



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS
MICROBIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
LICENCIATURA EN BIOMEDICINA
EJE DE MICROBIOLOGÍA

“TyrR participa en la regulación transcripcional de la formación
de biopelícula y el catabolismo de D-alanina en *Azospirillum
brasilense* Sp7”

Tesis presentada para obtener el grado de

Licenciatura en Biomedicina

Presenta:

Diana Carolina Castro Fernández

Directora de tesis:

D.C Beatriz Eugenia Baca

Asesor Metodológico:

D.C Alberto Ramírez Mata

Puebla, Pue. Junio de 2021



BENEMERITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE MEDICINA
LICENCIATURA EN BIOMEDICINA

TESIS PROFESIONAL

“TyrR participa en la regulación transcripcional de la formación de biopelícula y el catabolismo de D-alanina en *Azospirillum brasilense* Sp7”

PARA OBTENER EL TITULO DE:

Licenciada en Biomedicina

PRESENTA:

Diana Carolina Castro Fernández

DIRECTORA EXPERTA:

D.C Beatriz Eugenia Baca

DIRECTOR METODOLÓGICO:

D.C Alberto Ramírez Mata

REVISORA:

D.C Sandra Raquel Reyes Carmona

REVISORA:

D.C Claudia Fabiola Martínez de la Peña

Puebla, Pue. 2021

Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, ICUAP

Agradecimientos.

Agradezco a la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, mi alma máter, que me abrió las puertas y me permitió vivir estos cinco años al máximo, además de que me dio la oportunidad de extender mis horizontes al otorgarme la beca de intercambio académico, lo que me permitió conocer otro continente y otra cultura.

Agradezco al laboratorio de Interacción Bacteria-Planta del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, donde conocí a muchas personas increíbles. Especialmente a mi asesora de tesis, la Dra. Beatriz Eugenia Baca a quien le agradezco que con mucha paciencia dirigió y se comprometió con mi proyecto, me apoyo, me compartió sus conocimientos y me dio la oportunidad de pertenecer a su grupo de trabajo. Extiendo mis agradecimientos al Dr. Alberto Ramírez Mata, a la Dra. Sandra Raquel Reyes Carmona y a la Q.F.B. Ma. Luisa Xiqui Vázquez quienes fueron mis mentores, me brindaron apoyo, comprensión, uno que otro regaño, pero sobre todo mucho cariño en mi estancia en el laboratorio. Al Dr. Saúl Jijón Moreno, quien cuando llegué al laboratorio me enseñó y me aconsejó con mucha paciencia, la cual puse a prueba muchas veces, además de que me permitió conocerlo y tratarlo más que como a un maestro, como a un amigo. A Ibelith Cosme Herrera y Daniel Sierra Cacho, quienes hicieron la función de “hermanos mayores” en el laboratorio, siempre que necesitábamos un consejo o su ayuda, no dudaron en apoyarnos. Agradezco también a todas las personas que conocí en el laboratorio, cada una fue especial e hicieron que mi tiempo ahí fuera increíble.

A mis compañeros del eje de microbiología y del eje básico, tuve mucha suerte en poder conocerlos a cada uno de ustedes. Gracias Brenda y Keyla por ser mis consejeras y amigas en la universidad. Especialmente quiero dedicar mi trabajo a Diana Elizabeth Hernández Ceron; Dianita, tu vocación está en cada uno de los compañeros que tuvimos la dicha de coincidir contigo.

A Christopher Navarro Martínez, quien fue mi compañero no solo de clases, si no, de aventuras. Agradezco que hayas dicho “sí” a todas las locuras en las que te involucre, gracias por las pláticas y los consejos.

De la misma forma agradezco a todos los profesores que he tenido a lo largo de mi trayectoria académica. Que me han ayudado a dar cada paso de este recorrido.

Agradezco también a mis padres, Diana Beatriz Fernández Martínez y Enrique Gerardo Castro Hermida, por haberme cuidado y guiado en cada momento, les doy las gracias por todo el esfuerzo que hicieron por darnos la mejor educación a mi hermano y a mí. Espero poder seguir su ejemplo y algún día poder guiar a mis hijos de la misma forma.

A mi hermano, Luis Enrique Castro Fernández, quien es mi principal ejemplo, mi amigo, mi maestro y mi cómplice en todo, eres la persona que más me conoce.

Agradezco el poder compartir parte de mi vida contigo y te doy las gracias por ser siempre el que abre paso a lo desconocido, me has dado muchas lecciones y sin duda eres la persona de la que más he aprendido.

Les doy las gracias a mi familia. A mis abuelos, que siempre han visto por mí y me han procurado. A mis tías, especialmente a mi tía Consuelo que me ha llenado de mucho amor desde que tengo memoria.

A mis amigos, con quienes he compartido momentos de felicidad a lo largo de mi trayectoria. Especialmente a Ana Cristina Gutiérrez Carrillo e Imelda Guadalupe Fonseca Romero, que son mis mejores amigas y nunca han dudo en darme una mano cuando la necesito.

A Jesús Gamero Méndez, gracias por haber hecho la función de “patito de goma” mientras yo elaboraba este trabajo. Muchas gracias por tu paciencia al escucharme, agradezco también tu cariño y tu atención, gracias por ser un apoyo incondicional. De la misma forma, jamás dejare de agradecerle a la vida el que te convirtieras en mi destino, nos esperan muchas cosas juntos, y poco a poco estamos construyendo la base para nuestro futuro. Como dice el mismísimo Muntz: ¡La aventura nos aguarda!

“Si he logrado ver más lejos, ha sido porque he subido a hombros de gigantes”

-Isaac Newton

Esta frase se utiliza para hacer un reconocimiento agradecido y entrañable a las personas que han marcado pautas o abierto caminos en nuestras vidas. Por lo que solo me queda decirles, desde el corazón, ¡muchas gracias! a todos los “gigantes” que han estado en mi vida y por los que ahora soy la persona que actualmente soy.

Índice.

1. Resumen.....	1
2. Introducción.....	2
2.2 Genero <i>Azospirillum</i>	2
2.3 Interacción Planta-Microorganismo.....	3
2.4 Biosíntesis del Ácido Indol Acético (AIA).....	4
2.4.1 Vía de indol-3-acetamida (IAM).....	4
2.4.2 Vía del indol-3-acetonitrilo/ Vía de indol-acetaldoxima (IAN/IAOx).....	5
2.4.3 Vía del ácido indol-3-pirúvico (IPyA).....	5
2.4.4 Papel del AIA como molécula señal.....	6
2.5 Transcripción en procariontes.....	7
2.5.1 Transcripción por σ -54.....	7
2.6 Proteínas de unión potenciadoras bacterianas (Enhancer Binding Proteins).....	8
2.7 Factor de transcripción represor de tirosina (TyrR).....	10
2.8 Formación de Biopelícula.....	11
2.9 Quimiotaxis.....	13
3. Antecedentes.....	16
3.1 Antecedentes Generales.....	16
3.2 Antecedentes específicos.....	17
4. Justificación.....	22
5. Hipotesis.....	22
6. Objetivos.....	22
6.1 Objetivo General.....	22
6.2 Objetivos Específicos.....	22
7. Materiales y Métodos.....	23
7.1 Material Biológico.....	23
7.2 Técnicas y procedimientos.....	24
7.2.1 Condiciones de cultivo.....	24
7.2.2 Extracción y manipulación de ADN.....	24
7.2.3 Complementación de la mutante <i>A. brasilense</i> 2116.....	24
7.2.4 Curvas de crecimiento bacterianas.....	25
7.2.5 Cuantificación de la unión de Rojo Congo a los EPS.....	25

7.2.6 Análisis bioinformáticos.....	25
8. Resultados.....	27
8.1 Análisis bioinformático de las secuencias consenso para presuntos sitios de unión de TyrR en el genoma de <i>A. brasilense</i> Sp7.....	27
8.2 Crecimiento de las cepas 2116, 2117 y 2118 con D-alanina como única fuente de carbono y nitrógeno.....	28
8.3 Alteración en la síntesis de EPS.....	30
8.4 Selección y análisis de genes para los que se realizó diseño de iniciadores.....	31
8.4.1 Criterios a tomar en cuenta para el diseño de los iniciadores.....	32
8.4.2 Análisis de la región río arriba del gen que codifica para una proteína cinasa histidínica.....	33
8.4.3 Diseño de iniciadores y simulación de la construcción en el vector pRU1156 para la región río arriba del gen <i>AMK58_RS03745</i>	34
8.4.4 Análisis de la región río arriba del gen que codifica para una proteína implicada en quimiotaxis CheY.....	35
8.4.5 Diseño de iniciadores y simulación de la construcción en el vector pRU1156 para la región río arriba del gen <i>AMK58_RS03835</i>	36
8.4.6 Análisis de la región río arriba del gen que codifica para una proteína receptora de quimiotaxis.....	38
8.4.7 Diseño de iniciadores y simulación de la construcción en el vector pRU1156 para la región río arriba del gen <i>AMK58_RS04510</i>	39
8.4.8 Análisis de la región río arriba del gen que codifica para una proteína con dominio adenilato/guanilato ciclasa.....	40
8.4.9 Diseño de iniciadores y simulación de la construcción en el vector pRU1156 para la región río arriba del gen <i>AMK58_RS04755</i>	41
8.4.10 Análisis de la región río arriba del gen que codifica para una proteína con dominio de autotransporte.....	43
8.4.11 Diseño de iniciadores y simulación de la construcción en el vector pRU1156 para la región río arriba del gen <i>AMK58_RS22560</i>	44
8.4.12 Análisis de la región río arriba del gen que codifica para una proteína de transporte de hierro ferroso A.....	45
8.4.13 Diseño de iniciadores y simulación de la construcción en el vector pRU1156 para la región río arriba del gen <i>AMK58_RS14355</i>	46
8.4.14 Análisis de la región río arriba del gen que codifica para una proteína glucosiltransferasa.....	48

8.4.15 Diseño de iniciadores y simulación de la construcción en el vector pRU1156 para la región río arriba del gen <i>AMK58_RS12430</i>	48
8.4.16 Análisis de la región río arriba del gen que codifica para una proteína fijadora de calcio.	50
8.4.17 Diseño de iniciadores y simulación de la construcción en el vector pRU1156 para la región río arriba del gen <i>AMK58_RS11295</i>	51
8.4.18 Análisis de la región río arriba del gen que codifica para una proteína de la familia OmpA.....	52
8.4.19 Diseño de iniciadores y simulación de la construcción en el vector pRU1156 para la región río arriba del gen <i>AMK58_RS106745</i>	53
9. Discusión.....	55
10. Conclusiones.....	59
11. Bibliografía.	59
12. Anexos.	66
12.1 Medios de cultivo.	66
12.2 Mapa físico de la construcción pBSK-tyrR-Sp7.....	68
12.3 Mapa físico de la construcción pJB3-tyrR-Sp7.....	69
12.4 Contexto genético de los genes analizados para la posterior selección....	69

Índice de Figuras

Figura 1. Vías de síntesis del ácido-3-indol acético.....	6
Figura 2. Conformación de los dominios de los cinco grupos (grupos I-V) de las bEBPs.....	9
Figura 3. Formación de la biopelícula.....	12
Figura 4. La vía de la quimiotaxis en <i>E. coli</i>	14
Figura 5. Agrupación de genes implicados en la quimiotaxis dentro del genoma de <i>A. brasilense</i>	15
Figura 6. Unión de la proteína purificada TyrR al promotor del gen <i>ipdC</i> en presencia de aminoácidos aromáticos.	16
Figura 7. Región del extremo 5' de <i>ipdC</i> de <i>A. brasilense</i> Sp7.....	17
Figura 8. Predicción bioinformática de los dominios de TyrR de <i>A. brasilense</i> Sp7 y alineamiento múltiple con proteínas homólogas.	19
Figura 9. Construcción de la mutante 2116.	21
Figura 10. Vector pRU1156.....	26
Figura 11. Secuencias de los elementos <i>cis</i> contenidos en la región promotora intergénica de los genes <i>tyrR</i> y <i>dadA</i> de <i>A. brasilense</i> Sp7.	27
Figura 12. Homología con respecto a la secuencia consenso de la caja TyrR de <i>E. coli</i> de las cajas TyrR de la región intergénica entre el gen <i>tyrR</i> y <i>dadA</i> en <i>A. brasilense</i> Sp7.	28
Figura 13. Curvas de crecimiento de las cepas <i>A. brasilense</i> Sp7, 2116, 2117 y 2118.....	29
Figura 14. Cultivo de la cepa silvestre de <i>Azospirillum brasilense</i> Sp7 y la mutante <i>A. brasilense</i> 2116.	29
Figura 15. Cuantificación de la unión de RC a los EPS de las cepas <i>Azospirillum brasilense</i> Sp7, 2116 y 2117.....	30
Figura 16. Contexto genético y región río arriba del gen que codifica para una proteína cinasa histidínica.....	33
Figura 17. Simulación de la construcción del vector con el amplificado para el estudio de la región promotora del gen <i>AMK58_RS03745</i>	34
Figura 18. Simulación de gel de agarosa al 1.2% de los cortes enzimáticos para la comprobación de la construcción.	35
Figura 19. Contexto genético y región río arriba del gen que codifica para una proteína implicada en quimiotaxis CheY..	36
Figura 20. Simulación de la construcción del vector con el amplificado para el estudio de la región promotora del gen <i>AMK58_RS03835</i>	37
Figura 21. Simulación de gel de agarosa al 1.2% de los cortes enzimáticos para la comprobación de la construcción.	37
Figura 22. Contexto genético y región río arriba del gen que codifica para una proteína implicada receptora de quimiotaxis.	38
Figura 23. Simulación de la construcción del vector con el amplificado para el estudio de la región promotora del gen <i>AMK58_RS04510</i>	39

Figura 24. Simulación de gel de agarosa al 1.2% de los cortes enzimáticos para la comprobación de la construcción.	40
Figura 25. Contexto genético y región río arriba del gen que codifica para una proteína con dominio adenilato/guanilato ciclasa.	41
Figura 26. Simulación de la construcción del vector con el amplificado para el estudio de la región promotora del gen <i>AMK58_RS04755</i>	42
Figura 27. Simulación de gel de agarosa al 1.2% de los cortes enzimáticos para la comprobación de la construcción.	42
Figura 28. Contexto genético y región río arriba del gen que codifica para una proteína con dominio de autotransporte.	43
Figura 29. Simulación de la construcción del vector con el amplificado para el estudio de la región promotora del gen <i>AMK58_RS22560</i>	44
Figura 30. Simulación de gel de agarosa al 1.2% de los cortes enzimáticos para la comprobación de la construcción.	45
Figura 31. Contexto genético y región río arriba del gen que codifica para una proteína con dominio de transporte de hierro ferroso A.	46
Figura 32. Simulación de la construcción del vector con el amplificado para el estudio de la región promotora del gen <i>AMK58_RS14355</i>	47
Figura 33. Simulación de gel de agarosa al 1.2% de los cortes enzimáticos para la comprobación de la construcción.	47
Figura 34. Contexto genético y región río arriba del gen que codifica para una proteína glucosiltransferasa.	48
Figura 35. Simulación de la construcción del vector con el amplificado para el estudio de la región promotora del gen <i>AMK58_RS12430</i>	49
Figura 36. Simulación de gel de agarosa al 1.2% de los cortes enzimáticos para la comprobación de la construcción.	49
Figura 37. Contexto genético y región río arriba del gen que codifica para una proteína fijadora de calcio.	50
Figura 38. Simulación de la construcción del vector con el amplificado para el estudio de la región promotora del gen <i>AMK58_RS11295</i>	51
Figura 39. Simulación de gel de agarosa al 1.2% de los cortes enzimáticos para la comprobación de la construcción.	52
Figura 40. Contexto genético y región río arriba del gen que codifica para una proteína de la familia OmpA.	53
Figura 41. Simulación de la construcción del vector con el amplificado para el estudio de la región promotora del gen <i>AMK58_RS06745</i>	54
Figura 42. Simulación de gel de agarosa al 1.2% de los cortes enzimáticos para la comprobación de la construcción.	54

Índice de tablas

Tabla 1. Cepas utilizadas para la elaboración de este trabajo.....	23
Tabla 2. Plásmidos utilizados para la elaboración de este trabajo.	23
Tabla 3. Oligonucleótidos usados en fase experimental.	23
Tabla 4. Análisis de los genes elegidos para diseño de iniciadores.	32
Tabla 5. Información de los iniciadores diseñados para la amplificación de la región río arriba del gen <i>AMK58_RS03745</i>	34
Tabla 6. Información de los iniciadores diseñados para la amplificación de la región río arriba del gen <i>AMK58_RS03835</i>	36
Tabla 7. Información de los iniciadores diseñados para la amplificación de la región río arriba del gen <i>AMK58_RS04510</i>	39
Tabla 8. Información de los iniciadores diseñados para la amplificación de la región río arriba del gen <i>AMK58_RS04755</i>	41
Tabla 9. Información de los iniciadores diseñados para la amplificación de la región río arriba del gen <i>AMK58_RS22560</i>	44
Tabla 10. Información de los iniciadores diseñados para la amplificación de la región río arriba del gen <i>AMK58_RS14355</i>	46
Tabla 11. Información de los iniciadores diseñados para la amplificación de la región río arriba del gen <i>AMK58_RS12430</i>	48
Tabla 12. Información de los iniciadores diseñados para la amplificación de la región río arriba del gen <i>AMK58_RS11295</i>	51
Tabla 13. Información de los iniciadores diseñados para la amplificación de la región río arriba del gen <i>AMK58_RS06745</i>	53

Abreviaturas.

AAT: Aminotransferasa aromática
ACT: Aspartato quinasa, Corismato mutasa
ACF: Funciones alternativas celulares
ADN: Ácido desoxirribonucleico
ARN: Ácido ribonucleico
AIA: Ácido Indol-3-Acético
Ap: Ampicilina
ATP: Trifosfato de adenosina
AuxRE: Elemento de respuesta a auxinas
bEBP: Proteínas de unión potenciadoras bacterianas
CTAB: Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
CHASE: Dominio de proteínas extracelular sensor en quimiotaxis
CYCc: Dominio catalítico adenilil/guanilil ciclasa.
di-GMP-c: 3'5 diguanosin-monofosfato-cíclico
DAO: D-aminoácido deshidrogenasa
DO: Densidad Óptica
eDNA: ADN exógeno
EBP: Proteínas de unión potenciadoras
EMSA: Ensayo de cambios en la corrida electroforética
EPS: Exopolisacaridos
FHA: Dominio asociado a la horquilla
Gm: Gentamicina
HAMP: Dominio presente en cinasas histidínicas, adenilciclasas, proteínas aceptadoras de metilo y fosfatasas
HTH: Hélice vuelta hélice
HK: Histidin cinasa
IAM: Indol-3-acetamida
IAN: Indol-3-acetonitrilo
IAOx: Indol-acetaldoxima
IPA: Ácido Indol-3-Pirúvico
Km: Kanamicina
LB: Luria Bertani
MA: Dominios transductores de señales de quimiotaxis
MCP: Proteína aceptadora de metilo
MCS: Sitio múltiple de clonación
mL: Mililitros
ORF: Marco de lectura abierto
PAS: Per, ARNT y Sim. Dominio detector que une luz, oxígeno, sustancias redox.
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
PIA: Adhesina intracelular polisacárida
PiIZ: Proteínas cuyo dominio une al di-GMP en el dominio PiIZ
PGPR: Rizobacteria Promotora del Crecimiento de la Planta
PHB: Poli-β-hidroxibutirato
pH: Potencial de Hidrogeno
PPDC: Fenilpiruvato descarboxilasa

RC: Rojo Congo
REC: Dominio involucrado en regulación de respuesta
RR: Regulador de respuesta
SPE: Sustancias Poliméricas Extracelulares.
TAM: Triptamina
TF: Factores de transcripción
Tc: Tetraciclina
Tm: Temperatura de hibridación
UAS: Sitios de reconocimiento específico potenciador
V4R: Vinil 4 Reductasa
XylR-N: Dominio detector de azúcar

1. Resumen.

En la búsqueda de resolver los problemas que se le han prestado a la producción agrícola, donde se ha creado una dependencia al uso de insumos químicos, se ha optado por la alternativa de desarrollar prácticas agrícolas sostenibles, basadas en prácticas conservacionistas dentro de un marco de sostenibilidad ambiental. En este sentido, el uso de inoculantes microbianos juega un papel clave, ya que estos influyen de forma positiva en el crecimiento de las plantas. Entre los microorganismos que confieren este beneficio encontramos al grupo de bacterias, íntimamente ligadas a la rizosfera, que se les conoce como Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR's Plant Growth Promoting Rhizobacteria, acrónimo del inglés). Las bacterias pertenecientes al género *Azospirillum* son unas de las PGPR's más estudiadas y comercializadas por tener una notable capacidad benéfica en las plantas. Los principales beneficios que *Azospirillum* confiere a la planta se atribuyen a su capacidad de fijar nitrógeno y de sintetizar fitohormonas, principalmente el ácido indol-3-acético (AIA).

La colonización es de gran importancia para *Azospirillum*, ya que será un proceso necesario para que se pueda generar el efecto benéfico. A fin de que se lleve a cabo una buena colonización de la superficie de la raíz de la planta, la bacteria dependerá de la formación de biopelícula. Este trabajo es parte de una investigación de la compleja red de reguladores transcripcionales en *Azospirillum*, donde se evalúa al factor transcripcional TyrR de *A. brasilense* Sp 7, el cual tiene un papel importante en la regulación de genes esenciales en la biosíntesis, transporte y degradación de aminoácidos aromáticos. Empleando una cepa carente de dicha proteína y mediante análisis de distintos fenotipos, como son el crecimiento con diferentes fuentes de carbono y nitrógeno, y el estudio de la producción de biopelícula, se elucida el papel que TyrR desempeña en el modelo de estudio.

Los estudios estructurales de la proteína TyrR, exhibieron una alta homología con respecto a proteínas TyrR de otras bacterias. De forma relevante se identificó el motivo GAFTGA dentro del dominio central, el cual es indispensable para la activación dependiente de σ -54. Los análisis de los fenotipos, que abarcaron el estudio de la mutante 2116 que es deficiente de *tyrR* y de la cepa complementada 2117, indicaron que el factor transcripcional TyrR está involucrado en la producción de biopelícula y es responsable de la utilización de D-alanina como única fuente de carbono y el consumo parcial de este aminoácido como única fuente de nitrógeno.

Además, con el trabajo hecho por bioinformática se observaron las secuencias de los promotores putativos en el genoma de *A. brasilense* Sp 7, que posteriormente ubicamos y con esto suponer que genes pudiesen ser regulados por TyrR. Dichos resultados cimientan las bases para trabajos experimentales futuros.

2. Introducción.

Continuamente la agricultura se enfrenta con nuevos desafíos, muchos de estos son producto de afecciones causadas por parte de las actividades humanas, ya que hemos abusado de los recursos naturales, explotándolos y haciéndolos desgastarse. Por ello se sugiere darle un nuevo enfoque a la agricultura desde una variable más sustentable que sea amigable con el ambiente. En este sentido, se ha visto como una alternativa viable a la actividad agrícola con los principios de la agroecología, lo que hará de ésta una actividad sostenible y altamente productiva.

Se define a la agroecología como “*la aplicación de conceptos y principios ecológicos para el diseño y manejo de agroecosistemas sostenibles*”, ésta proporciona la manera de hacer a la agricultura una actividad ambientalmente afable y con una productividad alta. Entre los principios básicos que se fomenta promover, se encuentra la mejora de la biodiversidad y el fortalecimiento de las regulaciones biológicas (Gliessman-Stephen, 2002; Pedraza *et al.*, 2020).

Se buscan aplicar principios que orienten a mejorar la calidad del suelo, entre estos se encuentra productos que utilizan microorganismo como son: los biofertilizantes, bioestimuladores o bioplaguicidas. La alteración de la rizosfera por inoculación de microorganismos es una de las tecnologías agrícolas modernas que están innovando, ya que influyen de forma positiva en el crecimiento de las plantas. Entre los microorganismos que confieren este beneficio encontramos a bacterias que se les conoce como Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR's Plant Growth Promoting Rhizobacteria, acrónimo del inglés) (Pedraza *et al.*, 2020).

Varios son los efectos que los microorganismos tienen sobre la calidad del suelo, entre estos podemos mencionar: mejora de la disponibilidad de nutrientes, descomposición de sustancias tóxicas, producción de hormonas por las que inducen el crecimiento de las plantas, principalmente por el ácido indol-3-acético (AIA) y finalmente, aumentan la tolerancia de las plantas al estrés (Pedraza *et al.*, 2020).

Se han descrito diferentes géneros de bacterias como PGPR's entre ellos: *Arthrobacter*, *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Caulobacter*, *Chromobacterium*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Micrococcous*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* y *Serratia* (Ahemad & Kibret, 2014).

El género *Azospirillum* es uno de los más estudiados y comercializados por tener una notable capacidad benéfica en las plantas.

2.2 Genero *Azospirillum*.

En 1925 se describe por primera vez el género *Spirillum*, décadas después se reclasificó como *Azospirillum*, por su habilidad de fijar el nitrógeno atmosférico, este

género fue descrito y reportado por el grupo de la D.C Johanna Döbereiner en 1970 (Tarrand *et al.*, 1978).

Este género pertenece a la subclase alfa de las proteobacterias, es una bacteria de vida libre, fijadora de nitrógeno, heterótrofa, polimórfica (encontrada comúnmente en forma vibroide), es Gram negativa, catalasa, y oxidasa positiva, micro aeróbica, flagelada, puede formar quistes, su movilidad es en espiral y contiene cantidades elevadas de poli- β -hidroxibutirato (PHB). Su temperatura óptima de crecimiento es de 30 °C, con un pH entre 6.0 y 7.0. Una de las características fenotípicas por la que podemos distinguir con facilidad a *Azospirillum* es el color rojo escarlata que toman las colonias al crecer en un medio adicionado del colorante Rojo Congo (Young *et al.* 1992; Döbereiner 1992; Okon *et al.*, 1976; Rodríguez-Cáceres 1982; Caballero Mellado 2010).

En el medio ambiente, es muy común encontrar a *Azospirillum* en regiones tropicales, subtropicales y templadas; la mayoría de las especies se han descrito a partir de raíces de plantas y muestras de suelo (Pedraza *et al.*, 2020).

En la base de datos bioinformáticas NCBI, se reconocen 24 especies del género *Azospirillum*: *A. agrícola*, *A. baldaniorum*, *A. brasilense*, *A. canadense*, *A. doebereineriae*, *A. fermentarium*, *A. formosense*, *A. halopraeferens*, *A. himalayense*, *A. humicireducens*, *A. largimobile*, *A. lipoferum*, *A. melinis*, *A. oleiclasticum*, *A. oryzae*, *A. palatum*, *A. palustre*, *A. picis*, *A. ramasamyi*, *A. rugosum*, *A. soli*, *A. thermophilum*, *A. thiophilum*, *A. zea*.

La mayoría de los estudios que involucran las interacciones de *Azospirillum* con el crecimiento vegetal se basan en *Azospirillum brasilense*.

2.3 Interacción Planta-Microorganismo.

En las bacterias del género *Azospirillum* la colonización a la planta es un proceso de gran importancia. Puesto que los compuestos orgánicos y el oxígeno pueden limitar el crecimiento de la bacteria, y las raíces de las plantas producen gradientes de ambos factores. Por ello se necesita de la formación de una relación endosimbiótica, para esto, la bacteria cuenta con varios mecanismos que le ayudarán a realizar este proceso (Cassán *et al.*, 2015).

Una asociación planta-microorganismo es exitosa si la bacteria es capaz de sobrevivir al suelo y alcanzar poblaciones significativas en las raíces del huésped. Para que se lleve a cabo una buena colonización de la superficie de la raíz de la planta, la bacteria dependerá de su motilidad activa y la quimiotaxis hacia los exudados de las raíces, compuestos por quimioatrayentes y sustancias propiciadoras del crecimiento microbiano. *Azospirillum* tiene la capacidad de invadir las raíces, hay algunas diferencias cepa-especificas en la forma en que colonizan la raíz, algunas cepas tienen determinados mecanismos para interactuar con las raíces y colonizar incluso el interior de la raíz, mientras que otras, colonizan la capa

más externa de la raíz (Steenhoudt & Vanderleyden, 2000; Bashan & Levanony, 1991; Zhulin & Armitage, 1992).

La unión de *Azospirillum* a las raíces es esencial para una asociación eficaz con la planta. Se ha demostrado que la colonización de *Azospirillum* es un proceso difásico en el que durante la primera fase las bacterias se adsorben como células individuales, de forma rápida, débil y reversible, a esta se le conoce como fase de adsorción. De forma consecutiva es seguida por la fase de anclaje, en la que se forman agregados celulares (biopelícula), los cuales se adhieren de forma firme e irreversible, aquí se presenta la producción de sustancias poliméricas extracelulares (Steenhoudt & Vanderleyden, 2000).

De la misma forma, como ya se mencionó anteriormente, la planta se ve beneficiada por la interacción que forma con el microorganismo ya que las bacterias de la rizosfera que son capaces de fijar nitrógeno pueden mejorar la productividad de las plantas tanto por estimulación hormonal como por suministro de nitrógeno, la producción de la fitohormona ácido indol-3-acético (AIA) es de los principales responsables de los efectos observados sobre el crecimiento de la planta (Tien *et al.*, 1979).

2.4 Biosíntesis del Ácido Indol Acético (AIA).

Entre las bacterias que habitan la rizosfera la producción de la fitohormona ácido indol-3-acético es muy extendida. Estas bacterias utilizan más de una vía para la biosíntesis del AIA, en algunos casos una misma cepa puede utilizar más de una vía. El AIA microbiano ha sido relacionado con la estimulación del crecimiento o la patogénesis de las plantas. Entre los géneros bacterianos que brindan beneficio a las plantas a través de la producción de AIA se incluyen miembros de los géneros *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas* y *Rhizobium*, así como *Alcaligenes faecalis*, *Enterobacter cloacae*, *Acetobacter diazotrophicus* y *Bradyrhizobium japonicum*. Las vías biosintéticas generalmente se clasificarán según sus intermediarios (Patten & Glick, 1996).

La biosíntesis de esta molécula puede ser dependiente del triptófano o independiente del triptófano. Se han postulado cuatro diferentes vías que utilizan al triptófano como un precursor en bacterias del género *Azospirillum*: vía del ácido indol-3-pirúvico (IPA), vía de la indol-3-acetamida (IAM), vía del indol-3-acetonitrilo (IAN) y vía de la triptamina (TAM) (Carreño-Lopez *et al.*, 2000; Prinsen *et al.*, 1993).

2.4.1 Vía de indol-3-acetamida (IAM).

En esta vía el AIA es producido por dos pasos, a partir de la molécula de L-Triptófano pasa a convertirse en el precursor Indol-3-acetamina (IAM) por la enzima triptófano-2-monooxigenasa, en esta reacción el oxígeno molecular y el triptófano reaccionan para producir indol-3-acetamina, CO₂ y H₂O. El proceso continúa con la conversión de Indol-3-acetamina a ácido indol-3-acético catalizado por la enzima Indolacetamida hidrolasa/amilasa, que hidroliza la indol-3-acetamida y produce

ácido indol-3-acético y amoníaco. El reconocimiento de la utilización de esta vía en bacterias se basa en la identificación química del precursor IAM, la producción de AIA después de alimentar a las células bacterianas con IAM o la incorporación del carbono radiactivo del triptófano en IAM e AIA (Duca *et al.*, 2014; Manulis *et al.*, 1994; Comai & Kosuge 1980).

