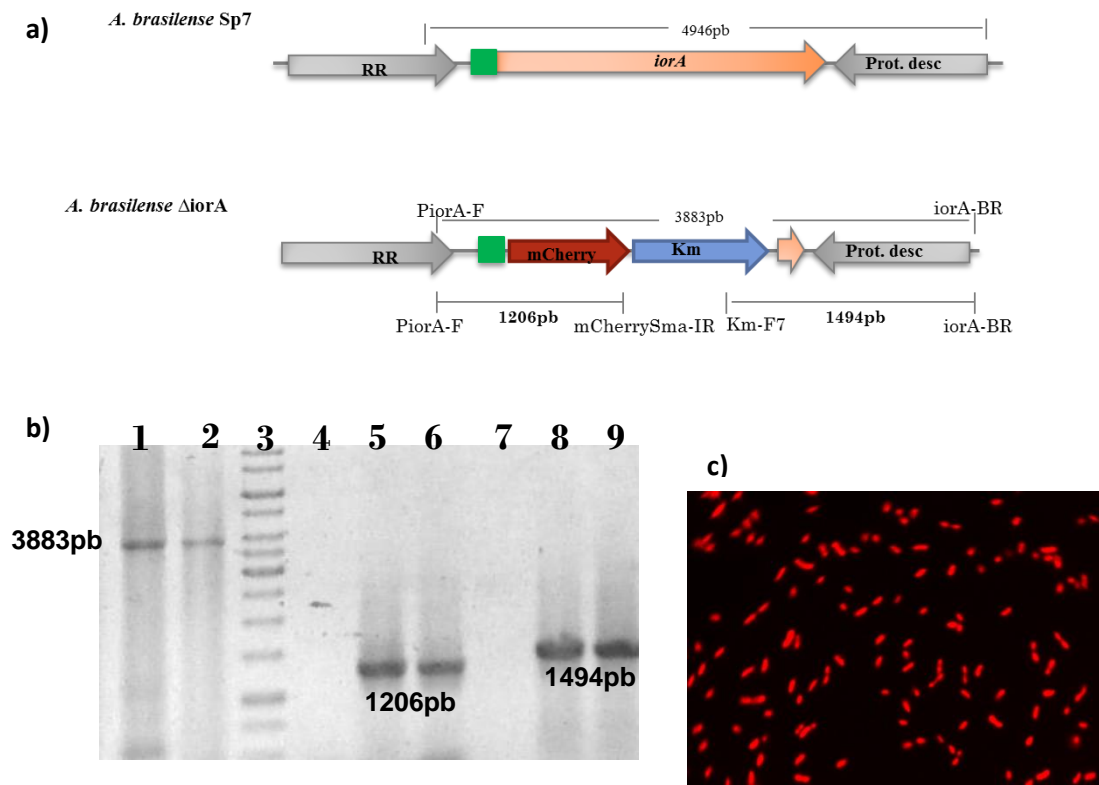


Figura 10. Obtención de la mutante *A. brasilense* $\Delta iorA$. 10a) Mapa físico que muestra el contexto genético de *A. brasilense* Sp7 y la mutante ($\Delta iorA$). 10b) Electroforetograma de los amplificadores correspondientes de la mutante $\Delta iorA$. Amplicón de 3883pb obtenido con los iniciadores *PiorA-F/iorA-BR* de *E.coli* S17.1 ($p\Delta iorA$) control positivo (carril 1) y de la mutante $\Delta iorA$ (carril 2). Amplicón obtenido con los iniciadores *PiorA-F/mCherry-SmaIR* de la construcción en *E.coli* S17.1 como control positivo (carril 5) y de la mutante $\Delta iorA$ (carril 6). Amplicón obtenido con los iniciadores *Km-F7/iorA-BR* de *E.coli* S17.1 ($p\Delta iorA$) control positivo (carril 8) y de la mutante $\Delta iorA$ (carril 9). Carril 3 MPM. 10c) Microscopía de fluorescencia que muestra la expresión de la proteína mCherry en la cepa mutante *A. brasilense* $\Delta iorA$.

➤ Curva de crecimiento de las cepas de *A. brasilense*

Se realizó una curva de crecimiento monitoreando durante 26 h el crecimiento de las cepas. No se encontraron diferencias en el crecimiento de las cepas debido a la mutación en el gen *iorA* o a la inserción cromosómica de la fusión transcripcional del promotor del gen *iorA* y el gen *mCherry* (Figura 11).

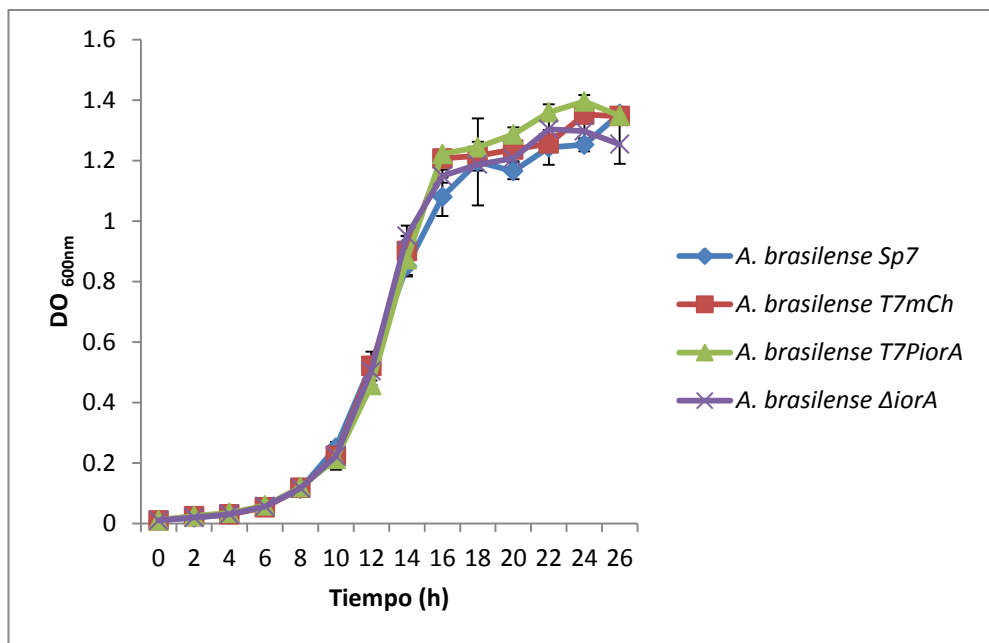
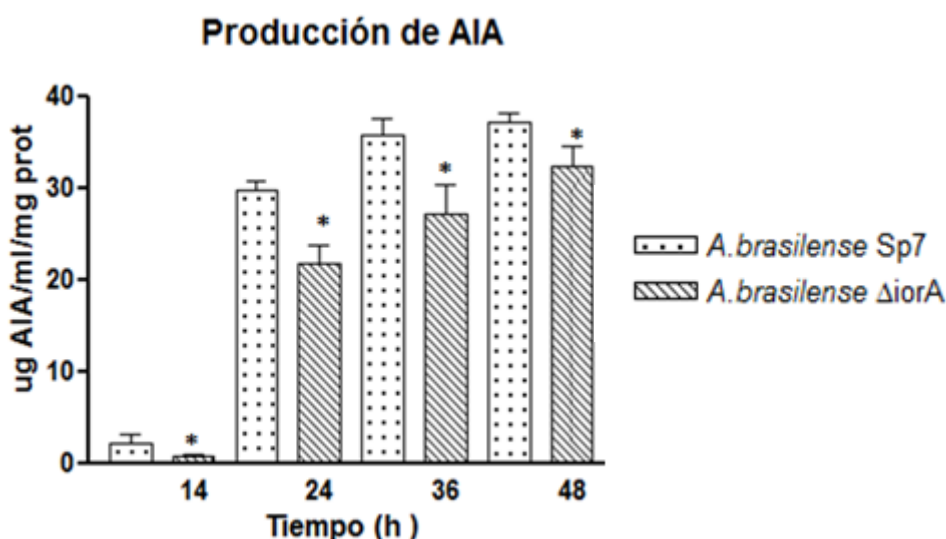


Figura 11. Curva de crecimiento de las cepas de *Azospirillum*. Los resultados mostrados son el promedio de tres ensayos independientes.

➤ Cuantificación de la producción de AIA en la cepa mutante $\Delta iorA$ y la cepa silvestre *A. brasilense Sp7*.

Se procedió a evaluar la producción de AIA en la cepa silvestre y la mutante isogénica. El ensayo mostró que la cepa mutante $\Delta iorA$ presentó una menor producción de AIA, la cual se determinó en un 20% debajo de la cepa silvestre a

las 24 h. Sin embargo, a las 48 h la diferencia en la producción de AIA es menor (Figura 12) siendo de un 7.4%. Los datos obtenidos fueron estadísticamente significativos, obteniendo una $p < 0.05$.



Cantidad de AIA producida en $\mu\text{g AIA/ml/mg}$ de proteína

Tiempo	<i>A. brasilense</i> Sp7	<i>A. brasilense</i> ΔiorA
14 h	2.16	0.81
24 h	29.71	21.83
36 h	35.89	28.88
48 h	37.1	34.41

Figura 12. Determinación de la producción de AIA. Las cepas fueron crecidas en medio mínimo K-malato suplementado con 100 $\mu\text{g/ml}$ de triptófano y analizadas a 14, 24, 36 y 48 h. Los resultados mostrados son el promedio de 3 ensayos independientes. Los asteriscos representan diferencias significativas ($P < 0.05$).

➤ Obtención de las cepas etiquetadas AZBR-PiorA y AZBR-mCh de *A. brasilense*

Para poder obtener las cepas etiquetadas se construyeron los plásmidos pAZBR-PiorA y pAZBR-mCh. En el vector pJMS se insertaron dos genes (AZOBR_40048 y AZOBR_40049), a partir del genoma de *A. brasilense* Sp245. Dichos genes fueron seleccionados debido a que presentaban una secuencia intergénica de 8pb y se

encontraban transcritos de manera opuesta, lo que indicaba no tener un promotor el cual pudiera afectarse durante la inserción del gen reportero, además ambos genes tienen una longitud similar, la cual es suficiente para poder llevar a cabo la recombinación en *Azospirillum*, de igual manera estos genes se encontraban altamente conservados entre las dos cepas lo que permitiría poder llevar a cabo la recombinación. En la región intergénica de los genes se insertó el gen de la proteína roja fluorescente mCherry y el gen de resistencia a Km para obtener el plásmido pAZBR-mCh como control negativo de la expresión del gen *iorA*. Una vez verificada la construcción se conjugó con la cepa silvestre *A. brasilense* Sp7 para obtener AZBR-mCherry (Figura 13). En pAZBR-mCh se insertó río arriba del gen de la mCherry un fragmento de 511 pb que corresponde al promotor del gen *iorA*, para así obtener la construcción pAZBR-PiorA. Este plásmido recombinante sirvió para obtener la cepa AZBR-PiorA, por conjugación como se describió en material y métodos. La región intergénica (8 pb) es flanqueada por los genes AZOBR_0048 y AZOBR_0049, que codifican para una proteína de membrana y una metiltransferasa respectivamente. Esta región está conservada en los genomas de *Azospirillum*, de longitud *ad hoc* para la recombinación, la dirección de la transcripción es opuesta, esto garantiza no generar efecto polar, tampoco se localizó un promotor en dicha región intergénica.

