BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS
LICENCIATURA EN BIOMEDICINA
LABORATORIO DE LA INTERACCIÓN BACTERIA-PLANTA

"Estudio de movilidad y quimiotaxis de la cinasa histidínica HkhB de *A. brasilense* Sp245 en vida libre y asociación al trigo"

Tesis para obtener el título de:

LICENCIADO EN BIOMEDICINA

Presenta:

Tomás Francisco Maya Malerva

Director de Tesis:
D.C. Beatriz Eugenia Baca

D.C. Alberto Ramírez Mata
Asesor Metodológico

Puebla, Puebla. Diciembre 2019

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS 3
ABREVIATURAS 4
RESUMEN 5
1.INTRODUCCIÓN 6
2.ANTECEDENTES 13
2.1. Antecedentes generales 13
2.2. Antecedentes específicos 15
3.HIPÓTESIS 17
4.OBJETIVOS 17
4.1. Objetivo general 17
4.2. Objetivos particulares 17
5.MATERIAL Y MÉTODO 17
5.1. Material biológico 17
5.2. Técnicas y procedimientos 17
6.RESULTADOS 20
6.1. Estrés salino 21
6.2. Movilidad 22
6.3. Colonización en plantas de trigo 23
7.DISCUSIÓN 24
8.CONCLUSIONES 27
9.PERSPECTIVAS 27
10.ANEXOS 28
11.REFERENCIAS 29

ÍNDICE DE FIGURAS

Número de figura	**Página**
Figura 1. Efecto de las PGPR sobre la raíz	8
Figura 2. Efecto de la inoculación de *A. brasilense* Sp245 en la morfología de la raíz de trigo	9
Figura 3. Estrategia de quimiotaxis de *Escherichia coli*	10
Figura 4. Diagrama del TCS de HK y HyHK	12
Figura 5. Correlación entre el número de genes TCS y el tamaño del genoma entre las bacterias asociadas a plantas	15
Figura 6. Curva de crecimiento de la cepa *A. brasilense* Sp245, A. brasilense Sp245 5A *cdgE::uidA*-Km^R y A. brasilense Sp245*ΔcdgE* 7U-3	16
Figura 7. Contexto genético y dominios proteicos del gen *hkh*B	17
Figura 8. Electroforetograma de producto de PCR y esquema de la región amplificada de la mutante *A. brasilense* Sp245:*ΔhkhB* C.556	21
Figura 9. Efecto del estrés salino en las cepas *A. brasilense* Sp245 y *A. brasilense* Sp245:*ΔhkhB* C.556	22
Figura 10. Ensayos de swimming y swarming	23
Figura 11. Ensayo de colonización al trigo	24
Figura 12. Microscopía de fluorescencia en cepas marcadas con *mCherry* en raíces de trigo	25

ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
°C	Grado Celsius
µL	Microlitro
Mm	Micrómetro
Abs	Absorbancia
CA	Dominio catalítico
CCW	Sentido contrario a las manecillas del reloj
Cm	Centímetro
CW	Sentido de las manecillas del reloj
DHp	Dominio de dimerización
ePGPR	Rizobacteria promotora del crecimiento vegetal extracelular
EPS	Exopolisacárido
g	Gramo
h	Horas
HATPasa	Dominio de autofosforilación
HisKA	Histidina de fosfotransferencia
HK	Cinasa histidínica
Hpt	Dominio de fosfotransferencia
HyHK	Cinasa histidínica híbrida
iPGPR	Rizobacteria promotora del crecimiento vegetal intracelular
L	Litro
LB*	Medio Luria-Bertani modificado
LPS	Lipopolisacárido
mL	Mililitro
mM	Milimolar
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de polimerasa
PGPB	Bacteria promotora del crecimiento vegetal
PGPR	Rizobacteria promotora del crecimiento vegetal
QS	Quorum sensing
RR	Regulador de respuesta
TCS	Sistema de doble componente
TMD	Dominio transmembrana
UFC	Unidades formadoras de colonia
Wt	Tipo silvestre

RESUMEN

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal tienen la capacidad de promover el desarrollo de las plantas a través de diversas estrategias. Estas bacterias pueden promover el aumento y disponibilidad de nutrientes, que son limitantes para la planta, como el fósforo o el nitrógeno o inclusive secretar fitohormonas o metabolitos secundarios que la planta puede utilizar. Una de las PGPR más estudiada es *Azospirillum brasilense*, de la cual se ha demostrado que puede promover cambios en la arquitectura de la raíz, pero para que esto ocurra debe haber una interacción íntima entre *Azospirillum* y la raíz. Es por ello que la capacidad de detectar las moléculas orgánicas que exuda la raíz y moverse hacia ésta es de suma importancia para la bacteria. En el presente trabajo se analizó el fenotipo de *Azospirillum brasilense* sp245:Δ*hkh*B C.556 a la cual le fue removido el gen *hkh*B que codifica para una presunta cinasa histidínica, debido a que se encuentra flanqueada por genes que participan en sistemas de doble componente entre ellas un regulador de respuesta tipo CheY-like, se tenía la hipótesis de que esta mutante se vería afectada en la capacidad de quimiotaxis y en la colonización a raíces de trigo. No obstante, los resultados obtenidos no demuestran una diferencia significativa entre las capacidades de *A. brasilense* Sp245 y *A. brasilense* Sp245:Δ*hkh*B C.556 en movilidad tanto *in vitro* como en plantas de trigo, así como en crecimiento en altas concentraciones de NaCl. Finalmente contrastando nuestros resultados con los trabajos previos de Gamboa 2014, Ávalos 2015 y Cordero 2017 se ha propuesto una probable regulación tipo cross-talk que ha restaurado el fenotipo silvestre.

1.INTRODUCCIÓN

Rizosfera

El suelo es el ecosistema terrestre que mayor actividad presenta, debido a las profusas y heterogéneas interacciones entre sus componentes físicos, químicos y biológicos, los cuales están controlados por las condiciones del entorno **(Barea *et al.*, 2005; Buscot, 2005)**. A través de estas interacciones, se llevan a cabo una gran variedad de relaciones entre diversos microorganismos, entre ellos y con las plantas.

El área de suelo en donde suceden las interacciones bacteria-planta contiene una composición diferente a la del resto del suelo, debido a la actividad intrínseca de las raíces, a esta porción de suelo influenciada por los exudados radiculares se le conoce como rizosfera **(Babalola, 2010; Moe, 2013; Igiehon & Babalola, 2017).** Debido a la gran concentración de moléculas orgánicas presentes en la rizosfera, la presencia de microorganismos es indudable. Entre estos microorganismos se encuentran las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB acrónimo del inglés Plant Growth Promoting Bacteria) que contribuyen al desarrollo de la planta aumentando la disponibilidad de nutrientes limitantes como fósforo o nitrógeno, por otro lado, la composición y actividad de la comunidad microbiana está fuertemente influenciada por el tipo de vegetación (y en consecuencia las especies de moléculas orgánicas exudadas) presente en el suelo **(Semmartin *et al.,* 2010; Thomson *et al*., 2010).**

Las interacciones benéficas bacteria-planta pueden ser clasificadas en tres categorías: i) Microorganismos que en asociación con la planta, son responsables de su nutrición (por ejemplo, microorganismos que permiten que los minerales sean asequibles para la planta); ii) agentes de biocontrol, que pueden estimular el crecimiento vegetal de manera indirecta, previniendo la actividad patógena y por último iii) microorganismos que producen fitohormonas, los cuales son responsables directamente del crecimiento de la planta **(Brimecombe *et al.,* 2007)**.

Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal

Una clasificación singular entre los microorganismos que pertenecen a las PGPB, son las bacterias promotoras del crecimiento vegetal que habitan directamente en la rizosfera, llamadas PGPR (acrónimo del inglés Plant Growth Promoting Rhizobacteria), las cuales pueden bajo ciertas condiciones promover la obtención de nutrientes y crecimiento general de la planta **(Glick, 1995)**.

Las PGPR tienen la capacidad de promover el crecimiento de las plantas ya sea directamente, secretando sustancias de crecimiento vegetal como: el ácido indol-3-acético, las citocininas, giberelinas y el óxido nítrico entre otras **(Bashan & de-Bashan, 2010)**, suministrando micro y macroelementos, fijando N_2 o solubilizando fosfatos; o de manera indirecta, estimulando el sistema de resistencia a patógenos y reduciendo el daño causado por ellos **(Egamberdieva & Lugtenberg, 2014)**. Son capaces de colonizar e incrementar la competitividad de las plantas, estimulando respuestas necesarias para afrontar factores estresantes, secretando hormonas de crecimiento vegetal y proveyendo elementos necesarios como el N_2 y P entre otros (Fig. 1) **(Bashan & de-Bashan, 2010; Vacheron *et al*., 2013; Cassán *et al.,* 2014)**.

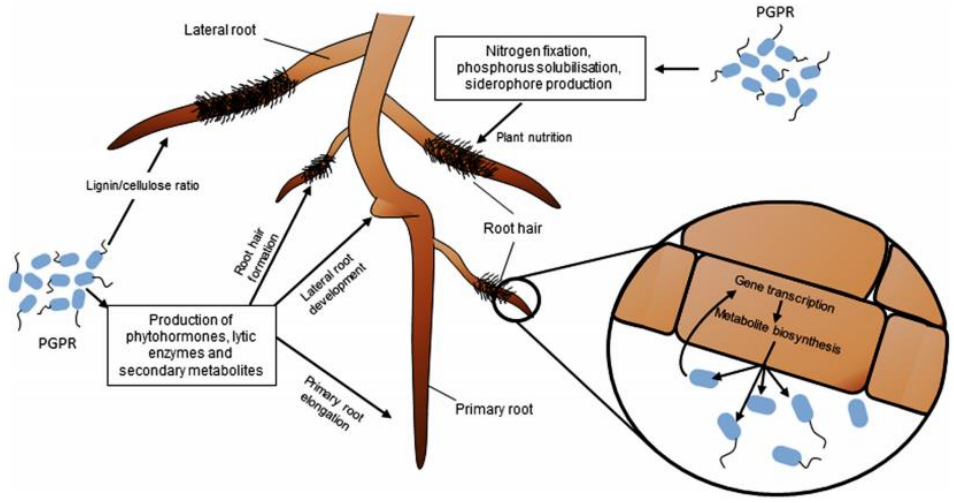

Fig. 1 **Efecto de las PGPR sobre la raíz.** Las PGPR puede modular el desarrollo de las raíces mediante la producción de fitohormonas, metabolitos y enzimas. Los efectos más comúnmente observados son una reducción de la tasa de crecimiento de la raíz primaria y un aumento del número y longitud de las raíces laterales y de los pelos radiculares. La PGPR también influye en la nutrición de las plantas mediante la fijación de nitrógeno, la solubilización del fósforo o la producción de sideróforos y modifica la fisiología de las raíces mediante el cambio de la transcripción génica y la biosíntesis de los metabolitos en las células vegetales. Tomado de Vacheron *et al*., 2013.

