



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**

---

**INSTITUTO DE CIENCIAS**

**CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS**

**TESIS:**

**Estudio de la regulación transcripcional del gen *ipdC* que participa en la biosíntesis de ácido indol-3-acético en cepas de *Azospirillum brasilense***

**TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**DOCTOR EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA)**

**PRESENTA:**

**M.C. SAÚL JIJÓN MORENO**

**DIRECTORA DE TESIS:**

**D.C. BEATRIZ EUGENIA BACA**

**Puebla, Pue., Diciembre de 2017**



## DECLARATORIA DEL AUTOR

Declaro que la presente tesis cuyo título es “Estudio de la regulación transcripcional del gen *ipdC* que participa en la biosíntesis de ácido indol-3-acético en cepas de *Azospirillum brasilense*” dirigida por la D.C. Beatriz Eugenia Baca y realizada en el Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla como uno de los requisitos para obtener el grado de Doctor en Ciencias (Microbiología) es original y de mi autoría y no ha sido utilizada para la obtención de algún grado académico en ninguna otra institución educativa. Aunque el contenido incluye información obtenida de otros trabajos publicados, ésta fue utilizada sólo como antecedentes y los autores fueron debidamente citados, por lo cual no infringe en las leyes de los derechos de autor.

Atentamente:

A handwritten signature in red ink, appearing to read 'Saúl Jijón', with a horizontal line underneath.

**M.C. Saúl Jijón Moreno**

## AGRADECIMIENTOS

En este espacio expreso mi más sincero agradecimiento a las personas que fueron parte fundamental en el desarrollo y culminación de este trabajo.

A **mis padres**, por ser mis más grandes maestros durante el tiempo que llevo de vida, por sus sabios consejos y por haber luchado incansablemente para que me desarrollara profesionalmente, lo cual constituye la herencia más valiosa que pudiera recibir. Siempre serán mi más grande inspiración.

A mi asesora de tesis, la **Dra. Beatriz Eugenia Baca** quien dirigió este trabajo con profesionalismo y paciencia, por su disposición y apoyo en el aspecto profesional y humano. Sus amplios conocimientos y consejos han tenido una gran influencia en mi desarrollo profesional, por lo cual indudablemente la considero mi mentora en este aspecto de mi vida. Fue un gran honor haber formado parte de su grupo de trabajo durante 8 años consecutivos.

A mis sinodales, la **Dra. Irma Herrera Camacho** (Laboratorio de Bioquímica y Biología molecular, Centro de Química, Facultad de Ciencias Químicas, BUAP), al **Dr. Candelario Vázquez Cruz** (Laboratorio de Microbiología Molecular y Celular, Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas [CICM], BUAP), al **Dr. Ygnacio Martínez Laguna** (Laboratorio de Biología Molecular de Enteropatógenos, Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, BUAP), al **Dr. Luis Javier Martínez Morales** (Laboratorio de Fisiología Microbiana de la Interacción Microorganismo-Hospedero, CICM, BUAP) y al **Dr. Guillermo Gosset Lagarda** (Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, UNAM), por sus valiosas recomendaciones durante los seminarios y tutorales de tesis y por su contribución en la revisión del manuscrito.

Al **Dr. Alberto Ramírez Mata** por sus valiosas aportaciones al trabajo a través de sus recomendaciones, por facilitarme el material de laboratorio, por haberme apoyado en la expresión de las proteínas y desde luego por su amistad.

A la **QFB. Ma. Luisa Xiqui Vázquez** por su gran apoyo en el desarrollo de algunos experimentos incluyendo la expresión y purificación de las proteínas y sobre todo por su amistad y compañerismo durante los 8 años de mi estancia en el laboratorio.

A mi novia **Cynthia Marcos Jiménez** por su apoyo profesional y humano, por escuchar pacientemente durante horas mis ideas sobre el trabajo, por sus opiniones y sugerencias, por compartir conmigo los momentos de alegría y entusiasmo, pero también por las palabras de aliento cuando me invadía el desánimo y la preocupación por el trabajo. Eres parte del grupo de personas que han influido de manera positiva en mi desarrollo personal al enseñarme entre muchas otras cosas que las relaciones personales son tan importantes como el ámbito profesional.

También expreso mi gratitud para mis amigos y colegas: **Areli, Elvia, Lili, Toño, Gamaliel, Lester, Iván Ricardo y Luís**, por su apoyo profesional y humano y sobre todo por su agradable amistad. A mis compañeros y amigos del laboratorio, **Saira, Roxana, Iris, Daneira, Andrea, Daniel, Paco, Ricardo, Miguel, Víctor, Francisco y Alejandro** con quienes compartí muchas horas de trabajo en un agradable ambiente de compañerismo y amistad.

A **mi maravillosa familia** por su apoyo, paciencia, comprensión y palabras de ánimo que me ayudaron a obtener este logro y por esos grandes momentos de convivencia familiar que hemos compartido. Por ello y por muchas cosas más, les viviré eternamente agradecido.

De igual forma, expreso mi agradecimiento a las instituciones que fueron parte fundamental en el desarrollo de este trabajo, principalmente a la **Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP)** y al **Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas** de la BUAP por haberme abierto sus puertas para continuar mis estudios de posgrado, a la **Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado (VIEP)** y al **Instituto de Ciencias (ICUAP)** por el apoyo económico recibido a través de sus programas de apoyos para congresos y becas profesionales. Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)**, por contribuir al financiamiento de este trabajo y por otorgarme una beca de doctorado y al **Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Puebla (CONCYTEP)** por su apoyo económico para asistir a congresos nacionales y en el extranjero.

## ABREVIATURAS

<b>AAT1</b>	Aromático aminotransferasa 1
<b>AAT2</b>	Aromático aminotransferasa 2
<b>AIA</b>	Ácido indol-3-acético
<b>AIP</b>	Ácido indol-3-pirúvico
<b>Ap</b>	Ampicilina
<b>ATP</b>	Trifosfato de adenosina
<b>AuxRE</b>	Elemento de respuesta a auxina
<b>bEBPs</b>	Proteínas de unión a potenciadores bacterianos
<b>cDNA</b>	DNA complementario
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>EMSA</b>	Ensayo de retardo de la movilidad en gel
<b>EPS</b>	Exopolisacáridos
<b>Gm</b>	Gentamicina
<b>HPLC</b>	Cromatografía líquida de alta resolución
<b>HTH</b>	Hélice-vuelta-hélice
<b>IAD</b>	Indol-3-acetaldehído
<b>IAM</b>	Indol-3-acetamida
<b>IAN</b>	Indol-3-acetonitrilo
<b>Km</b>	Kanamicina
<b>LB*</b>	LB modificado
<b>MMAB</b>	Medio mínimo para <i>Azospirillum brasilense</i>
<b>ON</b>	Óxido nítrico
<b>ONPG</b>	<i>Orto</i> -nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PGPR</b>	Rizobacteria promotora del crecimiento de la planta
<b>PPDC</b>	Fenilpiruvato descarboxilasa
<b>PWM</b>	Matriz de peso posicional

<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>RT-qPCR</b>	PCR cuantitativa en tiempo real
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato sódico
<b>PAGE-SDS</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
<b>Spc</b>	Espectinomicina
<b>SSTVI</b>	Sistema de secreción tipo VI
<b>TAE</b>	Tris-acetato-EDTA
<b>TAM</b>	Triptamina
<b>Tc</b>	Tetraciclina
<b>UM</b>	Unidades Miller

# ÍNDICE GENERAL

<b>DECLARATORIA DEL AUTOR.....</b>	<b>i</b>
<b>AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>ii</b>
<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>iv</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>2</b>
<b>1 INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>4</b>
1.1 El ácido indol-3-acético producido por <i>Azospirillum</i> spp. como regulador del crecimiento vegetal.....	5
1.2 Vías de producción de AIA en <i>A. brasilense</i> basado en análisis genéticos, bioquímicos y bioinformáticos .....	6
1.2.1 Vía del ácido indol-3-pirúvico.....	6
1.2.2 Vía del indol-3-acetonitrilo.....	9
1.2.3 Vía de la indol-3-acetamida.....	9
1.3 El ácido indol-3-acético como molécula señal en la interacción bacteria-planta...	10
1.4 Regulación de la biosíntesis de AIA y regulación transcripcional del gen <i>ipdC</i> ...	13
<b>2 JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>15</b>
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>16</b>
3.1 General.....	16
3.2 Específicos.....	16
<b>4 HIPÓTESIS.....</b>	<b>16</b>
<b>5 DIAGRAMA DE TRABAJO.....</b>	<b>17</b>
<b>6 MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>17</b>
6.1 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo.....	17
6.2 Técnicas de biología molecular.....	20

6.3	Amplificación y secuenciación de <i>ipdC</i> de <i>A. brasilense</i> spp.....	21
6.4	Aislamiento e identificación de proteínas de unión al promotor de <i>ipdC</i> por cromatografía de afinidad a DNA.....	22
6.5	Identificación de las proteínas obtenidas por cromatografía de afinidad a DNA..	23
6.6	Construcción de la mutante <i>A. brasilense</i> 2116.....	23
6.7	Construcción de la mutante <i>A. brasilense</i> 2117.....	25
6.8	Construcción de la mutante <i>A. brasilense</i> 2113.....	25
6.9	Construcción de la mutante <i>A. brasilense</i> 2114.....	28
6.10	Construcción de la doble mutante <i>A. brasilense</i> 2115.....	30
6.11	Complementación de las mutantes <i>A. brasilense</i> 2113 y <i>A. brasilense</i> 2115....	30
6.12	Aislamiento del RNA y eliminación del DNA genómico.....	31
6.13	Síntesis del cDNA.....	32
6.14	Análisis de la eficiencia de amplificación de los oligonucleótidos utilizados para la RT-qPCR.....	32
6.15	PCR cuantitativa en tiempo real.....	33
6.16	Actividad enzimática de la $\beta$ -galactosidasa.....	33
6.17	Cuantificación de la producción de AIA.....	34
6.18	Análisis bioinformáticos.....	35
6.19	Análisis estadístico.....	35
6.20	Clonación y expresión de LibR y MibR.....	35
<b>7</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>37</b>
7.1	Análisis <i>in silico</i> del promotor de <i>ipdC</i> de <i>A. brasilense</i> Sp7.....	37
7.2	Análisis de la variabilidad de la región del extremo 5' de <i>ipdC</i> de <i>A. brasilense</i> spp.....	40
7.3	Análisis de la secuencia de aminoácidos de PPDCs de cepas de <i>A. brasilense</i> ....	42
7.4	Producción de ácido indol-3-acético en cepas de <i>A. brasilense</i> .....	44
7.5	Identificación de <i>tyrR</i> en el genoma de <i>A. brasilense</i> Sp7.....	45

7.6	Mutación de <i>tyrR</i> y su efecto en la biosíntesis de ácido indol-3-acético.....	48
7.7	Efecto de la mutación de <i>tyrR</i> en la expresión de <i>ipdC</i> .....	49
7.8	Predicción de sitios de unión a TyrR en el genoma de <i>A. brasilense</i> Sp7.....	52
7.9	Aislamiento e identificación de proteínas de unión al promotor de <i>ipdC</i> por cromatografía de afinidad a DNA.....	53
7.10	Análisis bioinformático de LibR.....	56
7.11	Análisis bioinformático de MibR.....	59
7.12	Efecto de la mutación de <i>libR</i> y <i>mibR</i> en la biosíntesis de AIA.....	62
7.13	Efecto de la mutación de <i>libR</i> y <i>mibR</i> en la en la expresión de <i>ipdC</i> .....	67
7.14	Predicción de sitios de unión a LibR y MibR en la región reguladora de <i>ipdC</i> .....	69
7.15	Clonación y expresión de <i>libR</i> y <i>mibR</i> .....	70
<b>8</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>71</b>
<b>9</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>82</b>
<b>10</b>	<b>TRABAJOS FUTUROS.....</b>	<b>82</b>
<b>11</b>	<b>MATERIAL COMPLEMENTARIO.....</b>	<b>84</b>
11.1	Figuras complementarias.....	84
11.2	Tablas complementarias.....	97
<b>12</b>	<b>PUBLICACIONES Y CONGRESOS.....</b>	<b>101</b>
12.1	Publicaciones.....	101
12.2	Congresos.....	101
<b>13</b>	<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>119</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1</b>	Enzimas probablemente implicadas en la producción de AIA en <i>A. brasilense</i> Sp7 basado en análisis bioinformáticos.....	7
<b>Tabla 2</b>	Cepas bacterianas y plásmidos utilizados en este trabajo.....	18
<b>Tabla 3</b>	Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.....	20
<b>Tabla 4</b>	Identificación de cepas de <i>Azospirillum</i> spp. basado en la secuencia de nucleótidos del gen RNAr 16S.....	39
<b>Tabla 5</b>	Producción de AIA en MMAB con malato complementado con triptófano....	49
<b>Tabla 6</b>	Cinética de la expresión de <i>ipdC</i> en <i>A. brasilense</i> 2112 y <i>A. brasilense</i> 2117...	51
<b>Tabla 7</b>	Predicción bioinformática de sitios probables de unión a TyrR en el genoma de <i>A. brasilense</i> Sp7.....	52

## ÍNDICE DE TABLAS COMPLEMENTARIAS

<b>Tabla C1</b>	Medios de cultivo bacteriano utilizados en este trabajo.....	97
<b>Tabla C2</b>	Reactivos y soluciones utilizadas para la cromatografía de afinidad a DNA..	98
<b>Tabla C3</b>	Reactivos y soluciones utilizadas para la purificación de RNA de bacterias.....	99
<b>Tabla C4</b>	Reactivos y soluciones utilizadas para la actividad enzimática de la $\beta$ -galactosidasa.....	100

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Vías de biosíntesis de AIA en bacterias.....	6
<b>Figura 2</b>	Modelo propuesto de la señalización mediada por AIA en bacterias asociadas a plantas.....	11
<b>Figura 3</b>	Estrategia para la construcción de la mutante 2116.....	25
<b>Figura 4</b>	Estrategia para la construcción de la mutante 2113.....	27
<b>Figura 5</b>	Estrategia para la construcción de la mutante 2114.....	29
<b>Figura 6</b>	Región del extremo 5' de <i>ipdC</i> de <i>A. brasilense</i> Sp7.....	37

<b>Figura 7</b>	Amplificación del gen RNAr 16S utilizando oligonucleótidos específicos para <i>Azospirillum</i> spp.....	38
<b>Figura 8</b>	Arbol filogenético basado en la secuencia del gen RNAr 16S de <i>Azospirillum</i> spp.....	39
<b>Figura 9</b>	Alineamiento múltiple de la región río arriba de <i>ipdC</i> de cepas de <i>A. brasilense</i> .....	41
<b>Figura 10</b>	Alineamiento múltiple de proteínas homólogas a PPDC de cepas de <i>A. brasilense</i> .....	43
<b>Figura 11</b>	Arbol filogenético de proteínas PPDCs de <i>A. brasilense</i> spp. y sus homólogos de otros géneros bacterianos.....	44
<b>Figura 12</b>	Determinación de la producción de AIA por HPLC en cepas de <i>Azospirillum</i> spp.....	45
<b>Figura 13</b>	Predicción bioinformática de los dominios de TyrR de <i>A. brasilense</i> Sp7 y alineamiento múltiple con proteínas homólogas.....	47
<b>Figura 14</b>	Producción de AIA de las cepas Sp7, 2116 y 2112 en MMAB con malato a diferentes tiempos de crecimiento.....	49
<b>Figura 15</b>	Cinética de la expresión de <i>ipdC</i> en las cepas 2112 y 2117.....	51
<b>Figura 16</b>	PAGE-SDS de proteínas de <i>A. brasilense</i> Sp7 obtenidas por cromatografía de unión a DNA utilizando como sonda la región del extremo 5' de <i>ipdC</i> e identificación por espectrofotometría de masas.....	55
<b>Figura 17</b>	Predicción bioinformática de los dominios de LibR de <i>A. brasilense</i> Sp7 y alineamiento múltiple con proteínas homólogas.....	57
<b>Figura 18</b>	Árbol filogenético de proteínas homólogas a LibR.....	59
<b>Figura 19</b>	Predicción bioinformática de los dominios de MibR de <i>A. brasilense</i> Sp7 y alineamiento múltiple con proteínas homólogas.....	61
<b>Figura 20</b>	Árbol filogenético de proteínas homólogas a MibR.....	62
<b>Figura 21</b>	Cromatogramas de HPLC de la cuantificación de AIA producido por cepas de <i>A. brasilense</i> .....	64
<b>Figura 22</b>	Producción de AIA por cepas de <i>A. brasilense</i> en MMAB con malato a diferentes tiempos de crecimiento.....	66
<b>Figura 23</b>	Producción de AIA por cepas de <i>A. brasilense</i> en MMAB con gluconato a diferentes tiempos de crecimiento.....	67

<b>Figura 24</b>	Análisis de la expresión de <i>ipdC</i> en las cepas 2113, 2114 y 2115 con respecto a la cepa Sp7 en MMAB con malato en presencia o en ausencia de triptófano.....	68
<b>Figura 25</b>	Predicción bioinformática de los sitios de unión a LibR y MibR en la región reguladora de <i>ipdC</i> .....	69
<b>Figura 26</b>	Expresión de LibR y MibR en <i>E. coli</i> BL21.....	70
<b>Figura 27</b>	Modelo propuesto de la regulación transcripcional de <i>ipdC</i> en <i>A. brasilense</i> .	81

## ÍNDICE DE FIGURAS COMPLEMENTARIAS

<b>Figura C1</b>	Cinética de crecimiento de cepas de <i>A. brasilense</i> en MMAB con malato..	84
<b>Figura C2</b>	Relación sinténica de genes homólogos a <i>libR</i> en bacterias del género <i>Azospirillum</i> con respecto a <i>A. brasilense</i> Sp7.....	85
<b>Figura C3</b>	LibR y proteínas homólogas de la familia LuxR con dominios REC-HTH encontradas en el genoma de <i>A. brasilense</i> Sp7.....	86
<b>Figura C4</b>	Alineamiento múltiple del dominio REC de LibR con el dominio REC de proteínas homólogas encontradas en el genoma de <i>A. brasilense</i> Sp7.....	87
<b>Figura C5</b>	Alineamiento múltiple del dominio HTH de LibR con el dominio HTH de proteínas homólogas localizadas en el genoma de <i>A. brasilense</i> Sp7.....	88
<b>Figura C6</b>	Relación sinténica de genes homólogos a <i>mibR</i> en bacterias del género <i>Azospirillum</i> con respecto a <i>A. brasilense</i> Sp7.....	89
<b>Figura C7</b>	MibR y proteínas homólogas de la familia MarR encontradas en el genoma de <i>A. brasilense</i> Sp7.....	90
<b>Figura C8</b>	Alineamiento múltiple del dominio HTH de MibR con el dominio HTH de proteínas homólogas encontradas en el genoma de <i>A. brasilense</i> Sp7...	91
<b>Figura C9</b>	Cinética de crecimiento de cepas de <i>A. brasilense</i> en medio mínimo con malato o con gluconato.....	92
<b>Figura C10</b>	Plásmidos construídos en este trabajo.....	93
<b>Figura C11</b>	Curvas de disociación y determinación de la eficiencia de amplificación de <i>ipdC</i> , <i>gyrA</i> y <i>rho</i> por RT-qPCR.....	95
<b>Figura C12</b>	Gráficas de amplificación de <i>ipdC</i> , <i>gyrA</i> y <i>rho</i> obtenidas por RT-qPCR...	96

## RESUMEN

*Azospirillum brasilense* es una rizobacteria promotora del crecimiento vegetal que produce la fitohormona ácido indol-3-acético (AIA), una molécula de señalización involucrada en el procesos de interacción bacteria-planta. La biosíntesis de AIA en *Azospirillum* se lleva a cabo principalmente a través de la vía del ácido indol-3-pirúvico (AIP). La enzima fenilpiruvato descarboxilasa (PPDC) es codificada por el gen indolpiruvato descarboxilasa (*ipdC*). En este trabajo, se analizó la posible variabilidad genética del gen *ipdC* y de su región reguladora de cepas de *A. brasilense* aisladas de diferentes plantas y procedentes de diferentes regiones geográficas. Las cepas bacterianas fueron identificadas a través de la amplificación y secuenciación del gen rRNA 16S. La comparación de la secuencia de nucleótidos de la región reguladora de *ipdC* mostró que los elementos en *cis*, los cuales son importantes para la transcripción de *ipdC*, estuvieron muy conservados entre las cepas de *A. brasilense* analizadas. La comparación de la secuencia de nucleótidos de *ipdC*, así como de la secuencia deducida de aminoácidos de las PPDCs, mostró que existe poca variabilidad genética entre los aislados.

Previo a este trabajo se demostró que la transcripción de *ipdC* en *Enterobacter cloacae* es inducida directamente por el regulador transcripcional TyrR, el cual regula la expresión de genes involucrados en el transporte y metabolismo de aminoácidos en *Escherichia coli* (Ryu & Patten, 2008). En este trabajo, se analizó la posible participación de TyrR en la regulación de la expresión de *ipdC* en *A. brasilense* Sp7. En una cepa mutada en el gen *tyrR*, nombrada *A. brasilense* 2116, la producción de AIA disminuyó 18% comparada con la cepa silvestre Sp7. No obstante, un análisis transcripcional utilizando una fusión transcripcional cromosómica *ipdC-lacZ* mostró que TyrR no está implicado en la regulación de la expresión de *ipdC*. A través de un análisis bioinformático del genoma de *A. brasilense* Sp7 se encontraron probables sitios de unión para TyrR en promotores de genes que, probablemente, están implicados en la biosíntesis de AIA, lo cual sugiere que TyrR controla la biosíntesis de AIA a través de un mecanismo indirecto como el transporte de triptófano al interior de la célula o la biosíntesis de triptófano. A pesar de que se han identificado los elementos del promotor que son importantes para la transcripción de *ipdC* en *A. brasilense*, los factores en *trans* involucrados en su expresión no han sido identificados. En este trabajo, mediante ensayos de cromatografía de afinidad a DNA se aislaron proteínas que interactuaron con el promotor de *ipdC*. La identificación por espectrometría de masas reveló dos proteínas con dominios hélice-vuelta-hélice las cuales podrían estar involucradas en la expresión de *ipdC*. Estas proteínas correspondieron a un regulador transcripcional de la familia LuxR y a un regulador transcripcional de la familia MarR, las cuales fueron nombradas LibR (por LuxR-family indole-3-acetic acid biosynthesis regulator) y MibR (por MarR-family indole-3-acetic acid biosynthesis regulator), respectivamente. La

expresión de *ipdC* en una mutante con una delección de *libR*, nombrada *A. brasilense* 2113, disminuyó 4 veces (25%) con respecto a la cepa silvestre. En una mutante con una delección de *mibR*, nombrada *A. brasilense* 2114, la expresión de *ipdC* disminuyó ligeramente con respecto a la cepa silvestre, pero la diferencia entre ambas no fue estadísticamente significativa. En una doble mutante *libR-mibR*, nombrada *A. brasilense* 2115, la expresión de *ipdC* disminuyó 7 veces con respecto a la cepa silvestre. Por otro lado, la cepa 2113 produjo 31% menos AIA que la cepa silvestre, mientras que la cepa 2114 produjo ligeramente menos AIA que la cepa silvestre pero la diferencia entre ambas no fue estadísticamente significativa. Curiosamente, la doble mutante *A. brasilense* 2115 produjo 51% menos AIA que la cepa silvestre. A través de un análisis bioinformático del promotor de *ipdC* se encontró un probable sitio de unión a LibR y un probable sitio de unión a MibR, los cuales se sobrelapan con una repetición invertida localizada río arriba de un probable sitio de unión al factor  $\sigma^{54}$ . En conjunto, los resultados presentados en este trabajo sugieren que LibR y MibR coregulan la expresión de *ipdC* donde LibR actúa como un activador mientras que MibR posiblemente actúa como un antiactivador. Este trabajo aporta nuevos hallazgos sobre la regulación transcripcional de *ipdC* que permiten comprender el mecanismo empleado por *A. brasilense* para controlar la biosíntesis de AIA.

