



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE MEDICINA
LICENCIATURA EN BIOMEDICINA
EJE DE MICROBIOLOGÍA

TESIS

**“Análisis bioinformático y funcional del gen *cdgC-II* de *Azospirillum baldaniorum*
Sp245”**

TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TITULO DE:

Licenciado en biomedicina

PRESENTA:

Juan Pablo Victoriano Notario

DIRECTOR DE TESIS:

D.C. Alberto Ramírez Mata

Septiembre 2025

Agradecimientos.

Esta tesis es la prueba del enorme cariño y acompañamiento que he tenido en estos años, agradezco a mi familia por brindarme un espacio donde poder desarrollar mis sueños y ambiciones, a mi abuela Celia por ser quien con cariño y amor sincero ha visto por mí todos estos años, a mi madre Aida, orgullo y modelo a seguir, tanto ella como mi hermano José Carlos son el motor por el cual continuo esforzándome día con día, Carlos, eres mi más grande orgullo y por quien me motivo a ser mejor cada día, espero ser la mitad de increíble de lo que tú lo eres para mí, a mis peludos y motivo de mi alegría: Luna, Jack y Kascara, a mis tías y tíos que han sido parte de esto, en especial mi tía Mary y mi segunda madre, a quien nunca podre agradecerle todo lo que ha hecho por mí, mi madrina Luz, ambas han sido fundamentales para llegar a donde estoy, este logro también es suyo.

También me gustaría agradecer a un grupo excepcional de talentosas personas con las que he tenido la oportunidad de reír y aprender, le agradezco a mis compañeros y maestros del laboratorio de la Interacción Bacteria-Planta por abrirme las puertas de su laboratorio y brindarme las herramientas para poder completar esta meta, su continuo apoyo y confianza en que lo lograría es algo que siempre tendré presente, les agradezco por creer en mí.

Por último, pero igual de importante, mi mejor amiga Karla, quien ha tenido la desdicha de aguantarme todos estos años, no sé qué sería de mí sin tu compañía, tampoco me olvido de ti “Koi”, me acompañaste y animaste tanto en este proyecto, gracias por ello.

Índice

1. Resumen	3
2. Introducción	4
3.1 Antecedentes Generales	5
3.1.1 Rizosfera y bacterias promotoras del crecimiento vegetal	5
3.1.2 Genero <i>Azospirillum</i>	10
3.1.3 Características del género <i>Azospirillum</i>	10
3.2 Antecedentes específicos	11
3.2.1 Señalización bacteriana: Sistemas de Dos Componentes.	11
3.2.2 Reguladores de respuesta con actividad de diguanilato ciclasa y su papel en la bacteria	14
3.2.3 Formación de biopelícula	17
3.3 Marco de referencia	19
4. Planteamiento del problema	21
Hipótesis	21
5. Objetivos	21
5.1 Objetivo General	21
5.2 Objetivos Específicos	21
6. Materiales y métodos	22
7. Resultados	32
8. Discusión	52
9. Conclusiones	58
10. Bibliografía	58
11. Anexos	67

1. Resumen

Azospirillum baldaniorum Sp245 es una bacteria de vida libre que destaca por su capacidad de asociarse con plantas de forma simbiótica, favoreciendo el desarrollo de las mismas mediante distintos mecanismos que incluyen el incremento de pelos reticulares o la facilitación en la captación de nutrientes al actuar como una bacteria fijadora de nitrógeno, para que estos procesos puedan ocurrir es necesario una asociación bacteria-planta exitosa, esto requiere de una estructura de anclaje y resistencia conocida como biopelícula, misma que está regulada por dos elementos clave, el procesos de comunicación celular o *quorum sensing* y la producción del segundo mensajero di-GMPc, siendo este el encargado de favorecer la formación de la biopelícula al generar cambios funcionales y estructurales en la célula, este segundo mensajero se encuentra regulado por 2 grupos de proteínas, las fosfodiesterasas, proteínas con dominio EAL, encargadas de degradarlo y las diguanilato ciclasas, proteínas que cuentan con el dominio GGDEF, encargadas de su síntesis, en esta tesis se analizó *in silico e in vitro* la actividad de la proteína WP_014239228.1 (CdgCII) proteína diguanilato ciclasa que cuenta con los dominios REC-GGDEF, para ello se recuperó el ORF completo del gen *AZOBR_RS03050 (cdgC-II)*, para posteriormente integrarlo en el plásmido de expresión pGEX 4-T1, obteniendo la construcción pGEX_cdgC-II, este plásmido fue introducido en las células quimiocompetentes *Escherichia coli* S17.1 pDZ119, que cuentan con un riboswitch sensible al di-GMPc. Los resultados obtenidos al compararla con la diguanilato ciclasa ya caracterizada CdgC, demostraron que posee actividad catalítica, esta información fue complementada al analizar la presencia de la proteína en distintas especies del género *Azospirillum*, observando que todos los miembros analizados tienen presente el gen *cdgC-II*, como parte de un clúster de genes en su genoma, los análisis posteriores en otras bacterias asociadas a plantas mostraron que el clúster de genes asociados a CdgCII es una cualidad de los miembros del género *Azospirillum*.

2. Introducción

El suelo esconde un vasto y diverso grupo de interacciones biológicas que a simple vista no podemos observar. Estas asociaciones son la piedra angular que permite el desarrollo de la vida, por lo mismo, se requiere de procesos cuidadosamente regulados y adecuados que garanticen el beneficio mutuo de quienes forman parte de dichas interacciones; un grupo particular de individuos que destacan por su facilidad para asociarse y promover el crecimiento de las plantas son las bacterias promotoras del crecimiento vegetal, estas se encargan de proteger a la planta de patógenos que puedan resultar dañinos mientras favorecen y estimulan su desarrollo, para lograr esto, las bacterias necesitan generar una estructura que les permita una interacción continua y un microambiente óptimo que limite las interferencias externas, esta estructura es conocida como biopelícula, su formación está regulada por el aumento de la concentración del segundo mensajero bis (3'-5') guanosín monofosfato cíclico (di-GMPc) ⁽¹⁻²⁾.

Con la finalidad de conformar la biopelícula, el di-GMPc puede actuar a diferentes niveles en el interior de la célula, favoreciendo la producción de exopolisacáridos, reduciendo la motilidad o implicándose a nivel transcripcional. ⁽³⁻⁴⁾ Tal es su impacto en la célula, que su metabolismo está cuidadosamente regulado por dos grupos de proteínas conocidas como fosfodiesterasas y diguanilato ciclasas conforme al dominio que tengan presente, las fosfodiesterasas son proteínas que cuentan con un dominio EAL encargado de degradar al di-GMPc en 2 moléculas de GMP, mientras que las diguanilato ciclasas son las responsables de la síntesis de di-GMPc a partir de 2 moléculas ATP que interactúan con el sitio catalítico GGDEF presente en el dominio con el mismo nombre, el correcto funcionamiento de este tipo de proteínas resulta clave en la capacidad de la bacteria para adaptarse y poder sobrevivir ^(1, 5). Por lo cual, resulta fundamental entender el papel que desempeña cada una de las proteínas presentes en la bacteria. En la presente investigación se analizaron las características del gen *cdgC-II* que codifica la proteína CdgCII, una diguanilato ciclasa con los dominios REC-GGDEF presente en *Azospirillum baldaniorum* Sp245.

3. Antecedentes

3.1 Antecedentes Generales

3.1.1 Rizosfera y bacterias promotoras del crecimiento vegetal

Definida en un primer momento por el agrónomo y fisiólogo de plantas Lorenz Hiltner, la rizosfera es la región que rodea la raíz de las plantas, misma que destaca por ser una de las zonas con interacciones biológicas más dinámicas de la tierra, en ella conviven invertebrados, plantas y microorganismos, siendo estos últimos, parte esencial de todas las interacciones⁽⁶⁾. La rizosfera se puede dividir en 3 regiones distintivas, la **endorizosfera** (también llamada rizosfera interna, abarca la corteza de la raíz invadida por microorganismos), el **rizoplano** (ubicado entre la epidermis de la raíz y el mucilago asociado) y la **ectorizosfera** (la región del suelo más cercana a la raíz), es en esta última región donde se llevan a cabo la mayoría de los intercambios entre las plantas y las rizobacterias (bacterias denominadas así por la región en la que se encuentran), (Figura 1)^(6, 7).

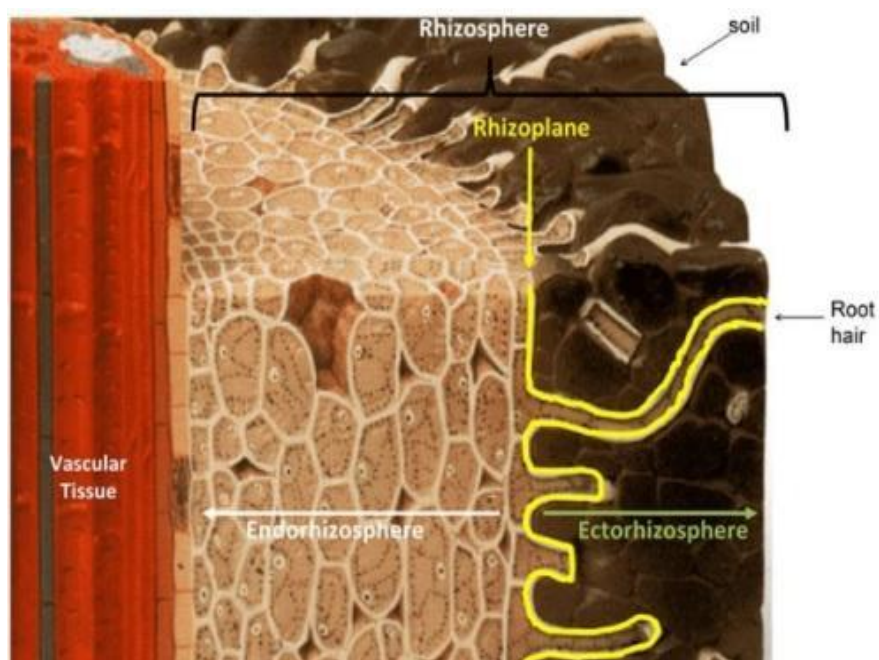


Figura 1. Esquema de la división de la Rizosfera. Se observa la complejidad y divisiones presentes en la rizosfera, la región exterior corresponde a la Ectorizosfera, seguida del rizoplano y con la endorizosfera como la parte más interna. Esquema recuperado de Mc.Near, 2013.

La importancia de estas interacciones biológicas es clave para el desarrollo óptimo de todos los implicados, por medio de exudados radiculares las plantas liberan azúcares, metabolitos secundarios o aminoácidos que llegan a representar hasta el 40% del carbono fijado mediante fotosíntesis, por su parte los microorganismos son a su vez los responsables de mantener las condiciones óptimas para el desarrollo de las plantas⁽⁶⁾, por lo que se les conoce como bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB por sus siglas en inglés *Plant Growth Promoting Bacteria*) al grupo de microorganismos que regulan el bienestar y desarrollo de la planta mediante mecanismos directos e indirectos⁽⁸⁾ (Figura 2).

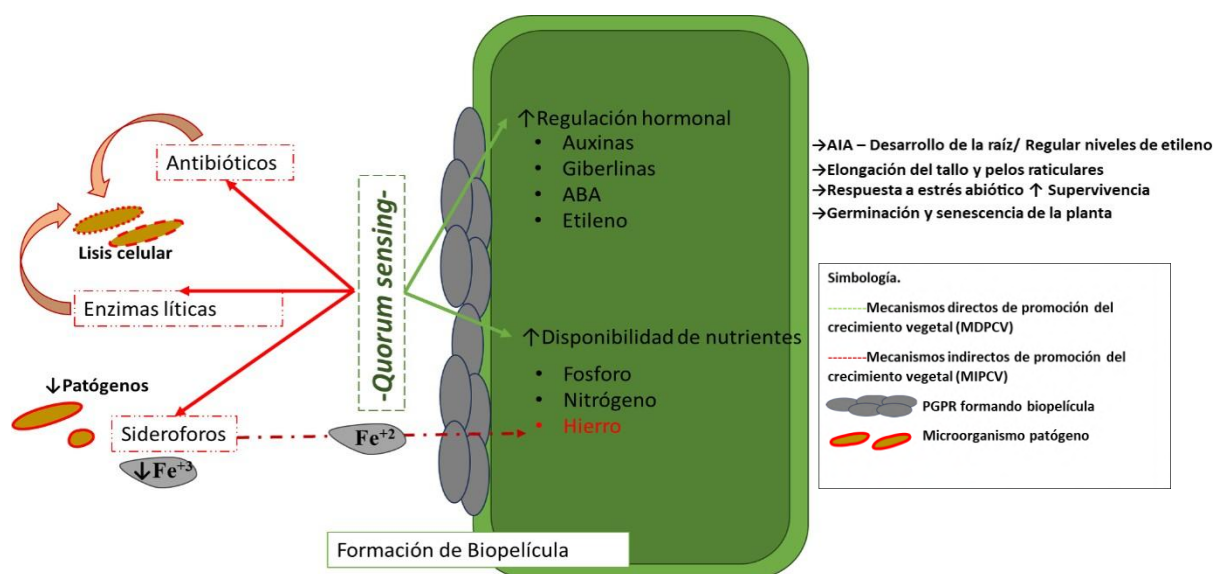


Figura 2. Mecanismos directos e indirectos de la promoción del crecimiento vegetal. En la figura se pueden observar las 2 vías que garantizan el desarrollo de la planta una vez colonizada la rizosfera, la MDPCV directos se enfoca en el desarrollo de la planta, mientras que los MIPCVC indirectos reducen la presencia de microorganismos patógenos mediante la liberación de antibióticos, enzimas y sideróforos. figura elaborada por Juan Pablo Victoriano Notario. 2023.

Mecanismos de promoción de crecimiento vegetal directos

Son mecanismos que las bacterias utilizan para reforzar el desarrollo de las plantas mediante liberación de nutrientes y estimulantes al medio⁽⁸⁻⁹⁾. A continuación, se indican los principales mecanismos:

Solubilización o fijación de nutrientes: La disponibilidad de nutrientes es un elemento clave en el desarrollo de las plantas, existen bacterias que se encargan de facilitar estos procesos, haciendo más sencillo para la planta poder asimilarlos.

- Fijación de Nitrógeno:** Aunque el nitrógeno conforma el 78% de la atmosfera, este no puede ser utilizado directamente por las plantas, es ahí cuando las PGPB intervienen mediante un proceso conocido como fijación del nitrógeno, el proceso de fijación consiste en el uso de una proteína denominada nitrogenasa que ayuda a reducir el nitrógeno atmosférico a amonio (NH_3), facilitando la captación por parte de la planta, este proceso es regulado por mecanismos que requieren la interacción de diversos factores ambientales y químicos, en el caso de *Azospirillum* el complejo nitrogenasa está regulado por condiciones como la microaerofilia o la concentración de NH_3 en el ambiente, cuando la concentración de NH_3 es elevada, DraT, una ADP-ribosil transferasa inhibe la dinitrogenasa reductasa al unir un grupo ADP-ribosilo a la subunidad gamma (γ), lo que impide el proceso de fijación de nitrógeno, en contra parte, cuando la concentración de NH_3 cae, DraG, una enzima glucosidolasa, interactúa con el grupo inhibitorio, removiéndolo, lo que restituye la actividad catalítica de la dinitrogenasa reductasa, permitiéndole continuar con la fijación de nitrógeno⁽⁸⁻¹⁰⁾ (Figura 3).

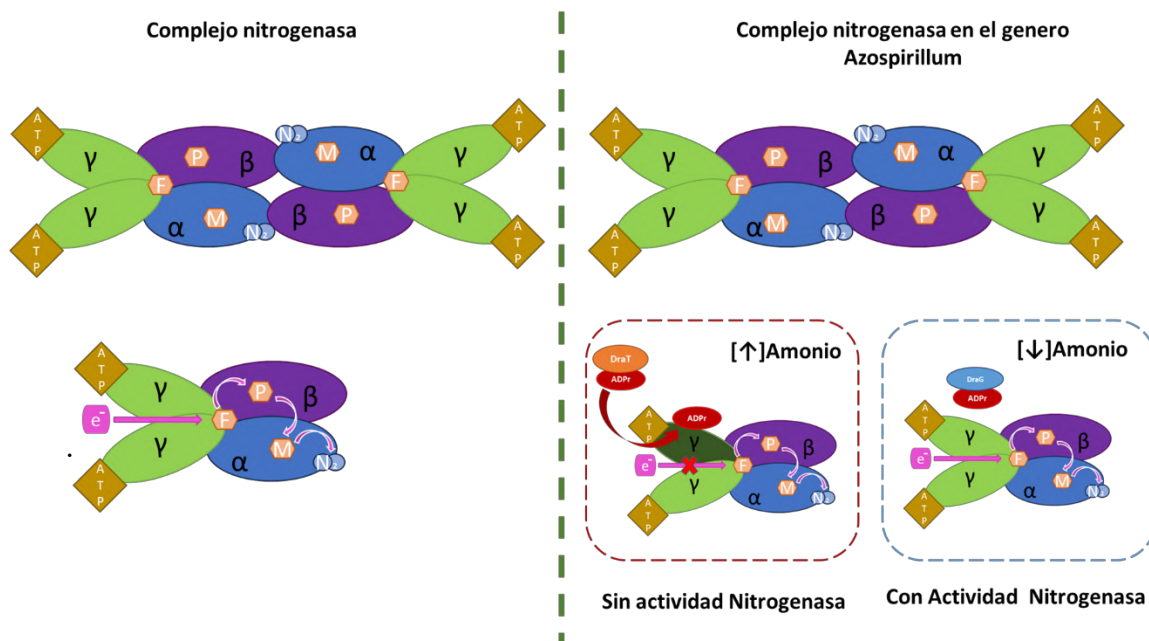


Figura 3: Comportamiento de la nitrogenasa del género *Azospirillum*, a diferencia de otros complejos nitrogenasa, en el caso de *Azospirillum*, la activación del complejo nitrogenasa está subordinada a dos proteínas clave, DraT inhibe la actividad de la subunidad gamma en presencia de una concentración de NH_4 elevada, cuando la concentración disminuye, DraG retira el grupo ADP-ribosilo de la subunidad gamma, lo que reinstituye la actividad del complejo nitrogenasa. Modificado a partir de la figura de Ángel Herráez, 2024.

- Mineralización del suelo: entre los minerales que las PGPB contribuyen a solubilizar está el potasio, sodio, y el fósforo, este último es indispensable para el crecimiento de las plantas, estas solo pueden absorberlo en sus formas di básica (HPO_4^{2-}) o monobásica (H_2PO_4^-), por lo que es necesario degradar el fosfato inorgánico presente en el suelo, esto lo consiguen mediante 2 procesos, el principal es mediante la liberación de ácidos orgánicos, como lo son ácido acético o ácido málico, estos modifican el pH del medio, acidificándolo y facilitando la reducción de los grupos fosfatos inorgánicos al formar complejos estables con Ca^{+2} , Mg^{+2} , Fe^{+3} y Al^{+3} ; el segundo proceso puede ocurrir sin la presencia de ácidos orgánicos y es mediante la acidificación del medio por la liberación de H^+ como parte de los procesos biológicos que realiza la bacteria^(8,12).

Producción de sustancias estimuladoras: Las rizobacterias tienen la capacidad de producir sustancias que desempeñan un papel similar a las fitohormonas liberadas por las plantas, entre ellas, las que más destacan son auxinas, ácido abscísico (ABA) y etileno⁽⁹⁾.

- Auxinas: Son hormonas inductoras del crecimiento vegetal, entre ellas destaca el ácido indolacético (AIA), un compuesto que estimula el desarrollo de la raíz, mejorando el anclaje de la planta al suelo, la captación de nutrientes y facilitando la división celular; Se considera que sus concentraciones en el microambiente de la planta son cruciales para su desarrollo, en concentraciones adecuadas, favorece el desarrollo de la raíz, sin embargo, cuando estas concentraciones se vuelven elevadas, puede actuar como un inhibidor del desarrollo⁽⁸⁾.
- Producción de ácido abscísico: Hormona clave en la respuesta a estrés abiótico, también es sintetizada por especies del género *Azospirillum*, actúa controlando el flujo de agua en las plantas mediante su efecto regulador de las estomas, induciendo el cierre estomático, también contribuye a la maduración de frutos y la inhibición de la germinación de las semillas ante condiciones adversas⁽¹³⁾.

- Producción de etileno: Considerado como un regulador del crecimiento vegetal, está involucrado en distintos procesos del desarrollo de la planta, desde el desarrollo de raíces adventicias y pelos absorbentes hasta estadios de germinación y senescencia de la planta, su regulación es muy importante, una concentración elevada de etileno después de la germinación puede generar inhibición en la elongación radicular⁽¹⁴⁾.

Mecanismos de promoción del crecimiento vegetal Indirectos

Son procesos químicos que la bacteria lleva a cabo de manera rutinaria cuya función principal no es proteger a la planta, pero estos mecanismos permiten evitar la colonización por patógenos, por ejemplo:

- Inducción de resistencia sistémica: Identificada en 1991 por Klopffer y Schippers, es una ruta de señalización contra fitopatógenos que mantiene a la planta alerta mediante compuestos inductores como antibióticos, sideróforos, inclusive compuestos como el etileno, la ventaja de un sistema de resistencia sistémica radica en preparar a la planta sobre una posible invasión antes de que suceda, reduciendo el impacto de la enfermedad que podría resultar perjudicial de otra forma ^(8,15).
- Producción de sideróforos: Los sideróforos son compuestos que se encargan de regular la disponibilidad de hierro en el medio, el hierro desempeña un papel clave en procesos de desarrollo celular que permiten a las células desempeñarse de manera adecuada, por lo que una deficiencia en el medio puede ser perjudicial para organismos patógenos que busquen establecerse en la rizosfera, esto lo logran absorbiendo el hierro normalmente en forma Fe^{+3} a Fe^{+2} al interior de las raíces de la planta, lo que permite su aprovechamiento⁽⁹⁾.