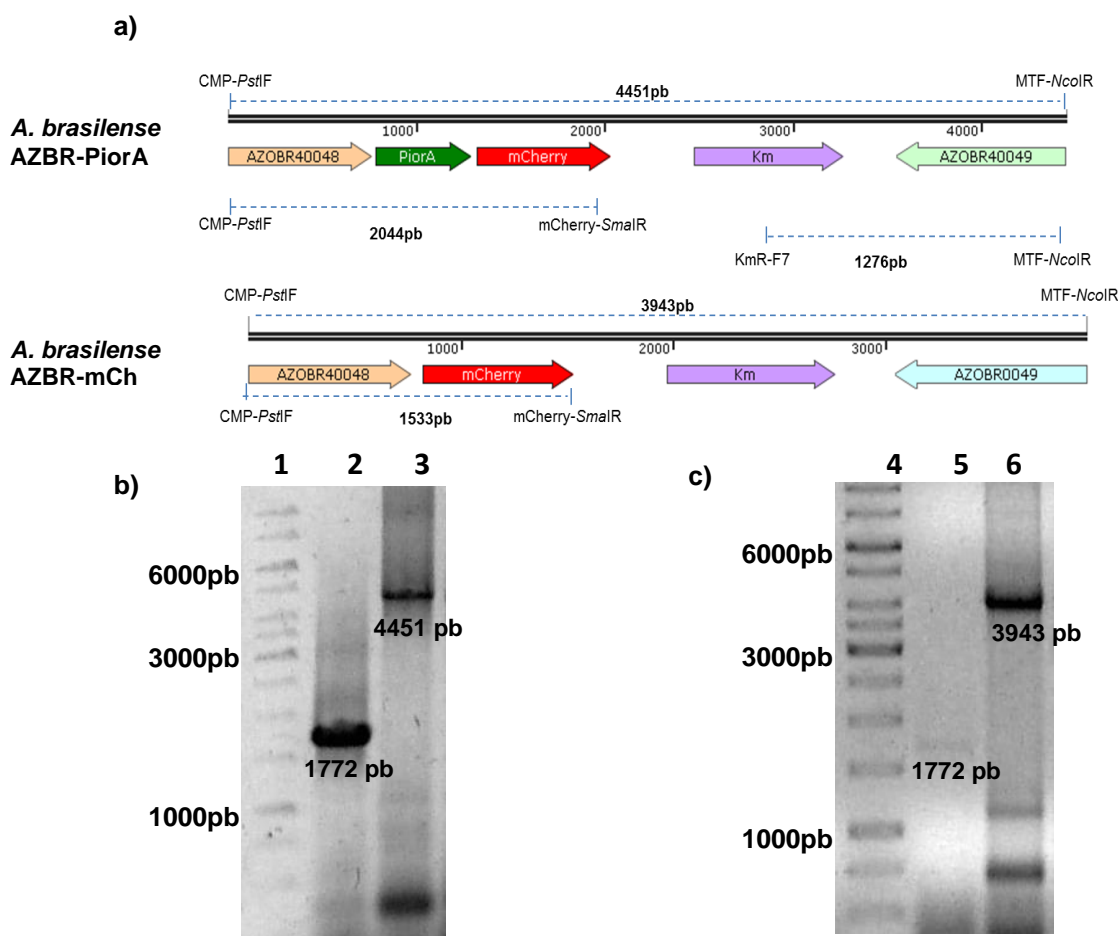


Figura 13. Análisis de las cepas etiquetadas *A. brasilense* AZBR-PiorA y AZBR-mCh 13a) Mapa físico de AZBR-PiorA y AZBR-mCh. 13b) Electroforesis en gel de agarosa donde se observan los amplificadores correspondientes a la cepa Sp7 (carril 2) y AZBR-PiorA (carril 3). 13c) Electroforesis en gel de agarosa donde se observan los amplificadores correspondientes a la cepa Sp7 (carril 5) y AZBR-mCh (carril 6) Carriles 1 y 4 MPM.

- Microscopía de fluorescencia de las cepas *A. brasilense* AZBR-PiorA y AZBR-mCh

Las cepas etiquetadas con la proteína mCherry (*A. brasilense* AZBR-PiorA y AZBR-mCh) se analizaron mediante microscopía confocal (Fig. 14). Ambas cepas mostraron ser fluorescentes, sugeriendo de que el promotor del gen AZOBR_40048 dirige la transcripción de mCherry. Por tanto, se requirió el diseño de un terminador de la transcripción localizado al final del gen AZOBR_0048. Mediante el programa

DOOR² se determinó la ausencia de un terminador, por lo cual se procedió a clonar una secuencia terminadora entre el gen AZOBR_0048 y el gen codificante de la proteína mCherry.

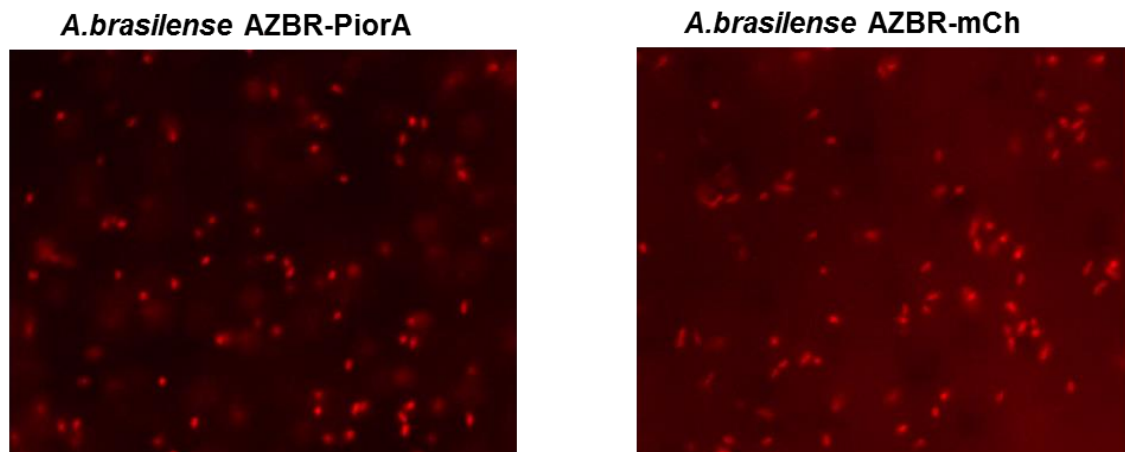


Figura 14. Microscopía de fluorescencia de las cepas etiquetadas *A. brasilense* AZBR PiorA y AZBR-mCh. Las células fueron crecidas en medio K-malato durante 30 h. Las imágenes fueron tomadas en un microscopio Nikon Eclipse TE200U con un zoom óptico de 100X y 200ms de exposición. Se observa la fluorescencia de las células incluso en la cepa que no contiene promotor (AZBR-mCh).

➤ Obtención de las cepas etiquetadas T7PiorA y T7mCh de *A. brasilense*.

Se procedió a clonar el terminador T7 para monitorear la expresión del gen *iorA* mediante la expresión de mCherry. Para lo cual se incluyó la secuencia del terminador T7 (Ω T7) en el diseño del iniciador delantero del promotor del gen *iorA* (Fig.4). Se obtuvieron los plásmidos pT7PiorA y pT7mCh los cuales fueron conjugados para obtener las cepas T7PiorA y T7mCh de *A. brasilense* (Fig. 15a, 15b y 15c).

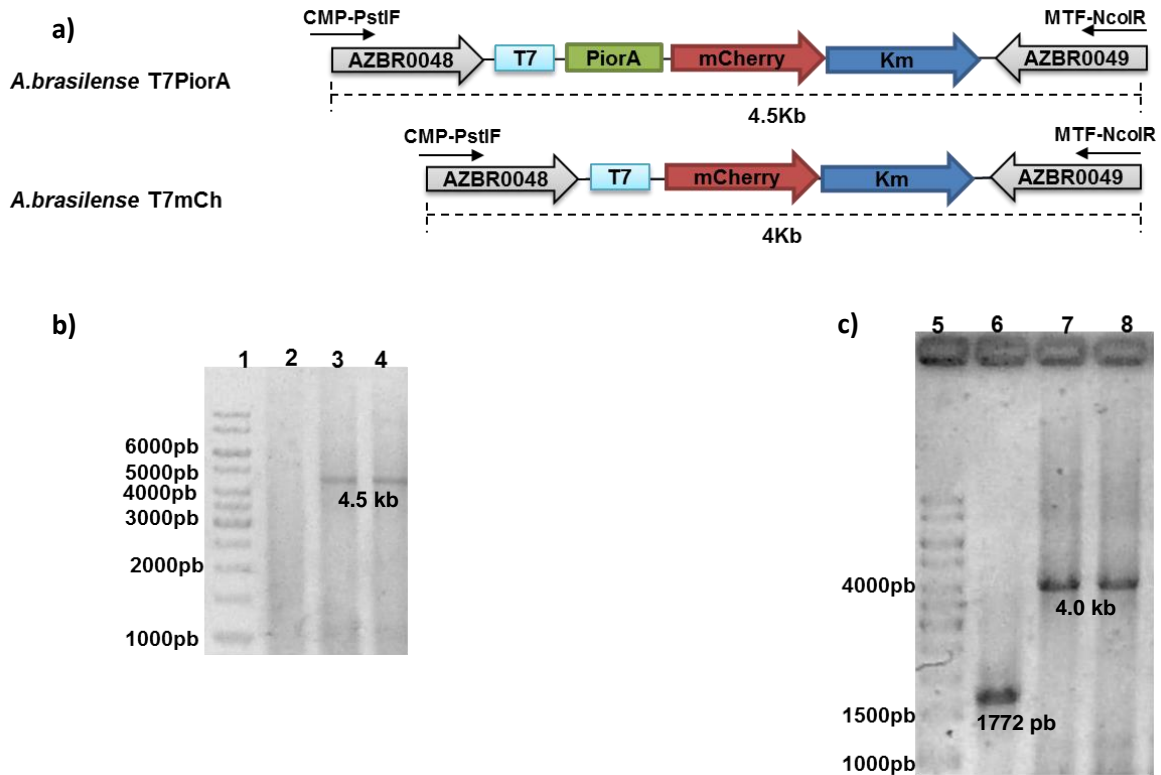


Figura 15. Obtención de las cepas etiquetadas *A. brasilense* T7PiorA y T7mCh. 15a) contexto genético de las cepas etiquetadas. 15b) PCR con los iniciadores CMP-PstI-F y MTF-NcoI-R para la comprobación de la cepa etiquetada AZBR-PiorA. MPM (carril 1), Ctrl negativo (carril 2), *E. coli* S17.1 pT7PiorA (carril 3), *A. brasilense* T7PiorA (carril 4). 15c) PCR con los iniciadores CMP-PstI-F y MTF-NcoI-R para la comprobación de la cepa etiquetada AZBR-mCh. MPM (carril 5), *A. brasilense* Sp7 (carril 6), *E. coli* S17.1 pT7mCh (carril 7), *A. brasilense* T7mCh (carril 8).