2.4.2 Vía del indol-3-acetonitrilo/ Vía de indol-acetaldoxima (IAN/IAOx).

La producción del indol-3-acetonitrilo para la síntesis de AIA se presenta gracias a que los nitrilos se hidrolizan directamente a sus ácidos correspondientes por la acción de nitrilasas específicas o se pueden catabolizar mediante un proceso que implica la conversión a una amida y posteriormente la hidrólisis de dicha amida a un ácido. Para esto, la reacción de conversión del precursor al producto final implica la conversión de triptófano a indol-3-acetaldoxima por la enzima oxidorreductasa, de manera siguiente el intermediario indol-3-acetaldoxima se convierte en indol-3-acetonitrilo mediante una indolacetaldoxima deshidratasa, este intermediario se convierte en AIA de dos formas: En un solo paso por una enzima nitrilasa o en un proceso de dos pasos por una nitrilo hidratasa y una amidasa, luego a indolacetonitrilo (Duca *et al.*, 2014; Patten & Glick, 1996).

Las enzimas nitrilo hidratasas unen las vías IAN e IAM ya que llevan a cabo la reacción de hidratación del indol-3-acetonitrilo en IAM, que luego pasara a convertirse en el producto final IAA por la indolacetamida hidrolasa/amidasa (Vega-Hernández *et al.*, 2002).

2.4.3 Vía del ácido indol-3-pirúvico (IPyA).

Esta vía comienza con la desaminación del L-Triptófano por una aminotransferasa convirtiéndolo en ácido Indol-3-piruvico (IPyA), continuando con la conversión del ácido indol-3-piruvico a indol-3-acetaldehído, esta reacción es catabolizada por la enzima fenilpiruvato descarboxilasa, que finalmente se oxida a AIA por las enzimas aldehído deshidrogenasa, mutasa u oxidasa (Rajagopal, 1971).

En general los microorganismos cuentan con varias proteínas con actividad de aminotransferasa aromática (AAT), cada una de estas enzimas frecuentemente puede utilizar múltiples aminoácidos de sustrato, incluidos los tres aminoácidos aromáticos, así como el aspartato. Estas enzimas ya sea solas o en combinación con otras funcionan en varios procesos celulares como son la biosíntesis de los aminoácidos aromáticos (fenilalanina y tirosina), el catabolismo de aminoácidos, y la generación de importantes metabolitos secundarios (Figura 1) (Jensen *et al.*, 1981; Kittell *et al.*, 1989).

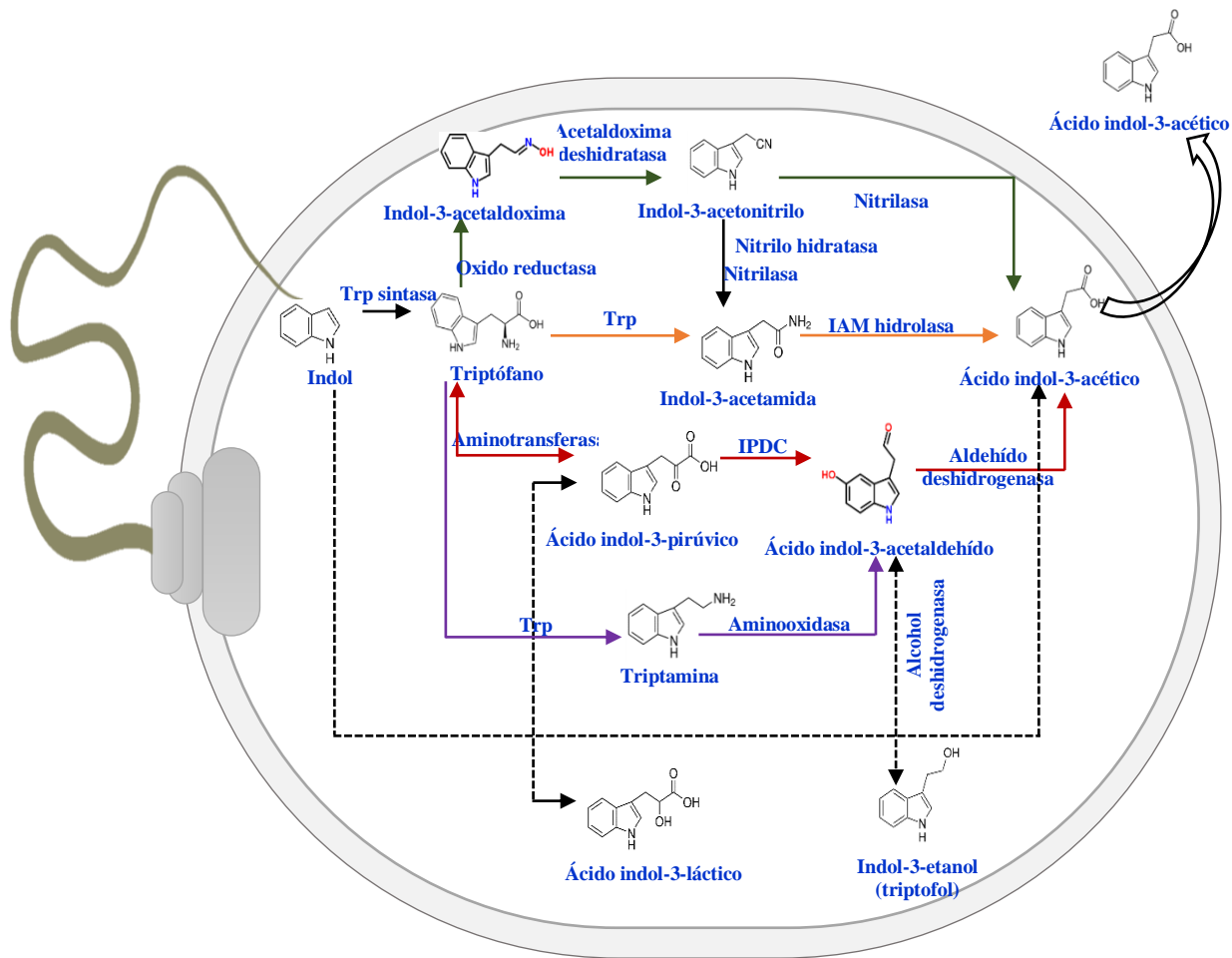


Figura 1. Vías de síntesis del ácido-3-indol acético. Jijón Moreno Saúl 2017. Tesis doctoral Estudio de la regulación transcripcional del gen *ipdC* que participa en la biosíntesis de ácido indol-3-acético en cepas de *Azospirillum brasilense*.

2.4.4 Papel del AIA como molécula señal.

El AIA es considerado una fitohormona de tipo auxina, algunos estudios la clasifican como molécula señal, tanto en plantas como en bacterias. Esta es la principal auxina en plantas, ya que controla muchos procesos fisiológicos, incluido el agrandamiento de las partes apicales de plantas, la división celular, la diferenciación de tejidos y las respuestas a la luz y a la gravedad (Teale *et al.*, 2006).

En bacterias, esta fitohormona es capaz de influir en la expresión génica de una manera muy eficiente y selectiva, mediante una regulación que puede ser positiva o negativa, los genes que son regulados están involucrados en diferentes procesos celulares como son la formación de biopelícula, la síntesis de exopolisacáridos, la resistencia a condiciones estresantes, entre otras. Un ejemplo de la regulación génica que lleva acabo el AIA, es en el gen *ipdC* de *A. brasilense* cuya transcripción está regulada por su producto final, el AIA, lo que constituye un bucle de autorregulación positiva, esto sugiere la presencia de un elemento sensible a auxina

en la región promotora del gen *ipdC*. En consecuencia, *A. brasilense* además de producir AIA, también es capaz de detectar AIA y alterar su expresión genética en presencia de la fitohormona (Donati *et al.*, 2013; Teale *et al.*, 2006; Van Puyvelde *et al.*, 2011; Spaepen *et al.* 2007).

2.5 Transcripción en procariontas.

La transcripción es un proceso importante en la expresión genética, en ésta se comprende la síntesis de la cadena de ARNm de la secuencia codificante de un gen, esta síntesis es catalizada por la enzima ARN polimerasa. En procariontas esta enzima está formada por la enzima central o “enzima core” que consiste en cinco subunidades ($\beta\beta'\alpha 2\omega$) que es capaz de unirse de manera inespecífica al ADN. Para poder llevar a cabo un proceso de transcripción específico, se requiere de un factor sigma (σ) que interviene de manera específica en el reconocimiento de una secuencia promotora adecuada, además de que ésta interactúa con activadores de la transcripción. La ARN polimerasa está formada por la enzima core y el factor σ , a este conjunto se le conoce como “holoenzima” (Coulson, 2008; Depeursinge *et al.*, 2010; Lewin 2008).

La mayoría de los estudios realizados sobre la transcripción en bacterias han usado a *Escherichia coli* como sistema modelo, el factor σ predominante en esta bacteria es σ -70. Los factores σ alternativos como σ -38, σ -32, σ -28, σ -19 y σ -24 son miembros de la familia σ -70, por tener un mismo mecanismo de inicio de la transcripción. Los miembros de esta familia se unen a los promotores conservados centrados en los elementos -10 y -35, esto quiere decir que la holoenzima se une a dos secuencias consenso, una en el elemento -35 (TTGACA) y la otra en el elemento -10 (TATAAT) (Bush & Dixon, 2012; Depeursinge *et al.*, 2010).

Por el contrario, el proceso de transcripción mediado por σ -54 difiere del de la familia σ -70, ya que no comparte homología de secuencia de reconocimiento, además que el proceso de activación requiere de diferentes elementos (Reitzer & Schneider, 2001).

2.5.1 Transcripción por σ -54.

Normalmente, en bacterias podemos encontrar varias subunidades alternativas del factor sigma (σ), con diferentes especificidades de secuencia que dirigen a la ARN polimerasa a diferentes promotores. Distinto de la familia σ -70, que es representada por un diverso grupo de factores sigma constitutivos y alternativos, en la familia σ -54 solo encontraremos a este factor. Se sabe que la subunidad σ -54 es única ya que no comparte homología con ningún otro factor sigma. A pesar de que los integrantes de ambas familias se unen a la misma enzima, estas familias activan la transcripción mediante mecanismos completamente diferentes (Bush & Dixon, 2012; Studholme & Dixon, 2003).

En contraste a la unión de σ -70, σ -54 se une a distintas secuencias consenso que están más conservadas. La unión se producirá en los elementos -12 (GG) y -24

(TGC), que forman parte de la gran secuencia consenso YTGGCACGrNNNTTGCW (Burrows *et al.*, 2003; Schumacher *et al.*, 2006).

A diferencia del inicio de la transcripción mediada por los factores pertenecientes a la familia σ -70, la transcripción dependiente de σ -54 requiere de la presencia de un activador, el cual acopla la energía que se generó en la hidrólisis de un trinucleótido (ATP) para la isomerización del complejo cerrado de la ARN polimerasa con σ -54. Por su similitud con el proceso que llevan a cabo las proteínas de unión potenciadoras de las eucariotas (EBP: Enhancer Binding Protein, acrónimo del inglés) a los activadores de la transcripción mediados por σ -54 se les conoce como proteínas de unión potenciadoras bacterianas (bEBP) (Bush & Dixon, 2012; Merrick, 1993; Schumacher *et al.*, 2004).

2.6 Proteínas de unión potenciadoras bacterianas (Enhancer Binding Proteins).

Las EBP se unen a sitios de reconocimiento específico potenciador (UAS: Upstream Activator Sequences, acrónimo del inglés) río arriba (80- 150 pb) del sitio de inicio de la transcripción. Estas se encuentran comúnmente en su forma inactiva como dímeros y tienen la necesidad de formar oligómeros para una alta actividad ATPasa (Klose *et al.*, 1994; Schumacher *et al.*, 2006).

Se sabe que las bEBP son proteínas modulares, que generalmente están constituidas por tres dominios. El dominio regulador N-terminal (R), que tiene un papel en la percepción de señales y la modulación de la actividad de la proteína. Un dominio AAA+ central (C) responsable de hidrólisis de ATP; este dominio es indispensable para activar la transcripción dependiente de σ -54. Por último, un dominio de unión al ADN C-terminal (D) que contiene un motivo de hélice-vuelta-hélice HTH, donde se lleva a cabo la unión con sitios de reconocimiento específico potenciador (UAS) (Figura 2). Se sabe que no todas las bEBP tienen cada uno de estos dominios, sin embargo, para que pueda tener su función como activador de la transcripción solo necesita contener en domino central, esto quiere decir que se pueden encontrar bEBP que solo tengan el dominio central y el dominio regulador o de igual manera que solo tengan el dominio central y el dominio de unión al ADN. De igual modo, los dominios reguladores no comparten ninguna homología, pueden contener diferentes motivos sensoriales. En consecuencia, la familia bEBP se divide en cinco grupos (I-V), en función de su organización de los tres dominios presentes (Bush & Dixon, 2012; Schumacher *et al.*, 2006; Studholme & Dixon, 2003).

La proteína TyrR se considera una bEBP que se clasifica en el grupo II, este grupo se caracteriza por tener el dominio central y el dominio C-terminal altamente conservado, el dominio variable será el N-terminal ya que en este podremos encontrar dominios PAS o dominios XylR-N y V4R (Bush & Dixon, 2012).

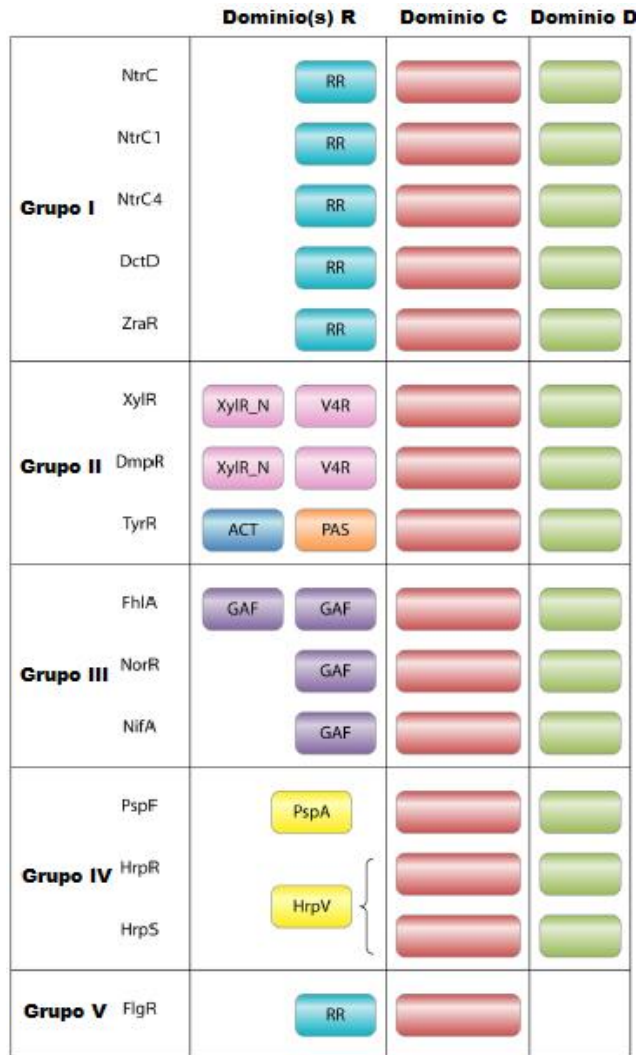


Figura 2. Conformación de los dominios de los cinco grupos (grupos I-V) de las bEBPs. El dominio central AAA+ (C) (rojo) está muy conservado y es esencial para la transcripción dependiente de σ -54. El dominio de unión al ADN (D) (Verde) de la región C-terminal, consiste en un motivo HTH que dirige la bEBP a sitios de reconocimiento específicos potenciadores (UAS) y este dominio puede estar ausente en algunas bEBP (grupo V). En la región N-terminal, el dominio regulador (R) que no se encuentra muy conservado entre los miembros de la familia bEBP, podemos encontrar diferentes dominios de recepción de señales; en función de las señales ambientales a detectar), Las bEBP del Grupo I contienen un dominio Regulador de Respuesta (RR) (azul). Las bEBP del Grupo II contienen dominios Per, ARNNT y Sim (PAS) (naranja) o dominios XylR-N y V4R (Vinil 4 Reductasa) (rosa). Las bEBP del Grupo III contienen un dominio GAF, nombrado así por contener una fosfodiesterasa estimulada de manera específica por GMP cíclico, una Adenilato ciclase de *Anabaena* y FhlA de *E. coli* (púrpura). En el grupo IV, las bEBP no contienen dominios de señalización como, por ejemplo, la proteína PspA (Phage Shock Protein A) y las proteínas HrpR y HrpS, ambas coactivadoras de la transcripción de genes de respuesta hipersensible y patogénesis, por lo tanto, están agrupados juntos. *Fuente: Bush & Dixon 2012.*

2.7 Factor de transcripción represor de tirosina (TyrR).

Las bacterias regulan la expresión de sus genes mediante el uso de Factores de Transcripción (TF). Se reconoce a los factores de transcripción como proteínas de unión a ADN en una secuencia específica (promotores), que reclutan a la ARN polimerasa para regular la transcripción de un conjunto de genes, por lo tanto, a través de esta regulación la célula pueda adaptarse a las variaciones del medio ambiente a las que continuamente la bacteria está expuesta (Lewin 2008; Studholme & Dixon, 2003).

TyrR es un factor transcripcional que tiene un papel importante en la regulación de genes esenciales en la biosíntesis, transporte y degradación de aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano, tirosina) (Argaet *et al.*, 1994).

En *E. coli* K12 se describe al “regulon TyrR” que comprende nueve unidades transcripcionales distintas (*aroF-tyrA*, *aroLM*, *tyrP*, *tyrB*, *aroP*, *tyrR*, *mtr*, *aroG* y *folA*), estas unidades pueden actuar como inhibidoras o activadoras de la transcripción, dependiendo de la naturaleza. Cada uno de los aminoácidos aromáticos actúa como cofactor con TyrR, al cual se unen a través de dos sitios de unión de ligando, lo que provoca una alteración de su estado de oligomerización y su afinidad por el ADN, esta proteína se suele encontrar en forma de dímero en el citoplasma (Pittard *et al.*, 2005).

En cuestiones estructurales esta proteína cuenta con 513 aminoácidos, tiene un peso molecular de 57 kDa y la constituyen tres dominios funcionales (Cui & Somerville, 1993; Pittard *et al.*, 2005):

-Un dominio N-terminal, que tiene una asociación específica con α CTD de la RNA polimerasa, este dominio es necesario para la dimerización, la unión del aminoácido cofactor y la activación transcripcional, las bases de datos describen una región de este dominio como un sitio de unión a ligando denominado dominio ACT (Asparato quinasa, Corismato mutasa y TyrR), siendo ésta la probable región de unión de los aminoácidos aromáticos involucrados. De la misma forma se identifica un dominio PAS (Per, Arn~~t~~-Sim), implicado en sistemas de transducción de señales (Ettema *et al.*, 2002; Pittard *et al.*, 2005; Verger *et al.*, 2007).

-Un dominio central, involucrado en la oligomerización y la unión al efector, este dominio es homólogo estructural a dominios como NtrC y NifA que están involucrados en la regulación de nitrógeno y la nitrogenasa. Estos dominios son miembros de la superfamilia de proteínas AAA +, que tienen funciones en diversos procesos celulares basadas en un modelo ATPasa. Estas proteínas de unión se caracterizan por ser potenciadoras que facilitan la transcripción dependiente de σ -54 por la hidrólisis del ATP que forma el complejo abierto en el promotor. Aunque TyrR tiene una homología estructural con estas proteínas, carece del motivo GAFTGA que se piensa es crítico para la activación de la transcripción en promotores dependientes de σ -54 y en su lugar TyrR reconoce los promotores σ -

70. Se ha demostrado que el dominio central de la proteína TyrR tiene actividad autocinasa, autofosfatasa y fosfatasa (Argaet *et al.*, 1994; Chipman & Shaanan, 2001; Dixon *et al.*, 2002; Kwok *et al.*, 1995; Morett & Segovia, 1993; Pittard *et al.*, 2005; Studholme & Dixon, 2003).

-Un dominio C-terminal, que contiene un motivo de unión a ADN de hélice-vuelta-hélice (HTH), esto quiere decir que este dominio tiene la función de unir el factor transcripcional al ADN. En *Haemophilus influenzae* se elucidó la estructura de la proteína TyrR, esto proporcionó evidencia de la clásica estructura hélice-vuelta-hélice (Huang *et al.*, 2019; Pittard *et al.*, 2005).

A las secuencias de ADN reconocidas por TyrR, se les denomina “caja TyrR”, los promotores que son reconocidos por esta proteína pueden contener uno o más motivos de reconocimiento, relacionados a la secuencia consenso TGTAAA-N6-TTTACA. Estas cajas de unión se clasifican de dos formas: las “cajas TyrR fuertes”, cuando tienen una coincidencia bases a 10-12 pares respecto a la secuencia consenso. En activación TyrR puede reconocerlas cuando esta proteína se encuentra en forma de dímero y en ausencia de cofactores (aminoácidos aromáticos). La otra clasificación son las “cajas TyrR débiles”, en las cuales la proteína tendrá menor afinidad a éstas, ya que tienen una coincidencia menor a 10-12 pares de bases respecto a la secuencia consenso, en activación los dímeros forman hexámeros, TyrR reconoce a éstas solo cuando se encuentra en presencia de tirosina y ATP. Los genes que serán reprimidos por TyrR, exceptuando *aroP*, contienen una disposición de caja doble, donde la caja débil se superpone al promotor (Argaet *et al.*, 1994; Pittard & Davidson, 1991; Pittard *et al.*, 2005).

En los estudios hechos por Jijón-Moreno y colaboradores, se pudo determinar que la proteína TyrR de *A. brasilense* Sp7 difiere de la de *E. coli* y *Enterobacter cloacae*, en que sí puede regular la transcripción en promotores que son dependientes de σ -54, debido a la conservación del motivo esencial. Además, en este estudio se determinó que TyrR juega un papel importante en la regulación de la producción de EPS y la formación de biopelícula en *A. brasilense* Sp7 (Jijón-Moreno *et al.*, 2019).

2.8 Formación de Biopelícula.

Se reconoce que en entornos naturales las bacterias se encuentran en una estrecha asociación con las superficies bióticas o abióticas, en forma de agregados multicelulares comúnmente conocidos como biopelícula. Como estrategia de vida la mayoría de las bacterias forman la biopelícula, ya que les brinda estabilidad, desempeña funciones catalíticas, aumenta las posibilidades de transferencia de material genético y la resistencia a los antibióticos, además de que participa en los procesos de comunicación celular y ofrece protección para sobrevivir a las condiciones adversas y variables del medio ambiente. Se puede definir formalmente a la biopelícula, como un *consorcio de microorganismos, que se encuentra embebido en una matriz constituida por sustancias poliméricas extracelulares (SPE*

acrónimo del inglés) donde los microorganismos comienzan a organizarse en colonias con diferentes requerimientos metabólicos (Ramírez-Mata *et al.*, 2014).

La biopelícula puede tener una constitución variable, se sabe que los microorganismos representan menos del 10% de la masa seca, mientras que la matriz puede representar más del 90%, por lo que es importante resaltar que esta matriz está constituida por: agua, exopolisacáridos (EPS), iones, fimbrias, proteínas de adherencia, ADN exógeno (eDNA), pilus y productos procedentes de las lisis bacterianas (ADN, proteínas, lípido, sustancias orgánicas). Podemos hallar algunos canales en las biopelículas, estos proporcionan el flujo de nutrientes, oxígeno y microorganismos de un sitio a otro a través de la circulación de fluidos, también mantienen la condición hidratada que proporciona un entorno natural para la supervivencia de la comunidad microbiana encerrada. La concentración de nutrientes, pH y disponibilidad de oxígeno puede variar (Branda *et al.*, 2005; Flemming & Wingender, 2010; Spormann *et al.*, 2004).

La biopelícula se desarrolla en diferentes etapas, comenzando por la adhesión primaria (I), que es rápida y reversible en superficies bióticas o abióticas, en esta etapa están implicadas las proteínas de la superficie celular, la siguiente etapa es la agregación intracelular (II), la unión se vuelve irreversible y se mide por diferentes estructuras bacterianas como son el flagelo y las fimbrias, un aspecto clave de esta fase es la adhesina intracelular polisacárido (PIA), ya que ésta participa en el proceso de acumulación celular. Continúa la etapa de maduración temprana de la biopelícula (III), las células se multiplican y forman capas de microorganismos, los péptidos y los surfactantes son importantes para esta etapa, hay un aumento en la biosíntesis de EPS; (IV) maduración de la biopelícula, hay formación de microcolonias y producción de SPE. Finalmente, la etapa de desprendimiento y dispersión (V), esta etapa final de la formación de la biopelícula implica la liberación de las células móviles, ya que las condiciones ya no son favorables, (Figura 3) (Flemming & Wingender, 2010; Vasudevan, 2014).

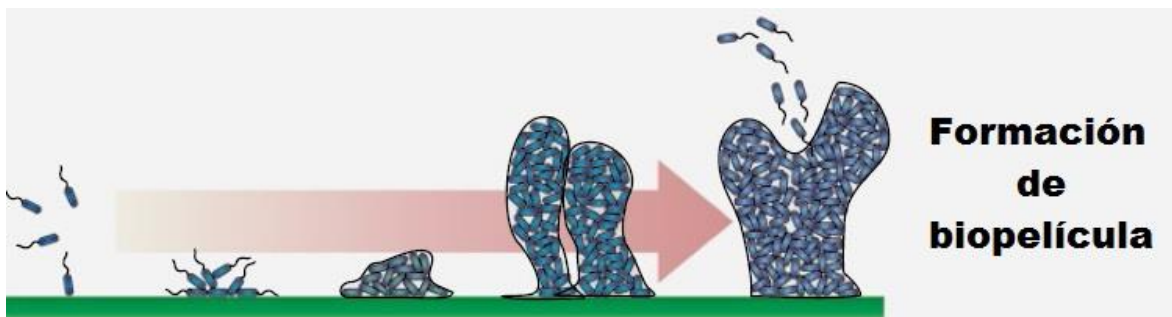


Figura 3. Formación de la biopelícula. En la etapa de adhesión, las bacterias se anclan en la superficie, primero de forma reversible y se continúa con una unión irreversible. Posteriormente, la maduración temprana de la biopelícula, en donde las células se multiplican y forman capas de microorganismos, además que hay un aumento en la producción de Sustancias extracelulares entre

los cuales destaca los exopolisacáridos (EPS), en la siguiente etapa de maduración habrá formación de microcolonias, y finalmente, cuando las condiciones del medio no son favorables, la biopelícula entrará en su última etapa que será el desprendimiento. *Fuente: Salcedo et al, 2015.*

La formación de la biopelícula es un cambio de vida en las bacterias que implica una expresión genética diferencial, ya que las bacterias cambian de una forma de vida planctónica a sésil. Este cambio de vida está relacionado con las concentraciones intracelulares de la molécula 3'5 diguanosin-monofosfato-cíclico (di-GMP-c) que es descrita como segundo mensajero en bacterias. Cuando las concentraciones de esta molécula incrementan se propicia el estilo de vida sésil, formación de biopelícula y expresión de componentes de la matriz extracelular. Si los niveles del di-GMP-c son bajos entonces el estilo de vida será planctónico. Las concentraciones de este segundo mensajero son reguladas enzimáticamente por dos proteínas, las diguanilato ciclasas que tienen un dominio GGDEF implicadas en la síntesis y las fosfodiesterasas que pueden ser de dominio EAL o HD-GYP que son las encargadas de la degradación (Hengge, 2009; O'Toole, 2003; Romling, *et al.*, 2013).

Existe una diversidad de factores que participan en la formación de la biopelícula, dependiendo la fase en la que esta se encuentre, como ya se mencionó, uno de los principales constituyentes de la matriz de la biopelícula son los EPS que es de vital importancia en procesos como: la adhesión, la agregación de células, la cohesión de la biopelícula, la retención de agua, la formación de la barrera protectora, la sorción de componentes orgánicos, la sorción de iones inorgánicos, el almacenaje de exceso de energía y la unión de enzimas (Beloin & Ghigo, 2005; Flemming & Wingender, 2010).

2.9 Quimiotaxis.

Gran parte de las bacterias móviles han desarrollado la capacidad de seguir gradientes de factores ambientales, como son productos químicos, pH, osmolaridad, temperatura y el potencial redox. Estas bacterias pueden encontrar mejores entornos para el crecimiento al migrar hacia sustancias químicas favorables (atrayentes) o alejarse de las sustancias que son desfavorables (repelentes). La quimiotaxis tiene un papel importante en el establecimiento de relaciones simbióticas con las plantas. Las bacterias quimiotácticas utilizan la detección temporal para realizar una caminata aleatoria sesgada alternando períodos de nado suave con breves cambios de dirección. Los mecanismos que utilizan las bacterias para hacer los cambios de dirección pueden diferir entre especies (Porter, *et al*, 2011; Wadhams & Armitage, 2004).

La frecuencia del cambio de dirección está controlada por la vía de la quimiotaxis, ya que esta controla la rotación flagelar, al nadar en una dirección favorable los cambios de dirección se suprimen, al contrario, al nadar en una dirección desfavorable los cambios de dirección incrementan. En la vía de la quimiotaxis, identificada en *E. coli*, las señales se transducen desde las proteínas

quimiorreceptoras al motor flagelar, por medio de una vía de señalización de dos componentes, esto quiere decir que en el núcleo del procesamiento de señales de todas las vías de la quimiotaxis se encuentran los complejos formados por quimiorreceptores, la cinasa histidínica CheA y un adaptador CheW, éste es el encargado de controlar la autofosforilación de CheA (Bi & Sourjik, 2018; Porter *et al.*, 2011).

Una vía de la quimiotaxis ampliamente estudiada es en el modelo de *E. coli*, en la que los quimioefectores son detectados por los quimiorreceptores, estos suelen ser proteínas diméricas transmembrana, conocidas como proteínas de quimiotaxis aceptadoras de metilo (MCP: Methyl-acepting Chemotaxis Proteins acrónimo del inglés), que contienen un dominio periplásmico de unión a ligando y un dominio citoplasmático de señalización. Estas proteínas dirigen la locomoción mediante la regulación de CheA, la cual dona el grupo fosforilo a un regulador de respuesta CheY, que en su forma fosforilada (CheY-P) induce la rotación del motor flagelar en el sentido de las agujas del reloj, al unirse a FliM y FliN del complejo interruptor de dicho flagelo. La terminación de la señal se produce por desfosforilación de CheY-P, para *E. coli* y bacterias relacionadas, CheY-P se desfosforila con la ayuda de la fosfatasa CheZ. Si la estimulación es persistente, las bacterias pueden adaptarse a ella, esto lo hacen ajustando los niveles de metilación del receptor y así regulan la actividad de CheA, a través de un sistema de adaptación, que consiste en una metiltransferasa CheR y una metilesterasa CheB. CheB elimina los grupos metilo añadidos a los MCP por la metiltransferasa constitutiva CheR (Figura 4) (Bi & Sourjik, 2018; Bible *et al.*, 2008; Hazelbauer *et al.*, 2010; Sarkar *et al.*, 2010).