3.1.2 Genero *Azospirillum*

Considerada una de las principales PGPB por su capacidad de favorecer el desarrollo de las plantas al estimular el tamaño de la raíz y pelos radiculares, el estudio de *Azospirillum* tiene sus comienzos con el primer miembro aislado y reportado en 1925 por Martinus Willem Beijerinck recibiendo el nombre de *Spirillum lipoferum*, la investigación del género se vio limitada durante mucho tiempo por la falta de medios y técnicas para su aislamiento e identificación, fue hasta el año 1984 donde el género *Azospirillum* fue retomado y descrito por Krieg y Döbereiner⁽¹⁶⁾.

Actualmente se conocen 27 especies distintas del género *Azospirillum*, de estas se han descrito al menos 23 especies: *A. halopraeferens*, *A. largimobile*, *A. doebereinae*, *A. Oryzae*, *A. melinis*, *A. Canadense*, *A. zae*, *A. rugosum*, *A. piscis*, *A. palatum*, *A. thiophilum*, *A. formosense*, *A. humicireducens*, *A. fermentarium*, *A. himalayense*, *A. soli*, *A. agrícola*, *A. griseum*, *A. palustre*⁽¹⁷⁾, tanto *A. amazonense* como *A. irakense* fueron reclasificadas a *Nitrospirillum amazonense*⁽¹⁸⁾ y *Niveispirillum irakense*⁽¹⁸⁾, por su parte, la cepa *A. ramosamyi* fue descrita en un primer momento como *Azospirillum* Sp. M2T2B2⁽¹⁹⁾ teniendo un caso similar con *A. baldaniorum* Sp245, antes conocida como *A. brasilense* Sp245⁽²⁰⁾ y *A. argentinense* quien se ha propuesto como una reclasificación de una cepa previamente clasificada como *A. brasilense* Az39⁽²¹⁾.

3.1.3 Características del género *Azospirillum*

Formando un subgrupo dentro de la familia *Rhodospirillaceae*, este tipo de α -proteobacterias de vida libre se caracterizan por su forma de varilla ligeramente curvada, carecen de la capacidad de producir esporas, pero algunos miembros pueden formar quistes a base de gránulos de polihidroxibutirato, de una tinción Gram negativa, las células se caracterizan por su elevada movilidad con múltiples flagelos laterales, pero con un único flagelo polar de mayor tamaño⁽²²⁾.

Las especies del género *Azospirillum* se distribuyen a lo largo de regiones tropicales, subtropicales, así como templadas, este tipo de bacterias se ha aislado en mayor medida en raíces de plantas o el suelo, también se ha visto su presencia en ambientes contaminados o con condiciones extremas, esto lo logra por medio de cambios en su estructura fisiológica

que va desde la pérdida de movimiento hasta la liberación de exopolisacáridos, pasando de una forma de bastón a una más ovalada, lo que le brinda protección adicional contra radiación ultravioleta, shock osmótico o disminución de nutrientes, entrando en un estado de latencia donde puede sobrevivir hasta que las condiciones se vuelvan favorables, si a esto se le suma su capacidad de aprovechar múltiples fuentes de carbono o nitrógeno y su capacidad de internalizarse al interior de la raíz, se obtiene un microorganismo capaz de sobrevivir en un ambiente tan competitivo como lo es la rizosfera⁽²³⁻²⁴⁾.

3.2 Antecedentes específicos

3.2.1 Señalización bacteriana: Sistemas de Dos Componentes.

Como el gran y diverso nicho ecológico que es la rizosfera, es necesario que los microorganismos que la habitan puedan identificar adecuadamente las características y cambios del medio que los rodea, para ello, las bacterias emplean diversas estrategias que les permiten detectar las concentraciones de oxígeno, amoníaco, luz, óxido nítrico, pH, entre otros inductores⁽²⁵⁾.

Entre los distintos mecanismos que utilizan las bacterias se encuentran los sistemas de señalización de dos componentes (SDC), estos SDC están constituidos por una quinasa sensora (también llamada histidina quinasa/HK) y un regulador de respuesta (RR), interactuando mediante la transferencia de un grupo fosfato en residuos conservados de histidina (His) y aspartato (Asp) respectivamente⁽²⁶⁻²⁷⁾.

Las histidina quinasas se encuentra en regiones específicas de las células como lo es la membrana celular, ubicación donde puede estar en contacto directo con el medio externo y responder de manera rápida a los estímulos y cambios del mismo, es posible separar la proteína en 2 regiones principales para su estudio, primero tendríamos la parte anclada a la membrana que cuenta con regiones transmembranales, siendo la encargada de detectar los estímulos ambientales, la segunda parte, corresponde a la región interna de la proteína donde podemos encontrar los dominios encargados de transmitir la señal⁽²⁷⁾.

Una vez que se ha emitido una señal, es necesario contar con proteínas especializadas en emitir una respuesta, las cuales deben ser lo más rápidas, regulables y específicas posibles⁽²⁶⁾. En el caso de los SDC el RR es el encargado de esto, estas proteínas cuentan con 2 regiones

principales: un dominio receptor donde se localiza el aspartato conservado, este se encarga de actuar como un andamio de relevo para el grupo fosfato que se encuentra en la histidina presente en la proteína sensora, el otro dominio es mucho más variable dependiendo del enfoque y mecanismos que regule este sistema, desde un sistema enzimático como lo son las diguanilato ciclasas o fosfodiesterasas, como un regulador de expresión genética en el caso del sistema NarX/NarL que favorecen la transcripción de genes asociados a la síntesis de nitratos en el género *Escherichia coli* o sistemas más complejos que hacen uso de intermediarios como lo es CheY en los SDC híbridos ⁽²⁸⁻²⁹⁾.

Los SDC se pueden clasificar conforme a la ruta que sigue el proceso de fosforilación, los simples o canónicos son aquellos que una vez el estímulo es detectado, se favorece la autofosforilación de la HK dependiente de ATP, una vez fosforilada, el RR se encarga de recibir el grupo fosfato en el residuo de Asp conservado, emitiendo una respuesta; Cuando el estímulo ya no es necesario, se libera como fosfato inorgánico mediante la acción fosfatasa de la histidina quinasa híbrida⁽²⁶⁾ (Figura 4).

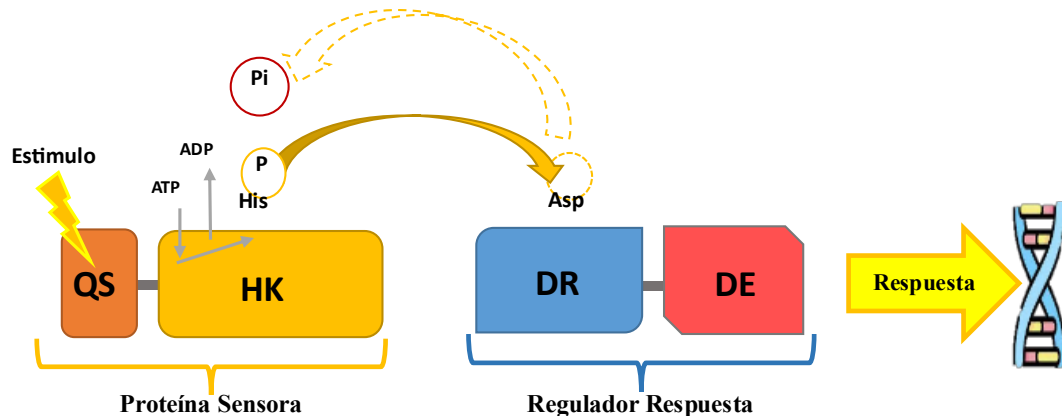


Figura 4. Sistema de 2 componentes simple o canónico. En este sistema solo se implica la actividad de una proteína sensora con 2 dominios: un dominio sensor o sensor quinasa (SK) y un dominio catalítico, en este caso una histidina quinasa (HK), así como un regulador de respuesta compuesto por un dominio receptor (DR) y un dominio efector (DE), Figura realizada por Juan Pablo victoriano Notario a partir del artículo de Terán-Melo *et al*, 2019; Francis y Porter, 2019.

El otro tipo de SDC es conocido como sistema de señalización de fosfo-relevo o híbrido, cuenta con un paso adicional que regula la interacción entre el residuo Histidina del sistema sensor y el Aspartato del regulador de respuesta, este paso adicional lo crean la adición de un dominio receptor (similar al del RR) y el dominio intermediario en la transferencia (HPt) que se puede encontrar dentro de la HK o como una proteína individual y soluble cuya característica principal es la presencia de un residuo His conservado, la interacción con el grupo fosfato mantendrá la siguiente secuencia: la bacteria detecta un cambio en el medio que la rodea (estimulo), responde a este estimulo utilizando ATP como fuente del grupo fosfato para la unión al residuo His conservado (H1), el grupo P es transferido al residuo Asp del dominio receptor (D1), esto da paso a la transferencia al dominio intermediario que posee la otra His conservada (H2) y finalmente se transfiere al residuo de Asp presente en el dominio receptor del RR (D2), la transferencia del grupo fosfato genera cambios conformacionales en la proteína que pueden terminar influyendo en la regulación de la expresión genética, tal como lo hace un SDC canónico, adicionalmente la HK puede fungir también como fosfatasa⁽²⁶⁻²⁷⁾ (Figura 5).

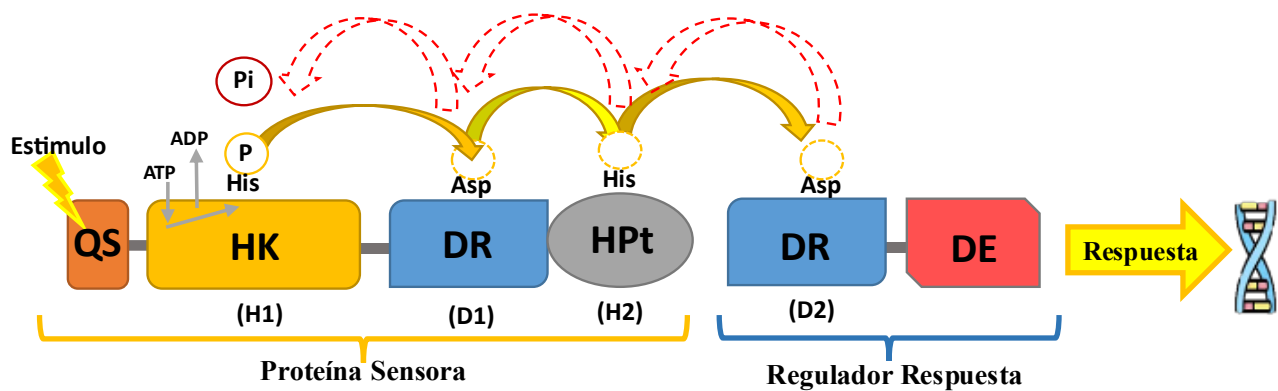


Figura 5. Sistema de dos componentes híbrido o de fosfo-relevo. Este sistema se diferencia del simple por la presencia de una proteína modular de transferencia (HPt) que interactúa como un intermediario de la proteína sensora y el regulador de respuesta, Figura realizada por Juan Pablo victoriano Notario, modificada a partir del artículo de Terán-Melo *et al.*, 2019; Francis y Porter, 2019.

Para que el segundo mensajero di-GMPc sea sintetizado se requiere que las DGC adquieran una conformación activa, para ello la enzima debe formar dímeros, una vez que la estructura se ha establecido, se requiere de 2 moléculas de GTP (guanosín trifosfato) que se colocan de forma antiparalela y dan paso a la formación de di-GMPc⁽³²⁾, este segundo mensajero puede desempeñar múltiples papeles al interior de la célula con la finalidad de favorecer la formación de una biopelícula:

Cambios en la motilidad: Los niveles de di-GMPc influyen en el comportamiento que las células adquirirán respecto a su motilidad y como esta puede generar cambios en la conformación de las colonias, la mutación por delección de la DGC codificada por el gen *acaty_c1319* de *Acidithiobacillus Caldus* genera cambios en la distribución y motilidad de las células en medio semi sólido, las colonias pasaron de ser circulares bien delimitada a expresar regiones de motilidad que ampliaban la circunferencia final de la colonia⁽³⁾ (Figura 7).

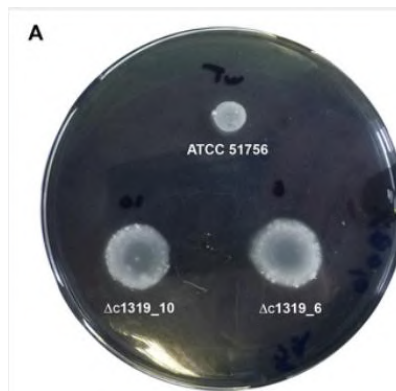


Figura 7. Di-GMPc modula el comportamiento de la motilidad en *A. caldus*. En la imagen se aprecian los cambios en la motilidad de las cepas con la delección del gen *acaty_c1319* (*Δc1319_10* & *Δc1319_6*) respecto a la cepa wildtype ATCC51756, se observan cambios en la morfología de las colonias, imagen tomada por Castro-Matias, *et al.* 2015.

Formación de exopolisacáridos: Los EPS son un componente clave en la estructura de la biopelícula, conforme la concentración de di-GMPc aumenta, también lo hacen los EPS que se producen (Figura 8), una de las particularidades del di-GMPc es que puede actuar a diferentes niveles:

- Activación enzimática: En el caso de *E. coli*, favorece la síntesis del exopolisacárido PNAG (polímero de n-Acetilglucosamida) (Figura 8) gracias a su actividad en sinergia con el operón pnagABCD, también llamado PNAG sintasa, específicamente de la subunidad PgaD, que codifica para una proteína de membrana que favorece la actividad de PgaC, enzima biosintética primaria en la producción de PNAG, los estudios realizados con la DGC YdeH demostraron su importancia en la concentración postraduccional de PgaD y el papel del di-GMPc para estabilizar el complejo PgaCD⁽⁴⁾.
- Regulación transcripcional: La celulosa es un polímero formado a partir de la unión de múltiples moléculas de β -D-glucosa (Figura 8), siendo uno los polímeros más abundantes en la tierra que es sintetizado por plantas, algas y bacterias, en estas últimas, puede desempeñar un papel esencial en la formación y mantenimiento de la biopelícula, los estudios realizados en *Acetobacter xylinus* demuestran que di-GMPc podría estar interactuando con el promotor de la celulosa sintasa, sin embargo su papel principal en la síntesis de celulosa es con la subunidad BcsA del operón BcsABCD (bacterial cellulose synthase), esta subunidad se considera parte esencial de la enzima celulosa sintasa bacteriana ya que es la encargada de generar la polimerización de la celulosa, el di-GMPc influye en la capacidad de BcsA de adaptar una conformación activa al unirse al dominio PilZ ubicado en la región C-terminal, cuando la

concentración decae, BcsA adopta una conformación auto inhibitoria mediante la formación de un loop en su estructura, lo que disminuye la producción de celulosa.⁽⁴⁾.

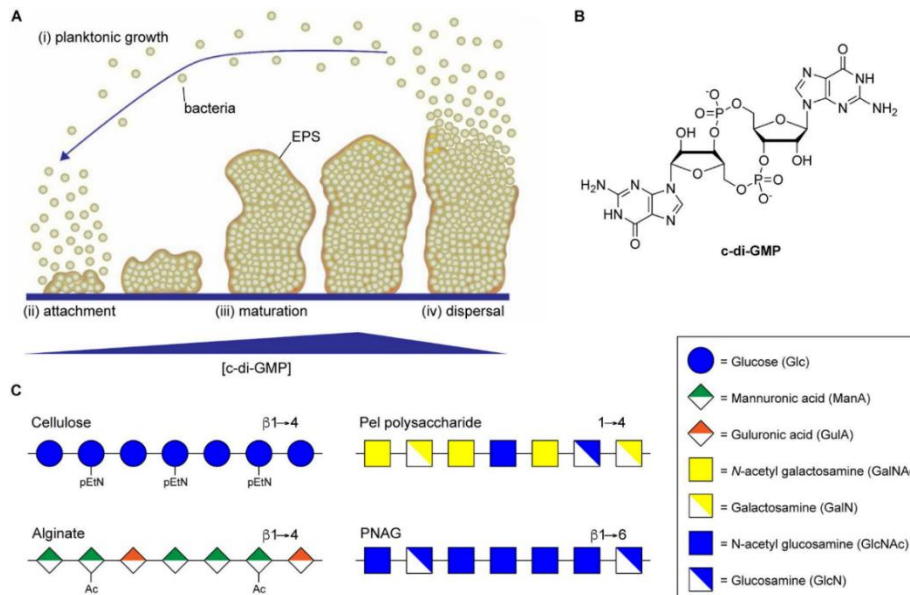


Figura 8. Efecto de la producción de di-GMPc en la formación de exopolisacáridos. Conforme las bacterias pasan de un estado plántico a uno sésil ocurren cambios en la concentración de di-GMPc. A) Cambios en los niveles de di-GMPc en la formación de biopelícula. B) Estructura del di-GMPc. C) Algunos de los exopolisacáridos producidos por las bacterias para la formación de la biopelícula, estos incluyen Celulosa, alginato, PNAG y Pel. Figura elaborada por Poulin & Kuperman, 2021.

3.2.3 Formación de biopelícula

La biopelícula es la acumulación de células bacterianas en superficies bióticas y abióticas, en el caso de las PGPB, su interacción ocurre con las raíces de las plantas, formando una estructura biótica, esta interacción se ve favorecida cuando la planta libera proteínas, metabolitos secundarios o ácidos orgánicos que se encargan de guiar a la bacteria de interés hacia la raíz o el interior de esta, dándole las señales necesarias para iniciar cambios en su expresión genética.⁽³³⁾.

Para favorecer la conformación de la biopelícula es necesaria la comunicación química bacteriana, mediante un proceso denominado *Quorum sensing* (*QSen*), este proceso favorece la expresión de genes acorde a la densidad poblacional de microorganismos, el *QSen* influye en procesos como la transferencia horizontal de genes, la estimulación en la producción de

toxinas o antibióticos o la formación de biopelícula, las moléculas encargadas de desencadenar el proceso de *QSen* van a variar de un grupo Gram a otro, pero un factor clave es la concentración de di-GMPc que favorece todos estos procesos (Figura 9), permitiéndole a la bacteria sobrevivir en ambientes altamente competitivos o a cambios repentinos en el medio que las rodea, como lo es el estrés abiótico^(4,34,35).

Contrario a la creencia popular, la formación de biopelícula no es solamente una estructura bacteriana que puede causar complicaciones médicas, es una estructura ampliamente distribuida en la naturaleza que forman un paso crucial en las interacciones simbióticas como lo es en el caso de las PGPB y las plantas, esta estructura le brinda a las bacterias un nicho seguro donde poder desarrollarse mientras las protege de radicales libres, compuestos antimicrobianos, procesos de invasión y resistencia a la radiación por luz UV, que facilitan la producción de compuestos beneficiosos para la planta (36-38).

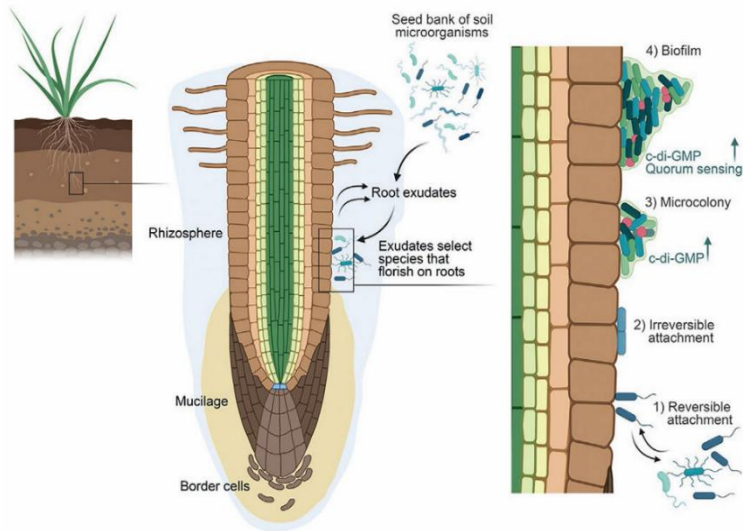


Figura 9. Reclutación de microorganismos del suelo mediante exudados radiculares. Las plantas liberan compuestos como proteínas o metabolitos secundarios que favorecen la quimiotaxis de las bacterias necesarias para formar una simbiosis, cuando se alcanza una determinada masa celular, se favorecen procesos como la formación de biopelícula por medio del *Quorum sensing* y mensajeros como el di-GMPc, imagen recuperada de Bhattacharyya, *et al.* 2023.