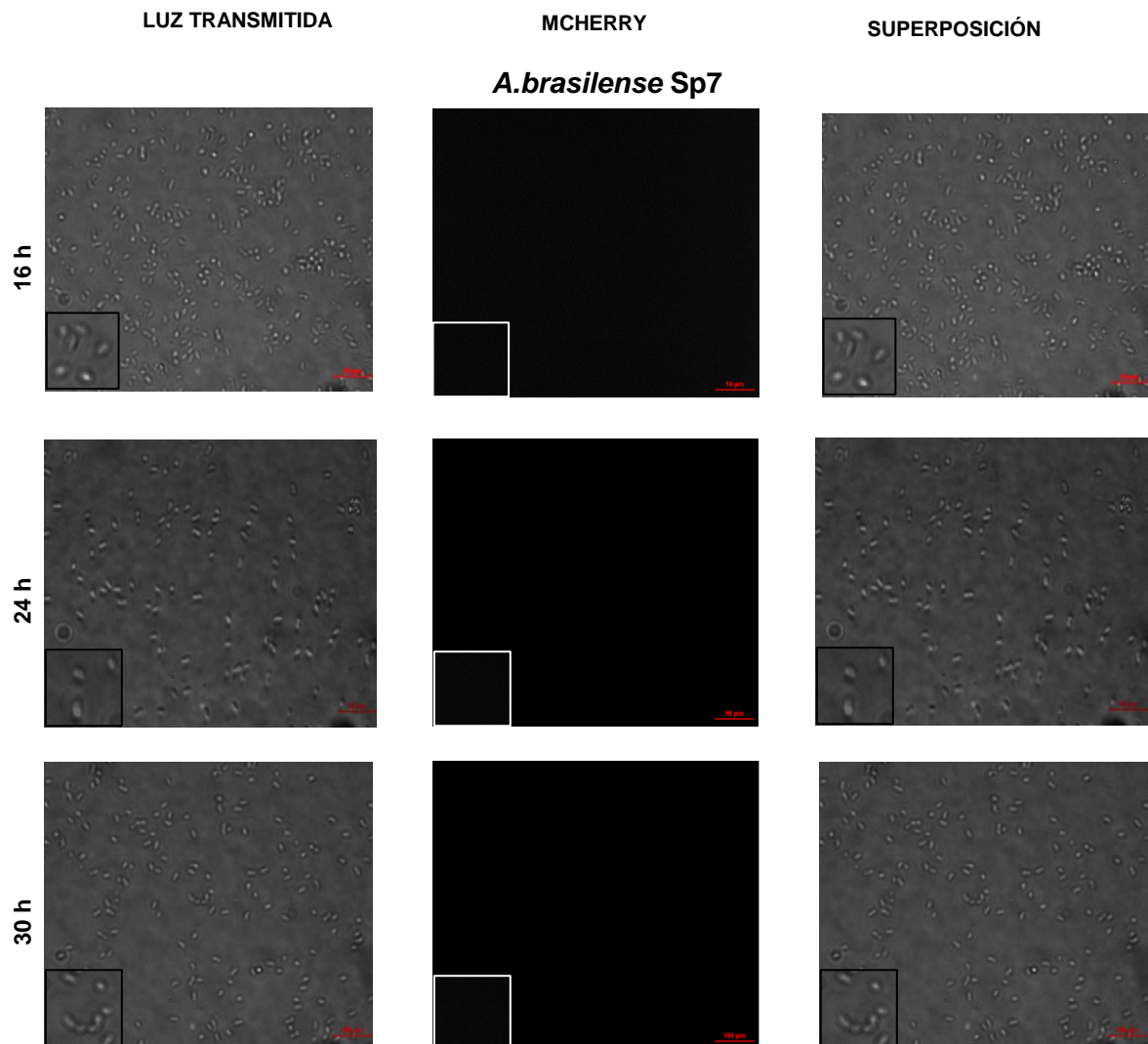
Se realizó la curva de crecimiento de las cepas etiquetadas. No se encontraron diferencias en el crecimiento comparada con la cepa silvestre *A. brasilense* Sp7 (Fig. 11).

- Microscopia de fluorescencia de las cepas de *A. brasilense* AZBR-mCh, AZBR-PiorA, T7PiorA y T7mCh.

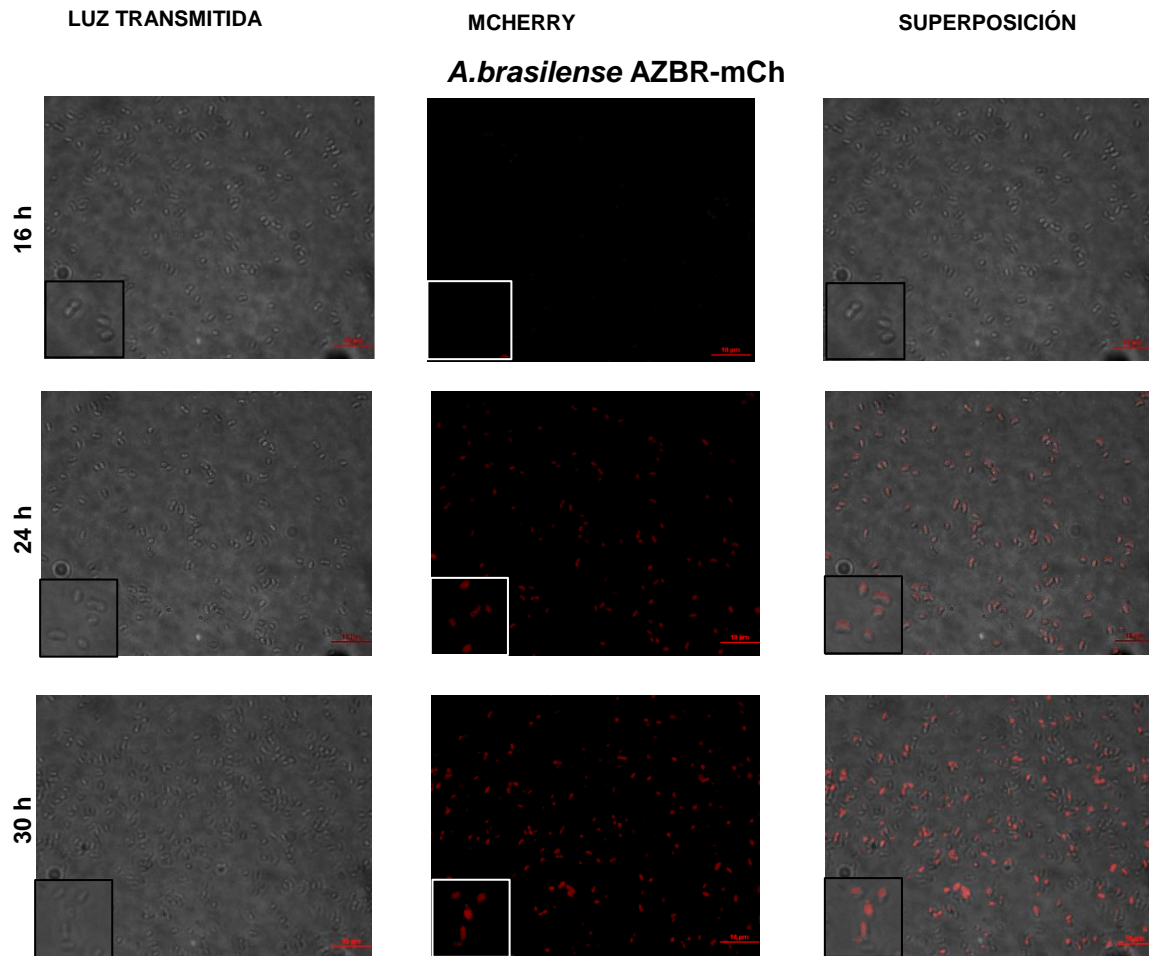
Las imágenes de fluorescencia se tomaron a 16, 24 y 30 h para analizar la expresión del gen reportero mCherry. La cepa Sp7 se usó como control negativo pues no presenta fluorescencia (Fig. 16a). Las cepas etiquetadas AZBR-mCh y AZBR-PiorA expresan el gen mCherry desde las 24 h de

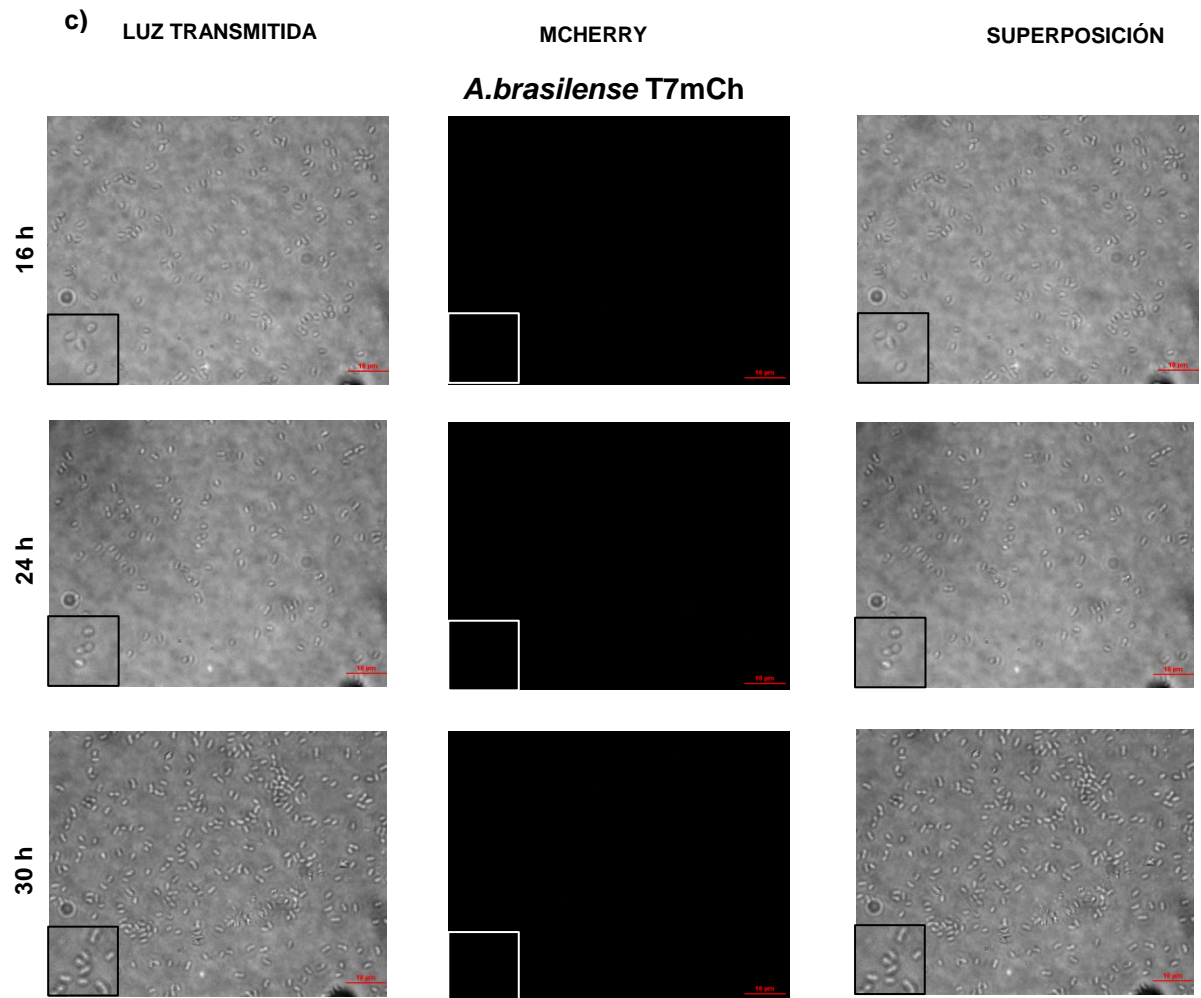
crecimiento (Fig. 16b y 16d). La cepa AZBR-mCh presentó fluorescencia, por lo cual no se consideró un control negativo adecuado para analizar la expresión del gen *iorA*. De aquí que se integró el terminador a las cepas T7PiorA y T7mCh. Se observó que la cepa T7mCh no expresa el gen mCherry, considerando el control negativo *ad hoc* para evaluar la expresión de *iorA* en asociación con la planta (Fig. 16c y 16e). Con respecto a la cepa mutante Δ *iorA* la expresión del gen reportero fue mayor comparada con la de las cepas etiquetadas, ya que a las 24 y 30h hay mayor intensidad de fluorescencia (Fig. 16f).