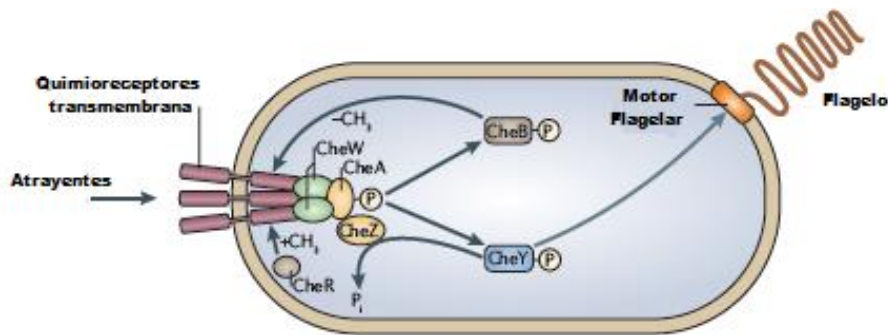


Figura 4. La vía de la quimiotaxis en *E. coli*. Los quimioefectores son detectados por los quimiorreceptores transmembrana. Estos envían señales a través de CheW a la cinasa histidínica CheA. En respuesta a la disminución de la concentración de atrayente, los quimiorreceptores activan la autofosforilación de CheA. CheA fosforilada (CheA-P) tiene la capacidad de fosforilar a cualquiera de sus reguladores de respuesta, CheB y CheY. CheY-P se une al motor flagelar y promueve un cambio en la dirección de rotación de izquierda a derecha. CheB-P es una metilesterasa que media la adaptación junto con la metiltransferasa, CheR. CheZ es una fosfatasa específica que desfosforila CheY-P, lo que permite una rápida terminación de la señal. *Fuente: Porter et al., 2011.*

Mientras que *E. coli* posee una sola vía de quimiotaxis, con sólo una copia de las proteínas de señalización, la mayoría de las bacterias tienen múltiples sistemas de

quimiotaxis. *A. brasilense* tiene cuatro operones de quimiotaxis distintos, Che1, Che2, Che3 y Che4 (Figura 5). Se identificó que la vía que regula los aumentos transitorios de la velocidad de nado en respuesta a los atrayentes es Che1, esta vía comprende homólogos de CheA, CheW, CheY, CheB y CheR. Se desconoce el papel de Che2 en *A. brasilense*, pero es un homólogo del operón *che2* que controla la biosíntesis flagelar en *Rhodospirillum centenum*. Che3 es una vía ACF (Alternative Cellular Functions acrónimo del inglés) similar a la quimiotaxis que es implicada en el control de la floculación en *A. brasilense*. Finalmente, la vía Che4, que está presente en los genomas de *Azospirillum*, se sabe que esta vía es esencial para todas las respuestas de quimiotaxis en *A. brasilense* y para la colonización competitiva de la superficie de la raíz del trigo (Bible *et al.*, 2015; A. Bible *et al.*, 2012; Mukherjee *et al.*, 2016; Wisniewski-Dyé *et al.*, 2011; Zhulin, 2012).

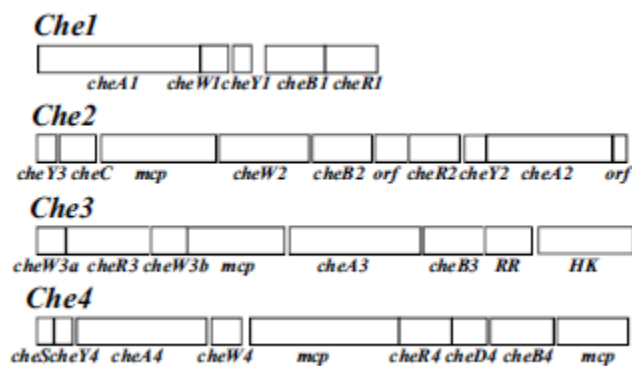


Figura 5. Agrupación de genes implicados en la quimiotaxis dentro del genoma de *A. brasilense*. Los cuadros representan marcos de lectura abiertos (ORF: Open Reading Frame acrónimo del inglés) y están dibujados a escala. Estos genes se identificaron por homología. Las abreviaciones significan: RR: gen que codifica para un regulador de respuesta, HK: gen que codifica para una cinasa histidinica; *mcp*: gene que codifica para una proteína aceptadora de metilo. *Fuente:* Mukherjee *et al.* 2016.

El estudio de genomas de *Azospirillum* ha mostrado que este género posee muchos genes que codifican para receptores de la quimiotaxis, que incluyen a las proteínas MCPs y Tlp (Transducing Like Protein acrónimo del inglés), algunos de los que se han estudiado son: Tlp1, un quimiorreceptor transmembrana que en su C-terminal tiene un dominio PilZ, se sabe que estos dominios se unen al di-GMP-c, la unión de este segundo mensajero a Tlp1 regula tanto la velocidad de nado como la frecuencia de inversiones, a través de la vía de Che1 y otra vía aún no identificada. Otro receptor estudiado es el receptor AerC, que funciona como un sensor redox, gracias a sus dominios PAS, que permite a las células buscar condiciones microaerófilas que apoyen la fijación óptima de nitrógeno, en *Azospirillum* este receptor se agrupa en los polos de la célula (Bible *et al.*, 2008; Russell *et al.*, 2013).

3. Antecedentes.

3.1 Antecedentes Generales.

En 2008, Ryu y Patten realizaron un análisis para identificar a la proteína reguladora que controla la expresión del gen *ipdC* en *Enterobacter cloacae* UW5, que codifica para una indol-3-piruvato descarboxilasa, involucrada en la vía indol-3-piruvato para la biosíntesis del AIA. En sus estudios identificaron la presencia de una secuencia consenso para la caja TyrR altamente conservada río arriba del gen, esta es muy similar a la secuencia de reconocimiento de la proteína reguladora TyrR de *E. coli* que regula los genes implicados en el transporte y metabolismo de aminoácidos aromáticos. Usando una mutante, realizada por inserción, demostraron que TyrR es necesario para la producción de AIA y para la inducción de la transcripción de *ipdC*. Esta regulación se hace de forma directa y es positiva, lo cual determinaron mediante PCR de transcripción inversa cuantitativa en tiempo real, de la misma forma midieron la actividad del gen reportero dirigido por el promotor de *ipdC* y mediante ensayos de desplazamiento de movilidad, concluyeron que ésta aumenta en respuesta a la adición de triptófano, fenilalanina y tirosina.

Para probar la capacidad de TyrR para unirse a la región promotora del gen *ipdC* realizaron ensayos de cambios en la corrida electroforética (EMSA acrónimo del inglés Electrophoretic Mobility Shift Assay) (Figura 6). En este ensayo utilizaron tres oligonucleótidos derivados de secuencias encontradas en la zona promotora de *ipdC* (IP3, IP3M e IP5), las secuencias IP3 e IP3M se encuentran en la zona de la caja TyrR. Para el diseño de IP3M sustituyeron las bases de nucleótidos que se sabe que son críticas en la interacción de TyrR en *E. coli*. IP5 es una secuencia que se encuentra río arriba de IP3 en el genoma de *E. cloacae* UW5, este oligonucleótido posee una secuencia similar a la secuencia consenso de la caja TyrR; sin embargo, la longitud de la secuencia de IP5 no es óptima para la interacción con TyrR.

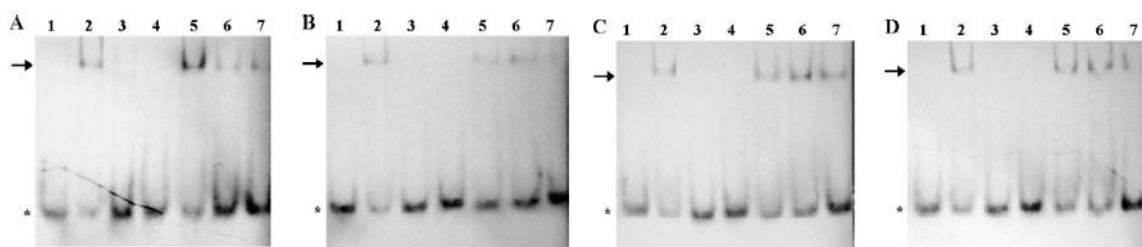


Figura 6. Unión de la proteína purificada TyrR al promotor del gen *ipdC* en presencia de aminoácidos aromáticos. Resultados del ensayo de cambio en la corrida electroforética (EMSA: electrophoretic mobility shift assay acrónimo del inglés). A) aminoácidos no aromáticos, B) L-triptófano, C) L-fenilalanina, D) L-tirosina. Para el estudio utilizaron fragmentos oligonucleótidos marcados, todos derivados de secuencias encontradas en el promotor *ipdC* de *E. cloacae* (IP3, IP3M y IP5). Los carriles 1 a 4 contenían: Línea 1: oligonucleótido IP3; Línea 2: IP3 y TyrR purificado y marcado; Línea 3: oligonucleótido IP3M y TyrR purificado y marcado; Línea 4: IP5 y TyrR purificado y marcado. Las líneas 5 a 7 tienen muestras de diferentes concentraciones de IP3. Los asteriscos muestran IP3 libre y las flechas marcan la unión del oligonucleótido a TyrR. Tomada de Ryu & Patten 2008.

3.2 Antecedentes específicos.

En el estudio de la regulación transcripcional del gen *ipdC* en *A. brasilense* Jijón-Moreno y colaboradores (2018), indican que dicho gen codifica para la enzima fenilpiruvato descarboxilasa (PPDC), el cual participa en la biosíntesis del AIA en cepas de *A. brasilense*. Entre sus estudios, realizan un análisis *in silico* del promotor de *ipdC* de *A. brasilense* Sp 7. En el contexto genético se observa que río arriba se localiza el gen AMK58_RS11555 (*gltX*), que codifica para una glutamato-tRNA ligasa putativa, encontrando la región intergénica entre los genes *gltX* e *ipdC* en donde se localiza un presunto promotor, similar al descrito en *A. brasilense* Sp245 (Spaepen *et al.*, 2008). Con este análisis se determina que en la región 5' río arriba de *ipdC* en *A. brasilense* Sp 7 se localizan varios elementos en *cis* que son importantes para la expresión del gen como son: un elemento de respuesta a auxinas (AuxRE), un probable sitio de unión para el factor sigma RpoN (σ -54), dos repeticiones invertida de 8 pb separada por una secuencia de 4 pb (ATTGTTTC(GAAT)GAAACAAT), un probable sitio de unión a ribosoma y finalmente el sitio de inicio de la transcripción (Figura 7).

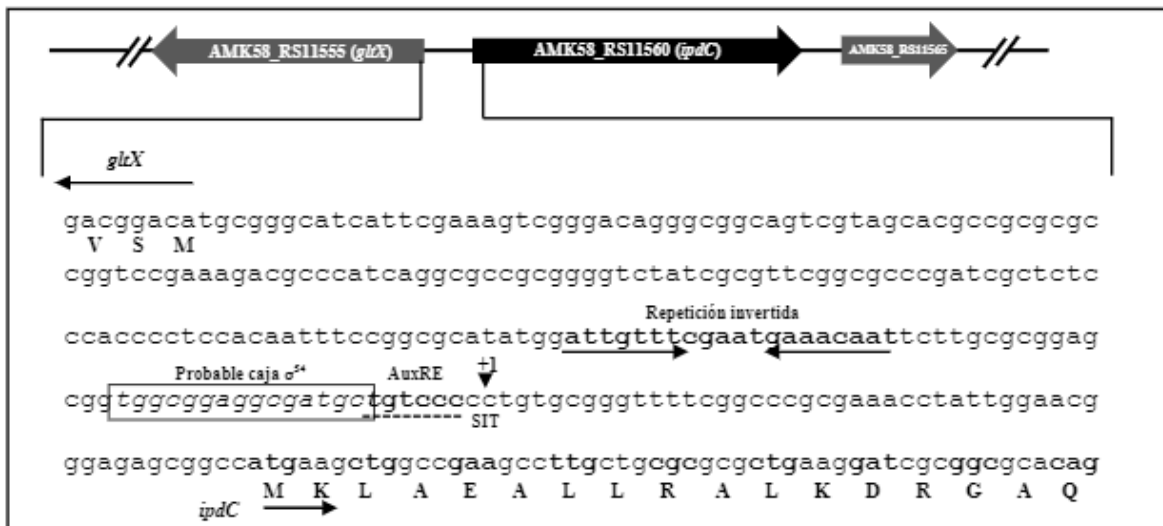


Figura 7. Región del extremo 5' de *ipdC* de *A. brasilense* Sp7. Con dos flechas opuestas se indica la repetición invertida, en un rectángulo se observa el probable sitio de unión para el factor σ -54, el elemento de respuesta a auxinas (AuxRE) está subrayado con una línea discontinua y finalmente el probable sitio de inicio de la transcripción (nucleótido +1) está indicado con un triángulo invertido. Se indica el inicio de la región codificante de *gltX* y de *ipdC* con sus respectivos aminoácidos. Jijón Moreno Saúl 2017. Tesis doctoral Estudio de la regulación transcripcional del gen *ipdC* que participa en la biosíntesis de ácido indol-3-acético en cepas de *A. brasilense*.

Tomando como referencia el hallazgo de Ryu y Patten (2008), en el laboratorio de Interacción bacteria- planta se plantea la hipótesis de que, de igual forma que en *E. cloacae*, TyrR podría tener un papel importante en la producción de AIA en *A. brasilense* Sp7 a través de la regulación transcripcional del gen *ipdC*.

A partir de la búsqueda de proteínas homólogas de *E. coli* K12 se identifica el gen *tyrR* en el genoma de *A. brasilense* Sp7, este alineamiento da como resultado el reconocimiento de la proteína codificada por el gen AMK58_RS07030 (*tyrR*) cuyo producto de traducción presenta una identidad del 43% y una similitud del 59% con la proteína TyrR de *E. coli*. El gen *tyrR* se encuentra en la cadena complementaria del cromosoma de *A. brasilense* Sp7, 272 pb río arriba de *tyrR* y en dirección opuesta, se encuentra el gen AMK58_RS07035, que codifica para una D-aminoácido deshidrogenasa (DAO; gen *dadA*). El gen *tyrR* codifica para una proteína de 514 aminoácidos (Jijón-Moreno *et al.*, 2019).

Entre los análisis bioinformáticos se realizan alineamientos múltiples de secuencias de proteínas homólogas con el servidor CLUSTAL omega. Se identifican cuatro motivos, en los que encontramos: los motivos Walker A (I) y Walker B (III) que son importantes para la unión e hidrólisis del ATP, el motivo de unión a σ -54 que se distingue por la secuencia consenso GSFTGA (II) y finalmente el motivo de unión a ADN (IV) (Figura 8) (Bush & Dixon 2012; Jijón-Moreno *et al.*, 2019).

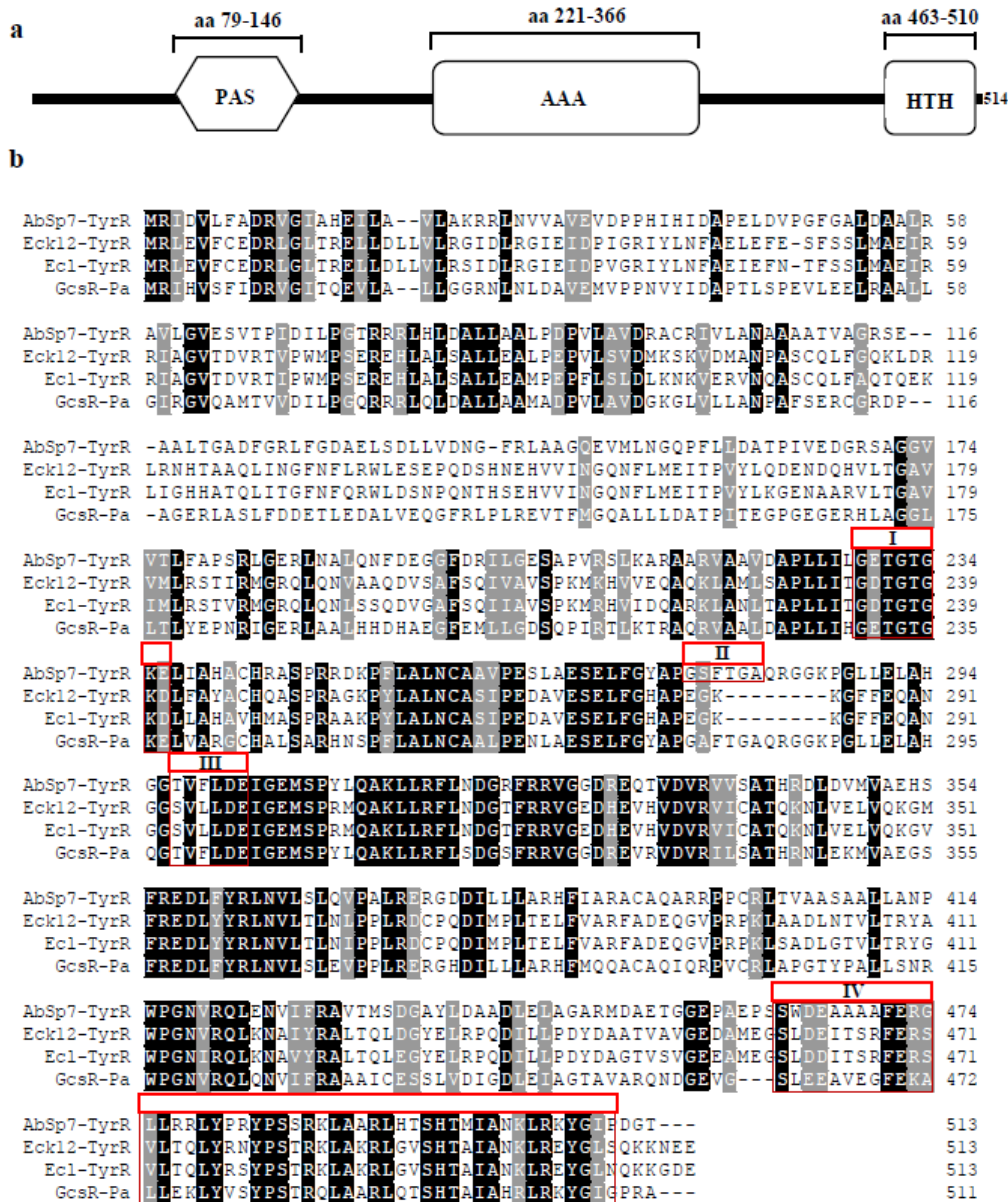


Figura 8. Predicción bioinformática de los dominios de TyrR de *A. brasilense* Sp7 y alineamiento múltiple con proteínas homólogas. a) Dominios de TyrR de *A. brasilense* Sp7 de acuerdo con el servidor bioinformático SMART. b) Alineamiento múltiple de secuencias homólogas a TyrR de *A. brasilense* Sp7. Las secuencias mostradas corresponden a las secuencias de aminoácidos de TyrR de *A. brasilense* Sp7 (TyrR_{AbSp7}), TyrR de *E. coli* MG1655 (TyrR_{Ec}), TyrR de *E. cloacae* (TyrR_{Ecl}) y GcsR de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (GcsR_{Pa}). Las regiones en cuadros rojos representan el motivo Walker A (I), el motivo de unión a sigma 54 (II), el motivo Walker B (III) y el dominio de unión a ADN (IV). El alineamiento múltiple se realizó con el programa Clustal Omega. En color negro y en gris se indican las regiones del alineamiento con 100% de identidad y 100% de similitud, respectivamente y fueron resaltadas utilizando el servidor bioinformático Multiple Align Show. Fuente: Jijón Moreno *et al.* 2019.

La proteína TyrR codificada por el gen *tyrR* de *Azospirillum* se analiza a nivel de estructura con el servidor I-Tasser, a través de la comparación de sus dominios con cristales ya caracterizados y que corresponden a los siguientes: el dominio N-terminal de la proteína TyrR de *E. coli* K12, el dominio central AAA+ de la proteína FleQ de *P. aeruginosa* y el dominio C-terminal la proteína TyrR de *Haemophilus influenzae*. Estos estudios de comparación por superposición presentan una alta homología, la presunta proteína comparte una gran similitud con respecto a la organización de cada dominio, a los motivos distintivos, a la estructura secundaria y a las características de la topografía que exhiben las bEBP. Con estos estudios de superposición se puede suponer que la proteína TyrR de *A. brasilense* Sp7 contiene: en su dominio N-terminal un dominio PAS y un dominio ACT, involucrados en el contacto con la subunidad α CTD de la ARN polimerasa y como sitio de unión para los aminoácidos aromáticos, respectivamente; en el dominio central se encuentra un sitio de unión de ATP putativo que se identifica con los sitios de unión de ATP Walker A y Walker B, el dominio central es el responsable de la hidrólisis de ATP además que se identifica en este el motivo distintivo GAFTGA que es indispensable para activar la transcripción dependiente de $\sigma 54$; el extremo C-terminal incluye el motivo HTH involucrado en la unión al ADN.

Para analizar la participación de la proteína TyrR en la producción del AIA se genera la mutante del gen *tyrR*, mediante la inserción de un casete de resistencia a gentamicina (Gm) en la región codificante del gen, a esta mutante se le nombró *A. brasilense* 2116 (Figura 9). Sin embargo, se observa que no hay diferencias estadísticamente significativas en la producción del AIA en comparación con la cepa silvestre (Jijón Moreno, 2017).

Por lo cual, se procede a realizar un estudio fenotípico de la mutante y definir la participación del gen *tyrR*.

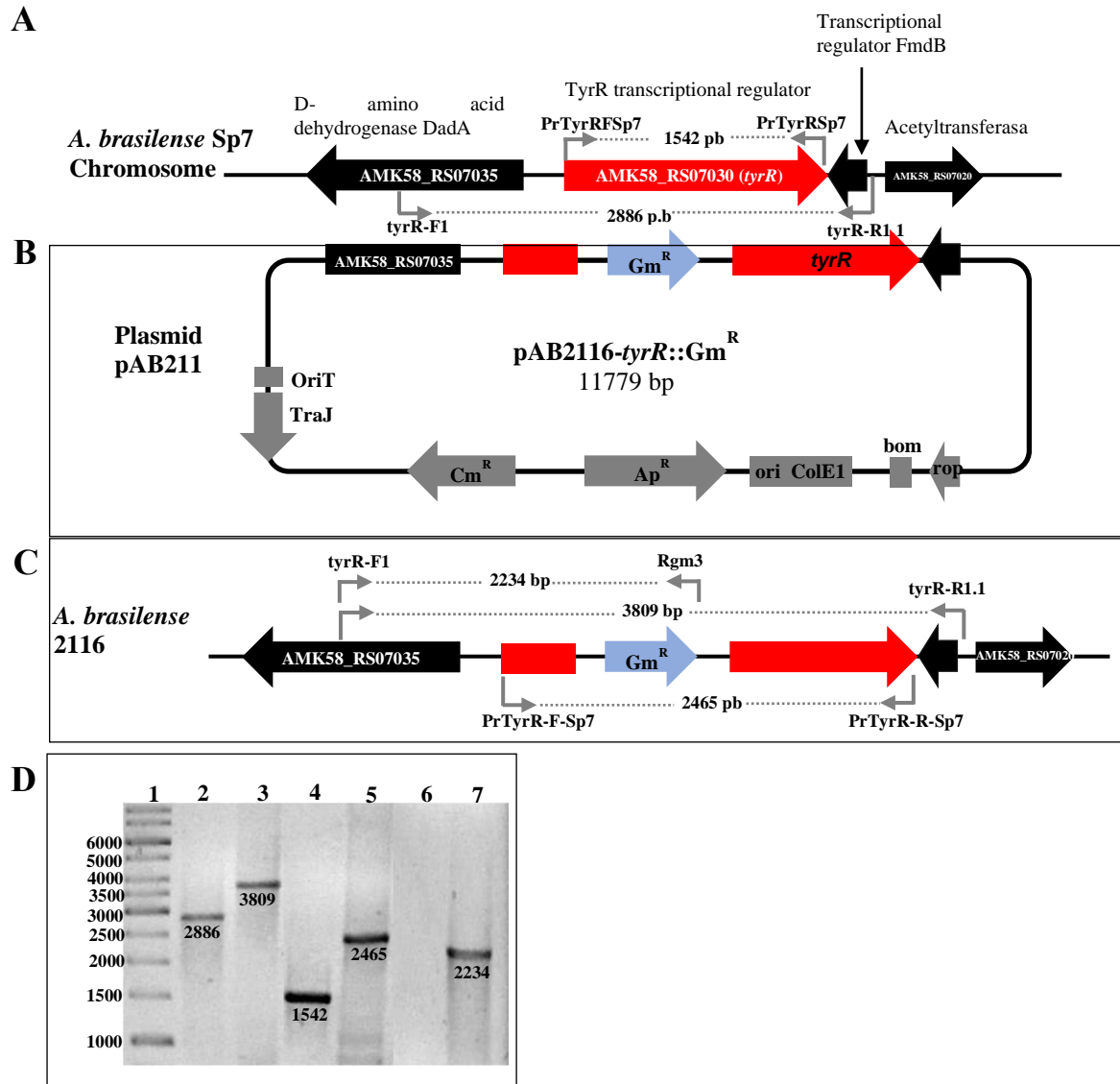


Figura 9. Construcción de la mutante 2116. A) Contexto genómico del gen *tyrR* en el cromosoma de *A. brasilense* Sp7. B) Mapa físico del plásmido pSUP-*tyrR*::Gm^R construido para la mutación de *tyrR* por recombinación homóloga. C) Mapa físico de la región del cromosoma de la mutante *A. brasilense* 2116 (mutante *tyrR*). Las flechas indican los oligonucleótidos utilizados para la comprobación de la mutación de *tyrR*. D) Electroforesis en gel de agarosa que muestra la comprobación por PCR de la mutación de *tyrR*: carril 1: Marcador de peso molecular de 1kb; carril 2: Producto de PCR obtenido con los oligonucleótidos tyrR-F1 y tyrR-R1.1 y DNA genómico de Sp7; Carril 3: producto de PCR obtenido con los oligonucleótidos tyrR-F1 y tyrR-R1.1 y DNA genómico de 2116; Carril 4: producto de PCR obtenido con los oligonucleótidos PrTyrRFSp7 y PrTyrRRSp7 y DNA genómico de Sp7; carril 5: producto de PCR obtenido con los oligonucleótidos PrTyrRFSp7 y PrTyrRRSp7 y DNA genómico de 2116; carril 6: PCR (control negativo) con los oligonucleótidos tyrR-F1 y Rgm3 y DNA genómico de Sp7; carril 7: producto de PCR obtenido con los oligonucleótidos tyrR-F1 y Rgm3 y DNA genómico de 2116. Se muestra el tamaño de los productos de PCR en pares de bases. Fuente: Jijón Moreno Saúl 2017. Tesis doctoral Estudio de la regulación transcripcional del gen *ipdC* que participa en la biosíntesis de ácido indol-3-acético en cepas de *Azospirillum brasilense*.

4. Justificación.

En la búsqueda de la aplicación de principios que orienten a mejorar la calidad del suelo, la alteración de la rizosfera por inoculación de microorganismos ha provocado un especial interés, ya que estos influyen de forma positiva en el crecimiento de las plantas y así, logran contribuir a enfocar a la agricultura como una actividad ambientalmente afable y con una alta productividad. La bacteria *A. brasilense* es de interés biotecnológico por ser una PGPR y promover un beneficio a las plantas de interés alimentario.

La explotación óptima de los efectos beneficiosos de la bacteria se puede lograr solo si se comprenden completamente los factores involucrados en procesos fundamentales para ésta, como son los mecanismos de colonización y las funciones de los componentes de las vías de señalización.

El correcto funcionamiento de procesos como la formación de biopelícula, la producción de EPS y la quimiotaxis, es esencial para una colonización efectiva, el estudio de la regulación molecular de estos es necesario para un empleo racional y efectivo de la bacteria. Por este motivo, resulta relevante determinar el papel del factor transcripcional TyrR en la regulación de los mecanismos celulares y de los factores involucrados.

5. Hipotesis.

El factor transcripcional TyrR está involucrado en la regulación de la expresión de genes que participan en procesos de transducción de señales y que están implicados en la formación de biopelícula y el proceso de quimiotaxis de *A. brasilense* Sp7.

6. Objetivos.

6.1 Objetivo General.

Describir la probable participación de la proteína TyrR en la regulación de genes implicados en formación de biopelícula y quimiotaxis en *A. brasilense* Sp7.

6.2 Objetivos Específicos.

-Estudiar el fenotipo de las mutantes 2116 (*A. brasilense* Sp 7 Δ *tyrR*), 2117 (*A. brasilense* *tyrR*::GmR (pJB*tyrR*)) y 2118 (*A. brasilense* 2116 (pJB3Tc20)) en crecimiento y producción de EPS.

-Realizar un análisis bioinformático de los presuntos promotores regulados por TyrR en *Azospirillum brasilense* Sp7

-Diseñar iniciadores para la amplificación de los presuntos promotores que sean de interés en la formación de biopelícula y quimiotaxis.

7. Materiales y Métodos.

7.1 Material Biológico.

Tabla 1. Cepas utilizadas para la elaboración de este trabajo.

Cepas	Características	Referencia
<i>E. coli</i> DH5 α	F- <i>endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG</i> ϕ 80 <i>dlacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169, <i>hsdR17</i> ($r_{K^{-}}$ $m_{K^{+}}$), λ	Thermo Fisher Scientific, EE.UU
<i>E. coli</i> S17.1	<i>recA thi pro hdsR4</i> ($r_{K^{-}}$ $m_{K^{+}}$) (RP4-2T:: <i>M-Km::Tn7</i>) Tp^{r} Sm^{r} λ pir	Simon <i>et al.</i> , 1983
<i>A. brasilense</i> Sp 7	Cepa silvestre	Tarrand <i>et al.</i> , 1978
<i>A. brasilense</i> 2116	<i>A. brasilense tyrR::Gm^R</i> isogénica de la cepa Sp7.	Jijón Moreno <i>et al.</i> , 2018
<i>A. brasilense</i> 2117	<i>A. brasilense tyrR::Gm^R</i> (pJB <i>tyrR</i>)	Este estudio
<i>A. brasilense</i> 2118	<i>A. brasilense</i> 2116 (pJB3Tc20)	Este estudio

Tabla 2. Plásmidos utilizados para la elaboración de este trabajo.

Plásmido	Características	Referencia
pBlueScript + (pBSK +)	Vector de clonación	Stratagene, La Jolla, CA, EE.UU
pBSK- <i>tyrR</i> -Sp7	Plásmido derivado de pBSK+ que contiene el gen <i>tyrR</i>	Este trabajo
pJB3Tc20	Plásmido derivado de RK2 oriT, Tc ^R , Ap ^R	Blatny <i>et al.</i> , 1997
pJB3- <i>tyrR</i> -Sp7	Plásmido derivado de pJB3Tc20 que contiene el gen <i>tyrR</i>	Este trabajo

Tabla 3. Oligonucleótidos usados en fase experimental.

Iniciador	Secuencia	Referencia
F- <i>tyrR</i> -Sp7	5' CCACCACCGTGACCTCGTG 3'	Este trabajo
TyrR-R1	5' CGCGGAGGGCCATTTTCAGCA 3'	Este trabajo

7.2 Técnicas y procedimientos.

7.2.1 Condiciones de cultivo.

Las cepas de *E. coli* DH5 α y S17.1 fueron cultivadas en medio Luria Bertani (LB) (en caldo o solidificado) en agitación (150 rpm) a 37 °C durante aproximadamente 16 h. Por otra parte, las cepas de *A. brasilense* Sp7, 2116, 2117 y 2118 se cultivaron en medio mínimo K-malato (en caldo o solidificado) a 30 °C, durante 18 h y en agitación (150 rpm), de igual manera estas cepas se incubaron en medio Rojo Congo (RC) y NfB* dependiendo del propósito del experimento.