3.3 Marco de referencia

En 2019 Martínez-Baca realizo ensayos sobre la actividad diguanilato ciclasa del gen *AZOBR_RS06990* que posteriormente fue definido como *cdgC*. Este se encuentra en el genoma de *Azospirillum baldaniorum* Sp245, de una longitud de 845 pb que codifica para una proteína de 294 aminoácidos, en estos ensayos se decidió generar una mutante por eliminación del gen *cdgC* denominada *A. brasilense* 59C, entre sus observaciones destaca que no hay una diferencia significativa en las curvas de crecimiento al comparar la cepa silvestre con la mutante $\Delta cdgC$, observando también cambios menores en la producción de biopelícula, destacando cambios en la producción de exopolisacáridos con afinidad al Calcoflúor (Figura 10), por lo que se teorizo que la proteína CdgC está involucrado en la producción de EPS con enlaces β 1-3,1-4, identificando además 3 proteínas más con los mismos dominios REC-GGDEF presentes en el genoma de *Azospirillum baldaniorum* Sp245.

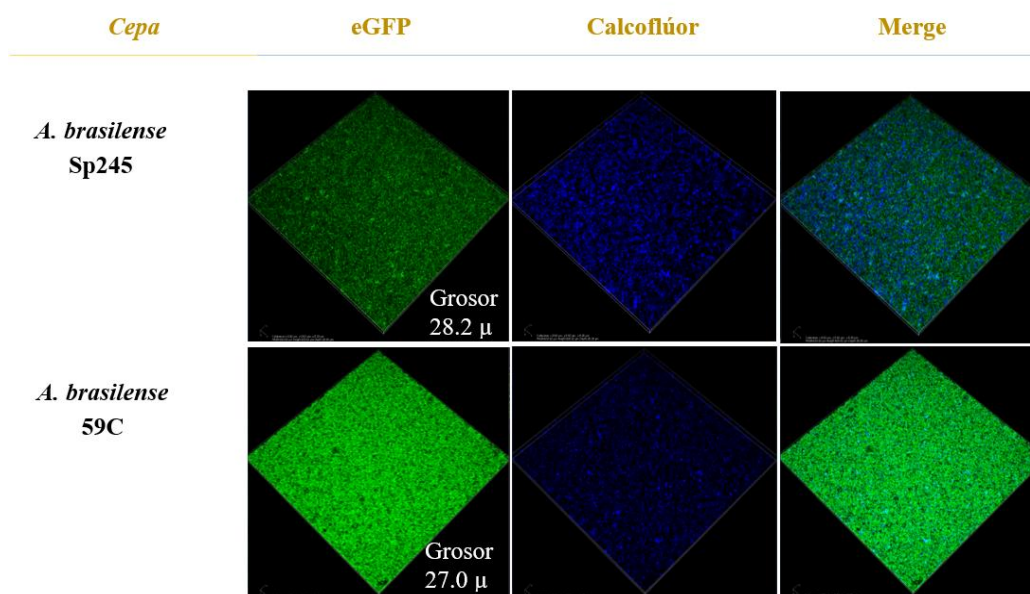


Figura 10. Comparativa en la formación de biopelícula utilizando la cepa wildtype *A baldaniorum* Sp245 (antes *A. brasilense* Sp245) y la mutante *A. baldaniorum* 59C (Antes *A. brasilense* 59C). Ensayo de biopelícula de 3 días de exposición, observado mediante microscopia confocal, la cepa 59C corresponde a la mutante por delección del gen *cdgC*, tomado de Martínez-Baca, 2019.

La información de la proteína CdgC fue complementada por Sierra-Cacho (2021), quien facilito la visualización de su actividad diguanilato ciclasa mediante su expresión en un sistema heterólogo, utilizando un plásmido con un promotor constitutivo que regula la expresión de la proteína fluorescente Amcyan y TurboRFP. Cuando el sistema detecta la producción de di-GMPc, favorece la expresión de la proteína TurboRFP, lo que se traduce en cambios en la coloración de las colonias a un tono rojizo, sus ensayos con la mutante *A. brasilense* 59C le permitieron determinar que CdgC desempeña un papel clave en la formación de biopelícula en condiciones de fijación de nitrógeno, pero no lo elimina por completo (Figura 11A). En este mismo trabajo se identificó la falta de cambios en los patrones de movilidad observados en la delección de otras proteínas como lo es WspR en *Pseudomonas*, por lo que se sospechaba que las otras 2 proteínas con una estructura REC-GGDEF similar, número de acceso del NCBI: WP_014239228.1 (*AZOBR_RS03050*) y WP_014197311.1 (*AZOBR_15555*) (se excluyó a *AZOBR_RS34040* por la presencia de una región intergénica de más de 140 aa) que fueron identificadas previamente podrían estar desempeñando un papel compensatorio durante estos procesos (Figura 11B).

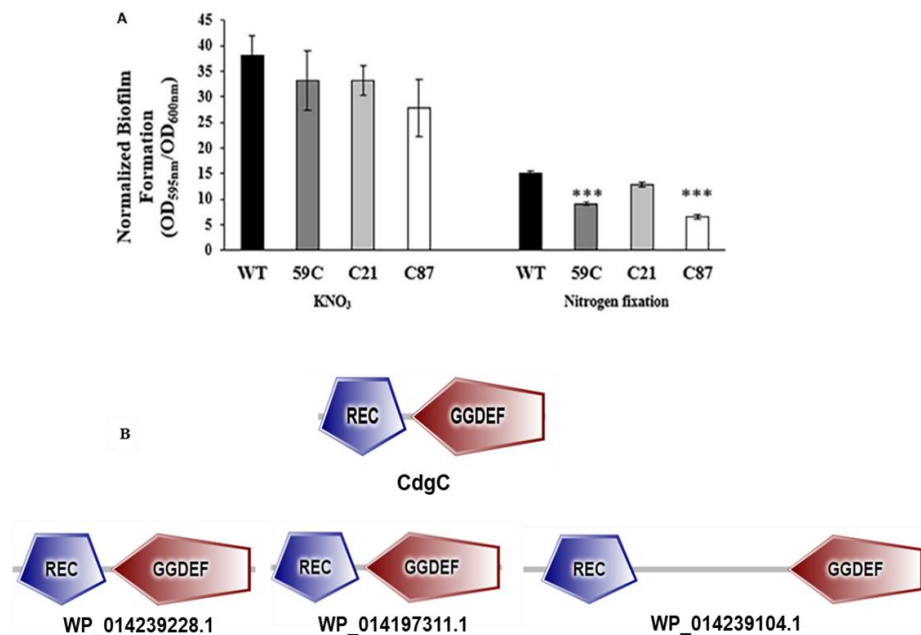


Figura 11. Papel de la proteína CdgC de *Azospirillum brasilense* Sp245. A) Comparativa en la formación de biopelícula, la cepa 59C corresponde a la mutante por delección del gen *cdgC*, C21 es la mutante restituida y C87 es el mutante control, las cepas se cultivaron en medio NFB con y sin KNO₃, recuperado de Sierra-Cacho, 2021; B) Representación de las 3 proteínas identificadas junto a CdgC, imagen elaborada utilizando el software de visualización de dominios SMART.

4. Planteamiento del problema

En el laboratorio de Interacción Bacteria-Planta se han realizado estudios del comportamiento de distintas diguanilato ciclasas en el genoma de *Azospirillum baldaniorum* Sp245, identificando hasta 20 genes con posible actividad catalítica, una de las proteínas recientemente estudiadas es CdgC codificada por el gen *AZOBR_RS06990*, por cuya configuración de dominios, se consideró que podría estar desempeñando un papel similar al de WspR, proteína implicada en la formación de biopelícula y responsable de generar un cambio en la conformación de colonias adoptando un fenotipo arrugado, los análisis realizados en $\Delta cdgC$ demostraron que está implicada en la liberación de exopolisacáridos y formación de biopelícula en condiciones de fijación de nitrógeno, pero no los elimina por completo.

Tomando esto como base y considerando que se identificaron otras 2 proteínas con dominios REC-GGDEF en el genoma de *Azospirillum baldaniorum* Sp245, se planteó el siguiente cuestionamiento: ¿el gen *AZOBR_RS03050* (*cdgC-II*) presente en *Azospirillum baldaniorum* Sp245 posee actividad catalítica como diguanilato ciclasa?

Hipótesis

La proteína CdgCII de *Azospirillum baldaniorum* Sp245 participa en la síntesis de di-GMPc.

5. Objetivos

5.1 Objetivo General

Analizar bioinformática y funcionalmente el gen *cdgC-II* de *Azospirillum baldaniorum* Sp245.

5.2 Objetivos Específicos

- Identificar los elementos funcionales y estructurales del gen *cdgC-II* y su distribución en el género *Azospirillum* por métodos bioinformáticos.
- Analizar el contexto genético del gen *cdgC-II* en *Azospirillum baldaniorum* Sp245.
- Realizar la construcción de un vector de expresión para el gen *cdgC-II*.
- Determinar la función diguanilato ciclasa del gen *cdgC-II* utilizando un biosensor de di-GMPc.

6. Materiales y métodos

Tabla 1. Material biológico utilizado		
Cepa / plásmido	Características más relevantes	Procedencia o referencia
Cepas		
<i>Escherichia coli</i>		
DH5α	<i>fhA2Δ</i> (ArgF-LacZ) U169 <i>phoA</i>	Thermo Fisher Scientific
S17.1	<i>recA</i> , <i>thi</i> , <i>pro</i> , <i>hsdR-M</i> + <i>RP4-2-Tc: Mu: Km: Tn7</i> .	Simon R. <i>et al.</i> 1983
<i>Azospirillum baldaniorum</i> Sp245	Cepa tipo “Wild Type”	Baldani-VDL. <i>et al.</i> 1987
Plásmido		
pGEM-T Easy	Vector de clonación con origen de replicación <i>f1</i> , <i>lacZα</i> , <i>Ap^r</i> .	Promega
pGEM_cdgC-II	Plásmido pGEM-T Easy con el gen <i>cdgC-II</i> presente en <i>Azospirillum baldaniorum</i> Sp245	Este estudio
pGEX-4T1	Vector de expresión, GST tac, <i>Ap^r</i>	Promega
pGEX_cdgC	Construcción derivada del plásmido pGEX-4T1, contiene el gen <i>cdgC</i> , <i>Ap^r</i>	Sierra-cacho, <i>et al.</i> , 2021
pGEX_cdgC-II	Construcción derivada del plásmido pGEX-4T1, contiene el gen <i>cdgC-II</i> , <i>Ap^r</i>	Este estudio
pDZ-119	Biosensor de di-GMPc, <i>Gm^r</i>	Martínez-Méndez, <i>et al.</i> 2021
Primers	Secuencia 5' → 3'	Referencia
<i>cdgC-II_F</i>	GATCC ATGACCGACGCACGCTCCA	Este estudio
<i>cdgC-II_R</i>	AATTC TTATACCGCAACCTCCACACCG	Este estudio

<i>pGEX_F</i>	CTGGATGCGTTCCCAAATTA	Laboratorio de Interacción Bacteria-Planta
<i>pGEX_R</i>	CAAGAATTATACACTCCGCTA	Laboratorio de Interacción Bacteria-Planta
<i>cdgC_F</i>	TTGAATTCATGCGCGTGCTCATCGCC	Sierra-Cacho, 2021
<i>cdgC_R</i>	TCGTCGACCTAAGGGGAGGGGACCACGC	Sierra-Cacho, 2021

Análisis bioinformático del gen *cdgC-II* presente en *Azospirillum baldaniorum* Sp245

Se consultó la información disponible en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) y Kyoto Encyclopedia Genes and Genomes (KEGG) del gen *AZOBR_RS03050* (*AZOBR_40083* en KEGG) denominado *cdgC-II* en esta tesis, se recuperó el contexto genético para identificar el probable promotor implicado en la expresión de *cdgC-II*, en el caso del KEGG, se utilizó la función *gene cluster* para identificar si el gen *cdgC-II* se encuentra asociado a sus genes aledaños, además de consultar sus rutas metabólicas en caso de estar disponibles. También se comparó la proteína WP_014239228.1 (CdgCII) con la diguanilato ciclasa WspR (NP_252391.1) de *Pseudomonas aeruginosa* PA01 y CdgC de *Azospirillum baldaniorum* Sp245 para identificar si contaba con los elementos funcionales necesarios para contar con actividad catalítica.

Análisis bioinformáticos de proteínas diguanilato ciclasa C en el género *Azospirillum*

Con la finalidad de identificar si la diguanilato ciclasa CdgCII se encuentra presente en otras bacterias del género *Azospirillum*, se realizó una consulta en la base de datos del NCBI, recuperando el genoma de las siguientes cepas: *Azospirillum argentinense* Az39 (GCF_000632475.1), *Azospirillum brasilense* Cd (GCF_008274965.1), *Azospirillum argentinense* MTCC4035 (GCF_005222165.1), *Azospirillum brasilense* MTCC4038 (GCF_005222145.1), *Azospirillum brasilense* MTCC4039 (GCF_005222205.1), *Azospirillum brasilense* Sp7 (GCF_001315015.1), *Azospirillum humicireducens* SgZ-5

(GCF_001639105.2), *Azospirillum lipoferum* 4B (GCF_000283655.1), *Azospirillum oryzae* KACC14407 (GCF_013347285.1), *Azospirillum ramasamyi* M2T2B2 (GCF_003233655.1), *Azospirillum* Sp. B510 (GCF_000010725.1), *Azospirillum* Sp. TSA2s (GCF_004923315.1), *Azospirillum* Sp. TSH100 (GCF_004923295.1), *Azospirillum* Sp. TSH58 (GCF_003119115.1), *Azospirillum thermophilum* CFH70021 (GCF_003130795.1), *Azospirillum thermophilum* BV-S (GCF_001305595.1).

La búsqueda de proteínas con dominios REC-GGDEF se realizó utilizando la herramienta bioinformática BLAST presente en NCBI, utilizando como referencia para los emparejamientos a CdgCII.

Análisis bioinformáticos de proteínas diguanilato ciclasa C en diferentes bacterias asociadas a plantas.

Para identificar si la proteína CdgCII puede estar presente en otras bacterias asociadas a plantas, se consultó la bibliografía de diferentes proteobacterias, específicamente de las α -proteobacterias, β -proteobacterias y γ -proteobacterias, los genomas fueron consultados y recuperados de NCBI, tomando como filtro que estén completamente secuenciadas o sean secuencias de referencia.

Una vez identificadas, se realizaron pasos similares a los descritos durante la búsqueda de proteínas similares a CdgCII en bacterias del género *Azospirillum*.

Condiciones de Cultivo

Las cepas de *Escherichia coli* S17.1 pDZ119 y DH5 α se cultivaron en medio Luria Bertani (LB) a una temperatura constante de 30°C a 150rpm durante un periodo de 14 a 16 horas, para cultivos en agar se utilizó una temperatura de 37°C sin agitación durante periodos de 18 a 24 horas. En el caso de la cepa de *Azospirillum baldaniorum* Sp245 se utilizó medio K-malato a 150 rpm y una temperatura constante de 30°C durante 16 a 18 horas.

Los medios de cultivo fueron suplementados con los siguientes antibióticos cuando fue requerido: ampicilina (Amp) 100 μ g/mL, Gentamicina (Gm) 30 μ g/mL.

Por último, se utilizaron las siguientes soluciones: IPTG [0.1mM/mL] para los ensayos de expresión y X-gal [20 µg/ml] que actuó como sustrato para contrastar colonias.

Extracción y manipulación de ADN

La extracción de ADN plasmídico de las cepas de *E. coli* S17.1 & DH5α se realizó por lisis alcalina con dodecilsulfato de Sodio (SDS) (Sambrook, 2001). El ADN genómico de *A. baldaniorum* Sp245, se recuperó por medio de la técnica de bromuro hexadecilmetilmonio (CTAB) (Sambrook, 2001).

Generación de células competentes y transformantes

Para la generación de células competentes se utilizaron las cepas *E. coli* S.17.1 y *E. coli* DH5α quimio competentes, se cultivaron en medio LB a un rango de 0.3 a 0.6 a una OD₅₈₀, estas fueron centrifugadas en frío a bajas revoluciones para recuperar las células y ser resuspendidas en tubos Eppendorf con medio 2XYT-CC, las células se mantuvieron en un ciclo de refrigeración continuo desde el momento en que alcanzaron la densidad óptica deseada, manteniéndose 10 minutos en hielo antes de ser almacenadas a -80°C hasta su uso.

Las células competentes se atemperaron en hielo durante 30 minutos, adicionándolas con 50µL KCM y 10µL del plásmido de interés, sometiénolas a un choque térmico a 42°C durante 2 minutos antes de devolverlas al hielo, para posteriormente llevarlas a incubación durante hora y media, utilizando 50µL para realizar un estriado masivo en una placa de agar LB adicionado con Amp [100 µg/ml] llevándolas a crecimiento durante 24 horas, para posteriormente sembrarlas y descartar falsos positivos.

Parámetros para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las enzimas se utilizaron siguiendo las indicaciones del proveedor (Thermo Scientific), haciendo las modificaciones necesarias para obtener los amplificadores deseados.

En el caso de los parámetros utilizados para la amplificación de los fragmentos, se describen en la siguiente tabla.

TABLA 2. PARAMETROS PARA PCR

FRAGMENTO	Desnaturalización	Hibridación	Elongación
<i>cdgC</i> 906pb	<ul style="list-style-type: none"> • Primer Ciclo: 5 minutos a 95°C • Ciclos posteriores 30 segundos a 95°C. 	<ul style="list-style-type: none"> • 30 segundos a 65°C cada ciclo. 	<ul style="list-style-type: none"> • Ciclos: 1 minuto a 72°C. • Ultimo ciclo: 5 minutos a 72°C.
<i>cdgC-II</i> 921pb	<ul style="list-style-type: none"> • Primer ciclo: 5 minutos a 95°C. • Ciclos posteriores: 30 segundos a 95°C. 	<ul style="list-style-type: none"> • 30 segundos a 60°C cada ciclo. 	<ul style="list-style-type: none"> • Ciclos: 1 minuto a 72°C. • Ultimo ciclo: 5 minutos a 72°C
pGEX_ <i>cdgC-II</i> 1328pb	<ul style="list-style-type: none"> • Primer ciclo: 5 minutos a 95°C. • Ciclos posteriores: 30 segundos a 95°C. 	<ul style="list-style-type: none"> • 30 segundos a 56°C cada ciclo. 	<ul style="list-style-type: none"> • Ciclos: 1:30 minutos a 72°C. • Ultimo Ciclo: 5 minutos a 72°C.
pGEX 4-T1 410pb	<ul style="list-style-type: none"> • Primer ciclo: 5 minutos a 95°C. • Ciclos posteriores: 30 segundos a 95°C. 	<ul style="list-style-type: none"> • 30 segundos a 56°C cada ciclo. 	<ul style="list-style-type: none"> • Ciclos: 1 minuto a 72°C. • Ultimo ciclo: 5 minutos a 72°C.

Selección de enzimas de restricción

Para determinar que enzimas de restricción eran las más adecuadas, se usaron las herramientas bioinformáticas SnapGeneViewer y NEBcutter, analizando la secuencia del gen *AZOBR_RS03050 (cdgC-II)* y los vectores pGEX-4-T-1 y pGEM-t-easy, se seleccionaron las enzimas *Bam*H1 y *Eco*R1 al ser las más adecuadas para los ensayos planteados en esta tesis, las enzimas se utilizaron conforme la guía provista por el proveedor (Thermo Scientific).

Diseño de oligonucleótidos

Utilizando la base de datos del NCBI se consultó la secuencia y contexto genético del gen *cdgC-II*, con ayuda de los programas snapGeneViewer y OligoAnalyzer 3.1 se diseñaron los oligos *cdgC-II_F* y *cdgC-II_R*, para abarcar toda la región codificante del gen, a estos primers

se les añadió el sitio de restricción *Bam*H1 y *Eco*R1 (resaltado en color rojo en la tabla de material biológico) para poder ligarlos posteriormente en el plásmido pGEX-4T.

Amplificación del gen *cdgC-II*

Se siguieron las recomendaciones del fabricante Invitrogen: ADN [20 ~ 200ng] 2µL, dNTP's [0.25 mM] 2µL, primer *cdgC-II_F* [10µM] 0.5µL, primer *cdgC-II_R* [10µM] 0.5µL, Buffer 10X High fidelity 2.5µL, MgSO₄ [50 mM] 1µL, Platimun *Taq* Polymerasa High Fidelity [5U/µL] 0.125µL, agua destilada 16.375µL para una reacción de volumen final 25µL; para comprobar la presencia del gen de interés durante los diferentes ensayos, se utilizó el master mix DreamTaq Green polymerase de la casa comercial ThermoScientific, en cuyo caso se adiciono Dream Taq Green 2X 5µL, ADN 2µL, oligonucleótido delantero 0.3µL, oligonucleótido reverso 0.3µL junto al agua destilada a un volumen final de 10µL.

Clonación del gen *cdgC-II* en el vector pGEM t-easy.

Para generar la construcción pGEM_*cdgC-II*, se utilizó el vector pGEM t-easy (Figura 12), que es un plásmido linealizado de mantenimiento ideal para clonar productos de PCR, al contar con una timidina 3' terminal presente en ambos extremos, permite la unión de productos de PCR que cuenten con una desoxiadenosina en su región 3' terminal como es el caso de los amplificados utilizando la *Platinum Taq polymerase*, entre las características de este vector de clonación se encuentra su elevado número de copias, un casete de resistencia a Ampicilina y la presencia del gen *lacZ*, un elemento clave para la selección de colonias positivas a la inserción del amplicon, este gen funciona como una *β-galactosidasa* que contribuye a la formación de colonias azuladas en presencia de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido (X-gal) obteniendo como productos galactosa y 5-bromo-4cloro-3-hidroindol, este último es el responsable del tono azulado por su proceso de oxidación, misma coloración que se pierde cuando se realiza la ligación exitosa de un segmento de ADN en el vector, produciendo una proteína trunca que carece de la capacidad de hidrolizar residuos galactosil, evitando así la hidrolisis del X-gal y en consecuencia dando como resultado colonias blancas.