a)



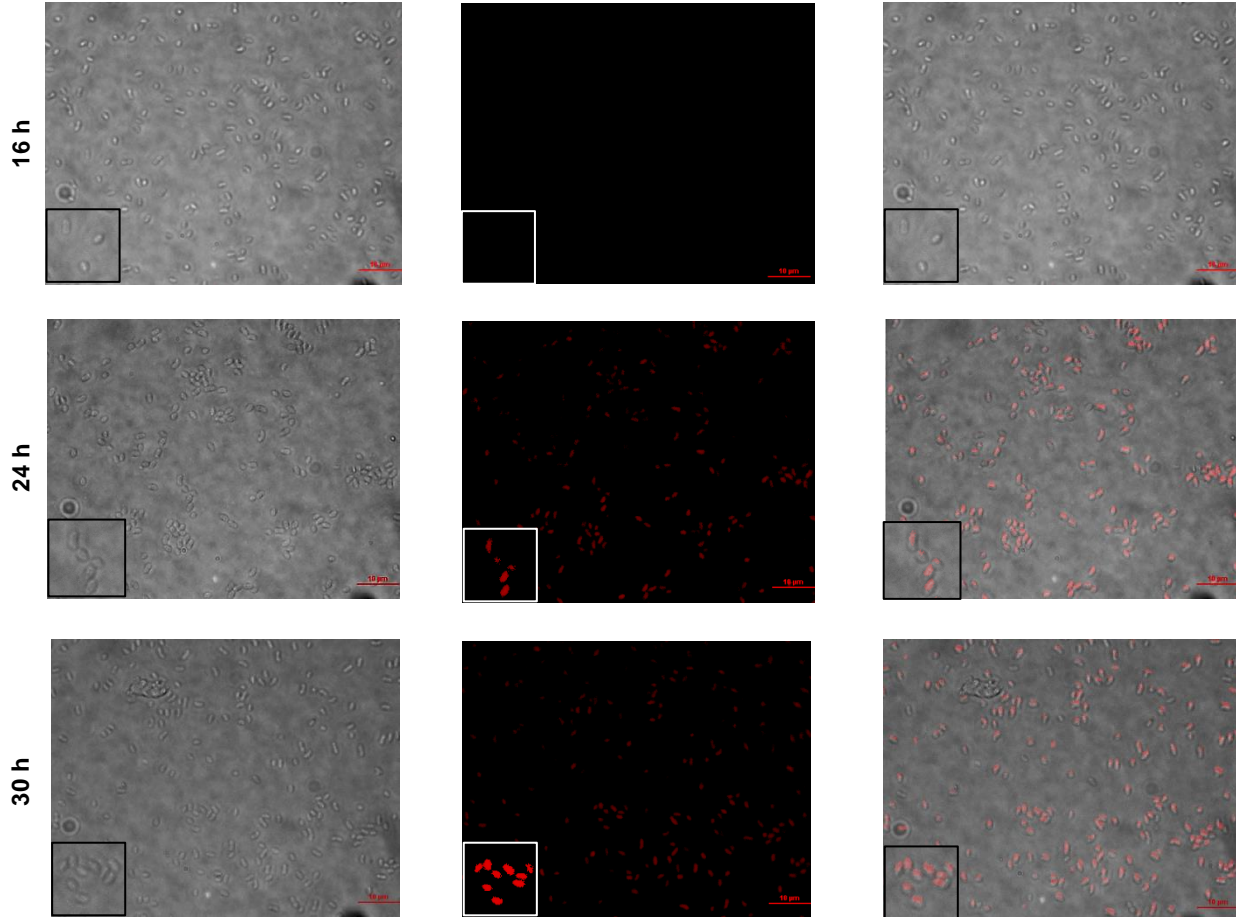
b)





d) LUZ TRANSMITIDA MCHERRY SUPERPOSICION

A. brasilense AZBR-PiorA



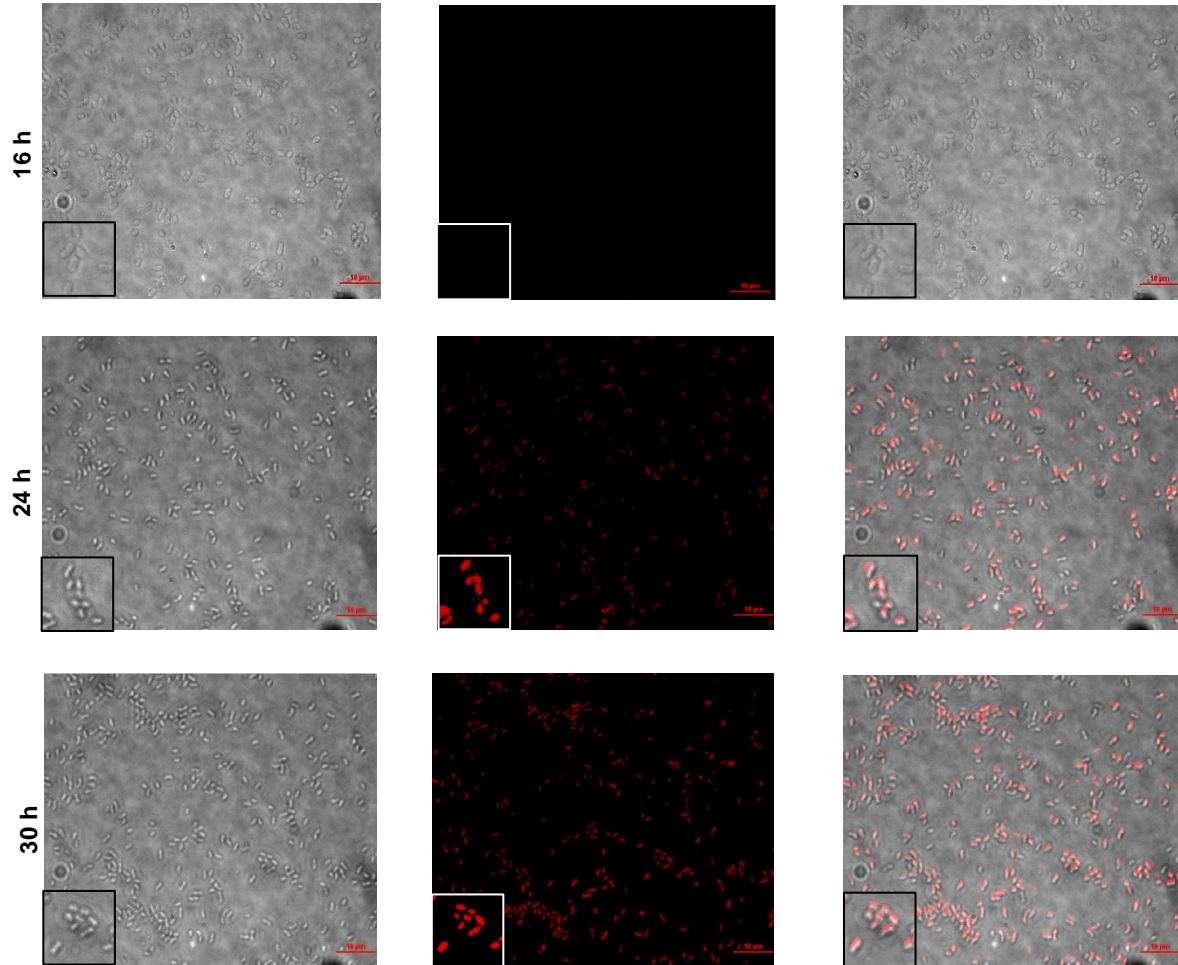
e)

LUZ TRANSMITIDA

MCHERRY

SUPERPOSICION

A. brasilense T7PiorA



Utilizando la fórmula $C_1V_1=C_2V_2$ se calculó el volumen de inóculo (2 ml para 20 ml de medio mínimo K-Malato) necesario para el ensayo de colonización.

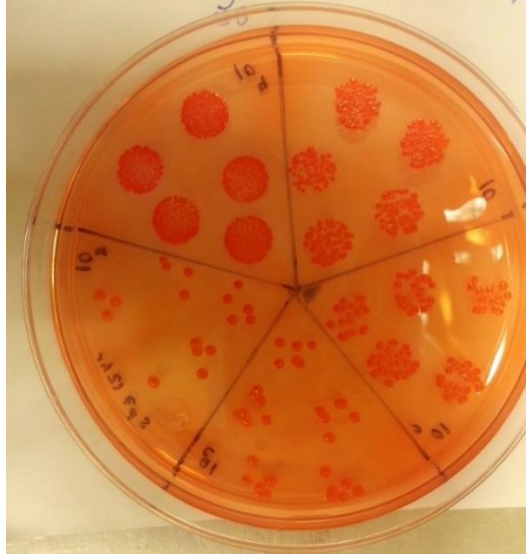


Figura 17. Conteo de UFC. Las UFC fueron realizadas en placas de medio rojo Congo, los cultivos fueron crecido en medio mínimo K-Malato durante 12h hasta una $D.O_{600}$ de 0.6, se realizaron diluciones de 10^{-4} hasta 10^{-8} encontrando que en una dilución de 10^{-6} se obtienen 10^{-8} UFC/ml.

➤ Ensayo de colonización al trigo

El conteo de UFC en placa de la colonización de la cepa Sp7 arrojó un resultado de 2.45×10^{-9} UFC/g de raíz mientras que, para la cepa mutante $\Delta iorA$ de 2.13×10^{-9} UFC/g de raíz y para la cepa T7PiorA de 2.76×10^{-9} UFC/g de raíz. El análisis estadístico mostró que no existen diferencias significativas en la colonización de las cepas de *A. brasilense* presentando una $p > 0.05$, por lo que la mutación del gen *iorA* no tiene un efecto en la colonización de la bacteria a la planta (Figura 18).