Debido a la gran competencia que supone la rizosfera las PGPRs se han adaptado en dos tipos de interacciones: simbióticas o intracelulares (iPGPR), aquellas que viven dentro de las plantas e intercambian metabolitos directamente, y rizobacterias de vida libre o extracelulares (ePGPR), las cuales realizan una interacción mutualista y su hábitat es la rizosfera, el rizoplano de las plantas e incluso pueden encontrarse entre las células de la corteza de la raíz **(Gray & Smith, 2005)**.

Interacción *Azospirillum*-Planta

La inoculación de *Azospirillum* ha demostrado ser causante de cambios en la arquitectura de la raíz de las plantas, mejorando el sistema radicular con el alargamiento y formación de raíces laterales y adventicias (Fig. 2) **(Loredo-Osti, *et al.,* 2004; Spaepen *et al.,* 2008)**. Debido a dichos cambios se ha propuesto que la inoculación de especies de *Azospirillum* promueven un aumento en la absorción de agua y minerales, lo cual influye directamente en el crecimiento de las plantas **(Bashan & de-Bashan, 2010)**. Por otro lado, se ha observado que en condiciones de estrés *Azospirillum* puede almacenar osmolitos orgánicos como azúcares, aminoácidos y sus derivados **(Sleator & Hill, 2002;Gallarato *et al*., 2015)**, expulsar iones dañinos y proveer cierta tolerancia a la planta frente al estrés salino **(Paul, 2013; Gallarato *et al*., 2015)** realizar cambios en la envoltura celular (composición de ácidos grasos de membrana o producción de exopolisacáridos (EPS) **(Chowdhury *et al*., 2007)** y modificar la expresión de genes por medio de factores sigma **(Paul, 2013; Gallarato *et al*., 2015;)**, sin embargo se ha descifrado muy poco acerca de los mecanismos de osmotolerancia en estos microorganismos, ya que la mayoría de estudios se han enfocado meramente en la evaluación de los efectos promotores de crecimiento **(Gallarato *et al*., 2015)**.

Para lograr aportar los efectos benéficos anteriormente mencionados, *Azospirillum* debe alcanzar poblaciones significativas de unidades formadoras de colonia (UFC) en la superficie radicular **(Greer-Phillips *et al.,* 2004).** Sin embargo, son diversas las características y habilidades requeridas por *Azospirilllum* para una

adecuada interacción con la planta, entre las que se incluyen aquellas involucradas en la colonización de la raíz (movilidad, quimiotaxis, formación de biopelícula) **(Alexandre, 2015)**, presencia de lipopolisacáridos (LPS), así como hidrofobicidad y carga de la pared celular **(Bashan *et al.,* 2004)**. No obstante, algunos estudios mencionan que la quimiotaxis es especialmente importante, puesto que influye directamente en el desplazamiento del microorganismo a la rizosfera contribuyendo a su supervivencia y propiciando un cercano contacto entre la bacteria y la planta **(Greer-Phillips *et al*., 2004; Alexandre, 2015)**.

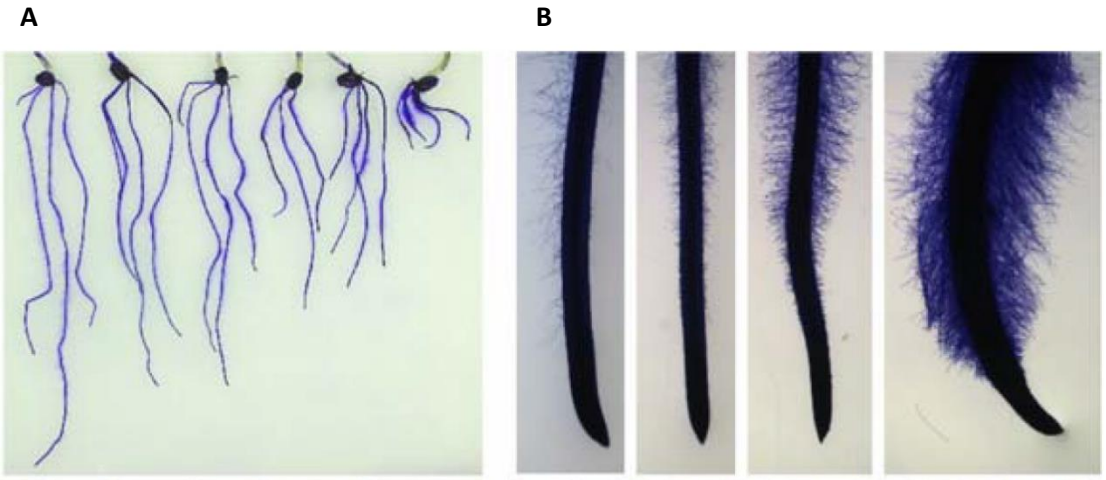

Fig. 2 **Efecto de la inoculación de *A. brasilense* Sp245 en la morfología de la raíz de trigo. a)** Efecto de la inoculación en la longitud de las raíces de izquierda a derecha: No inoculada, plántulas inoculadas con 10^5, 10^6, 10^7, 10^8 y 10^9 UFC/planta. **b)** Efecto de la inoculación en la formación de pelos radiculares. De izquierda a derecha: No inoculada, plántulas inoculadas con 10^5, 10^7 y 10^9 UFC/planta. Tomada de Spaepen *et al.,* 2008.

Movilidad bacteriana

Debido a su tamaño, las bacterias experimentan una inercia despreciable, por otro lado, sus movimientos son restringidos por la viscosidad del medio donde se encuentra. Por lo tanto, las bacterias móviles presentan un comportamiento ondulatorio, a través de flagelos en forma de hélice que al rotar cumplen una función de propela que mueve a la bacteria. Las bacterias se comportan como partículas en una solución y están sujetas a las fuerzas físicas, como el movimiento Browniano **(Berg, 1993)**. El movimiento Browniano es esencial para la reorientación aleatoria del nado en nuevas direcciones, y es esta fuerza especialmente significante en la reorientación del flagelo polar **(Mitchell, 2002)**, tal como las bacterias del género *Azospirillum*. Sin embargo, las bacterias móviles no son capaces de detectar gradientes espaciales, en su lugar, detectan gradientes temporales, en donde una condición ambiental es comparada con otra encontrada algunos milisegundos antes. En ausencia de un gradiente, las bacterias móviles se mueven erráticamente hacia ninguna dirección particular. Por otro lado, cuando se mueven hacia el gradiente de un atractante, se suprimen los cambios en la dirección del nado, y las bacterias se desplazan hacia el atractante **(Sourjik & Wingreen, 2012)**.

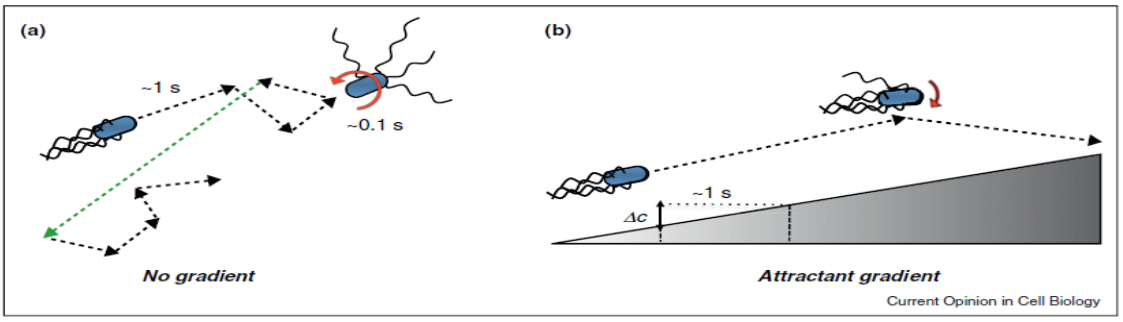

Fig. 3 **Estrategia de quimiotaxis de *Escherichia coli*. (a)** Nado de ***E. coli*** en ausencia de un gradiente. El movimiento de las células en un ambiente uniforme consiste en desplazamientos suaves que duran hasta varios segundos y se interrumpen por giros cortos. El resultado de la rotación del flagelo en sentido contrario a las agujas del reloj (CCW), que da como resultado la formación de un haz flagelar propulsor detrás de la célula. Las vueltas son causadas por la rotación en sentido horario (CW) de uno o varios flagelos, lo que desestabiliza la trayectoria. **(b)** Quimiotaxis en gradientes. La estrategia de quimiotaxis de *E. coli* y otras bacterias se basa en un desplazamiento parcialmente aleatorio, mediante la cual las células hacen comparaciones temporales de las concentraciones de quimioefector durante una carrera y suprimen el inicio del siguiente giro si aumenta el nivel de estimulación positiva. Como consecuencia, se prolonga en la dirección positiva (es decir, hasta el gradiente quimioatrayente). La magnitud de la respuesta al gradiente depende del cambio en la concentración de atrayente (Δc) experimentado por la célula móvil durante una corrida antes de que el sistema de adaptación se reinicie. Tomado de Sourjik y Wingreen, 2012.

El mecanismo molecular de la quimiotaxis ha sido estudiado en gran detalle en *Escherichia coli*, una bacteria con flagelos peritricos (Fig. 3) **(Wadhams & Armitage, 2004; Sourjik & Wingreen, 2012)**.

Sistemas de doble componente

A consecuencia de las cambiantes condiciones ambientales que pueden presentarse en los diversos nichos ecológicos, las bacterias necesitan detectar y responder de manera rápida y eficaz a dichos estímulos. Para lograr esta tarea, una gran cantidad de microorganismos utilizan Sistemas de Doble Componente (TCSs, del inglés Two Component System). Un TCS representativo consiste en una proteína denominada cinasa histidínica (HK histidine kinase, acrónimo del inglés) anclada a membrana, que detecta los estímulos, y un regulador de respuesta (RR) citoplasmático, que media la señal de reacción de la bacteria a partir de reacciones de fosforilación/defosforilación que regulan; generalmente, la expresión de genes que propician la adaptación al entorno como el metabolismo, virulencia, esporulación, *quorum sensing* (QS), resistencia a antibióticos, formación de biopelícula y respuesta al estrés **(Jung *et al.,* 2012; Borland *et al.,* 2016)**. Los TCS se encuentran ampliamente distribuidos en organismos procariontes y eucariontes como plantas, levaduras y hongos **(Chang & Stewart, 1998; West & Stock, 2001; Jung *et al*., 2012)**.