## ABSTRACT

The plant growth-promoting rhizobacteria *Azospirillum brasilense* produces the phytohormone indole-3-acetic acid (IAA), a signaling molecule involved in bacteria-plant interaction. IAA biosynthesis in *Azospirillum* occurs mainly through the indole-3-pyruvic acid (IPyA) pathway. The indole pyruvate decarboxylase (*ipdC*) gene encodes the key enzyme in this pathway, phenylpyruvate decarboxylase (PPDC). In this work, the possible genetic variability between *ipdC* gene, and its regulatory sequence from *A. brasilense* strains isolated from different plants and geographic regions was analyzed. Bacterial strains were identified by PCR amplification and sequencing of the 16S rDNA gene. Nucleotide comparison of the *ipdC* regulatory region revealed that *cis*-elements previously shown to be required for *ipdC* transcription were highly conserved between *A. brasilense* strains. Both, nucleotide sequence of *ipdC* and deduced amino acids sequence of the PPDCs, revealed low levels of genetic variability between the isolates.

Transcription of *ipdC* in *Enterobacter cloacae* has been determined to be directly induced by the transcriptional regulator TyrR, which regulates genes involved in aromatic amino acid transport and metabolism in *Escherichia coli* (Ryu & Patten, 2008). In this work, the possible involvement of TyrR in

both, *ipdC* gene regulation and indole-3-acetic acid biosynthesis in *A. brasilense* Sp7 was analyzed. The production of IAA in a *tyrR* insertional mutant, denoted *A. brasilense* 2116, was decreased by 18% compared to wild-type strain. However, transcriptional analysis using *ipdC-lacZ* chromosomal reporter fusion revealed that TyrR is not involved in *ipdC* transcriptional regulation. A genome-wide analysis of *A. brasilense* Sp7 revealed putative TyrR binding sites in promoters of genes probably involved in indole-3-acetic acid biosynthesis, which suggest that TyrR controls IAA biosynthesis through an indirect mechanism such as tryptophan biosynthesis and transport into the cell. It was shown in previous studies that promoter elements are required for *ipdC* transcription in *A. brasilense*, however, until now, trans-acting transcriptional factors involved in *ipdC* expression have not been yet identified. To identify trans-acting transcriptional factors regulating *ipdC* expression, DNA affinity chromatography and mass spectrometry were utilized to isolate and identify proteins that interact with *ipdC* promoter. Two putative transcriptional regulators with helix-turn-helix domains were identified that bind to the *ipdC* promoter: a LuxR family and a MarR family transcriptional regulator that were named LibR (LuxR-family indole-3-acetic acid biosynthesis regulator) and MibR (MarR-family indole-3-acetic acid biosynthesis regulator), respectively. A *libR* deletion mutant, denoted *A. brasilense* 2113, showed a 4-fold lower level of *ipdC* transcript compared to wild-type strain. The levels of *ipdC* transcript were slightly lower in a *mibR* deletion mutant, denoted *A. brasilense* 2114, albeit not statistically different from the wild-type strain. Interestingly, a *libR-mibR* double mutant, denoted *A. brasilense* 2115, showed a 7-fold decrease in *ipdC* transcript level compared to the wild type strain. On another hand, the IAA production was decreased by 31% in the strain 2113 compared to wild-type strain and slightly lower in the strain 2114 albeit not statistically different from the wild-type strain. Interestingly, levels of IAA in the double mutant *A. brasilense* 2115 were decreased by 51% compared to the wild type strain. Bioinformatic analysis of *ipdC* promoter revealed a potential LibR binding site and a MibR binding site. These sites overlaps a previously identified inverted repeat upstream of a putative  $\sigma^{54}$  binding site. Taken together, all data obtained here suggest that both, LibR and MibR coregulate the *ipdC* expression where LibR acts as an activator while MibR acts as an antiactivator. These findings provide novel insight in the transcriptional regulation of *ipdC* that contribute to our understanding of the regulatory mechanism employed by *A. brasilense* in controlling IAA biosynthesis.

# 1. INTRODUCCIÓN

La rizósfera, la zona del suelo que rodea y que está influenciada por las raíces de las plantas (Hartmann *et al.*, 2008), es el hábitat de una gran cantidad de microorganismos como bacterias, hongos, oomicetos, virus y arqueas, así como algunos protozoarios. Estos organismos son atraídos por las rizodeposiciones, tales como los nutrientes, los exudados y el mucigel liberados por las raíces de las plantas, lo cual les permite establecerse en la rizósfera o colonizar el tejido interno de la raíz causando varios efectos sobre el crecimiento y nutrición de la planta huésped (Philippot *et al.*, 2013). Estos microorganismos pueden establecer una relación de simbiosis, asociación mutualista o parasitismo con la planta. Las asociaciones mutualistas se clasifican en dos tipos: protectores contra patógenos y proveedores de nutrientes como los hongos arbusculares micorrízicos y las bacterias que producen sustancias reguladoras del crecimiento vegetal (Lambers *et al.*, 2009). A estas últimas se les conoce como rizobacterias promotoras del crecimiento de la planta (PGPRs) debido a que generan un efecto positivo en las plantas. Las bacterias que más abundan en la rizósfera son las pertenecientes a la subclase alfa de las proteobacterias seguido por las subclases beta y gamma (Chow *et al.*, 2002). La subclase alfa incluye la rizobacteria fijadora de nitrógeno *Azospirillum*, uno de los géneros más estudiados en la actualidad debido a su capacidad de aumentar el crecimiento y el rendimiento de numerosas especies vegetales de interés agrícola (de-Bashan & Bashan, 2004).

Las bacterias del género *Azospirillum* son rizobacterias Gram negativas, fijadoras de nitrógeno de vida libre de forma curva (vibroide), producen flagelos polares y peritricos. Hasta el momento se han identificado 19 especies las cuales están listadas en el sitio web LPSN (List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature, [www.bacterio.net/azospirillum.html](http://www.bacterio.net/azospirillum.html), fecha de consulta: 2017) aunque las más estudiadas han sido *A. brasilense* y *A. lipoferum*. Contienen de 6 a 7 replicones y el tamaño de su genoma varía dependiendo de la especie o de la cepa y oscila entre 6.4-7.6 megabases con un contenido de G + C del 67-68% (Wisniewski-Dye *et al.*, 2012). Las bacterias del género *Azospirillum* han sido aisladas de más de 100 especies de plantas y mejoran significativamente el crecimiento y la productividad de plantas de interés agrícola en condiciones de campo (Bashan y de-Bashan, 2010). La estimulación del crecimiento vegetal por *Azospirillum* spp. se debe a varios mecanismos como la producción y secreción de: fitohormonas (Tien *et al.*, 1979; Bottini *et al.*, 1989), óxido nítrico (Creus *et al.*, 2005), ácido abscísico (Cohen *et al.*, 2008), así como el incremento en la disponibilidad de nutrientes (Rodríguez *et al.*, 2004; Bashan y de-Bashan 2005; Hungria *et al.*, 2010), la fijación biológica de nitrógeno (de-Bashan *et al.*, 2012) y el incremento de la resistencia a patógenos (Tortora *et al.*, 2011), entre otros. Incluso, se ha propuesto una hipótesis aditiva la cual sugiere que los mecanismos mencionados anteriormente pueden actuar de manera conjunta (Bashan y de-Bashan, 2010). De todos estos mecanismos, probablemente los más importantes son la producción de

la fitohormona ácido indol-3-acético (AIA) y óxido nítrico (ON) debido a que son los principales responsables de los efectos observados sobre el sistema radicular.

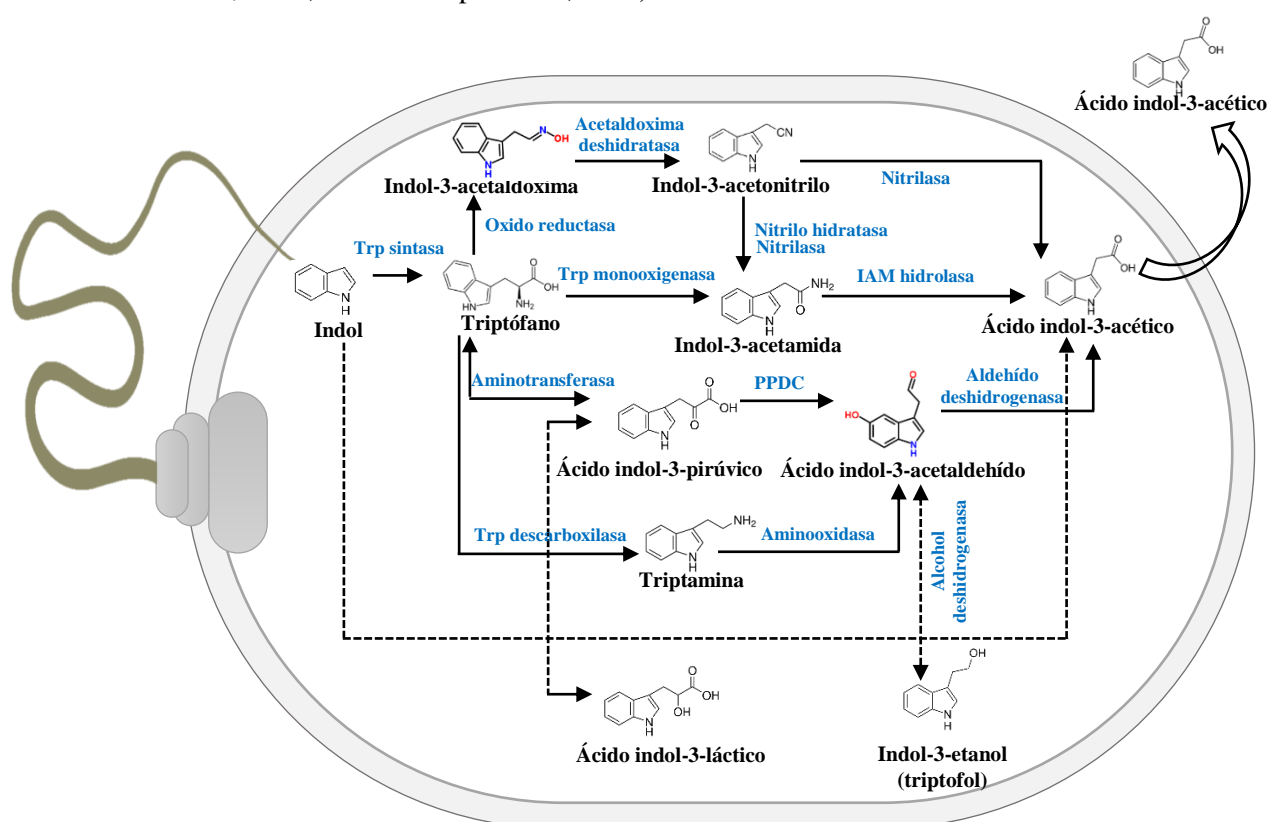
### **1.1. El ácido indol-3-acético producido por *Azospirillum* spp. como regulador del crecimiento vegetal**

El AIA regula gran parte de los procesos del desarrollo de las plantas como la embriogénesis (Friml *et al.*, 2003), la organogénesis de las raíces, incluyendo la dominancia apical (Reinhardt *et al.*, 2000; Benková *et al.*, 2003) y el desarrollo del tejido vascular (Mattsson *et al.*, 2003), así como el crecimiento diferencial durante el tropismo (Friml *et al.*, 2002), senescencia (Ellis *et al.*, 2005), interacción planta-patógeno (Kazan *et al.*, 2009), respuesta al estrés abiótico (Wang *et al.*, 2010), entre otros.

El AIA es la principal fitohormona producida por las plantas y también es sintetizado por diversos microorganismos incluyendo hongos y bacterias como las PGPRs. La función del AIA producido por bacterias ha sido estudiado desde hace más de tres décadas, cuando se descubrió que juega un papel importante como factor de virulencia para la formación del tumor en la planta, inducido por *Agrobacterium tumefaciens* y *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* (Smidt y Kosuge, 1978; Thomashow *et al.*, 1984). Desde entonces se han encontrado diversos géneros bacterianos que producen AIA pero con efecto no patógeno entre los que se encuentran *Azospirillum*, *Enterobacter*, *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus* (Ahmad *et al.*, 2008; Raddidi *et al.*, 2008; Hassen δ Labuschagne, 2010; Sokolova *et al.*, 2011), *Methylobacterium extorquens* (Ivanova *et al.*, 2001) y *Paenibacillus polymyxa* (Lebuhn *et al.*, 1997). Recientemente se han reportado otros géneros bacterianos que sintetizan AIA entre ellos *Sphingomonas pseudosanguini* (Thepsukhon *et al.*, 2013), *Staphylococcus*, *Methylobacterium* (Jiang *et al.*, 2013), *Streptomices* sp. (Lin y Xu, 2013), *Burkholderia phytofirmans* (Naveed *et al.*, 2015), entre otros. Tien *et al.*, (1979) fueron los primeros en sugerir que las bacterias rizosféricas del género *Azospirillum* podían mejorar el crecimiento vegetal a través de la producción de fitohormonas como el AIA. La producción de AIA depende de la especie, la cepa, las condiciones de cultivo, la concentración de triptófano, el pH, la oxigenación y de la fase de crecimiento (Crozier *et al.*, 1988; Omay *et al.*, 1993). En un estudio llevado a cabo en 40 cepas de *Azospirillum* spp. aisladas de diferentes plantas y regiones geográficas se encontró que la producción de AIA en medio mínimo con malato complementado con triptófano oscila entre 0,17-98 µg/ml (Jijón-Moreno *et al.*, 2015). El triptófano es considerado el precursor del AIA debido a que la adición de este aminoácido a los cultivos de bacterias productoras de AIA resulta en una mayor producción de esta fitohormona (Wright *et al.*, 1991).

## 1.2. Vías de producción de AIA en *A. brasilense* basado en análisis genéticos, bioquímicos y bioinformáticos

La identificación de algunos genes implicados en la biosíntesis de AIA en *A. brasilense* y en otros géneros bacterianos, se han identificado a través de la construcción y caracterización de mutantes afectadas en la producción de AIA, así como a través de la caracterización bioquímica de algunas enzimas que catalizan la formación de compuestos intermediarios de las vías dependientes de triptófano. De esta forma se han identificado cuatro vías metabólicas dependientes de triptófano en bacterias del género *Azospirillum*; vía del ácido indol-3-pirúvico (AIP) vía de la indol-3-acetamida (IAM), vía del indol-3-acetonitrilo (IAN) y vía de la triptamina (TAM), así como una vía independiente de triptófano (figura 1) (Prinsen *et al.*, 1993; Costacurta *et al.*, 1994; Carreño-López *et al.*, 2000).



**Figura 1. Vías de biosíntesis de AIA en bacterias.** Las líneas punteadas indican las reacciones en las que no se han identificado las enzimas implicadas. Abreviaturas: IPDC, Indol piruvato descarboxilasa (adaptado de Duca *et al.*, 2014).

### 1.2.1. Vía del ácido indol-3-pirúvico

La principal vía de producción de AIA en *A. brasilense* y en otras rizobacterias es la del intermediario ácido indol-3-pirúvico. La vía consiste de tres etapas, en la primera el precursor triptófano es transaminado a

ácido indol-3-pirúvico por una aminotransferasa y posteriormente este último es descarboxilado por una indol piruvato descarboxilasa formando indol-3-acetaldehído, el cual a su vez es oxidado por una indol acetaldehído deshidrogenasa para formar AIA (figura 1). En bacterias, las aromático aminotransferasas que participan en la primera reacción de la vía, esto es, la transaminación del triptófano para formar ácido indol-3-pirúvico, han sido caracterizadas a nivel bioquímico en diversos estudios (Ruckdäschel *et al.*, 1988, Baca *et al.*, 1994; Soto-Urzúa *et al.*, 1996; Ge, *et al.*, 2009; Szkop & Bielawsky, 2013). La enzima indol piruvato descarboxilasa es codificada por el gen *ipdC* y se considera la más importante en la vía debido a que la mutación de *ipdC* en diferentes cepas de *A. brasilense* causó una disminución de entre el 10 y el 50% en la biosíntesis de AIA comparada con la cepa silvestre (Carreño-López *et al.*, 2000, Malhotra y Srivastava, 2008; Costacurta *et al.*, 1994; Zimmer *et al.*, 1998). Hasta la fecha se ha secuenciado el genoma completo de siete cepas del género *Azospirillum*, entre los que se encuentran *Azospirillum* sp. B510 (Kaneko *et al.*, 2010), *A. brasilense* Sp245 (Wisniewski-Dyé *et al.*, 2011), *A. lipoferum* 4B (Wisniewski-Dyé *et al.*, 2011), *A. brasilense* Az39 (Riviera *et al.*, 2014), *A. brasilense* CBG497 (Wisniewski-Dyé *et al.*, 2012), *A. thiophilum* DSM 21654 (Kwak & Shin, 2016; Fomenkov *et al.*, 2016) y *A. brasilense* Sp7 (Kwak y Shin, 2016, artículo no publicado). La disponibilidad de la secuencia genómica completa de *A. brasilense* Sp7 en el GenBank (Kwak y Shin, 2016), nos permitió encontrar proteínas homólogas que participan en la biosíntesis de AIA en otras bacterias (tabla 1).

**Tabla 1.** Enzimas probablemente implicadas en la producción de AIA en *A. brasilense* Sp7 basado en análisis bioinformáticos.

No. de Acceso genbank, <i>A. brasilense</i> Sp7	Función probable	Homólogo, No. de acceso genbank	Organismo	Identidad (similitud)	Referencia
ALJ37565.1	Histidinol fosfato aminotransferasa	YP_003613824.1	<i>E. cloacae</i> ATCC 13047	29% (48%)	Koga <i>et al.</i> , 1994
	Histidinol fosfato aminotransferasa	WP_011858434.1	<i>A. baumannii</i> ATCC 17978	29% (49%)	Nwugo <i>et al.</i> , 2013
ALJ36000.1	Indol piruvato descarboxilasa	AF285632	<i>E. cloacae</i> UW5 (antes <i>P. putida</i> GR12-2)	29% (44%)	Patten & Glick, 2002
ALJ34554.1	Aldehído deshidrogenasa	AY850388	<i>A. brasilense</i> Yu62	99% (98%)	Xie <i>et al.</i> , 2005
	Aldehído deshidrogenasa	XP_758655.1	<i>Ustilago maydis</i>	44% (60%)	Basse <i>et al.</i> , 1996
ALJ38412	Aldehído deshidrogenasa	XP_758655.1	<i>Ustilago maydis</i>	39% (59%)	Basse <i>et al.</i> , 1996
ALJ36000.1	Indol piruvato descarboxilasa	AF285632	<i>E. cloacae</i> UW5 (antes <i>P. putida</i> GR12-2)	29% (44%)	Patten & Glick, 2002
ALJ34554.1	Aldehído deshidrogenasa	AY850388	<i>A. brasilense</i> Yu62	99% (98%)	Xie <i>et al.</i> , 2005
	Aldehído deshidrogenasa	XP_758655.1	<i>Ustilago maydis</i>	44% (60%)	Basse <i>et al.</i> , 1996
ALJ38412	Aldehído deshidrogenasa	XP_758655.1	<i>Ustilago maydis</i>	39% (59%)	Basse <i>et al.</i> , 1996
ALJ39111.1	Nitrilasa	CAL26199.1	<i>B. amyloliquefaciens</i> FZB42	25% (40%)	Idris <i>et al.</i> , 2007
	Nitrilasa	AFY19658.1	<i>Pseudomonas</i> sp. UW4	27% (37%)	Duca <i>et al.</i> , 2014
ALJ35078.1	AIA acetiltransferasa	CAL26203.1	<i>B. amyloliquefaciens</i> FZB42	34% (50%)	Idris <i>et al.</i> , 2007

De acuerdo a este análisis en BLAST (Altschul *et al.*, 1997), la cepa Sp7 contiene todas las enzimas que participan en la vía del ácido indol-3-pirúvico que incluyen dos aromático aminotransferasas, la aromático aminotransferasa 1 (AAT1) y la aromático aminotransferasa 2 (AAT2) codificadas por los genes *hisC1* y *hisC2*, respectivamente. El gen *hisC1* se identificó previamente en una genoteca de *A. brasilense* Sp7 y se encontró que tiene una pequeña contribución en la producción de AIA y además se expresa tanto en vida libre como en asociación con la planta de trigo (Castro-Guerrero *et al.*, 2011). La secuencia traducida del gen *hisC2* tiene una identidad del 29% (48% de similitud) con una triptófano aminotransferasa de *E. cloacae* ATCC 13047, la cual cataliza de manera reversible la transaminación de triptófano para producir ácido indol-3-pirúvico y glutamato (Koga *et al.*, 1994).

El gen *ipdC* de *A. brasilense* Sp7, el cual codifica para la indol piruvato descarboxilasa, contribuye de manera significativa en la producción de AIA debido a que una mutante en este gen produjo sólo el 25% de índoles totales de lo que produjo la cepa silvestre (Carreño-López *et al.*, 2000). La secuencia traducida de *ipdC* de *A. brasilense* Sp7 presenta una identidad del 99% (99% de similitud) con la indol piruvato descarboxilasa de *A. brasilense* Sp245, la cual contribuye en alrededor de un 90% en la producción de AIA y cataliza la descarboxilación del ácido indol-3-pirúvico para formar indol-3-acetaldeído (Costacurta *et al.*, 1994) y comparte un 29% de identidad (44% de similitud) con la secuencia traducida de *ipdC* de *E. cloacae* UW5 que contribuye en alrededor de un 95% a la producción de AIA en presencia de triptófano (Patten & Glick, 2002). La enzima que participa en la última reacción de la vía del AIP, esto es, la deshidrogenación del indol-3-acetaldeído para formar AIA, ha sido reportada recientemente por Shao *et al.*, (2015). En *B. amyloliquefasciens* SQR9 se identificaron dos genes que podrían estar involucrados en la vía del ácido indol-3-pirúvico; una indol piruvato descarboxilasa codificada por el gen *yclC* (No. de acceso NCBI V529\_03400) y una acetaldeído deshidrogenasa codificada por el gen *dhaS* (No. de acceso NCBI V529\_19360). Las mutantes en los genes *yclC* y *dhaS* produjeron un 45 y 23% de AIA de lo que produjo la cepa silvestre, respectivamente (Shao *et al.*, 2015). En el genoma de la cepa Sp7 se encontraron dos aldeído deshidrogenasas que podrían participar en la última etapa de la biosíntesis de AIA. Una de estas proteínas comparte un 99 y 44% de identidad con una aldeído deshidrogenasa de *A. brasilense* Yu62 y de *Ustilago maydis*, respectivamente (tabla 1). En *A. brasilense* Yu62 el gen *aldA*, el cual codifica para la indol acetaldeído deshidrogenasa AldA, se identificó en una biblioteca de mutantes generadas por transposición de Tn5. La mutación de *aldA* afectó la producción de AIA en alrededor de un 50% con respecto a la cepa silvestre (Xie *et al.*, 2005).

### 1.2.2. Vía del indol-3-acetonitrilo

Existe la evidencia fisiológica de la presencia de otras vías de biosíntesis de AIA en *A. brasilense* Sp7 además de la vía del ácido indol pirúvico (Carreño-López *et al.*, 2000), sin embargo, hasta el momento no se han identificado los genes o enzimas que participan en tales vías. Una de las vías alternativas de producción de AIA en bacterias es la vía del indol-3-acetonitrilo, en la cual el indol-3-acetonitrilo es deshidratado a indol-3-acetamida por una nitrilo hidratasa o por una nitrilasa y posteriormente éste es convertido a AIA por una indol acetamida hidrolasa (fig. 1). Alternativamente, el indol-3-acetonitrilo es convertido directamente a AIA por una nitrilasa (Patten *et al.*, 2012; Duca *et al.*, 2014). Utilizando células permeabilizadas, Carreño-López *et al.*, (2000) observaron la conversión enzimática de indol-3-acetonitrilo a AIA en una cepa silvestre de *A. brasilense* Sp7 y en una mutante en el gen *ipdC*, lo cual constituye una evidencia de la posible existencia de esta vía en *A. brasilense*. La búsqueda en BLAST (Altschul *et al.*, 1997) reveló la presencia de una nitrilasa que comparte un 25% de identidad (40% de similitud) con una nitrilasa de *B. amyloliquefaciens* FZB42 codificada por el gen *yhcX* (tabla 1). Una mutante de *B. amyloliquefaciens* FZB42 en el gen *yhcX* produjo solo el 50% de AIA de lo que produjo la cepa silvestre (Idiris *et al.*, 2007).