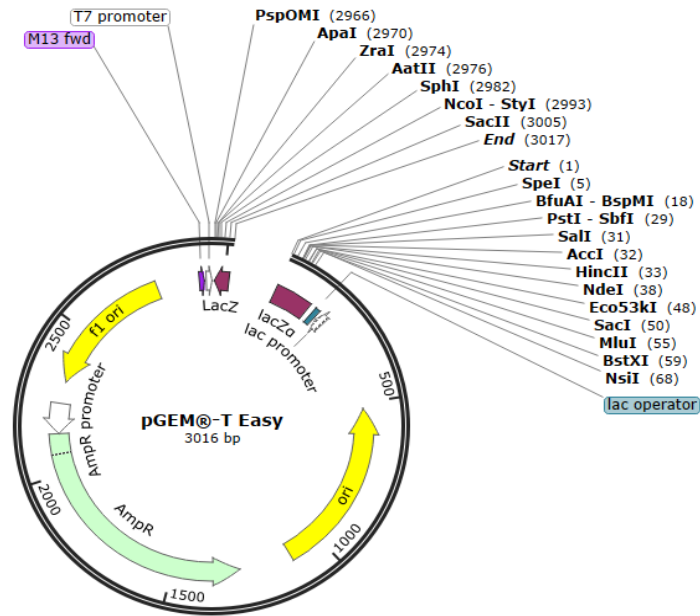


Figura 12. Esquema del vector pGEM-t-easy linealizado. El sitio de clonación múltiple se encuentra en medio del gen *lacZ*, por lo que una inserción correcta del gen de interés inhabilita su actividad β-galactosidasa, imagen elaborada utilizando el software SnapGene Viewer.

La construcción pGEM_ *cdgC-II* se generó mediante la ligación del plásmido de mantenimiento pGEM-T Easy y el fragmento de 921pb amplificado por PCR del gen *cdgC-II*, las transformaciones se realizaron en células quimiocompetentes *E. coli* DH5α, las células se crecieron en placas de agar LB adicionadas con Amp [100 μg/ml] y X-gal [20 μg/ml] incubándolas durante 24 horas; Para corroborar que ocurrió la ligación del interés, se realizó una PCR utilizaron los primers específicos *cdgC-II_F* y *cdgC-II_R*.

Sublocación del gen *cdgC-II* en el vector pGEX-4-T-1

Para determinar una posible función del gen *cdgC-II* se decidió sub clonarlo en el vector de expresión pGEX-4-T-1, este plásmido destaca por contener un promotor de lactosa capaz de ser inducible mediante el uso de IPTG (Isopropil-β-D-1tiogalactopiranosido) una molécula análoga a la alolactosa, el IPTG favorece la expresión continua del gen de interés al evitar la actividad represora del gen *lacI*, al ser una molécula no hidrolizable se mantiene unida a *lacI*, esto evita que interactúe con el sitio de actividad promotora *lacO*, permitiendo así la unión

continua del ARN polimerasa al promotor Tac, facilitando con esto la expresión continua de la proteína de interés (Figura 13A).

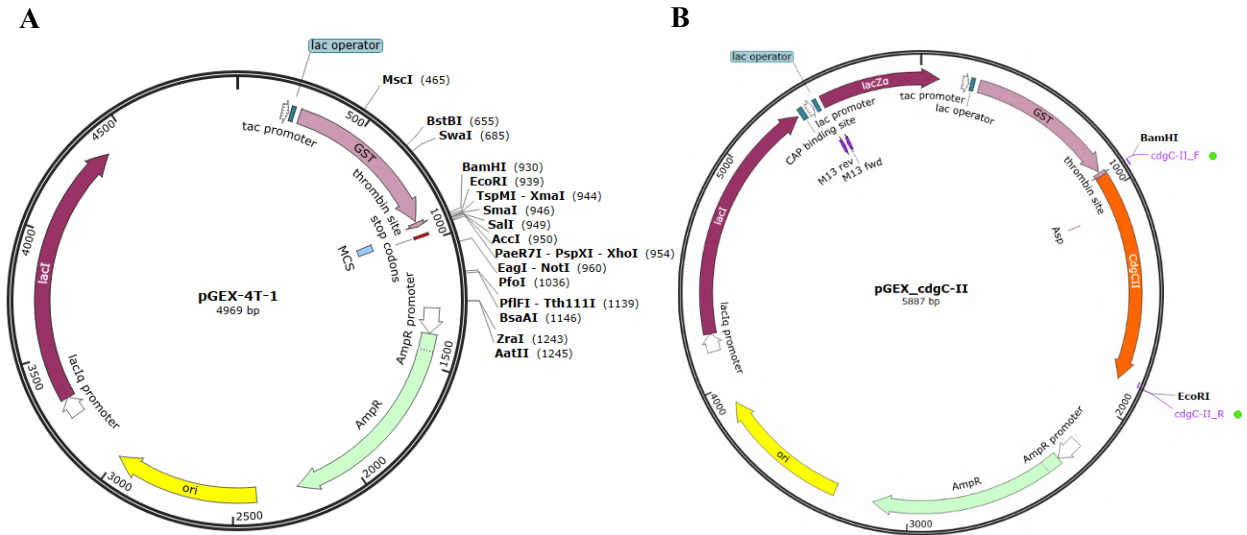


Figura 13 Vector pGEX 4-T1. A) Esquema del vector pGEX4-T1, en ausencia de IPTG, *lacI* actúa como el gen represor del operador lac, impidiendo la unión del ARN polimerasa al promotor Tac, evitando con ello la transcripción continua de los genes de interés, B) Esquema de la construcción pGEX_ *cdgC-II*, imágenes realizadas utilizando el software SnapGene Viewer, la secuencia de pGEX_4T1 fue recuperada del repositorio provisto por SnapGene.

Siguiendo las indicaciones del fabricante, se realizó una restricción del plásmido pGEX 4T-1 y el plásmido de mantenimiento pGEM_ *cdgC-II* utilizando las enzimas *BamHI* y *EcoRI*, posteriormente se realizó una electroforesis para identificar los fragmentos que corresponden al gen *cdgC-II* y el plásmido pGEX 4T-1 linealizado, estos fueron recuperados utilizando el kit Zymoclean Gel Recovery (ZYMO RESEARCH) para posteriormente ligarlos siguiendo las indicaciones del fabricante (ZYMO RESEARCH); el plásmido pGEX_ *cdgC-II* (Figura 13B) fue introducido en las células competentes *E. coli* DH5 α , realizando un barrido masivo en placa de agar LB adicionado con Amp [100 μ g/ml] e incubadas a 37°C durante 24 horas, las colonias obtenidas fueron resemebradas en agar LB + con Amp [100 μ g/ml] para descartar falsos positivos .

Se comprobó la construcción del plásmido pGEX_ *cdgC-II* mediante PCR utilizando los oligonucleótidos *cdgC-II_F* y *cdgC-II_R*, una vez corroborada la inserción del fragmento en

el vector de clonación, se introdujo el plásmido pGEX_ *cdgC-II* en las células quimiocompetentes *Escherichia coli* S17.1 que cuentan con el biosensor para di-GMPc ubicado en el plásmido pDZ-119 (Figura 14), generando la cepa *E. coli* S17.1 pDZ-119/pGEX_ *cdgC-II*, misma que fue utilizada para realizar los ensayos de expresión y función de la proteína CdgCII.

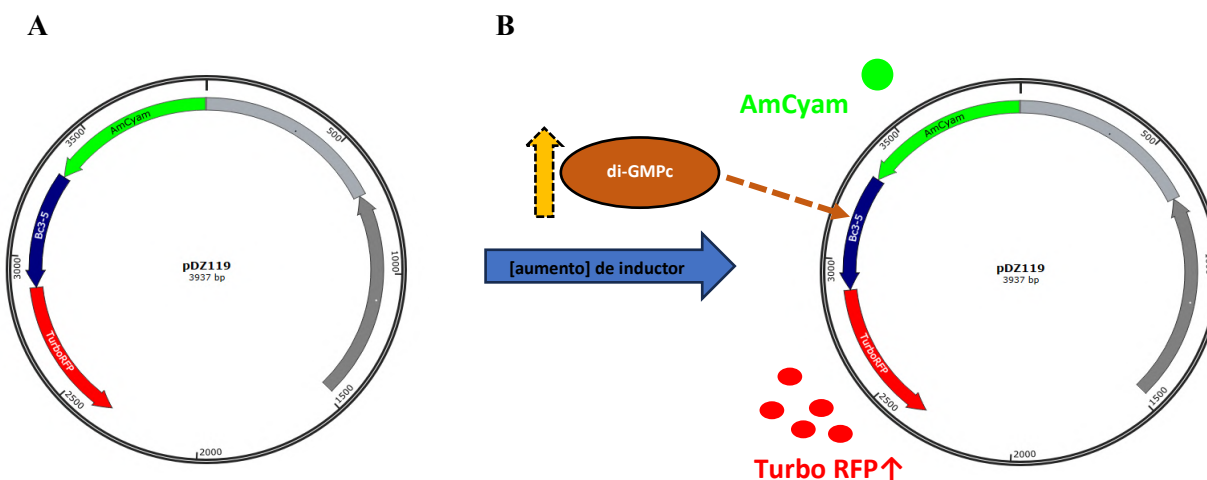


Figura 14. Esquema ilustrativo del plásmido pDZ-119: A) En este esquema se resaltan las partes más importantes del plásmido pDZ119, siendo las proteínas de fluorescencia AmCyam (verde) y TurboRFP (rojo). B) inducción de B-c3-5 por el aumento en la producción de di-GMPc, una vez estimulada, favorece la producción de TurboRFP, con ello cambiando la coloración de la colonia a un tono más rojizo, diagrama elaborado utilizando el software SnapGene Viewer.

El plásmido pGEX-4T-1 también fue introducido en las células quimiocompetentes *Escherichia coli* S17.1 pDZ-119, generando la cepa *Escherichia coli* S17.1 pDZ-119/pGEX-4-T-1 que servirá como control negativo durante los ensayos de funcionalidad del gen *cdgC-II*, para comprobar la presencia del plásmido en las células, se realizó una PCR utilizando los oligonucleótidos pGEX_F y pGEX_R.

Análisis de los niveles de di-GMPc en CdgCII

Para analizar los niveles de di-GMPc se utilizaron las cepas de *E. coli* S17.1 pDZ119/pGEX_*cdgC-II*, *E. coli* S17.1 pDZ119/PGEX-4-T-1, *E. coli* S17.1 pDZ119/pGEX_*cdgC* y *E. coli* S17.1 pDZ119, estas se crecieron en medio LB adicionado con ampicilina [100 µg/mL]. Para corroborar que CdgCII cuenta con función de DGC, se utilizó la diguanilato ciclasa previamente caracterizada CdgC⁽²⁴⁾. Los cultivos se crecieron a una DO600, posteriormente se adicionó IPTG a una concentración final de 0.1 mM para inducir la expresión de las DGCs. La inducción se llevó a cabo a 30°C por 24 horas a una agitación de 150 rpm. Los cultivos fueron concentrados a 10X y resuspendidos en agua. La producción de di-GMPc se analizó de 2 formas distintas, de manera macroscópica se analizó el cambio en la intensidad del color con la producción de este segundo mensajero, en el caso de los ensayos microscópicos, se utilizó el microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse TE2000U, para ello se utilizó una alícuota de cultivo inducido que fue depositado en un cubreobjetos y fijada con un tapón de agarosa al 1%. La excitación y emisión del fluoróforo AmCyan se realizó a 458 nm y 489nm respectivamente, en el caso del fluoróforo TurboRFP fue 553nm para la excitación y para 570nm la emisión, las imágenes fueron procesadas en el software Nikon NIS Elements.

7. Resultados

Contexto genético del gen *cdgC-II*

El gen *cdgC-II* tiene un tamaño de 921 pb, se encuentra localizado en la cadena positiva del cromosoma de *A. baldaniorum* Sp245, los análisis preliminares proporcionados por la KEGG lo integran en un clúster de genes que abarcan una histidina quinasa híbrida no ortodoxa (*AZOBR_RS34075*), una proteína hipotética (*AZOBR_RS40090*), un pseudogen que codifica una histidina quinasa con dominio de dimerización (*AZOBR_RS40095*), una proteína con dominio HPT (*AZOBR_RS40100*), la diguanilato ciclasa *CdgCII*, una molibdotransferasa de molibdopterina *MoeA* (*AZOBR_RS03055*) una proteína de biosíntesis de molibdopterina (*AZOBR_RS03060*) y una proteína de la familia de las pirinas (*AZOBR_RS03060*). En conjunto estos genes constituyen un contexto genético diferente al identificado en *cdgC* y *cdgC-III* (figura 15), los dominios de las proteínas que forman el clúster de genes asociados a *cdgC-II* en *A. baldaniorum* Sp245 se incluyen en la tabla 3.

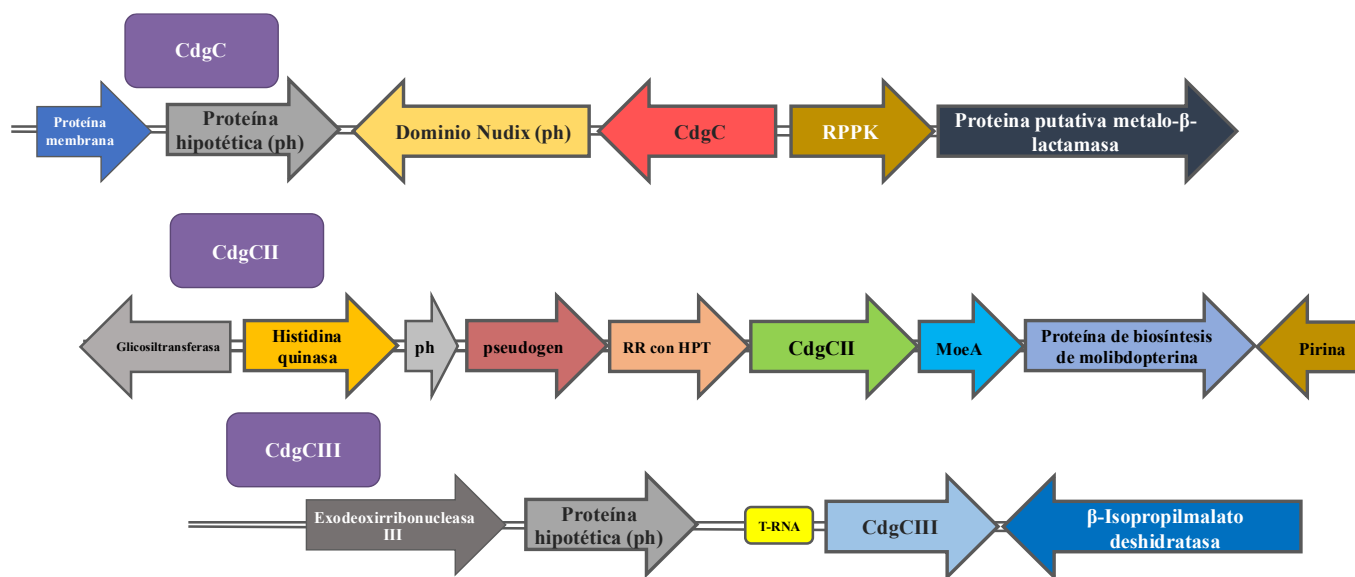


Figura 15. Comparativa de los contextos genéticos de los genes *cdgC*, *cdgC-II* y *cdgC-III*. En esta imagen se puede apreciar cual diverso es el contexto genético del cual pueden formar parte los genes *cdgC*, siendo *CdgCII* el único que cuenta múltiples elementos regulatorios.

Para corroborar la información provista por la plataforma KEGG, se analizó el contexto genético de *cdgC-II*, estudiando la organización de los genes y los espacios intergénicos entre ellos. Utilizando la herramienta bioinformática BPROM, se identificó un promotor $\sigma 70$

ubicado en la región intergénica entre *AZOBR_RS03025*, que codifica una glicosil transferasa y *AZOBR_RS34075*, correspondiente a la histidina quinasa híbrida que pertenece al clúster de genes asociados a *cdgC-II* (figura 16).

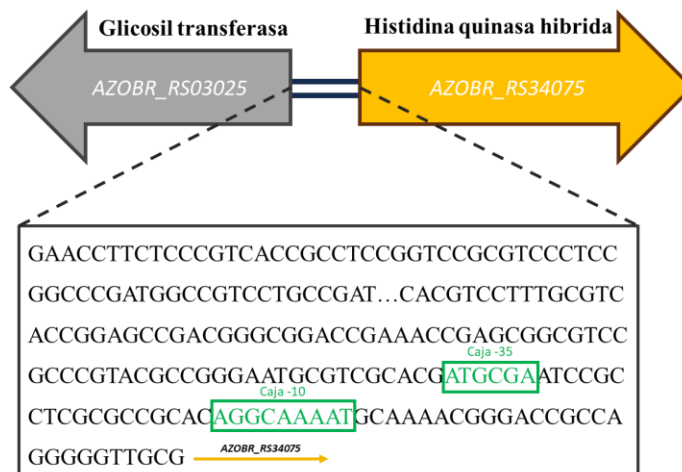


Figura 16. Identificación de la región promotora del clúster de genes asociados a *cdgC-II*. Se identificó un promotor para σ_{70} en la región intergénica de *AZOBR_RS03025* y *AZOBR_RS34075* mediante la herramienta BPRM.

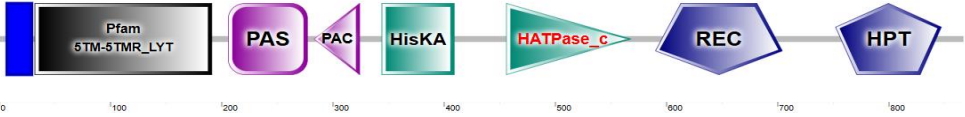

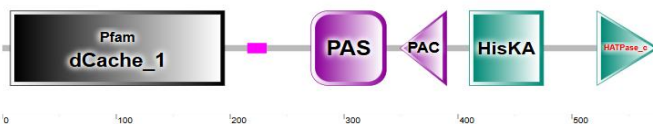
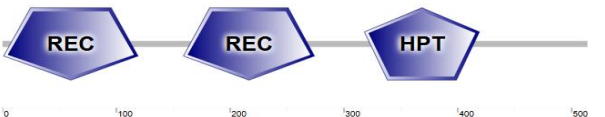
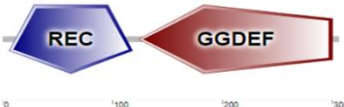
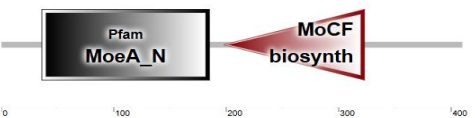
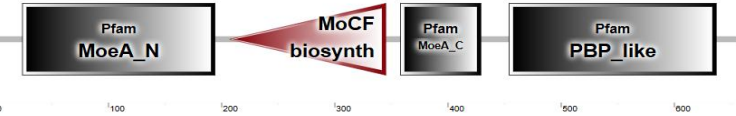
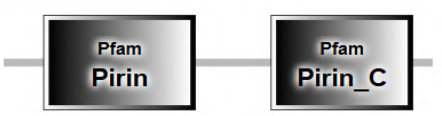
>Región intergénica *AZOBR_RS03025* y *AZOBR_RS34075*

```
GAACCTTCTCCCGTCACCGCCTCCGGTCCGCGTCCCTCCGGCCCCGATGGCCGTCCTGCCGATGCTTTCCATGG
CGTGAATCCCAAGGGAGGACCCCTTCGGGCGAGAGCGCGGTCTTCGGGCGACACCGGCGCGGTACCGCCGG
CATCCCCGTTCCGCAACGGGAATGAAGGCCCTTTTGCCCCGCCGGAATTCGGTACTAACCCGGTTCATGCGGCC
GCCGGACCGCCCCGCCGGCGAAATCCCCGGAACGTACAGGCCTATGGCATTGCGACGATTGCCGGTGT
GGAGGGGGTGCSCCAAGGGCGTGGTGCGGTGCGGAACGCGGGACCTTTCCCGCCCCGCCGTGCCTCCGCT
CCGCCACCCCGTATGGTGAACCCGGGCGGGTTGCCTCGGTGCGGCTGCCAGGATGGACGACCACCTCCGGC
GCGGCACGTCTTTGCGTCACCGAGCCGACGGGCGGACCGAAACCGAGCGGCGTCCGCCCGTACGCCGGG
AATGCGTCGCACGATGCGAATCCGCTCGCGCCGCACAGGCAAAATGCAAAAACGGGACCGCCAGGGGGTTG
CG
```

>Promotor_Clúster_ *cdgC-II*

```
Length of sequence- 576
Threshold for promoters - 0.20
Number of predicted promoters - 1
Promoter Pos: 556 LDF- 0.88
-10 box at pos. 541 aggcaaat Score 56
-35 box at pos. 517 atgcca Score 8
Oligonucleotides from known TF binding sites:
No such sites for promoter at 556
```