Cinasa histidínica (HK)

Las cinasas histidínicas generalmente presentan actividad al encontrarse como dímeros los cuales se activan por medio de un proceso de recepción de un estímulo que propicia su autofosforilación. Aunque regularmente se encuentran asociadas a la membrana, pueden existir también en el citoplasma bacteriano **(Borland, *et al.,* 2015)**. Todas las cinasas histidínicas contienen dos dominios altamente conservados, dominio HisKA y un dominio HATPasa, el cual contiene un residuo de histidina (H) conservado donde se llevan a cabo las reacciones de autofosforilación y fosfotransferencia **(Jung *et al*., 2012)**. El sensor de la HK consiste de una porción N-terminal moduladora de estímulos específicos y la porción C-terminal como un módulo efector, el cual comprende el dominio de dimerización (DHp) y el dominio catalítico de unión a ATP (CA). La mayoría de las HK también contienen al menos un dominio accesorio entre los dominios transmembrana y el dominio de

dimerización anotado como DHp; además de otros dominios accesorios, que pueden ser dominios PAS, HAMP y GAF, que podrían contribuir para la especificidad y estabilidad de la dimerización (Fig. 4) **(Khorchid & Ikura, 2006; Cheung & Hendrickson, 2010; Capra & Laub, 2012)**, además de que la presencia de diversos dominios puede brindar una capacidad más extensa de detectar estímulos **(Borland *et al*., 2015)**.

Regulador de respuesta (RR)

Los RR poseen un dominio receptor, donde se encuentra el residuo de ácido aspártico que sirve como sitio de fosforilación; muchos de los RRs son proteínas conformadas por dos dominios, el dominio receptor está fusionado con un dominio secundario que tiene cierta actividad efectora. En muchos casos el dominio de respuesta es de unión a DNA funcionando como un factor transcripcional; sin embargo, existen otros tipos de respuestas como la activación de proteínas secundarias involucradas en diversas actividades fisiológicas con funciones enzimáticas o involucradas en mecanismos de movilidad **(Chang & Stewart, 1998)**.

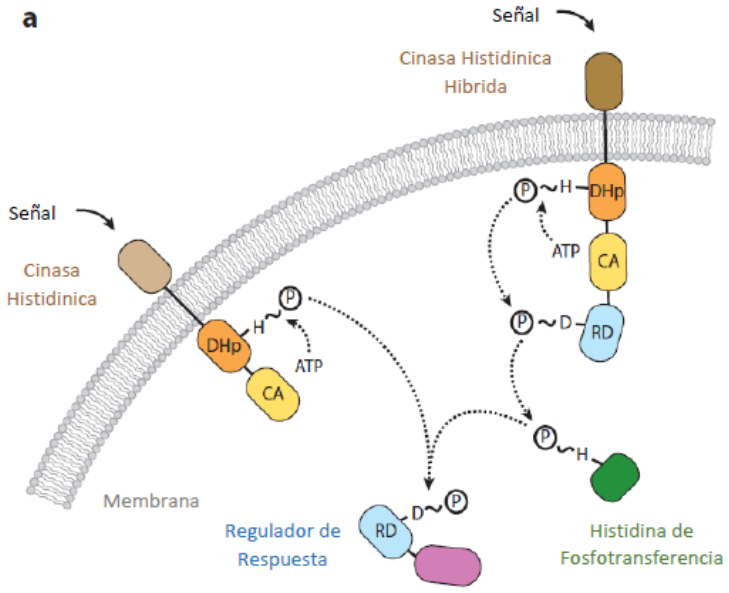

Fig. 4 **Diagrama del TCS de HK y HyHK** (Cinasa histidínica hìbrida). Tomada de Capra & Laud, 2012.

Mecanismo de acción del TCS

La activación de la HK se lleva a cabo cuando se detecta una señal por un dominio sensor que se localiza en el periplasma, éste se encarga de propagar la señal a

través de las hélices presentes en los dominios transmembranales (TMD, acrónimo Transmembrane Domain) y el domino conector hacia el centro catalítico de la cinasa, el cual sufre un cambio conformacional en la alineación de los residuos de histidina conservados frente a una región conservada dependiente de ATP, formando así el sitio activo cinasa **(Khorchid & Ikura, 2006; Capra & Laub, 2012)**. La HK se encarga de catalizar una reacción de autofosforilación ATP-dependiente en un residuo conservado de Histidina, este grupo fosforilo es inmediatamente transferido al ácido aspártico (D) conservado en RR, el cual sufre un cambio conformacional que activa la respuesta emergente, alterando de esa manera las propiedades transcripcionales y enzimáticas **(Khorchid & Ikura, 2006)**. La HK y el RR tienen una relación intrínseca que separa las señales de entrada, es decir de fosfotranferencia y da una respuesta de salida a dichas señales, siendo éste el que permite a la bacteria amplificar y diversificar sus señales **(Jung *et al*., 2012)**.

2.ANTECEDENTES

2.1. Antecedentes generales

TCS híbridos

Aunque usualmente se localizan en distintas proteínas, los módulos del receptor y transmisor a veces se fusionan en una llamada cinasa histidínica híbrida (HyHK Hybrid histidine kinase, acrónimo del inglés). Dicha estructura da como resultado transferencias múltiples de fosfatos que se cree proporcionan mecanismos de ajuste y más puntos de control que los mecanismos de fosfotransferencia clásicas **(Borland *et al*., 2015)**.

La existencia de TCS más complejos, denominados híbridos, que utilizan reacciones de fosforelevo y representan sistemas más complejos **(Appleby *et al.,* 1996)**, posibilitan la regulación de manera individual de las reacciones de fosfotransferencia **(Krell *et al*., 2010)**. Aunque usualmente los dominios transmisor y receptor se encuentran en distintas proteínas, existen algunas en las cuales los dominios se encuentran codificadas en la misma proteína de manera unida en una sola proteína, llamada cinasa histidínica hibrida (HyHK) **(Cui *et al.,* 2011)**.

HK y HyHKs en *Azospirillum*

En el año 2015 Borland y colaboradores realizaron un análisis *in silico* de 4 cepas secuenciadas y disponibles en la base de datos de *Azospirillum* (*A. brasilense* Sp245 y CBG 497, *A. lipoferum* 4B y *Azospirillum* SpB510). El objetivo del estudio fue conocer el repertorio de genes que codifican para TCS. Los resultados señalan que la cepa *A. brasilense* Sp245 y *A. lipoferum* 4B presentan 3.3% y 3.9% de su genoma, respectivamente, como genes que codifican para TCS. *A. brasilense* Sp245 posee un total de 259 genes codificantes para TCS, 129 son HKs (74 HK y 55 HyHKs), 124 RR y 2 proteínas de fosfotransferencia (2 Hpt). *A. lipoferum* 4B posee 244 genes putativos codificantes para TCS, 69 son HK clásicas, 49 HyHK y 121 RR. El genoma de *Azospirillum* sp. B510 codifica para 260 genes de TCS putativas, de las cuales 75 son HKs, 47 HyHK y 132 RRs. Por otro lado *A. brasilense* CBG497 contiene un total de 227 genes para TCS putativos, 60 HKs, 50 HyHKs, 111 RRs y 2 proteínas de fosfotransferencia (1 HisKA y 1Hpt). En conclusión, se determinó que el género *Azospirillum* presenta mayor número de genes TCS al igual que mayor número de HyHKs, en comparación con otros géneros bacterianos con tamaño del genoma similar, así las cuatro cepas de *Azospirillum* están de manera presuntiva enriquecidas en TCS (Fig. 5) **(Borland *et al*., 2015)**.

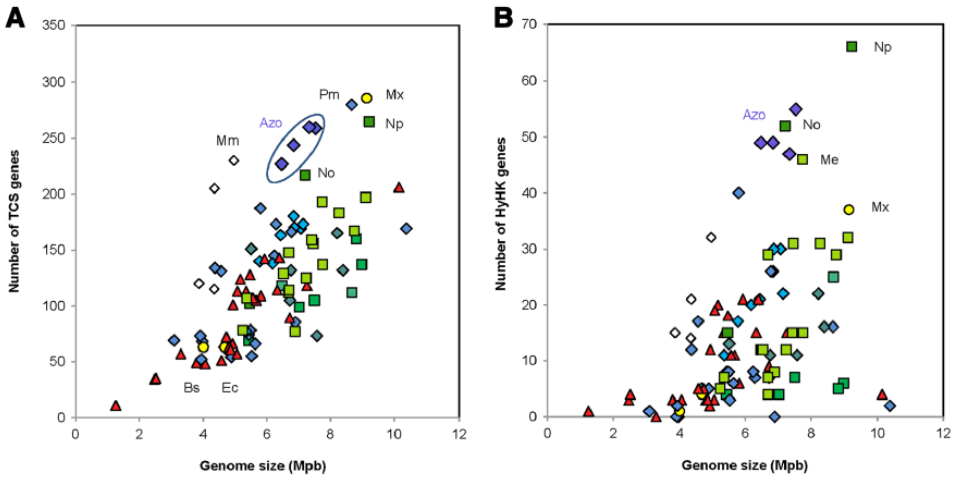

Fig. 5 **Correlación entre el número de genes TCS y el tamaño del genoma entre las bacterias asociadas a plantas. A)** Número de los genes TCS. **B)** Número de genes que codifican HyHKs**.** Los símbolos representan círculos amarillos: organismos modelo *B. subtilis*, *E. coli*, *M. xanthus*; triángulos rojos: fitopatógenos; cuadrados verdes: simbiontes vegetales; diamantes azules: PGPR; diamantes blancos: *Rhodospirillacea eacuático*. Abreviaciones, Azo: *Azospirillum;* Bs: *B. subtilis* BSn5; Ec: *E. coli* K12; Me: *Methylobacterium* sp. 4-46; Mm: *M. magneticum* AMB-1; Mx: *M. xanthus* DK1622; No: *Nostoc* sp. PCC 73102; Pm: *Paenibacillus mucilaginosus* KNP414. Obtenido de Borland *et al*., 2015.