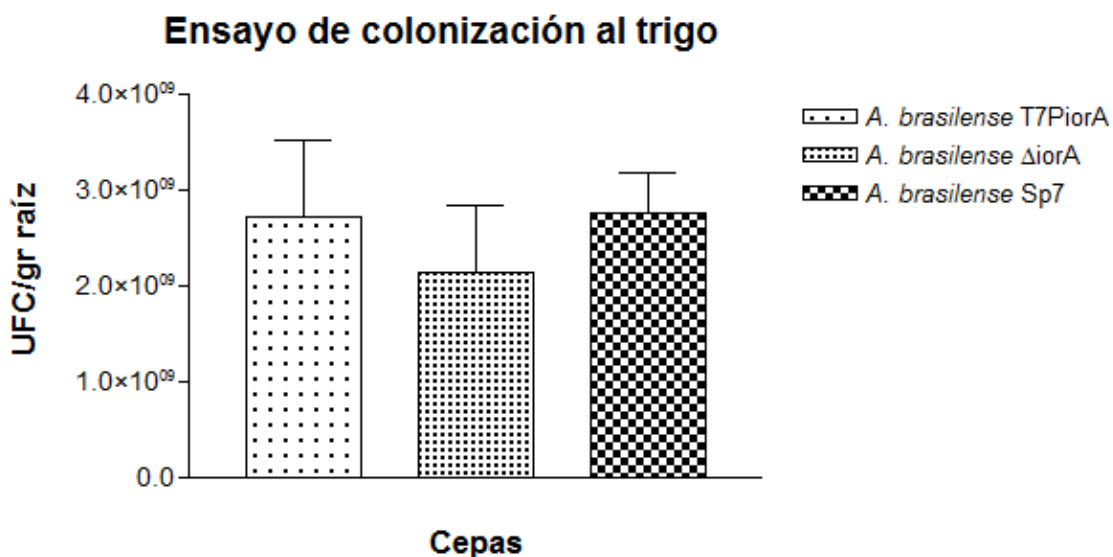


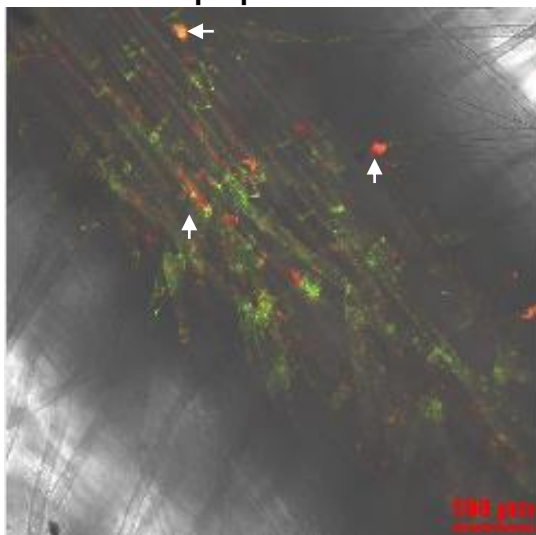
Figura 18. Ensayo de colonización al trigo. El análisis estadístico (ANOVA) mostró que no existe una diferencia significativa en la colonización al trigo entre las cepas silvestres y mutante ($p > 0.05$).

Mediante microscopía confocal se analizó el sitio de colonización de las cepas, las microfotografías permiten estimar que se presenta mejor colonización en la zona basal cercana a la semilla (Figura 19a y 19b), mientras que en las zonas media y de la cofia (Anexo 3) se estima menor colonización. Así mismo se observó que el gen *iorA* se expresa en la bacteria durante la asociación con la planta encontrando fluorescencia del gen reportero mCherry en la cepa etiquetada T7PiorA (Figura 19a).

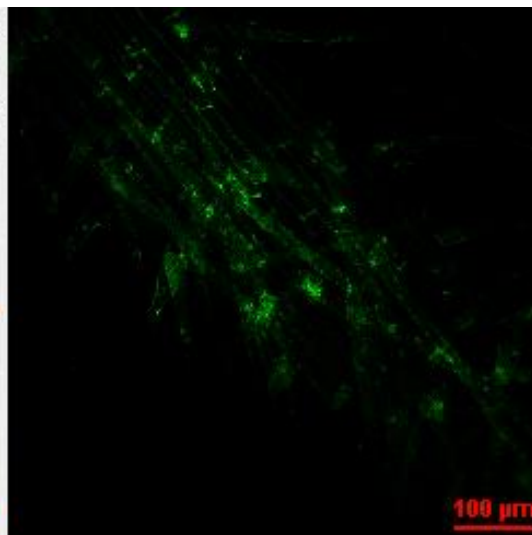
A. brasilense T7PiorA

a)

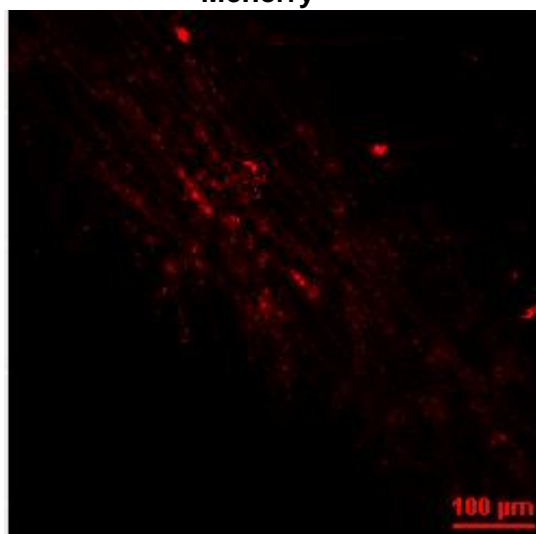
Superposición



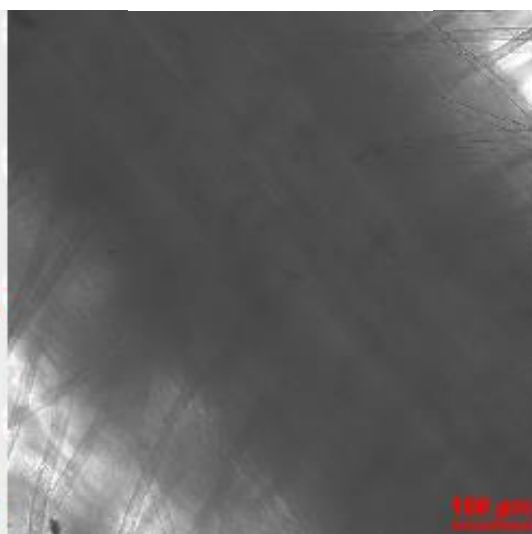
FITC



Mcherry



Luz transmitida



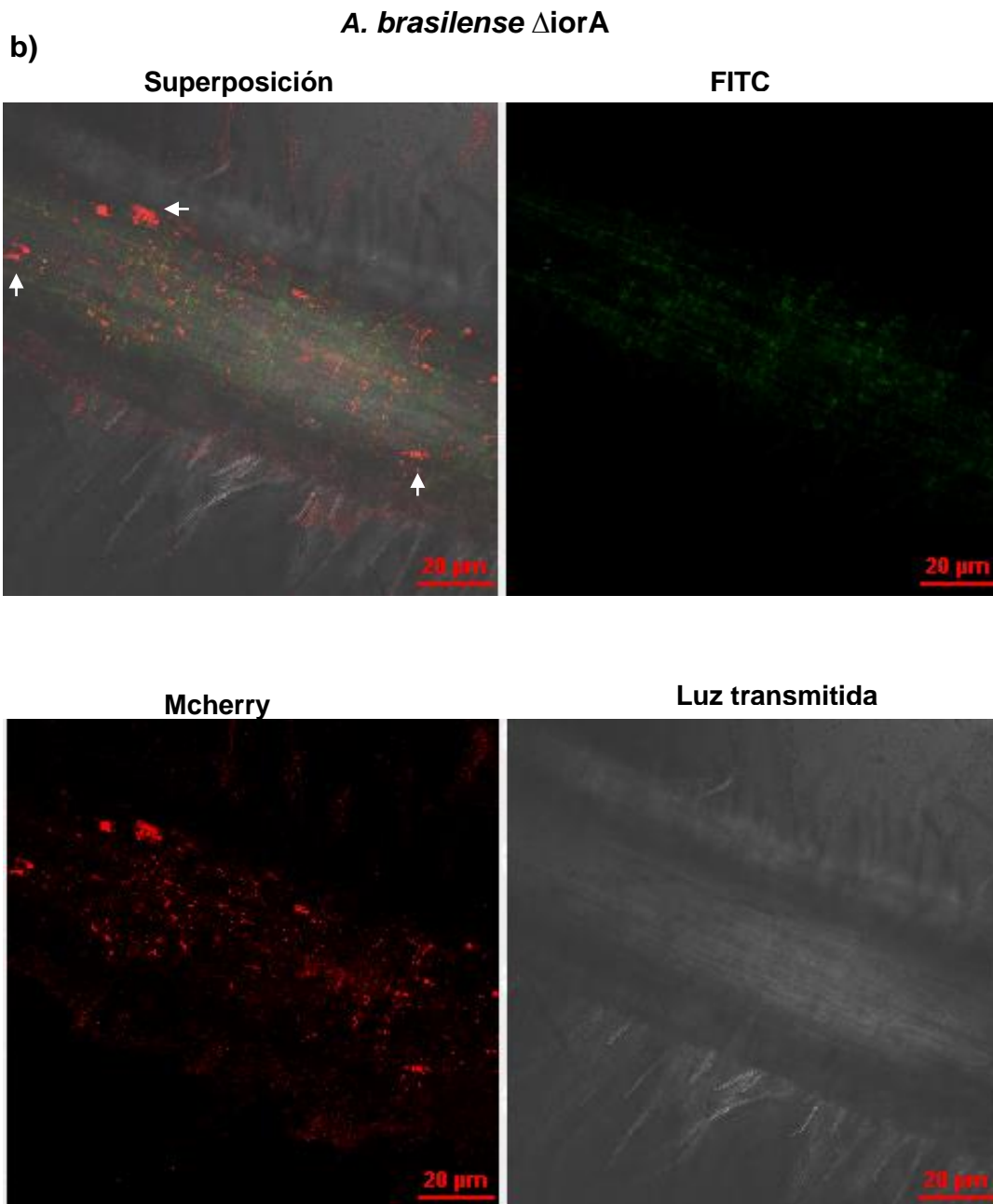


Figura 19. Microscopía confocal de las cepas de *A. brasilense*. Imagen tomada con un objetivo 20X de la zona basal de la raíz (cerca a la semilla) donde se observan pequeños agregados bacterianos que se encuentran adheridos a los pelos y la raíz principal. A) Colonización de la cepa T7PiorA, B) Colonización de la cepa Δ iorA.

DISCUSION

En este estudio se analizó la participación del gen *iorA* de *A. brasilense* Sp7 en la producción de AIA y la colonización al trigo. Se encontró que el gen es funcional, siendo responsable de la síntesis de AIA hasta de un 20% en fase estacionaria temprana (Fig. 12) sin embargo no se obtuvo un efecto del 100% de disminución debido a que existen otras vías que están participando para sintetizar esta fitohormona, tal como sucede con la mutante en el gen *ipdC* de las cepas *A. brasilense* Sp7 (Carreño-López *et al.*, 2000), *A. brasilense* Sp245 (Vande Broek *et al.*, 1999) y *A. brasilense* SM (Malhotra y Srivastava, 2008). Se sabe que el gen *ipdC* se expresa en fase estacionaria y es el gen principal de la vía de IPyA por la cual se sintetiza el AIA en la cepa *A. brasilense* (Vande Broek *et al.*, 1999; Spaepen *et al.*, 2007), por lo que a partir de las 36 h la contribución del gen *iorA* en la síntesis de AIA es menor, siendo únicamente del 7% (Fig. 12), ya que la biosíntesis de la fitohormona se estaría llevando a cabo por la vía IPyA en donde el sustrato, el ácido indol pirúvico se estaría descarboxilando mediante la enzima IPDC. De igual manera el AIA es excretado y acumulado al exterior de la bacteria (Crozier *et al.*, 1988) por lo que la producción que se observa mediante HPLC en el sobrenadante no disminuye considerablemente. Sería interesante la construcción de una doble mutante *ipdC-iorA* para evaluar si es posible obtener un efecto aditivo en la disminución de la producción de AIA.