Tabla 3. Dominios de las proteínas asociadas al contexto genético de CdgCII

Protein ID	SMART
<p>WP_014239226.1</p>	<p>Histidina quinasa híbrida no ortodoxa</p> 
<p>WP_244439344.1</p>	<p>Proteína hipotética con una región transmembrana</p> 
<p>AZOBR_RS40095</p>	<p>Pseudogen</p> 
<p>WP_244439382.1</p>	<p>Regulador de Respuesta con dominio HpT</p> 
<p>CdgCII</p>	<p>Diguanilato Ciclasa</p> 
<p>WP_014239229.1</p>	<p>Molibdopterferasa de molibdopterina MoeA</p> 
<p>WP_014239230.1</p>	<p>Proteína de biosíntesis de molibdopterina</p> 
<p>WP_014239231.1</p>	<p>Proteína de la familia de las pirinas</p> 

Alineamiento del Dominio REC

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```
P_Aeruginosa_PA01_REC_WspR          VMVLLVDDQAMIGEAVRRSLASEAGIDFHFCSDPQQAVAVANQIKPTVILQDLVMPGVDG 60
A_badaniorum_Sp245_REC_CdgCII       SKILVVDDIPSNVH-VLS-RILKDDHDIYFATDGAKALELAQSRPLDVLVLDIMMPGMDG 58
A_badaniorum_Sp245_REC_CdgC        MRVLIADDTVLMRT-MLSEQVASYGHDVILARDGREALNLAQAESFDIAIIDWEMPRLSG 59
A_badaniorum_Sp245_REC_CdgCIII      MRILVVDDSRMART-VLCQQLEGFHGQATFAESGQMALTRCRDEPIDIALVDFRVGETEG 59
          :*:.**      :      . : :. .  * : ..      : : * : : . *

P_Aeruginosa_PA01_REC_WspR          LTLAAYRGNPATRDIPPIVLSTKEEPTVKSAAFAAGANDYLVKLPDAIELVARI      115
A_badaniorum_Sp245_REC_CdgCII       YEVC SRLKTDPI TRDIPVIFISAKSEVEDETYGLEVG AIDFISKPI SPPIVKARV    113
A_badaniorum_Sp245_REC_CdgC        LEVCWLLKADPR TAYSYLILM TSHDEFFYEMKALDAGADDFIHKPVNRAHLKARL    114
A_badaniorum_Sp245_REC_CdgCIII      VEVCWHLRAAQRE RHLYLM LMI PGSI TNQFFEVVENGADEFLRKPLDLTWRARL    114
          :      :      : : : .      .  ** : : * .      : **:
```

Alineamiento del Dominio GGDEF

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```
A_badaniorum_Sp245_GGDEF_CdgCII     LKRQTDLLRRTL SFADGLTGIANRRRFDEVLLREWRRCGRVQLPLSLIMLDVDQFKPYNDH 60
P_Aeruginosa_PA01_GGDEF_WspR        LLETNLVLQRLMNSDGLTGLSNRRHFDEYLEMEWRRSLREQSQLSLLMIDVDYFKSYNDT 60
A_badaniorum_Sp245_GGDEF_CdgC      ITEMHRLLVQAQQT DPLTGVANRRALDRAGEEIRRAQRARQPLSLLIADIDHFKRINDS 60
A_badaniorum_Sp245_GGDEF_CdgCIII    VVDMQRQLERLATTDSL T GALNRGRFMARAADEVARAQRSGQPLSAIMLDIDHFKKVNDT 60
          :      *      : * ** * * :      * * . *      * * : : * * * * **

A_badaniorum_Sp245_GGDEF_CdgCII     YGHQAGDECLRAVAQLLAEQMMRPGGLIANYGGDEFVCLLPETDEGGAVQVAERLRRETVA 120
P_Aeruginosa_PA01_GGDEF_WspR        FGHVAGDEALRQVAGAI REGCSRSSLAAANYGDEFAMVLPGTSPPGARLLAEKVRRTVE 120
A_badaniorum_Sp245_GGDEF_CdgC      RGHAAGDEALQRVRTL-DGALRPGGLIGNYGDEFVLLPNTALADASVVAERLRQRVA 119
A_badaniorum_Sp245_GGDEF_CdgCIII    YGHATGDEAIRSVVRVC-RSLVRGAVLGLLGGDEFAILLPETPPQGAALLAERLRRALA 119
          ** : ** . : . .      * . : . * * * * . : * * * . * : * : : . :

A_badaniorum_Sp245_GGDEF_CdgCII     DRRLPHAVSH-VADHVTISLGVATARPTLDDT-PDRLTQLADGLLYEAKRAGRNRVCSG 177
P_Aeruginosa_PA01_GGDEF_WspR        SLQISHDQPR-PGSHLTVS IGVSTLVPGGGGQTFRVLIEMADQALYQAKNNGRNQVGLM 178
A_badaniorum_Sp245_GGDEF_CdgC      SQEMG---PDGDSFRMTASFGVAPVAPDAPGG-IDDALRTADAALYRAKAEGRNRVVP 174
A_badaniorum_Sp245_GGDEF_CdgCIII    ETDVRIANGAGSVLTF TVSIGVSALRP AE-TS-IAAVLARADEALYRAKNGGRNRVVD 176
          . :      . * * : * : *      *      * * * * * * * * :
```

Tabla 4. Características de la proteína CdgCII				
Matriz de porcentaje de identidad global de CdgCII				
	CdgC	CdgCII	CdgCIII	WspR
CdgC	100%	40.07%	42.66%	33.11%
CdgCII	40.07%	100%	35.47%	40.52%
CdgCIII	42.66%	35.47%	100%	32.66%
WspR	33.11%	40.52%	32.66%	100%
Matriz de porcentaje de identidad del dominio REC				
	REC CdgC	REC CdgCII	REC CdgCIII	REC WspR
REC CdgC	100%	37.11%	36.84%	30.02%
REC CdgCII	37.11%	100%	28.32%	24.56%
REC CdgCIII	36.84%	28.32%	100%	20.18%
REC WspR	24.56%	30.02%	20.18%	100%
Matriz de porcentaje de identidad del dominio GGDEF				
	GGDEF CdgC	GGDEF CdgCII	GGDEF CdgCIII	GGDEF WspR
GGDEF CdgC	100%	44.51%	46.88%	39.88%
GGDEF CdgCII	44.51 %	100%	41.14%	48.02%
GGDEF CdgCIII	46.88%	41.14%	100%	41.71%
GGDEF WspR	39.88%	48.02%	41.71%	100%
Motivos Conservados en el dominio GGDEF				
<p>Motivos del dominio GGDEF</p> <p>bits</p> <p>4.0</p> <p>3.0</p> <p>2.0</p> <p>1.0</p> <p>0.0</p> <p>5 10 15 20</p> <p>WebLogo 3.7.9</p>				
GGDEF	Sitio de actividad catalítica.			
RXXD (sitio I)	Sitio de auto inhibición, conformado por una Arg y Asp conservado.			

La información recolectada nos indica que la proteína CdgCII cuenta con los motivos Conservados en el dominio GGDEF que corresponden al sitio de Inhibición o sitio I (RxxD) y el sitio con actividad catalítica del mismo nombre GGDEF, además de poseer una identidad elevada (>40%) respecto a las proteínas WspR y CdgC, tomando en cuenta esta similitud se decidió generar la estructura terciaria de CdgCII mediante la plataforma ITASSER para poder compararla con WspR, una proteína ya cristalizada y depositada en el Protein Data Bank (PDB:3BRE), mediante el software de visualización de proteínas ChimeraX se comparó la estructura generada de CdgCII con WspR, observando un elevado grado de similitud en la conformación que toma la estructura terciaria en los dominios REC y GGDEF, resaltando en un color diferente los motivos conservados que se identificaron en CdgCII (Figura 17).

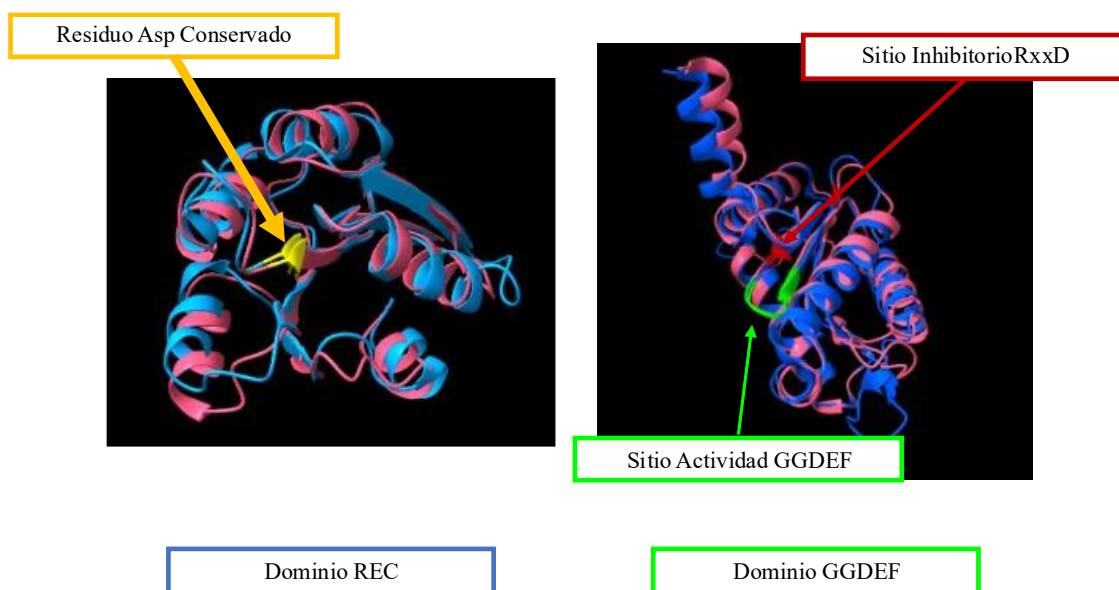


Figura 17. Comparación de la estructura terciaria de los dominios REC y GGDEF de CdgCII (Rosa) y WspR(azul). La comparación estructural se generó mediante el software de visualización de proteínas ChimeraX, identificando el Asp Conservado (amarillo) responsable de la fosforilación del dominio REC, el sitio de auto inhibición RxxD (rojo) y la región catalítica GGDEF (verde) en el dominio del mismo nombre.

Presencia de la proteína CdgCII en el género *Azospirillum* y otras proteobacterias asociadas a plantas.

Para ampliar la información recolectada sobre la proteína CdgCII, se realizó un análisis por BLAST de los genomas de distintas bacterias del género *Azospirillum*, estos resultados fueron contrastados al realizar una búsqueda en paralelo utilizando el Conserved Domain Database, obteniendo en ambos casos 40 proteínas distribuidas en las 16 cepas analizadas, la información recolectada fue depositada en la Tabla 5.

Tabla 5. Distribución de proteínas CdgC en el género <i>Azospirillum</i>			
Cepa del género <i>Azospirillum</i>	RefSeq	Numero de proteínas CdgC	Protein ID
<i>Azospirillum argentinense</i> Az39	GCF_000632475.1	3	WP_040133993.1 WP_160174806.1 WP_038525874.1
<i>Azospirillum brasilense</i> Cd	GCF_008274965.1	3	WP_035671042.1 WP_035671246.1 WP_035672942.1
<i>Azospirillum argentinense</i> MTCC4035	GCF_005222165.1	3	WP_038525874.1 WP_137116444.1 WP_137114315.1
<i>Azospirillum brasilense</i> MTCC4038	GCF_005222145.1	4	WP_035671042.1 WP_035671246.1 WP_035672942.1 WP_137165196.1
<i>Azospirillum brasilense</i> MTCC4039	GCF_005222205.1	3	WP_137139367.1 WP_137141163.1 WP_175426460.1
<i>Azospirillum brasilense</i> Sp7	GCF_001315015.1	3	WP_035671246.1 WP_035672942.1 WP_035671042.1
<i>Azospirillum humicireducens</i> SgZ-5	GCF_001639105.2	2	WP_063634969.1 WP_063635255.1

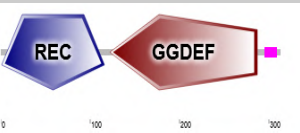
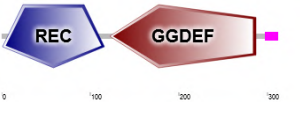
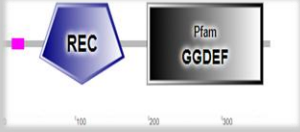
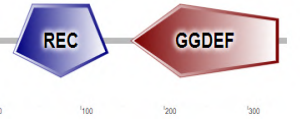
<i>Azospirillum lipoferum</i> 4B	GCF_000283655.1	2	WP_014248328.1 WP_014248701.1
<i>Azospirillum oryzae</i> KACC14407	GCF_013347285.1	2	WP_246457697.1 WP_149198244.1
<i>Azospirillum ramasamyi</i> M2T2B2	GCF_003233655.1	2	WP_111066665.1 WP_111067067.1
<i>Azospirillum</i> Sp. B510	GCF_000010725.1	2	WP_012974989.1 WP_042442983.1
<i>Azospirillum</i> Sp. TSA2s	GCF_004923315.1	2	WP_136704536.1 WP_136704536.1
<i>Azospirillum</i> Sp. TSH100	GCF_004923295.1	2	WP_136704316.1 WP_109443164.1
<i>Azospirillum</i> Sp. TSH58	GCF_003119115.1	3	WP_109070160.1 WP_109070679.1 WP_162600029.1
<i>Azospirillum thermophilum</i> CFH70021	GCF_003130795.1	2	WP_109326993.1 WP_109329935.1
<i>Azospirillum thiophilum</i> BV-S	GCF_001305595.1	2	WP_045582432.1 WP_082108818.1

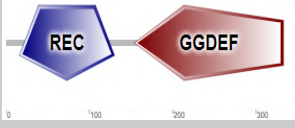
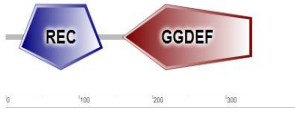
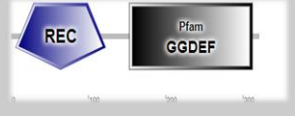
Mediante un alineamiento realizado en Clustal Omega, se compararon las proteínas recuperadas con CdgC, CdgCII y CdgCIII, dando como resultado que, de las 40 proteínas recuperadas, 16 proteínas están relacionadas a CdgCII (ID >75%), 16 a CdgCIII (ID >56%) y 8 a CdgC (ID >84%) (material anexo).

Tomando como precedente las DGC con dominios REC-GGDEF identificadas en los distintos miembros del género *Azospirillum*, se decidió ampliar la búsqueda a otras proteobacterias con la finalidad de identificar si tenían una distribución similar de proteínas con dominios REC-GGDEF, para ello se recuperaron un total de 38 genomas, estos fueron filtrados en un primer momento respecto a si tenían o no proteínas similares a CdgC mediante análisis por BLAST, posteriormente se enlistaron las cepas en las que se ha documentado su asociación a plantas (tabla 6).

Tabla 6. DGC con dominios REC-GGDEF presentes en otras proteobacterias asociadas a plantas

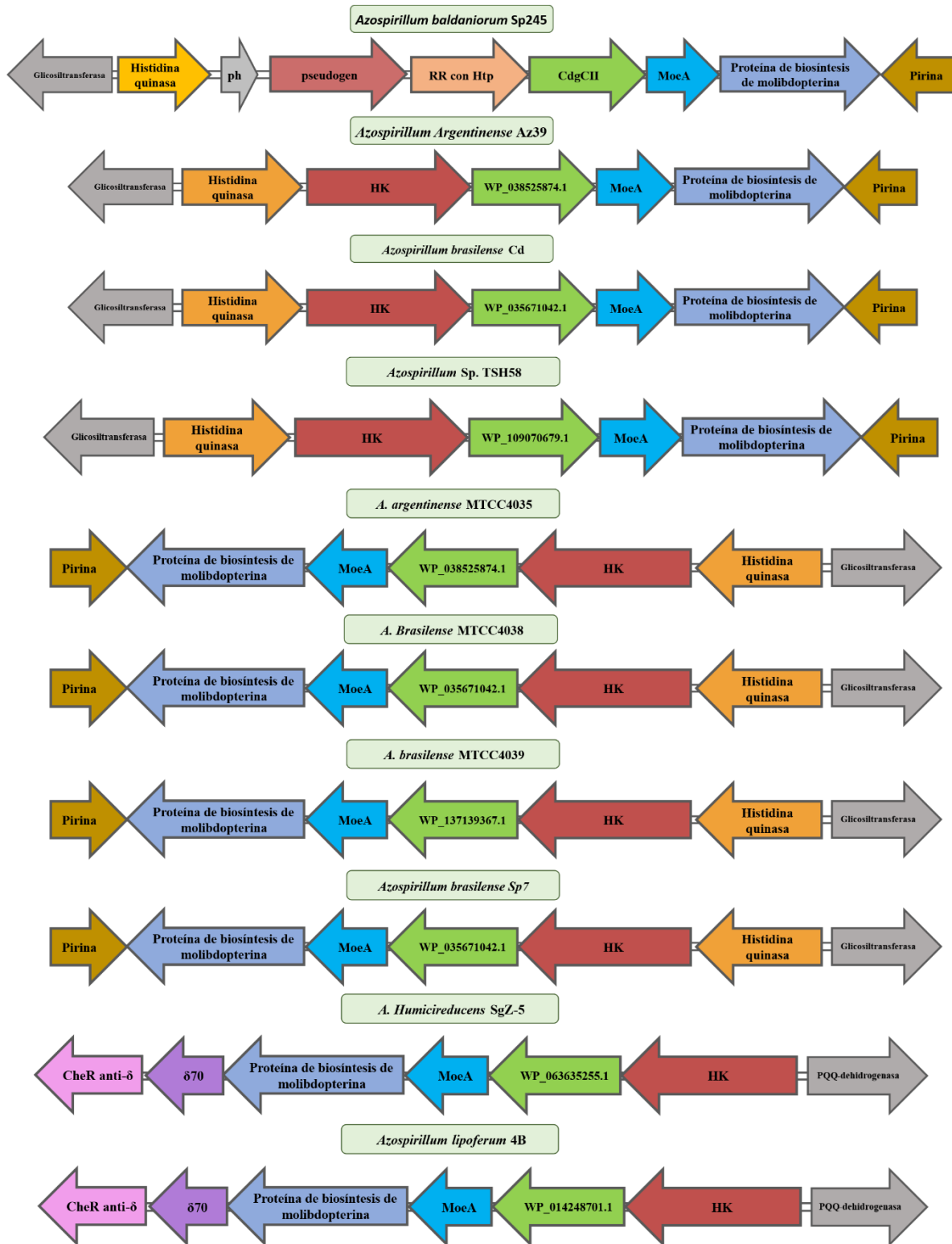
Bacteria	Categoría taxonómica	Cepa	RefSeq	Tiene proteínas tipo CdgC	Referencia
<i>Azorhizobium caulinodans</i>	alpha proteobacteria	ORS 571	GCF_000010525.1	Si	Liu W. <i>et al.</i> , 2017
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Gamma proteobacteria	PAO1	GCF_000006765.1	Si	Walker T. <i>et al.</i> , 2014
<i>Pseudomonas ogarae</i>	Gamma proteobacteria	F113	GCF_000237065.1	Si	Blanco-Romero E. <i>et al.</i> , 2022
<i>Pseudomonas putida</i>	Gamma proteobacteria	KT2440	GCF_000007565.2	Si	Planchamp C. <i>et al.</i> , 2015
<i>Stutzerimonas stutzeri</i>	Gamma proteobacteria	NRCB010	GCF_024972815.1	Si	Ren F. <i>et al.</i> , 2024

Cepa	ProteinID	Tamaño	Dominios Proteicos
<i>Azorhizobium caulinodans</i> ORS 571	WP_043879294.1	312aa	
	WP_043879293.1	312aa	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	NP_253086.1	366aa	
	NP_252391.1 (WspR)	347aa	

<i>Pseudomonas ogarae</i> F113	WP_014336753.1	333aa	
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	WP_029615556.1	335aa	
<i>stutzerimonas stutzeri</i> NRCB010	WP_011914242.1	321aa	

Con las secuencias de las distintas diguanilato ciclasas recuperadas se decidió realizar un árbol filogenético (Figura 18) utilizando el software MEGA (Molecular Evolutionary Genetic Analysis) para observar la distribución de las proteínas CdgC, se identificaron 3 clados donde se agrupan las DGC asociadas a CdgC, CdgCII y CdgCIII, también es importante destacar como las DGC encontradas en otras proteobacterias forman sus propios nodos independientes, hablando específicamente de CdgCII, las proteínas que componen su clado se dividen en 2 subgrupos, por lo que en un primer momento se decidió analizar la secuencia de cada proteína, para posteriormente revisar su contexto genético, observando 2 tipos de contextos genéticos muy predominantes, con la cualidad de que todos mantienen 4 proteínas, un regulador de respuesta (RR) río arriba de la CdgCII y 2 proteínas asociadas a la síntesis de molibdopterina ubicadas río abajo (Figura 19).