2.2. Antecedentes específicos

Gamboa (2014) realizó una mutación por inserción en el gen AZOBR_RS26145, de la diguanilato ciclasa E (*cdgE*), mediante la inserción de un casete de resistencia de betaglucuronidasa-kanamicina (*gusA*-Km^R), con la finalidad de analizar la participación de diversas proteínas con dominios GGDEF de *A. brasilense* Sp245, involucradas en funciones como el crecimiento bacteriano y resistencia al estrés. Al comparar fenotípicamente el crecimiento de ambas cepas (Fig. 6 A) se observó un incremento en el tiempo de generación 147 min de la mutante (*A. brasilense* Sp245 5 A *cdgE::uidA*-Km^R) contra 51 min de la silvestre (*A. brasilense* Sp245). Asimismo, se analizó el papel del estrés por NaCl, en donde se observa una disminución significativa del crecimiento en comparación con la cepa silvestre (Fig. 6 B). Debido a esto se analizó el contexto genético de la *cdgE*, el cual presentaba diversos genes de regulación tipo transcripcional (AZOBR_RS26130), así como genes involucrados en señalización como la cinasa histidinica (AZOBR_RS34900). Estos genes presentaban la misma dirección de transcripción, y contaban con espacios intergénicos cortos, lo que sugiere que el gen de la *cdgE* se localiza en un operón.

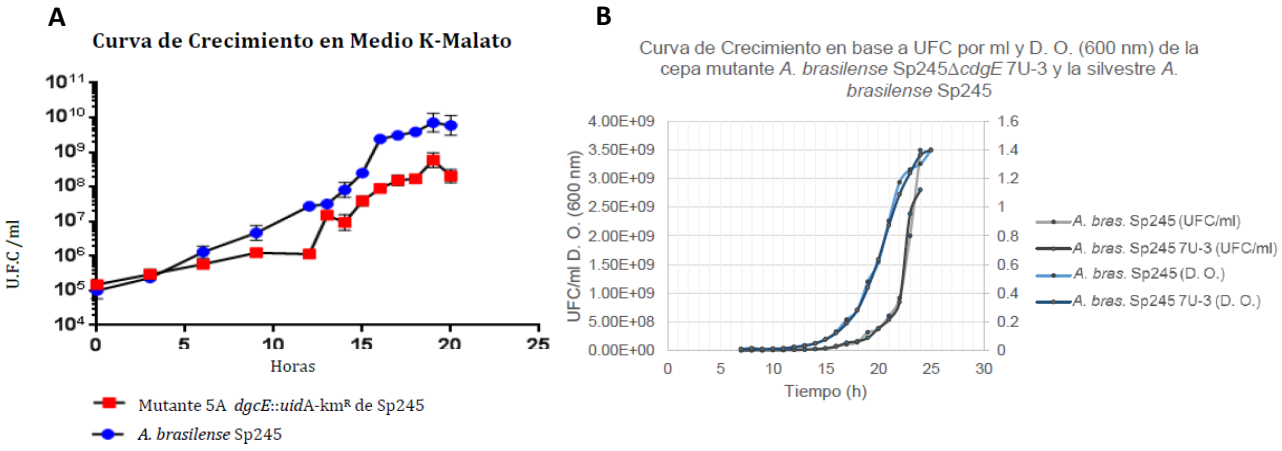

Fig. 6 **Ensayos de crecimiento**. A) Curva de crecimiento de la cepa *A. brasilense* Sp245 5A *cdgE::uidA*-Km^R contra *A. brasilense* Sp245 mediante determinación de UFC.B) Curva de crecimiento de la cepa *A. brasilense* Sp245*ΔcdgE* 7U-3 contra *A. brasilense* Sp245 basado en determinación de Abs y UFC. Tomado de Avalos, 2015.

Posteriormente Avalos (2015), realizó una mutación por remoción del gen *cdgE*. Para ello utilizó un sistema de doble selección (positiva y negativa), empleando el plásmido suicida pK18*mobsac*B para seleccionar la mutante. A pesar de la baja frecuencia de recombinación se obtuvo la mutante *A. brasilense* Sp245*ΔcdgE* 7U-3. Al analizar los fenotipos de crecimiento y de susceptibilidad al NaCl se observó que no existía una diferencia significativa de la mutante con respecto a la silvestre (Fig. 5 B), discrepando con lo reportado por Gamboa (2014). Por lo cual, se infiere que la inserción del casete *gusA*-Km^R pudo generar una mutación polar, afectando genes río abajo.

Finalmente, en un esfuerzo por tener certeza del gen implicado en el fenotipo expresado por la mutante de Gamboa (*A. brasilense* Sp245 5A *cdgE::uidA*-Km^R), Cordero (2017) realizó una mutación mediante recombinación homóloga con el uso de un plásmido suicida, denominado pCDR, para la remoción del gen *hkhB*, localizado río abajo de la *cdgE*, que presuntamente expresa una cinasa histidínica. El análisis bioinformático de este gen muestra que en el N-terminal contiene 6 regiones transmembranales y 5 dominios proteicos: PAS, HisKA (sitio fosfo-aceptor/dimerización), HTAPase_c (dominio catalítico), REC (receptor) y HTP (dominio de fosfotransferencia) (Fig. 7).

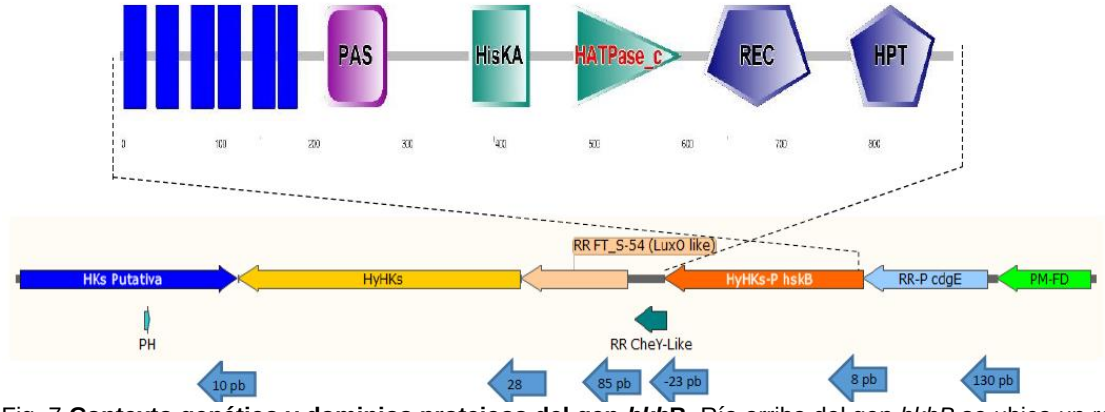

Fig. 7 **Contexto genético y dominios proteicos del gen *hkh*B.** Río arriba del gen *hkhB* se ubica un regulador de respuesta tipo CheY like (RR CheY-like), un regulador de respuesta con función de factor de transcripción sigma 54 (FT_S-54), una proteína cinasa histidínica hibrida (HyHKs); y una cinasa histidínica probable (HKs-P) con una proteína hibrida (PH); río abajo presenta la diguanilato ciclasa CdgE (gen *cdg*E) y una proteína de membrana de función desconocida (PM-FD). En el N-terminal, el gen *hhkB* contiene 6 regiones transmembranales y 5 dominios proteicos: PAS, HisKA, HTAPase_c, REC y HTP. Las flechas azules muestran las distancias intergénicas. Tomado de Cordero, 2017.

3.HIPÓTESIS

El gen *hkhB* que codifica presuntivamente una cinasa histidínica de *A. brasilense* Sp245, está involucrado en la movilidad bacteriana.

4.OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Determinar la participación de la cinasa histidínica híbrida HkhB de *A. brasilense* en movilidad y quimiotaxis en vida libre y en la colonización al trigo.

4.2. Objetivos particulares

Realizar ensayos de swimming y swarming de las cepas *A. brasilense* Sp245 y *A. brasilense* Sp245:Δ*hkh*B C.556

Realizar ensayos de resistencia a NaCl de las cepas *A. brasilense* Sp245 y *A. brasilense* Sp245:Δ*hkh*B C.556

Realizar ensayos de colonización en plantas de trigo de las cepas *A. brasilense* Sp245 y *A. brasilense* Sp245:Δ*hkh*B C.556

5.MATERIAL Y MÉTODO

5.1. Material biológico

Cepa	Características	Referencia
***A. brasilense* Sp245**	Cepa silvestre	(Baldani *et al.,* 1986)
***A. brasilense* Sp245 C.556**	Cepa mutante Δ*hkh*B de *A. brasilense* Sp245	(Cordero, 2017)
***A. brasilense* Sp245(pMP2449-5)**	Cepa silvestre con plásmido que contiene el gen *m-cherry*	(Ramirez-Mata *et al*., 2018)
***A. brasilense* Sp245 C.556 (pMP2449-5)**	Cepa mutante Δ*hkh*B de *A. brasilense* Sp245 con plásmido que contiene el gen *m-cherry*	(Ramirez-Mata *et al*., 2018)

5.2. Técnicas y procedimientos

Crecimiento bacteriano de *Azospirillum brasilense* Sp245

El crecimiento se evaluó realizando la curva de crecimiento de *A. brasilense* Sp245 y *A. brasilense* Sp245:Δ*hkh*B C.556 con cultivos monitoreados en un lapso de

tiempo de 12-36h. El precultivo se realizó a partir de cultivos en placas de rojo Congo sin antibiótico para las cepas silvestre y mutante**,** inoculadas por estría de aislamiento, tras un periodo de incubación de 48 h a 30 °C, se tomaron 3-4 colonias y se inocularon en tubo con 5 ml de medio rico LB* (precultivo), previamente esterilizado. Posteriormente en matraces Erlenmeyer de 250 ml con un volumen de 20 ml de medio rico LB*, previamente esterilizado, se inoculó una muestra de precultivo a una relación 1000:1 (medio de cultivo/precultivo). Posteriormente, se realizaron registros cada dos horas en el lapso de 12 a 24 h, y cada tres horas de las 24 a 36 h. El registro espectrofotométrico se realiza en $DO_{600\ nm}$, por otro lado, el conteo de UFC se realiza mediante el método modificado de Miles **(Miles *et al.,* 1938),** realizando diluciones seriadas 10^{-1} a 10^{-7}. Las últimas dos diluciones se cultivan en placas de rojo Congo por duplicado, tras un periodo de incubación 48 h/30°C las colonias son sumadas y promediadas, utilizando la siguiente fórmula para obtener las UFC/ml:

$$\frac{(\#de\ colonias)(Factor\ de\ dilución\ )(1000\ mL)}{10} = UFC/mL$$

Sensibilidad a NaCl en medio K-malato

La determinación de la sensibilidad a NaCl se realizó a partir de un precultivo en condiciones estándar (18h/30°C). Posteriormente se realizaron los cultivos de la mutante y la cepa silvestre en medio K-malato con concentraciones de 150mM, 200mM y 300mM de NaCl. En matraces Erlenmeyer de 50 ml con un volumen de 20 ml de K-malato (con la respectiva concentración de NaCl) se inoculó una concentración de $1x10^7$UFC/ml de la cepa a evaluar. A las 18h se determinó la DO_{600nm}, se observó al microscopio óptico y finalmente se realizaron las diluciones necesarias para el conteo de UFC. El ensayo se realizó en dos experimentos independientes.