Los antibióticos y las concentraciones utilizadas en este trabajo para el crecimiento de *E. coli* fueron: 100 μ g/mL de Ampicilina (Ap), 10 μ g/mL Tetraciclina (Tc), 30 μ g/mL de Gentamicina (Gm) y 20 μ g/mL de Kanamicina (Km). Para *A. brasilense* fueron: Tc 15 μ g/mL y Gm 30 μ g/mL.

7.2.2 Extracción y manipulación de ADN.

Las extracciones de ADN genómico de *A. brasilense* Sp7 se realizaron mediante el método de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) (Sambrook, 2001). Igualmente, las extracciones de ADN plasmídico se llevaron a cabo con el procedimiento de lisis alcalina empleando SDS y NaOH (Sambrook, 2001).

Las reacciones de PCR se realizaron siguiendo las indicaciones y concentraciones sugeridas por el proveedor de la enzima polimerasa Thermo Scientific.

7.2.3 Complementación de la mutante *A. brasilense* 2116.

La mutante 2116 se complementó en *trans* con el plásmido pJB $tyrR$ que es de bajo número de copias. Para esto, a partir del ADN genómico de *A. brasilense* Sp7 como molde y con los oligonucleótidos F- $tyrR$ -Sp7 y TyrR-R1 (tabla 3) se amplificó la región que abarcaba el promotor nativo y la ORF de $tyrR$. El producto de PCR (1964 p.b) se clonó en el plásmido pBSK+, que fue previamente digerido con la enzima de restricción EcoRV, lo que resultó en la formación del plásmido pBSK- $tyrR$ -Sp7. Posterior a esto, $tyrR$ se liberó de pBSK- $tyrR$ -Sp7 con las enzimas HindIII y BamHI, se clonó en el plásmido pJB3Tc20 utilizando los mismos sitios de restricción (Blatny *et al.*, 1997), y se obtuvo el plásmido pJB3- $tyrR$ -Sp7 el cual se transformó en células quimiocompetentes de *E. coli* DH5 α y *E. coli* S17.1. pJB3- $tyrR$ -Sp7 se transfirió por conjugación biparental a la mutante 2116 de la siguiente forma: las células donadoras de *E. coli* S17.1, las cuales contenían el plásmido pJB3- $tyrR$ -Sp7, se cultivaron en 5 mL de medio LB* suplementado con 10 μ g/mL de Tc a 37 °C a 150 rpm hasta alcanzar una DO_{600nm} de 0.8, las células receptoras de *A. brasilense* Sp 7 se cultivaron en 5 mL de medio LB* a 30 °C a 150 rpm hasta que alcanzaron una DO_{600nm} de 0.3. Se tomó 1 mL de cada cultivo y se centrifugaron a 8000 rpm durante 2 min, se lavó el paquete celular dos veces con 1 mL de medio LB*. Se continuó resuspendiendo las células en 50 μ l de LB*, mezclándose y colocándose en forma de punto (20 μ l en cada punto) sobre una placa de LB* sin antibióticos. Después de

24 h de incubación a 30 °C, se tomaron las células de la placa y se resuspendieron en 1 mL de medio mínimo K-malato y se empaquetaron por centrifugación a 8000 rpm por 2 min, se hicieron lavados del paquete celular con el mismo medio 2 veces. Posteriormente, se resuspendieron las células en 1 mL de medio mínimo K- malato y se preparó una serie de diluciones (de 10^{-1} a 10^{-4}) en un volumen de 100 μ l y se sembraron de forma masiva en placas de medio mínimo K- malato complementado con Tc 15 μ g/mL y Gm 30 μ g/mL. Se incubaron durante 48 h a 30 °C, las transconjugantes se resembraron en placas de medio mínimo K- malato complementadas con 30 μ g/mL de Gm y de manera simultánea se sembraron en placas de medio mínimo K- malato complementadas con 15 μ g/mL de Tc. Finalmente, las transconjugantes que resultaron Gm^R y Tc^R se consideraron como posibles complementadas. A la cepa complementada se le denominó *A. brasilense* 2117. Para completar el estudio se originó la cepa que se usó como control negativo, ya que esta contiene el plásmido pJB3Tc20 vacío, que finalmente se denominó *A. brasilense* 2118.

7.2.4 Curvas de crecimiento bacterianas.

Para evaluar el crecimiento de las cepas, se cultivaron en medio mínimo K-malato o medio mínimo K suplementado con 20 mM de DL-alanina o D-alanina como fuente de carbono (C), de la misma manera se utilizó el medio mínimo K-malato suplementado con 20 mM de DL-alanina como fuente de nitrógeno (N). Se incubaron las cepas a 30 °C durante 36 o 58 h con agitación a 150 rpm. Finalmente, se monitoreo el crecimiento de cada cepa a través de la medición de la DO_{600nm} en intervalos de 4 h.

7.2.5 Cuantificación de la unión de Rojo Congo a los EPS.

Partimos de un cultivo de medio RC de *A. brasilense* y derivadas, se sembraron las cepas en matraces Erlenmeyer de 125 mL que contenían 25 mL de medio NfB*, se incubaron a 30°C en condiciones estáticas durante 5 días. Más adelante, se determinó la DO_{600nm} y se tomó 2 mL de cultivo que se sedimentaron a 10000 rpm durante 3 min, se desechó el sobrenadante, se hizo un lavado con medio NfB* y se resuspendió en 2 mL de medio NfB* al que se le añadió una solución al 0.005% de colorante RC para lograr una concentración final de 40 μ g/mL, se incubó durante 2 h a 30 °C con agitación (200 rpm). Las células y los EPS unidos al RC se recolectaron mediante centrifugación a 10000 rpm a 5 min, para la determinación de la unión de EPS necesitamos medir la cantidad de RC que no se unió por ello se recuperó el sobrenadante de la muestra y se midió la absorbancia a 490 nm, finalmente se comparó el resultado con una concentración de RC adecuada (10–300 μ g/mL) para obtener la cantidad en mg de RC.

7.2.6 Análisis bioinformáticos.

Se identificaron las secuencias consenso para la unión de TyrR en el genoma de *A. brasilense* Sp 7 (Referencia de la secuencia de NCBI: NZ_CP012914.1), utilizando

la plataforma Find Individual Motif Occurrences (FIMO) (Grant *et al.*, 2011), a partir de los resultados arrojados y utilizando el servidor BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul *et al.*, 1997) se realizaron alineamientos de nucleótidos para la búsqueda de las cajas TyrR putativas en el genoma de *A. brasilense* Sp 7 y conocer así su contexto genómico, de esta forma se puede suponer cual es el gen que está siendo regulado presuntamente por TyrR. Continuando con el estudio se hizo una predicción de dominios proteicos de las proteínas presuntamente reguladas por TyrR con el programa SMART (Schultz *et al.*, 1998); además de una búsqueda de los promotores de cada gen, para determinar por cual familia de σ están siendo regulados, para esto se utilizó el servicio BPROM de la plataforma Softberry (Solovyev & Salamov, 2011) y la aplicación Virtual Footprint de la base de datos PRODORIC (Münch *et al.*, 2005). Finalmente, para el diseño de los iniciadores se utilizaron las herramientas SnapGene, Oligoanalyzer® y NEBcutter V2.0

Para el diseño de los iniciadores se tomó en cuenta el vector al que se planean clonar los fragmentos para las fusiones transcripcionales, para un trabajo futuro se utilizará el plásmido pRU5611 derivado del pJP2 (Karunakaran *et al.*, 2005), por ser un plásmido que muestra estabilidad en *Azospirillum*, en este vector se localizó un sitio múltiple de clonación (MCS acrómino del inglés), cuyos sitios de enzimas de restricción serán empleados para el diseño de los oligonucleótidos; así como los genes reporteros *gfp* y *gusA* que codifican para las proteínas verde fluorescente y β -glucoronidasa que indicaran el papel del regulador transcripcional putativo en la expresión del promotor clonado, cuando las fusiones sean introducidas a las cepas silvestre y mutante 2116 (Figura 10).

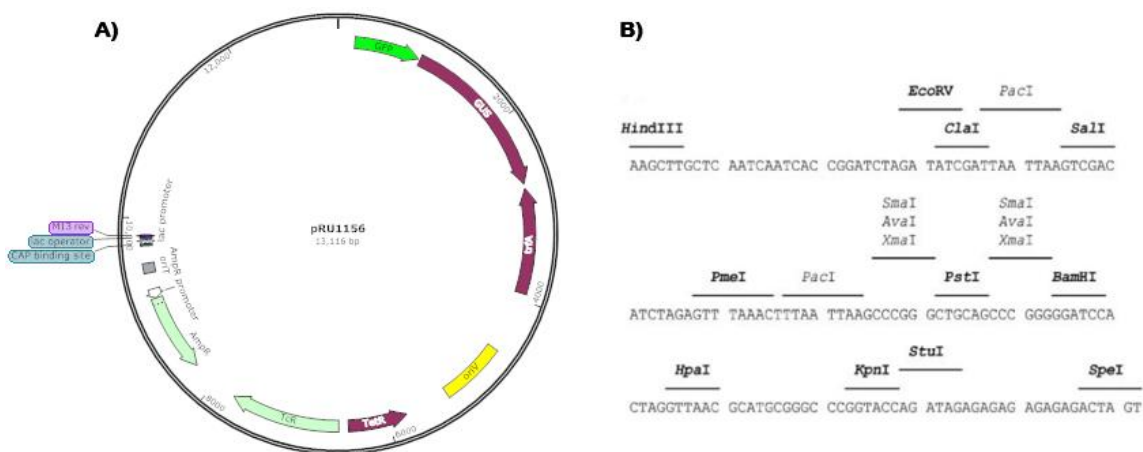


Figura 10. Vector pRU1156. A) Mapa del plásmido pRU1156 donde se puede observar la ubicación del MCS y los genes que contiene. B) Secuencia del MCS, en el que se marcan los sitios de las enzimas de restricción. Las enzimas en negritas solo tienen un sitio de corte. Fuente: Karunakaran *et al.*, 2005.

8. Resultados.

8.1 Análisis bioinformático de las secuencias consenso para presuntos sitios de unión de TyrR en el genoma de *A. brasilense* Sp7.

Utilizando el conjunto de cajas TyrR de *E. coli* (Pittard *et al.*, 2005; Andrews *et al.*, 1991), *E. cloacae* (Ryu & Patten 2008), y *Yersinia pestis* (Deng *et al.*, 2015), todas estas con una identidad del 100% en “cajas fuertes TyrR”, pudimos obtener la secuencia consenso: TGTAACG-N4-CTTTACA con la que posteriormente se escaneó el genoma de *A. brasilense* Sp 7 en el programa FIMO (Grant *et al.*, 2011), en el que encontramos una lista de secuencias que potencialmente podrían unir a TyrR. De esta manera identificamos motivos que tienen una fuerte homología con los descritos como sitios de unión de TyrR.

Para comenzar con el estudio bioinformático, se analizaron las secuencias adyacentes al gen *tyrR*, en las que se hallaron tres regiones consenso para la unión de TyrR en la región intergénica entre el gen *tyrR* y el gen *dadA*. El análisis predijo dos cajas putativas río arriba de *tyrR* y una tercera caja río abajo de *dadA* (Figura 11).

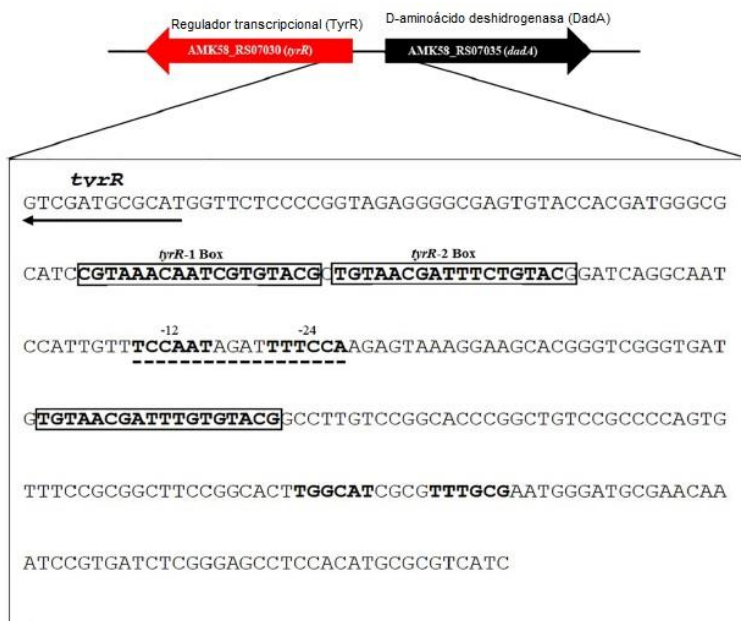


Figura 11. Secuencias de los elementos cis contenidos en la región promotora intergénica de los genes *tyrR* y *dadA* de *A. brasilense* Sp7. Cada caja TyrR está remarcada por un rectángulo, las regiones promotoras -12 y -24 se indican en negritas y subrayadas por una línea punteada. Las flechas muestran los ORF de los genes *tyrR* y *dadA*. Las cajas TyrR en el genoma de *A. brasilense* Sp7 se identificaron utilizando el software FIMO. Fuente: Jijón-Moreno *et al.* 2019.

De igual forma hicimos un estudio comparativo del grado de homología de estas regiones con respecto a la secuencia consenso de unión de TyrR solo de *E. coli* (Pittard *et al.*, 2005), ya que sabemos la homología de las cajas es un factor en la afinidad de la unión de la proteína (Figura 12).

	T	G	T	A	A	A	N	N	N	N	N	N	T	T	T	A	C	A	Porcentaje de Homología	Porcentaje de GC de la región intermedia
Secuencia consenso (<i>E. coli</i>)	T	G	T	A	A	A	N	N	N	N	N	N	T	T	T	A	C	A	-	-
Caja TyrR 1	C	G	T	A	A	A	C	A	A	T	C	G	T	G	T	A	C	G	75%	50%
Caja TyrR 2	T	G	T	A	A	C	G	A	T	T	T	C	T	G	T	A	C	G	75%	33.3%
Caja TyrR 3	T	G	T	A	A	C	G	A	T	T	T	G	T	G	T	A	C	G	75%	33.3%

Figura 12. Homología con respecto a la secuencia consenso de la caja TyrR de *E. coli* de las cajas TyrR de la región intergénica entre el gen *tyrR* y *dadA* en *A. brasilense* Sp7. En la imagen se pueden observar las secuencias de las cajas TyrR a analizar, en amarillo se resaltan los nucleótidos homólogos y la zona intermedia está marcada en azul.

8.2 Crecimiento de las cepas 2116, 2117 y 2118 con D-alanina como única fuente de carbono y nitrógeno.

En microorganismos como *E. coli* y *P. aeruginosa* la posesión de la D-alanina deshidrogenasa (DAO) confiere la capacidad de utilizar la D- y L- alanina como fuente de carbono, energía y nitrógeno para el crecimiento (Franklin & Venables, 1976). En el análisis de promotores se predijo la posición de supuestas cajas TyrR en la región intergénica entre los genes *tyrR* y *dadA*, lo que sugiere que la transcripción del gen que codifica para la DAO sería regulada por el factor TyrR, esto llevó a investigar si la mutación *tyrR* involucraba la interrupción del catabolismo del aminoácido D-alanina. En los resultados la mutación del gen *tyrR* en *A. brasilense* Sp 7 suprimió el crecimiento de la cepa en medio mínimo suplementado con D-alanina como única fuente de C, por lo que se formuló la hipótesis de que TyrR desempeña un papel en la utilización de D-alanina como fuente de N. Para comprobar esta hipótesis, se examinó la capacidad de las cepas Sp7, 2116, 2117 y 2118 para crecer en medio mínimo DL-malato sin cloruro de amonio (NH₄Cl) pero adicionado con D-alanina (20 mM) como única fuente de N. Los resultados fueron: la mutante *tyrR* mostro un crecimiento significativamente reducido, mientras que la cepa silvestre Sp 7 tiene un patrón similar al crecimiento en medio mínimo K-malato, en la cepa complementada, en la que se reintroduce el gen, se restauró completamente el crecimiento a los niveles de la cepa silvestre y finalmente la cepa 2118 que tenía función de control negativo al poseer el vector vacío, no restauró el crecimiento, lo que nos indica que el fenotipo de crecimiento reducido se debe a la mutación del gen *tyrR* (Figura 13). Con estos resultados se infirió que la enzima DAO codificada por el gen *AMK58_RS07035* es necesaria para la utilización de D-alanina como fuente de N en *A. brasilense* Sp7 y su expresión genética puede estar siendo afectada por la participación de TyrR.

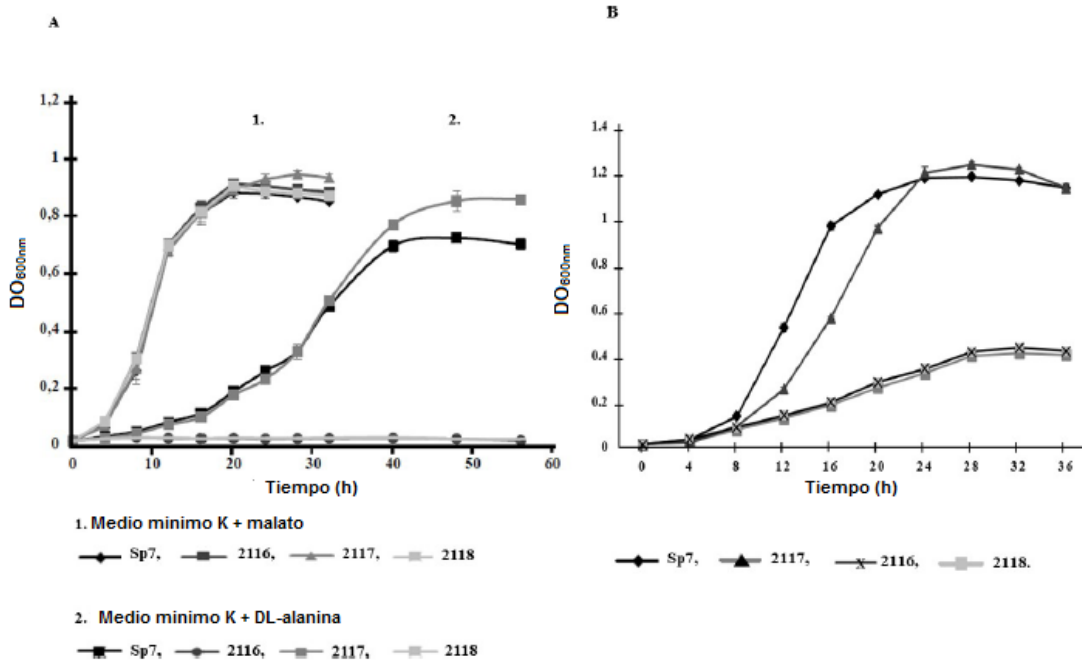


Figura 13. Curvas de crecimiento de las cepas *A. brasilense* Sp7, 2116, 2117 y 2118. A) Cinética de crecimiento de las cepas a estudiar en medio mínimo con malato o con DL-alanina como fuente de C. Las cepas se cultivaron en medio mínimo complementadas con malato (20 mM) o DL-alanina (20 mM) como fuente de C. El crecimiento se siguió midiendo la DO_{600nm} en periodos de 4 h hasta las 36 h. B) Crecimiento de *A. brasilense* Sp7 y derivadas en medio mínimo con D- alanina como única fuente de N. Las cepas se cultivaron en medio mínimo DL-malato suplementado con D-alanina (20mM) como única fuente de N. El crecimiento se siguió midiendo la DO_{600nm} en periodos de 4 h hasta las 36 h.

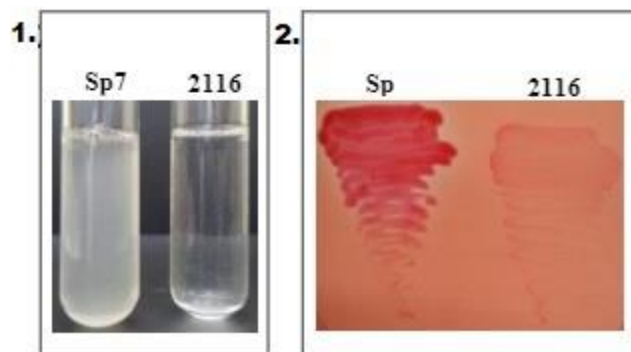


Figura 14. Cultivo de la cepa silvestre de *A. brasilense* Sp7 y la mutante *A. brasilense* 2116. 1) Cultivo de *A. brasilense* Sp7 y *A. brasilense* 2116 en medio mínimo con alanina como única fuente de C a las 48 horas de crecimiento, 2. Cultivo de *A. brasilense* Sp7 y *A. brasilense* 2116 en placa de medio mínimo con alanina como única fuente de C complementado con RC a los 5 días de crecimiento

8.3 Alteración en la síntesis de EPS.

Se observó que el crecimiento de la mutante 2116 en medio RC tenía un aspecto diferente al de la cepa silvestre Sp7, lo que sugiere que la captación del colorante RC disminuye considerablemente (Figura 14), del mismo modo, se observó que en la cepa complementada el fenotipo de la mutante se restauró. Para confirmar los datos, se utilizó el método de cuantificación de la unión de RC a los EPS, ya que se sabe que las bacterias del género *Azospirillum* son comúnmente identificadas con este colorante gracias a la afinidad que tiene con los EPS de estas bacterias. Asimismo, los EPS están asociados a la estructura de matriz de la biopelícula (Viruega-Gongora *et al.* 2020). En los resultados, se puede observar que la unión del RC a los EPS en la mutante disminuyó de manera significativa con respecto a lo visto en la cepa Sp7, finalmente en la cepa complementada el fenotipo se restauró (Figura 15).

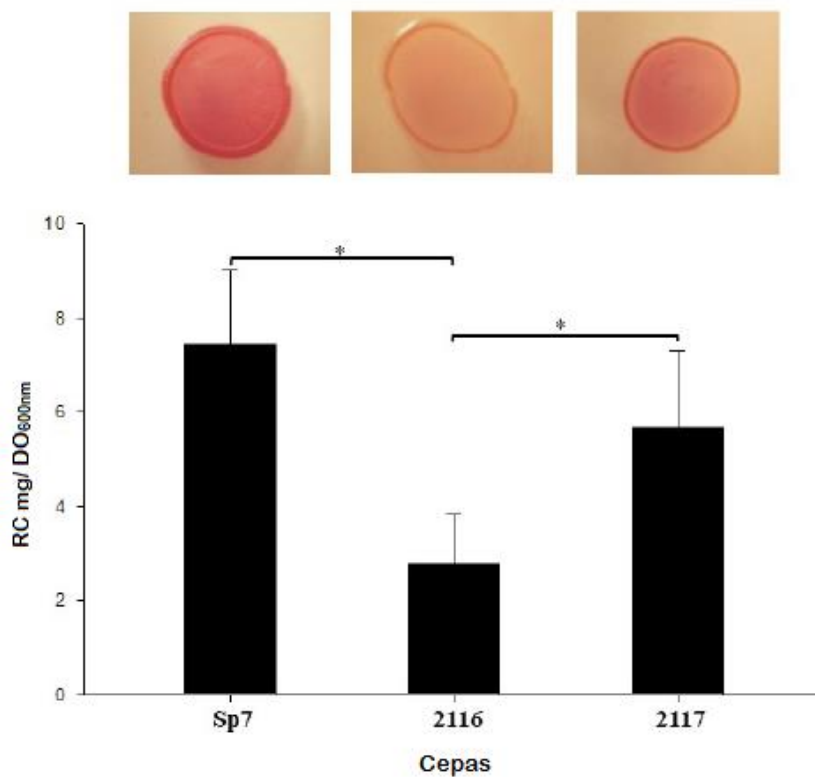


Figura 15. Cuantificación de la unión de RC a los EPS de las cepas *A. brasilense* Sp7, 2116 y 2117. Ensayo de unión del RC a EPS. Las células fueron cultivadas en medio RC solidificado inoculando 10 μ L de cada cepa, cuando estas alcanzaron una DO_{600nm} de 1.0, durante 72 h a 30° C. Para la cuantificación de la unión de RC a los EPS se siguió el método descrito en el apartado de Material y Métodos. La unión del colorante se expresa en mg de RC/DO_{600nm}.

8.4 Selección y análisis de genes para los que se realizó diseño de iniciadores.

Con los resultados del programa FIMO (Grant *et al.*, 2011), observamos la posición de cada secuencia consenso en el genoma y al conocer su contexto genómico pudimos predecir que genes son regulados putativamente por TyrR (Anexo 12.4). Con la predicción de dominios proteicos hecha con la aplicación SMART nos proporcionó información para conocer las estructuras de los productos de los genes, lo que nos permite inferir en que procesos metabólicos pudieran estar involucradas estas proteínas. Adicional a esto, utilizando los servidores SoftBerry (Solovyev & Salamov, 2011) y Virtual Footprint (Münch *et al.*, 2005), para localizar sitios de reconocimiento de los factores sigma, que sugiera o no que el factor σ -54 esté involucrado en la regulación de la transcripción de los genes.

Para seleccionar a los genes que se consideran de interés en el estudio, se tomaron en cuenta los siguientes criterios de inclusión:

- La distancia de la secuencia consenso TyrR con el ORF del gen de interés, que se encontrará en un rango de aproximadamente 50 a 400 p.b.
- El contexto genómico, así como la dirección de la transcripción de los genes río arriba y río abajo.
- Dominios proteicos que contiene la proteína codificada por el gen que se encuentra putativamente regulado por TyrR.
- El factor sigma involucrado, que preferiblemente contarán con la secuencia consenso de σ 54.
- El proceso celular en el que podría estar involucrado el gen de interés, que pudiera estar implicado en procesos de señalización.

Finalmente, con nuestros criterios de selección se eligieron nueve genes, para los cuales además se diseñaron oligonucleótidos para su análisis experimental posterior.

Gen	Ubicación	Caja TyrR (TGTAAG-N6-TTTACA)	Tipo de σ	Secuencia de unión de σ -35 / -10 (TTGACA-N17-TATAAT)	Score Softberry -10/-35	Distancia entre la secuencia σ y ORF
AMK58_RS03745 Histidina cinasa	Cadena Líder (Cromosoma)	IGTATTGCAG AATTGACA	70	TTAACGAGGTGCC GGGCCGCTTGCTA TAGT	64/37	47 p.b
AMK58_RS03835 Proteína para quimiotaxis CheY	Cadena Líder (Cromosoma)	GGTAACCCGA TATTTACG	70	TGGCCGTGAGGGA TGACTTTTCGGCAG ACT	37/18	107 p.b
AMK58_RS04510 MCP	Cadena complementaria (Cromosoma)	TGGAATACAA CCGTTACT	70	GTCATAAATATGAC CAGAAAACCCCTAAA AT	63/5	398 p.b
AMK58_RS04755 Proteína con dominio adenilato/guanilato ciclasa	Cadena complementaria (Cromosoma)	TGGAACATCG GCTGTACG	70	CTGACCTGCATCTT ATGAGGGGAAAAAAT	36/9	179 p.b
AMK58_RS22560 Proteína con dominio de autotransporte	Cadena complementaria (Plásmido 2)	TGCAATTTAG TTTTTACT	70	ATCAATCGCCTCTT TTTCTGCATAAT	57/5	144 p.b
AMK58_RS14355 Proteína de transporte de hierro ferroso A	Cadena líder (Plásmido 1)	CGTTACGCTT ATTTTACA	70	AAGCCCTAATCGC GGTAGGGCCGTTA CGCT	47/-28	125 p. b
AMK58_RS12430 Glucosiltransferasa	Cadena líder (Cromosoma)	TGGACAGCTA CCTGTCCG	x	x	x/x	x
AMK58_RS11295 Proteína fijadora de calcio	Cadena líder (cromosoma)	IGTATAGTTA AAGTCACA	70	ACGCCCTTAGGAAA AAGGTTAATGTATA GT	58/-28	74 p.b
AMK58_RS06745 Proteína de la familia OmpA	Cadena líder (Cromosoma)	TGTCACGTTA CATGCACG	70	TTTAGTGCGTCGCA GCACTGTG	58/19	178 p. b

Tabla 4. Análisis de los genes elegidos para diseño de iniciadores. En la tabla se muestra en verde, la información correspondiente al gen, en la fila amarilla esta la secuencia consenso de la Caja TyrR que se encuentra río arriba del gen en negritas se remarcan los nucleótidos conservados con respecto al consenso. La información de las filas color rojo, es la correspondiente al análisis de la búsqueda de promotores. En el caso del gen *AMK58_RS12430* los servidores informáticos no indicaron ninguna homología para las secuencias de unión de sigma.

8.4.1 Criterios a tomar en cuenta para el diseño de los iniciadores.

Para realizar el diseño de los oligonucleótidos, realizamos una investigación de los criterios que se deben cumplir según la bibliografía y lo observado experimentalmente, la investigación finalmente nos lleva a realizar un listado con los criterios, pero antes es preciso tener presente que se debe ser laxo con estas premisas ya que cada diseño es distinto y siempre se debe considerar el fin del estudio a realizar:

- Los cebadores deben tener entre 18- 24 pares de bases de longitud.
- Tener una T_m (Temperatura de hibridación) en un rango de 52 °C a 62 °C.
- El contenido de G:C entre 40% - 60%.
- La diferencia de T_m entre los dos cebadores no debe ser mayor a 5°C.

- Los iniciadores no deben favorecer las horquillas ni tener secuencias autocomplementarias.
- La energía libre de Gibbs (ΔG) de las horquillas, ya sean homodiméricas o heterodiméricas, deben ser ≤ -5.6 kcal/mol. Cuando los oligonucleótidos tienen una secuencia de enzima de restricción es común que pasen de este valor, experimentalmente no tiene repercusiones.
- Si en el estudio para el que se utilizarán los oligonucleótidos se hará una clonación posteriormente, hay que tener en cuenta el plásmido en el que se planea clonar el fragmento, para agregar los sitios para las enzimas de restricción. Si se utilizará un sitio múltiple de clonación, hay que tener en consideración no tener los mismos sitios de restricción en el amplificado.
- Debemos considerar que los cebadores sean específicos para la región a amplificar y que no tengan más sitios de hibridación en el genoma en el que se realizará el estudio (Buck *et al.*, 1999).

8.4.2 Análisis de la región río arriba del gen que codifica para una proteína cinasa histidínica.

Las proteínas cinasas histidínicas tienen un papel importante en la transducción de señales, actúan como transferasas de grupos fosfato. Además, participan en los sistemas de dos componentes, esto indica que son elementos clave en las redes de señalización en bacterias y participan en la regulación de varias funciones celulares. En los resultados obtenidos en el presente trabajo, se identificó al gen *AMK58_RS03745* que codifica para una cinasa histidínica, la cual contiene: un dominio CHASE, un dominio PAS, un dominio fosfoceptor (HisKA) y un dominio con actividad de ATPasa (HATPase_c) (Figura 16) (Wolanin *et al.*, 2002).