### 1.2.3. Vía de la indol-3-acetamida

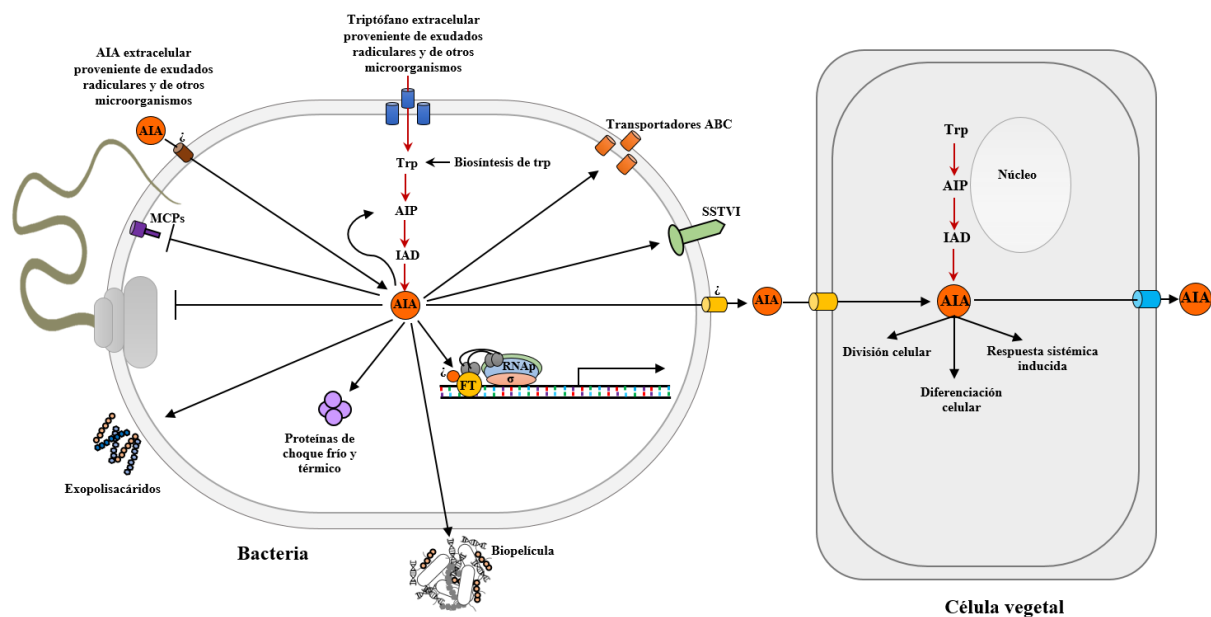
La vía de la indol-3-acetamida ha sido bien caracterizada en bacterias. En esta vía de dos etapas, el triptófano es convertido a indol-3-acetamida por la enzima triptófano-2-monooxigenasa (IaaM), codificada por el gen *iaaM*. En la segunda etapa el IAM es convertido a AIA por una indol acetamina hidrolasa (IaaH), codificada por el gen *iaaH* (Pollmann *et al.*, 2006). La existencia de esta vía en *A. brasilense* fue sugerida en los trabajos de Prinsen *et al.*, (1993) quienes determinaron la existencia de indol-3-acetamida en la fracción sobrenadante del medio de crecimiento, sin embargo, el análisis del genoma completo de *A. brasilense* Sp7 no mostró la presencia de genes homólogos que participan en esta vía. En contraste, en un análisis del genoma completo de *Azospirillum* sp. B510 reportado por Kaneko *et al.*, (2010) se encontraron dos genes homólogos a *iaaM* e *iaaH*, los cuales podrían estar involucrados en la síntesis de AIA a partir de la vía de la indol-3-acetamida en esta bacteria, lo cual sugiere que existe variación en cuanto a las vías de producción de AIA presentes en diferentes especies o cepas de la misma especie.

### 1.3. El ácido indol-3-acético como molécula señal en la interacción bacteria-planta

Generalmente las bacterias producen pequeñas moléculas de señalización que están implicadas en el proceso de transducción de señales, el cual se inicia a partir de un estímulo ambiental o celular, y a partir de esta información reaccionan rápidamente transmitiendo dichas señales a la maquinaria transcripcional, la cual altera la expresión de genes en la célula produciendo una respuesta adaptativa (Camilli & Bassler, 2006). Algunas bacterias secretan pequeñas moléculas conocidas como autoinductores, entre ellas destacan las de tipo acil-homoserina lactonas (Eberhard *et al.*, 1981), el ácido metil éster 3-hidroxipalmitico (Flavier *et al.*, 1997), la 4-hidroxi-2-alquil-quinolonas (Dubern *et al.*, 2008), la 3-hidroxipentadecano-4-ona (Spirig *et al.*, 2008) y la p-coumaroil-homoserín-lactona (Schaefer *et al.*, 2008). Estos autoinductores son moléculas que permiten a las bacterias detectar su propia densidad poblacional seguido por la expresión de genes implicados en diversos procesos celulares como bioluminiscencia, diferenciación morfológica, secreción de factores de virulencia, formación de biopelícula, esporulación, entre otros (Bassler & Losick, 2006).

Además de las moléculas mencionadas anteriormente, se ha descubierto que otras moléculas de tipo hormonal funcionan como señal en el proceso de comunicación célula-célula y microorganismo-hospedero. Se ha mostrado que el AIA funciona como molécula señal en varios microorganismos asociados a plantas debido a que permite la expresión de genes que participan no solo en su propia biosíntesis o catabolismo, sino también en otros procesos como la formación de biopelícula, biosíntesis de exopolisacáridos, resistencia a condiciones de estrés (calor, frío, estrés osmótico, estrés oxidativo y desecación), entre otros (figura 2) (Donati *et al.*, 2013; Bianco *et al.*, 2006; Bianco *et al.*, 2009).

El papel del AIA como molécula señal en *A. brasilense* fue revelado por un trabajo del grupo de J. Vanderleyden. El análisis de la expresión de genes inducidos por AIA se evaluó mediante un estudio de microarreglos en *A. brasilense* Sp245 y su mutante isogénica en el gen *ipdC*, la cual produce muy bajos niveles de AIA comparado con la silvestre (Puyvelde *et al.*, 2011). En la mutante, se disminuyó la expresión de 39 genes que codifican proteínas ribosomales, mientras que aumentó la expresión de genes que pertenecen a un sistema de reducción de nitratos. Este sistema juega un papel muy importante en la desnitrificación aeróbica y en la adaptación a un metabolismo anaeróbico. Además se observó un aumento en la expresión de genes que codifican proteínas de transporte, entre ellos, transportadores de unión a ATP y transportadores periplásmicos independientes de ATP (TRAP).



**Figura 2. Modelo propuesto de la señalización mediada por AIA en bacterias asociadas a plantas.** El triptófano que se encuentra en la rizósfera es captado por las bacterias asociadas a la planta y es utilizado para diversos procesos bioquímicos y metabólicos. Uno de estos procesos es la biosíntesis de AIA, en el que el triptófano es convertido a AIA en una ruta enzimática de 3 etapas. En la primera etapa el triptófano es transaminado para formar ácido indol-3-piúvico (AIP) y en la segunda el AIP es descaboxilado para formar indol-3-acetaldehído (IAD). Finalmente, en la tercera etapa el IAD es deshidrogenado para formar AIA. Es probable que el AIA que se encuentra en la rizósfera como producto del metabolismo microbiano pueda ser internalizado a través de transportadores específicos localizados en la membrana citoplasmática bacteriana. En el interior de la célula el AIA actúa como molécula señal activando o reprimiendo la expresión de varios genes cuyos productos proteicos participan de manera directa o indirecta en diversos procesos como la formación de biopelícula y la síntesis de exopolisacáridos. Además, permite la expresión de genes implicados en el ensamble del sistema de secreción tipo VI (SSTVI) y transportadores de tipo ABC, mientras que reprime la expresión de otros genes, por ejemplo los que participan en el ensamble del flagelo y los que dan lugar a proteínas aceptoras de metilos (MCPs). Aunque se desconoce el mecanismo por el cual el AIA ejerce su actividad de señalización, es posible que actúe de manera similar a otras moléculas de señalización, por ejemplo sirviendo como ligando de factores de transcripción que, a su vez, regulan la expresión génica de manera positiva o negativa. El AIA excretado hacia el medio extracelular es captado por la planta en donde puede actuar como molécula señal para la expresión de genes implicados en procesos como la división celular, diferenciación celular y en la respuesta sistémica inducida (Puyvelde *et al.*, 2011; Donati *et al.*, 2013).

Estas proteínas están implicadas en la importación de carbohidratos a la bacteria y esto le podría permitir captar nutrientes del ambiente rizosférico. Además, el AIA agregado al medio de cultivo aumentó la expresión de genes que codifican para proteínas del sistema de secreción tipo VI (SSTVI). Este sistema consiste de un grupo de proteínas que forman una estructura similar a un tubo de inyección a través del cual la bacteria transporta proteínas efectoras a otras células, por ejemplo a otras bacterias o a las células de la planta huésped (Coulthurst, 2013). En conjunto, estos resultados demuestran que el AIA actúa como una molécula de señalización en la interacción bacteria-planta (Puyvelde *et al.*, 2011).

En *B. japonicum* y en *E. coli*, el AIA agregado de manera exógena al medio de cultivo causó un aumento en la producción de biopelícula y de exopolisacáridos (Donati *et al.*, 2013; Bianco *et al.*, 2006). La producción de biopelícula y exopolisacáridos suele ser esencial para las bacterias que habitan el suelo debido a que les permite resistir las condiciones ambientales fluctuantes y estresantes que suelen encontrarse en la rizósfera (Kachlany *et al.*, 2001; Salunkhe *et al.*, 2005).

Otro de los genes que aumentan su expresión en presencia de AIA son los del propio catabolismo del AIA. En *B. japonicum* y *A. brasilense* Sp245 el AIA causó un aumento en la expresión de genes que codifican para la enzima indol piruvato ferredoxin oxidorreductasa (Donati *et al.*, 2013; Puyvelde *et al.*, 2011). Esta enzima cataliza la descarboxilación oxidativa de arilpiruvatos y es la proteína citoplasmática más abundante en *Pyrococcus furiosus* (Mai *et al.*, 1994) y se sugiere que podría estar implicada en el metabolismo de AIA (Donati *et al.*, 2013). Previo a estos estudios se demostró que el AIA induce la expresión tanto de *ipdC* (Van de Broek *et al.*, 1999; Malhotra & Srivastava, 2008) como de *hisC1*, el gen que codifica para la aromático aminotransferasa 1 en *A. brasilense* Sp7 implicada en la transaminación del triptófano para producir ácido indol-3-pirúvico (Castro-Guerrero *et al.*, 2011). En *B. japonicum*, *A. brasilense* Sp245 y en *A. tumefaciens*, el AIA indujo la expresión de aminotransferasas y aldehído deshidrogenasas (Donati *et al.*, 2013; Puyvelde *et al.*, 2011; Yuan *et al.*, 2008), sin embargo, su participación en la biosíntesis de AIA aún no se ha comprobado. En contraste, el AIA causó un efecto represor sobre los genes de quimiotaxis y de expresión del flagelo en *B. japonicum*, lo cual sugiere que la bacteria utiliza un mecanismo de conservación de energía reprimiendo genes para sus funciones de movilidad y produce más proteínas de estrés que le permite sobrevivir en un ambiente de estrés como la rizósfera (Donati *et al.*, 2013). Estos estudios muestran que el AIA es una molécula de señalización que podría permitir a las bacterias competir en la rizósfera con otros microorganismos e interactuar con la planta huésped a través de una serie de procesos bioquímicos y/o fisiológicos que les garantiza un estado de asociación simbiótica. En figura 2 se muestra un modelo de la señalización mediada por AIA en bacterias asociadas a plantas de acuerdo a los estudios de transcriptoma que se han llevado a cabo en algunas bacterias como *A. brasilense* y en *B. japonicum* (Puyvelde *et al.*, 2011; Donati *et al.*, 2013).

Hasta el momento se desconoce el mecanismo molecular por el cual el AIA influye en la expresión de genes en bacterias. Algunas moléculas de señalización como las de tipo acil-homoserino lactona regulan la transcripción de genes uniéndose a factores de transcripción de la familia LuxR o LasR, los cuales a su vez activan o reprimen la transcripción de genes implicados en diversos procesos como la producción de biopelícula, bioluminiscencia o la expresión de factores de virulencia (Churchil *et al.*, 2011). Existe evidencia de que el AIA también podría regular la transcripción de genes uniéndose a factores de transcripción. En *Acinetobacter baumannii* se encontró que el factor de transcripción IacR, el cual pertenece

a la familia MarR de reguladores transcripcionales, participa en el catabolismo de AIA a través de la regulación negativa del operón *iac* el cual consta de nueve genes estructurales (*iacHABICDEFX*) que codifican proteínas implicadas en la degradación de AIA. La adición de AIA al medio de cultivo causó un aumento en la expresión del operón *iac* lo cual indicó que esta fitohormona antagoniza la represión de *iac* dependiente de IacR. Posteriormente mediante ensayos de EMSA se comprobó que la proteína IacR se une al promotor de *iac*. Esta unión se inhibió totalmente cuando se agregó AIA a una concentración de 50  $\mu\text{M}$  (Shu *et al.*, 2015). Estos resultados sugieren que el AIA podría interactuar con el regulador transcripcional IacR haciendo que se despegue del promotor permitiendo así la expresión del operón *iac*. Este trabajo es el primer estudio que demuestra que el AIA actúa como un ligando bacteriano con el fin de regular la expresión génica en bacterias (Shu *et al.*, 2015).

#### **1.4. Regulación de la biosíntesis de AIA y regulación transcripcional del gen *ipdC***

La biosíntesis de AIA en bacterias es regulada por diversos factores ambientales que influyen en la expresión de *ipdC*. Por ejemplo, el pH ácido y las condiciones anaeróbicas incrementan la expresión de *ipdC* en *A. brasilense* Sp245 (Ona *et al.*, 2005, Vande Broek *et al.*, 2005). Generalmente la adición de triptófano al medio de cultivo, causa un aumento en la producción de AIA. Sin embargo, este incremento no siempre está relacionado con la inducción de la expresión de los genes implicados en la biosíntesis de AIA por el triptófano. Por ejemplo, mientras que en *P. pútida* GR12-2 la adición de triptófano al medio causó un aumento en la expresión de *ipdC* (Patten & Glick, 2002), en *A. brasilense* Sp7 no causó ningún efecto (Carreño-López *et al.*, 2000). Otro de los factores que inducen la expresión de *ipdC* es la formación de biopelícula. Esto se demostró en un estudio de microarreglos en *S. typhimurium* en el que *ipdC* mostró un nivel de expresión de 3.5 veces más en células formando biopelícula comparado con células en estado planctónico (Hamilton *et al.*, 2009).

La inducción de la expresión de *ipdC* probablemente esté directamente relacionada con las características de su promotor. Esta hipótesis se apoya por el hecho de que se han encontrado varios elementos en *cis* en la región promotora de *ipdC* de *A. brasilense* Sp245 que son importantes en la inducción mediada por AIA (Vande Broek *et al.*, 2005). Uno de estos elementos es una repetición invertida localizada en la posición -58 a -38 relativo al sitio de inicio de la transcripción, al cual se le dio el nombre de elemento regulado por auxinas y es requerida para la activación del promotor de *ipdC* y además es esencial para su inducción por AIA (Vande Broek *et al.*, 2005). Este hallazgo representó la primera descripción de un gen bacteriano regulado por auxinas. En este estudio se mostró que esta regulación de tipo “feedback” (autoinducción) por el AIA es responsable del incremento de los niveles de transcripción de *ipdC*, durante el crecimiento de un

cultivo de *A. brasilense* con el mayor nivel de expresión observado en fase de crecimiento estacionaria (Vande Broek *et al.*, 2005). Previamente a este estudio, en un análisis *in silico* de la región promotora de *ipdC* de *A. brasilense* Sp245 se encontraron varios elementos en *cis* regulatorios, tales como un elemento de respuesta a auxina o AuxRE (TGTCNC), así como un sitio de unión putativo para el factor sigma 54 (también conocido como RpoN o  $\sigma^{54}$ ) y un probable sitio de unión a ribosoma (GGAGA) (Lambrecht *et al.*, 1999). RpoN se une a una secuencia de DNA en el promotor que incluye las cajas -12 y -24 (la secuencia consenso es YTGGCACGRNNNTTGCW, en donde N es cualquier nucleótido, Y representa a las pirimidinas, R a las purinas y W puede ser una A o T) y requiere necesariamente de la presencia de una proteína activadora que acopla la energía generada por la hidrólisis de ATP, para la formación del complejo abierto en el proceso de la transcripción (Bush & Dixon, 2012).

Otra característica del promotor de *ipdC* de *A. brasilense* Sp245 es la presencia de dos secuencias palíndromes idénticas localizadas en una región de 150 pb misma que está ausente en otras cepas de *A. brasilense* como la Sp7 (Vande Broek *et al.*, 2005; Malhotra & Srivastava, 2009). Las secuencias palíndromes o repeticiones invertidas en un promotor suelen ser el sitio de unión a factores de transcripción que regulan la transcripción de manera positiva o negativa (Huffman & Brennan, 2002), sin embargo, la presencia de cajas de unión probable a un determinado factor de transcripción debe corroborarse con estudios *in vivo* e *in vitro* que demuestren su participación en la regulación transcripcional del gen en cuestión.

Inmediatamente río abajo de *ipdC* (a 99 pb) se localizó un gen que codifica para una proteína conocida como IaaC (Vande Broek *et al.*, 2005). El gen *iaaC* se transcribe tanto de manera independiente como en forma de operón junto con *ipdC* y se comprobó que regula la producción de AIA pero no la transcripción de *ipdC*. La mutación de *iaaC* causó un aumento de hasta 6 veces en la producción de AIA en *A. brasilense* Sp245 (Vande Broek *et al.*, 2005), mientras que cuando se sobreexpresó en *A. brasilense* SM causó una disminución del 50% en la producción de AIA (Malhotra & Srivastava, 2008), con lo cual se comprobó que el producto de este gen inhibe parcialmente la biosíntesis de AIA en *A. brasilense*. Un análisis bioinformático de la secuencia traducida de *iaaC* de *A. brasilense* Sp245 mostró una identidad del 38% (48% de similitud) con la proteína de respuesta a estrés Dr1199 de *Deinococcus radiodurans* (PDB no. 2VRN). Dr1199 pertenece a una superfamilia de proteínas (DJ-1) la cual incluye proteínas que están involucradas en la protección contra diversas condiciones de estrés ambiental (Fioravani *et al.*, 2008). En *A. brasilense* Sp7 y SM el gen *iaaC* está ausente, lo cual sugiere que la biosíntesis de AIA en estas dos bacterias se regula de manera diferente (Malhotra & Srivastava, 2008).

En el promotor de *ipdC* de *E. cloacae* UW5 se encontró una secuencia repetida invertida similar a la caja de reconocimiento para el factor transcripcional TyrR (Ryu & Patten 2008). TyrR regula la transcripción de genes (de manera positiva o negativa) que están implicados en el transporte y metabolismo de aminoácidos aromáticos en *E. coli* (Pittard *et al.*, 2005). Para corroborar si TyrR regula la transcripción de *ipdC* se generó una mutante en el gen *tyrR* en *E. cloacae* UW5. La mutación de *tyrR* provocó una disminución de alrededor de un 90% en la producción de AIA comparado con la cepa silvestre. Mediante ensayos de retardo de la movilidad en gel (EMSA), así como la cuantificación de la expresión de *ipdC* por PCR cuantitativa en tiempo real (RTq-PCR) y la expresión del gen reportero *uidA* (que codifica para la enzima  $\beta$ -glucuronidasa) dirigida por el promotor de *ipdC*, se comprobó que TyrR regula la transcripción de *ipdC* de manera positiva y directa (Ryu & Patten 2008). Mientras tanto, en *E. cloacae* y *P. putida*, *ipdC* es regulado por el factor sigma alternativo RpoS ( $\sigma^{38}$ ) (Patten & Glick, 2002; Saleh & Glick, 2001). RpoS es un factor sigma que actúa en fase estacionaria del crecimiento regulando la expresión de genes de respuesta a diferentes tipos de estrés (Latifi *et al.*, 1996). La sobreexpresión de *rpoS* en *P. fluorescens* causó un aumento de 10 veces en la producción de AIA (Saleh & Glick, 2001). En *A. brasilense* no se ha encontrado un homólogo de RpoS por lo cual la expresión de *ipdC* podría ser regulado por otro factor sigma. A pesar de la existencia de un sitio de unión putativo para el factor sigma RpoN en el promotor de *ipdC*, la mutación de *rpoN* en *A. brasilense* Sp7 no afectó la producción de AIA (Milcamps *et al.*, 1996).

## 2. JUSTIFICACIÓN

El AIA es una fitohormona implicada en diversos procesos del desarrollo de la planta, así como una molécula señal en el proceso de interacción bacteria-planta por lo que ha sido considerado como uno de los mecanismos más importantes por los cuales las PGPRs estimulan el desarrollo vegetal. La regulación de la biosíntesis de AIA en PGPRs como *A. brasilense* es un proceso altamente regulado y aunque se conocen algunos factores ambientales que controlan este proceso a nivel fisiológico, se conoce muy poco sobre la regulación genética. Los resultados derivados de este trabajo permitirán comprender el mecanismo empleado por *A. brasilense* para regular la biosíntesis de AIA como una estrategia para adaptarse al ambiente rizosférico y establecer una asociación exitosa con su planta huésped.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. General

- Estudiar la regulación transcripcional del gen *ipdC* involucrado en la síntesis de AIA en cepas de *A. brasilense*.

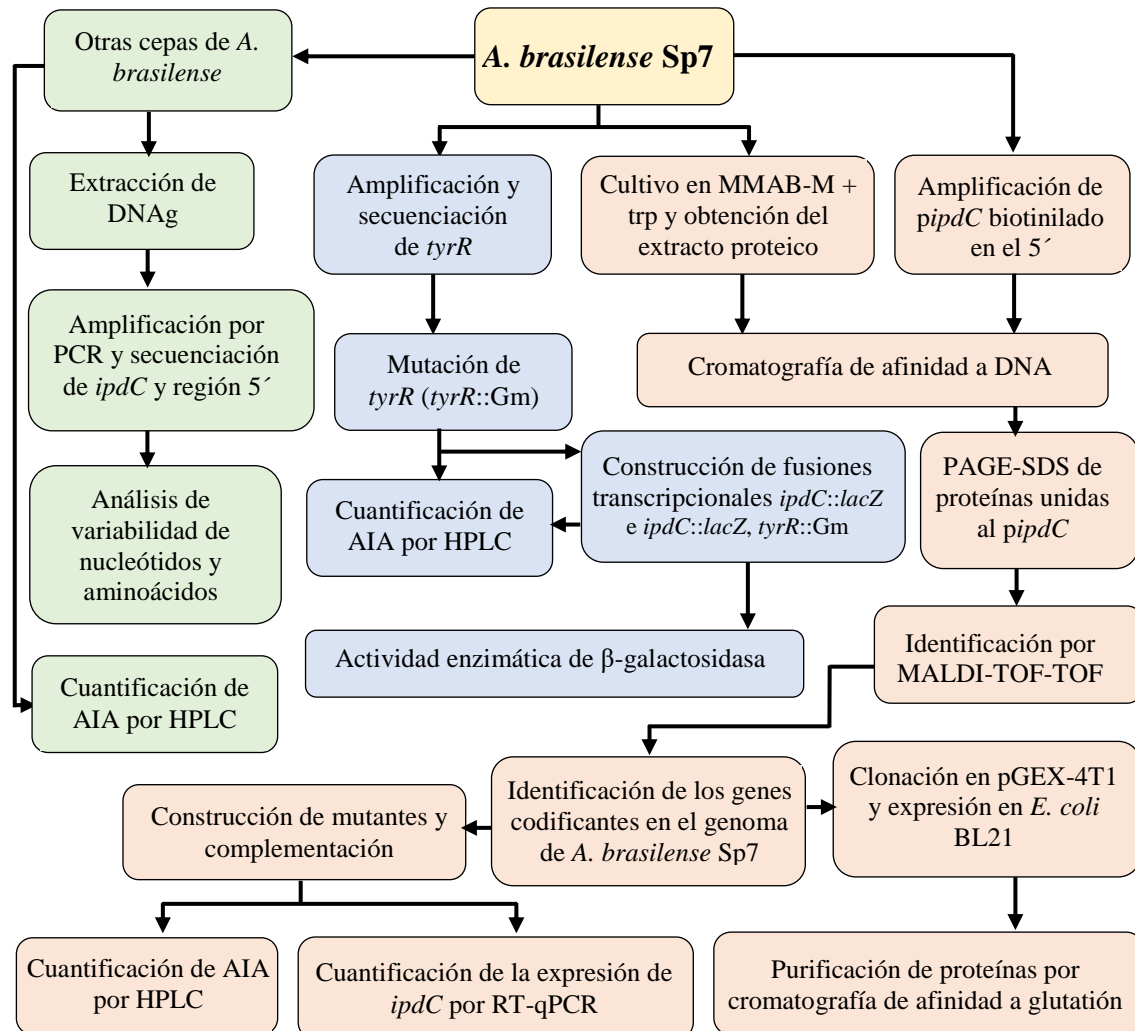
#### 3.2. Específicos:

1. Identificar la región reguladora del gen *ipdC* a nivel de secuencia nucleotídica en diferentes cepas de *A. brasilense*
2. Amplificar y secuenciar los genes *ipdC*, *hisC1* y *hisC2* de cepas de *A. brasilense* y *A. lipoferum*.
3. Analizar la posible participación de TyrR en la regulación transcripcional de *ipdC* y en la biosíntesis de AIA en *A. brasilense* Sp7
4. Identificar las proteínas de unión al promotor de *ipdC*
5. Construir mutantes en los genes codificantes de las proteínas que interactúan con el promotor de *ipdC*
6. Cuantificar la producción de AIA de la cepa silvestre y de las mutantes generadas.
7. Cuantificar la expresión de *ipdC* en la cepa silvestre y en las mutantes generadas.