Ensayo de movilidad

La movilidad de las cepas se determinó mediante ensayos de movimiento natatorio y de superficie. Ambos ensayos se realizaron a partir de cultivos realizados en matraces Erlenmeyer de 250 ml con un volumen de 20 ml de medio rico LB*, hasta

alcanzar una concentración de 5.5-6X10^6 UFC/5µL. Las placas de swimming y swarming se prepararon con medio K-malato (10mM) con 0,3 % y 0,5% de agar, respectivamente. Se inoculó un volumen de 5 µL del cultivo en LB* dentro del agar (Swimming) o sobre el agar (Swarming), las placas se dejaron secar dentro de campana de flujo laminar hasta secar completamente el sitio del inóculo y se incubó a 30°C/48h. La cuantificación de la movilidad se determinó con respecto al diámetro del halo de cada cepa. El experimento se realizó en tres experimentos independientes con dos réplicas cada uno.

Desinfección de semillas de trigo con hipoclorito de sodio y cicloheximida

A partir de semillas de trigo previamente seleccionadas por tamaño y apariencia se pesaron (una a una) y seleccionaron aquellas que tenían un peso entre 0.05g - 0.055g. Posteriormente se enjuagaron con agua estéril durante 1 min en tres ocasiones. Enseguida se cepilló suavemente cada semilla de trigo (una a una) con extran al 2%, y se enjuagaron 5 veces con agua estéril o hasta eliminar el jabón. A continuación, se eliminó el agua estéril y se agregó hipoclorito de sodio al 1%, de manera que las semillas estuvieran completamente sumergidas, y se mantuvo en agitación 30min/60rpm. Posteriormente se decantó el cloro y se enjuagó inmediatamente con agua estéril durante 1 min hasta que el agua utilizada para enjuagar alcanzó un pH 5 aproximadamente.

Enseguida se embebieron las semillas en 10 mL de PBS pH 6.8 (1.7g de K_2HPO_4 y 1.36g KH_2PO_4) con ciclohexamida (150 µg/mL), estreptomicina (250 µg/mL), tetraciclina (20 µg/mL) y fluconazol (150 µg/mL) durante 10 min a 60 rpm. Finalmente se decantó la solución y se realizaron 3 lavados con agua estéril por 1 min a 60 rpm.

Colonización de plantas

Para el ensayo de colonización de *Azospirillum* en plantas de trigo se utilizaron semillas previamente desinfectadas. Las semillas se incubaron en agar agua al 0.6% a 30°C/48h aisladas de la luz y en condiciones de atmósfera húmeda. Pasadas las 48h las semillas germinadas se colocaron en solución hidropónica y se

incubaron por 7 días en una cámara ambiental con ciclos día-noche (luz 14h/24°C y oscuridad de 10h/16°C), con una humedad de 80%.

Posteriormente se inoculó cada plántula con $1X10^7$ UFC/mL de la cepa a evaluar. Y se incubó nuevamente durante 7 días en una cámara ambiental con ciclos día-noche (luz 14h/24°C y oscuridad 10h/16°C), con 80% de humedad. Transcurrido ese tiempo se procedió a desmontar la planta de la solución hidropónica, se midió la longitud (cm) del tejido aéreo y de la raíz y se pesó únicamente la raíz (para reportar UFC/g de raíz). Finalmente se maceró la raíz con 900 µL de solución reguladora Z pH 7.4 hasta formar una pasta lo más homogénea posible y se procedió a realizar las diluciones para los ensayos de conteo de UFC/mL.

6.RESULTADOS

Comprobación de la mutante *A. brasilense* Sp245:Δ*hkh*B C.556

Para comprobar la identidad de la bacteria que se utilizaría para los ensayos propuestos se realizó una PCR a partir de una extracción de ADN genómico utilizando los cebadores R1*hsk*B-*Hind*III y F2*hsk*B-*Bam*HI. Obteniendo un amplicón de 2111 pb, coincidiendo con lo reportado por Cordero.

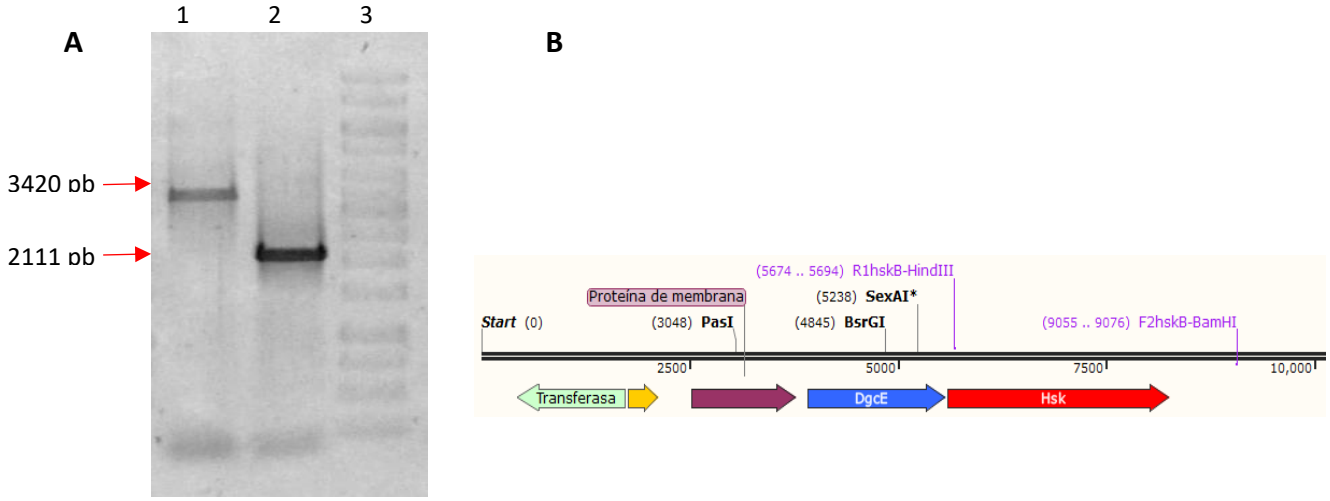

Fig. 8 A) **Electroforetograma del PCR para corroborar la mutante *A. brasilense* Sp245:*ΔhkhB* C.556.** Carril 1 *A. brasilense Sp245*, carril *2 A. brasilense Sp245:ΔhkhB C.556,* carril 3 Marcador de peso molecular 1 Kb. **B) Esquema de la región amplificada.** En rojo se observa la posición del gen *hkhB*, las etiquetas moradas muestran la posición identificada por los iniciadores

6.1. Estrés salino

Los resultados entre las cepas Wt y mutante C.556 de DO y UFC obtenidos en los ensayos de estrés salino a 150 mM, 200 mM y 300 mM de NaCl a las 18 y 20 horas de incubación no muestran diferencias significativas (Fig. 9A). Asimismo, en ensayos con las mismas concentraciones de NaCl, en un medio de cultivo que contenía la mitad de la concentración de fosfatos (7.5 mM $[PO_4]^-$), las cepas Wt y C.556 no manifiestan diferencias significativas en el crecimiento a las 18 y 20 horas (Fig. 9B).

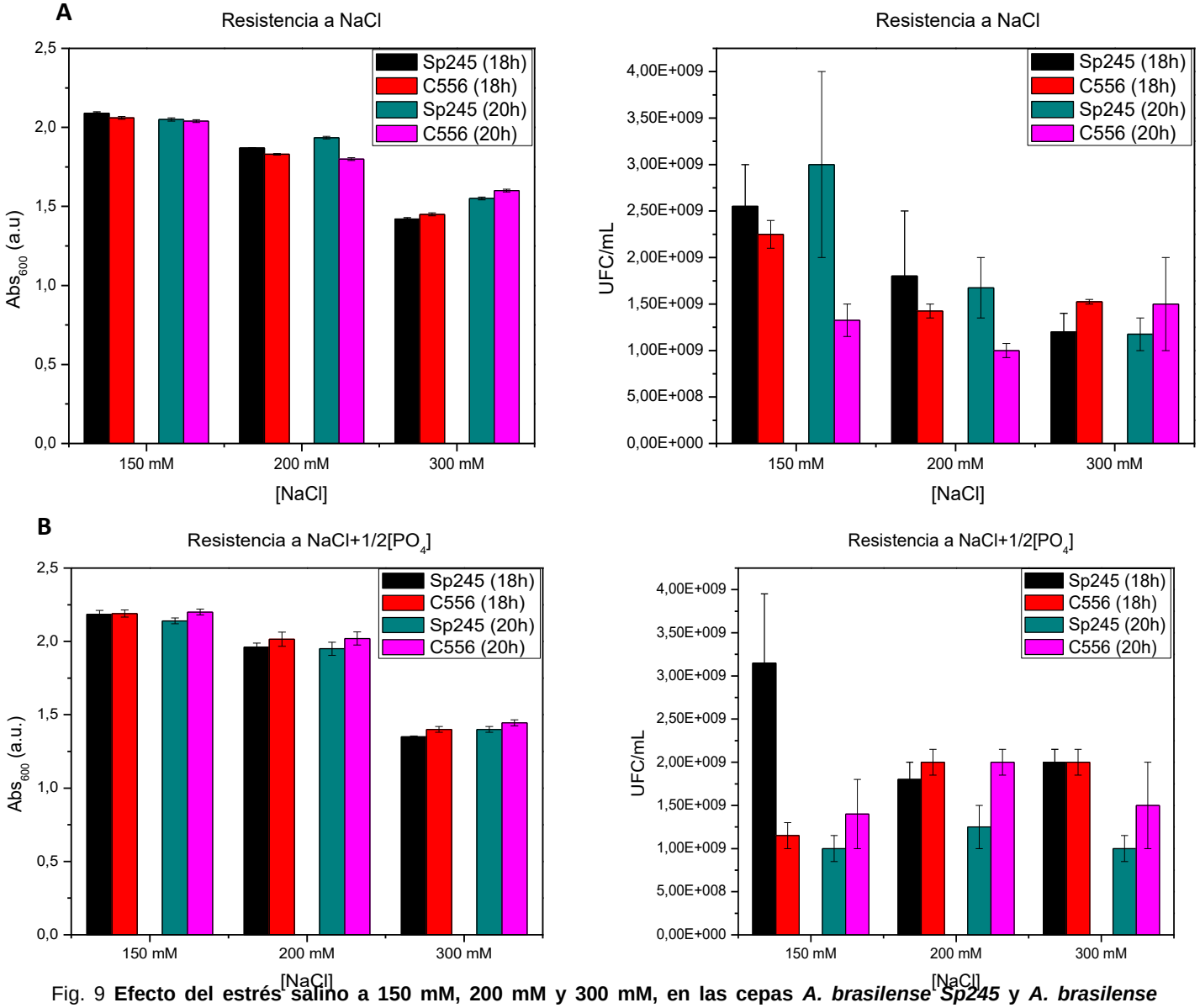

Fig. 9 **Efecto del estrés salino a 150 mM, 200 mM y 300 mM, en las cepas *A. brasilense Sp245* y *A. brasilense Sp245:ΔhkhB C.556.* A)** Crecimiento en K-malato. **B)** Crecimiento en K-malato con la mitad de la concentración de fosfatos. Los resultados son un promedio de 2 ensayos independientes, las barras de error representan la desviación estándar. El análisis estadístico se realizó mediante t-Student con valor de significancia si $P<0.05$.