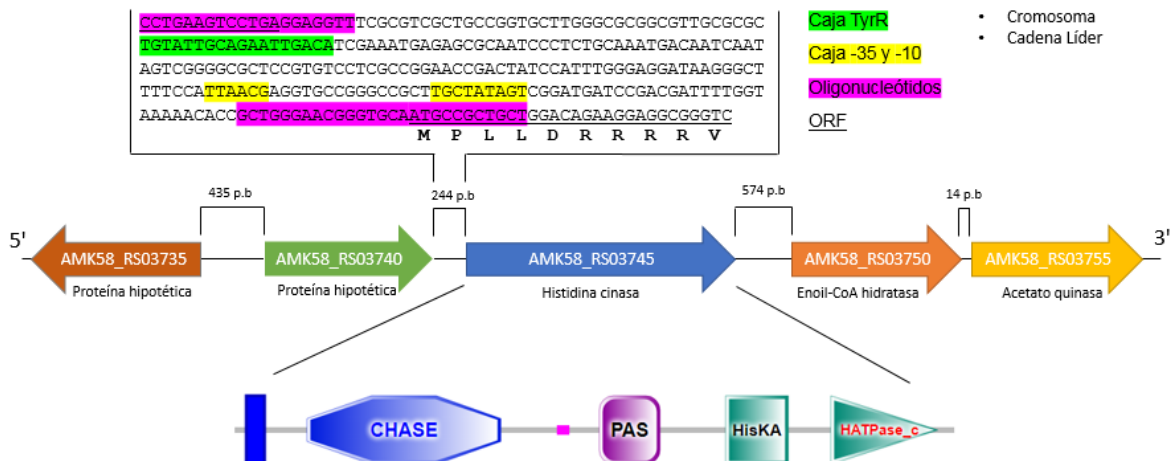


Figura 16. Contexto genético y región río arriba del gen que codifica para una proteína cinasa histidínica. Referencia de la Secuencia de NCBI utilizada: NZ_CP012914.1. El diagrama presentado se realizó utilizando la información obtenida de los servidores: FIMO, SoftBerry, Virtual Footprint y SMART.

8.4.3 Diseño de iniciadores y simulación de la construcción en el vector pRU1156 para la región rio arriba del gen *AMK58_RS03745*.

Posterior al análisis de la región rio arriba del gen, empleamos los programas informáticos: SnapGene y Oligoanalyzer para el diseño de los oligonucleótidos.

	Delantero (Foward)	Reverso (Reverse)
Nombre	AMK3745_F	AMK3745_R
Secuencia (5'-3')	TAAAGCTTCCTGAAGTCCTGAGGAGGTT	ATACTAGTGGCATTGCACCCGTTCCCAG
Secuencia de enzima añadida	HindIII (AAGCTT)	SpeI (ACTAGT)
Tamaño	28 p.b	28 p.b
%GC	46.4 %	53.6 %
Tm	60.8 °C	63.8 °C
Homo-dimero (ΔG más alta)	-10.23 kcal/mol	-7.05 kcal/mol
Hetero-dimero (ΔG más alta)	-4.64 kcal/mol	
Tamaño del amplificado	279 p.b	

Tabla 5. Información de los iniciadores diseñados para la amplificación de la región rio arriba del gen *AMK58_RS03745*. Información obtenida en el servidor Oligo Analyzer.

Posterior al diseño de iniciadores, se procedió a realizar una simulación de la construcción utilizando el vector pRU1156 y el gen *AMK58_RS03745* (Figura 17).

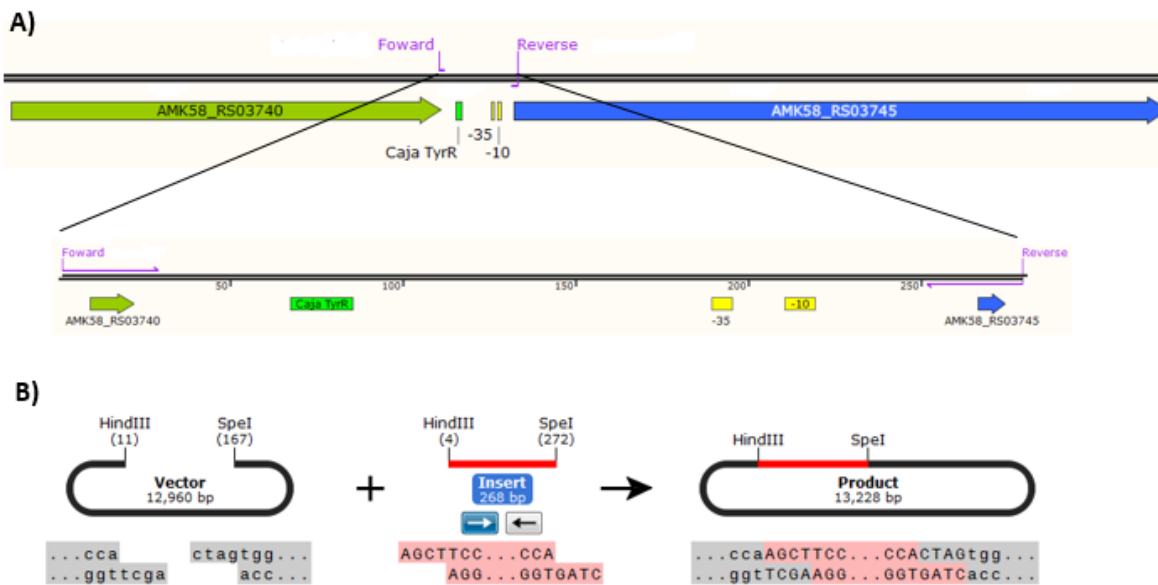


Figura 17. Simulación de la construcción del vector con el amplificado para el estudio de la región promotora del gen *AMK58_RS03745*. A) Contexto genético donde se observa la ubicación de los oligonucleótidos, inicialmente, se creó una simulación de la región a amplificar. B) Simulación del corte con enzimas de restricción (*HindIII* y *SpeI*) del vector y posteriormente del inserto para finalmente obtener la simulación de la construcción esperada, de esta forma también se comprobó el correcto diseño de los oligonucleótidos. La simulación se realizó con el programa SnapGene.

Para comprobar la correcta construcción del vector, es necesario realizar cortes con enzimas de restricción, cuyo patrón se observa a continuación.

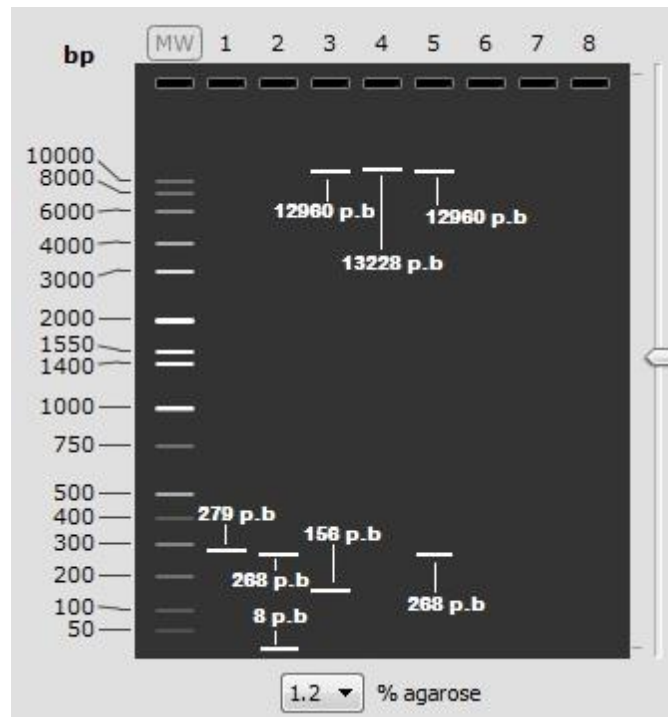


Figura 18. Simulación de gel de agarosa al 1.2% de los cortes enzimáticos para la comprobación de la construcción. MW: Marcador de peso molecular, Carril 1: Amplificado utilizando los oligonucleótidos AMK3745_F y AMK3745_R en el genoma de *A. brasilense* Sp 7 (279 pb), Carril 2: Amplificado después de los cortes con las enzimas de restricción *HindIII* y *SpeI* (268 pb), se observa una pequeña línea que corresponde a los pares de bases complementarios de las enzimas de restricción (8 pb), Carril 3: Alineamiento del vector pRU1156 con las enzimas *HindIII* y *SpeI* (12960 pb), se libera la región entre ambas enzimas (156 pb). Carril 4: Alineamiento de la construcción con la enzima *HindIII* (13228 pb). Carril 5: Comprobación de la construcción. Utilizando las enzimas *HindIII* y *SpeI*, se debe observar una banda de 12960 pb que corresponde al vector y una banda de 268 pb que corresponde a la región que nos interesa estudiar. La simulación se realizó con el programa SnapGene.

8.4.4 Análisis de la región río arriba del gen que codifica para una proteína implicada en quimiotaxis CheY.

La proteína CheY tiene actividad en la transducción de señales, involucrada en la quimiotaxis, por ser un regulador de respuesta que al recibir el grupo fosforilo de la cinasa histidínica CheA presenta afinidad por el motor flagelar. La unión de CheY fosforilado al motor flagelar activa el interruptor en la dirección de la rotación del flagelo, lo que provoca una inversión en el nado de la bacteria (Mukherjee et al., 2019).

Esta proteína está codificada por el gen *AMK58_RS03835*. Contiene un dominio REC, que se caracteriza por tener un residuo de aspartato que será el aceptor del grupo fosforilo en su región N-terminal (Galperin, 2006). En la siguiente imagen se muestra la secuencia río arriba del gen que codifica para la proteína CheY, su contexto genético y los dominios presentes en su estructura (Figura 19).

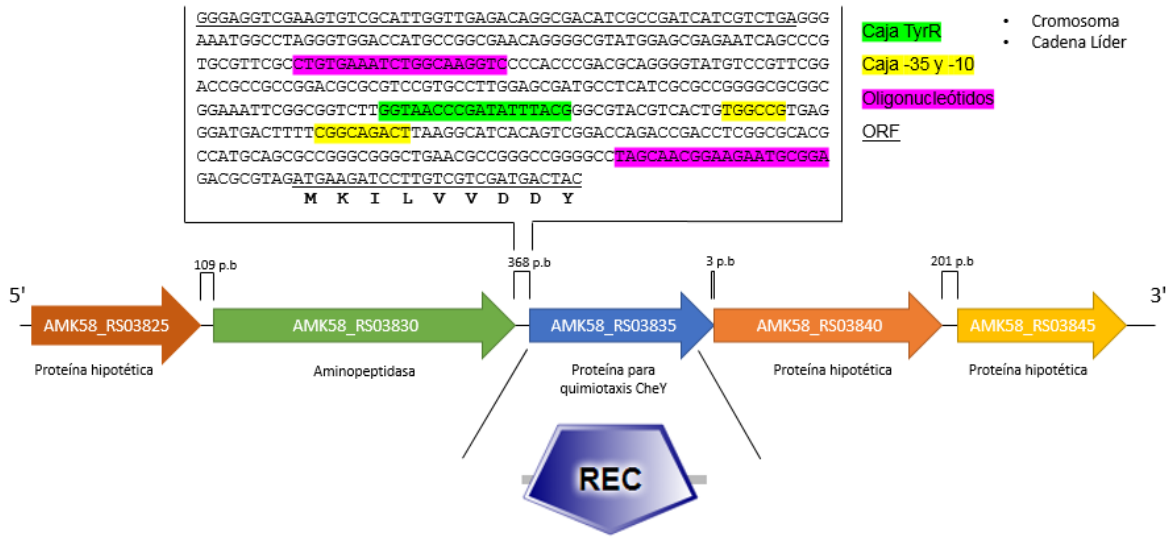


Figura 19. Contexto genético y región río arriba del gen que codifica para una proteína implicada en quimiotaxis CheY. Referencia de la Secuencia de NCBI utilizada: NZ_CP012914.1. El diagrama presentado se realizó utilizando la información obtenida de los servidores: FIMO, SoftBerry, Virtual Footprint y SMART.

8.4.5 Diseño de iniciadores y simulación de la construcción en el vector pRU1156 para la región río arriba del gen *AMK58_RS03835*.

Posterior al análisis de la región río arriba del gen, empleamos los programas informáticos: SnapGene y Oligoanalyzer para el diseño de los oligonucleótidos.

	Delantero (Forward)	Reverso (Reverse)
Nombre	AMK3835_F	AMK3835_R
Secuencia (5'-3')	ATAAGCTTCTGTGAAATCTGGCAAGGTC	CTACTAGTCCGCATTCTTCCGTTGCTA
Secuencia de enzima añadida	HindIII (AAGCTT)	SpeI (ACTAGT)
Tamaño	28 p.b	27 p.b
%GC	42.9 %	48.1 %
Tm	59 °C	59.7 °C
Homo-dimero (ΔG más alta)	-10.23 kcal/mol	-6.84 kcal/mole
Hetero-dimero (ΔG más alta)	-7.04 kcal/mole	
Tamaño del amplificado	302 p.b	

Tabla 6. Información de los iniciadores diseñados para la amplificación de la región río arriba del gen *AMK58_RS03835*. Información obtenida en el servidor Oligo Analyzer.

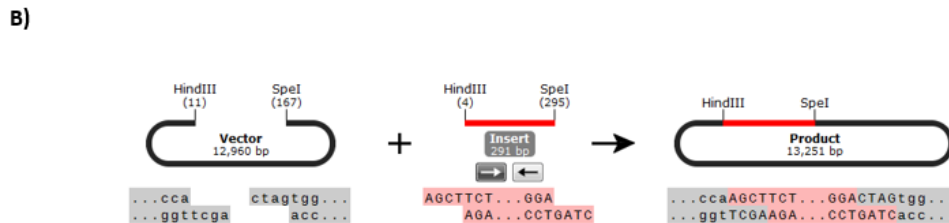
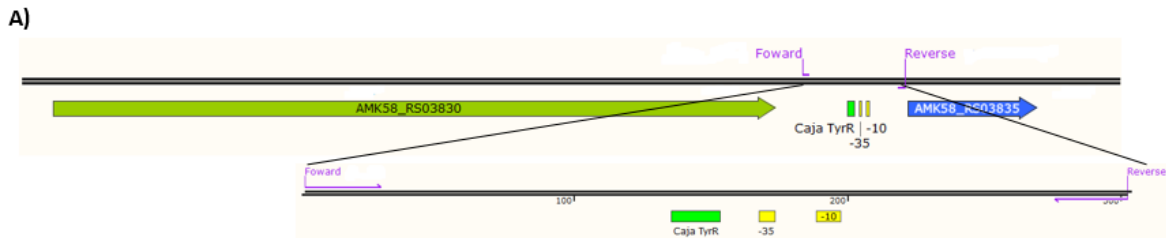


Figura 20. Simulación de la construcción del vector con el amplificado para el estudio de la región promotora del gen *AMK58_RS03835*. A) Contexto genético donde se observa la ubicación de los oligonucleótidos, inicialmente, se creó una simulación de la región a amplificar. B) Simulación del corte con enzimas de restricción (*HindIII* y *SpeI*) del vector y posteriormente del inserto para finalmente obtener la simulación de la construcción esperada, de esta forma también se comprobó el correcto diseño de los oligonucleótidos. La simulación se realizó con el programa SnapGene.

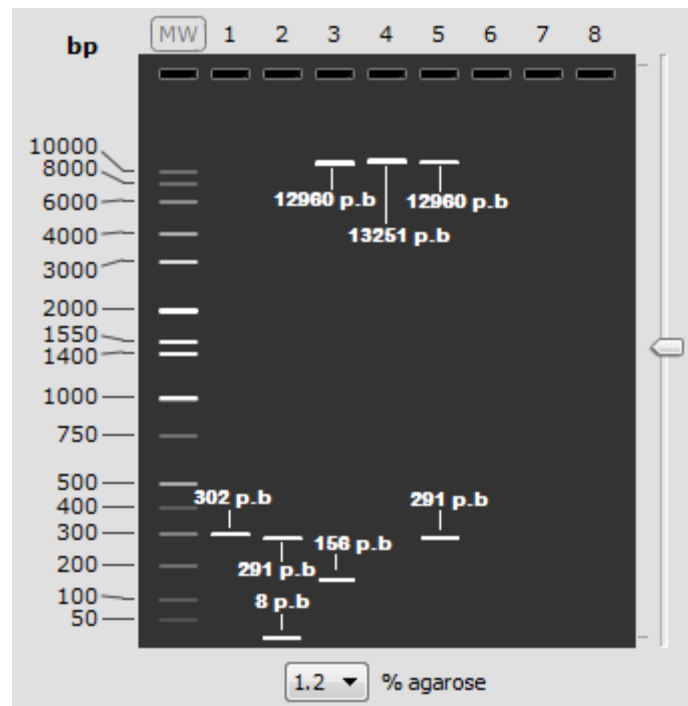


Figura 21. Simulación de gel de agarosa al 1.2% de los cortes enzimáticos para la comprobación de la construcción. MW: Marcador de peso molecular, Carril 1: Amplificado utilizando los oligonucleótidos AMK3835_F y AMK3835_R en el genoma de *A. brasilense* Sp 7 (302 pb), Carril 2: Amplificado después de los cortes con las enzimas de restricción *HindIII* y *SpeI* (291 pb), se observa una pequeña línea que corresponde a los pares de bases complementarios de las enzimas de restricción (8 pb), Carril 3: Linealización del vector pRU1156 con las enzimas *HindIII* y *SpeI* (12960 pb), se libera la región entre ambas enzimas (156 pb). Carril 4: Linealización de la construcción con la enzima *HindIII* (13251 pb). Carril 5: Comprobación de la construcción. Utilizando las enzimas *HindIII* y *SpeI*, se debe observar una banda de 12960 pb que corresponde al vector y

una banda de 291 p.b que corresponde a la región que nos interesa estudiar. La simulación se realizó con el programa SnapGene.

8.4.6 Análisis de la región río arriba del gen que codifica para una proteína receptora de quimiotaxis.

Se predice que el gen *AMK58_RS04505* codifica para una proteína receptora de quimiotaxis, en el análisis se observó que en esta proteína se encuentra: un dominio HAMP, un dominio MA y finalmente un dominio PilZ (Figura 22).

Los cambios en las concentraciones de los quimioefectores son detectados por los quimiorreceptores (MCPs), al unirse un quimioefector con una MCP conducirá a un cambio conformacional que se transmitirá al motor flagelar por una cascada de fosforelevo. De manera interesante podemos resaltar que el dominio PilZ representa una de las clases mejor caracterizadas de efectores de di-GMP-c, ya que estos receptores parecen tener las mayores afinidades al segundo mensajero, cuando el di-GMP-c se une al dominio PilZ este cambia su conformación y regula de manera alostérica las actividades de los dominios de salida vinculados, además funciona como un módulo versátil que regula diversas actividades que son dependientes de di-GMP-c. Este dominio está presente en el receptor de quimiotaxis Tlp1 de *A. brasilense* que tiene función como sensor de energía e interviene en la capacidad de la bacteria para navegar en gradientes de compuestos que afectan los niveles de energía intracelular, como son el oxígeno y los ácidos orgánicos (Amikam & Galperin, 2006; Galperin & Chou, 2019; O'Neal *et al.*, 2019; O'Neal *et al.*, 2017).

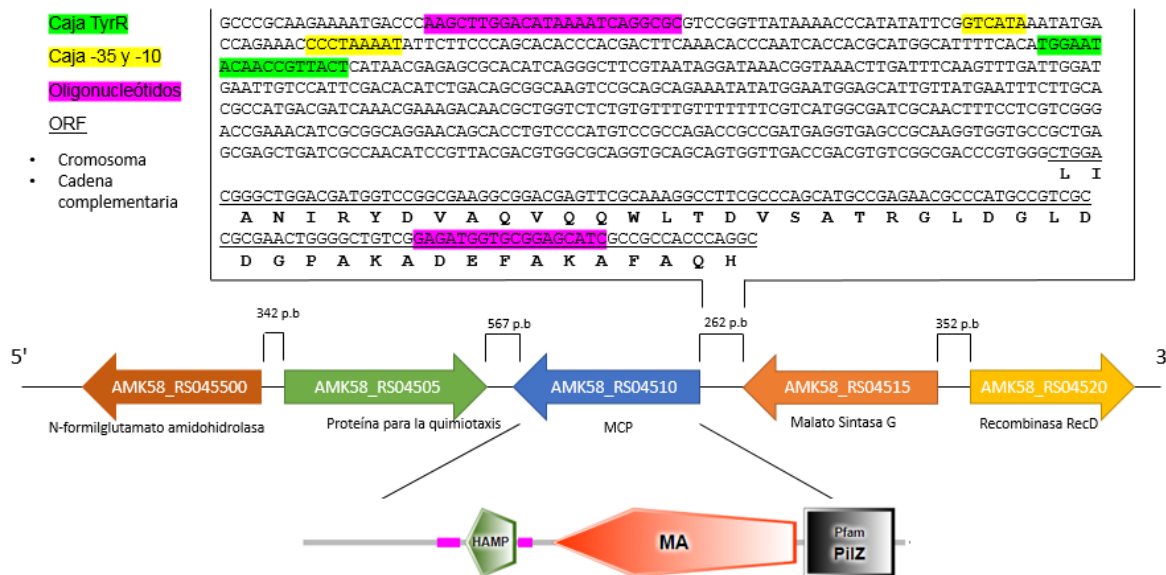


Figura 22. Contexto genético y región río arriba del gen que codifica para una proteína implicada receptora de quimiotaxis. Referencia de la Secuencia de NCBI utilizada: NZ_CP012914.1. El diagrama presentado se realizó utilizando la información obtenida de los servidores: FIMO, SoftBerry, Virtual Footprint y SMART.

8.4.7 Diseño de iniciadores y simulación de la construcción en el vector pRU1156 para la región rio arriba del gen *AMK58_RS04510*.

	Delantero (Foward)	Reverso (Reverse)
Nombre	AMK4510_F	AMK4510_R
Secuencia (5'-3')	TTAAGCTTGGACATAAAAATCAGGCGC	CTACTAGTGATGCTCCGCACCATCTC
Secuencia de enzima añadida	HindIII (AAGCTT)	SpeI (ACTAGT)
Tamaño	26 p.b	26 p.b
%GC	42.3 %	53.8 %
Tm	58 °C	60.3 °C
Homo-dimero (ΔG más alta)	-10.23 kcal/mol	-6.84 kcal/mol
Hetero-dimero (ΔG más alta)	-6.75 kcal/mol	
Tamaño del amplificado	684 p.b	

Tabla 7. Información de los iniciadores diseñados para la amplificación de la región rio arriba del gen *AMK58_RS04510*. Información obtenida en el servidor Oligo Analyzer.

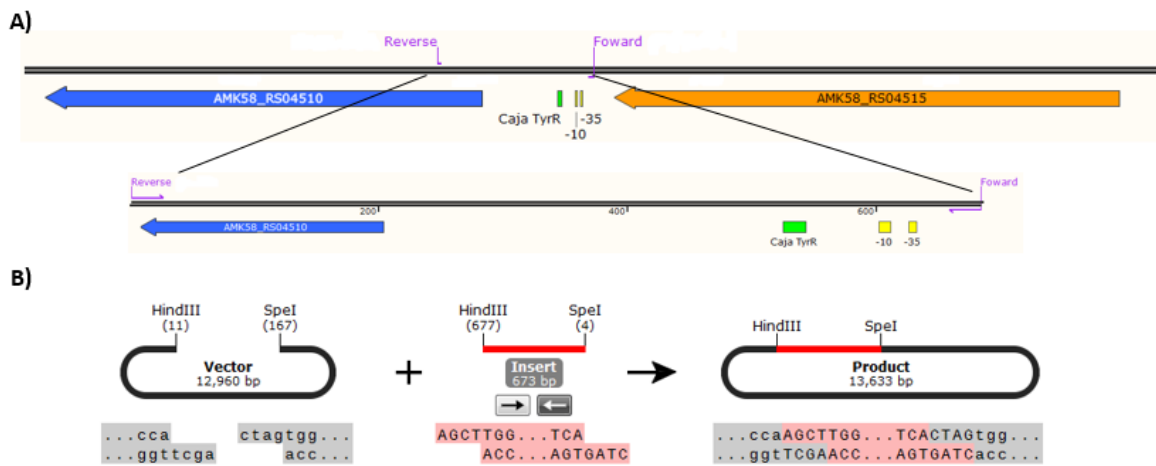


Figura 23. Simulación de la construcción del vector con el amplificado para el estudio de la región promotora del gen *AMK58_RS04510*. A) Contexto genético donde se observa la ubicación de los oligonucleótidos, inicialmente, se creó una simulación de la región a amplificar. B) Simulación del corte con enzimas de restricción (*HindIII* y *SpeI*) del vector y posteriormente del inserto para finalmente obtener la simulación de la construcción esperada, de esta forma también se comprobó el correcto diseño de los oligonucleótidos. La simulación se realizó con el programa SnapGene.

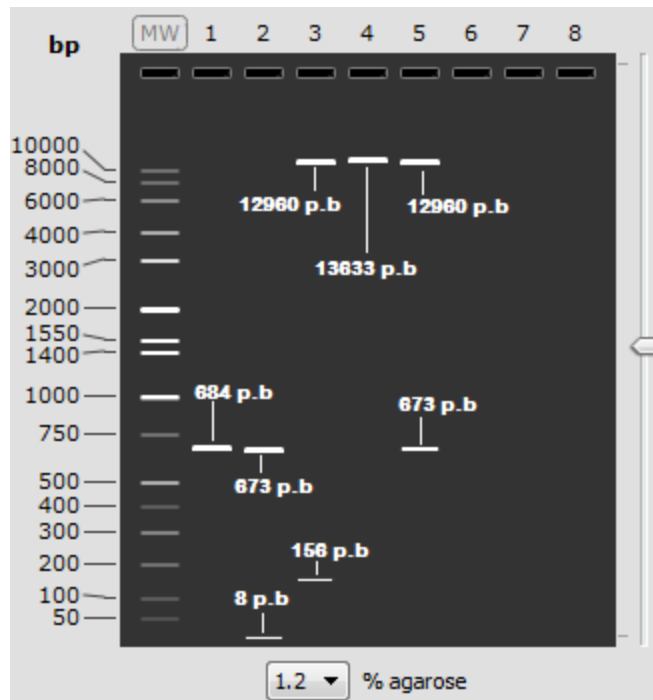


Figura 24. Simulación de gel de agarosa al 1.2% de los cortes enzimáticos para la comprobación de la construcción. MW: Marcador de peso molecular, Carril 1: Amplificado utilizando los oligonucleótidos AMK4510_F y AMK4510_R en el genoma de *A. brasilense* Sp 7 (684 pb), Carril 2: Amplificado después de los cortes con las enzimas de restricción *Hind*III y *Spe*I (673 pb), se observa una pequeña línea que corresponde a los pares de bases complementarios de las enzimas de restricción (8 pb), Carril 3: Linealización del vector pRU1156 con las enzimas *Hind*III y *Spe*I (12960 pb), se libera la región entre ambas enzimas (156 pb). Carril 4: Linealización de la construcción con la enzima *Hind*III (13633 pb). Carril 5: Comprobación de la construcción. Utilizando las enzimas *Hind*III y *Spe*I, se debe observar una banda de 12960 pb que corresponde al vector y una banda de 673 pb que corresponde a la región que nos interesa estudiar. La simulación se realizó con el programa SnapGene.

8.4.8 Análisis de la región río arriba del gen que codifica para una proteína con dominio adenilato/guanilato ciclasa.

En esta proteína codificada por el gen *AMK58_RS04755* encontramos un dominio CYCc y un dominio FHA (Figura 25). El dominio CYCc tiene una actividad catalítica de guanilato ciclasa, ya que promueve la formación de GMP cíclico (GMPc) a partir de GTP. El GMPc participa como segundo mensajero. A las proteínas con este dominio las encontramos en forma soluble o ancladas a la membrana, la mayoría de las formas unidas a la membrana tienen función como receptores de pequeños polipéptidos, las formas solubles son comúnmente encontradas como heterodímeros. En las células podemos encontrar receptores cuyas funciones son reguladas por el GMPc (fosfodiesterasas, proteínas cinasas reguladas y canales iónicos) (Garbers, 1992).

El dominio FHA es un dominio de reconocimiento de fosfopéptidos, el cual se encuentran en muchas proteínas reguladoras. Este dominio está presente en una amplia gama de proteínas que participan en diferentes procesos celulares como

son: reparación del ADN, transducción de señales transporte vesicular, degradación de proteínas, etcétera (Durocher & Jackson, 2002).

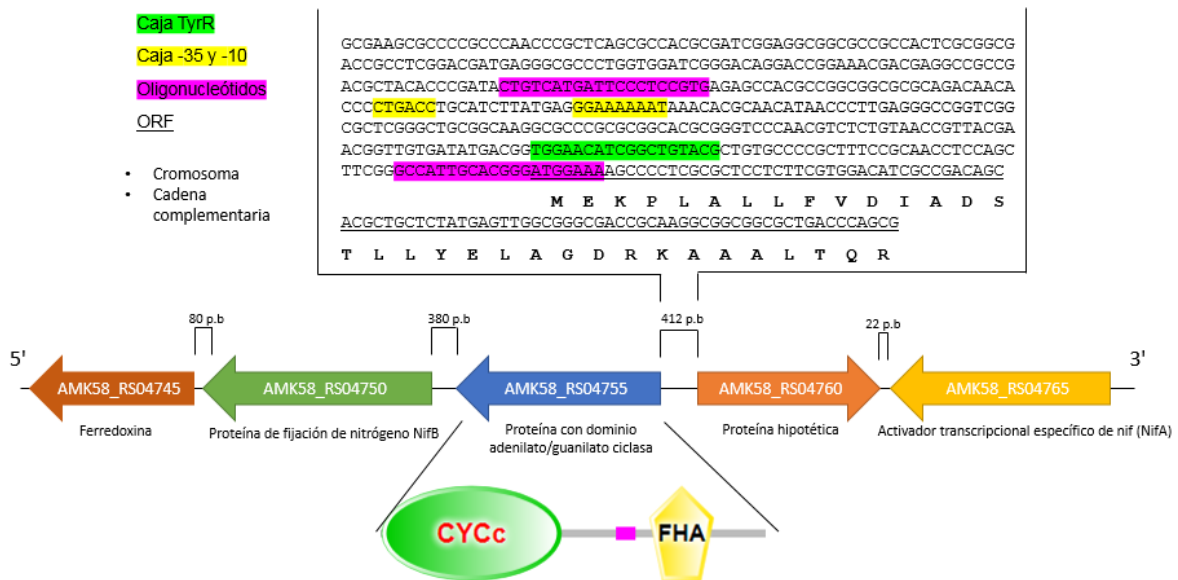


Figura 25. Contexto genético y región río arriba del gen que codifica para una proteína con dominio adenilato/guanilato ciclasa. Referencia de la Secuencia de NCBI utilizada: NZ_CP012914.1. El diagrama presentado se realizó utilizando la información obtenida de los servidores: FIMO, SoftBerry, Virtual Footprint y SMART.

8.4.9 Diseño de iniciadores y simulación de la construcción en el vector pRU1156 para la región río arriba del gen *AMK58_RS04755*.

	Delantero (Foward)	Reverso (Reverse)
Nombre	AMK4755_F	AMK4755_R
Secuencia (5'-3')	TTAAGCTTCTGTCATGATTCCCTCCGTG	CTACTAGTTTCCATCCCCTGCAATGGC
Secuencia de enzima añadida	HindIII (AAGCTT)	SpeI (ACTAGT)
Tamaño	28 p.b	27 p.b
%GC	46.4 %	51.9 %
Tm	60.1 °C	61.2 °C
Homo-dimero (ΔG más alta)	-10.23 kcal/mol	-7.05 kcal/mol
Hetero-dimero (ΔG más alta)	-3.61 kcal/mole	
Tamaño del amplificado	282 p.b	

Tabla 8. Información de los iniciadores diseñados para la amplificación de la región río arriba del gen *AMK58_RS04755*. Información obtenida en el servidor Oligo Analyzer.