Contexto genético de las proteínas CdgCII presentes en bacterias del género *Azospirillum*



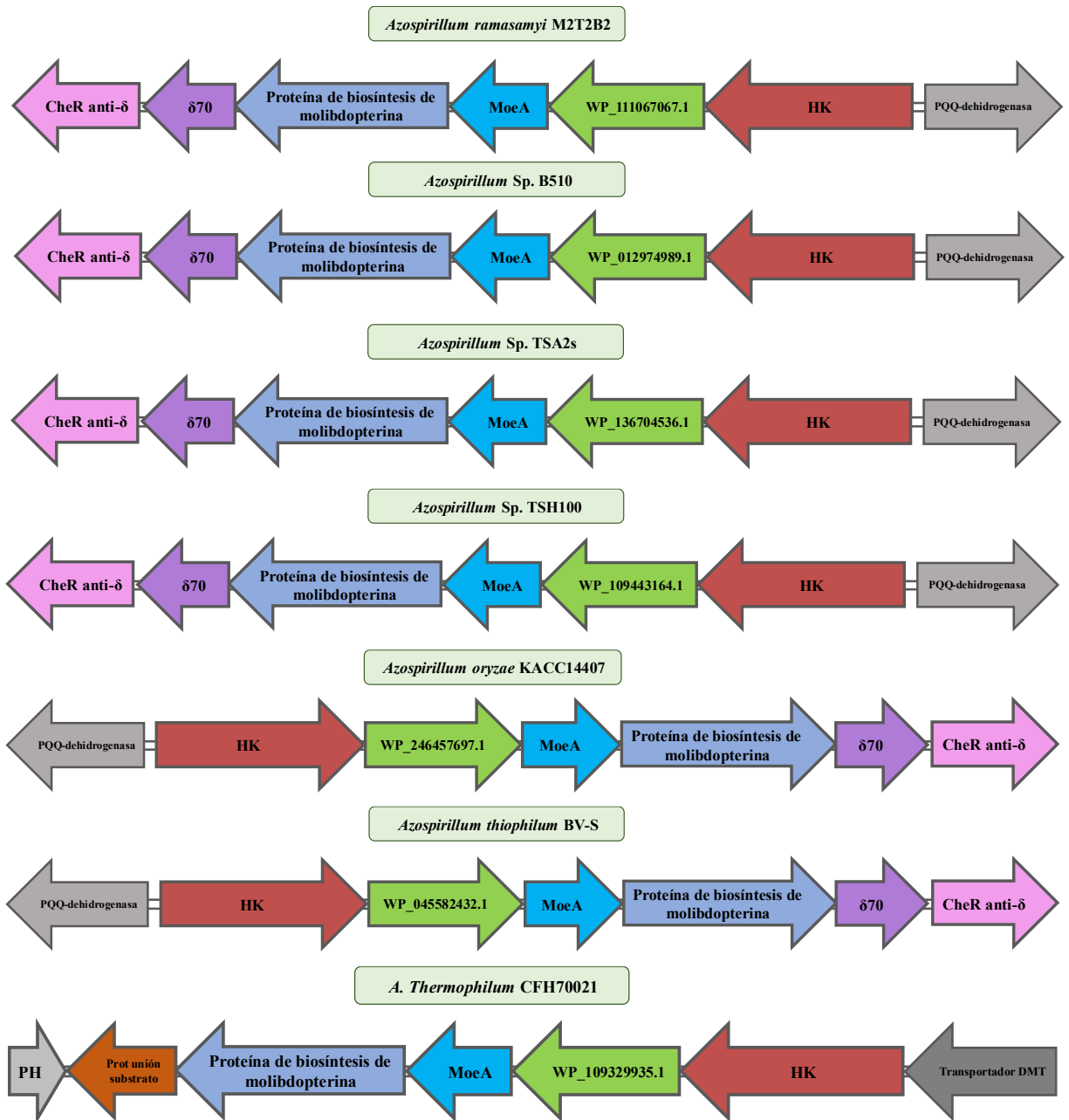


Figura 19. Contexto genético de las proteínas tipo CdgCII en bacterias del género *Azospirillum*. Se analizó el contexto genético de distintas especies del género *Azospirillum*, se observa la prevalencia de 4 proteínas en los distintos genomas, un RR, una DGC CdgCII y 2 proteínas asociadas a la síntesis del cofactor de molibdopterina, las variaciones en los contextos genéticos se relacionan con la distribución observada en el mapa filogenético.

Generación de la construcción pGEM-*cdgC-II*

La información recuperada al comparar la proteína CdgCII con otras diguanilato ciclasas ya caracterizadas, nos sugiere que posee los elementos esenciales para contar con actividad catalítica. Es a partir que de esta información se decidió analizar la actividad diguanilato ciclasa de CdgCII mediante un riboswitch sensible a di-GMPc.

El primer paso consistió en ampliar por PCR el ORF completo del gen *cdgC-II* mediante los cebadores *cdgC-II_F* y *cdgC-II_R* en los que se incluyeron los sitios de restricción *Bam*HI y *Eco*RI, respectivamente; La PCR fue realizada siguiendo las indicaciones del fabricante (invitrogen), utilizando la enzima Platinum Taq Pol, enzima caracterizada por su elevado número de copias y alta fidelidad, las muestras se corrieron en gel de agarosa al 1% (Figura 20A).

Una vez obtenida la amplificación del gen *cdgC-II*, se clono en el vector linealizado pGEM-t-easy utilizando la ligasa T4 conforme lo indicaba el proveedor (Promega). Con la finalidad de identificar las construcciones exitosas, se decidió insertar el plásmido en las células quimiocompetentes *E. coli DH5 α* , las colonias blancas obtenidas fueron resebradas y posteriormente sometidas a PCR utilizando los oligonucleótidos *cdgC-II_F* y *cdgC-II_R* (Figura 20B), estas muestras fueron contrastadas con el ampliado obtenido de la cepa wildtype, obtenido así la construcción pGEM_*cdgC-II* (Figura 20C) .

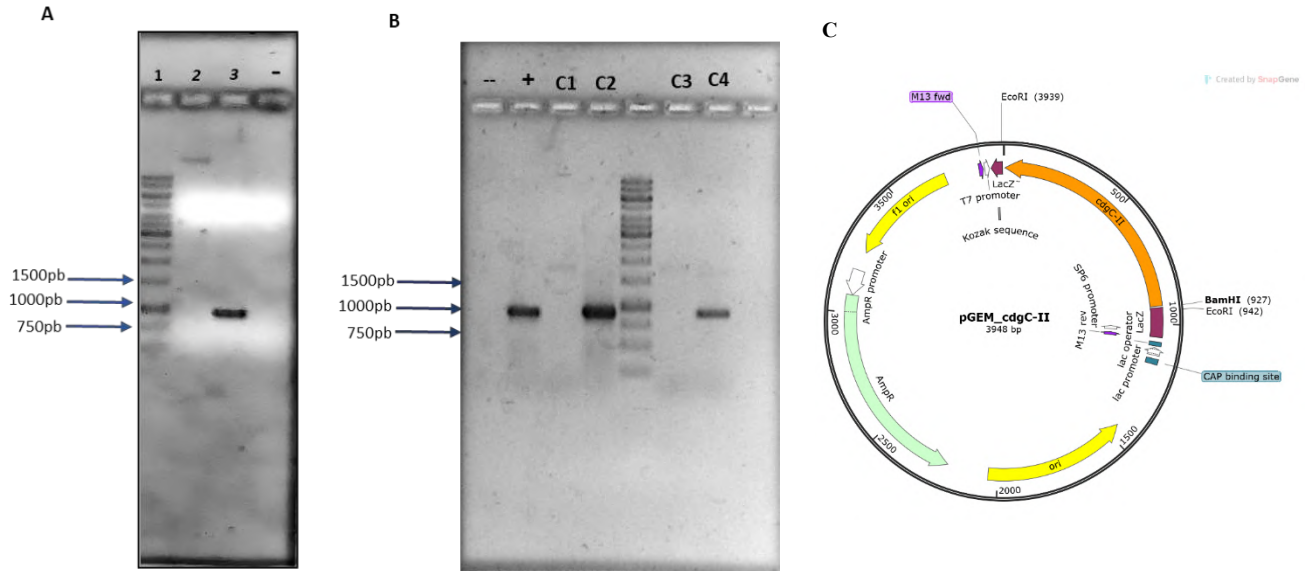


Figura 20. Electroforetograma del ampliado del gen *cdgC-II* y construcción del plásmido pGEM_ *cdgC-II*. A) Amplificado del gen presente en *Azospirillum baldaniorum* Sp245, 1) Marcador Peso Molecular 2) ADN genómico de *A. baldaniorum* Sp245, 3)Amplificado del gen *cdgC-II*, 4)Control negativo. B) Amplificado de las colonias reportadas como positivas a la introducción del gen *cdgC-II* en el vector pGEM t-easy y su comparación con la secuencia *wildtype* (+), en la imagen se observa que las muestras 2 y 4 fueron las únicas que amplificaron. C) Diagrama de la construcción del plásmido pGEM_ *cdgC-II*, imagen elaborada utilizando el programa SnapGene Viewer.

Generación del vector pGEX_ *cdgC-II*

Para generar la construcción pGEX_ *cdgC-II* fue necesario generar una restricción en los plásmidos pGEX-4T1 y pGEM_ *cdgC-II*, mediante la plataforma SnapGene Viewer se predijeron los tamaños de los fragmentos recuperados, en el caso del vector pGEX-4T-1 se esperaba obtener un fragmento de 4900 pb, por parte de la construcción pGEM_ *cdgC-II*, se predijeron 2 fragmentos, uno de 921 pb que corresponde al gen *cdgC-II* y otro de 3016 pb que corresponde al vector pGEM-t-easy, esta información corresponde con los resultados obtenidos al correr las muestras en un gel de agarosa al 1% (Figura 21).

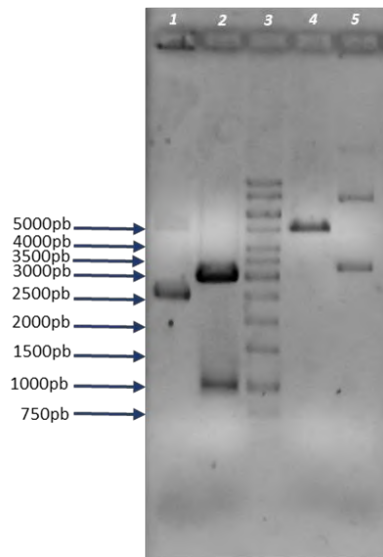


Figura 21. Restricción del plásmido pGEM_cdgC-II y el plásmido pGEX-4T-1, 1) plásmido pGEM_cdgC-II, 2) Restricción con *Bam*HI y *Eco*RI, obteniendo 2 fragmentos, uno de 921 pb (CdgCII) y 3027 pb (pGEM), 3) MPM, 4) Restricción del plásmido pGEX_4T-1, obteniendo un fragmento de 4960 pb, 5) Plásmido pGEX 4T-1.

Una vez obtenidos los fragmentos de ADN que corresponden al gen *cdgC-II* y pGEX-4T linealizado, se utilizó el kit Zymoclean Gel DNA Recovery (ZYMO Research) para recuperar las bandas de interés para posteriormente realizar la construcción del plásmido pGEX_cdgC-II conforme las indicaciones del fabricante.

El plásmido pGEX_cdgC-II fue introducido en las células quimiocompetentes *E. coli* DH5 α , con la finalidad de obtener un número elevado de copias del plásmido, las colonias recuperadas fueron analizadas por PCR para identificar cuáles habían integrado con éxito el plásmido pGEX_cdgC-II (Figura 22). Posteriormente se recuperó el material plasmídico pGEX_cdgC-II para realizar una transformación en *E. coli* S17.1 pDZ119, células quimiocompetentes con la característica de poder detectar la producción de di-GMPc gracias al riboswitch presente en el plásmido pDZ119, obteniendo así la cepa *E. coli* pDZ119/pGEX_cdgC-II, esta se creció

en medio LB adicionada con Amp [100µg/ml] y Gm [15µg/ml] para identificar aquellas colonias que integraron exitosamente ambos plásmidos.

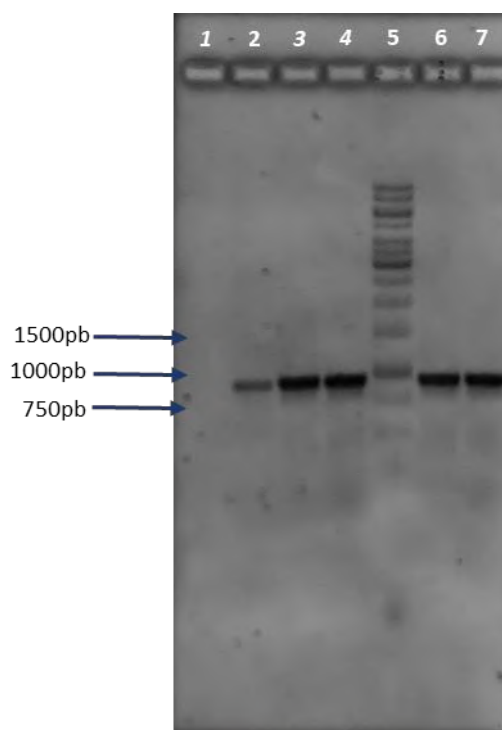


Imagen 22. Electroforetograma de PCR del gen *cdgC-II* en la construcción *pGEX_cdgC-II*. 1)Control Negativo, 2) control positivo utilizando la cepa *wildtype*, 3) PCR en colonia cepas 1-3, 4) PCR en colonia cepas 4-6, 5) MPM, 6) PCR en colonia cepas 13-15 7) PCR 16-18.

Análisis de la producción de di-GMPc del gen *cdgC-II* en *Escherichia coli* S17.1 pDZ119

Se comparo la producción de di-GMPc de la cepa *E. coli* S17.1 pDZ119/pGEX_*cdgC-II* con *E. coli* S17.1 pDZ119/pGEX_*cdgC* una DGC funcional ya identificada que fungiría como control positivo, mientras que el control negativo se obtuvo al generar la cepa con el vector vacío *E. coli* S17.1 pDZ119/pGEX-4T, la adición del inductor IPTG favorece la expresión continua del gen de interés, si este posee actividad DGC generara un cambio en la coloración de las colonias a tonos más rojizos-anaranjados intensos, macroscópicamente, CdgC obtuvo una coloración naranja intensa mientras que CdgCII fue de una coloración más rojiza, pero de menor intensidad, , esta se puede apreciar con mayor claridad en las placas de agar (Figura 23), en el caso de la fluorescencia, se observa un cambio en la coloración respecto al control negativo pGEX_4T1, este último se mantiene con una coloración verde, lo que nos indica

una mayor acumulación del fluoróforo Amcyan, mientras que la producción de di-GMPc favorece la expresión del fluoróforo TurboRFP lo que se traduce en una coloración naranja-rojiza, estos resultados nos indican que el gen *cdgC-II* posee actividad diguanilato ciclasa (Figura 24).

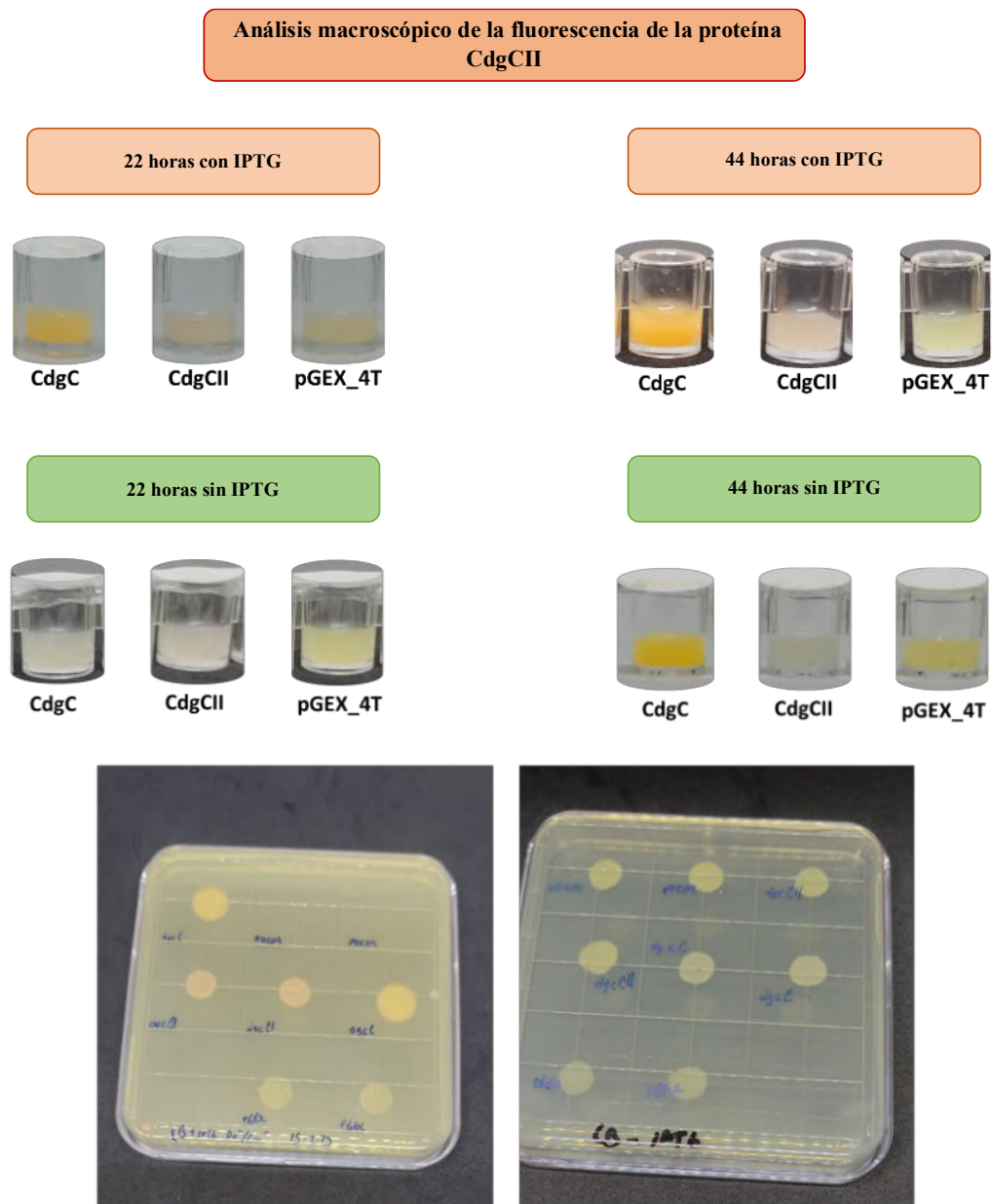
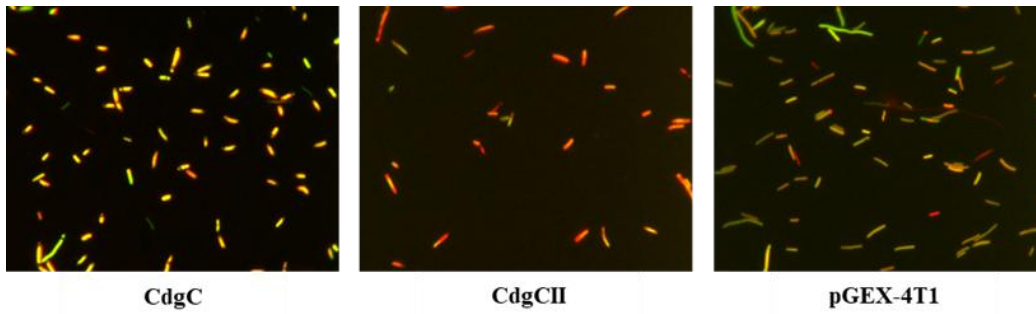
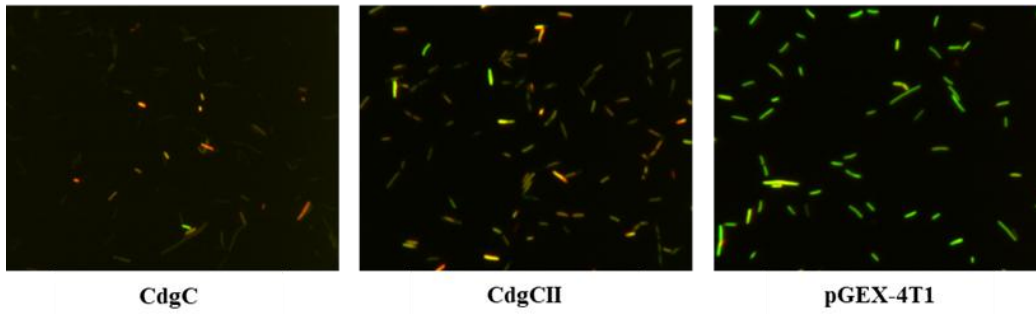


Imagen 23. Análisis macroscópico de la fluorescencia de CdgC-II. Se comparo la fluorescencia emitida con pGEX_4T (control negativo) y CdgC, una proteína con diguanilato ciclasa previamente caracterizada, en la imagen se observan los cambios en la coloración conforme a la producción de di-GMPc, adquiriendo una coloración más naranja a rojiza cuando aumentan los niveles de di-GMPc, esto se logra mediante IPTG, un inductor de expresión genética.