6.2. Movilidad

El ensayo de movilidad se dividió en tipo swimming (Fig. 10A) con una concentración de agar suave al 0.3% y tipo swarming (Fig. 10B) con una concentración de agar suave al 0.5%. En los cuales las cepas *A. brasilense* Sp245 Wt y *A. brasilense* Sp245:Δ*hkh*B C.556 mostraron halos de desplazamiento prácticamente similares y sin diferencia significativa.

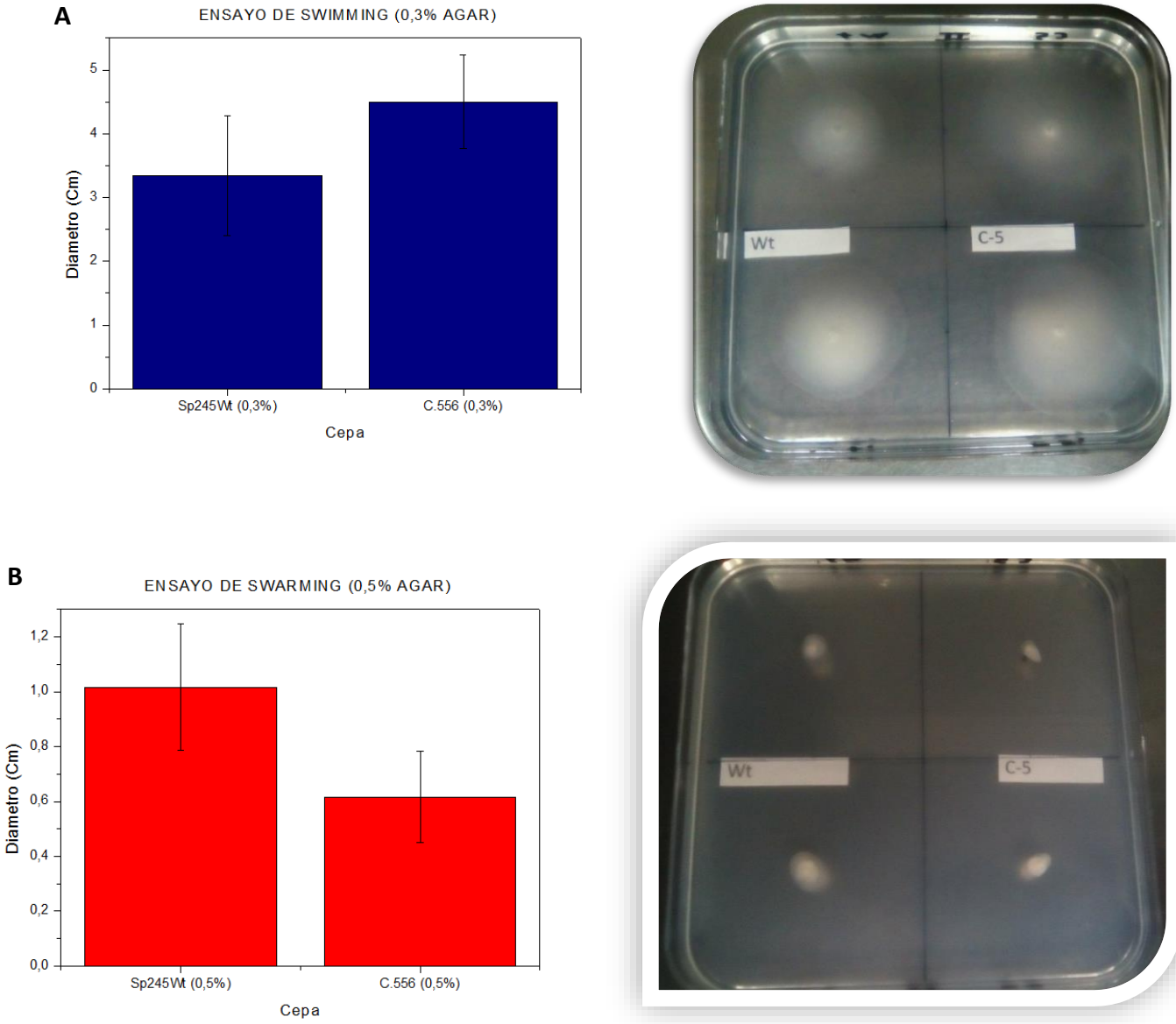

Fig. 10 **Movilidad en agar suave. A)** Movilidad tipo swimming. **B)** Movilidad tipo swarming. En cada ensayo se muestra una imagen representativa. Los resultados son un promedio de 3 ensayos independientes, las barras de error representan la desviación estándar. El análisis estadístico se realizó mediante t-Student con valor de significancia si $P<0.05$.

6.3. Colonización en plantas de trigo

Pese a contar con resultados similares en la movilidad de la cepa Wt y C.556, el ensayo de colonización al trigo era necesario para buscar indicios de posibles afectaciones en alguna de las etapas de asociación a las raíces. No obstante, la cuantificación de UFC/mL/g raíz de la mutante *A. brasilense* Sp245:Δ*hkh*B C.556 no manifestó cambios significativos en relación a la cepa silvestre *A. brasilense* Sp245 (Fig. 11). Por otro lado, se utilizaron las mismas cepas, pero marcadas con la proteína fluorescente *mCherry* para visualizar la superficie de colonización directamente en la raíz (Fig. 12).

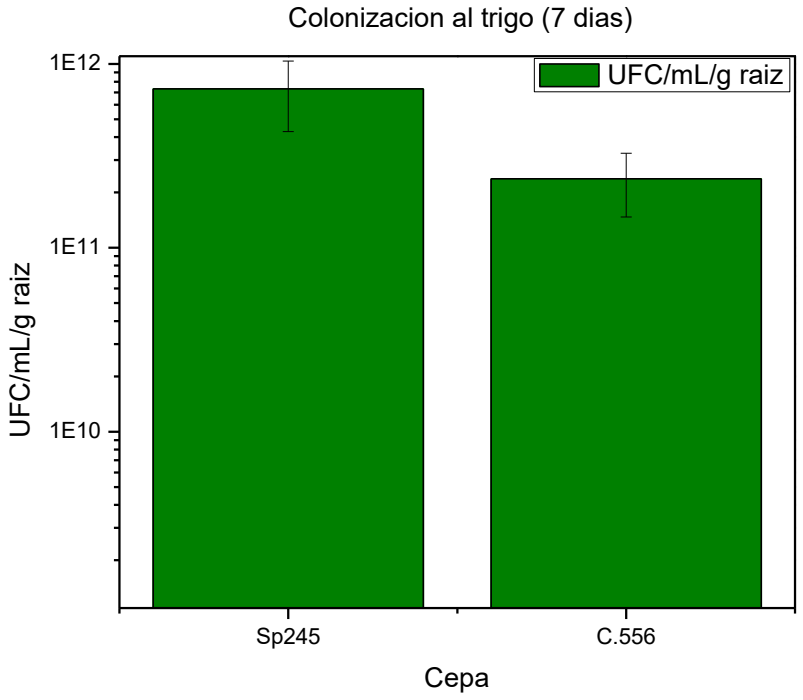

Fig. 11 **Colonización al trigo. A)** Movilidad tipo swimming. **B)** Movilidad tipo swarming. En cada ensayo se muestra una imagen representativa. Los resultados son un promedio de 3 ensayos independientes, las barras de error representan la desviación estándar. El análisis estadístico se realizó mediante t-Student con valor de significancia si $P<0.05$.