Cabe resaltar que el gen *iorA* analizado en este trabajo es el único gen de una indol piruvato ferredoxina oxidoreductasa que se ha estudiado en una bacteria PGPR, al que se le ha atribuido una función en la producción de AIA, ya que hasta ahora sólo existían estudios de actividad enzimática en bacterias termófilas como *Pyrococcus furiosus* y *Thermotoga marítima* (Mai y Adams, 1994; Biamey y Adams, 1994).

Por otro lado, para poder llevar a cabo la mutación de *iorA*, se utilizó un plásmido suicida mediante el cual se logró obtener una fusión transcripcional cromosómica (Fig. 2), que permitió evaluar de manera fidedigna la expresión del gen reportero mCherry, ya que no se tuvo el efecto de dosis génica tal como sucede con plásmidos de más de una copia. La fluorescencia de mCherry en la cepa mutante

(Fig. 16f) fue mayor comparada con la cepa etiquetada T7PiorA (Fig. 16e), esto podría deberse a que el promotor de *iorA* se encuentra en el locus nativo comparada con la cepa etiquetada que se encuentra en un locus diferente, que al estar en su sitio original estén presentes todas las secuencias de unión a factores transcripcionales que permitan su expresión. Además, mediante bioinformática no se encontró un terminador transcripcional río arriba del promotor de *iorA* por lo que el promotor del gen del regulador de respuesta que se encuentra río arriba de *iorA* pudiera tener una influencia en su expresión comparada con la cepa etiquetada a la que se le insertó un terminador T7.

Como se muestra en la figura 16 la expresión del gen reportero mCherry se observó a partir de las 24 h de crecimiento durante la fase estacionaria, no observando expresión del gen durante la fase logarítmica, lo que indica que el gen *iorA* es un gen de fase estacionaria, por lo que podría ser dependiente de la densidad celular, similar a lo reportado por Vande Broek *et al.*, en 1999 para el gen *ipdC* de *A. brasilense* Sp245 en donde una señal recibida en esta fase de crecimiento, ya sea la detección de un compuesto producido durante esta fase, el cambio en pH del medio o la inducción de un factor sigma S. Carreño-López *et al.*, en 2000 concluyeron que la máxima producción de AIA en *A. brasilense* Sp7 se da durante la fase estacionaria, tal como se observó en este trabajo para el gen *iorA*, por lo que se estaría expresando en mayor cantidad durante esta fase en que es requerido para la producción de la fitohormona similar a lo que ocurre con *ipdC*. Así mismo la expresión de *iorA* en fase estacionaria se debería a que el AIA acumulado durante esta fase de crecimiento se encuentre aumentando su expresión al unirse a un factor transcripcional que a su vez se una al promotor de *iorA*. Van Puyvelde *et al.*, en 2011 mostraron al realizar el transcriptoma de *A. brasilense* Sp245 que el gen de una indol piruvato oxidoreductasa en presencia de AIA se sobreexpresa hasta 16 veces más. En *ipdC* un sitio AuxRE juega un papel en la transcripción del gen en presencia de AIA, se propone que un regulador transcripcional se une al sitio promoviendo su transcripción mediante un mecanismo de retroalimentación positiva (Vande-Broek *et al.*, 2005) en este trabajo se identificó un probable sitio

AuxRE en el promotor de *iorA* que estaría regulando su transcripción en presencia de esta molécula durante la fase estacionaria.

Mediante microscopía confocal se observó que *iorA* se expresa en asociación con la planta por medio de la visualización de la fluorescencia del gen reportero mCherry en los pelos radiculares y la raíz principal que están en la zona más cercana a la semilla. La zona media y la zona de la cofia presentaron muy pocos agregados bacterianos, sin embargo, se encuentran presentes (Anexo 2), lo que concuerda con lo reportado por Shelud'Ko *et al.*, en 2010; Bashan y Levanony 1989 para la cepa *A. brasilense* Cd y Ramos *et al.*, en 2002 en la cepa Sp7 en donde mencionan que *A. brasilense* coloniza principalmente la zona de los pelos radiculares y la raíz principal de plantas de trigo (*Triticum aestivum*), formando microcolonias al adherirse a la superficie radicular.

Mediante el conteo de UFC se encontró que, a pesar de que *iorA* se expresa en asociación con la planta de trigo, no tiene un efecto en la colonización, ya que la cepa mutante Δ *iorA* no presenta una diferencia significativa comparada con la cepa silvestre (Fig.18), contrario a lo reportado en cianobacterias del género *Nostoc* (Hussain *et al.*, en 2015) en *Pantoea agglomerans* (Manulis *et al.*, 1998), en *Ps. fluorescens* HP72 (Suzuki *et al.*, 2003) y en *A. brasilense* SM (Kochar y Srivastava, 2012), en donde el AIA producido es requerido para llevar a cabo una colonización eficiente y la actividad promotora de crecimiento en las plantas. Se ha descrito que el AIA no es el único mecanismo involucrado en la colonización de la bacteria, existen otros mecanismos como la producción de exopolisacáridos o la fijación de nitrógeno (Pereg-Gerk *et al.*, 1998; Steenhoudt y Vanderleyden, 2000) que podrían estar participando en el proceso de colonización de la bacteria a la planta. Sin embargo aunque este gen no tenga un efecto en la colonización, podría tener un papel en el metabolismo de la bacteria por lo que estaría expresándose en asociación con la planta, una hipótesis sería su participación en el metabolismo de los aminoácidos aromáticos de la bacteria para obtener energía, similar a lo que reporta Mai y Adams en 1994 en *Pyrococcus furiosus* donde una indol piruvato oxidoreductasa utiliza el indol piruvato como sustrato para metabolizarlo y

convertirlo mediante un proceso de descarboxilación a su análogo derivado de Aril-Acetil CoA y producir energía para la bacteria.

La utilización de la cepa etiquetada T7PiorA en el ensayo de colonización mostró que a pesar de haber insertado una fusión transcripcional y un terminador al fondo genético de la bacteria no hubo un efecto en la colonización de *Azospirillum* a la planta debido a la manipulación genética de la cepa, incluso el crecimiento de la cepa no se afectó, por lo que se empleó como cepa control, lo que permitió la visualización del sitio de colonización mediante microscopía confocal, esto es similar a lo reportado por Wang *et al.*, en 2014 en donde la adición de un terminador y una fusión transcripcional con el reportero fluorescente GFP para evaluar la colonización de *Enterobacter cloacae* GW-3 a la planta de plátano no tiene un efecto en la colonización, no encontrando diferencias entre la cepa etiquetada y la cepa silvestre.

CONCLUSIÓN

En este trabajo se analizó la participación del gen *iorA* en la producción de AIA encontrando que es funcional, siendo responsable de un 20% de la producción de durante la fase estacionaria temprana mientras que en fase estacionaria tardía sólo es responsable de un 7%.

El gen *iorA* no tiene un papel en la colonización de la bacteria al trigo, no obstante, el gen *iorA* se expresa en la bacteria durante el proceso de asociación con la planta de trigo observando fluorescencia mediante una fusión transcripcional con el gen reportero mCherry.

Por último, la construcción de los plásmidos para la obtención de la mutante y las cepas etiquetadas son funcionales como herramientas para el etiquetado y monitoreo de cepas en ensayos de colonización, ya que con una sola copia es posible visualizar la fluorescencia.

PERSPECTIVAS

- Debido a que se observó que la mutación del gen *iorA* contribuye en la producción de AIA es indispensable realizar la complementación de la mutante Δ *iorA* para corroborar la participación del gen en la producción de esta fitohormona.
- Como se ha descrito el gen *iorA* se sobreexpresa en presencia de AIA en *A. brasilense* Sp245 por lo que se sugiere realizar ensayos en vida libre adicionando diferentes concentraciones de AIA al cultivo para analizar la expresión del gen reportero y analizar si esta molécula participa en la expresión del gen *iorA* en *A. brasilense* T7PiorA.
- En este trabajo se observó que el gen *iorA* se expresa en asociación con la planta por lo que sería interesante realizar ensayos de expresión en planta con las cepas etiquetadas T7PiorA y la cepa control T7mCh para analizar en qué momento de la asociación de la bacteria con la planta el gen *iorA* comienza a expresarse.

BIBLIOGRAFIA

- Abd-Alla M.** (1999). Growth and Siderophore Production in *Bradyrhizobium* (Lupin) Strains under Iron Limitation. *Folia Microbiol.* 44:(2)196-200.
- Badri D. Weir T. van der Lelie D. y Vivanco J.** (2009) Rhizosphere chemical dialogues: plant-microbe interactions. *Current Opinion in Biotechnology.* 20:642–650.
- Baldani V.L.D. Baldani J.I. y Döbereiner J.** (1987). Inoculation of field grown wheat with *Azospirillum spp* in Brasil. *Biol. Fertil. Soil.* 4: 37-40.
- Bashan Y. y Levany H.** (1989). Factors affecting adsorption of *Azospirillum brasilense* Cd to root hairs as compare with roots surface of wheat. *Can. J. Microbiol.* (35):936-944.
- Bashan Y. Holguin G. y de- Bashan L.** (2004). *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997–2003). *Can J Microbiol.* 50: 521–577.
- Beneduzi A. Ambrosini A. y Passaglia L.** (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genetics and Molecular Biology*, 35, 4 (suppl), 1044-1051.
- Biamey J.M. y Adams M.W.** (1994). Characterization of an ancestral type of pyruvate ferredoxin oxidoreductase from the hyperthermophilic bacterium, *Thermotoga maritima*. *Biochemistry.* 33(4) 1000-1007.
- Broek A.V. Lambrecht M. Eggermont K. y Vanderleyden J.** (1999). Auxins Upregulate Expression of the indole-3-pyruvate decarboxylase gene in *Azospirillum brasilense*. *Journal of Bacteriology.* 181(4): 1338-1342.
- Bulgarelli D. Schlaeppi K. Spaepen S. van Themaat E. y Schulze-Lefert P.** (2013). Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 64:807–38.
- Carreño-López R. Campos-Reales N. Elmerich C y Baca B.E.** (2000). Physiological evidence for differently regulated tryptophan-dependent pathways for indole-3-acetic acid synthesis in *Azospirillum brasilense*. *Mol Gen Genet.* 264(4):521-30.
- Cecagno R. Fritsch T.E. y Scharnk I.S.** (2015). The plant growth-promoting bacteria *Azospirillum amazonense*: genomic versatility and phytohormone pathway. *Biomed Res Int.* 2015.1-7. dx.doi.org/10.1155/2015/898592.
- Choudhary D. Prakash A. y Johril B.** (2007). Induced systemic resistance (ISR) in plants: mechanism of action. *Indian J. Microbiol.* 47:289–297.
- Couillerot O. Combes-Meynet E. Pothier J. Bellvert F. Challita E. Poirier M. Rohr R. Comte G. Moëne-Loccoz Y. y Prigent-Combaret C.** (2011). The role of the antimicrobial compound 2,4-diacetylphloroglucinol in the impact of biocontrol *Pseudomonas fluorescens* F113 on *Azospirillum brasilense* phyto-stimulators. *Microbiology* 157: 1694–1705.
- Crowley D. Reid P. y Szaniszlo P.** (1988). Utilization of microbial siderophores in iron acquisition by oat. *Plant Physiol.* 87: 680-685.
- Crozier A. Arruda P. Jasmim J.M. Monteiro A.M. y Sandberg G.** (1988). Analysis of indole-3-acetic acid and related indoles in culture medium from *Azospirillum lipoferum* and *Azospirillum brasilense*. *Applied and Environmental Microbiology* 54 (11): 2833-2837.
- Dobbeleare S. Croonenborghs A. Thys A. Vande Broek A. y Vanderleyden J.** (1999). Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. *Plant and Soil* 212: 155–164.
- Donati A.J. Lee H.I. Leveau J.H.J. y Chang W.S** (2013) Effects of indole-3-acetic acid on the transcriptional activities and stress tolerance of *Bradyrhizobium japonicum*. *PLoS ONE* 8(10): e76559. doi:10.1371/journal.pone.0076559.
- Glick B.R.** (1995) The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can J Microbiol* 41:109-117.
- Gray E. y Smith D.** (2005). Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. *Soil Biology & Biochemistry* 37:395–412.
- Gündisch C. Kirchhof G. Baur M. Bode W. y Hartmann. A.** (1993). Identification of *Azospirillum* species by RFLP and pulsed-field gel electrophoresis. *Microb. Release* 2:41-45.