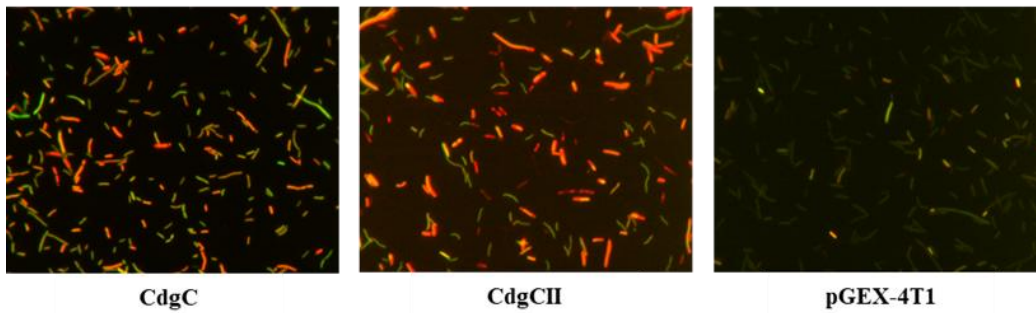
Cepas adicionadas con IPTG 22 horas



Cepas sin la adición de IPTG 22 horas



Cepas adicionadas con IPTG 44 horas



Cepas sin la adición de IPTG 44 horas

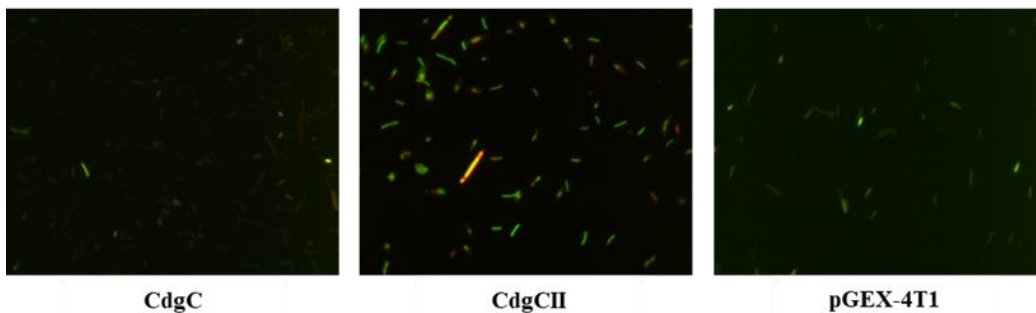


Figura 24. Imágenes de microscopia de fluorescencia para analizar el aumento del di-GMPc. Las imágenes corresponden a las proteínas CdgC (control positivo) CdgCII (proteína de interés) y el vector vacío pGEX-4T1 (control negativo), las muestras se midieron con una exposición 200nm y ganancia de 16nm.

8. Discusión

En el laboratorio de Interacción Bacteria-Planta se han llevado a cabo múltiples análisis *in silico* de las proteínas con probable actividad DGC, en el caso del genoma de *Azospirillum baldaniorum* Sp245 se han identificado 35 proteínas asociadas a la producción y regulación de di-GMPc, 20 de estas proteínas cuentan con un dominio GGDEF, destacando 3 proteínas con los dominios REC-GGDEF⁽²⁾, siendo WP_02188143.1, posteriormente definida como CdgC, la proteína en la que se realizaron los primeros ensayos, demostrando que CdgC está implicada en la formación de biopelícula, específicamente en condiciones de fijación de nitrógeno, los estudios realizados con la mutante Δ CdgC disminuyeron la producción de biopelícula en medio NFB al compararlo con la cepa *wildtype*, aunque en condiciones de desnitrificación (medio mínimo + KNO₃) no se vio alteración alguna en la producción de biopelícula⁽²⁴⁾, por lo que se plantea que alguna de las otras 2 proteínas similares a CdgC podría estar desempeñando un papel activo en la formación de biopelícula bajo condiciones de desnitrificación.

Los análisis realizados con las DGC funcionales CdgC y WspR en las que se tienen identificados los motivos conservados con actividad catalítica e inhibitoria, nos indican que CdgCII mantiene el residuo de Asp conservado en el dominio REC necesario para el proceso de fosforilación, así como el motivo inhibitorio RxxD y catalítico GGDEF en el dominio del mismo nombre, todos ellos necesarios para la regulación de su actividad catalítica, además de mostrar un porcentaje de identidad elevado respecto a WspR (40.52%) por lo que podría estar desempeñando un papel en la conformación de biopelícula o cambios en la conformación de las colonias similar al reportado en *Pseudomonas*⁽⁴⁸⁻⁴⁹⁾.

Esta información concuerda con los resultados obtenidos al expresar la proteína CdgCII en el sistema heterólogo *E. coli* S17.1 pDZ119, el riboswitch presente en el plásmido pDZ119 funciona al censar los cambios en la concentración del di-GMPc, cuando no hay presencia de este segundo mensajero, el plásmido continua produciendo el fluoróforo Amcyan que dota a las colonias de una coloración verde, como la observada en el control negativo *E. coli* S17.1 pDZ119/pGEX-4T1, en caso de que se esté produciendo di-GMPc, este se une al riboswitch B-c3-5 que favorece la expresión continua de la proteína Turbo RFP, cambiando la coloración de las colonias a un tono rojizo, similar al observado en el control positivo *E. coli* S17.1

pDZ119/PGEX_ *cdgC* y el gen de interés introducido en *E. coli* S17.1 pDZ119/pGEX_ *cdgC-II*, confirmando que la proteína CdgCII cuenta con actividad diguanilato ciclasa.

Proteínas como CdgCII están encargadas de sintetizar di-GMPc, el aumento en la producción de este segundo mensajero se encuentra asociado a cambios en la motilidad de la bacteria, alteraciones en su ciclo de división celular y en especial a la formación de biopelícula, por lo que debe ser cuidadosamente controlado. En reguladores de respuesta como CdgCII, se requiere que estos sean fosforilados para contar con actividad catalítica, muchos de ellos necesitan la actividad de una histidina quinasa encargada de responder a los cambios que experimente la célula en el medio que la rodea, la interacción de la histidina quinasa y el regulador de respuesta conforman los sistemas de dos componentes, mismos se caracterizan por ser específicos para sus cognados⁽²⁶⁾, en el clúster de genes asociados a *cdgC-II* se identificó la histidina quinasa híbrida WP_014239226.1 que codifica para una proteína con dominio transmembrana 5TM-5TMR_LYT (pfam07694) similar a los receptores tipo LytS-Yhck, se ha demostrado que este dominio es sensible a la presencia de piruvato, molécula implicada en distintos procesos más allá de su papel en el metabolismo bacteriano, entre ellos se incluyen división celular y como mecanismo de respuesta al estrés oxidativo, por lo que la presencia de piruvato podría estar desempeñando un papel en los mecanismos que activan y regulan a CdgCII⁽⁵⁰⁾.

En contra parte tenemos la presencia del pseudogen *AZOBR_RS40095*, también ubicado río arriba de CdgCII, al traducir la secuencia de nucleótidos a aminoácidos que lo conforman, se identificó otra histidina quinasa con dominio de dimerización y un dominio dCACHE, las proteínas ubicadas río arriba y río abajo de este pseudogen podrían ser parte de otra histidina quinasa híbrida como las identificadas en otros miembros del género *Azospirillum*; Por lo mismo resulta complicado poder catalogar a CdgCII siguiendo la propuesta de Borland y colaboradores para SDC en el género *Azospirillum*, misma que clasifica a las proteínas pertenecientes a estos sistemas independientemente de si son HK, RR o proteínas de fosforrelevo, agrupándolas y catalogándolas conforme si se encuentran contiguas a otras o no, la proteína CdgCII se encuentra clasificada originalmente como parte de un sistema en par, esto en base a los análisis comparativos que se realizaron a partir del genoma de *Azospirillum lipoferum* 4B, específicamente del gen *AZOLI_2514* posteriormente

identificado como *AZOLI_RS10955*, que codifica para WP_014248701.1 una de las DGC similares a CdgCII identificadas en los análisis realizados en este estudio, que junto con la histidina quinasa híbrida codificada por *AZOLI_10960* (antes *AZOLI_2515*) integran ambos elementos de este par⁽⁵¹⁾, considerando que el contexto genético de CdgCII en *Azospirillum baldaniorum* Sp245 es distinto, se planteó clasificar a CdgCII como miembro de un sistema de triada por la presencia de las 2 probables histidina quinasa identificadas río arriba de CdgCII, aunque con la disposición del pseudogen y los genes aledaños provistos por las plataformas del NCBI y KEGG resulta complicado clasificarla en este momento.

Otro punto que refuerza la necesidad de analizar en detalle el contexto genético de esta región es que el pseudogen *AZOBR_RS40095* en realidad sea parte de una proteína más grande que no se haya podido secuenciar adecuadamente, al comparar los dominios presentes en la cepa de este estudio *Azospirillum baldaniorum* Sp245 (RefSeq: GCF_000237365.1) con otra cepa depositada en NCBI de *Azospirillum baldaniorum* Sp245 (RefSeq: GCF_003119195.2), se observó que mantenían contextos genéticos similares, teniendo como diferencia que esta última posee el clúster de genes asociados a *cdgC-II* en la cadena negativa y la cepa integraba tanto el pseudogen como los genes río arriba y abajo del mismo en una única proteína denominada WP_109138639.1 (Figura 25).

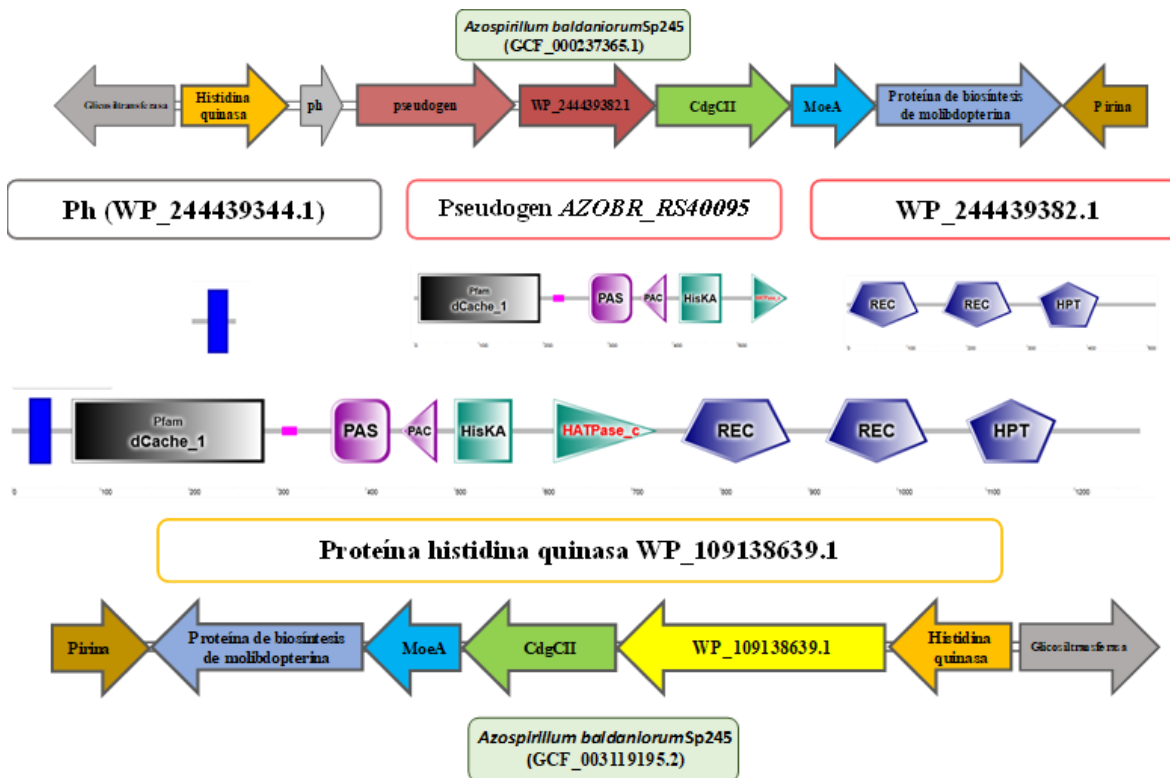
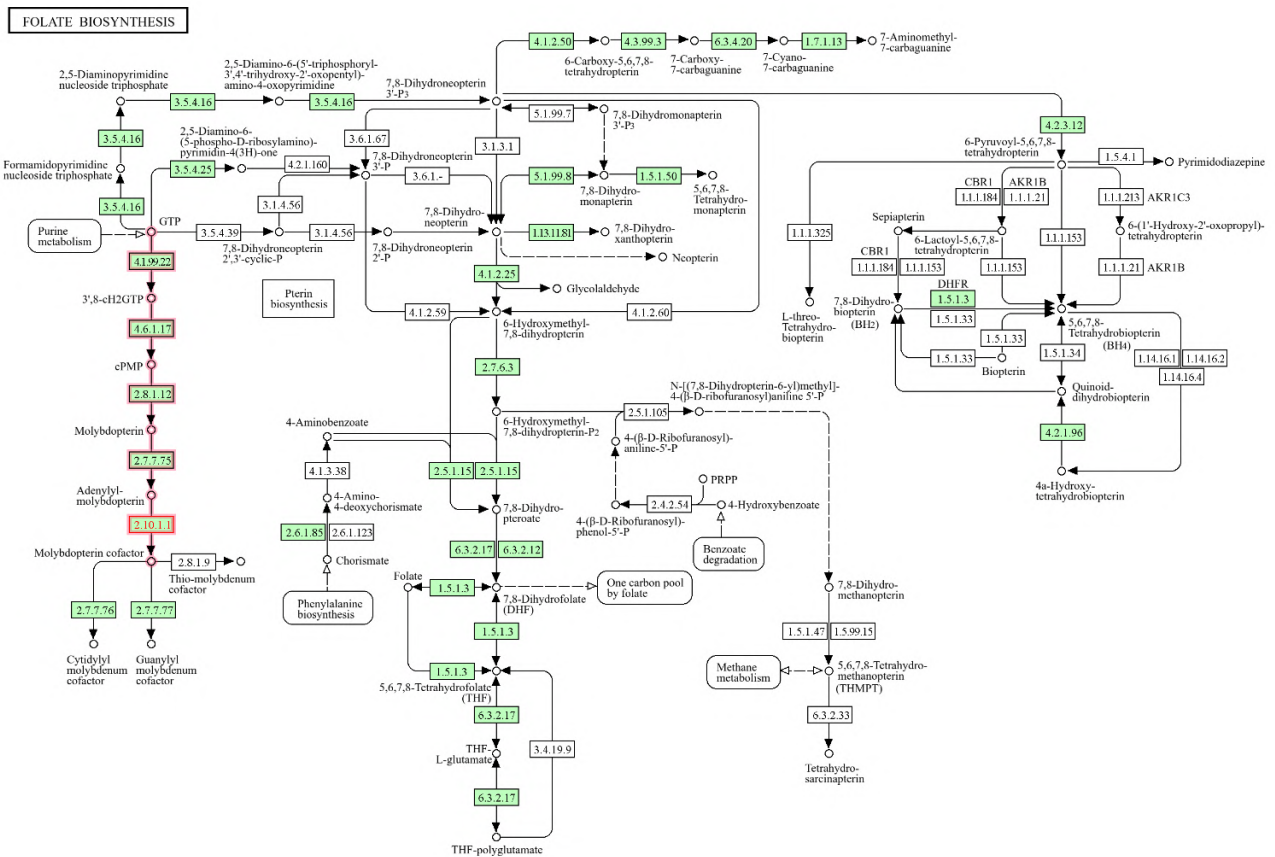


Figura 25. Comparativa del contexto genético del pseudogen *AZOBR_RS40095* y la proteína *WP_109138639.1* Se observa que la proteína *WP_109138639.1* presente en el genoma de la cepa *Azospirillum baldaniorum* Sp245 (número acceso NCBI: GCF_003119195.2) cuenta con los mismos dominios que las proteínas y el pseudogen pertenecientes al clúster asociado a la proteína *CdgCII* analizada en esta tesis perteneciente a la cepa de *A. baldaniorum* Sp245 (número de acceso NCBI: GCF_000237365.1).

La presencia de dos HK río arriba en algunos de los miembros del género *Azospirillum* analizados podría conferirles una ventaja para determinar y responder de manera más óptima a las condiciones del medio que las rodean, aunque en este estudio no se determinó si ambas HK híbridas interactúan en conjunto para regular la actividad catalítica de *CdgCII*, se han descrito casos donde los sistemas de 2 componentes se asocian para generar mecanismos de interacción más complejos conocidos como redes de trabajo multiquinasa o MKN por sus siglas en inglés (Multi Kinase Networks), estas redes de trabajo le permiten a la bacteria responder a situaciones complejas al integrar y censar distintos estímulos mediante sistemas de 2 componentes que interactúan entre ellos, ya sea de forma sinérgica u antagónica⁽⁵²⁾, estos sistemas se han visto implicados en la regulación de procesos como la quimiotaxis, esporulación, respuesta a estrés, virulencia, formación de biopelícula, metabolismo del

nitrógeno, así como procesos más específicos que incluyen la división celular asimétrica o diferenciación en cuerpos fructíferos⁽⁵³⁾.

Continuando con el análisis del contexto genético de CdgCII, rio abajo de esta diguanilato ciclasa se identificaron 2 proteínas asociadas a la síntesis de molibdopterina, la vía metabólica descrita en KEGG para WP_014239229.1 y WP_014239230.1 (ambas catalogadas como molibdopterin molibdotransferasa) presentes en *Azospirillum baldaniorum* Sp245, las implica en la biosíntesis del cofactor de molibdopterina (MoCo), específicamente en el papel de convertir la Adenil-molibdopterina al cofactor de molibdopterina, siendo denominadas como proteínas MoeA-like (ver figura 26).



00790 1/27/22
(c) Kanehisa Laboratories

Figura 26. Biosíntesis del cofactor de molibdopterina. Los cuadros verdes indican que *Azospirillum baldaniorum* Sp245 cuenta con los genes para seguir esa ruta metabólica, en rojo se resalta la ruta de biosíntesis del cofactor de molibdopterina, comienza con 2 moléculas de GTP e implica la actividad de múltiples enzimas encargadas de convertirlo en Adenil-molibdopterina que es convertido en cofactor de molibdopterina gracias a la actividad catalítica molibdopterin molibdotransferasa de proteínas como WP_014239229.1 y WP_014239230.1 (remarcado en rojo intenso), imagen recuperada de la plataforma Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG).

En bacterias se ha observado que las proteínas Moe-like están estrechamente relacionadas al metabolismo del nitrógeno, en el caso de *Burkholderia thailandensis*, la mutación en el gen *BTH_I1704* impide el crecimiento de la cepa en condiciones anaerobias con nitrato como único aceptor de electrones, análisis posteriores determinaron que *BTH_I1704* también es importante para la formación de biopelícula, los autores indican que la disminución en la formación de biopelícula podría deberse a una menor producción de nitrito producto de la alteración en la actividad de la nitrato reductasa⁽⁵⁴⁾. Por su parte la presencia de la proteína resulta crucial para la producción de compuestos bioactivos como lo es la rifamicina SV en el caso de *Amycolatopsis mediterranei* U32, disminuyendo un 95% su producción en la cepa con el gen *moeA* interrumpido, los autores indican que la vía regulada por MoeA resulta clave al proporcionar el nitrógeno amídico esencial en la conformación de la rifamicina SV⁽⁵⁵⁾.

Esta estrecha relación entre las proteínas MoeA y el nitrógeno se debe en gran medida al cofactor de molibdopterina (MoCo), molécula que se une al sitio catalítico de enzimas como la nitrato deshidrogenasa, que permite pasar del nitrato (NO_3^-) a nitrito (NO_2^-) facilitando procesos redox posteriores al brindar un ion O^- , un proceso clave para la supervivencia de la bacteria en condiciones de hipoxia, permitiendo a las bacterias adaptarse a cambios abruptos o demandantes del medio que las rodea⁽⁵⁶⁻⁵⁷⁾.

En cuanto a las 2 proteínas MoeA-like adyacentes presentes en todos los genomas del género *Azospirillum* consultados, los análisis filogenéticos realizados en archeas y bacterias por Megrian y colaboradores, clasifican a las proteínas MoeA adyacentes como MoeA1 y MoeA2, siendo los miembros de MoeA2 los que comparten los dominios con la MoeA canónica identificada en *Escherichia coli*, por lo que la proteína WP_014239229.1 identificada en el clúster de genes de CdgCII estaría más orientada al uso de molibdopterina para formar el cofactor MoCo, mientras que WP_014239230.1 se clasificaría dentro de las proteínas MoeA1, mismas que se caracterizan por estar fusionadas a un dominio PBP (periplasmic-binding-protein) que funge como receptor no enzimático utilizado en procariotas para censar moléculas pequeñas en el periplasma y transportarlas al citoplasma, en el caso de MoeA1, los autores especulan que el dominio PBP-like Mfacilitaría la capturar y transporte tungsteno, favoreciendo la síntesis del cofactor de tungsteno⁽⁵⁸⁾.

En su conjunto el clúster de genes podría estar desempeñando un papel importante durante los procesos de desnitrificación, por un lado la diguanilato ciclasa CdgCII contribuiría en la formación de biopelícula, una estructura clave para regular la cantidad de O₂ disponible al interior de la estructura^(25,59,60), un ambiente bajo en oxígeno es necesario para que proteínas como la nitrato reductasa puedan ser sintetizadas⁽⁶¹⁾, mientras que las proteínas MoeA-like proporcionarían el cofactor MoCo necesario para que lleve a cabo su función desnitrificante, en cuanto a las HK ubicadas río arriba de CdgCII, estas podrían estar regulando la actividad diguanilato ciclasa de CdgCII en base a la concentración de piruvato⁽⁵⁸⁾, molécula que podría estarse acumulando bajo condiciones en las que no sea posible utilizar el NADH y Acetil CoA obtenido de su metabolismo en el ciclo de Krebs como resultado del bloqueo de la cadena respiratoria por la limitada cantidad de oxígeno presente en la célula⁽⁶²⁻⁶³⁾.