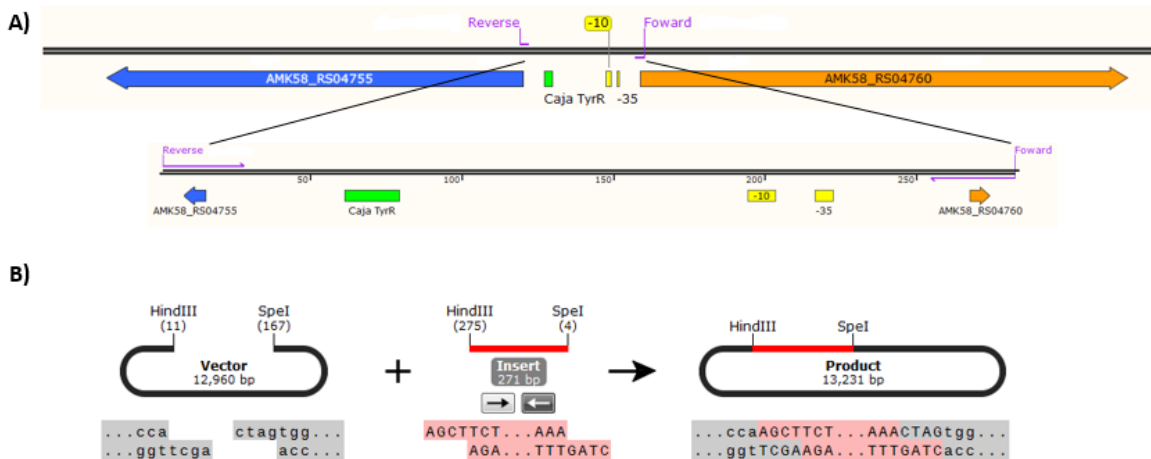


Figura 26. Simulación de la construcción del vector con el amplificado para el estudio de la región promotora del gen *AMK58_RS04755*. A) Contexto genético donde se observa la ubicación de los oligonucleótidos, inicialmente, se creó una simulación de la región a amplificar. B) Simulación del corte con enzimas de restricción (*HindIII* y *SpeI*) del vector y posteriormente del inserto para finalmente obtener la simulación de la construcción esperada, de esta forma también se comprobó el correcto diseño de los oligonucleótidos. La simulación se realizó con el programa SnapGene.

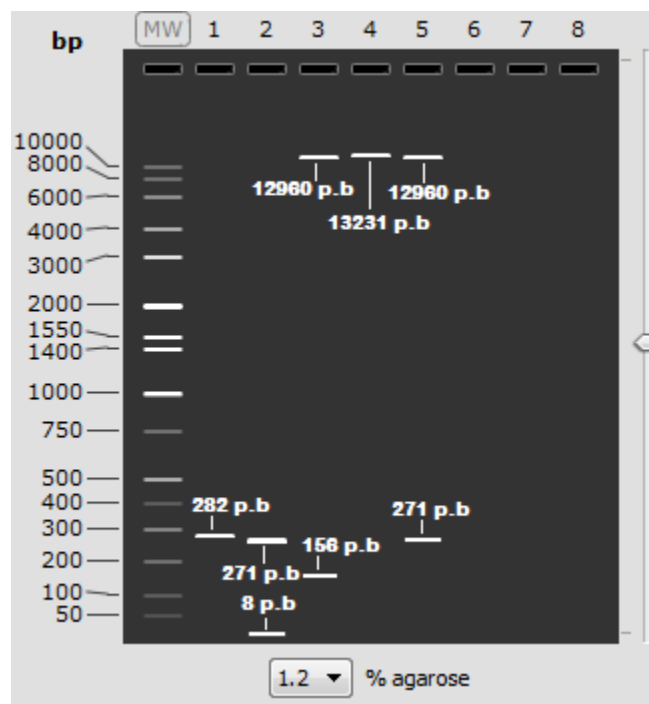


Figura 27. Simulación de gel de agarosa al 1.2% de los cortes enzimáticos para la comprobación de la construcción. MW: Marcador de peso molecular, Carril 1: Amplificado utilizando los oligonucleótidos AMK4755_F y AMK4755_R en el genoma de *A. brasilense* Sp 7 (282 pb), Carril 2: Amplificado después de los cortes con las enzimas de restricción *HindIII* y *SpeI* (271 pb), se observa una pequeña línea que corresponde a los pares de bases complementarios de las enzimas de restricción (8 pb), Carril 3: Linealización del vector pRU1156 con las enzimas *HindIII* y *SpeI* (12960 pb), se libera la región entre ambas enzimas (156 pb). Carril 4: Linealización de la construcción con la enzima *HindIII* (13231 pb). Carril 5: Comprobación de la construcción. Utilizando

las enzimas *HindIII* y *SpeI*, se debe observar una banda de 12960 pb que corresponde al vector y una banda de 271 pb que corresponde a la región que nos interesa estudiar. La simulación se realizó con el programa SnapGene.

8.4.10 Análisis de la región río arriba del gen que codifica para una proteína con dominio de autotransporte.

Con las predicciones hechas en el servidor, suponemos que esta proteína codificada por el gen *AMK58_RS22560* contiene un dominio de autotransporte (Figura 28). Se sabe que la secreción de productos proteicos se produce por varias vías diferentes, una de estas vías, la vía tipo V, se caracteriza porque el producto que media la secreción a través de la membrana externa está contenido dentro de la propia proteína secretada, a las que se conoce como proteína de autotransporte. Este dominio se caracteriza por formar una estructura similar a una porina comprendida por laminas β antiparalelas dispuestas en una conformación hipotética de barril (Henderson *et al.*, 1998).

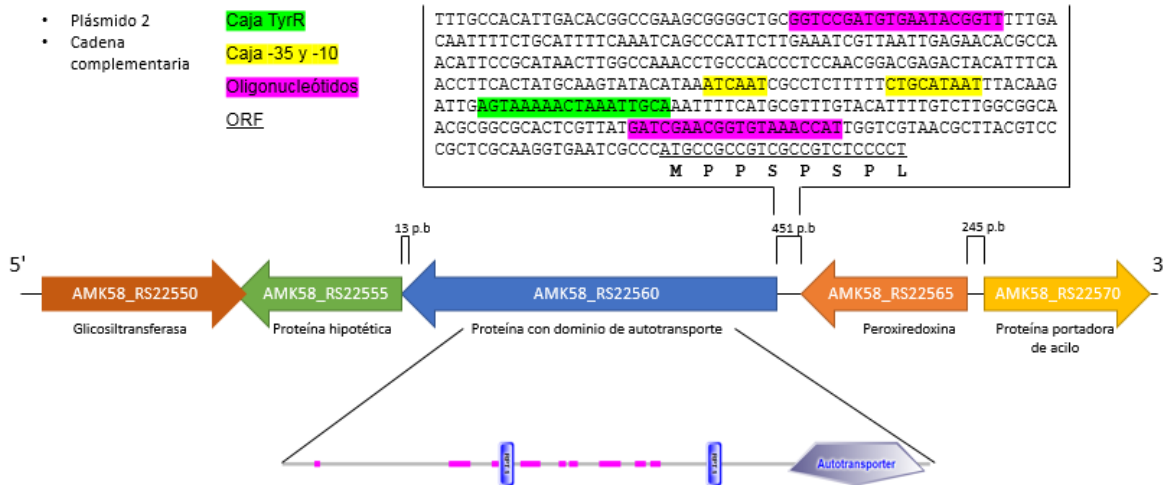


Figura 28. Contexto genético y región río arriba del gen que codifica para una proteína con dominio de autotransporte. Referencia de la Secuencia de NCBI utilizada: NZ_CP012914.1. El diagrama presentado se realizó utilizando la información obtenida de los servidores: FIMO, SoftBerry, Virtual Footprint y SMART.

8.4.11 Diseño de iniciadores y simulación de la construcción en el vector pRU1156 para la región rio arriba del gen *AMK58_RS22560*.

	Delantero (Foward)	Reverso (Reverse)
Nombre	AMK22560_F	AMK22560_R
Secuencia (5'-3')	ATAAGCTTGGTCCGATGTGAATACGGTT	GCACTAGTATGGTTTACACCGTTCGATC
Secuencia de enzima añadida	HindIII (AAGCTT)	SpeI (ACTAGT)
Tamaño	28 p.b	28 p.b
%GC	42.9 %	46.4 %
Tm	59.9 °C	58.8 °C
Homo-dimero (ΔG más alta)	-10.23 kcal/mol	-6.84 kcal/mol
Hetero-dimero (ΔG más alta)	-9.36 kcal/mol	
Tamaño del amplificado	311 p.b	

Tabla 9. Información de los iniciadores diseñados para la amplificación de la región rio arriba del gen *AMK58_RS22560*. Información obtenida en el servidor Oligo Analyzer.

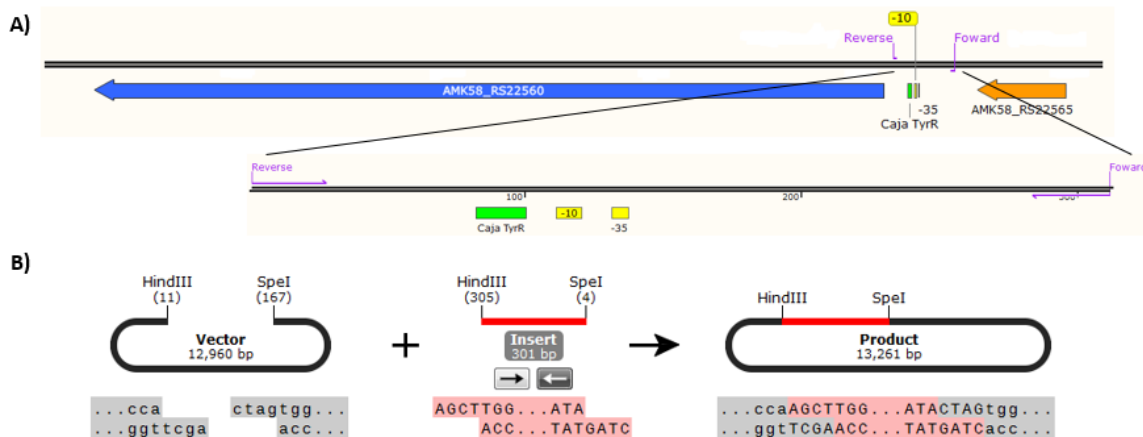


Figura 29. Simulación de la construcción del vector con el amplificado para el estudio de la región promotora del gen *AMK58_RS22560*. A) Contexto genético donde se observa la ubicación de los oligonucleótidos, inicialmente, se creó una simulación de la región a amplificar. B) Simulación del corte con enzimas de restricción (*HindIII* y *SpeI*) del vector y posteriormente del inserto para finalmente obtener la simulación de la construcción esperada, de esta forma también se comprobó el correcto diseño de los oligonucleótidos. La simulación se realizó con el programa SnapGene.

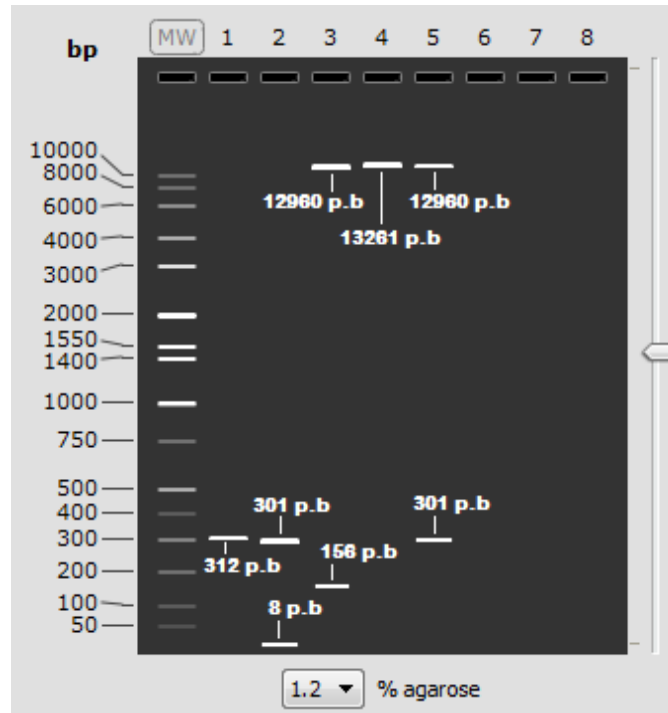


Figura 30. Simulación de gel de agarosa al 1.2% de los cortes enzimáticos para la comprobación de la construcción. MW: Marcador de peso molecular, Carril 1: Amplificado utilizando los oligonucleótidos AMK22560_F y AMK22560_R en el genoma de *A. brasilense* Sp 7 (312 pb), Carril 2: Amplificado después de los cortes con las enzimas de restricción *HindIII* y *SpeI* (301 pb), se observa una pequeña línea que corresponde a los pares de bases complementarios de las enzimas de restricción (8 pb), Carril 3: Linealización del vector pRU1156 con las enzimas *HindIII* y *SpeI* (12960 pb), se libera la región entre ambas enzimas (156 pb). Carril 4: Linealización de la construcción con la enzima *HindIII* (13261 pb). Carril 5: Comprobación de la construcción. Utilizando las enzimas *HindIII* y *SpeI*, se debe observar una banda de 12960 pb que corresponde al vector y una banda de 301 pb que corresponde a la región que nos interesa estudiar. La simulación se realizó con el programa SnapGene.

8.4.12 Análisis de la región rio arriba del gen que codifica para una proteína de transporte de hierro ferroso A.

Esta proteína codificada por el gen *AMK58_RS14355* se caracteriza por formar parte del sistema de transporte de hierro ferroso “Feo”, dicho sistema está conformado por tres genes, *feoA*, *feoB* y *feoC*. *FeoA* es una proteína soluble pequeña probablemente ubicada en el citosol, cuya función no se ha elucidado por completo, se sugiere que podría estar interactuando con *FeoB*, la cual contiene un dominio de proteína G y un dominio integral de membrana con motivos de “ala de mosca” que funciona como la permeasa de Fe^{2+} , finalmente como parte de este sistema encontramos a *FeoC*, que aparentemente funciona como un regulador transcripcional (Lau *et al.*, 2016)

En esta proteína encontramos un único dominio central *FeoA*, al que se sugiere que puede unirse a metales, en la mayoría de los casos, hierro o manganeso (Figura 31) (Lau *et al.*, 2013).

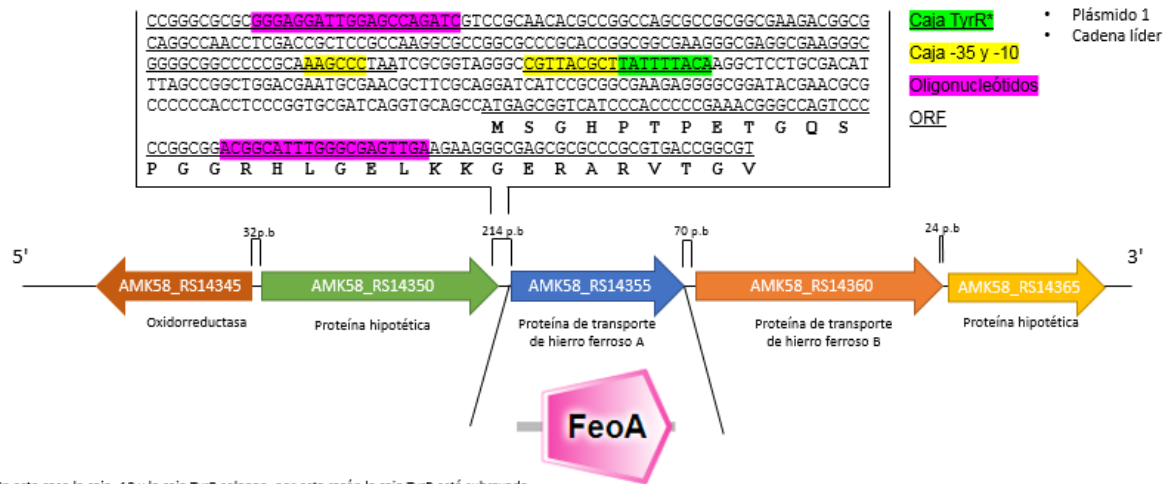


Figura 31. Contexto genético y región río arriba del gen que codifica para una proteína con dominio de transporte de hierro ferroso A. Referencia de la Secuencia de NCBI utilizada: NZ_CP012914.1. El diagrama presentado se realizó utilizando la información obtenida de los servidores: FIMO, SoftBerry, Virtual Footprint y SMART.

8.4.13 Diseño de iniciadores y simulación de la construcción en el vector pRU1156 para la región río arriba del gen *AMK58_RS14355*.

	Delantero (Forward)	Reverso (Reverse)
Nombre	AMK14355_F	AMK14355_R
Secuencia (5'-3')	ATAAGCTT GGGAGGATTGGAGCCAGATC	ATACTAG TCAACTCGCCAAATGCCGT
Secuencia de enzima añadida	HindIII (AAGCTT)	SpeI (ACTAGT)
Tamaño	28 p.b	27 p.b
%GC	50 %	48.1 %
Tm	61.7 °C	61.8 °C
Homo-dimero (ΔG más alta)	-10.23 kcal/mol	-6.84 kcal/mol
Hetero-dimero (ΔG más alta)	-10.04 kcal/mol	
Tamaño del amplificado	378 p.b	

Tabla 10. Información de los iniciadores diseñados para la amplificación de la región río arriba del gen *AMK58_RS14355*. Información obtenida en el servidor Oligo Analyzer.

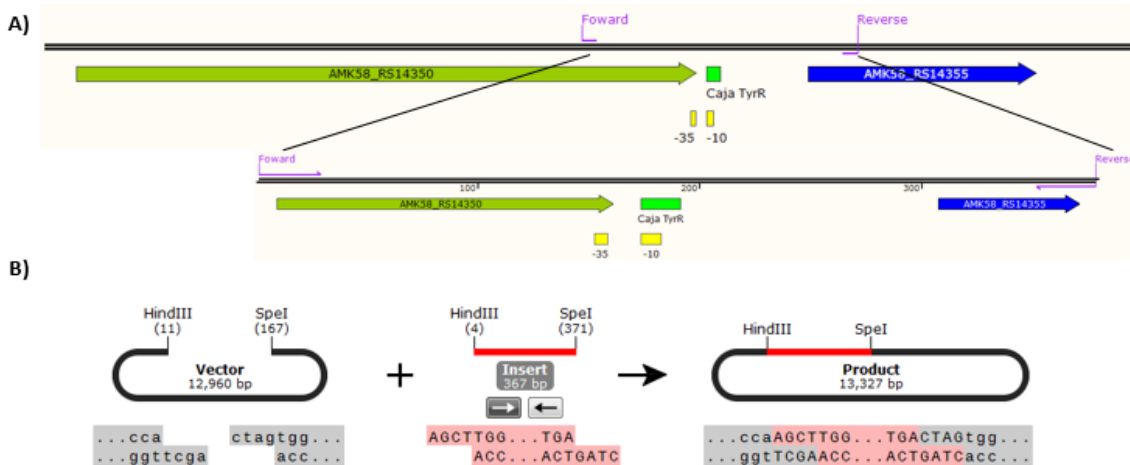


Figura 32. Simulación de la construcción del vector con el amplificado para el estudio de la región promotora del gen *AMK58_RS14355*. A) Contexto genético donde se observa la ubicación de los oligonucleótidos, inicialmente, se creó una simulación de la región a amplificar. B) Simulación del corte con enzimas de restricción (*Hind*III y *Spe*I) del vector y posteriormente del inserto para finalmente obtener la simulación de la construcción esperada, de esta forma también se comprobó el correcto diseño de los oligonucleótidos. La simulación se realizó con el programa SnapGene.

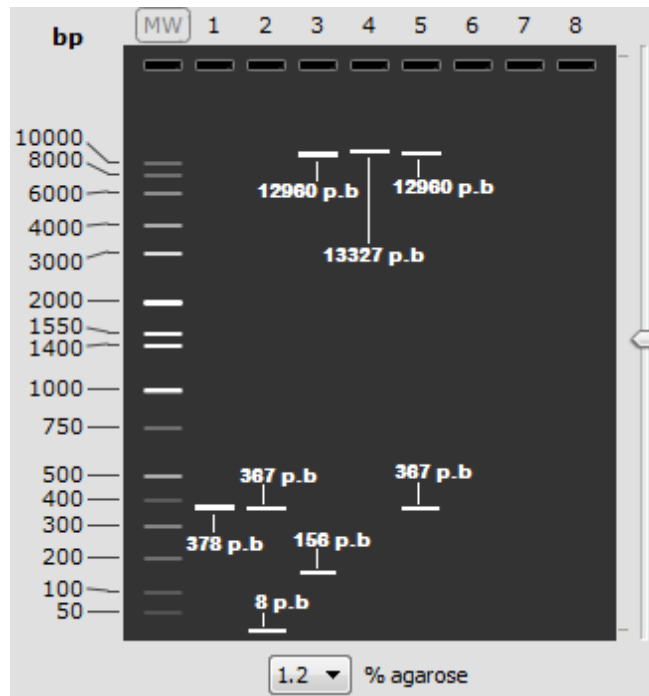


Figura 33. Simulación de gel de agarosa al 1.2% de los cortes enzimáticos para la comprobación de la construcción. MW: Marcador de peso molecular, Carril 1: Amplificado utilizando los oligonucleótidos AMK14355_F y AMK14355_R en el genoma de *A. brasilense* Sp 7 (378 pb), Carril 2: Amplificado después de los cortes con las enzimas de restricción *Hind*III y *Spe*I (367 pb), se observa una pequeña línea que corresponde a los pares de bases complementarios de las enzimas de restricción (8 pb), Carril 3: Linealización del vector pRU1156 con las enzimas *Hind*III y *Spe*I (12960 pb), se libera la región entre ambas enzimas (156 pb). Carril 4: Linealización de la construcción con la enzima *Hind*III (13327 pb). Carril 5: Comprobación de la construcción. Utilizando

las enzimas *HindIII* y *SpeI*, se debe observar una banda de 12960 pb que corresponde al vector y una banda de 367 pb que corresponde a la región que nos interesa estudiar. La simulación se realizó con el programa SnapGene.

8.4.14 Análisis de la región río arriba del gen que codifica para una proteína glucosiltransferasa.

Para llevar a cabo la biosíntesis de disacáridos, oligosacáridos y polisacáridos se necesita de la acción de enzimas con dominios de glucosiltransferasa. Estas proteínas catalizan la transferencia de los residuos de azúcar de moléculas donantes (UDP-glucosa, UDP-N-acetil-galactosamina, GDP-manosa o CDP-abequose) a sustratos como son la celulosa, dolicol fosfato y ácidos teicoicos, para esta unión se formarán enlaces glucosídicos (Campbell *et al.*, 1998). En este estudio se identificó que el gen *AMK58_RS12430* codifica para una proteína con actividad de glucosiltransferasa (Figura 34).

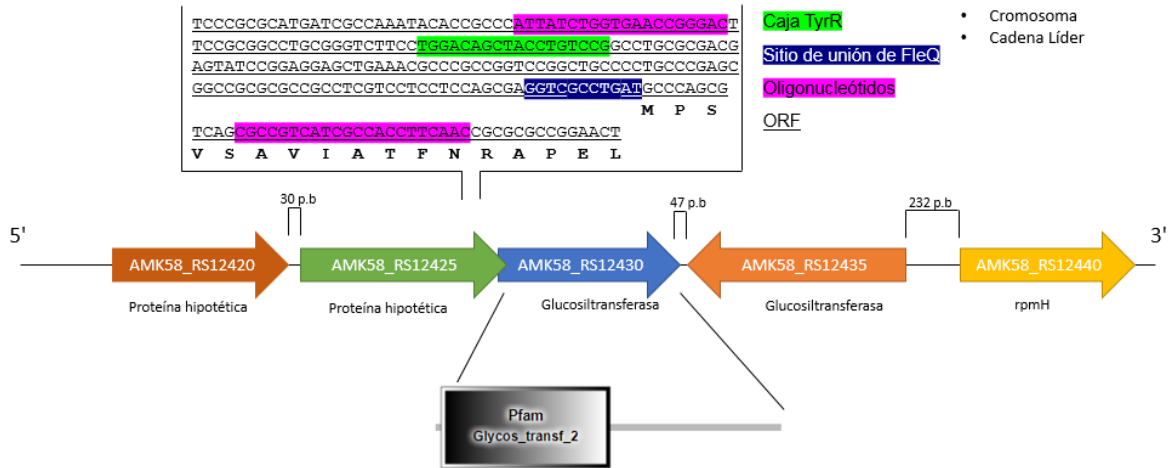


Figura 34. Contexto genético y región río arriba del gen que codifica para una proteína glucosiltransferasa. Referencia de la Secuencia de NCBI utilizada: NZ_CP012914.1. El diagrama presentado se realizó utilizando la información obtenida de los servidores: FIMO, SoftBerry, Virtual Footprint y SMART.

8.4.15 Diseño de iniciadores y simulación de la construcción en el vector pRU1156 para la región río arriba del gen *AMK58_RS12430*.

	Delantero (Forward)	Reverso (Reverse)
Nombre	AMK12430_F	AMK12430_R
Secuencia (5'-3')	CGAAGCTT ATTATCTGGTGAACCGGGAC	TTACTAGT TGAAGGTGGCGATGACGGC
Secuencia de enzima añadida	HindIII (AAGCTT)	SpeI (ACTAGT)
Tamaño	28 p.b	27 p.b
%GC	50 %	51.9 %
Tm	60.5 °C	62.1 °C
Homo-dimero (ΔG más alta)	-10.23 kcal/mol	-6.84 kcal/mol
Hetero-dimero (ΔG más alta)	-6.68 kcal/mol	
Tamaño del amplificado	214 p.b	

Tabla 11. Información de los iniciadores diseñados para la amplificación de la región río arriba del gen *AMK58_RS12430*. Información obtenida en el servidor Oligo Analyzer.

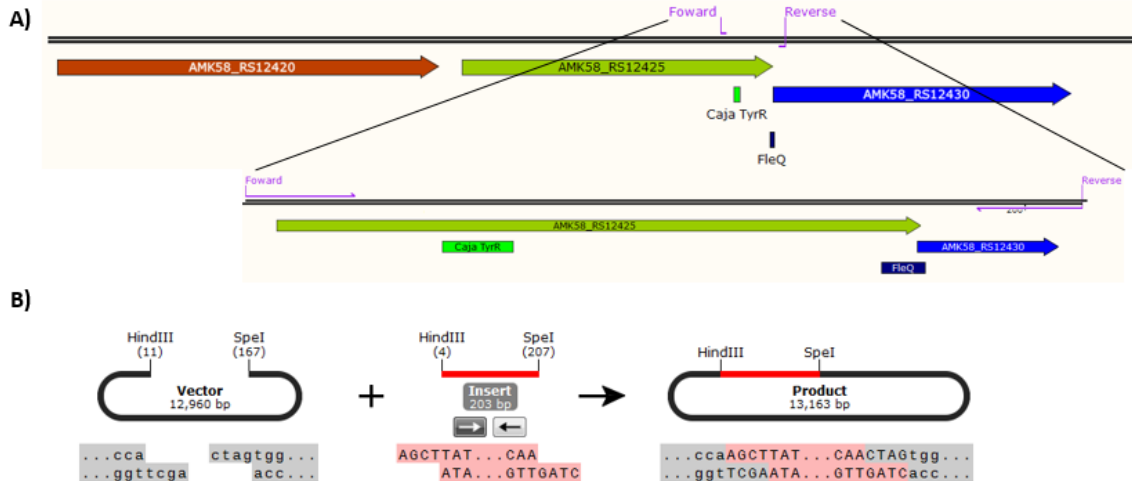


Figura 35. Simulación de la construcción del vector con el amplificado para el estudio de la región promotora del gen *AMK58_RS12430*. A) Contexto genético donde se observa la ubicación de los oligonucleótidos, inicialmente, se creó una simulación de la región a amplificar. B) Simulación del corte con enzimas de restricción (*HindIII* y *SpeI*) del vector y posteriormente del inserto para finalmente obtener la simulación de la construcción esperada, de esta forma también se comprobó el correcto diseño de los oligonucleótidos. La simulación se realizó con el programa SnapGene.

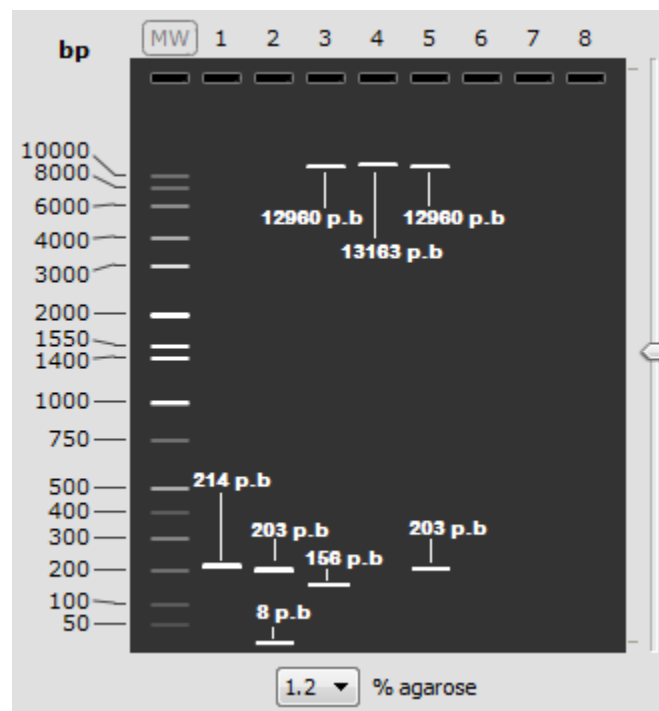
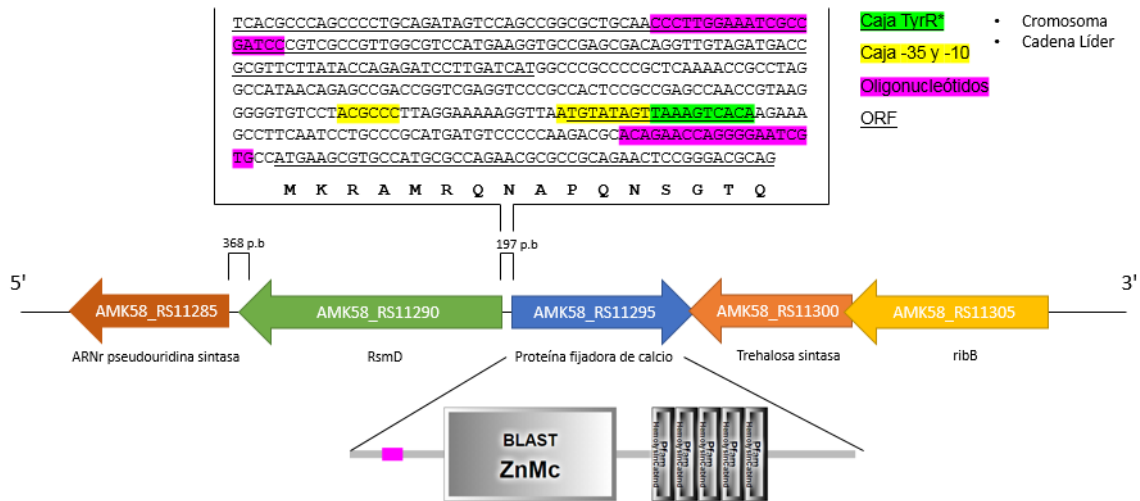


Figura 36. Simulación de gel de agarosa al 1.2% de los cortes enzimáticos para la comprobación de la construcción. MW: Marcador de peso molecular, Carril 1: Amplificado utilizando los oligonucleótidos AMK12430_F y AMK12430_R en el genoma de *A. brasilense* Sp 7 (214 pb), Carril 2: Amplificado después de los cortes con las enzimas de restricción *HindIII* y *SpeI* (203 pb), se observa una pequeña línea que corresponde a los pares de bases complementarios de

las enzimas de restricción (8 pb), Carril 3: Linealización del vector pRU1156 con las enzimas *HindIII* y *SpeI* (12960 pb), se libera la región entre ambas enzimas (156 p.b). Carril 4: Linealización de la construcción con la enzima *HindIII* (13163 p.b). Carril 5: Comprobación de la construcción. Utilizando las enzimas *HindIII* y *SpeI*, se debe observar una banda de 12960 pb que corresponde al vector y una banda de 203 pb que corresponde a la región que nos interesa estudiar. La simulación se realizó con el programa SnapGene.