Hussain A. Shah S.T. Rahman H. Irshad M. y Iqbal A. (2015). Effect of IAA on *in vitro* growth and colonization of *Nostoc* in plant roots. *Frontiers in plant Science*. 6 (46) doi: 10.3389/fpls.2015.00046.

Imada E.L. Rolla dos Santos A.A. Oliveira A.L. Hungria M. y Rodrigues E.P. (2016). Indole-3-acetic acid production via the indole-3-pyruvate pathway by plant growth promoter *Rhizobium tropici* CIAT 899 is strongly inhibited by ammonium. *Res Microbiol*. doi: 10.1016/j.resmic.2016.10.010..

Jaroszuk-Scise J. Kurek E. y Trytek M. (2014). Efficiency of indoleacetic acid, gibberellic acid and ethylene synthesized in vitro by *Fusarium culmorum* strains with different effects on cereal growth. *Biologia* 69 (3): 281—292.

Kochar M. y Srivastava M. (2012). Surface colonization by *Azospirillum brasilense* SM in the indole-3-acetic acid dependent growth improvement of sorghum. *J Basic Microbiol*. 52: 123-131.

Koul V. Adholeya A. y Kochar M. (2014). Sphere of influence of indole acetic acid and nitric oxide in bacteria. *J. Basic Microbiol*. 54:1-11.

Lambrecht M. Okon Y. Vande Broek A. y Vanderleyden J. (2000). Indole 3-acetic acid: a reciprocal signalling molecule in bacteria-plant interactions. *Trends in microbiology*. 8(7):298-300.

Lavicoli A. Boutet E. Buchala A. y Métraux J. (2003). Induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* in response to root inoculation with *P. fluorescens* CHA0. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 16(10):851-858.

Lee J. Postmaster A. Peng Soon H. Keast D. y Carson K. (2011). Siderophore production by actinomycetes isolates from two soil sites in Western Australia. *An International Journal on the Role of Metal Ions in Biology, Biochemistry and Medicine*. doi:10.1007/s10534-011-9503-9.

Li J. Shah S. Moffatt B. y Glick B. (2001). Isolation and characterization of an unusual 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase gene from *Enterobacter cloacae* UW4. *Antonie van Leeuwenhoek* 80: 255–261.

Lin J. Shah S. Moffatt B. y Glick B. (2014). Isolation and characterization of an unusual 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase gene from *Enterobacter cloacae* UW4. *Antonie van Leeuwenhoek* 80: 255–261.

Lin S. Liu Y. Hameed A. Hsu Y. Huang H. Lai W. y Young C. (2016). *Azospirillum agricola* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from cultivated soil. *Int J Syst Evol Microbiol*. 66(3):1453-8. doi: 10.1099/ijsem.0.000904.

Malhotra M. y Srivastava S. (2006). Targeted engineering of *Azospirillum brasilense* SM with indole acetamide pathway for indoleacetic acid over-expression. *Can J Microbiol*. 52 (11):1078-1084.

Malhotra M. y Srivastava S. (2008). Organization of the *ipdC* region regulates IAA levels in different *Azospirillum brasilense* strains: molecular and functional analysis of *ipdC* in strain SM. *Environ Microbiol*. 10 (5) 1365-1373.

Malhotra M. y Srivastava S. (2008). An *ipdC* gene knock-out of *Azospirillum brasilense* strain SM and its implications on indole-3-acetic acid biosynthesis and plant growth promotion. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 93(4):425-33.

Mai X. y Adams W. (1994). Indolepyruvate Ferredoxin Oxidoreductase from the Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Journal of Biological Chemistry*. 269 (24):16726-16732.

Mandimba G. (1995). Contribution of nodulated legumes on the growth of *Zea mays* L. under various cropping systems. *Symbiosis* 19:213–222.

Manulis S. Haviv-Chesner A. Brandl M.T. Lindow S.E. y Barash I. (1998). Differential involvement of indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in pathogenicity and epiphytic fitness of *Erwinia herbicola* pv. *gypsophillae*. *Mol Plant Microbe Interact*. 11(7):634-642.

Massena V. dos Santos K. y Pedraza R. (2011). What is expected from the genus *Azospirillum* as a plant growth-promoting bacteria? En Maheshwari, D., *Bacteria in agrobiology: plant growth responses*. pp:123-138.

Mehnaz S. Weselowski B. y Lazarovits G. (2007). *Azospirillum zeae* sp. nov., a diazotrophic bacterium isolated from rhizosphere soil of *Zea mays*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 57:2805-9.

- Nascimento F. Vicente C. Barbosa P. Espada M. Glick B. Mota M. y Oliveira S.** (2013). Evidence for the involvement of ACC deaminase from *Pseudomonas putida* UW4 in the biocontrol of pine wilt disease caused by *Bursaphelenchus xylophilus*. *BioControl*. 58:427–433
- Ona O. Impe J. Prinsen E. y Vanderleyden J.** (2005). Growth and indole-3-acetic acid biosynthesis of *Azospirillum brasilense* Sp245 is environmentally controlled. *FEMS Microbiology Letters* 246:125–132.
- Patten C. Blakney A. y Coulson T.** (2012). Activity, distribution and function of indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*. DOI: 10.3109/1040841X.2012.716819.
- Pedrosa F. Monteiro R.A. Wassem R. y et al.** (2011). Genome of *Herbaspirillum seropedicae* Strain SmR1, a Specialized Diazotrophic Endophyte of Tropical Grasses. *PLoS Genet* 7(5): e1002064. doi:10.1371/journal.pgen.1002064.
- Pereg-Gerk L. Paquelin A. Gounon P. Kennedy I.R. y Elmerich C.** (1998). A transcriptional regulator of the LuxR-UhpA family, FlcA, controls flocculation and wheat root surface colonization by *Azospirillum brasilense* Sp7. *Mol Plant Microbe Interact* 11 (3): 177-187.
- Ramírez-Mata A. López-Lara L.I. Xiqui Vázquez M.L. Jijón-Moreno S. Romero-Osorio A. y Baca B.E.** (2016). The cyclic-di-GMP diguanylate cyclase CdgA has a role in biofilm formation and exopolysaccharide production in *Azospirillum brasilense*. *Res Microbiol* 167(3):190.201.
- Ramos H. J. Roncato-Maccaria L. D. Souza E.M. Soares-Ramos J. R. Hungria M. y Pedrosa F.O.** (2002). Monitoring *Azospirillum*-wheat interactions using the *gfp* and *gusA* genes constitutively expressed from a new broad-host range vector. *Journal of Biotechnology*. 97:243–252.
- Sant'Anna F.H. Almeida L.G.P. y Cecagno R.** (2011). “Genomic insights into the versatility of the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum amazonense*,” *BMC Genomics*.12 (409) 1-14.
- Sambrook J. Fritsch E.F. y Maniatis T.** (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2 edición. Vol 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 253pp.
- Shelud'ko A.V. Shirokov A.A. Sokolova M.K. Sokolov O.I. Petrova L.P. Matora L.Y. y Katsy E.I.** (2010) Wheat Root Colonization by *Azospirillum brasilense* strains with different motility. *Microbiology* 79 (5) : 688–695.
- Simon R. Priefer U. y Pühler A.** (1983). A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram negative bacteria. *Biotechnology* 1: 784-790.
- Shih-Yao L. Fo-Ting S. y Chiu-Chung Y.** (2011). Rapid detection and identification of the free-living nitrogen fixing genus *Azospirillum* by 16S rRNA-gene-targeted genus-specific primers. *Antonie van Leeuwenhoek*. 1-8.
- Spaepen S. Vanderleyden J. y Remans R.** (2007). Indole -3-acetic acid in microbial and microorganism – plant signaling. *FEMS Microbiol Rev*. 31:425–448.
- Spaepen S. Versées W. Gocke D. Pohl M. Steyaert J. y Vanderleyden J.** (2007). Characterization of phenylpyruvate decarboxylase, involved in auxin production of *Azospirillum brasilense*. *J. Bacteriol*, 189, 7626–7633.
- Spaepen S. Dobbelaerae S. Croonenborghs A. y Vanderleyden J.** (2008). Effects of *Azospirillum brasilense* indole 3- acetic acid production on inoculated wheat plants. *Plant and Soil*. 312 (1): 15-23.
- Steenhoudt O. y Vanderleyden J.** (2000). *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiology Reviews* 24:487-506.
- Suzuki S. He Y.X. y Oyaizu H.** (2003) Indole-3-acetic acid production in *Pseudomonas fluorescens* HP72 and its association with suppression of creeping bentgrass brown patch. *Curr Microbiol* 47: 138–143.
- Szkop M. y Bielawski W.** (2013). A simple method for simultaneous RP-HPLC determination of indolic compounds related to bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Antonie van Leeuwenhoek*.103:683–691.

Tarrand J. J. Krieg N. R. y Döbereiner, J. (1978). A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov., and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. *Can J Microbiol* 24, 967–980.

Tsavkelova E. Cherdyntseva T. y Netrusov A. (2005). Auxin production by bacteria associated with orchid roots. *Microbiology*. 74(1):46–53.

Ulmasov T. Liu Z.B. Hagen G. y Guilfoyle T.J. (1995). Composite structure of auxin response elements. *The Plant Cell* (7): 1611–1623.

Vacheron J. Desbrosses G. Bouffaud M. Touraine B. Moëgne-Loccoz Y. Muller D. Legendre L. Wisniewski-Dyé F. y Prigent-Combaret C. (2013). Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Frontiers in Plant Science*. 4:1-19.