### 4. HIPÓTESIS

- *Azospirillum brasilense* controla la biosíntesis de AIA a través de reguladores transcripcionales que se unen en la región reguladora de *ipdC* para modular su expresión.

## 5. DIAGRAMA DE TRABAJO



## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

### 7.1. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Las cepas bacterianas y los plásmidos utilizados en este trabajo están listados en la tabla 2 y la fórmula de los medios de cultivo bacteriano utilizados se muestra en la tabla complementaria C1. *E. coli* DH5α (utilizada para experimentos de transformación) y *E. coli* S17.1 (utilizada para conjugación biparental) se cultivaron a 37°C en medio LB. Las cepas de *A. brasilense* se cultivaron en medio mínimo para *A.*

*brasiliense* (MMAB) con malato o con gluconato como fuente de carbono de acuerdo a Okon *et al.*, (1977) y para los experimentos de conjugación se crecieron en medio LB modificado (LB<sup>\*</sup>). Cuando fue necesario, las cepas de *A. brasiliense* y *E. coli* se crecieron con antibióticos a las siguientes concentraciones: ampicilina (Ap) 100 µg/ml, gentamicina (Gm) 30 µg/ml, kanamicina (Km) 25 µg/ml y tetraciclina (Tc) 15 µg/ml.

**Tabla 2.** Cepas bacterianas y plásmidos utilizados en este trabajo

Cepas bacterianas o plásmidos	Descripción	Referencia
<b>Cepa</b>		
<i>E. coli</i> DH5α	<i>endA1 hsdR17 supE44 thi-1λ<sup>-</sup> recA1 gyrA96 relA1 ΔlacU169 Ø80 (ΔlacZΔM15).</i>	Invitrogen, Carlsbad, CA
<i>E. coli</i> S17.1	<i>pro, thi hsd, recA,:: RP4-2 Tc:: Mu-Km Tn7.</i>	Simon <i>et al.</i> , 1983
<i>A. brasiliense</i> Sp245	Cepa silvestre.	Baldani <i>et al.</i> , 1987
<i>A. brasiliense</i> M-1	Cepa silvestre aislada de <i>Saccharum officinarum</i> .	Jijón-Moreno <i>et al.</i> , 2015
<i>A. brasiliense</i> Az39	Cepa silvestre aislada de <i>Triticum turgidum</i> .	Díaz-Zorita & Fernández-Canigia, 2009
<i>A. brasiliense</i> 42M	Cepa silvestre aislada de <i>Zea mays</i> .	García de Salamone <i>et al.</i> , 1996
<i>A. brasiliense</i> C-15	Cepa silvestre aislada de <i>Panicum maximum</i> Jacq.	Jijón-Moreno <i>et al.</i> , 2015
<i>A. lipoferum</i> 5	Cepa silvestre aislada de <i>Oryza sativa</i>	Rariz <i>et al.</i> , 2013
<i>A. lipoferum</i> 45	Cepa silvestre aislada de <i>Oryza sativa</i>	Rariz <i>et al.</i> , 2013
<i>A. lipoferum</i> 64	Cepa silvestre aislada de <i>Oryza sativa</i>	Rariz <i>et al.</i> , 2013
<i>A. brasiliense</i> Sp7	Cepa silvestre.	Tarrand <i>et al.</i> , 1978
<i>A. brasiliense</i> 2112	Cepa derivada de <i>A. brasiliense</i> Sp7 mutada en el gen <i>ipdC</i> . ( <i>ipdC::lacZ-Km<sup>R</sup>-Sm<sup>R</sup>/Spc<sup>R</sup></i> ). Km <sup>R</sup> , Sm <sup>R</sup> .	Carreño-López <i>et al.</i> , 2000
<i>A. brasiliense</i> 2113	Cepa derivada de <i>A. brasiliense</i> Sp7 mutada en el gen <i>libR</i> por inserción de un gen de resistencia a kanamicina ( <i>ΔlibR::Km<sup>R</sup></i> ). Km <sup>R</sup> .	Este trabajo
<i>A. brasiliense</i> 2114	Cepa derivada de <i>A. brasiliense</i> Sp7 mutada en el gen <i>mibR</i> por inserción de un gen de resistencia a kanamicina ( <i>ΔmibR::Km<sup>R</sup></i> ). Km <sup>R</sup> .	Este trabajo
<i>A. brasiliense</i> 2115	Cepa derivada de <i>A. brasiliense</i> Sp7 mutada en el gen <i>mibR</i> por inserción de un gen de resistencia a gentamicina y en el gen <i>libR</i> por inserción de un gen de resistencia a kanamicina ( <i>ΔlibR::Km<sup>R</sup>, ΔmibR::Gm<sup>R</sup></i> ). Km <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup> .	Este trabajo
<i>A. brasiliense</i> 2116	Cepa derivada de <i>A. brasiliense</i> Sp7 mutada en el gen <i>tyrR</i> por inserción de un gen de resistencia a gentamicina ( <i>tyrR::Gm<sup>R</sup></i> ). Gm <sup>R</sup> .	Este trabajo
<i>A. brasiliense</i> 2117	Cepa derivada de <i>A. brasiliense</i> 2112 mutada en el gen <i>tyrR</i> por inserción de un gen de resistencia a gentamicina ( <i>ipdC::lacZ-Km<sup>R</sup>-Sm<sup>R</sup>/Spc<sup>R</sup>, tyrR::Gm<sup>R</sup></i> ). Km <sup>R</sup> , Sm <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup> .	Este trabajo
<i>A. brasiliense</i> 2113- <i>libR</i> <sup>+</sup>	Cepa complementada derivada de la mutante <i>A. brasiliense</i> 2113 ( <i>libR::Km<sup>R</sup></i> ), contiene el plásmido de bajo número de copias pJB3- <i>libR</i> . Km <sup>R</sup> , TC <sup>R</sup> .	Este trabajo
<i>A. brasiliense</i> 2115- <i>libR</i> <sup>+</sup> <i>mibR</i> <sup>+</sup>	Cepa complementada derivada de la mutante <i>A. brasiliense</i> 2115 ( <i>ΔmibR::Gm<sup>R</sup>, ΔlibR::Km<sup>R</sup></i> ), contiene el plásmido de bajo número de copias pJB3 <i>mibR-libR</i> . Km <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup> , TC <sup>R</sup> .	Este trabajo
<b>plásmido</b>		
pBluescript +	Vector de clonación, Ap <sup>R</sup> .	Stratagene, La Jolla, CA, USA
pCR2.1-TOPO	Vector de clonación, Ap <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> .	Invitrogen
pBSL142	Plásmido de alto número de copias, Gm <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup> .	Alexeyev <i>et al.</i> , 1995
pJB3Tc20	Plásmido de bajo número de copias, Tc <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup> .	Blatny <i>et al.</i> , 1997

pCR2.1- <i>tyrR</i>	Derivado de pCR2.1-TOPO, contiene clonado un fragmento de DNA de 2886 pb que incluye la región codificante de <i>tyrR</i> de <i>A. brasilense</i> Sp7. Ap <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> .	Este trabajo
pCR2.1- <i>tyrR</i> ::Gm <sup>R</sup>	Derivado de pCR2.1- <i>tyrR</i> , contiene clonado un gen de resistencia a gentamicina en la región codificante de <i>tyrR</i> , Ap <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup> .	Este trabajo
pSUP202	Plásmido suicida, Ap <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> .	Simon <i>et al.</i> , 1983
pSUP- <i>tyrR</i> ::Gm <sup>R</sup>	Plásmido suicida derivado de pSUP202, contiene el gen <i>tyrR</i> de <i>A. brasilense</i> Sp7 interrumpido con un gen de resistencia a gentamicina, Ap <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup> .	Este trabajo
pGEM-T-Easy	Vector de clonación, Ap <sup>R</sup> .	Promega
pGEM-FA <i>libR</i>	Derivado de pGEM-T-Easy, contiene clonado una fragmento de 771 pb correspondiente a una región rio arriba de <i>libR</i> de <i>A. brasilense</i> Sp7, Ap <sup>R</sup> .	Este trabajo
pGEM-FB <i>libR</i>	Derivado de pGEM-T-Easy, contiene clonado una fragmento de 855 pb correspondiente a una región rio abajo de <i>libR</i> de <i>A. brasilense</i> Sp7, Ap <sup>R</sup> .	Este trabajo
pGEM-FA <i>mibR</i>	Derivado de pGEM-T-Easy, contiene clonado una fragmento de 781 pb correspondiente a una región rio arriba de <i>mibR</i> de <i>A. brasilense</i> Sp7, Ap <sup>R</sup> .	Este trabajo
pGEM-FB <i>mibR</i>	Derivado de pGEM-T-Easy, contiene clonado una fragmento de 830 pb correspondiente a una región rio abajo de <i>mibR</i> de <i>A. brasilense</i> Sp7, Ap <sup>R</sup> .	Este trabajo
pJMS-Km	Plásmido suicida derivado de pSUP202, Ap <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> .	Ramírez-Mata <i>et al.</i> , 2016
pJMS-Δ <i>libR</i> ::Km <sup>R</sup>	Plásmido suicida derivado de pJMS-Km, contiene clonado un fragmento rio arriba (771 pb) y un fragmento rio abajo (855 pb) de <i>libR</i> de <i>A. brasilense</i> Sp7 flanqueando a un gen de resistencia a kanamicina, Ap <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> .	Este trabajo
pJMS-Δ <i>mibR</i> ::Km <sup>R</sup>	Plásmido suicida derivado de pJMS-Km <sup>R</sup> , contiene clonado un fragmento rio arriba (781 pb) y un fragmento rio abajo (830 pb) de <i>mibR</i> de <i>A. brasilense</i> Sp7 flanqueando a un gen de resistencia a kanamicina, Ap <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> .	Este trabajo
pJMS-Δ <i>mibR</i> ::Gm <sup>R</sup>	Plásmido suicida derivado de pJMS-Δ <i>mibR</i> ::Km <sup>R</sup> , contiene clonado un fragmento rio arriba (781 pb) y un fragmento rio abajo (830 pb) de <i>mibR</i> de <i>A. brasilense</i> Sp7 flanqueando a un gen de resistencia a gentamicina, Ap <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup> .	Este trabajo
pJB3- <i>libR</i>	Plásmido de bajo número de copias que contiene el gen silvestre <i>libR</i> de <i>A. brasilense</i> Sp7 incluyendo su promotor. Este plásmido fue utilizado para la complementación de la mutante <i>A. brasilense</i> 2113. Tc <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup> .	Este trabajo
pJB3 <i>mibR-libR</i>	Plásmido de bajo número de copias que contiene el gen silvestre <i>mibR</i> y el gen silvestre <i>libR</i> de <i>A. brasilense</i> Sp7 incluyendo su promotor. Este plásmido fue utilizado para la complementación de la mutante <i>A. brasilense</i> 2115. Tc <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup> .	Este trabajo
pGEX-4T-1	Plásmido de expresión de proteínas. Ap <sup>R</sup>	GE Healthcare Life Sciences
pGEXGST- <i>libR</i>	Plásmido de expresión que contiene el gen <i>libR</i> fusionado al gen <i>gst</i> . Este plásmido fue utilizado para la expresión de LibR en <i>E. coli</i> BL21. Ap <sup>R</sup> .	Este trabajo
pGEXGST- <i>mibR</i>	Plásmido de expresión que contiene el gen <i>mibR</i> fusionado al gen <i>gst</i> . Este plásmido fue utilizado para la expresión de MibR en <i>E. coli</i> BL21. Ap <sup>R</sup> .	Este trabajo

## 6.2. Técnicas de biología molecular

Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo están listados en la tabla 3.

**Tabla 3.** Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

Oligonucleótido y uso	Secuencia 5' - 3'	Características del amplicón	Referencia
<b>Amplificación del RNAr 16S</b>			
rRNA-AZOF	TGAGAAGGGATGCGCAGGCGG	Amplificación del gen rRNA 16S de <i>Azospirillum</i> spp. (1.75 kb)	Jijón-Moreno <i>et al.</i> , 2015
rRNA-AZOR	CCGTGAGAAGGGATGCGCCG		
<b>Amplificación de <i>ipdC</i></b>			
RegR-2F	GTCCGAAAGACGCCCATC	Amplificación de <i>ipdC</i> incluyendo el promotor (1896 pb)	Jijón-Moreno <i>et al.</i> , 2015
RiaaC-Stop	TTAGCGGGCCAGCCCGATC		
<b>Cromatografía de afinidad a DNA</b>			
BIOT-PipdCF	CATGCGGGCATCATTCGAAAGTC	Amplificación del promotor de <i>ipdC</i> biotinilado en el 5' (303 pb)	Este trabajo
PipdCR	TGTGCGCCGCGATCCTTCAG		
<b>Mutación de <i>tyrR</i> y comprobación</b>			
TyrR-F1	AACGGCTTCACCAGCGTCGG	Amplificación de <i>tyrR</i> incluyendo una región del extremo 5' y 3' (2886 pb)	Este trabajo
TyrR-R1.1	GGATGGGTGCGCCTGGTTCC		
<b>Mutación de <i>libR</i> y comprobación</b>			
LuxR-AF	ATCCCGGGTACCTTCGCCAAGCTCCAACAGGC	Amplificación de una región del extremo 5' de <i>libR</i> (fragmento A, 771 pb)	Este trabajo
LuxR-AR	GTCTCGAGATTTTCATCTGGTGGTGCC		
LuxR-BF	ATAGGCCTATGGCCTTCCGCGAGTCGC	Amplificación de una región del extremo 3' de <i>libR</i> (fragmento B, 855 pb)	Este trabajo
LuxR-BR	CACCCGGGACTAGTACTGGTGCCTGAACCTTGAC		
<b>Mutación de <i>mibR</i> y comprobación</b>			
MarR-AF	ATCCCGGGTACCAGGGCTTGCCTTCCTTCTTC	Amplificación de una región del extremo 5' de <i>mibR</i> (fragmento A, 781 pb)	Este trabajo
MarR-AR	TACTCGAGGGTCAACGTGAAAGCCGTGC		
MarR-BF	ATAGGCCTGCGCAGCTCATCGACTTCCTG	Amplificación de una región del extremo 3' de <i>mibR</i> (fragmento B, 830 pb)	Este trabajo
MarR-BR	ATCCCGGGACTAGTGTCTGCGGACAAGTATGT		
<b>Otros usos</b>			
KmR-F7	GCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTG	Hibrida en la posición 758-781 de Km <sup>r</sup> Hibrida en la posición 235-256 de Km <sup>r</sup>	Este trabajo
KmR-R	CAGTGACAACGTCGAGCACAGC		
<b>Clonación y expresión de MibR</b>			
FmarR	ATGAATTCTTGACCGACATCGACCGCCC	Amplificación de la región codificante de <i>mibR</i> (495 pb)	Este trabajo
RmarR	ATGTCGACTCAGCCGGCCCGCGAGATGC		
<b>Clonación y expresión de LibR</b>			
FluxR	ATGAATTCATGAAAATCCTGATCGGAGACGA	Amplificación de la región codificante de <i>libR</i> (645 pb)	Este trabajo
RluxR	ATGTCGACTCAGCGGAGTGGCGACTGCG		
<b>RT-qPCR</b>			
ipdC-RT-F2	ATCCTCAGCGACACAAACTT	Amplificación de un fragmento de <i>ipdC</i> (109 pb)	Este trabajo
ipdC-RT-R	TGTCGGCGTAGGTGTGATAG		
gyrA-RT-F2	GTCGGGCATGTGATGAAG	Amplificación de un fragmento de <i>gyrA</i> (116 pb)	Este trabajo
gyrA-RT-R2	GGTAGACCTTCAGCTTGTAGAC		
rhoF2	GCGGCTCGCTGACCATCATC	Amplificación de un fragmento de <i>rho</i> (188 pb)	Este trabajo
rhoR2	GACCAGCAGCTCCTCCTTGC		

La purificación de DNA plasmídico y genómico, así como la preparación y la transformación de células quimiocompetentes de *E. coli* se llevaron a cabo de acuerdo a los protocolos descritos por Sambrook *et al.*, 2001. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se llevó a cabo en un volumen de reacción de 20  $\mu$ l que incluyó los siguientes componentes: 1  $\mu$ l de DNA templado (50 ng), 1  $\mu$ l de dimetilsulfóxido (5%), 1.6  $\mu$ l de una mezcla de 5 mM de desoxinucleósidos trifosfato (concentración final de 0.4 mM de cada uno), 2  $\mu$ l de buffer de reacción de PCR 10X, 1.2  $\mu$ l de una solución de 50 mM de MgCl<sub>2</sub> (concentración final de 3.0 mM), 1  $\mu$ l de una solución de 10  $\mu$ M de oligonucleótidos (concentración final de 0.5  $\mu$ M de cada uno), 0.25  $\mu$ l de *Taq* DNA polimerasa recombinante o *Taq* DNA polimerasa platinum (Invitrogen) 5 unidades/ $\mu$ l (concentración final de 1.25 U) y 11  $\mu$ l de agua mili-Q. La PCR se llevó a cabo en un termociclador (Bio-Rad) siguiendo el siguiente programa: un ciclo de desnaturalización a 95°C por 5 min, una segunda etapa de desnaturalización a 95°C por 1 min, 35 ciclos de amplificación con una etapa de alineamiento por 30 seg a una temperatura dependiendo del par de oligonucleótidos utilizados y una etapa de elongación de 1 min/kb a 72°C y una etapa de extensión final a 72 °C por 10 min. Los productos de PCR fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% a 70 volts por 1 h en buffer TAE 1x. Los fragmentos fueron comparados con un marcador de peso molecular de 1 kb (Fermentas). El gel fue teñido en bromuro de etidio y fotografiado bajo luz ultravioleta. Cuando fue necesario, las bandas se cortaron del gel y se purificaron con el kit comercial Zymoclean Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research, Orange, CA, USA). Las reacciones de ligación se llevaron a cabo utilizando T4 DNA ligasa de acuerdo a las recomendaciones del fabricante (Life Technologies). Todos los plásmidos construidos se comprobaron por restricción y cuando fue necesario por secuenciación (Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca Mor, México).

### **6.3. Amplificación y secuenciación de *ipdC* de *A. brasilense* spp.**

La amplificación de *ipdC* incluyendo un fragmento de la región río arriba se llevó a cabo por PCR utilizando los oligonucleótidos RegR-2F y RiaaC-Stop (tabla 3) y DNA genómico de cepas de *Azospirillum* spp. aisladas de diferentes plantas y regiones geográficas (tabla 2). La PCR y la separación de los productos de PCR de cada cepa se llevaron a cabo como se indicó anteriormente. Las bandas de DNA fueron purificadas con el kit Zymoclean Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research, Orange, CA, USA) y se enviaron a la Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México en donde se realizó la secuenciación de nucleótidos.

#### **6.4. Aislamiento e identificación de proteínas de unión al promotor de *ipdC* por cromatografía de afinidad a DNA**

El aislamiento de proteínas de unión al promotor de *ipdC* se llevó a cabo mediante cromatografía de afinidad a DNA de acuerdo al protocolo descrito por Jutras *et al.* (2012) con algunas modificaciones. Los reactivos y soluciones se muestran en la tabla complementaria C2. El ensayo se describe a continuación:

Se utilizó como sonda un fragmento de 306 pb que incluyó una región de 256 pb río arriba del codón de inicio de *ipdC* y una región de 50 pb río abajo del mismo. La sonda se obtuvo mediante amplificación por PCR utilizando el oligonucleótido delantero BIOT-PipdCF el cual se le agregó una molécula de biotina en el extremo 5' (Integrated DNA Technologies) y el oligonucleótido reverso PipdCR (tabla 3) y DNA genómico de *A. brasilense* Sp7 como templado. El fragmento amplificado se corrió en un gel de agarosa al 1% y la banda de DNA correspondiente se purificó utilizando el kit Zymoclean Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research). Posteriormente, se mezclaron 200  $\mu$ l (2 mg) de perlas magnéticas acopladas a estreptavidina (Dynabeads M-280 Streptavidin, Life Technologies), con 500  $\mu$ l de buffer de lavado 2x, el tubo se colocó en un magneto (DynaMag<sup>TM</sup>-Spin, Life Technologies) para separar el sobrenadante de las perlas. Este proceso de lavado se realizó 3 veces.

Después de la etapa de lavado, las perlas se mezclaron con 200  $\mu$ l de buffer de lavado 2x y 20  $\mu$ g de DNA sonda biotinilada. La muestra se mantuvo en agitación constante (50 rpm) utilizando un revolver rotador de 360° (Labnet revolver<sup>TM</sup>, Labnet international Inc.) durante 1 h a 25 °C seguido por 3 lavados con 500  $\mu$ l de buffer de lavado 1x y finalmente 3 lavados con 500  $\mu$ l de buffer TE.

El extracto proteico se obtuvo a partir de un cultivo de *A. brasilense* Sp7 crecido en 500 ml de medio mínimo con malato como fuente de carbono y triptófano (100  $\mu$ g/ml) a 30°C durante 30 h (fase estacionaria, DO<sub>600</sub> = 1.4) a 150 rpm. Las células se empaquetaron por centrifugación a 10000 rpm por 10 min y se lavaron dos veces con 50 ml de buffer TN. Posteriormente las células se resuspendieron en 5 ml de buffer de sonicación. Después de 1 h de incubación a 37 °C las células se lisaron por sonicación mantenidas en hielo con un programa de 5 pulsos por 5 min a 40% de amplitud (el proceso se repitió 3 veces con intervalos de 5 min). Las células lisadas se pasaron a tubos Eppendorf de 1.5 ml y se centrifugaron a 14000 rpm durante 1 h a 4°C para separar los restos celulares (este proceso se realizó dos veces). Posteriormente se cuantificaron las proteínas de la fracción soluble utilizando el método de Bradford (Bio-Rad Protein Assay Kit) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El rendimiento promedio fue de 12 mg de proteínas/ml. El complejo promotor *ipdC*-estreptavidina se lavó 3 veces con 500  $\mu$ l de buffer de unión (buffer de sonicación sin lisozima), posteriormente se agregaron 400  $\mu$ l de buffer de unión complementado con 10  $\mu$ g de DNA competidor Poly-dI-dC (ácido poli-desoxiinosínico-desoxicidílico, Sigma-Aldrich) y 750  $\mu$ l de

extracto proteico (9 mg de proteínas), seguido por incubación a 25 °C por 1 h en agitación constante en el revolver agitador de 360°. Este proceso se repitió una vez más agregando la misma cantidad de Poly-dI-dC y de extracto proteico (18 mg de proteínas en total). Finalmente el complejo se lavó cuatro veces con 500 µl de buffer de unión para eliminar las proteínas de unión no específica.