8.4.16 Análisis de la región río arriba del gen que codifica para una proteína fijadora de calcio.

La proteína codificada por el gen *AMK58_RS11295* tiene: un dominio metalopeptidasa y cinco dominios de hemolisina (Figura 37). Las enzimas con dominio metalopeptidasa se caracterizan por generar la proteólisis y para su funcionamiento se necesita de la presencia de un catión divalente que puede ser zinc, cobalto, manganeso o cobre que se unirá a la molécula de agua. El ion metálico se mantiene en su lugar mediante ligandos de aminoácidos, generalmente son tres. Estos ligandos pueden variar entre histidina, glutamato, aspartato, lisina y arginina. El dominio de hemolisina está involucrado en la unión de iones Calcio (Baumann *et al.*, 1993; Rawlings & Barrett, 1995).



*En este caso la caja -10 y la caja TyrR solapan, por esta razón la caja TyrR está subrayada

Figura 37. Contexto genético y región río arriba del gen que codifica para una proteína fijadora de calcio. Referencia de la Secuencia de NCBI utilizada: NZ_CP012914.1. El diagrama presentado se realizó utilizando la información obtenida de los servidores: FIMO, SoftBerry, Virtual Footprint y SMART.

8.4.17 Diseño de iniciadores y simulación de la construcción en el vector pRU1156 para la región rio arriba del gen *AMK58_RS11295*.

	Delantero (Foward)	Reverso (Reverse)
Nombre	AMK11295_F	AMK11295_R
Secuencia (5'-3')	ATAAGCTTCCCTTGGAAATCGCCGATCC	TTACTAGTCACGATTCCCCTGGTTCTGT
Secuencia de enzima añadida	HindIII (AAGCTT)	SpeI (ACTAGT)
Tamaño	28 p.b	28 p.b
%GC	50 %	46.4 %
Tm	62.2 °C	60.5 °C
Homo-dimero (ΔG más alta)	-10.23 kcal/mol	-6.84 kcal/mol
Hetero-dimero (ΔG más alta)	-8.61 kcal/mol	
Tamaño del amplificado	309 p.b	

Tabla 12. Información de los iniciadores diseñados para la amplificación de la región rio arriba del gen *AMK58_RS11295*. Información obtenida en el servidor Oligo Analyzer.

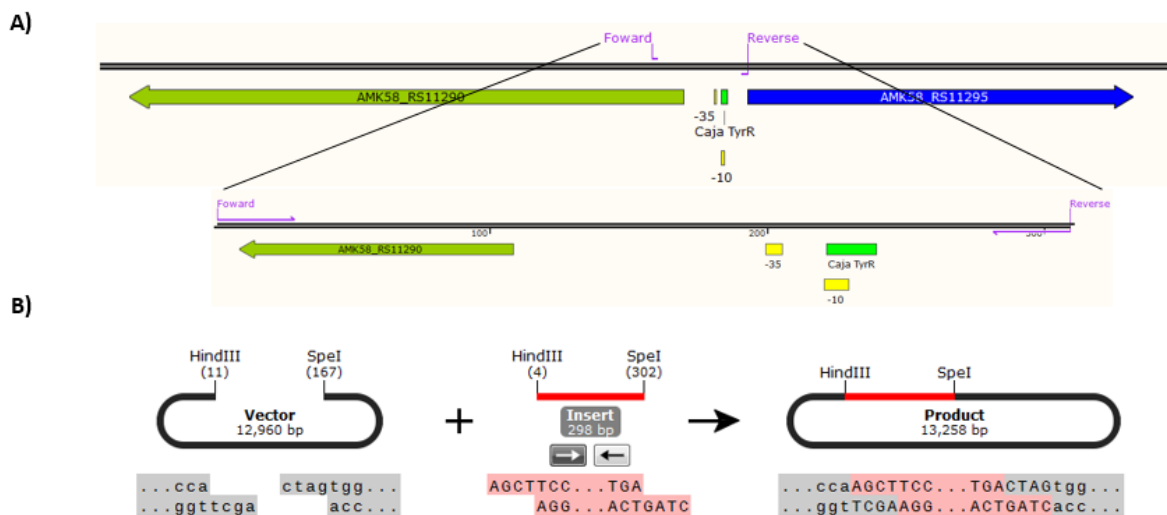


Figura 38. Simulación de la construcción del vector con el amplificado para el estudio de la región promotora del gen *AMK58_RS11295*. A) Contexto genético donde se observa la ubicación de los oligonucleótidos, inicialmente, se creó una simulación de la región a amplificar. B) Simulación del corte con enzimas de restricción (*HindIII* y *SpeI*) del vector y posteriormente del inserto para finalmente obtener la simulación de la construcción esperada, de esta forma también se comprobó el correcto diseño de los oligonucleótidos. La simulación se realizó con el programa SnapGene.

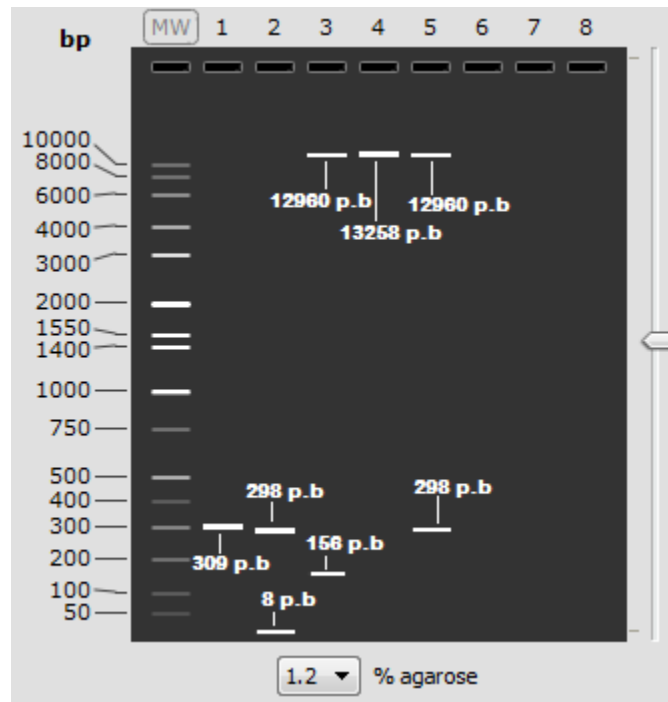


Figura 39. Simulación de gel de agarosa al 1.2% de los cortes enzimáticos para la comprobación de la construcción. MW: Marcador de peso molecular, Carril 1: Amplificado utilizando los oligonucleótidos AMK11295_F y AMK11295_R en el genoma de *A. brasilense* Sp 7 (309 pb), Carril 2: Amplificado después de los cortes con las enzimas de restricción *Hind*III y *Spe*I (298 pb), se observa una pequeña línea que corresponde a los pares de bases complementarios de las enzimas de restricción (8 pb), Carril 3: Linealización del vector pRU1156 con las enzimas *Hind*III y *Spe*I (12960 pb), se libera la región entre ambas enzimas (156 p.b). Carril 4: Linealización de la construcción con la enzima *Hind*III (13258 p.b). Carril 5: Comprobación de la construcción. Utilizando las enzimas *Hind*III y *Spe*I, se debe observar una banda de 12960 pb que corresponde al vector y una banda de 298 pb que corresponde a la región que nos interesa estudiar. La simulación se realizó con el programa SnapGene.

8.4.18 Análisis de la región río arriba del gen que codifica para una proteína de la familia OmpA.

El dominio OmpA se caracteriza por ser un dominio conservado con una estructura beta/alfa/beta/alfa-beta, asociado comúnmente a: proteínas integrales de membrana parecidas a porinas, proteínas pequeñas ancladas a lípidos y canales de protones (Freudl *et al.*, 1990). Se encontró en este estudio que el gen *AMK58_RS06745* codifica para una proteína con dominio OmpA (Figura 40).

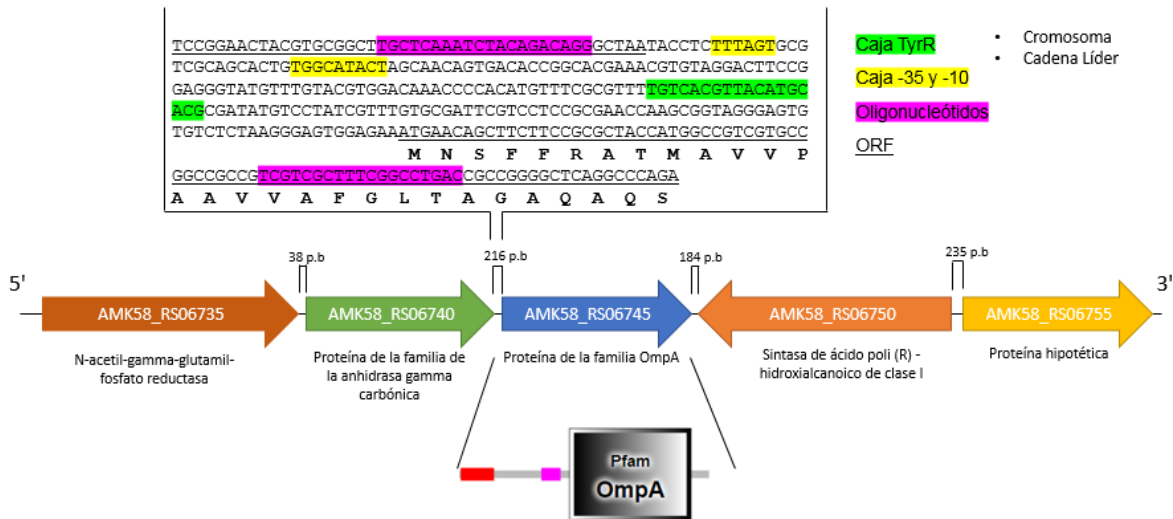


Figura 40. Contexto genético y región río arriba del gen que codifica para una proteína de la familia OmpA. Referencia de la Secuencia de NCBI utilizada: NZ_CP012914.1. El diagrama presentado se realizó utilizando la información obtenida de los servidores: FIMO, SoftBerry, Virtual Footprint y SMART.

8.4.19 Diseño de iniciadores y simulación de la construcción en el vector pRU1156 para la región río arriba del gen *AMK58_RS106745*.

	Delantero (Foward)	Reverso (Reverse)
Nombre	AMK6745_F	AMK6745_R
Secuencia (5'-3')	ATAAGCTTGCTCAAATCTACAGACAGG	TTACTAGTCAGGCCGAAAGCGACGA
Secuencia de enzima añadida	HindIII (AAGCTT)	SpeI (ACTAGT)
Tamaño	27 p.b	25 p.b
%GC	40.7 %	52 %
Tm	56.8 °C	61.5 °C
Homo-dimero (ΔG más alta)	-10.23 kcal/mol	-9.28 kcal/mol
Hetero-dimero (ΔG más alta)	-6.68 kcal/mol	
Tamaño del amplificado	317 p.b	

Tabla 13. Información de los iniciadores diseñados para la amplificación de la región río arriba del gen *AMK58_RS06745*. Información obtenida en el servidor Oligo Analyzer.

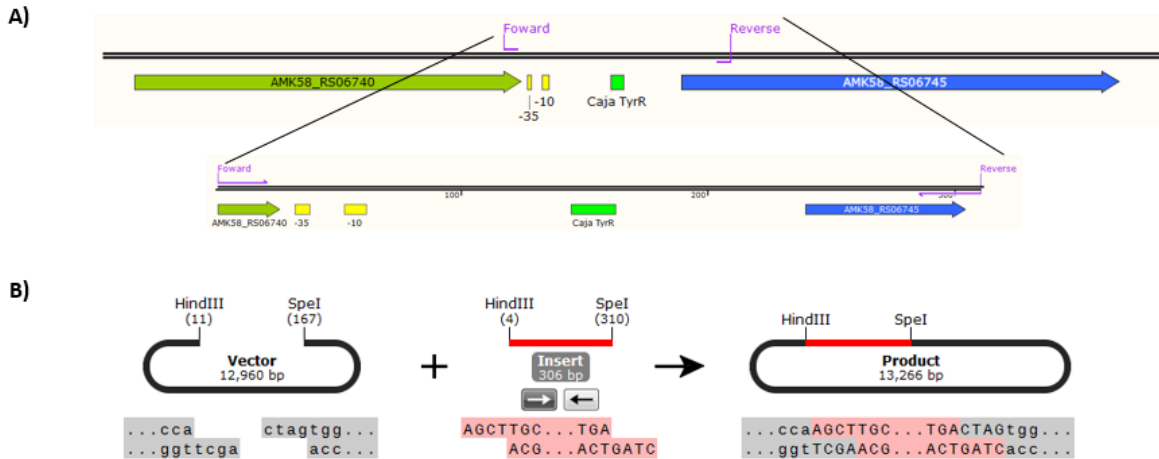


Figura 41. Simulación de la construcción del vector con el amplificado para el estudio de la región promotora del gen *AMK58_RS06745*. A) Contexto genético donde se observa la ubicación de los oligonucleótidos, inicialmente, se creó una simulación de la región a amplificar. B) Simulación del corte con enzimas de restricción (*HindIII* y *SpeI*) del vector y posteriormente del inserto para finalmente obtener la simulación de la construcción esperada, de esta forma también se comprobó el correcto diseño de los oligonucleótidos. La simulación se realizó con el programa SnapGene.

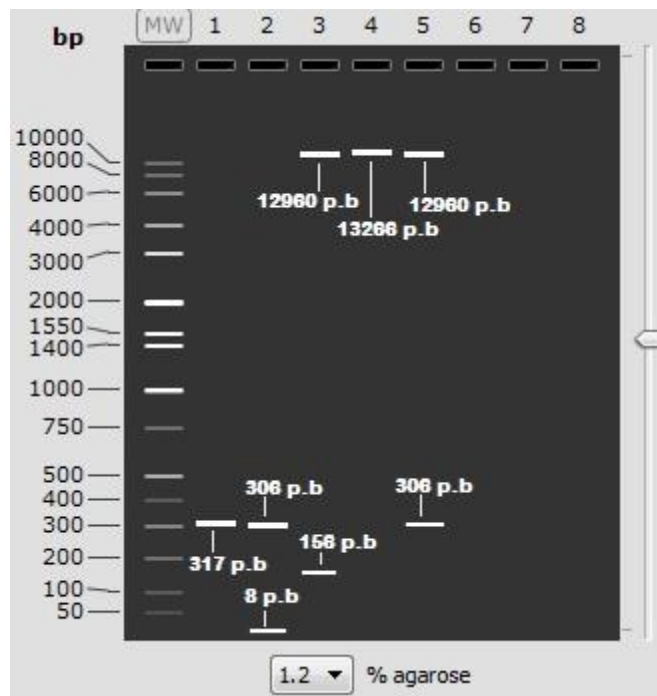


Figura 42. Simulación de gel de agarosa al 1.2% de los cortes enzimáticos para la comprobación de la construcción. MW: Marcador de peso molecular, Carril 1: Amplificado utilizando los oligonucleótidos AMK6745_F y AMK6745_R en el genoma de *A. brasilense* Sp 7 (317 pb), Carril 2: Amplificado después de los cortes con las enzimas de restricción *HindIII* y *SpeI* (306 pb), se observa una pequeña línea que corresponde a los pares de bases complementarios de las enzimas de restricción (8 pb), Carril 3: Linealización del vector pRU1156 con las enzimas *HindIII* y *SpeI* (12960 pb), se libera la región entre ambas enzimas (156 pb). Carril 4: Linealización de la construcción con la enzima *HindIII* (13266 pb). Carril 5: Comprobación de la construcción. Utilizando

las enzimas *HindIII* y *SpeI*, se debe observar una banda de 12960 pb que corresponde al vector y una banda de 306 pb que corresponde a la región que nos interesa estudiar. La simulación se realizó con el programa SnapGene.

9. Discusión.

Mediante su investigación, Jijón-Moreno (2017) describió los factores involucrados en la regulación transcripcional del gen *ipdC*; tomando como referencia los reportes de Ryu y Pattern, los cuales señalan a TyrR como el factor transcripcional responsable de la regulación de la expresión de *ipdC* en *E. cloacae* UW5. Jijón-Moreno decidió analizar al factor transcripcional TyrR, sin embargo, mediante la obtención de una cepa mutante y su posterior análisis con respecto a la producción de AIA, concluyó que TyrR afecta de manera negativa la producción de este metabolito; sin embargo, la regulación que efectúa no resulta de regular de manera directa el gen *ipdC*. Estos resultados apuntan a la necesidad de profundizar en el análisis de TyrR, así como los genes y rutas metabólicas en las cuales pudiese estar involucrado.

El conocer este factor y la función que desempeña a nivel transcripcional en diferentes genes dentro de *Azospirillum* resulta ser de gran relevancia para el conocimiento de la regulación genética de esta bacteria. Lo obtenido en este trabajo fue parte de la investigación de TyrR en *A. brasilense* Sp7 en la que, empleando una cepa carente de dicha proteína y mediante análisis de distintos fenotipos como la producción de biopelícula, la determinación de la biosíntesis de AIA, además de la evaluación de la expresión de los genes *tyrR* y *dadA* por medio de RT-PCR, y la expresión de la fusión transcripcional *ipdC-lacZ* nos permitió elucidar el papel que TyrR desempeña en nuestro modelo de estudio.

La mayoría de los reportes de TyrR, realizados en *E. coli*, señalan la diversidad de este factor, ya que puede actuar como activador o inhibidor de la transcripción de sus genes blanco. La activación mediada por TyrR ocurre a través de interacciones con la subunidad α de la ARN polimerasa, por tanto, se requiere que TyrR se una a secuencias río arriba del elemento promotor y en la misma cara del ADN, para permitir el contacto directo entre TyrR y la ARN polimerasa. En cuanto a los elementos de unión a TyrR en el ADN, se han descrito a las denominadas cajas TyrR. Estas se encuentran presentes en la región río arriba del gen blanco, pudiendo existir más de una caja y, además, pueden presentarse en una combinación de cajas fuertes y débiles. Se ha descrito, en el caso de promotores reprimidos por TyrR en presencia de tirosina, la existencia de al menos dos cajas TyrR adyacentes, una fuerte y otra débil. La caja débil está típicamente más cerca o se superpone con el promotor central y la unión mediada por cofactores en este sitio de baja afinidad requiere una caja fuerte adyacente. Por otra parte, se ha observado que, en los operones, donde la caja débil se encuentra más alejada del promotor, su posición juega un papel más crítico para la regulación mediada por tirosina (Pittard et al., 2005; Jijón-Moreno et al. 2019).

El grado de homología que tengan las cajas TyrR de acuerdo con la secuencia consenso afectará la afinidad de la unión de TyrR. Generalmente, las cajas TyrR fuertes tienen al menos 10 coincidencias de nucleótidos con el consenso, un alto grado de simetría de secuencia y una secuencia espaciadora rica en AT; mientras que las cajas débiles tienen menos de 10 nucleótidos coincidentes y menos simetría. Por ello, es importante analizar detalladamente la posición y la secuencia de estas cajas. En nuestros análisis bioinformáticos, donde identificamos las secuencias consenso en la región promotora intergénica de los genes *tyrR* y *dadA*, observamos la presencia de tres cajas TyrR. Estas se encuentran en la cadena líder, además presentan 9 nucleótidos coincidentes con la secuencia consenso, de modo que, siendo muy estrictos, se podrían clasificar como cajas TyrR débiles. En una de estas cajas el contenido de GC de la región intermedia es del 50%, la más alta de las tres; las dos cajas subsecuentes tienen un contenido GC de esta región del 33.3%. Otra de las características que muestran estas tres cajas es que contienen las bases invariables (G-N₁₄-C), por lo que se intuye que la unión de TyrR a las secuencias se encuentra conservada (Pittard *et al.*, 2005; Jijón-Moreno *et al.* 2019)

Por otra parte, y tomando en consideración los resultados obtenidos mediante el empleo de la RT-PCR hechos en el trabajo de Jijón-Moreno, se dedujo que la transcripción del gen *dadA* se encuentra afectada por la mutación de *tyrR*, por lo que se concluyó que la regulación llevada a cabo es de activación. Con base a los datos obtenidos al analizar el regulón TyrR de *E. coli*, se pueden enlistar una serie de requisitos críticos para la activación génica: una caja TyrR fuerte ubicada río arriba del promotor, un promotor imperfecto capaz de activarse, la proteína TyrR funcional, cualquiera de los tres aminoácidos aromáticos, y la subunidad de la ARN polimerasa que interactúa con TyrR (Pittard *et al.*, 2005; Coulson *et al.*, 2021; Jijón-Moreno *et al.*, 2019).

En el estudio realizado por Jijón-Moreno se analiza la proteína TyrR de *A. brasilense* Sp7. La estructura de esta exhibe una alta homología con respecto a proteínas TyrR identificadas en otras bacterias. En cuanto a su arquitectura, esta contiene un dominio PAS en su extremo amino terminal, un dominio de interacción con el factor σ -54 en el dominio central y un dominio HTH en el extremo carboxilo terminal; gracias a su estructura esta proteína puede ser clasificada como una bEBP, las cuales regulan la expresión de genes dependientes de σ -54. Al realizar un análisis más detallado en la secuencia aminoacídica de la proteína, se identifica el motivo GAFTGA dentro del dominio central de la misma, el cual es indispensable para la activación dependiente de σ -54. Este descubrimiento es relevante, ya que cabe destacar que dicho motivo no se encuentra presente en los homólogos de la proteína de *E. coli* ni de *E. cloacae*. Lo que nos lleva a predecir que en la regulación génica mediada por TyrR de *Azospirillum*, también se encuentra involucrado el factor σ -54 (Bush & Dixon, 2012; Jijón-Moreno *et al.*, 2019).

Para continuar con el análisis de la función de TyrR en *A. brasilense* Sp7, se utilizó a la mutante de su gen codificante. Al evaluar el crecimiento de la cepa mutante, se

observó que presentaba una alteración para la utilización de la D-alanina como única fuente de C y el consumo parcial de este aminoácido como única fuente de N. Los aminoácidos, con excepción de la glicina, tienen estereoisómeros (D- y L-aminoácidos) debido al centro quiral en el carbono α . Sabemos que, los L-aminoácidos son esenciales por ser componentes básicos de todas las proteínas; de la misma forma, sus enantiómeros (los D-aminoácidos) cumplen funciones importantes en los microorganismos, por ejemplo, estos son elementos necesarios del peptidoglicano, siendo este el componente principal de la pared celular bacteriana y la fuente más comúnmente citada de D-aminoácidos en estos microorganismos; aunado a esto, existen reportes de bacterias que incorporan D-alanina y ácido D-glutámico en su pared como elementos estructurales y para proteger a la bacteria de las proteasas que degradan péptidos elaborados con L-aminoácidos. Adicionando, la D-alanina puede ser esencial para el crecimiento, la formación de biopelícula, la producción de EPS, la adhesión bacteriana y la biosíntesis de metabolitos importantes (Lee *et al.*, 2020; Jijón-Moreno *et al.*, 2018).

En el presente trabajo, al observar la afectación en el crecimiento de la mutante *tyrR* en medio mínimo suplementado con D-alanina como única fuente de C, se concluyó que la regulación efectuada por TyrR en el gen *dadA* afecta el catabolismo de D-alanina como fuente de C y el consumo parcial del mismo aminoácido como única fuente de N. La DAO participa en el catabolismo de la alanina, al catalizar la oxidación de la D-alanina a piruvato, el cual es un metabolito clave bacteriano (Lee *et al.*, 2020; Radkov & Moe, 2014).

Los otros fenotipos evaluados fueron la producción de EPS y la formación de biopelícula. En sus primeras etapas, la formación de biopelícula es dependiente de la motilidad bacteriana para que el microorganismo pueda alcanzar una superficie biótica o abiótica adecuada. Para dicho fin, los flagelos cumplen con un papel fundamental, en primera instancia como organelos locomotores para posteriormente desempeñar una función como adhesina entre la bacteria y la superficie a colonizar (Ganusova *et al.*, 2021; Viruega-Gongora *et al.*, 2020). Una vez adherida la bacteria a la raíz, en el caso específico de *A. brasilense* Sp7, el microorganismo comenzará a producir adhesinas que le proporcionarán un anclaje más fuerte e irreversible, dando lugar a la formación de microcolonias y la producción de EPS, los cuales están asociados a la matriz de la biopelícula. De los resultados obtenidos al analizar estos fenotipos, se concluye que, al encontrarse disminuida la captación del colorante Rojo Congo por parte de la cepa mutante, se intuyó que la biosíntesis de EPS está alterada. De forma complementaria, se observó que la producción de biopelícula se encontraba disminuida, lo cual se asocia con mutantes con defectos en la producción de EPS, debido al papel que desempeñan en la estructura de la misma, la alteración en la formación de biopelícula está directamente relacionada a la alteración de la síntesis de EPS. El mecanismo por el cual ocurre esto es desconocido, por lo que se necesitarían de más estudios para poder elucidarlo (Rodrigues *et al.*, 2015).

Debido a la diversa gama de estructuras, propiedades y funciones de los polisacáridos, se resalta la importancia de este componente de la matriz para una adaptación exitosa de las bacterias a cualquier nicho. En este sentido, se sabe que la biopelícula involucra varios reguladores transcripcionales y factores sigma alternativos; un ejemplo que demuestra esta postulación es el estudio realizado por Cheng y colaboradores en 2018, donde determinan el papel de los reguladores de respuesta de la familia NtrC en la formación de biopelícula y en la expresión de genes *vps*, que codifican para genes implicados en la producción de EPS en *V. cholerae*. El factor sigma alternativo RpoN, requiere de proteínas EBPs para iniciar la transcripción, por lo que no es de sorprender que el genoma de *V. cholerae* codifique para siete EBPs que pertenecen a la familia NtrC. En estudios empleando mutantes carentes de NtrC se observa que estas cepas aumentaron su formación de biopelícula a la par de un incremento en los transcritos de genes *vps*; por lo que estos resultados proporcionan evidencia que sugiere que RpoN puede actuar como un regulador positivo o negativo de *vps* dependiendo de la EBP presente, sugiriendo la importancia y complejidad de la regulación dependiente de éstas en la formación de biopelícula de *V. cholerae*. La contribución de los reguladores de la familia NtrC al fenotipo de biopelícula mediada por RpoN no se encuentra completamente elucidada. Esto nos lleva a inferir que, la red de regulación de las EBPs es compleja, ya que pueden tener una regulación tanto directa como indirecta o positiva y negativa; además de estar involucrados en la síntesis de EPS y la formación de biopelícula (Cheng *et al.*, 2018; Limoli, Jones, & Wozniak, 2015; Spormann *et al.*, 2004; Viruega-Góngora *et al.*, 2020; Ganusova *et al.*, 2021).

En el presente trabajo, el cual fue parte de una investigación de la compleja red de reguladores transcripcionales en *Azospirillum*, la bioinformática nos permitió inferir sobre genes que pudiesen estar involucrados en la formación de biopelícula y que, además, formen parte de la red de regulación mediada por un σ alternativo y el factor TyrR. En *E. coli* se ha especificado que el factor TyrR está involucrado en la expresión de diferentes genes asociados a distintas funciones celulares, por ejemplo, genes que codifican para enzimas de la vía de síntesis de corismato (*aroF*, *aroG* y *aroL*); para la producción de los aminoácidos aromáticos (fenilalanina y tirosina) (*tyrA* y *tyrB*) y ácido fólico (*folA*), que se derivan del corismato; genes que codifican varios transportadores de aminoácidos aromáticos (*aroP*, *mtr* y *tyrP*); y para el propio TyrR (*tyrR*), esto último observado también en nuestro estudio. En la regulación transcripcional existen muchos elementos a tomar en cuenta para considerar que factores están involucrados en la regulación. El uso conjunto de diversas plataformas bioinformáticas nos permiten plantear el diseño de futuras investigaciones. Es importante resaltar que para la búsqueda de secuencias consenso de TyrR, de los factores σ involucrados y otros sitios característicos de la regulación transcripcional, utilizamos la información que está descrita en microorganismos bien caracterizados, pero podría haber diferencias considerables con nuestro microorganismo de estudio, esto hay que tenerlo en cuenta para interpretar los resultados obtenidos y así, experimentalmente, mediante el uso de

fusiones transcripcionales, tendremos la posibilidad de afirmar o descartar si TyrR cumple con una función en la regulación de los genes evaluados en *Azospirillum* (Cheng *et al.*, 2018; Coulson *et al.*, 2021).

10. Conclusiones.

Con base en los resultados obtenidos en nuestra investigación, podemos concluir que TyrR es necesario para la utilización de D-alanina como única fuente de carbono, además de su papel en el uso parcial como fuente de nitrógeno del mismo aminoácido. Por otra parte, quedó asentada su participación en la producción de sustancias poliméricas extracelulares (EPS), así como en la formación de biopelícula.

Finalmente, los datos obtenidos mediante predicción bioinformática determinaron genes que pudiesen ser regulados por TyrR. Dichos resultados cimentan las bases para trabajos futuros, los cuales tendrían la finalidad de evaluar y clasificar aquellos genes regulados por TyrR y que además pudiesen ser partícipes en la síntesis de EPS, así como en la formación de biopelícula en *Azospirillum*.