Wang Y. Xia Q. Zhang H. Lu X. Sun J. y Zhang X. (2014). Construction of a heterologous gene expression system in the banana rhizobacterium strain GW-3 and its colonization ability. *World J Microbiol Biotechnol* 30:903–913.

Wisniewski-Dyé F. y Prigent-Combaret C. (2013). Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Frontiers in Plant Science*. 4:1-19.

Vande Broek A. Lambrecht M. Eggermont K. y Vanderleyden J. (1999). Auxins Upregulate Expression of the indole-3-pyruvate decarboxylase gene in *Azospirillum brasilense*. *Journal Of Bacteriology*. 181 (4):1338–1342.

Vande Broek A. Gysegom P. Ona O. Hendrickx N. Prinsen E. Van Impe J. y Vanderleyden J. (2005). Transcriptional analysis of the *Azospirillum brasilense* indole-3-pyruvate decarboxylase gene and identification of a cis-acting sequence involved in auxin responsive expression. *MPMI* 18 (4): 311–323.

Van Puyvelde S. Cloots L. Engelen K. Das F. Marchal K. Vanderleyden J. y Spaepen S. (2011) Transcriptome analysis of the rhizosphere bacterium *Azospirillum brasilense* reveals an extensive auxin response. *Microb Ecol.* 61:723 – 728.

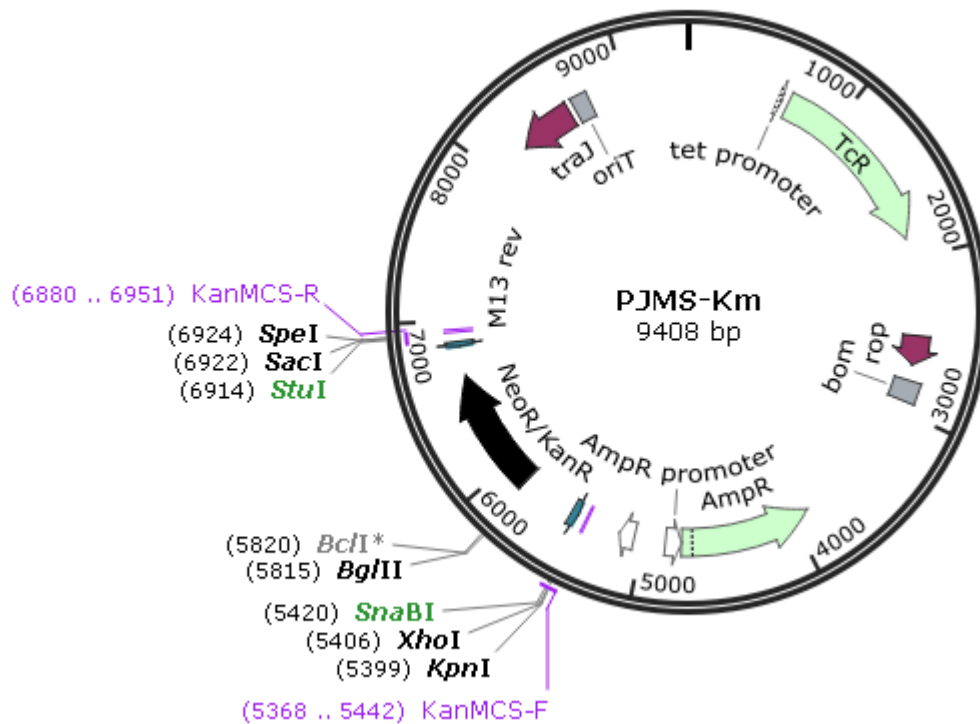
Wiggs J.L. Bush J.W. y Chamberlin M.J. (1979). Utilization of promoter and terminator sites on bacteriophage T7 DNA by RNA Polymerases from a variety of bacterial orders. *Cell*. (16):97-109.

Woodward A.W. y Bartel B. (2005). Auxin: Regulation, action and interaction. *Annals of Botany* 95: 707–735.

Zahran H. (1999). Rhizobium-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63(4):968.

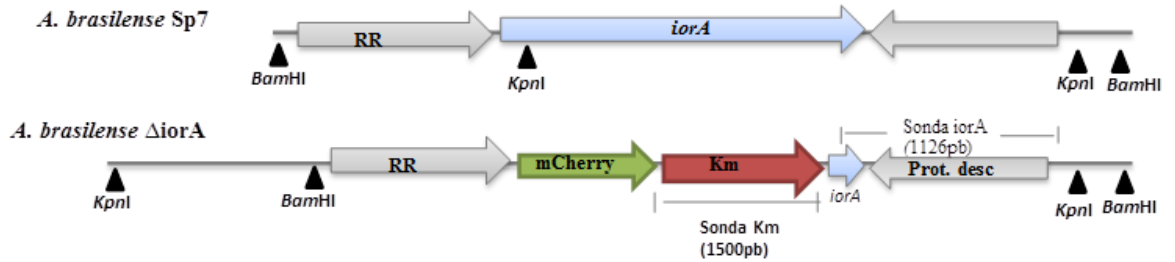
ANEXO 1. Mapa físico del plásmido pJMS-Km

Mapa físico del plásmido pJMS-Km que muestra los sitios únicos de restricción pertenecientes a las enzimas que flanquean el gen de resistencia a Km. El plásmido fue usado para la construcción del vector p Δ iorA.

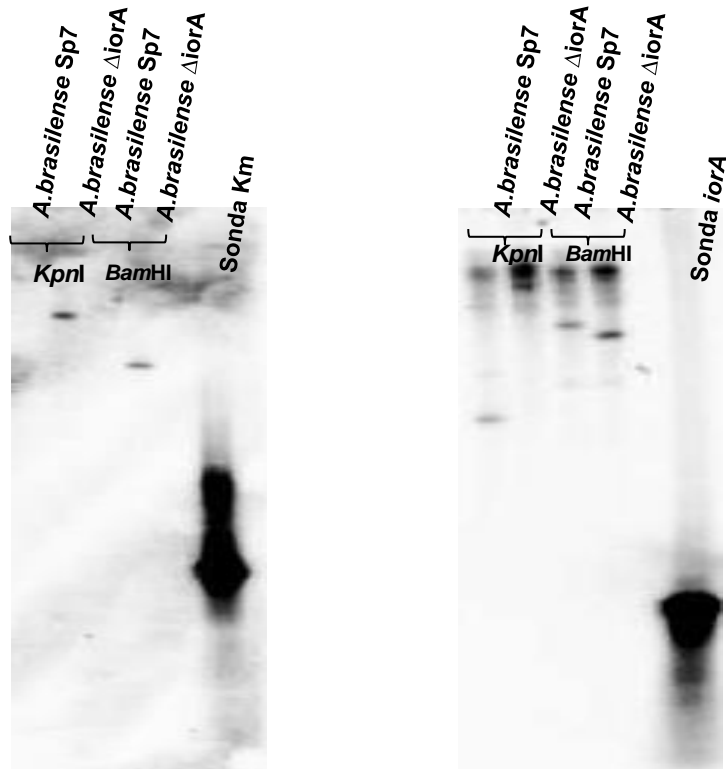


ANEXO 2. Southern blot de la cepa mutante *A. brasilense* Δ iorA

La cepa mutante *A. brasilense* Δ iorA fue corroborada por Southern blot utilizando como sonda el gen de km y un fragmento del gen *iorA*. Las enzimas utilizadas para este ensayo fueron *Kpn*I y *Bam*HI. Los fragmentos esperados se muestran en la tabla.



Fragmentos esperados		
Cepa	<i>A. brasilense</i> Sp7	<i>A. brasilense</i> Δ iorA
Enzima <i>Kpn</i> I	4500pb	11000pb
Enzima <i>Bam</i> HI	9000pb	8500pb

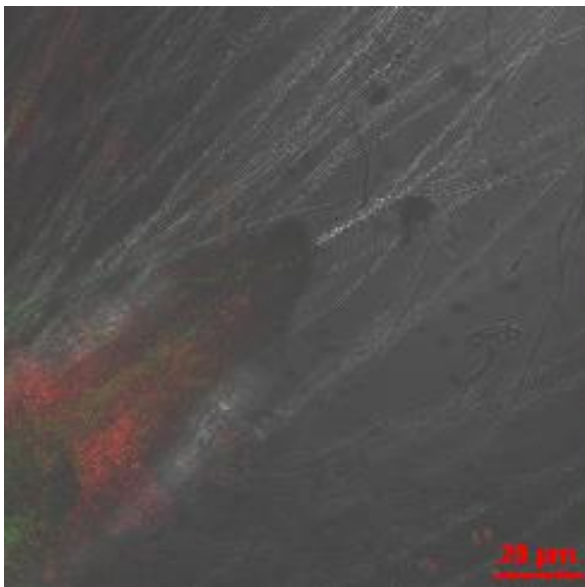


ANEXO 3. Microscopía confocal de las cepa mutante Δ iorA de *A. brasilense*.

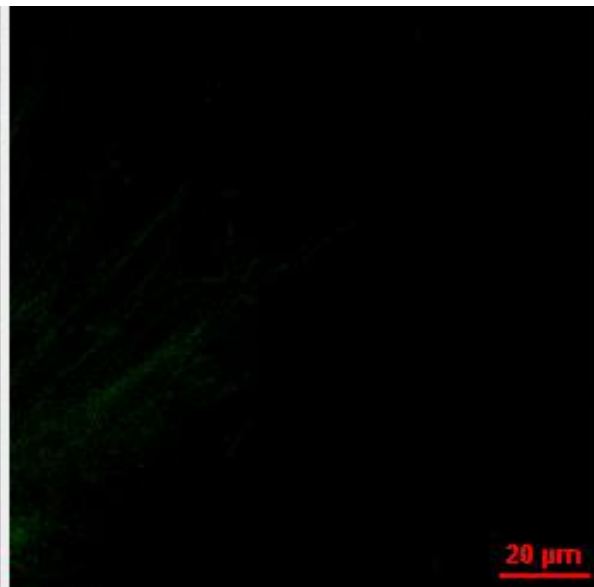
Imagen de microscopía confocal de la cepa mutante Δ iorA tomada a 10X en la zona de la cofia, donde se observa la colonización de la bacteria en la raíz de la planta de trigo.

***A. brasilense* Δ iorA**

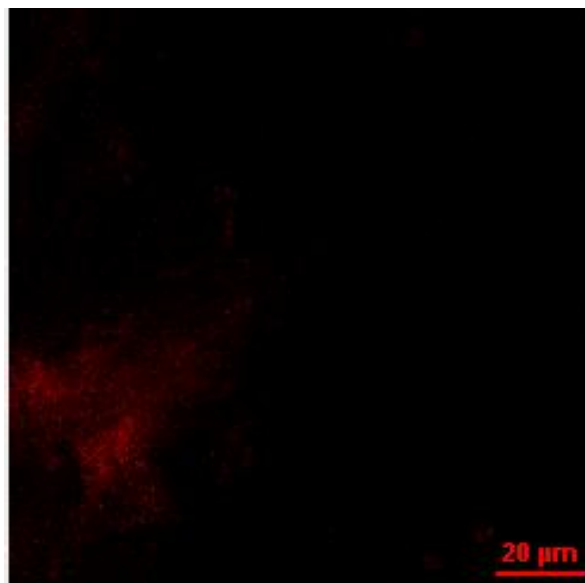
Superposición



FITC



Mcherry



Luz transmitida