Las proteínas de unión al promotor de *ipdC* se eluyeron agregando 150 µl de buffer de elusión, la muestra se homogeneizó suavemente en Vortex por 5 min, se colocó en el magneto y se separó el sobrenadante, el cual se guardó a -20°C. El proceso de elusión se repitió aumentando la concentración de NaCl del buffer de elusión a 500, 750 y 1 M. Finalmente las muestras se separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (PAGE-SDS) en gradiente de poliacrilamida de 4-20% (Bio-Rad). El gel fue teñido con azul de Coomassie de acuerdo a Schägger (2006), o con nitrato de plata de acuerdo al protocolo descrito por Chevallet *et al.*, (2006).

## **6.5. Identificación de las proteínas obtenidas por cromatografía de afinidad a DNA**

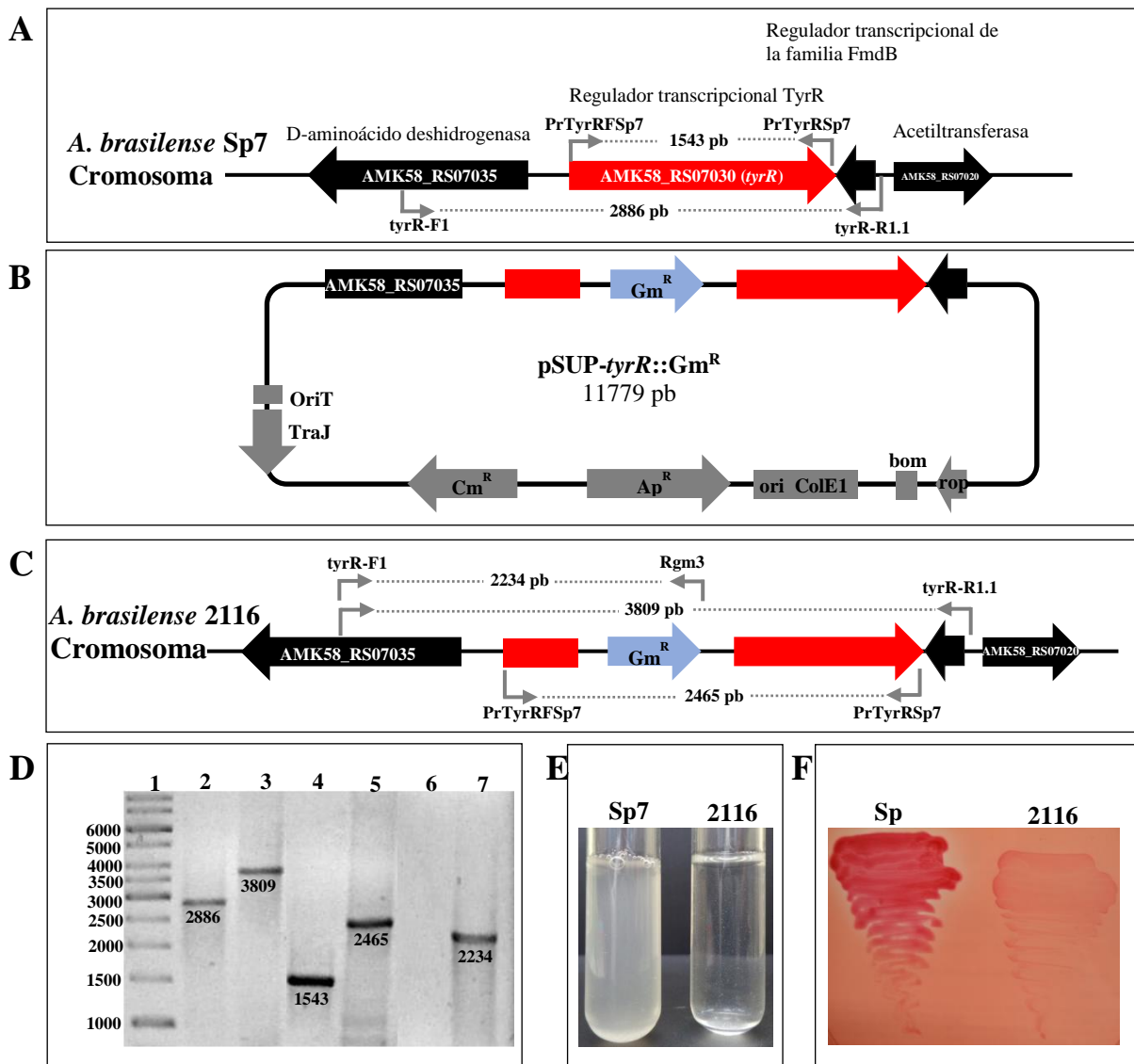
Las bandas de interés se cortaron del gel de poliacrilamida y se enviaron al Laboratorio Nacional de Servicios Experimentales del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (LaNSE-CINVESTAV-IPN), en donde realizó la identificación de las proteínas por MALDI-TOF-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time-Of-Flight).

## **6.6. Construcción de la mutante *A. brasilense* 2116**

La mutación de *tyrR* se llevó a cabo a través de la inserción de un gen de resistencia a Gm en la región codificante de *tyrR* y la mutante se obtuvo por recombinación homóloga. Para ello se amplificó por PCR una región de 2886 pb utilizando DNA genómico de *A. brasilense* Sp7 como templado y los oligonucleótidos *tyrR*-F1 y *tyrR*-R1.1 (tabla 3). Este fragmento incluyó la región codificante de *tyrR* (AMK58\_07015, 1542 pb) y una región de 1063 pb río arriba y una región de 281 pb río abajo de *tyrR* relativo al codón de inicio y al codón de paro, respectivamente. El fragmento se clonó en el vector pCR2.1-TOPO (Invitrogen) obteniendo el plásmido pCR2.1-*tyrR*. Posteriormente, el plásmido pCR2.1-*tyrR* se digirió con la enzima *SalI*, en la región codificante de *tyrR* (posición 412-417). En este sitio se insertó un gen de resistencia a Gm el cual fue obtenido del plásmido pBSL142 mediante restricción con *SalI* obteniendo el plásmido pCR2.1-*tyrR*::Gm<sup>R</sup>. El fragmento *tyrR*::Gm<sup>R</sup> se amplificó por PCR a partir de pCR2.1-*tyrR*::Gm<sup>R</sup> utilizando los oligonucleótidos *tyrR*-F1 y *tyrR*-R1.1. El fragmento de PCR con un tamaño aproximado de 3.75 kb se clonó el sitio *EcoRV* del plásmido suicida pSUP202 (Simon *et al.*, 1983)

obteniendo el plásmido pSUP-*tyrR*::Gm<sup>R</sup> el cual fue incorporado en *E. coli* S17.1 ( $\lambda$ pir) por transformación química.

La mutante *A. brasilense* 2116 se obtuvo por conjugación biparental como se indica a continuación: las células donadoras de *E. coli* S17.1, las cuales contenían el plásmido pSUP-*tyrR*::Gm<sup>R</sup>, se cultivaron en 5 ml de medio LB\* complementado con 30  $\mu$ g/ml de Gm a 37 °C a 150 rpm hasta alcanzar una DO<sub>600</sub> de 0.8, mientras que las células receptoras de *A. brasilense* Sp7 se cultivaron en medio LB\* a 30 °C a 150 rpm hasta alcanzar una DO<sub>600</sub> de 0.3. Se tomó 1 ml de cada cultivo y se centrifugaron a 8000 rpm por 2 min a temperatura ambiente, el paquete celular se lavó dos veces con 1 ml de LB\*. Posteriormente, las células donadoras y las receptoras se resuspendieron en 50  $\mu$ l de LB\*, se mezclaron y se colocaron en forma de punto (20  $\mu$ l en cada punto) sobre una placa de LB\* sin antibióticos. Después de 24 h de incubación a 30 °C, las células se resuspendieron en 1 ml de MMAB-M y se empaquetaron por centrifugación a 8000 rpm por 2 min a temperatura ambiente y se lavaron 2 veces con MMAB-M. Las células se resuspendieron en 1 ml de MMAB-M, se preparó una serie de diluciones (de 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-3</sup>) en un volumen de 100  $\mu$ l y se sembraron de manera masiva en placas de MMAB-M complementado con 30  $\mu$ g/ml de Gm. Después de 48 h de incubación a 30 °C las transconjugantes se resembraron en placas de MMAB-M complementadas con 30  $\mu$ g/ml de Gm con ayuda de palillos de madera estériles y de manera simultánea se sembraron en placas de MMAB-M complementadas con 15  $\mu$ g/ml de Tc. Las transconjugantes que fueron Gm<sup>R</sup> y Tc<sup>S</sup> se consideraron como posibles mutantes. La comprobación de la mutación de *tyrR* se llevó a cabo por PCR y se muestra en la figura 3.



**Figura 3. Estrategia para la construcción de la mutante 2116.** **A.** Mapa físico de la región del cromosoma de *A. brasilense* Sp7 donde se localiza el gen *tyrR*. **B.** Mapa físico del plásmido pSUP-*tyrR*::Gm<sup>R</sup> 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. **E.** Cultivo de *A. brasilense* Sp7 y *A. brasilense* 2116 en medio mínimo con alanina como única fuente de carbono a las 48 horas de crecimiento. **F.** Cultivo de *A. brasilense* Sp7 y *A. brasilense* 2116 en placa de medio mínimo con alanina como única fuente de carbono complementado con rojo congo a los 5 días de crecimiento.

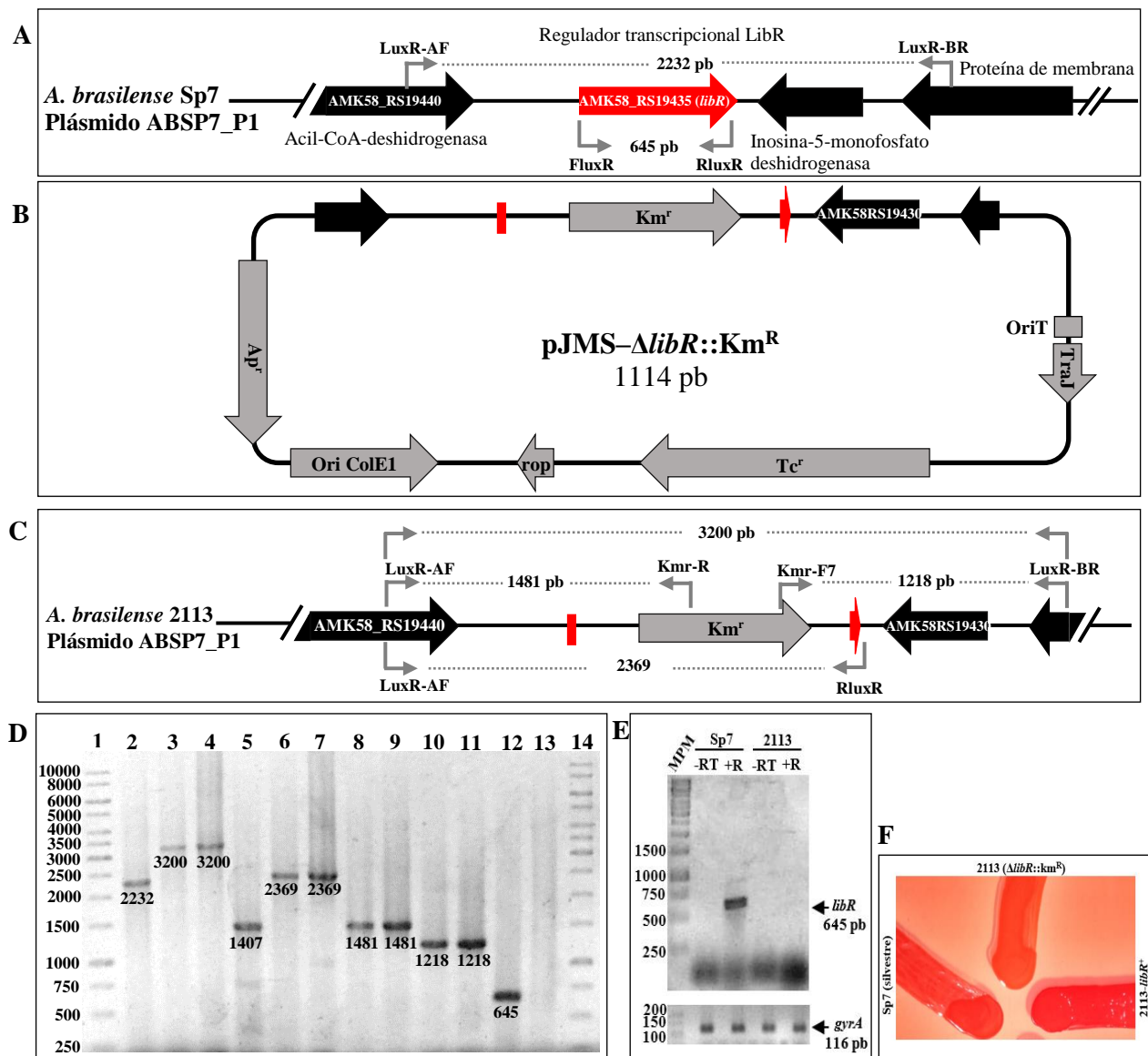
## 6.7. Construcción de la mutante *A. brasilense* 2117.

Previo a este trabajo se construyó una mutante en el gen *ipdC* mediante la inserción de un casete que incluyó un gen de resistencia a estreptomicina/espectinomicina ( $Sm^R/Sp^R$ ), el gen reportero *lacZ* y un gen de resistencia a Km, obteniendo la fusión transcripcional cromosómica *ipdC::lacZ-km-Sm<sup>R</sup>/Sp<sup>R</sup>* (tabla 2). La mutante fue nombrada *A. brasilense* 2112 (Carreño López *et al.*, 2000). La mutante *A. brasilense* 2117 es derivada de la mutante *A. brasilense* 2112 y se construyó insertando el plásmido pSUP-*tyrR::Gm<sup>R</sup>* en *A. brasilense* 2112 siguiendo el mismo método de conjugación biparental descrito anteriormente para la mutante *A. brasilense* 2116.

## 6.8. Construcción de la mutante *A. brasilense* 2113

Para construir la mutante *A. brasilense* 2113 se amplificó por PCR una región de 771 pb (762 pb río arriba y 9 pb río a bajo relativo al codón de inicio de *libR* [AMK58\_RS19435]) el cual se nombró fragmento A utilizando DNA genómico de *A. brasilense* Sp7 como templado y los oligonucleótidos luxR-AF y luxR-AR (tabla 3), los cuales fueron diseñados con un sitio *KpnI* y *XhoI*, respectivamente. Por otra parte se amplificó una región de 855 pb (30 pb río arriba y 825 pb río a bajo relativo al codón de paro de *libR*), el cual se nombró fragmento B utilizando los oligonucleótidos luxR-BF y luxR-BR (tabla 3), los cuales fueron diseñados con sitios *StuI* y *SpeI*, respectivamente. El fragmento A y el fragmento B se clonaron de manera separada en el plásmido pGEM-T-Easy (Promega) obteniendo los plásmidos pGEM-F*AlibR* y pGEM-FB*libR*, respectivamente. El fragmento A se liberó de pGEM-F*AlibR* con *KpnI* y *XhoI* y se clonó en los sitios *KpnI-XhoI* del plásmido suicida pJMS-Km (Ramírez-Mata *et al.*, 2016) obteniendo el plásmido pJMS-F*AlibR*-Km<sup>R</sup>. Posteriormente, el fragmento B se liberó de pGEM-FB*libR* con *StuI* y *SpeI* y se clonó en los sitios *StuI-SpeI* de pJMS-F*AlibR*-Km<sup>R</sup> obteniendo el plásmido pJMS- $\Delta$ *libR::Km<sup>R</sup>* el cual se transformó en células quimiocompetentes de *E. coli* S17.1.

La mutante *A. brasilense* 2113 se obtuvo a través de un proceso de doble entrecruzamiento por recombinación homóloga siguiendo el mismo método de conjugación biparental descrito anteriormente, excepto que el medio de cultivo se complementó con 25  $\mu$ g/ml de Km para la selección de las transconjugantes. La comprobación de la mutación de *libR* se llevó a cabo por PCR y RT-PCR y se muestra en la figura 4.

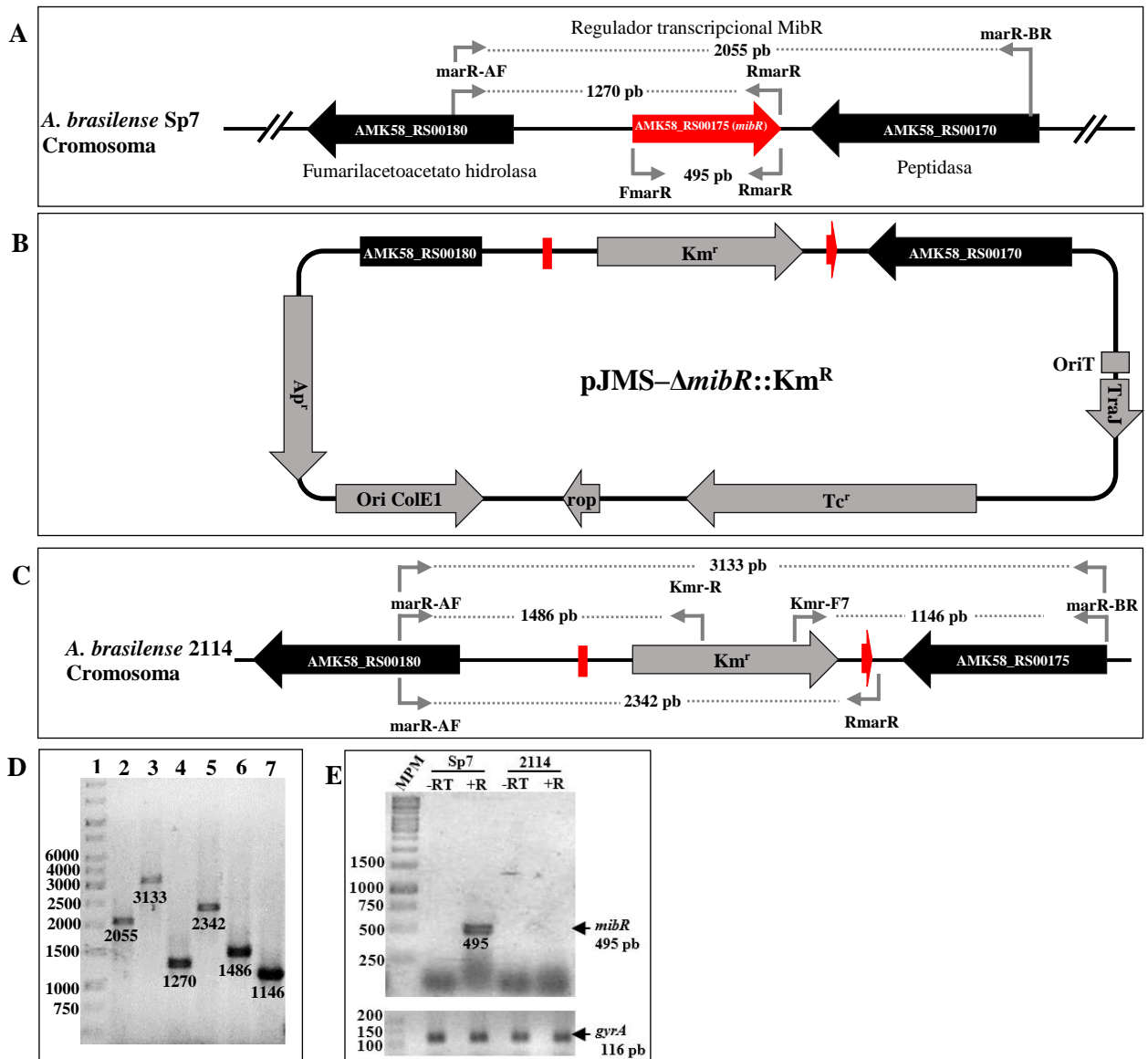


**Figura 4. Estrategia para la construcción de la mutante 2113.** A. Mapa físico de la región del plásmido ABSP7\_p1 de *A. brasilense* Sp7 donde se localiza *libR*. B. Mapa físico del plásmido suicida pJMS- $\Delta$ *libR*::Km<sup>R</sup> construido para la mutación de *libR* por recombinación homóloga. C. Mapa físico de la región del plásmido ABSP7\_P1 de la mutante *A. brasilense* 2113. Las flechas indican los oligonucleótidos utilizados para la comprobación de la mutante 2113. D. Electroforesis en gel de agarosa que muestra la comprobación de la mutación de *libR*: Carril 1: marcador de peso molecular de 1 kb; Carril 2: producto de PCR obtenido con los oligonucleótidos luxR-AF y luxR-BR y DNA genómico de la cepa Sp7 (silvestre); carril 3: producto de PCR obtenido con los oligonucleótidos luxR-AF y luxR-BR y DNA plasmídico de *E. coli* DH5 $\alpha$  que contiene el plásmido pJMS- $\Delta$ *libR*::Km; carril 4: producto de PCR obtenido con los oligonucleótidos luxR-AF y luxR-BR y DNA genómico de 2113; carril 5: producto de PCR obtenido con los oligonucleótidos luxR-AF y RluxR y DNA genómico de Sp7; carril 6: producto de PCR obtenido con los oligonucleótidos luxR-AF y RluxR y DNA plasmídico de *E. coli* DH5 $\alpha$  que contiene el plásmido pJMS- $\Delta$ *libR*::Km; carril 7: producto de PCR obtenido con los oligonucleótidos FluxR y RluxR y DNA genómico de 2113; carril 8: producto de PCR obtenido con los oligonucleótidos luxR-AF y Kmr-R y DNA plasmídico de *E. coli* DH5 $\alpha$  que contiene el plásmido pJMS- $\Delta$ *libR*::Km; carril 9: producto de PCR obtenido con los oligonucleótidos luxR-AF y Kmr-R y DNA genómico de 2113; carril 10: producto de PCR obtenido con los oligonucleótidos Kmr-F7 y luxR-BR y DNA plasmídico de *E. coli* DH5 $\alpha$  que contiene el plásmido pJMS- $\Delta$ *libR*::Km; carril 11: producto de PCR obtenido con los oligonucleótidos Kmr-F7 y luxR-BR y DNA genómico de la cepa 2113; carril 12: producto de PCR obtenido con los oligonucleótidos FluxR y RluxR y DNA genómico de Sp7; carril 13: PCR realizado con los oligonucleótidos

FluxR y RluxR y DNA genómico de la cepa 2113 (comprobación de la ausencia de *libR*); Carril 14: marcador de peso molecular de 1 kb. El tamaño de los productos de PCR está indicado en pares de bases. **E.** Comprobación de la mutación de *libR* por RT-PCR. El RNA fue extraído de células crecidas hasta la fase estacionaria (24 h de crecimiento) en medio mínimo con malato sin la adición de triptófano. Para las reacciones de PCR se utilizaron como templado 200 ng de cDNA (+RT) o de RNA (-RT) de Sp7 o de 2113 y los oligonucleótidos FluxR y RluxR. En la parte inferior de la figura se muestra el corrimiento de los productos de amplificación del gen *gyrA*, el cual fue utilizado como normalizador. En todos los carriles se cargó el mismo volumen de la mezcla de reacción de PCR (5  $\mu$ l). **F.** Cultivo en placa de 4 días de crecimiento de la cepa Sp7, 2113 Y 2113-*libR*<sup>+</sup> en MMAB con malato complementado con rojo congo.