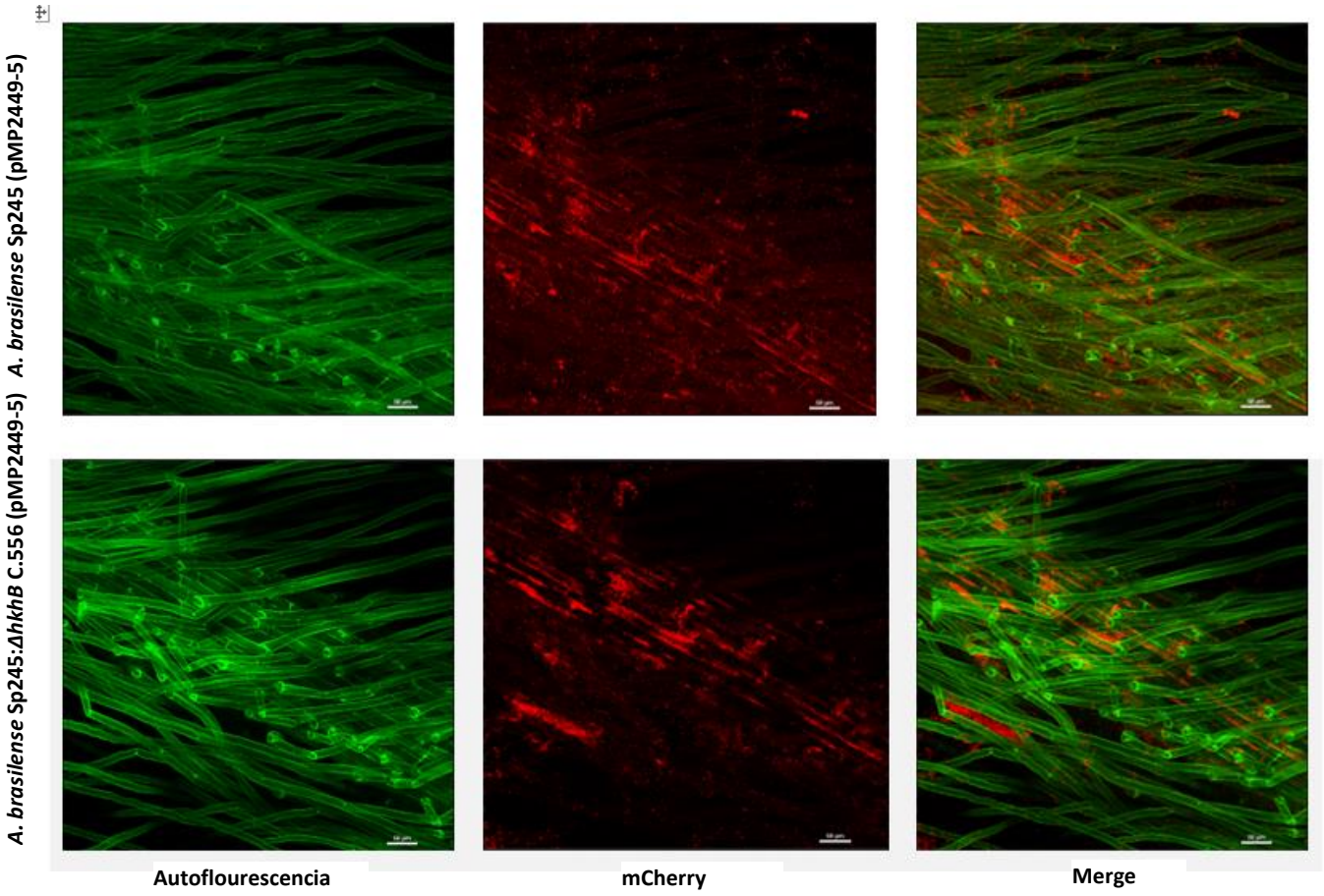

Fig. 12 Visualización de la raíz de *Triticum aestivum* var. Nana inoculada con cepas derivadas de *Azospirillum brasilense* Sp245 marcadas con proteína fluorescente mCherry. Barra de escala=50µm

7.DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este proyecto no muestran diferencias significativas entre las cepas *A. brasilense* Sp245 y *A. brasilense* Sp245:Δ*hkh*B C.556 en los ensayos de estrés salino, movilidad tipo swimming y swarming y en la colonización al trigo.

Puesto que presencia de altas concentraciones de sal (estrés salino), *A. brasilense* muestra un aumento en la producción de EPS (Chowdhury et al., 2007), para contrarrestar en gran medida los efectos inherentes del medio hipertónico en que se encuentra; podemos inferir que la nula diferencia en el crecimiento en medios de cultivo con altas concentraciones de sal de *A. brasilense* Sp245 en comparación con la mutante *A. brasilense* Sp245:Δ*hkh*B C.556 nos indica (al menos de manera

indirecta) que la vía de producción de EPS no ha sido afectada, o al menos no de manera significativa.

Evidentemente los resultados obtenidos en la movilidad tipo swimming son contrastantes con los resultados reportados por Cordero y nos indican una probable adaptación de la mutante *A. brasilense* Sp245:Δ*hkh*B C.556. Está probable hipótesis se sustenta en el ensayo bioinformático realizado por Borland en 2015 (Borland *et al*., 2015) que demostró la presencia de 129 genes que codifican para HKs, 74 HKs clásicas y 55 HKs híbridas (dos de las cuales codificadas en el probable operón en que se encuentra HkhB), y 124 genes que codifican para RRs (tres codificados en el mismo probable operón de HkhB) (Borland et al., 2015), y debido a que en la organización genética de los TCS muchos genes codificados dentro del mismo operón funcionan en la misma vía (Borland et al., 2015), una hipótesis lógica sería que al menos en este probable operón la relación HK:RR de los genes podría fomentar una comunicación cruzada (Cross-talk) entre las dos HyHKs y los tres RRs.

El término “cross-talk” se define como la comunicación entre vías que, si es eliminada, deja intactas dos vías distintas y funcionales **(Laub & Goulian, 2007)**. Tomando en cuenta las similitudes en los dominios conservados de las HKs y RRs, la comunicación cruzada puede ser introducida en el sistema a través de la heterodimerización HK-HK, heterodimerización RR-RR, así como a través de fosfotransferencia de HK-RR no relacionados. Además, la intercomunicación también puede estar mediada a través de la corregulación del mismo conjunto de genes por dos RR diferentes o por la comunicación entre dos TCSs diferentes entre sí de manera indirecta a través de una proteína auxiliar **(Agrawal *et al.*, 2016)**.

Estudios *in vivo* han reportado casos de “cross-talk” en *Escherichia coli*, donde los TCS NarX-NarL y NarQ-NarP muestran fosfotranferencia cruzada mediante heterodimerización HK-RR. NarX (HK) es preferentemente estimulada por nitrato y fosforila a NarL (RR). NarQ (HK), por otro lado, es estimulado por nitrato y nitrito y fosforila ambos RR NarL y NarP **(Noriega, *et al.,* 2010; Yoshida *et al.,* 2015)**. En *Rhodobacter capsulatus*, la HK NtrB y NtrY pueden servir como

fosfodonador para el RR NtrC, sugiriendo que la presencia de una intercomunicación es factible entre NtrB-NtrC y NtrY-NtrX **(Drepper *et al*., 2006)**. Por otra parte, estudios *in vitro* en *E. coli* han demostrado que de la cinasa VanS puede fosforilar al RR phoB, pero sólo en la ausencia de su HK phoR **(Fisher *etal.,* 1995; Silva *et al.,* 1998)**. De manera similar, la cinasa phoR actúa como fosfodonador del RR VanR, en ausencia de VanS **(Haldimann *et al.,*1997; Silva *et al*., 1998)**. En cada caso, la comunicación cruzada probablemente sea una consecuencia de la eliminación de la actividad fosfatasa normalmente proporcionada por la HK relacionada, la cual sería bifuncional.

Por lo tanto, se propone que la mutante *A. brasilense* Sp245:Δ*hkh*B C.556 sobrellevó la deleción de la HK HkhB mediante una adaptación tipo cross-talk, probablemente con la HyHKs localizada río arriba del presunto operón. Sin embargo, estudios posteriores habrán de respaldar o refutar esta afirmación, puesto que los reportes de genes de TCS que se encuentran unidos físicamente presentan funciones fisiológicas más complicadas **(Capra & Laub, 2012; Krell *et al*., 2010)**.

Finalmente, es difícil contrastar los resultados de los ensayos de colonización al trigo ya que, al no manifestar diferencias en las habilidades quimiotácticas, era poco probable que la capacidad de *A. brasilense* Sp245:Δ*hkh*B C.556 para dirigirse a la raíz del trigo se viera afectada. Aunado a esto, la gran cantidad de genes relacionados a TCS que se encuentran en el genoma de *A. brasilense* Sp245 podría sugerirnos que la colonización de la raíz no es dependiente de un solo TCS, sino de sistemas de múltiples componentes. Lo que podría permitir a la bacteria responder de una manera más precisa y versátil al entorno tan competitivo al que se encuentra expuesta.

8.CONCLUSIONES

La mutante *A. brasilense* Sp245:Δ*hkh*B C.556 probablemente sobrellevó la deleción de la HK HkhB mediante una adaptación tipo “cross-talk”, tal vez con la HyHKs localizada río arriba del presunto operón.

El gran número de genes relacionados a TCS que se encuentran en el genoma de *A. brasilense* Sp245 sugiere que la colonización de la raíz no es dependiente de un solo TCS, sino de sistemas de múltiples componentes, por lo que la mutación de un solo TCS no afecta de manera significativa la colonización.

9.PERSPECTIVAS

Realizar ensayos de competencia en la colonización a la raíz entre *A. brasilense* Sp245:Δ*hkh*B C.556 y *A. brasilense* Sp245.

Determinar la importancia de la HyHK presente río arriba de HkhB mediante remoción del gen.

Realizar ensayos de fosforrelevo para comprender la función del probable operón.

10.ANEXOS

A. Medios de cultivo (g/L)

A.1 LB* (Modificado)

Reactivo	**Cantidad (g/L)**
Peptona de caseína	10
Extracto de levadura	5
NaCl	5
$MgSO_4$ 7 H_2O	0.6
$CaCl_2$	0.37
Agar	15
pH 7 con KOH al 10%	

A.2 Rojo congo

Reactivo	**Cantidad (g/L)**
D. L. Málico	5
Extracto de levadura	0.5
K_2HPO_4	0.5
$MgSO_4$ 7 H_2O	0.2
NaCl	0.1
$FeCl_3$ 1%	1.4 ml
Na_2MoO_4 2 H_2O 0.5%	0.4 ml
Rojo Congo (1/400)	15 ml
Agar	15
pH 6.8 con KOH	

A.3 Medio mínimo K-malato

Reactivo	**Cantidad (g/L)**
KH_2PO_4	0.87
K_2HPO_4	1.67
$MgSO_4$ 7 H_2O	0.29
NaCl	0.48
D. L. Málico	4.5326
$CaCl_2$ 2 H_2O 0.7%	10 ml
pH 6.8 con KOH	

A.4 Medio mínimo para movilidad

Reactivo	**Cantidad (g/L)**
$MnSO_4$	0.025
$ZnSO_4$ 7 H_2O	0.7
$CoSO_4$ 7 H_2O	0.014
$CuSO_4$ 5 H_2O	0.0125
H_3BO_4	0.03
KH_2PO_4	0.87
K_2HPO_4	1.67
$MgSO_4$ 7 H_2O	0.29
NaCl	0.48
D. L. Málico [1]	1.3409
LB* [2]	
$CaCl_2$ 2 H_2O 0.7%	10 ml
$FeCl_3$ 1%	1 ml
Na_2MoO_4 2 H_2O 0.5%	1ml
NH_4Cl 20%	5 ml
Solución de oligoelementos	1 ml
Agar plantas	3[1] , 5[2]

[1]En ensayo de swimming

[2]En ensayos de swarming

11.REFERENCIAS

Agrawal, R., Sahoo, B. K., & Saini, D. K. (2016). Cross-talk and specificity in two-component signal transduction pathways. *Future Microbiology*, *11*(5), 685–697.

Alexandre, G. (2015). Chemotaxis in *Azospirillum*. En *Handbook for Azospirillum* (pp. 101–114). Springer International Publishing.