11. Bibliografía.

- Ahemad, M., & Kibret, M. (2014). Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University - Science*, 26(1), 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2013.05.001>
- Amikam, D., & Galperin, M. Y. (2006). PilZ domain is part of the bacterial c-di-GMP binding protein. *Bioinformatics*, 22(1), 3–6. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti739>
- Argaet, V. P., Wilson, T. J., & Davidson, B. E. (1994). Purification of the Escherichia coli regulatory protein TyrR and analysis of its interactions with ATP, tyrosine, phenylalanine, and tryptophan. *Journal of Biological Chemistry*, 269(7), 5171–5178. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)37671-8](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)37671-8)
- Baumann, U., Wu, S., Flaherty, K. M., & McKay, D. B. (1993). Three-dimensional structure of the alkaline protease of Pseudomonas aeruginosa: A two-domain protein with a calcium binding parallel beta roll motif. *EMBO Journal*, 12(9), 3357–3364. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1993.tb06009.x>
- Beloin, C., & Ghigo, J. M. (2005). Finding gene-expression patterns in bacterial biofilms. *Trends in Microbiology*, 13(1), 16–19. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.11.008>
- Bi, S., & Sourjik, V. (2018). Stimulus sensing and signal processing in bacterial chemotaxis. *Current Opinion in Microbiology*, 45, 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2018.02.002>
- Bible, A. N., Khalsa-Moyers, G. K., Mukherjee, T., Green, C. S., Mishra, P., Purcell, A., ... Alexandre, G. (2015). Metabolic adaptations of *Azospirillum brasilense* to oxygen stress by cell-to-cell clumping and flocculation. *Applied and*

Environmental Microbiology, 81(24), 8346–8357.
<https://doi.org/10.1128/AEM.02782-15>

- Bible, A. N., Stephens, B. B., Ortega, D. R., Xie, Z., & Alexandre, G. (2008). Function of a chemotaxis-like signal transduction pathway in modulating motility, cell clumping, and cell length in the alphaproteobacterium *Azospirillum brasilense*. *Journal of Bacteriology*, 190(19), 6365–6375. <https://doi.org/10.1128/JB.00734-08>
- Bible, A., Russell, M. H., & Alexandre, G. (2012). The *Azospirillum brasilense* Che1 chemotaxis pathway controls swimming velocity, which affects transient cell-to-cell clumping. *Journal of Bacteriology*, 194(13), 3343–3355. <https://doi.org/10.1128/JB.00310-12>
- Branda, S. S., Vik, Å., Friedman, L., & Kolter, R. (2005). Biofilms: The matrix revisited. *Trends in Microbiology*, 13(1), 20–26. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.11.006>
- Burgess, R. R. (2017). Sigma Factors ☆. *Reference Module in Life Sciences*, (December 2015), 1–4. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-809633-8.07152-1>
- Burrows, P. C., Severinov, K., Ishihama, A., Buck, M., & Wigneshweraraj, S. R. (2003). Mapping σ 54-RNA polymerase interactions at the -24 consensus promoter element. *Journal of Biological Chemistry*, 278(32), 29728–29743. <https://doi.org/10.1074/jbc.M303596200>
- Bush, M., & Dixon, R. (2012). The Role of Bacterial Enhancer Binding Proteins as Specialized Activators of σ 54-Dependent Transcription. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76(3), 497–529. <https://doi.org/10.1128/mnbr.00006-12>
- Campbell, J. A., Davies, G. J., Bulone, V., & Henrissat, B. (1998). Correction: A classification of nucleotide-diphospho-sugar glycosyltransferases based on amino acid sequence similarities (Biochemical Journal (1997) 326 (929-939)). *Biochemical Journal*, 329(3), 719. <https://doi.org/10.1042/bj3290719>
- Carreño-Lopez, R., Campos-Reales, N., Elmerich, C., & Baca, B. E. (2000). Physiological evidence for differently regulated tryptophan-dependent pathways for indole-3-acetic acid synthesis in *Azospirillum brasilense*. *Molecular and General Genetics*, 264(4), 521–530. <https://doi.org/10.1007/s004380000340>
- Cassán, F. D., Okon, Y., & Creus, C. M. (2015). *Handbook for Azospirillum*.
- Cheng, A. T., Zamorano-Sánchez, D., Teschler, J. K., Wu, D., & Yildiz, F. H. (2018). NtrC adds a new node to the complex regulatory network of biofilm formation and vps expression in *Vibrio cholerae*. *Journal of Bacteriology*, 200(15), 1–14. <https://doi.org/10.1128/JB.00025-18>
- Chipman, D. M., & Shaanan, B. (2001). The ACT domain family. *Current Opinion in Structural Biology*, 11(6), 694–700. [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(01\)00272-X](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(01)00272-X)

- Coulson, T. J. D. (2008). The Aromatic Amino Acid Responsive TyrR Transcription Factor of. *Tesis Doctoral*.
- Cui, J., & Somerville, R. L. (1993). The TyrR protein of Escherichia coli, analysis by limited proteolysis of domain structure and ligand-mediated conformational changes. *Journal of Biological Chemistry*, 268(7), 5040–5047. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)53499-2](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)53499-2)
- Depeursinge, A., Racoceanu, D., Iavindrasana, J., Cohen, G., Platon, A., Poletti, P.-A., & Muller, H. (2010). Fusing Visual and Clinical Information for Lung Tissue Classification in HRCT Data. *Artificial Intelligence in Medicine*, 412(5), ARTMED1118. <https://doi.org/10.1016/j>
- Dixon, M. P., Pau, R. N., Howlett, G. J., Dunstan, D. E., Sawyer, W. H., & Davidson, B. E. (2002). The central domain of Escherichia coli TyrR is responsible for hexamerization associated with tyrosine-mediated repression of gene expression. *Journal of Biological Chemistry*, 277(26), 23186–23192. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112184200>
- Donati, A. J., Lee, H. I., Leveau, J. H. J., & Chang, W. S. (2013). Effects of Indole-3-Acetic Acid on the Transcriptional Activities and Stress Tolerance of Bradyrhizobium japonicum. *PLoS ONE*, 8(10), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076559>
- Duca, D., Lorv, J., Patten, C. L., Rose, D., & Glick, B. R. (2014). Indole-3-acetic acid in plant-microbe interactions. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 106(1), 85–125. <https://doi.org/10.1007/s10482-013-0095-y>
- Durocher, D., & Jackson, S. P. (2002). The FHA domain. *FEBS Letters*, 513(1), 58–66. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)03294-X](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)03294-X)
- Ettema, T. J. G., Brinkman, A. B., Tani, T. H., Rafferty, J. B., & Van Oost, J. Der. (2002). A novel ligand-binding domain involved in regulation of amino acid metabolism in prokaryotes. *Journal of Biological Chemistry*, 277(40), 37464–37468. <https://doi.org/10.1074/jbc.M206063200>
- Flemming, H. C., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8(9), 623–633. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>
- Franklin, F. C. H., & Venables, W. A. (1976). Biochemical, genetic, and regulatory studies of alanine catabolism in Escherichia coli K12. *MGG Molecular & General Genetics*, 149(2), 229–237. <https://doi.org/10.1007/BF00332894>
- Freudl, R., Klose, M., & Henning, U. (1990). Export and sorting of the Escherichia coli outer membrane protein OmpA. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 22(3), 441–449. <https://doi.org/10.1007/BF00763176>
- Galperin, M. Y. (2006). Structural classification of bacterial response regulators: Diversity of output domains and domain combinations. *Journal of Bacteriology*, 188(12), 4169–4182. <https://doi.org/10.1128/JB.01887-05>

- Galperin, M. Y., & Chou, S. H. (2019). Structural conservation and diversity of PilZ-related domains. *BioRxiv*, 202(4), 1–14. <https://doi.org/10.1101/814665>
- Garbers, P. S. T. Y. and D. L. (1992). Guanylyl cyclase-linked receptors. *Annu. Rev. Neurosci.*, 15, 193–225.
- Gliessman-Stephen, R. (2002). Agroecología: Procesos ecológicos en agricultura sostenible. In *Diversidad y estabilidad del agroecosistema*.
- Hazelbauer, G. L., Falke, J. J., & Parkinson, J. S. (2010). Networked Arrays. *Trends in Biochemical Sciences*, 33(1), 9–19. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2007.09.014>. Bacterial
- Henderson, I. R., Navarro-Garcia, F., & Nataro, J. P. (1998). 3030327297_the Great Escape.Pdf. *Trends in Microbiology*, 6(9), 370–378.
- Hengge, R. (2009). Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 7(4), 263–273. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2109>
- Huang, Z., Wang, Y. H., Zhu, H. Z., Andrianova, E. P., Jiang, C. Y., Li, D., ... Liu, S. J. (2019). Cross talk between chemosensory pathways that modulate. *MBio*, 10(1), 1–15.
- Jensen, R. A., Calhoun, D. H., & Twarog, R. (1981). Intracellular roles of microbial aminotransferases: Overlap enzymes across different biochemical pathways. *Critical Reviews in Microbiology*, 8(3), 229–266. <https://doi.org/10.3109/10408418109085080>
- Jijón-Moreno, S., Baca, B. E., Castro-Fernández, D. C., & Ramírez-Mata, A. (2019). TyrR is involved in the transcriptional regulation of biofilm formation and D-alanine catabolism in *Azospirillum brasilense* Sp7. *PLoS ONE*, 14(2), 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211904>
- Karunakaran, R., Mauchline, T. H., Hosie, A. H. F., & Poole, P. S. (2005). A family of promoter probe vectors incorporating autofluorescent and chromogenic reporter proteins for studying gene expression in Gram-negative bacteria. *Microbiology*, 151(10), 3249–3256. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28311-0>
- Kittell, B. L., Helinski, D. R., & Ditta, G. S. (1989). Aromatic aminotransferase activity and indoleacetic acid production in *Rhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology*, 171(10), 5458–5466. <https://doi.org/10.1128/jb.171.10.5458-5466.1989>
- Klose, K. E., North, A. K., Stedman, K. M., & Kustu, S. (1994). The major dimerization determinants of the nitrogen regulatory protein NTRC from enteric bacteria lie in its carboxy-terminal domain. *Journal of Molecular Biology*, Vol. 241, pp. 233–245. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1994.1492>
- Kwok, T., Yang, J., Pittard, A. J., Wilson, T. J., & Davidson, B. E. (1995). Analysis of an *Escherichia coli* mutant TyrR protein with impaired capacity for tyrosine-mediated repression, but still able to activate σ^{70} promoters. *Molecular Microbiology*, 17(3), 471–481. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.mmi_17030471.x

- Lau, C. K. Y., Ishida, H., Liu, Z., & Vogel, H. J. (2013). Solution structure of *Escherichia coli* feoA and its potential role in bacterial ferrous iron transport. *Journal of Bacteriology*, *195*(1), 46–55. <https://doi.org/10.1128/JB.01121-12>
- Lau, C. K. Y., Krewulak, K. D., & Vogel, H. J. (2016). Bacterial ferrous iron transport: The Feo system. *FEMS Microbiology Reviews*, *40*(2), 273–298. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuv049>
- Lee, C. J., Qiu, T. A., & Sweedler, J. V. (2020). D-Alanine: Distribution, origin, physiological relevance, and implications in disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, *1868*(11), 140482. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2020.140482>
- Limoli, D. H., Jones, C. J., & Wozniak, D. J. (2015). Bacterial Extracellular Polysaccharides in Biofilm Formation and Function. *Microbiology Spectrum*, *3*(3), 1–19. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.mb-0011-2014>
- Manulis, S., Shafrir, H., Epstein, E., Lichter, A., & Barash, I. (1994). Biosynthesis of indole-3-acetic acid via the indole-3-acetamide pathway in *Streptomyces* spp. *Microbiology*, *140*(5), 1045–1050. <https://doi.org/10.1099/13500872-140-5-1045>
- Merrick, M. J. (1993). In a class of its own — the RNA polymerase sigma factor σ_{54} (σ_N). *Molecular Microbiology*, *10*(5), 903–909. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1993.tb00961.x>
- Morett, E., & Segovia, L. (1993). The σ_{54} bacterial enhancer-binding protein family: Mechanism of action and phylogenetic relationship of their functional domains. *Journal of Bacteriology*, *175*(19), 6067–6074. <https://doi.org/10.1128/jb.175.19.6067-6074.1993>
- Mukherjee, T., Elmas, M., Vo, L., Alexiades, V., Hong, T., & Alexandre, G. (2019). Multiple CheY Homologs Control Swimming Reversals and Transient Pauses in *Azospirillum brasilense*. *Biophysical Journal*, *116*(8), 1527–1537. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2019.03.006>
- Mukherjee, T., Kumar, D., Burriss, N., Xie, Z., & Alexandre, G. (2016). *Azospirillum brasilense* chemotaxis depends on two signaling pathways regulating distinct motility parameters. *Journal of Bacteriology*, *198*(12), 1764–1772. <https://doi.org/10.1128/JB.00020-16>
- O'Neal, L., Akhter, S., & Alexandre, G. (2019). A PilZ-Containing Chemotaxis Receptor Mediates Oxygen and Wheat Root Sensing in *Azospirillum brasilense*. *Frontiers in Microbiology*, *10*(MAR), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00312>
- O'Neal, L., Ryu, M., Gomelsky, M., & Alexandre, G. (2017). Optogenetic Manipulation of Cyclic Receptor Activity in *Azospirillum*. *Journal of Bacteriology*, *199*(18), 1–18.
- O'Toole, G. A. (2003). To build a biofilm. *Journal of Bacteriology*, *185*(9), 2687–2689.

<https://doi.org/10.1128/JB.185.9.2687-2689.2003>

- Patten, C. L., & Glick, B. R. (1996). Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Canadian Journal of Microbiology*, 42(3), 207–220. <https://doi.org/10.1139/m96-032>
- Pedraza, R. O., Filippone, M. P., Fontana, C., Salazar, S. M., Ramírez-mata, A., Sierra-cacho, D., & Baca, B. E. (2020). *Author's personal copy*.
- Pittard, A. J., & Davidson, B. E. (1991). TyrR protein of Escherichia coli and its role as repressor and activator. *Molecular Microbiology*, 5(7), 1585–1592. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1991.tb01904.x>
- Pittard, J., Camakarlis, H., & Yang, J. (2005). The TyrR regulon. *Molecular Microbiology*, 55(1), 16–26. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04385.x>
- Porter, S. L., Wadhams, G. H., & Armitage, J. P. (2011). Signal processing in complex chemotaxis pathways. *Nature Reviews Microbiology*, 9(3), 153–165. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2505>
- Prinsen, E. (1993). Azospirillum brasilense Indole-3-Acetic Acid Biosynthesis: Evidence for a Non-Tryptophan Dependent Pathway . *Molecular Plant-Microbe Interactions*, Vol. 6, p. 609. <https://doi.org/10.1094/mpmi-6-609>
- Radkov, A. D., & Moe, L. A. (2014). Bacterial synthesis of D-amino acids. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(12), 5363–5374. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5726-3>
- RAJAGOPAL, R. (1971). Metabolism of Indole-3-acetaldehyde. III. Some Characteristics of the Aldehyde Oxidase of Avena Coleoptiles. *Physiologia Plantarum*, 24(2), 272–281. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1971.tb03491.x>
- Ramírez-mata, A., Fernández-domínguez, I. J., Nuñez-reza, K. J., Xiqui-vázquez, M. L., & Baca, B. E. (2014). *REVISTA ARGENTINA DE Redes de señalización en la producción de biopelículas en bacterias: quorum sensing , di-GMPc y óxido nítrico*. 46(3), 242–255.
- Rawlings, B. N. D., & Barrett, A. J. (1995). [13] Evolutionary families of metallopeptidases In Proteolytic Enzymes: Aspartic and Metallo Peptidases. In *Methods in enzymology* (Vol. 248).
- Reitzer, L., & Schneider, B. L. (2001). Metabolic Context and Possible Physiological Themes of ζ 54-Dependent Genes in Escherichia coli. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65(3), 422–444. <https://doi.org/10.1128/mubr.65.3.422-444.2001>
- Rodrigues, A. C., Bonifacio, A., de Araujo, F. F., Junior, M. A. L., & do Vale Barreto Figueiredo, M. (2015). *Azospirillum sp. as a Challenge for Agriculture*. 29–51. https://doi.org/10.1007/978-3-319-24654-3_2
- Romling, U., Galperin, M. Y., & Gomelsky, M. (2013). Cyclic di-GMP: the First 25

- Years of a Universal Bacterial Second Messenger. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 77(1), 1–52. <https://doi.org/10.1128/mmbr.00043-12>
- Russell, M. H., Bible, A. N., Fang, X., Gooding, J. R., Campagna, S. R., Gomelsky, M., & Alexandria, G. (2013). Integration of the second messenger c-di-GMP into the chemotactic signaling pathway. *MBio*, 4(2), 1–11. <https://doi.org/10.1128/mBio.00001-13>
- Ryu, R. J., & Patten, C. L. (2008). Aromatic amino acid-dependent expression of indole-3-pyruvate decarboxylase is regulated by tyrr in *Enterobacter cloacae* UW5. *Journal of Bacteriology*, 190(21), 7200–7208. <https://doi.org/10.1128/JB.00804-08>
- Sarkar, M. K., Paul, K., & Blair, D. (2010). Chemotaxis signaling protein CheY binds to the rotor protein FliN to control the direction of flagellar rotation in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(20), 9370–9375. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000935107>
- Schumacher, J., Joly, N., Rappas, M., Zhang, X., & Buck, M. (2006). Structures and organisation of AAA+ enhancer binding proteins in transcriptional activation. *Journal of Structural Biology*, 156(1), 190–199. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2006.01.006>
- Schumacher, J., Zhang, X., Jones, S., Bordes, P., & Buck, M. (2004). ATP-dependent transcriptional activation by bacterial PspF AAA+protein. *Journal of Molecular Biology*, 338(5), 863–875. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.02.071>
- Spormann, A. M., Thormann, K., Saville, R., Shukla, S., & Entcheva, P. (2004). Microbial biofilms. *Nanoscale Technology in Biological Systems*, 341–357. <https://doi.org/10.1201/9780203500224>
- Steenhoudt, O., & Vanderleyden, J. (2000). *Azospirillum* review. *FEMS Microbiology Reviews*, 24(1), 1–20.
- Studholme, D. J., & Dixon, R. (2003). Domain architectures of σ_{54} -dependent transcriptional activators. *Journal of Bacteriology*, 185(6), 1757–1767. <https://doi.org/10.1128/JB.185.6.1757-1767.2003>
- Tarrand, J. J., Krieg, N. R., & Dobereiner, J. (1978). A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. *Canadian Journal of Microbiology*, 24(8), 967–980. <https://doi.org/10.1139/m78-160>
- Teale, W. D., Paponov, I. A., & Palme, K. (2006). Auxin in action: Signalling, transport and the control of plant growth and development. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(11), 847–859. <https://doi.org/10.1038/nrm2020>
- Thomas J. D. Coulson, René M. Malenfant, C. L. P. (2021). *crossm* Characterization of the *TyrR* Regulon in the *Rhizobacterium* *Enterobacter ludwigii* UW5 Reveals Overlap with the *CpxR*. 203(1), 1–21.

- Tien, T., Gaskins, M., & Hubbell, D. (1979). Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth *Applied and Environmental Microbiology*, 37(5), 1016–1024. Retrieved from <http://aem.asm.org/cgi/content/abstract/37/5/1016>
- van Puyvelde, S., Cloots, L., Engelen, K., Das, F., Marchal, K., Vanderleyden, J., & Spaepen, S. (2011). Transcriptome Analysis of the Rhizosphere Bacterium *Azospirillum brasilense* Reveals an Extensive Auxin Response. *Microbial Ecology*, 61(4), 723–728. <https://doi.org/10.1007/s00248-011-9819-6>
- Vasudevan, R. (2014). Biofilms: Microbial Cities of Scientific Significance. *Journal of Microbiology & Experimentation*, 1(3). <https://doi.org/10.15406/jmen.2014.01.00014>
- Vega-Hernández, M. C., León-Barrios, M., & Pérez-Galdona, R. (2002). Indole-3-acetic acid production from indole-3-acetonitrile in bradyrhizobium. *Soil Biology and Biochemistry*, 34(5), 665–668. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(01\)00229-2](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(01)00229-2)
- Viruega-góngora, V. I., Acatitla-jácome, I. S., Reyes-carmona, S. R., Baca, B. E., & Ramírez-mata, A. (2020). Víctor I. Viruega-Góngora, Iris S. Acatitla-Jácome, Sandra R. Reyes-Carmona, Beatriz E. Baca and Alberto Ramírez-Mata*. *FEMS Microbiology Letters*, 367(4).
- Wadhams, G. H., & Armitage, J. P. (2004). Making sense of it all: Bacterial chemotaxis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5(12), 1024–1037. <https://doi.org/10.1038/nrm1524>
- Wisniewski-Dyé, F., Borziak, K., Khalsa-Moyers, G., Alexandre, G., Sukharnikov, L. O., Wuichet, K., ... Zhulin, I. B. (2011). *Azospirillum* genomes reveal transition of bacteria from aquatic to terrestrial environments. *PLoS Genetics*, 7(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002430>
- Wolanin, P. M., Thomason, P. A., & Stock, J. B. (2002). Histidine protein kinases: Key signal transducers outside the animal kingdom. *Genome Biology*, 3(10), 1–8. <https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-10-reviews3013>
- ZHULIN, I., & ARMITAGE, J. (1992). The role of taxis in the ecology of *Azospirillum*. *Symbiosis (Philadelphia, PA)*, 13(1), 199–206.
- Zhulin, K. W. and I. B. (2012). System in Prokaryotes. *Sci Signal.*, 3(128), ra50. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2000724>.Origins

12. Anexos.

12.1 Medios de cultivo.

Medio LB

Componente	100 mL
Peptona de caseína	1.0 g
Extracto de Levadura	0.5 g

NaCl	1.0 g
Agar bacteriológico	1.5 g
Ajustar pH a 7.0 con NaOH	

Medio LB*

Componente	100 mL
Peptona de caseína	1.0 g
Extracto de Levadura	0.5 g
NaCl	0.5 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.0367 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.0616 g
Agar bacteriológico	1.5 g
Ajustar pH a 7.0 con NaOH	

Medio mínimo K-malato

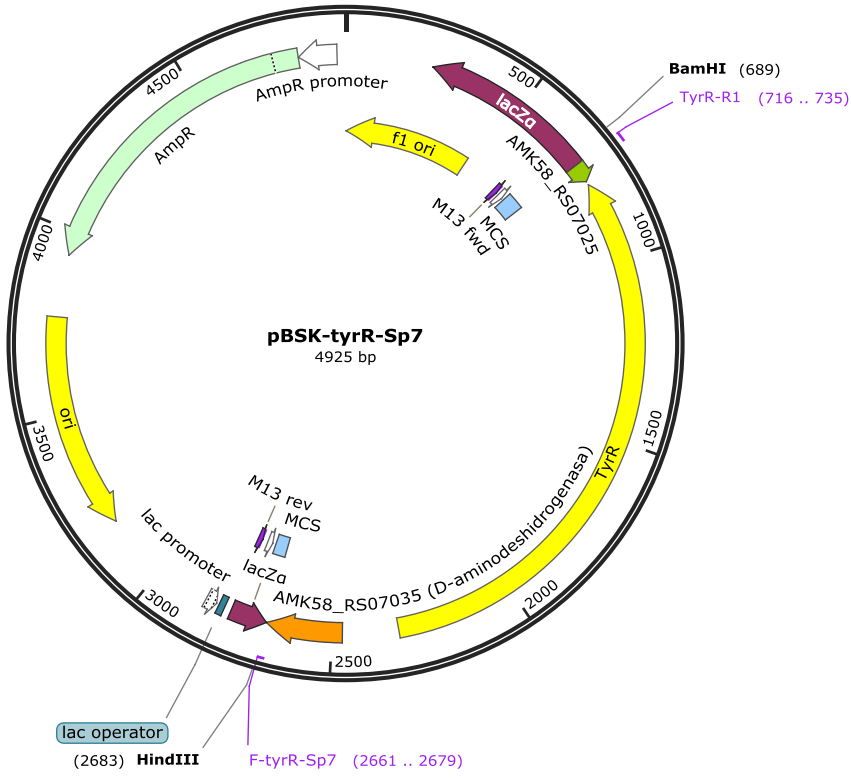
Componente	100 mL
KH ₂ PO ₄	0.087 g
K ₂ HPO ₄	0.167 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.02 g
NaCl	0.01 g
Ácido málico	0.5 g
KOH (perlas)	0.4 g
Ajustar pH a 6.8 con KOH al 10% y esterilizar a 5 lb durante 30 min	
CaCl ₂ 2%	0.1 mL
FeCl ₃ 1%	0.1 mL
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O 0.2%	0.1 mL
NH ₄ Cl 20%	0.5 mL
Solución de oligoelementos	0.1 mL

Medio Rojo Congo

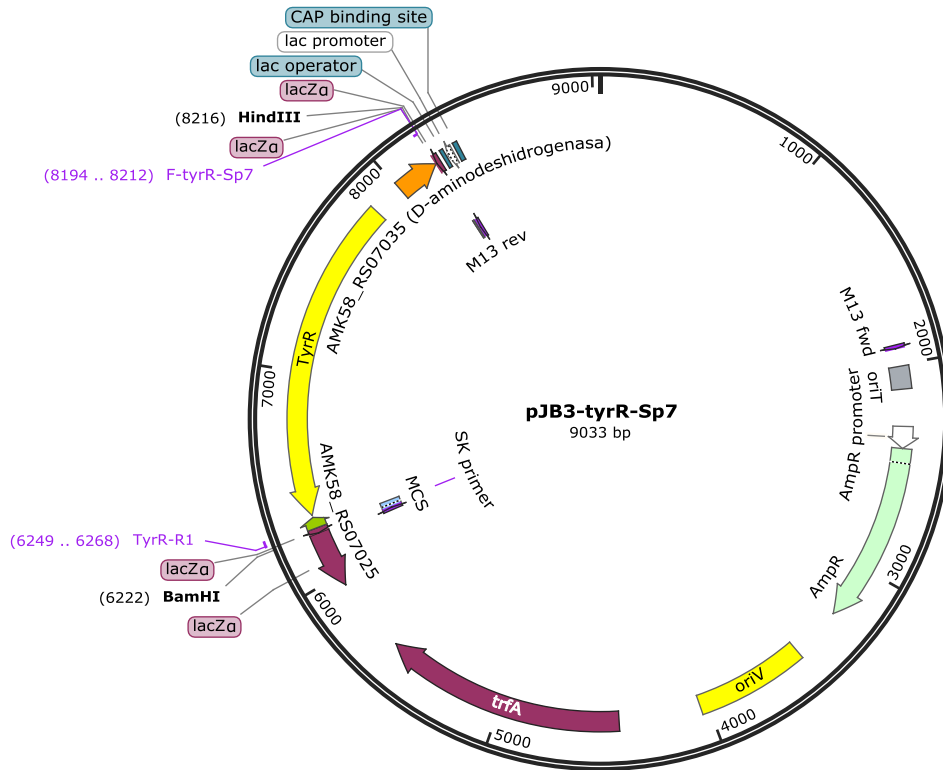
Componentes	100 mL
K ₂ HPO ₄	0.05 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.02 g
NaCl	0.01 g
Extracto de levadura	0.05 g
Ácido málico	0.5 g
KOH	0.4 g
FeCl ₃ 1%	0.14 mL
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O 0.1%	0.2 mL
Ajustar pH a 6.8 con KOH posterior a eso agregar el rojo congo al 0.25%	
Rojo Congo 0.25%	1.5 mL

Agar bacteriológico	1.5 g
Esterilizar 5 lb por 30 minutos	

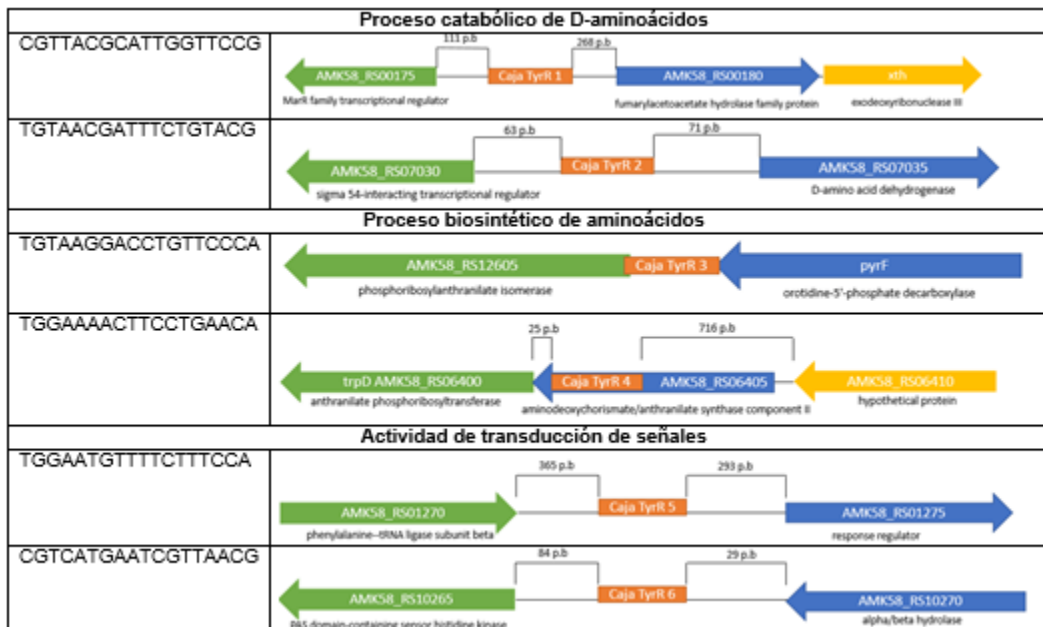
12.2 Mapa físico de la construcción pBSK-tyrR-Sp7.



12.3 Mapa físico de la construcción pJB3-tyrR-Sp7.



12.4 Contexto genético de los genes analizados para la posterior selección.



TGTATTGCAGAATTGACA	<p>AMKS8_RS03740 hybrid sensor histidine kinase/response regulator</p> <p>Caja TyrR 7</p> <p>AMKS8_RS03745 CHASE domain-containing protein</p>
GGTAACCCGATATTTACG	<p>AMKS8_RS03830 aminopeptidase P family protein</p> <p>Caja TyrR 8</p> <p>AMKS8_RS03835 chemotaxis protein CheF</p>
TGTAACCTCAGTTTTCT	<p>AMKS8_RS01995 Do family serine endopeptidase</p> <p>Caja TyrR 9</p> <p>AMKS8_RS02000 hypothetical protein</p>
TGTAGGGTATATTTAACA	<p>AMKS8_RS04500 tRNA-Val</p> <p>Caja TyrR 10</p> <p>AMKS8_RS04505 methyl-accepting chemotaxis protein</p>
TGGAATACAACCGTTACT	<p>AMKS8_RS04510 HAMP domain-containing protein</p> <p>Caja TyrR 11</p> <p>AMKS8_RS04515 malate synthase G</p>
TGTCAATCTATATGAACA	<p>AMKS8_RS23855 manganese efflux pump</p> <p>Caja TyrR 12</p> <p>AMKS8_RS23860 methyl-accepting chemotaxis protein</p>
TGGAACATCGGCTGTAC G	<p>AMKS8_RS04755 RNA domain-containing protein</p> <p>Caja TyrR 13</p> <p>AMKS8_RS04760 hypothetical protein</p>

Actividad de transportadores transmembrana	
CGTCACCAAATCTTCACA	<p>AMKS8_RS02250 hypothetical protein</p> <p>Caja TyrR 14</p> <p>uppB AMKS8_RS02255 sn-glycerol-3-phosphate ABC transporter substrate-binding protein</p>
TGGAACGCITTTCTGTCCG	<p>AMKS8_RS08690 rubredoxin</p> <p>AMKS8_RS08695 Lrp/AsnC family transcriptional regulator</p> <p>Caja TyrR 15</p> <p>AMKS8_RS08700 LysI family transporter</p>
TGAAAAGGTTCTGTACA	<p>AMKS8_RS18430 adenine phosphoribosyltransferase</p> <p>Caja TyrR 16</p> <p>AMKS8_RS18435 MlaE family lipid ABC transporter permease subunit</p>
TGTTACGTTTTTCATGACG	<p>AMKS8_RS19930 DMT family transporter</p> <p>Caja TyrR 17</p> <p>AMKS8_RS19935 Na⁺/Pi cotransporter family protein</p>
TGCAATTTAGTTTTACT	<p>AMKS8_RS22560 autotransporter domain-containing protein</p> <p>Caja TyrR 18</p> <p>AMKS8_RS22565 OsmC family protein</p>
CGTTACGCTTATTTTACA	<p>AMKS8_RS14350 tetratricopeptide repeat protein</p> <p>Caja TyrR 19</p> <p>AMKS8_RS14355 ferrous iron transport protein A</p>