## 6.9. Construcción de la mutante *A. brasilense* 2114

Para construir la mutante *A. brasilense* 2114 se amplificó por PCR una región de 781 pb (775 pb rio arriba y 6 pb rio a bajo relativo al codón de inicio de *mibR* [AMK58\_RS00175]) el cual se nombró fragmento A utilizando DNA genómico de *A. brasilense* Sp7 como templado y los oligonucleótidos marR-AF y marR-AR (tabla 3), los cuales fueron diseñados con un sitio *KpnI* y *XhoI*, respectivamente. Por otra parte se amplificó una región de 830 pb (45 pb rio arriba y 785 pb rio abajo relativo al codón de paro de *mibR*), el cual se nombró fragmento B utilizando los oligonucleótidos marR-BF y marR-BR (tabla 3), los cuales fueron diseñados con sitios *StuI* y *SpeI*, respectivamente. El fragmento A y el fragmento B se clonaron de manera separada en el plásmido pGEM-T-Easy obteniendo los plásmidos pGEM-FAmibR y pGEM-FBmibR, respectivamente. El fragmento A se liberó de pGEM-FAmibR con *KpnI* y *XhoI* y se clonó en los sitios *KpnI-XhoI* del plásmido suicida pJMS-Km obteniendo el plásmido pJMS-FAmibR-Km<sup>R</sup>. Posteriormente, el fragmento B se liberó de pGEM-FBmibR con *StuI* y *SpeI* y se clonó en los sitios *StuI-SpeI* de pJMS-FAmarR-Km<sup>R</sup> obteniendo el plásmido pJMS- $\Delta$ mibR::Km<sup>R</sup>. La mutante *A. brasilense* 2114 se obtuvo a través de un proceso de doble entrecruzamiento por recombinación homóloga siguiendo el mismo método de conjugación biparental descrito anteriormente. La comprobación de la mutación de *mibR* se llevó a cabo por PCR y por RT-PCR y se muestra en la figura 5.



**Figura 5. Estrategia para la construcción de la mutante 2114.** **A.** Mapa físico de la región del cromosoma de *A. brasilense* Sp7 donde se localiza *mibR*. **B.** Mapa físico del plásmido suicida pJMS- $\Delta$ *mibR*::Km<sup>R</sup> construido para mutación de *marR* por recombinación homóloga. **C.** Mapa físico de la región del cromosoma de la mutante *A. brasilense* 2114. Las flechas indican los oligonucleótidos utilizados para la comprobación de la mutante 2114. **D.** Electroforesis en gel de agarosa que muestra la comprobación de la mutación de *marR*: Carril 1: marcador de peso molecular de 1 kb; Carril 2: producto de PCR obtenido con los oligonucleótidos *marR*-AF y *marR*-BR y DNA genómico de la cepa Sp7 (silvestre); carril 3: producto de PCR obtenido con los oligonucleótidos *marR*-AF y *marR*-BR y DNA genómico de la cepa 2114; carril 4: producto de PCR obtenido con los oligonucleótidos *marR*-AF y *RmarR* y DNA genómico de la cepa Sp7; carril 5: producto de PCR obtenido con los oligonucleótidos *marR*-AF y *RmarR* y DNA genómico de la cepa 2114; carril 6: producto de PCR obtenido con los oligonucleótidos *marR*-AF y *Kmr*-R y DNA genómico de la cepa 2114; carril 7: producto de PCR obtenido con los oligonucleótidos *Kmr*-F7 y *marR*-BR y DNA genómico de la cepa 2114. El tamaño de los productos de PCR está indicado en pares de bases. **E.** Comprobación de la mutación de *mibR* por RT-PCR. El RNA fue extraído de células crecidas hasta la fase estacionaria (24 h de crecimiento) en medio mínimo con malato sin la adición de triptófano. Para las reacciones de PCR se utilizaron como templado 200 ng de cDNA (+RT) o de RNA (-RT) de Sp7 o de 2114 y los oligonucleótidos *FmarR* y *RmarR*. En la parte inferior de la figura se muestra el corrimiento de los productos de amplificación del gen *gyrA*, el cual fue utilizado como normalizador. En todos los carriles se cargó el mismo volumen de la mezcla de reacción de PCR (5  $\mu$ l).

## 6.10. Construcción de la doble mutante *A. brasilense* 2115

Para obtener la doble mutante *A. brasilense* 2115, el gen de resistencia a Km del plásmido pJMS- $\Delta$ *mibR*::Km<sup>R</sup> fue eliminado mediante restricción con *Xba*I y en su lugar se insertó un gen de resistencia a Gm obtenido del plásmido pBSL142 (Alexeyev *et al.*, 1995) mediante restricción con *Xba*I, obteniendo el plásmido pJMS- $\Delta$ *mibR*::Gm<sup>R</sup>, el cual se transformó en células quimiocompetentes de *E. coli* S17.1. *A. brasilense* 2113 se conjugó con *E. coli* S17.1 la cual contenía el plásmido pJMS- $\Delta$ *mibR*::Gm<sup>R</sup> siguiendo el mismo método de conjugación biparental descrito anteriormente. Las transconjugantes se seleccionaron en placas de MMAB con malato complementadas con 30  $\mu$ g/ml de Gm y 25  $\mu$ g/ml de Km. La comprobación de la mutante obtenida, nombrada *A. brasilense* 2115, se llevó a cabo por PCR de la misma forma que se realizó para las mutantes 2113 y 2114 (no mostrado).

## 6.11. Complementación de las mutantes *A. brasilense* 2113 y *A. brasilense* 2115

La mutante *A. brasilense* 2113 se complementó en *trans* con el plásmido de bajo número de copias pJB3*libR*. Para ello, la región codificante de gen *libR* incluyendo una región de 762 pb rio arriba del codón de inicio se amplificó por PCR utilizando DNA genómico de *A. brasilense* Sp7 como templado y los oligonucleótidos luxR-AF y RluxR (tabla 3). El producto de PCR (1407 pb) se clonó en el plásmido pGEM-T-Easy obteniendo el plásmido pGEM-*libR*Sp7. *libR* (incluyendo el probable promotor) se liberó de pGEM-*libR*Sp7 con *Eco*RI y se clonó en el mismo sitio del plásmido pJB3TC20 (Blatny *et al.*, 1997) obteniendo el plásmido pJB3*libR* el cual se transformó en células quimiocompetentes de *E. coli* DH5 $\alpha$  y *E. coli* S17.1. pJB3*libR* se transfirió por conjugación a la mutante *A. brasilense* 2113 siguiendo el mismo método de conjugación biparental descrito anteriormente. Las transconjugantes se seleccionaron en placas de MMAB con malato complementadas con 15  $\mu$ g/ml de Tc y 25  $\mu$ g/ml de Km. La comprobación de la cepa complementada, nombrada *A. brasilense* 2113-*libR*<sup>+</sup> se llevó a cabo por PCR (no mostrado).

Por otro lado, la doble mutante *A. brasilense* 2115 se complementó en *trans* con el plásmido pJB3*mibR*-*libR*. Para ello, la región codificante de gen *mibR* incluyendo una región de 775 pb rio arriba del codón de inicio se amplificó por PCR utilizando DNA genómico de *A. brasilense* Sp7 como templado y los oligonucleótidos marR-AF y RmarR (tabla 3). El producto de PCR (1270 pb) se clonó en el plásmido pGEM-T Easy obteniendo el plásmido pGEM-*mibR*Sp7. *mibR* (incluyendo el probable promotor) se liberó de pGEM-*mibR*Sp7 con *Eco*RI y se clonó en el mismo sitio del plásmido pBSL142. De esta forma, el gen de resistencia a Gm de pBSL142 quedó reemplazado por *mibR* generando el plásmido pBSL-*mibR*Sp7. Posteriormente, *mibR* se liberó de pBSL-*mibR*Sp7 con *Hind*III-*Xba*I y se clonó en los mismos sitios del

plásmido pJB3*libR* generando el plásmido pJB3*mibR-libR* el cual se transformó en células quimiocompetentes de *E. coli* DH5 $\alpha$  y *E. coli* S17.1. pJB3*mibR-libR* se transfirió por conjugación a la mutante *A. brasilense* 2115 siguiendo el mismo método de conjugación biparental descrito anteriormente. Las transconjugantes se seleccionaron en placas de MMAB con malato complementadas con 15  $\mu\text{g/ml}$  de Tc, 25  $\mu\text{g/ml}$  de Km y 30  $\mu\text{g/ml}$  de Gm. La comprobación de la cepa complementada, nombrada *A. brasilense* 2115-*mibR*<sup>+</sup>*libR*<sup>+</sup> se llevó a cabo por PCR (no mostrado).

## 6.12. Aislamiento del RNA y eliminación del DNA genómico

Los reactivos y soluciones utilizadas para el aislamiento del RNA se muestran en la tabla C3. La técnica consistió en lo siguiente: una colonia de cada cepa bacteriana crecida en MMAB con malato y rojo congo (0.005%) por 48 h fue cultivada en 5 ml de MMAB con malato a 30 °C y 150 rpm hasta la fase exponencial tardía (DO<sub>600</sub> de 1.0 a 1.1). Este cultivo fue utilizado para inocular 20 ml de MMAB con malato a una DO<sub>600</sub> inicial de 0.01. Los cultivos se incubaron a 30 °C y 150 rpm por 24 h (DO<sub>600</sub> de 1.3). 2 ml de cada cultivo se centrifugaron a 8000 rpm por 2 min y cada paquete celular se lavó dos veces con buffer TE. Posteriormente, cada paquete celular fue resuspendido en 400  $\mu\text{l}$  de buffer TE, 400  $\mu\text{l}$  de buffer de lisis (bromuro de cetiltrimetilamonio [CTAB] 2% y de NaCl 2 M) y 50  $\mu\text{l}$  de una solución de SDS al 10% y se incubaron por 5 min a temperatura ambiente para lisar las células. Posteriormente, se agregaron 150  $\mu\text{l}$  de fenol saturado con buffer de Tris (Tris 0.1 M, pH 8.0) y 300  $\mu\text{l}$  de una solución de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1 [vol/vol]). Los tubos se centrifugaron a 10000 rpm por 10 min y cada sobrenadante se lavó 3 veces con 300  $\mu\text{l}$  de cloroformo/alcohol isoamílico. El RNA de cada cepa se precipitó con 2 volúmenes de etanol absoluto por 20 min a temperatura ambiente. Los tubos se centrifugaron a 10000 rpm por 10 min y el RNA purificado se lavó tres veces con 1 ml de etanol al 70% y se resuspendió en 100  $\mu\text{l}$  de agua miliQ tratada con dietilpircarbonato (DEPC) al 0.1% estéril. La concentración del RNA se cuantificó midiendo la absorbancia a una DO de 260 nm en un espectrofotómetro Eon Microplate (BioTek) equipado con una placa microvolumétrica Take3 (BioTek). La calidad del RNA se determinó analizando la relación de la DO<sub>260</sub>/DO<sub>280</sub> (un valor entre 1.8-2.0 se consideró aceptable) y la integridad del mismo se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8%.

Inmediatamente después de la extracción del RNA, se eliminó el DNA genómico de cada muestra de RNA utilizando el kit comercial TURBO DNA-free Kit (Ambion, Life technologies). El procedimiento consistió en preparar una mezcla de reacción de 50  $\mu\text{l}$  que incluyó los siguientes componentes: 8  $\mu\text{g}$  de RNA, 5  $\mu\text{l}$  de buffer de la DNasa TURBO 10X, 2 unidades de DNasa TURBO y agua libre de nucleasas. Las mezclas de reacción se incubaron por 30 min a 37 °C. Posteriormente, se agregaron 5  $\mu\text{l}$  de reactivo de inactivación

de la DNasa y se incubaron por 5 min a temperatura ambiente. Los tubos se centrifugaron a 10000 rpm por 2 min y los sobrenadantes, los cuales contenían el RNA, se separaron del reactivo de inactivación de la DNasa. La concentración de cada muestra de RNA se volvió a cuantificar como se indicó anteriormente y la integridad del mismo se verificó por electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. Para corroborar la eliminación del DNA genómico, se realizó la PCR utilizando 200 ng de RNA como templado 200 ng de DNA genómico como control positivo y los oligonucleótidos 27F y 1492R para amplificar el RNAr 16S. Las reacciones de PCR fueron reamplificadas para corroborar la ausencia de cualquier producto de PCR. La ausencia de cualquier producto de PCR indicó que el DNA genómico se eliminó en su totalidad de las muestras de RNA.

### **6.13. Síntesis del cDNA**

Inmediatamente después de la eliminación del DNA genómico de las muestras de RNA, se llevó a cabo la síntesis del DNA complementario (cDNA) utilizando el kit comercial Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (ThermoFisher Scientific). El procedimiento consistió en preparar una mezcla de reacción de 25 µl que incluyó los siguientes componentes: 2 µg de RNA, 4 µl de la mezcla de reacción 5X (cuyos componentes incluyen el bufer de reacción, dNTPs y oligonucleótidos aleatorios), 2 µl de transcriptasa reversa (Maxima Enzyme Mix) y agua libre de nucleasas. La mezcla de reacción se incubó a 25 °C por 30 min, 50 °C por 30 min, 65 °C por 30 min y finalmente a 85 °C por 5 min para inactivar la transcriptasa reversa. La concentración del cDNA de cada cepa se cuantificó midiendo la absorbancia a una DO de 260 nm en un espectrofotómetro Eon Microplate (BioTek) equipado con una placa microvolumétrica Take3 (BioTek).

### **6.14. Análisis de la eficiencia de amplificación de los oligonucleótidos utilizados para la RT-qPCR**

La eficiencia de amplificación de cada par de oligonucleótidos se analizó con el método de curva estándar con cuatro diluciones seriadas de cDNA de *A. brasilense* Sp7 y se muestra en la figura complementaria C11. Para la PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) se utilizó el kit comercial Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific). Se utilizaron los siguientes oligonucleótidos: ipdC-RT-F2 e ipdC-RT-R para amplificar un fragmento de 109 pb de *ipdC*; gyrA-RT-F2 y gyrA-RT-R2 para amplificar un fragmento de 116 pb de *gyrA*; rhoF2 y rhoR2 para amplificar un fragmento de 188 pb de *rho* (tabla 3). Se prepararon mezclas de reacción por triplicado con un volumen final de 20 µl cada una que incluyó los siguientes componentes: 10 µl de Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X),

(cuyos componentes incluyen SYBR Green, dNTPs, Taq DNA polimerasa Maxima Hot Start, MgCl<sub>2</sub> y buffer de PCR), 0.6 µl de cada oligonucleótido preparado a una concentración de 10 pmoles/µl (concentración final de 300 mM de cada uno), 2 µl de cDNA preparado a una concentración de 400, 40, 4 y 0.4 ng/µl (concentración final de 40, 4, 0.4 y 0.04 ng/µl) y 6.8 µl de agua libre de nucleasas. La qPCR se realizó en un termociclador StepOnePlus (Applied Biosystem) siguiendo el siguiente programa térmico: 95 °C por 10 min, seguido de 40 ciclos a 95 °C por 15 seg y 60 °C por 1 min, seguido de una etapa de curva de disociación (melt curve stage) a 95 °C por 1 min, 60 °C por 1 min y 95 °C por 1 min.

### **6.15. PCR cuantitativa en tiempo real**

La cuantificación de la expresión de *ipdC* se llevó a cabo por RT-qPCR utilizando el kit comercial Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific). Se prepararon mezclas de reacción por triplicado con un volumen final de 20 µl cada una que incluyó los siguientes componentes: 10 µl de Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X), (cuyos componentes incluyen SYBR Green, dNTPs, Taq DNA polimerasa Maxima Hot Start, MgCl<sub>2</sub> y buffer de PCR), 0.6 µl de cada oligonucleótido preparado a una concentración de 10 pmoles/µl (concentración final de 300 mM de cada uno), 2 µl de cDNA preparado a una concentración de 100 ng/µl (concentración final de 10 ng/µl) y 6.8 µl de agua libre de nucleasas. Para cada par de oligonucleótidos se incluyeron reacciones de PCR sin templado o con 200 ng/µl de RNA no tratado con transcriptasa reversa como controles negativos. La cuantificación de la expresión de *ipdC* se llevó a cabo mediante el método comparativo C<sub>T</sub> (2<sup>-ΔΔCT</sup>) en el que los genes *gyrA* y *rho* se utilizaron como genes de referencia. La RT-qPCR se realizó en un termociclador StepOnePlus (Applied Biosystem) siguiendo el siguiente programa térmico: 95 °C por 10 min, 40 ciclos a 95 °C por 15 seg y 60 °C por 1 min, una etapa de curva de disociación (melt curve stage) a 95 °C por 1 min, 60 °C por 1 min y 95 °C por 1 min. Los datos se colectaron en la etapa de alineamiento. Los resultados fueron analizados con el programa StepOne (Applied Biosystem). El experimento se realizó tres veces, cada uno con muestras biológicas obtenidas de ensayos independientes. En la figura complementaria C12 se muestran las gráficas de amplificación de *ipdC*, *gyrA* y *rho* obtenidas por RT-qPCR.

### **6.16. Actividad enzimática de la β-galactosidasa**

El ensayo de la actividad enzimática de la β-galactosidasa se llevó a cabo de acuerdo a Miller (1972) con algunas modificaciones. Los reactivos y soluciones se muestran en la tabla complementaria C4. El ensayo consistió en preparar un precultivo de *A. brasilense* 2112 y de *A. brasilense* 2117 en 5 ml de MMAB con

malato como fuente carbono a 30 °C por 18 h a 150 rpm. Posteriormente se tomaron alícuotas de cada precultivo y se inocularon de manera separada en 20 ml de MMAB con malato complementado con 100 µg/ml de triptófano contenido en matraces de 120 ml de capacidad hasta obtener una DO<sub>600</sub> de 0.01. Los matraces se incubaron a 30 °C a 150 rpm y se tomó una muestra de 2 ml de cada cultivo a las 12, 16, 20, 24 y 28 h de crecimiento. 1 ml de cada muestra de cultivo se utilizó para medir el crecimiento bacteriano por espectrofotometría a una DO de 600 nm. Por otro lado, 1 ml de cada muestra de cultivo se centrifugó a 8000 rpm por 2 min, se descartó el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en 1 ml de buffer Z. Las células se permeabilizaron con 50 µl de cloroformo y 50 µl de SDS al 0.1% a 30 °C por 30 min. Posteriormente se agregaron 100 µl de solución sustrato (orto-nitrofenil-β-D-galactopiranosido, 8 mg/ml), las muestras se incubaron a 30 °C por 30 min hasta que la solución se tornó de color amarillo (tiempo de reacción). Para detener la reacción enzimática se agregaron 200 µl de solución de paro (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1M), las muestras se centrifugaron a 10000 rpm por 5 min. Se midió en el sobrenadante a una DO de 420 nm. La actividad específica se calculó en unidades Miller (UM) utilizando la fórmula:  $(1000 \times DO_{420}) / (\text{tiempo de reacción en min} \times DO_{600})$ . El ensayo se realizó tres veces de manera independiente.

### **6.17. Cuantificación de la producción de AIA**

La cuantificación de AIA se llevó a cabo con el método descrito por Szkop & Bielawski (2013) y Carreño-López *et al.* (2000). La técnica consistió en preparar un precultivo de cada cepa de *A. brasilense* en 5 ml de MMAB con malato como fuente de carbono a 30 °C por 18 h a 150 rpm. Posteriormente se tomaron alícuotas de cada precultivo y se inocularon de manera separada en 20 ml de MMAB-M complementado con 100 µg/ml de triptófano contenido en matraces de 120 ml de capacidad hasta obtener una DO<sub>600</sub> de 0.01. Los matraces se incubaron a 30 °C a 150 rpm y se tomó una muestra de 1 ml de cada cultivo. Las muestras se centrifugaron a 10000 rpm por 10 min y el sobrenadante se pasó por un filtro con tamaño de poro de 0.22 µm (Millipore). Para la separación por HPLC se inyectaron alícuotas de 20 µl en un cromatógrafo de líquidos (Beckman Gold Liquid) con una columna C-18 de fase reversa con un diámetro interno de 4.6 mm y un tamaño de partícula de 5 µm. Las fracciones fueron eluidas con una fase móvil isocrática, la cual consistió de acetonitrilo (reactivo A) y ácido acético al 1% (reactivo B) en una relación 40:60 v/v, respectivamente, a una tasa de flujo de 1 ml/min y a una absorbancia de 280 nm con un tiempo de corrida de 6 min (Carreño-López *et al.*, 2000). Los ensayos se realizaron por triplicado y la concentración de AIA se calculó de acuerdo a una curva patrón que se realizó a partir de AIA (Sigma catálogo no. 87-51-4) y se normalizó cuantificando las proteínas totales del cultivo bacteriano con el método de Bradford de acuerdo a las especificaciones del fabricante (Bio-Rad).

## 6.18. Análisis bioinformáticos

Los alineamientos se llevaron a cabo en el servidor Clustal Omega (Sievers *et al.*, 2011). Los residuos conservados de nucleótidos y de aminoácidos se resaltaron con el servidor Multiple Align Show (<http://www.bioinformatics.org/sms/index.html>). La búsqueda de secuencias homólogas de nucleótidos o aminoácidos se llevó a cabo en Blast (Altschul *et al.*, 1997) y en GenBank (Benson *et al.*, 2005). La predicción de estructuras secundarias y terciarias se realizó con el servidor Phyre<sup>2</sup> (Kelley *et al.*, 2015) y la predicción de los dominios protéicos se realizó con el servidor SMART (Schultz *et al.*, 1998). Los árboles filogenéticos se construyeron con el programa MEGA version 5.0 (Tamura *et al.*, 2011). La búsqueda de sitios de unión a factores de transcripción se llevó a cabo en el servidor Virtual Footprint de la base de datos PRODORIC (Münch *et al.*, 2005).

## 6.19. Análisis estadístico

La significancia estadística de los datos se determinó utilizando una prueba *t* de student desapareada utilizando el programa estadístico SigmaPlot versión 14.0.

## 6.20. Clonación y expresión de LibR y MibR

Para la expresión de LibR, la región codificante de *libR* (645 pb) se amplificó con los oligonucleótidos FluxR y RluxR (tabla 3), los cuales fueron diseñados con sitios *EcoRI* y *SalI*, respectivamente y DNA de *A. brasilense* Sp7 como templado. El producto de PCR se clonó en los sitios *EcoRI-SalI* del plásmido de expresión pGEX-4T-1 (GE Health Care Life Sciences) generando el plásmido pGEXGST-*libR*. En pGEXGST-*libR*, *libR* quedó fusionado al gen que codifica para la proteína glutatión S-transferasa (GST), de tal manera que se genera una proteína híbrida GST-LibR, con GST unida al extremo amino terminal de LibR. Por otro lado, para la expresión de MibR, la región codificante de *mibR* (495 pb) se amplificó con los oligonucleótidos FmarR y RmarR (tabla 3), los cuales fueron diseñados con sitios *EcoRI* y *SalI*, respectivamente y DNA de *A. brasilense* Sp7 como templado. La clonación se realizó de manera similar que *libR* generando el plásmido pGEXGST-*mibR*. El mapa físico de los plásmidos pGEXGST-*libR* y pGEXGST-*mibR* se muestra en la figura complementaria C13. pGEXGST-*mibR*, *mibR* quedó fusionado a *gst*, de tal manera que se genera una proteína híbrida GST-MibR, con GST unida al extremo amino terminal de MibR. pGEXGST-*libR* y pGEXGST-*mibR* se transfirieron de manera separada a células quimiocompetentes de *E. coli* BL21 generando las cepas *E. coli* BL21-*libR* o *E. coli* BL21-*mibR*,

respectivamente. Se preparó un precultivo bacteriano de *E. coli* BL21-*libR* o *E. coli* BL21-*mibR* inoculando una colonia de cada cepa en un tubo con 5 ml de LB complementado con 100 µg/ml de ampicilina y se incubaron a 37 °C a 150 rpm por 18 horas. Posteriormente se tomaron 250 µl de cada precultivo y se inocularon en matraces con 25 ml de LB (dilución 1:1000) complementado con 100 µg/ml de ampicilina y se incubaron a 37°C a 150 rpm hasta obtener una  $DO_{600} = 0.5$ . Para inducir la expresión de pGEXGST-*libR* o de pGEXGST-*mibR*, se agregó isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a cada matrás a una concentración de 0.1 mM y se incubaron a 22°C a 150 rpm por 3 horas más. Para cada cepa se preparó un matrás como control el cual no fue tratado con IPTG (no inducido). Los cultivos se centrifugaron en alícuotas de 10 ml a 10000 rpm por 10 minutos a 4°C. Los paquetes celulares se almacenaron a -80°C toda la noche y posteriormente se resuspendieron en 1 ml de buffer de lisis (50 mM de Tris pH 8, 5 mM de EDTA, 50 mM de NaCl, 0.15 mM de PMSF y 1 mM de 2-mercaptoetanol). Las células se lisaron por sonicación mantenidas en hielo con un programa de 10 pulsos por 30 segundos a 40% de amplitud (el proceso se repitió 3 veces con intervalos de 5 min). Las células lisadas se centrifugaron a 10000 rpm durante 1 h a 4°C para separar los restos celulares (este proceso se realizó dos veces). Las proteínas de la fracción soluble se cuantificaron con el método de Bradford (Bio-Rad Protein Assay Kit) de acuerdo a las instrucciones del fabricante utilizando como referencia albúmina de suero bovino (ROCHE).