Appleby, J. L., Parkinson, J. S., & Bourret, R. B. (1996). Signal transduction via the multi-step phosphorelay: Not necessarily a road less traveled. *Cell*, *86*(6), 845–848.

Avalos, M. Á. (2015). Participación de la diguanilato ciclasa de *A. brasilense* en crecimiento y estrés. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, Puebla.

Babalola, O. O. (2010). Beneficial bacteria of agricultural importance. *Biotechnology Letters*, *32*(11), 1559–1570.

Baldani, V. L. D., de B. Alvarez, M. A., Baldani, J. I., & Döbereiner, J. (1986). Establishment of inoculated *Azospirillum* spp. in the rhizosphere and in roots of field grown wheat and sorghum. En F. A. Skinner & P. Uomala (Eds.), *Nitrogen Fixation with Non-Legumes: The Third International Symposium on Nitrogen Fixation with Non-*

legumes, Helsinki, 2–8 September 1984 (pp. 35–46). Dordrecht: Springer Netherlands.

Barea, J.-M., Pozo, M. J., Azcón, R., & Azcón-Aguilar, C. (2005). Microbial co-operation in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, *56*(417), 1761–1778.

Bashan, Y., & de-Bashan, L. E. (2010). How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth—A critical assessment. En *Advances in Agronomy* (Vol. 108, pp. 77–136). Elsevier.

Bashan, Y., Holguin, G., & de-Bashan, L. E. (2004). *Azospirillum* -plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). *Canadian Journal of Microbiology*, *50*(8), 521–577.

Berg, H. C. (1993). Diffusion: Microscopy Theory. En *Random Walks in Biology* (5-14). New Jersey: Princeton University Press.

Borland, S., Oudart, A., Prigent-Combaret, C., Brochier-Armanet, C., & Wisniewski-Dyé, F. (2015). Genome-wide survey of two-component signal transduction systems in the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum*. *BMC Genomics*, *16*(1).

Borland, S., Prigent-Combaret, C., & Wisniewski-Dyé, F. (2016). Bacterial hybrid histidine kinases in plant–bacteria interactions. *Microbiology*, *162*(10), 1715–1734.

Brimecombe, M. J., De Leij, F. A. A. M., & Lynch, J. M. (2007). Rhizodeposition and microbial populations. En *The Rhizosphere: Biochemistry and Organic Substances at the Soil-Plant Interface, Second Edition* (pp. 73–109). Boca Raton, Florida: CRC Press.

Buscot, F. (2005). What Are Soils? En A. Varma & F. Buscot (Eds.), *Microorganisms in Soils: Roles in Genesis and Functions* (pp. 3–17). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

Capra, E. J., & Laub, M. T. (2012). Evolution of two-component signal transduction systems. *Annual Review of Microbiology*, *66*(1), 325–347.

Cassán, F., Vanderleyden, J., & Spaepen, S. (2014). Physiological and agronomical aspects of phytohormone production by model plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) belonging to the genus *Azospirillum*. *Journal of Plant Growth Regulation*, *33*(2), 440–459.

Chang, C., & Stewart, R. C. (1998). The two-component system: Regulation of diverse signaling pathways in prokaryotes and eukaryotes. *Plant Physiology*, *117*(3), 723–731.

Cheung, J., & Hendrickson, W. A. (2010). Sensor domains of two-component regulatory systems. *Current Opinion in Microbiology*, *13*(2), 116–123.

Chowdhury, S. P., Nagarajan, T., Tripathi, R., Mishra, M. N., Le Rudulier, D., & Tripathi, A. K. (2007). Strain-specific salt tolerance and osmoregulatory mechanisms in *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiology Letters*, *267*(1), 72–79.

Cordero, C. (2017). Obtención de la mutación del gen hskB de *Azospirillum brasilense* y análisis de su fenotipo. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, Puebla.

Cui, Y., Tu, R., Wu, L., Hong, Y., & Chen, S. (2011). A hybrid two-component system protein from *Azospirillum brasilense* Sp7 was involved in chemotaxis. *Microbiological Research*, *166*(6), 458–467.

Drepper, T., Wiethaus, J., Giaourakis, D., GroÃ, S., Schubert, B., Vogt, M., … Masepohl, B. (2006). Cross-talk towards the response regulator NtrC controlling nitrogen metabolism in *Rhodobacter capsulatus*. *FEMS Microbiology Letters*, *258*(2), 250–256.

Egamberdieva, D., & Lugtenberg, B. (2014). Use of plant growth-promoting rhizobacteria to alleviate salinity stress in plants. En M. Miransari (Ed.), *Use of Microbes for the Alleviation of Soil Stresses, Volume 1* (pp. 73–96).

Fisher, S. L., Jiang, W., Wanner, B. L., & Walsh, C. T. (1995). Cross-talk between the histidine protein kinase VanS and the response regulator PhoB: characterization and identification of a vans domain that inhibits activation of PhoB. *Journal of Biological Chemistry*, *270*(39), 23143–23149.

Gallarato, L. A., Paulucci, N. S., Chiappero, J., Cesari, A. B., Reguera, Y. B., Vicario, J. C., & Dardanelli, M. S. (2015). Stress physiology in *Azospirillum* and other PGPRs. En *Handbook for Azospirillum* (pp. 319–330). Springer International Publishing.

Gamboa, A. (2014). Participación de proteínas con dominios GGDEF en crecimiento de *Azospirillum brasilense*. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, Puebla.

Glick, B. R. (1995). The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, *41*(2), 109–117.

Gray, E. J., & Smith, D. L. (2005). Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant–bacterium signaling processes. *Soil Biology and Biochemistry*, *37*(3), 395–412.

Greer-Phillips, S. E., Stephens, B. B., & Alexandre, G. (2004). An energy taxis transducer promotes root colonization by *Azospirillum brasilense*. *Journal of Bacteriology*, *186*(19), 6595–6604.

Haldimann, A., Fisher, S. L., Daniels, L. L., Walsh, C. T., & Wanner, B. L. (1997). Transcriptional regulation of the *Enterococcus faecium* BM4147 vancomycin resistance gene cluster by the VanS-VanR two-component regulatory system in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*, *179*(18), 5903–5913.

Igiehon, N. O., & Babalola, O. O. (2017). Biofertilizers and sustainable agriculture: exploring arbuscular mycorrhizal fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *101*(12), 4871–4881.

Jung, K., Fried, L., Behr, S., & Heermann, R. (2012). Histidine kinases and response regulators in networks. *Current Opinion in Microbiology*, *15*(2), 118–124.

Khorchid, A., & Ikura, M. (2006). Bacterial histidine kinase as signal sensor and transducer. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *38*(3), 307–312.

Krell, T., Lacal, J., Busch, A., Silva-Jiménez, H., Guazzaroni, M.-E., & Ramos, J. L. (2010). Bacterial sensor kinases: Diversity in the recognition of environmental signals. *Annual Review of Microbiology*, *64*(1), 539–559.

Laub, M. T., & Goulian, M. (2007). Specificity in two-component signal transduction pathways. *Annual Review of Genetics*, *41*(1), 121–145.

Loredo-Osti, C., López Reyes, L., & Espinosa Victoria, D. (2004). Plant growth-promoting bacteria in association with graminaceous species: A Review. *Terra Latinoamericana*, *22*, 225–239.

Miles, A. A., Misra, S. S., & Irwin, J. O. (1938). The estimation of the bactericidal power of the blood. *Journal of Hygiene*, *38*(06), 732–749.

Mitchell, J. G. (2002). The energetics and scaling of search strategies in bacteria. *The American Naturalist*, *160*(6), 727–740.

Moe, L. A. (2013). Amino acids in the rhizosphere: From plants to microbes. *American Journal of Botany*, *100*(9), 1692–1705.

Noriega, C. E., Lin, H.-Y., Chen, L.-L., Williams, S. B., & Stewart, V. (2010). Asymmetric cross-regulation between the nitrate-responsive NarX-NarL and NarQ-NarP two-component regulatory systems from *Escherichia coli* K-12. *Molecular Microbiology*, *75*(2), 394–412.

Paul, D. (2013). Osmotic stress adaptations in rhizobacteria: Osmotic stress adaptations in rhizobacteria. *Journal of Basic Microbiology*, *53*(2), 101–110.

Ramirez-Mata, A., Pacheco, M. R., Moreno, S. J., Xiqui-Vazquez, M. L., & Baca, B. E. (2018). Versatile use of *Azospirillum brasilense* strains tagged with egfp and

mCherry genes for the visualization of biofilms associated with wheat roots. *Microbiological Research*, *215*, 155–163.

Semmartin, M., Di Bella, C., & de Salamone, I. G. (2010). Grazing-induced changes in plant species composition affect plant and soil properties of grassland mesocosms. *Plant and Soil*, *328*(1–2), 471–481.

Silva, J. C., Haldimann, A., Prahalad, M. K., Walsh, C. T., & Wanner, B. L. (1998). In vivo characterization of the type A and B vancomycin-resistant enterococci (VRE) VanRS two-component systems in *Escherichia coli*: A nonpathogenic model for studying the VRE signal transduction pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *95*(20), 11951–11956.

Sleator, R. D., & Hill, C. (2002). Bacterial osmoadaptation: the role of osmolytes in bacterial stress and virulence. *FEMS Microbiology Reviews*, *26*(1), 49–71.

Sourjik, V., & Wingreen, N. S. (2012). Responding to chemical gradients: bacterial chemotaxis. *Current Opinion in Cell Biology*, *24*(2), 262–268.

Spaepen, S., Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., & Vanderleyden, J. (2008). Effects of *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid production on inoculated wheat plants. *Plant and Soil*, *312*(1–2), 15–23.

Thomson, B. C., Ostle, N., McNamara, N., Bailey, M. J., Whiteley, A. S., & Griffiths, R. I. (2010). Vegetation affects the relative abundances of dominant soil bacterial taxa and soil respiration rates in an upland grassland soil. *Microbial Ecology*, *59*(2), 335–343.

Vacheron, J., Desbrosses, G., Bouffaud, M.-L., Touraine, B., Moënne-Loccoz, Y., Muller, D., … Prigent-Combaret, C. (2013). Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Frontiers in Plant Science*, *4*.

Wadhams, G. H., & Armitage, J. P. (2004). Making sense of it all: bacterial chemotaxis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *5*(12), 1024–1037.

West, A. H., & Stock, A. M. (2001). Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends in Biochemical Sciences*, *26*(6), 369–376.

Yoshida, M., Ishihama, A., & Yamamoto, K. (2015). Cross talk in promoter recognition between six NarL-family response regulators of *Escherichia coli* two-component system. *Genes to Cells*, *20*(7), 601–612.