9. Conclusiones

El gen *cdgC-II* presente en *Azospirillum baldaniorum* Sp245 codifica una proteína con todos los elementos funcionales necesarios para contar con actividad diguanilato ciclasa, esta proteína se encuentra ampliamente distribuida en todos los miembros del género *Azospirillum* analizados, aunque las búsquedas en otras proteobacterias no dieron resultados tan favorables respecto a la presencia de proteínas con una distribución de dominios REC-GGDEF similares a los presentes en CdgC o CdgC-II, la presencia de un clúster de genes compartidos en todos los miembros del género *Azospirillum* nos da indicios de que puede estar desempeñando un papel importante durante procesos como la desnitrificación, sin embargo, se necesitan análisis más detallados de ciertas regiones pertenecientes al contexto genético de CdgCII presente en *Azospirillum baldaniorum* Sp245 (RefSeq: GCF_000237365.1) para determinar si hubo un error durante su secuenciación y almacenamiento en las bases de datos del NCBI y KEGG o es una característica única de esta cepa que le pueda conferir un comportamiento distinto al de sus congéneres.

Perspectivas a futuro.

Un paso importante para continuar con el análisis del papel de la proteína CdgCII en *Azospirillum baldaniorum* Sp245 es el realizar una mutante por delección del gen *cdgC-II*, para poder analizar los cambios que tendría respecto a la cepa *wildtype* bajo condiciones de fijación de nitrógeno y procesos de desnitrificación, esta información nos ayudarían a reforzar y comprobar si CdgCII resulta crucial durante estos procesos.

Las proteínas MoeA-like también podrían estar desempeñando un papel auxiliar en el desarrollo de *Azospirillum baldaniorum* Sp245 bajo condiciones de desnitrificación, los análisis preliminares en KEGG implican la presencia de 3 genes adicionales a los descritos en esta tesis (*AZOBR_100300*, *AZOBR_130039* y *AZOBR_p130019*) la presencia de múltiples copias podría implicarlos en distintos procesos de gran importancia para el desarrollo de la bacteria, por lo que se considera importante analizarlos en estudios posteriores.

10. Bibliografía

- 1 Schirmer T, Jenal U. Structural and mechanistic determinants of c-di-GMP signalling. Nat Rev Microbiol [Internet]. 2009; 7(10):724–35. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/nrmicro2203> .
- 2 Ramírez-Mata A, Pacheco CM, Cruz Pérez JF, Sáenz MM, Baca BE. In silico comparative analysis of GGDEF and EAL domain signaling proteins from the *Azospirillum* genomes. BMC Microbiol [Internet]. 2018;18(1):20. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1186/s12866-018-1157-0>.
- 3 Castro M, Deane SM, Ruiz L, Rawlings DE, Guiliani N (2015) Diguanylate Cyclase Null Mutant Reveals That C-Di-GMP Pathway Regulates the Motility and Adherence of the Extremophile Bacterium *Acidithiobacillus caldus*. PLoS ONE 10(2): e0116399. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116399> .

- 4 Poulin MB, Kuperman LL. Regulation of Biofilm Exopolysaccharide Production by Cyclic Di-Guanosine Monophosphate. *Front Microbiol* [Internet]. 2021;12. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2021.730980> .
- 5 Jenal U, Reinders A, Lori C. Cyclic di-GMP: second messenger extraordinaire. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2017;15(5):271–84. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/nrmicro.2016.190> .
- 6 Osvaldo-Pedraza R, Estrada-Bonilla GA & Bonilla-Buitrago RR. Los biofertilizantes y su relación con la sostenibilidad agrícola. En Bonilla-Buitrago R, Gonzales-de-Bashan LE & Osvaldo-Pedraza R(Eds), *Bacterias promotoras de crecimiento vegetal en sistemas de agricultura sostenible*. Colombia: AGROSAVIA;2021.p.41-42.
- 7 McNear DH. The Rhizosphere- roots, soils and everything in between. *Nat Edu Knowl*. 2013; 4(3):1.
- 8 Posada-Uribe LF, Moreno-Galván AE, Santos-Torres MT & Estrada-Bonilla GA. Mecanismos de Promoción de Crecimiento de las PGPB. En Bonilla R, Gonzáles de Bash LE, Osvaldo-Pedraza R. Editores. *Bacterias Promotoras de crecimiento vegetal en sistemas de agricultura sostenible*. Primera edición. Colombia. AGROSAVIA. 2021. p. 80-95. Doi: <https://doi.org/10.21930/agrosavia.analisis.7405019> .
- 9 Glick BR. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica (Cairo)* [Internet]. 2012:963401. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.6064/2012/963401> .
- 10 Pedrosa FO, Oliveira ALM, Guimarães VF, Etto RM, Souza EM, Furmam FG, *et al*. The ammonium excreting *Azospirillum brasilense* strain HM053: a new alternative inoculant for maize. *Plant Soil* [Internet]. 2020;451(1–2):45–56. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1007/s11104-019-04124-8>.
- 11 Herraéz A. Complejo de la nitrogenasa [Internet]. Uah.es. [citado el 10 de mayo de 2024]. Disponible en: <https://biomodel.uah.es/metab/nitro/nitrogenasa.htm> .
- 12 Prabhu N, Borkar S, Garg S. Phosphate solubilization by microorganisms. En: *Advances in Biological Science Research*. Elsevier; 2019. p. 161–176.
- 13 Sharma A, Shahzad B, Kumar V, Kohli SK, Sidhu GPS, Bali AS, *et al*. Phytohormones regulate accumulation of osmolytes under abiotic stress. *Biomolecules* [Internet]. 2019;9(7):285. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/biom9070285>.

- 14 Hayat R, Ali S, Amara U, Khalid R, Ahmed I. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Annals of Microbiology* [Internet]. 2010;60(4):579–98. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1007/s13213-010-0117-1>.
- 15 Walters D, Heil M. Costs and trade-offs associated with induced resistance. *Physiol Mol Plant Pathol* [Internet]. 2007;71(1–3):3–17. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pmpp.2007.09.008>.
- 16 Reis VM, Baldani VLD, Baldani JI. Isolation, identification and biochemical characterization of *Azospirillum* spp. And other nitrogen-fixing bacteria. En Cassan FD, Yaacov O & Creus CM (Eds), *Handbook for Azospirillum technical issues and protocols*. Suiza: Springer International Publishing;2015.p.3-4.
- 17 Cassan F, Coniglio A, López G, Molina R, Nievas S, de Carlan CLN, *et al.* Everything you must know about *Azospirillum* and its impact on agriculture and beyond. *Biol Fertil Soils* [Internet]. 2020;56(4):461–79. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1007/s00374-020-01463-y>.
- 18 Lin S-Y, Hameed A, Shen F-T, Liu Y-C, Hsu Y-H, Shahina M, *et al.* Description of *Niveispirillum fermenti* gen. nov., sp. nov., isolated from a fermentor in Taiwan, transfer of *Azospirillum irakense* (1989) as *Niveispirillum irakense* comb. nov., and reclassification of *Azospirillum amazonense* (1983) as *Nitrospirillum amazonense* gen. nov. *Antonie Van Leeuwenhoek* [Internet]. 2014;105(6):1149–62. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1007/s10482-014-0176-6>.
- 19 Anandham R, Heo J, Krishnamoorthy R, SenthilKumar M, Gopal NO, Kim S-J, *et al.* *Azospirillum ramasamyi* sp. nov., a novel diazotrophic bacterium isolated from fermented bovine products. *Int J Syst Evol Microbiol* [Internet]. 2019;69(5):1369–75. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1099/ijsem.0.003320>.
- 20 dos Santos Ferreira N, Hayashi Sant’ Anna F, Reis VM, Ambrosini A, Gazolla Volpiano C, Rothballer M, *et al.* Genome-based reclassification of *Azospirillum brasilense* Sp245 as the type strain of *Azospirillum baldaniorum* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* [Internet]. 2020;70(12):6203–12. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1099/ijsem.0.004517>.
- 21 dos Santos Ferreira N, Coniglio A, Puente M, Sant’Anna FH, Maroniche G, García J, *et al.* Genome-based reclassification of *Azospirillum brasilense* Az39 as the type strain of

- Azospirillum argentinense* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* [Internet]. 2022;72(8). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1099/ijsem.0.005475> .
- 22 Young CC, Lin SY, Shen FT & Lai WA. Molecular Tools for Identification and Characterization of Plant Growth Promoting Rhizobacteria with Emphasis in *Azospirillum* spp. En Cassan FD, Yaacov O & Creus CM (Eds), Handbook for *Azospirillum* technical issues and protocols. Suiza: Springer International Publishing;2015. p.27. DOI: 10.1007/978-3-319-06542-7.
- 23 Dong Q, Bauer CE. Transcriptome analysis of cyst formation in *Rhodospirillum centenum* reveals large global changes in expression during cyst development. *BMC Genomics* [Internet]. 2015;16(1). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1186/s12864-015-1250-9> .
- 24 Sierra Cacho D, Zamorano Sánchez DS, Xiqui-Vázquez ML, Viruega Góngora VI, Ramírez-Mata A, Baca BE. CdgC, a cyclic-di-GMP diguanylate cyclase of *Azospirillum baldaniorum* is involved in internalization to wheat roots. *Front Plant Sci* [Internet]. 2021;12:748393. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2021.748393> .
- 25 Ramírez-Mata A, Fernández-Domínguez IJ, Nuñez-Reza KJ, Xiqui-Vázquez ML, Baca BE. Redes de señalización en la producción de biopelículas en bacterias: quorum sensing, di-GMPc y óxido nítrico. *Rev Argent Microbiol* [Internet]. 2014;46(3):242–55. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/s0325-7541\(14\)70079-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0325-7541(14)70079-3) .
- 26 Terán-Melo JL, Rodríguez-Rangel C, Georgellis D, Álvarez AF. Mecanismos de autofosforilación y transfosforilación en sistemas de dos componentes bacterianos. *TIP* [Internet]. 2019;22. Disponible en: <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2018.0.162>.
- 27 Barba-Ostria CA. Los sistemas de dos componentes: circuitos moleculares versátiles. *TIP Rev Esp Cienc Quim Biol*. 2014;17(1):62-76.
- 28 Wang S. Bacterial Two-Component Systems: Structures and Signaling Mechanisms [Internet]. *Protein Phosphorylation in Human Health*. InTech; 2012. Available from: <http://dx.doi.org/10.5772/48277> .
- 29 Sanders DA, Gillece-Castro BL, Stock AM, Burlingame AL, Koshland DE Jr. Identification of the site of phosphorylation of the chemotaxis response regulator protein, CheY. *J Biol Chem* [Internet]. 1989;264(36):21770–8. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/s0021-9258\(20\)88250-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0021-9258(20)88250-7) .

- 30 Bhattacharyya A, Mavrodi O, Bhowmik N, Weller D, Thomashow L, Mavrodi D. Bacterial biofilms as an essential component of rhizosphere plant-microbe interactions. En: *Methods in Microbiology*. Elsevier; 2023. p. 3–48. Doi: 10.1016/bs.mim.2023.05.006.
- 31 Méndez-Ortiz MM, Membrillo-Hernández J. Proteins with GGDEF and EAL domains: their role in bacterial metabolism. *Microbiología*. 2005;47(3-4):130-139.
- 32 Schirmer T. C-di-GMP synthesis: Structural aspects of evolution, catalysis and regulation. *J Mol Biol* [Internet]. 2016;428(19):3683–701. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2016.07.023> .
- 33 Berg G. Plant–microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Appl Microbiol Biotechnol* [Internet]. 2009;84(1):11–8. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-009-2092-7>.
- 34 Seneviratne G, Weerasekara MLMAW, Seneviratne KACN, Zavahir JS, Kecskés ML, Kennedy IR. Importance of biofilm formation in plant growth promoting rhizobacterial action. En: *Microbiology Monographs*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2010. p. 81–95.
- 35 Xu C, Weston BR, Tyson JJ, Cao Y. Cell cycle control and environmental response by second messengers in *Caulobacter crescentus*. *BMC Bioinformatics* [Internet]. 2020;21(S14). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1186/s12859-020-03687-z> .
- 36 Morris RJ, Bamford NC, Bromley KM, Erskine E, Stanley-Wall NR, MacPhee CE. *Bacillus subtilis* Matrix Protein TasA is Interfacially Active, but BslA Dominates Interfacial Film Properties. *Langmuir* [Internet]. 2024;40(8):4164–73. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1021/acs.langmuir.3c0316> .
- 37 Vlamakis H, Chai Y, Beaugregard P, Losick R, Kolter R. Sticking together: building a biofilm the *Bacillus subtilis* way. *Nat Rev Microbiol* [Internet] 2013;11(3):157–68. Disponible en: <https://doi.org/10.1128/mbio.01664-16>.
- 38 Beloin C, Roux A, Ghigo J-M. *Escherichia coli* Biofilms. En: *Current Topics in Microbiology and Immunology*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2008. p. 249–289.

- 39 Simon, R., Priefer, U. & Pühler, A. A Broad Host Range Mobilization System for *In Vivo* Genetic Engineering: Transposon Mutagenesis in Gram Negative Bacteria. *Nat Biotech.* 1983, p. 784–791. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/nbt1183-784>.
- 40 Baldani VLD, Baldani JI, Döbereiner J. Inoculation of field-grown wheat (*Triticum aestivum*) with *Azospirillum* spp. in Brazil. *Biol Fertil Soils* [Internet]. 1987;4–4(1–2):37–40. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1007/bf00280348>.
- 41 Martínez-Méndez R, Camacho-Hernández DA, Sulvarán-Guel E, Zamorano-Sánchez D. 2021. A Trigger Phosphodiesterase Modulates the Global c-di-GMP Pool, Motility, and Biofilm Formation in *Vibrio parahaemolyticus*. *J Bacteriol* 203:10.1128/jb.00046-21. Disponible en: <https://doi.org/10.1128/jb.00046-21>.
- 42 Sambrook, J. & Russell. Preparation of plasmid DNA by alkaline lysis with SDS. En: *Molecular cloning 1*, 3ed. Nueva York; Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.p. 1.31-1.41.
- 43 Liu W, Yang J, Sun Y, Liu X, Li Y, Zhang Z, et al. Azorhizobium caulinodans transmembrane chemoreceptor TlpA1 involved in host colonization and nodulation on roots and stems. *Front Microbiol* [Internet]. 2017;8:1327. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2017.01327>.
- 44 Walker TS, Bais HP, Déziel E, Schweizer HP, Rahme LG, Fall R, et al. *Pseudomonas aeruginosa*-plant root interactions. Pathogenicity, biofilm formation, and root exudation. *Plant Physiol* [Internet]. 2004;134(1):320–31. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1104/pp.103.027888>.
- 45 Blanco-Romero E, Garrido-Sanz D, Durán D, Rivilla R, Redondo-Nieto M, Martín M. Regulation of extracellular matrix components by AmrZ is mediated by c-di-GMP in *Pseudomonas ogarae* F113. *Sci Rep* [Internet]. 2022;12(1):11914. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-022-16162-x>.
- 46 Planchamp C, Glauser G, Mauch-Mani B. Root inoculation with *Pseudomonas putida* KT2440 induces transcriptional and metabolic changes and systemic resistance in maize plants. *Front Plant Sci* [Internet]. 2014;5:719. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2014.00719>.
- 47 Ren F, Liu N, Gao B, Shen H, Li S, Li L, et al. Identification of *Stutzerimonas stutzeri* volatile organic compounds that enhance the colonization and promote tomato seedling

- growth. J Appl Microbiol [Internet]. 2024;135(10). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1093/jambio/txae248> .
- 48 Huangyutitham V, Güvener ZT, Harwood CS. Subcellular clustering of the phosphorylated WspR response regulator protein stimulates its diguanylate cyclase activity. MBio [Internet]. 2013;4(3):e00242-13. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1128/mBio.00242-13>
- 49 O'Neal L, Baraquet C, Suo Z, Dreifus JE, Peng Y, Raivio TL, *et al.* The Wsp system of *Pseudomonas aeruginosa* links surface sensing and cell envelope stress. PNAS. USA. [Internet]. 2022;119(18):e2117633119. Doi: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.2117633119>
- 50 Behr S, Brameyer S, Witting M, Schmitt-Kopplin P, Jung K. Comparative analysis of LytS/LytTR-type histidinae kinase/response regulator systems in γ -proteobacteria. PLoS One [Internet]. 2017;12(8):e0182993. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0182993> .
- 51 Borland S, Oudart A, Prigent-Combaret C, Brochier-Armanet C, Wisniewski-Dyé F. Genome-wide survey of two-component signal transduction systems in the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum*. BMC Genomics [Internet]. 2015;16(1):833. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1186/s12864-015-1962-x>.
- 52 Francis VI, Porter SL. Multikinase networks: Two-component signaling networks integrating multiple stimuli. Annual Review Microbiololy [Internet]. 2019;73(1):199–223. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-micro-020518-115846> .
- 53 Francis, VI, Waters, EM, Finton-James, SE *et al.* Multiple communication mechanisms between sensor kinases are crucial for virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. Nature Communication 9, 2219 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04640-8> .
- 54 Andreae CA, Titball RW, Butler CS. Influence of the molybdenum cofactor biosynthesis on anaerobic respiration, biofilm formation and motility in *Burkholderia thailandensis*. Research in Microbiology. 2014;165(1):41–9. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.resmic.2013.10.009> .
- 55 Wang W, Zhang W, Lu J, Yang Y, Chiao J, Zhao G, *et al.* MoeA, an enzyme in the molybdopterin synthesis pathway, is required for rifamycin SV production in *Amycolatopsis mediterranei* U32. Appl Microb and Biotech [Internet]. 2002;60(1–2):139–46. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-002-1093-6>.

- 56 Zumft WG. Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microb and Mol Biol Rev* [Internet]. 1997;61(4):533–616. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1128/membr.61.4.533-616.1997> .
- 57 Schwarz G, Mendel RR. Molybdenum cofactor biosynthesis and molybdenum enzymes. *Annu Rev Plant Biol* [Internet]. 2006;57:623–47. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105437>.
- 58 Megrian D, Martinez M, Alzari PM, Wehenkel AM. Evolutionary plasticity and functional repurposing of the essential metabolic enzyme MoeA. *Communications Biology* [Internet]. 2025 [citado el 10 de abril de 2025];8(1):49. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s42003-025-07476-3>.
- 59 Stewart PS. Diffusion in biofilms. *J Bacteriol* [Internet]. 2003;185(5):1485–91. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1128/JB.185.5.1485-1491.2003>.
- 60 Downing LS, Nerenberg R. Effect of oxygen gradients on the activity and microbial community structure of a nitrifying, membrane-aerated biofilm. *Biotechnol Bioeng* [Internet]. 2008;101(6):1193–204. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1002/bit.22018>.
- 61 Durand S, Guillier M. Transcriptional and post-transcriptional control of the nitrate respiration in bacteria. *Front Mol Biosci* [Internet]. 2021;8:667758. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3389/fmolb.2021.667758>
- 62 Berg JM, Stryer L, Tymoczko JL & Gatto GJ. 16. Glycolysis and Gluconeogenesis. En: Berg JM, Tymoczko JL, Gatto GJ. *Biochemistry*. 8a ed. Nueva York, NY, Estados Unidos de América: W.H. Freeman; 2015.p.462-464.
- 63 Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2013). Regulation of the Citric Acid Cycle. (Ed), *Principles of Biochemistry* (Sixth Ed., pp. 653-656)
- 64 National Center for Biotechnology Information (NCBI)[Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; [1988] – [cited 2023 Jul]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- 65 Kanehisa M, Furumichi M, Sato Y, Matsuura Y, Ishiguro-Watanabe M. KEGG: biological systems database as a model of the real world. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2025;53(D1): D672–7. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkae909>

- 66 Ivica Letunic, Supriya Khedkar, Peer Bork, SMART: recent updates, new developments and status in 2020, *Nucleic Acids Research*, Volume 49, Issue D1, 8 January 2021, Pages D458–D460, Disponible en: <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa937>
- 67 Solovyev V. Automatic Annotation of Microbial Genomes and Metagenomic Sequences. En: Li ERW, editor. *Metagenomics and its Applications in Agriculture, Biomedicine and Environmental Studies*. Nova Science Publishers; 2011. p. 61–78.
- 68 Letunic I, Khedkar S, Bork P. SMART: recent updates, new developments and status in 2020. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2021;49(D1): D458–60. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkaa937>
- 69 Madeira F, Madhusoodanan N, Lee J, Eusebi A, Niewielska A, Tivey ARN, et al. The EMBL-EBI Job Dispatcher sequence analysis tools framework in 2024. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2024;52(W1):W521–5. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkae241>
- 70 Meng EC, Goddard TD, Pettersen EF, Couch GS, Pearson ZJ, Morris JH, et al. UCSF ChimeraX: Tools for structure building and analysis. *Protein Sci* [Internet]. 2023;32(11):e4792. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1002/pro.4792>

11. Anexos

Tabla 1.1 Proteínas CdgC presentes en bacterias del género *Azospirillum*.

Link:

https://drive.google.com/drive/folders/1sJ6Y9Eym23RMLFqeSzDwmRB6tMltKk6y?usp=drive_link