## 7. RESULTADOS

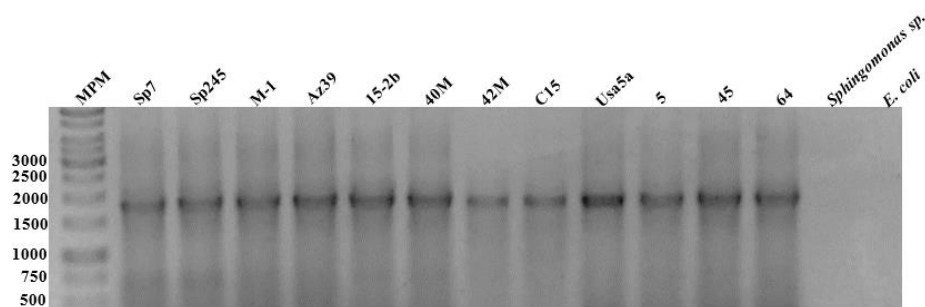
### 7.1. Análisis *in silico* del promotor de *ipdC* de *A. brasilense* Sp7.

En el genoma de *A. brasilense* Sp7 el gen *ipdC* que codifica para la enzima fenilpiruvato descarboxilasa (PPDC) está localizado en la cadena positiva del cromosoma anotado como AMK58\_RS11560 (no. de acceso en GenBank WP\_035671558.1). A una distancia de 250 pb río arriba y codificado en dirección opuesta a *ipdC* se encuentra el gen *gltX* anotado como AMK58\_RS11555, que codifica para una glutamato-tRNA ligasa, y a 205 pb río abajo, el gen AMK58\_RS11565 que codifica para una probable proteasa dependiente de ATP (Zimmer *et al.*, 1997; Kwak & Shin, 2016; este trabajo) (figura 6). El promotor de *ipdC* está localizado en la región intergénica entre *gltX* e *ipdC* y ha sido estudiado en *A. brasilense* Sp245 (Vande Broek *et al.*, 2005, Rothballe *et al.*, 2005). La región 5' río arriba de *ipdC* de la cepa Sp245 se localizaron varios elementos en *cis* que son importantes para la expresión del gen, entre ellos, un elemento de respuesta a auxinas (AuxRE), un probable sitio de unión para el factor sigma RpoN ( $\sigma^{54}$ ), una repetición invertida de 8 pb separada por una secuencia de 4 pb (ATTGTTTC(GAAT)GAAACAAT), dos secuencias palíndromes, un probable sitio de unión a ribosoma, así como el sitio de inicio de la transcripción (Rothballe *et al.*, 2005, Lambrecht *et al.*, 1999, Vande Broek *et al.*, 2005). A excepción de las dos secuencias palíndromes, todos los demás elementos en *cis* están conservados en el promotor de *A. brasilense* Sp7 (figura 6).



**Figura 6.** Región del extremo 5' de *ipdC* de *A. brasilense* Sp7. La repetición invertida está indicada con dos flechas opuestas, el probable sitio de unión para el factor  $\sigma^{54}$  está indicado con un rectángulo, mientras que el elemento de respuesta a auxinas (AuxRE) está subrayado con una línea discontinua, 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.

La comparación de la secuencia de la región 5' de *ipdC* de la cepa Sp7 con el de la cepa Sp245, mostró que esta última contiene una región de 150 pb que no está presente en la cepa Sp7 (Rothballer *et al.*, 2005). Esta misma diferencia se observó en la región 5' de *ipdC* de *A. brasilense* SM (Malhotra & Srivastava, 2008). Tomando como referencia este antecedente, en este trabajo se llevó a cabo el análisis de la secuencia de *ipdC* incluyendo la región del extremo 5' de diversas cepas de *A. brasilense* aisladas de diferentes plantas y sitios geográficos (tabla 2), esto con el fin de saber si existe variabilidad en la secuencia de nucleótidos y si esta variabilidad podría tener una relación directa con la producción de AIA. Estas cepas fueron identificadas previamente por métodos fisiológicos y bioquímicos (Mascarua-Esparza *et al.*, 1988, Díaz-Zorita y Fernández-Canigia 2009, Di Salvo *et al.*, 2014, Garcia de Salamone *et al.*, 1996, Pedraza *et al.*, 2007, Rariz *et al.*, 2013), sin embargo, se consideró necesario llevar a cabo la identificación a través de la amplificación por PCR y la secuenciación del gen RNAr 16S. Para ello, se diseñaron los oligonucleótidos rRNA-AzoF y rRNA-AzoR (tabla 3) para amplificar la secuencia completa del gen RNAr 16S específico de *Azospirillum* spp. El oligonucleótido rRNA-AzoF hibrida en una región conservada localizada a ~170 pb rio arriba del RNAr 16S, mientras que el oligonucleótido rRNA-AzoR hibrida en una región conservada localizada a ~60 pb rio abajo del mismo. Un alineamiento múltiple de secuencias del gen RNAr 16S de *Azospirillum* spp. y de bacterias filogenéticamente relacionadas mostró que estas dos regiones sólo se conservan en bacterias del género *Azospirillum* (no mostrado). Con estos iniciadores se obtuvo un producto de 1.75 kb solo en bacterias del género *Azospirillum* mientras que no se observó ningún amplificado en *E. coli* S17.1 ni en *Sphingomonas* sp., utilizadas como controles negativos, tal y como se esperaba (figura 7). El producto de PCR se secuenció y la secuencia de nucleótidos obtenida de cada cepa se analizó en el servidor bioinformático BLAST. La secuencia del RNAr 16S de cada cepa se depositó en el GenBank (el número de acceso se muestra en la tabla 4). Las cepas fueron identificadas como *A. brasilense* y *A. lipoferum* basado en el porcentaje de identidad con la secuencia de nucleótidos del RNAr 16S de bacterias disponibles en el GenBank (tabla 4).

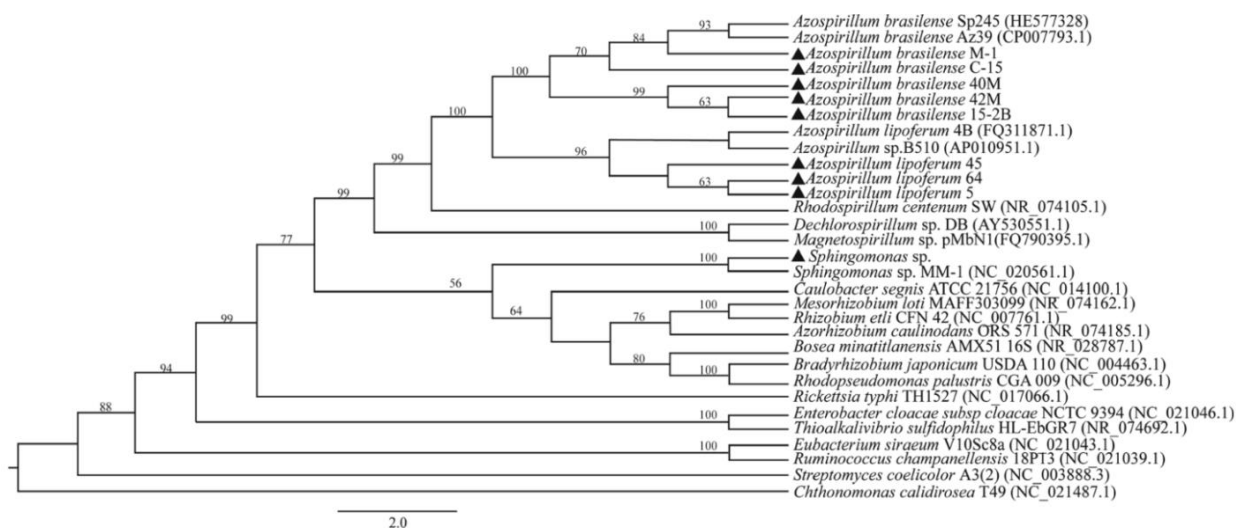


**Figura 7. Amplificación por PCR del gen RNAr 16S de *Azospirillum* spp.** La PCR se realizó con los oligonucleótidos rRNA-AzoF y rRNA-AzoR y DNA genómico de las cepas de *Azospirillum* spp. indicadas en la parte superior de cada carril y como controles negativos DNA genómico de *Sphingomonas* sp. y *E. coli*. MPM, marcador de peso molecular de 1 kb.

El árbol filogenético construido a partir de la secuencia del RNAr 16S mostró que las cepas están muy emparentadas entre sí y mostraron una estrecha relación taxonómica con bacterias del género *Rhodospirillum* spp. y *Magnetospirillum* spp. (figura 8).

**Tabla 4.** Identificación de cepas de *Azospirillum* spp. basado en la secuencia de nucleótidos del gen RNAr 16S.

Cepa	Nombre de la cepa	No. de nucleótidos secuenciados del gen rRNA 16S	No. de acceso del gen RNAr 16S en GenBank	Bacteria más relacionada de acuerdo al análisis en Blastn	Identidad de la secuencia (%) del gen rRNA 16S con la bacteria más relacionada
M-1	<i>A. brasilense</i> M-1	1473	KP676398	<i>A. brasilense</i> Az39 (CP007793.1)	99%
C15	<i>A. brasilense</i> C15	1473	KP676402	<i>A. brasilense</i> Sp7 (CP012914.1)	99%
40M	<i>A. brasilense</i> 40M	1473	KP676405	<i>A. brasilense</i> Sp7 (CP012914.1)	99%
42M	<i>A. brasilense</i> 42M	1473	KP676404	<i>A. brasilense</i> Sp7 (CP012914.1)	99%
15-2B	<i>A. brasilense</i> 15-2B	1475	KP676403	<i>A. brasilense</i> Az39 (CP007793.1)	99%
5	<i>A. lipoferum</i> 5	1472	KP676401	<i>A. lipoferum</i> 4B (FQ311868.1)	98%
45	<i>A. lipoferum</i> 45	1471	KP676400	<i>A. lipoferum</i> DSM 1691 (NR117481.1)	98%
64	<i>A. lipoferum</i> 64	1472	KP676399	<i>A. lipoferum</i> 4B (FQ311868.1)	97%

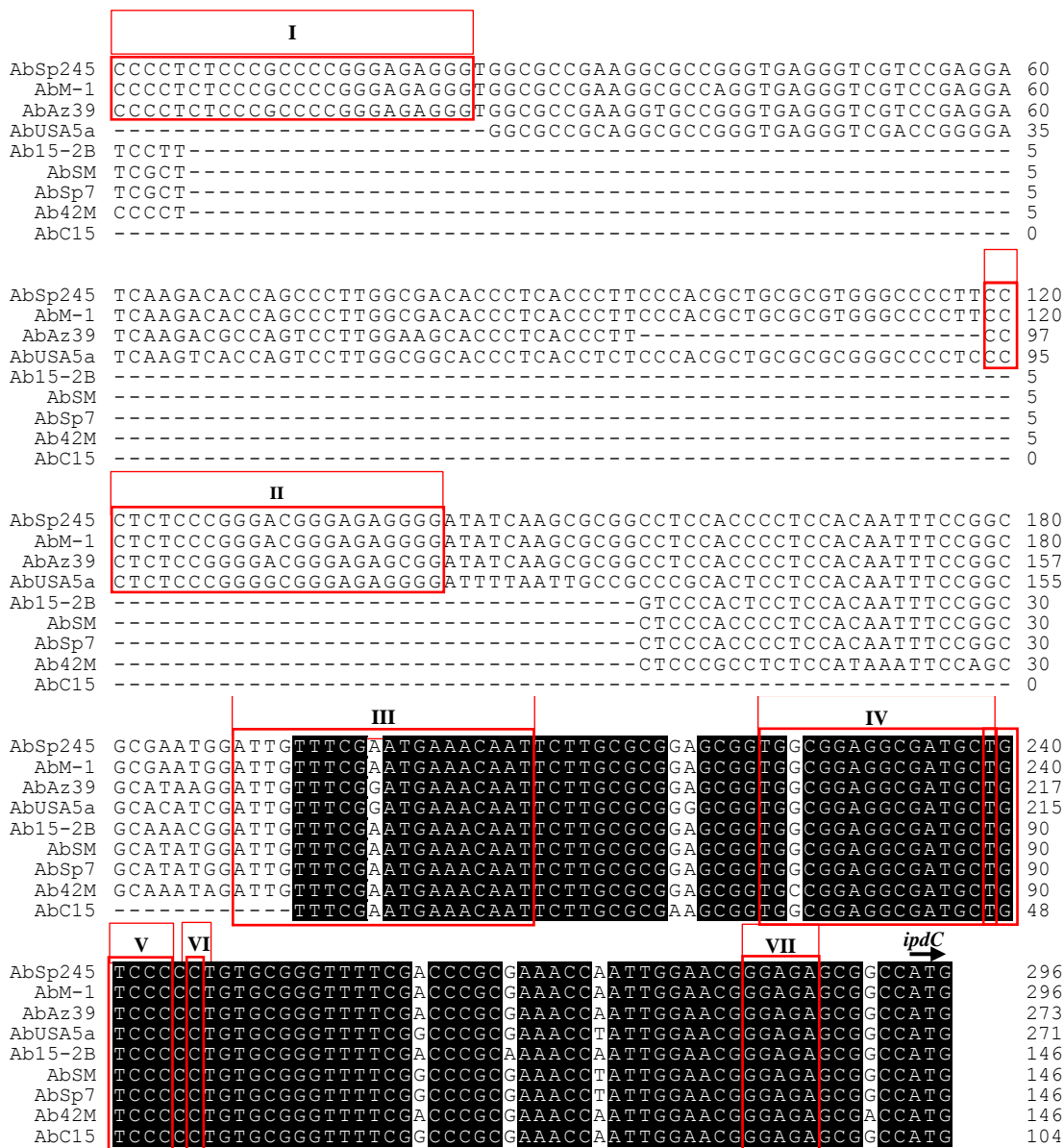


**Figura 8.** Árbol filogenético basado en la secuencia del gen RNAr 16S de *Azospirillum* spp. Las cepas marcadas con un triángulo negro son aquellas cuya secuencia del RNAr 16S (1471-1475 pb) se obtuvo en este trabajo. Las secuencias de nucleótidos del gen RNAr 16S de bacterias utilizadas como referencia fueron obtenidas del GenBank (el número de acceso se muestra en paréntesis). El árbol filogenético se construyó con el algoritmo neighbor-joining utilizando el programa MEGA 5.0 con un valor bootstrap de 1000 réplicas. Los números en las ramas del filograma indican los valores de bootstrap mayores al 50%. La barra de escala corresponde a 2.0 sustituciones por posición de nucleótido.

## 7.2. Análisis de la variabilidad de la región del extremo 5' de *ipdC* de *A. brasilense* spp.

Como se indicó anteriormente, uno de los objetivos de este trabajo fue analizar si existe variabilidad tanto en la región codificante de *ipdC* como en la región del extremo 5' de *Azospirillum* spp. aisladas de diferentes plantas y sitios geográficos (tabla 2). Para ello, se llevó a cabo la amplificación por PCR de *ipdC* utilizando los oligonucleótidos RegR-2F y RiaaC-Stop (tabla 3) y DNA genómico de cepas de *Azospirillum* spp. identificadas previamente (tabla 4). La posición del sitio de hibridación de ambos oligonucleótidos varía entre cepas de *A. brasilense*, por ejemplo, en la cepa Sp245, el oligonucleótido RegR-2F hibrida en una región localizada a 328 pb río arriba de *ipdC*, mientras que en la cepa Sp7, el sitio de hibridación se localiza a 178 pb río arriba del mismo. Esta diferencia se debe a la presencia del fragmento de 150 pb en la región 5' de *ipdC* de la cepa Sp245 misma que no está presente en la cepa Sp7 como se indicó anteriormente. De igual forma, la localización del sitio de hibridación del oligonucleótido RiaaC-Stop varía entre estas dos cepas. En la cepa Sp245 se localiza a 749 pb río abajo de *ipdC*, justo al final del gen *iaaC*, mientras que en la cepa Sp7 se localiza a 44 pb debido a que en esta última solo está presente un fragmento de la región 3' de *iaaC* (Malhotra & Srivastava, 2008). Debido a esta diferencia entre cepas de *A. brasilense*, se obtuvieron dos grupos de amplicones; el grupo I de 2.75 kb (tomando como referencia la cepa Sp245) y el grupo II de 1.9 kb (tomando como referencia la cepa Sp7). De acuerdo a los resultados de la PCR, las cepas Sp245, M1, Az39 y Usa5a pertenecen al grupo I, mientras que las cepas Sp7, 15-2B, 42M y C15 pertenecen al grupo II (no mostrado). En las cepas de *A. lipoferum* 5, 45 y 64 no se obtuvo ningún amplicón aun utilizando varios pares de oligonucleótidos. Por ello, la búsqueda de *ipdC* en estas cepas se realizó mediante Southern Blot utilizando la región codificante de *ipdC* de la cepa Sp7 como sonda, sin embargo, no se obtuvo ninguna señal de hibridación (no mostrado), lo cual indica que *ipdC* no está presente en estas cepas. Estos resultados concuerdan con el hecho de que otras cepas como *Azospirillum* sp B510 y *A. lipoferum* 4B carecen de *ipdC* (Wisniewski-Dye *et al.*, 2011, Kaneko *et al.*, 2010). El producto de PCR de cada cepa se secuenció y la secuencia de nucleótidos se depositó en el GenBank (número de acceso KM972378 [*ipdC* de *A. brasilense* M-1], KM972379 [*ipdC* de *A. brasilense* C-15], KM972380 [*ipdC* de *A. brasilense* 42M], KM972381 [*ipdC* de *A. brasilense* 15-2B], KM972382 [*ipdC* de *A. brasilense* Az39] y KM972383 [*ipdC* de *A. brasilense* USA5a]). En la región 5' de *ipdC* se observaron dos aplotipos, el aplotipo I que contiene una región de 150 pb como la cepa Sp245 y el aplotipo II, el cual carece de dicha región como la cepa Sp7 (figura 9). Las cepas pertenecientes al aplotipo I poseen dos secuencias palíndromes (I y II en la figura 9) muy conservadas (100% de identidad). Tanto las cepas del aplotipo I como del aplotipo II comparten una región muy conservada (87-91% de identidad) de 146 pb río arriba del codón de inicio de *ipdC* en la cual, la repetición invertida, el probable sitio de unión a RpoN, el sitio AuxRE, el sitio de inicio de la transcripción y el

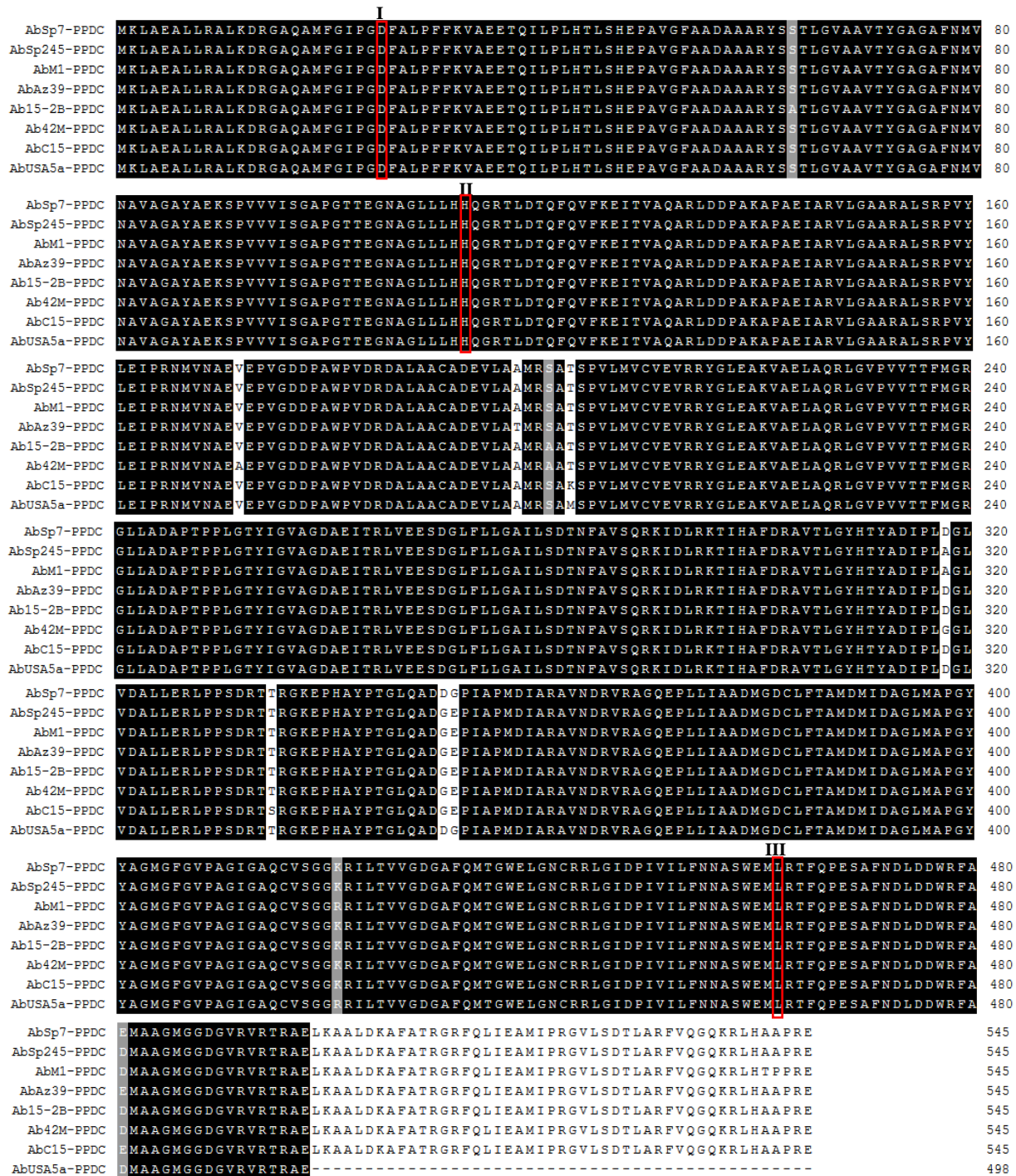
probable sitio de unión a ribosoma (regiones III, IV, V, VI y VII, respectivamente en la figura 9) están muy conservados. Estos resultados indican que existe poca variabilidad en la secuencia de nucleótidos de la región 5' de *ipdC* entre cepas de *A. brasilense* aisladas de diferentes plantas y regiones geográficas.



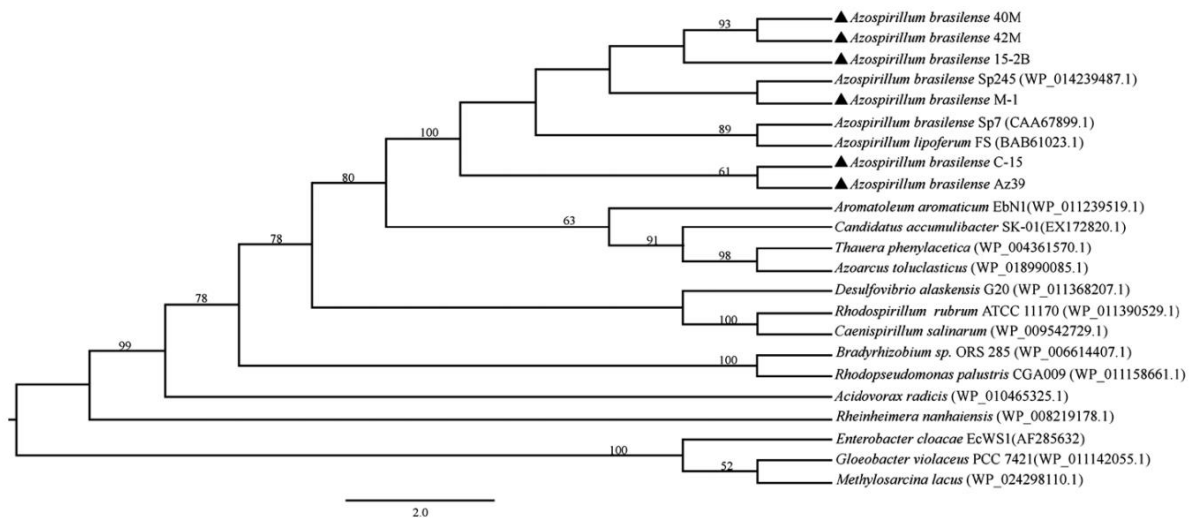
**Figura 9. Alineamiento múltiple de la región río arriba de *ipdC* de cepas de *A. brasilense*.** Las secuencias mostradas en el alineamiento corresponde a la región río arriba de *ipdC* de *A. brasilense* Sp245 (AbSp245, no. de acceso en GenBank NC\_016617.1), *A. brasilense* M-1 (AbM-1, KM972378), *A. brasilense* Az39 (AbAz39, CP007793.1), *A. brasilense* USA5a (AbUSA5a, KM972383), *A. brasilense* 15-2B (Ab15-2B, KM972381), *A. brasilense* SM (AbSM, DQ490109.1), *A. brasilense* Sp7 (AbSp7, CP012914.1), *A. brasilense* 42M (Ab42M, KM972380) y *A. brasilense* C15 (AbC15, KM972379). Las cajas representan las secuencias palíndromes (I y II), la repetición invertida (III), el probable sitio de unión a RpoN (IV) el sitio AuxRE (V), el sitio de inicio de la transcripción (VI) y el probable sitio de unión a ribosoma (VII). La flecha indica el inicio de la región codificante de *ipdC*. El alineamiento múltiple se realizó con el programa Clustal Omega. En color negro se indican las regiones del alineamiento con 100% de identidad y fueron resaltadas utilizando el servidor bioinformático Multiple Align Show (<http://www.bioinformatics.org/sms/index.html>).

### **7.3. Análisis de la secuencia de aminoácidos de PPDCs de cepas de *A. brasilense***

El alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos de PPDCs de las cepas analizadas mostró que comparten un porcentaje de identidad del 99-100% (figura 10) y tienen conservada la triada catalítica que está implicada en la unión al sustrato de acuerdo a la comparación con la PPDC de *E. cloacae* (Schütz *et al.*, 2005). Sin embargo, el Glu468 de la PPDC de *E. cloacae* corresponde a una leucina en la posición 462 en todas las PPDCs de *A. brasilense* analizadas (figura 10). El análisis en BLAST utilizando como referencia la secuencia de aminoácidos de la PPDC de *A. brasilense* Sp7, mostró que homólogos a PPDCs se encuentran distribuidos en diversos géneros bacterianos y, de acuerdo al análisis filogenético, forman un solo cluster perteneciente a la familia de las PPDCs de acuerdo a la clasificación sugerida por Spaepen *et al.* (2007) (figura 11). En conjunto, estos resultados indican que, aunque las cepas analizadas fueron aisladas de diferentes regiones geográficas y de diferentes plantas, existe muy poca variabilidad en la secuencia de aminoácidos de PPDCs.



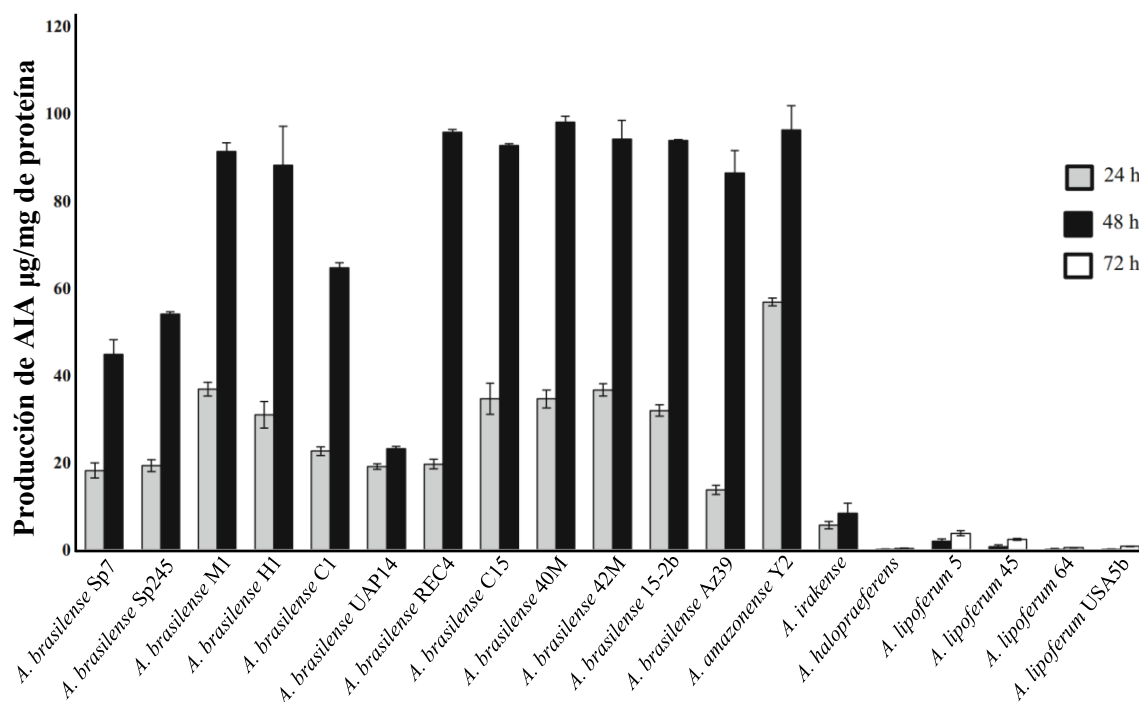
**Figura 10. Alineamiento múltiple de proteínas homólogas a PPDC de cepas de *A. brasilense*.** Las secuencias mostradas en el alineamiento corresponde a la secuencia de aminoácidos de la PPDC de *A. brasilense* Sp7 (AbSp7-PPDC, no. de acceso en GenBank WP\_035671558.1), de *A. brasilense* Sp245 (AbSp245-PPDC, WP\_014239487.1), de *A. brasilense* M-1 (AbM1-PPDC, AKE79065.1), de *A. brasilense* Az39 (AbAz39-PPDC, AIB12566.1), de *A. brasilense* 15-2B (Ab15-2B-PPDC, AKE79068.1), de *A. brasilense* 42M (Ab42M-PPDC, AKE79067.1), de *A. brasilense* C15 (AbC15-PPDC, AKE79066.1) y de *A. brasilense* USA5a (AbUSA5a-PPDC, AKE79070.1). Los números indican los aminoácidos (la triada catalítica Asp25-His113-Leu462 (I, II y III, respectivamente) de acuerdo a la comparación con la PPDC de *E. cloacae* (Schütz *et al.*, 2005). 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 (<http://www.bioinformatics.org/sms/index.html>).



**Figura 11.** Árbol filogenético de proteínas PPDCs de *A. brasilense* spp. y sus homólogos de otros géneros bacterianos. Las cepas marcadas con un triángulo negro son aquellas cuya secuencia de *ipdC* (1638 pb) se obtuvo en este trabajo. La secuencia de aminoácidos de la PPDC de *A. brasilense* Sp7 se utilizó como referencia para la búsqueda de sus homólogos en GenBank utilizando BLAST y los números de acceso en GenBank correspondientes se muestran en paréntesis. El alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos (545 aminoácidos) se llevó a cabo con MEGA 5.0 utilizando el algoritmo Muscle y el árbol filogenético no enraizado se construyó con el método Maximum Likelihood basado en el modelo de Whelan y Goldman (Whelan y Goldman, 2001) utilizando el mismo programa con un valor bootstrap de 1000 réplicas. Los números en las ramas del filograma indican los valores de bootstrap mayores al 50%. La barra de escala corresponde a 2.0 sustituciones por cada 15 aminoácidos.

#### 7.4. Producción de ácido indol-3-acético en cepas de *A. brasilense*

Para analizar la biosíntesis de AIA, las cepas de *Azospirillum* spp. se cultivaron en MMAB con malato como fuente de carbono complementado con 100 µg/ml de triptófano (0.49 mM). Para este análisis se incluyeron otras cepas de *A. brasilense*, así como otras especies como *A. amazonense*, *A. irakense* y *A. halopraeferens*. La cantidad de AIA producido se determinó por HPLC como se indicó en material y métodos a partir de las 24 h hasta las 48 h de crecimiento y los valores obtenidos fueron normalizados con la cantidad de proteínas totales del cultivo bacteriano. Como se muestra en la figura 12, a las 24 h de crecimiento, todas las cepas de *A. brasilense* produjeron AIA en valores desde 13.8 µg/mg de proteína en la cepa Az39 hasta 36.9 µg/mg de proteína en la cepa M1. A las 48 horas de crecimiento la producción fue mayor en todas las cepas de *A. brasilense* alcanzando valores que van desde 23.3 µg/mg de proteína en la cepa UAP14 hasta 98.2 µg/mg de proteína en la cepa 40M. De igual forma, *A. amazonense* Y2 produjo una cantidad considerable de AIA a las 24 y 48 h (56.9 y 96.4 µg/mg de proteína, respectivamente). En cambio, las cepas de *A. lipoferum* produjeron muy poco AIA a las 48 y 72 h de crecimiento, con valores de 0.17 a 3.8 µg/mg de proteína (figura 12). Estos resultados indican que *A. brasilense* produce una mayor cantidad de AIA que *A. lipoferum* y que otras especies como *A. irakense* y *A. halopraeferens*.

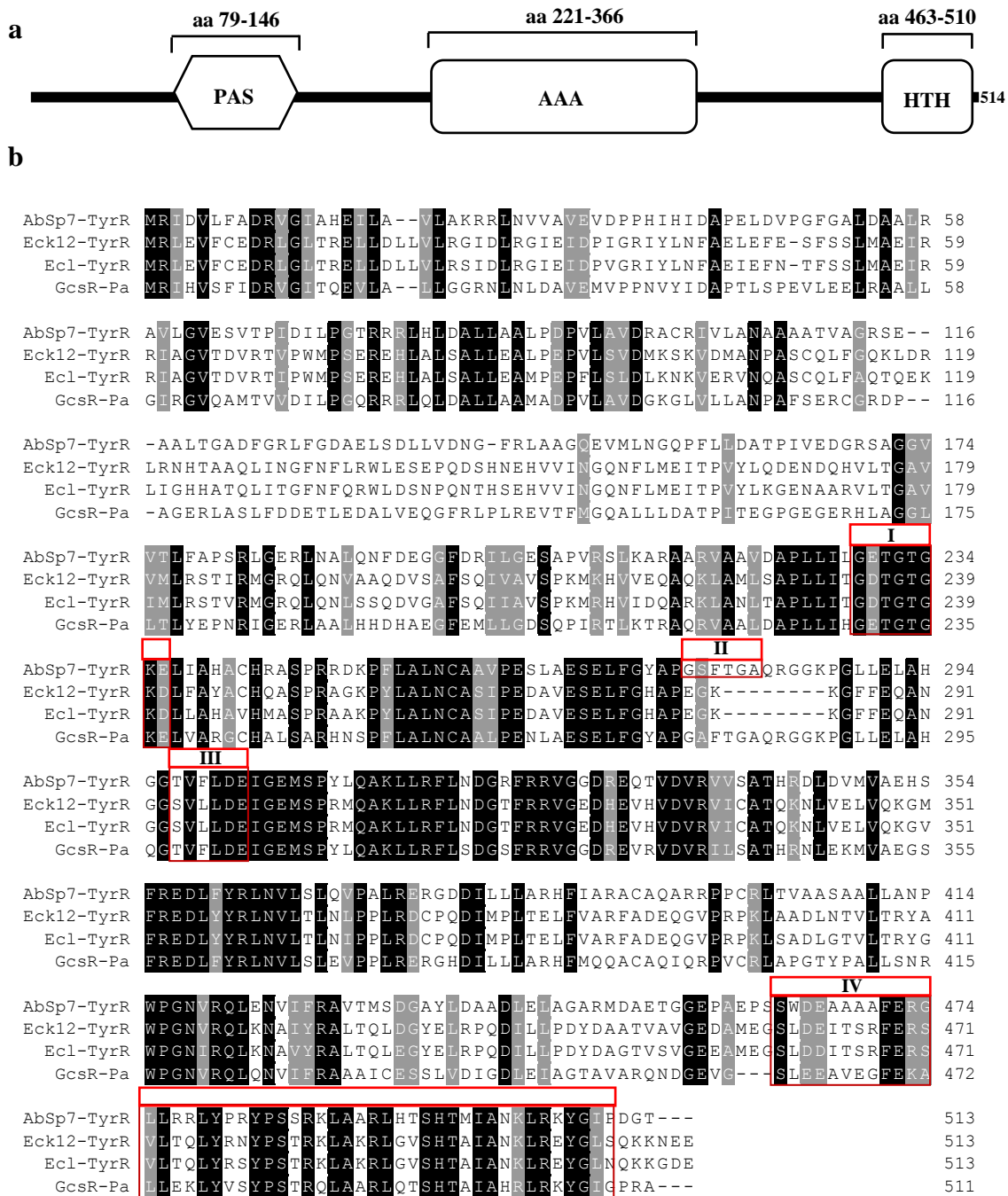


**Figura 12. Determinación de la producción de AIA por HPLC en cepas de *Azospirillum* spp.** Las cepas se crecieron en MMAB con malato como fuente de carbono y triptófano (100 µg/ml [0.49 mM]). En los tiempos indicados se tomó una alícuota de cada cultivo para la cuantificación de AIA por HPLC y de proteínas totales como se indicó en material y métodos. Los resultados corresponden a la media de los valores de ensayos por duplicado de tres réplicas biológicas y las barras de error representan la desviación estándar.

### 7.5. Identificación de *tyrR* en el genoma de *A. brasilense* Sp7

En un trabajo realizado por Ryu & Patten (2008), se encontró que en *E. cloacae* UW5 el gen *ipdC* que participa en la biosíntesis de AIA a través de la vía del ácido indol-3-pirúvico es regulado de manera positiva y directa por el factor transcripcional TyrR. La mutación de *tyrR* provocó una disminución drástica en la producción de AIA comparado con la cepa silvestre, comprobando así su participación en la biosíntesis de AIA (Ryu & Patten, 2008). TyrR regula la transcripción de genes (de manera positiva o negativa) que están implicados en el transporte y metabolismo de aminoácidos aromáticos en *E. coli* y generalmente utiliza como cofactores a los aminoácidos aromáticos tirosina, fenilalanina o triptófano (Pittard *et al.*, 2005). Tomando como referencia este hallazgo, en este trabajo se planteó la hipótesis de que, de la misma 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 de *ipdC*. Para comprobar esta hipótesis, primero se realizó una búsqueda bioinformática de proteínas homólogas a TyrR de *E. coli* K12 (no. de acceso en GenBank NP\_415839.1) en el genoma de *A. brasilense* Sp245 (Wisniewski-Dyé *et al.*, 2011) debido que al inicio de este trabajo aun no estaba disponible el genoma de la cepa Sp7. De esta forma, utilizando la herramienta

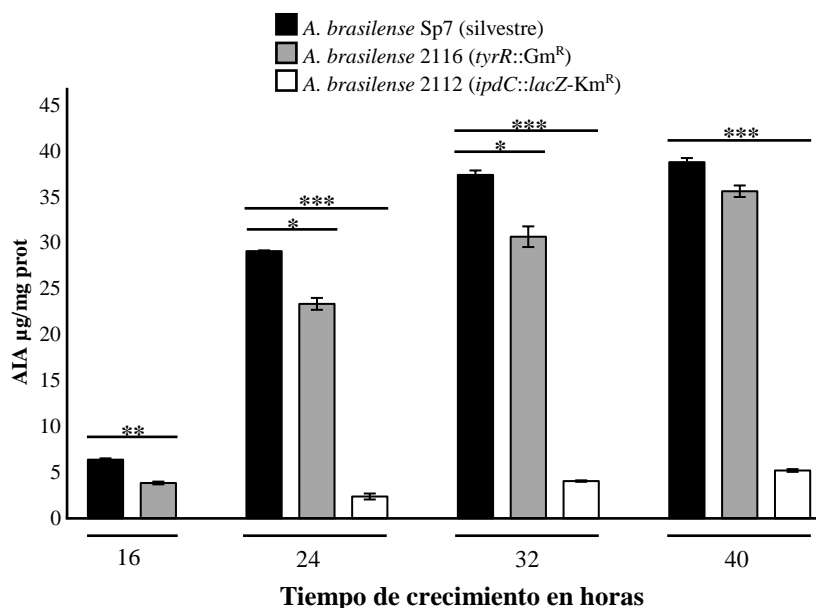
BLASTP, se encontró una proteína con una identidad del 43% (58% de similitud, valor E 4e-122) con TyrR de *E. coli* (no. de acceso en GenBank WP\_035673475.1) codificada por el gen AZOBR\_RS08015. La secuencia de nucleótidos de *tyrR* de *A. brasilense* Sp245 se utilizó como referencia para diseñar los iniciadores *tyrR*-F1 y *tyrR*-R1.1 (tabla 3) con los cuales, a través de PCR utilizando como templado DNA genómico de *A. brasilense* Sp7, se obtuvo un amplificado de 2886 pb el cual incluyó la región codificante de *tyrR* (1542 pb), un fragmento de 1063 pb de la región del extremo 5' y un fragmento de 281 pb de la región del extremo 3'. El producto de PCR se secuenció y la secuencia de nucleótidos de *tyrR* mostró un porcentaje de identidad del 96% (valor E 0.0) con *tyrR* de *A. brasilense* Sp245. La publicación del genoma completo de *A. brasilense* Sp7 (Kwak & Shin, 2016) permitió confirmar la presencia de *tyrR* en esta cepa. *tyrR* está codificado en la cadena complementaria del cromosoma de *A. brasilense* Sp7 anotado con el número de locus AMK58\_RS07030 (figura 3). A una distancia de 272 pb río arriba de *tyrR* y codificado en dirección opuesta, se encuentra el gen MK58\_RS07035, el cual codifica para una D-aminoácido deshidrogenasa (no. de acceso en GenBank WP\_059398767.1) y río abajo, el gen AMK58\_RS07020, el cual codifica para un regulador transcripcional de la familia FmdB (no. de acceso en GenBank WP\_035673472.1) (figura 3). *tyrR* codifica para una proteína de 514 aminoácidos y una masa molecular teórica de 55.1 kDa. De acuerdo al análisis en el servidor bioinformático SMART, contiene un dominio PAS (*Per*-ARNT-SIM, aminoácidos 79-146) en el dominio amino terminal, seguido por un dominio central de interacción con el factor sigma 54 (dominio AAA [ATPasas asociadas con diversas actividades celulares], aminoácidos 201-366). Este dominio incluye un motivo Walker A (aminoácidos 229-236) y un motivo Walker B (aminoácidos 297-302) los cuales son importantes para la unión y la hidrólisis de ATP, así como un motivo de 6 aminoácidos (GSFTGA, aminoácidos 276-281) los cuales son importantes para la interacción con el factor sigma 54 (Bush & Dixon, 2012) (figura 13a). Ortólogos a TyrR como el de *E. coli* o el de *E. cloacae* carecen de este motivo por lo cual regulan promotores dependientes de sigma 70 pero no de sigma 54 (Pittard *et al.*, 2005). En el dominio carboxilo terminal contiene un dominio hélice-vuelta-hélice (HTH, aminoácidos 463-510) cuya secuencia lo agrupa entre los factores de transcripción de la familia Fis (figura 13a). El alineamiento de la secuencia de aminoácidos de TyrR de la cepa Sp7 con proteínas homólogas de otros géneros bacterianos mostró que comparte un 43% de identidad (59% de similitud, valor E 1e-131) con TyrR de *E. coli* que regula la transcripción de genes implicados en el transporte y biosíntesis de aminoácidos aromáticos (Pittard *et al.*, 2005), un 43% de identidad (60% de similitud, valor E 1e-137) con TyrR de *E. cloacae* que regula la transcripción de *ipdC* implicado en la biosíntesis de AIA (Ryu & Patten, 2008) y un 62% de identidad (74% de similitud, valor E 0.0) con GcsR de *P. aeruginosa* que regula la transcripción de genes implicados en el metabolismo de glicina y en la biosíntesis de piocianina (Lundgren *et al.*, 2013) (figura 13b).



**Figura 13. 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 a la predicción en el servidor bioinformático SMART. Se indican los aminoácidos (aa) que corresponden a cada dominio. (b) Alineamiento múltiple de homólogos a TyrR de *A. brasilense* Sp7. Las secuencias mostradas en el alineamiento corresponden a la secuencia de aminoácidos de TyrR de *A. brasilense* Sp7 (TyrR-AbSp7, número de acceso en GenBank WP\_035673475.1), TyrR de *E. coli* MG1655 (TyrR-Ec, NP\_415839.1), TyrR de *E. cloacae* (TyrR-Ecl, WP\_003856887.1) y GcsR de *P. aeruginosa* PAO1 (GcsR-Pa, NP\_251139.1). 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 DNA (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 (<http://www.bioinformatics.org/sms/index.html>).

## 7.6. Mutación de *tyrR* y su efecto en la biosíntesis de ácido indol-3-acético

Para analizar la posible participación de TyrR en la producción de AIA, se construyó una mutante en el gen *tyrR* por recombinación homóloga. Para ello, *tyrR* de la cepa Sp7 se interrumpió con el gen *aacC1* (gentamicina 3-N-acetiltransferasa), el cual confiere resistencia a Gm como se indicó en material y métodos. La comprobación se llevó a cabo por PCR y se describe con detalle en la figura 3. La mutante se nombró *A. brasilense* 2116. La mutación de *tyrR* no afectó la tasa de crecimiento en MMAB con malato como fuente de carbono (figura complementaria C1). Para analizar la biosíntesis de AIA, la cepa Sp7 (silvestre), la cepa 2116 y una cepa derivada de Sp7 cuyo gen *ipdC* fue interrumpido con el gen reportero *lacZ* y el gen de resistencia a Km, denominada *A. brasilense* 2112 (Carreño-López *et al.*, 2000), se cultivaron en MMAB con malato como fuente de carbono complementado con 100 µg/ml de triptófano (0.49 mM). La cantidad de AIA producido se determinó por HPLC a partir de las 16 h hasta las 48 h de crecimiento (fase exponencial tardía hasta la fase estacionaria tardía, respectivamente) a intervalos de 8 h y los valores obtenidos fueron normalizados con la cantidad de proteínas totales del cultivo bacteriano. Como se muestra en la figura 14 y en la tabla 5, la mutación de TyrR afectó de forma negativa la biosíntesis de AIA de una manera dependiente del tiempo de crecimiento. El mayor efecto se observó a las 16 horas con un 40% de disminución en la cepa 2116 con respecto a la cepa Sp7. El efecto fue menor a las 24, 32 y 40 horas (19.8, 18 y 8% de disminución en la cepa 2116 con respecto a la cepa Sp7, respectivamente) (figura 14 y tabla 5). Por otro lado, la cepa 2112 produjo 92-87% menos AIA que la cepa Sp7 a las 24 y 48 horas, respectivamente, lo cual concuerda con los resultados reportados previamente (Carreño-López *et al.*, 2000). Estos resultados indican que TyrR contribuye a la regulación de la biosíntesis de AIA en *A. brasilense* principalmente en la fase exponencial de crecimiento.



**Figura 14. Producción de AIA de las cepas Sp7, 2116 y 2112 en MMAB con malato a diferentes tiempos de crecimiento.** Las cepas se crecieron en MMAB con malato como fuente de carbono y triptófano (100 µg/ml [0.49 mM]). En los tiempos indicados se tomó una alícuota de cada cultivo para la cuantificación de AIA por HPLC y de proteínas totales como se indicó en material y métodos. Los resultados corresponden a la media de los valores de ensayos por duplicado de tres réplicas biológicas y las barras de error representan la desviación estándar. Los asteriscos encima de las barras indican la significancia estadística en donde \* <0.01, \*\*\* <0.001, de acuerdo a la prueba *t* de student.

**Tabla 5. Producción de AIA en MMAB con malato complementado con trp\***

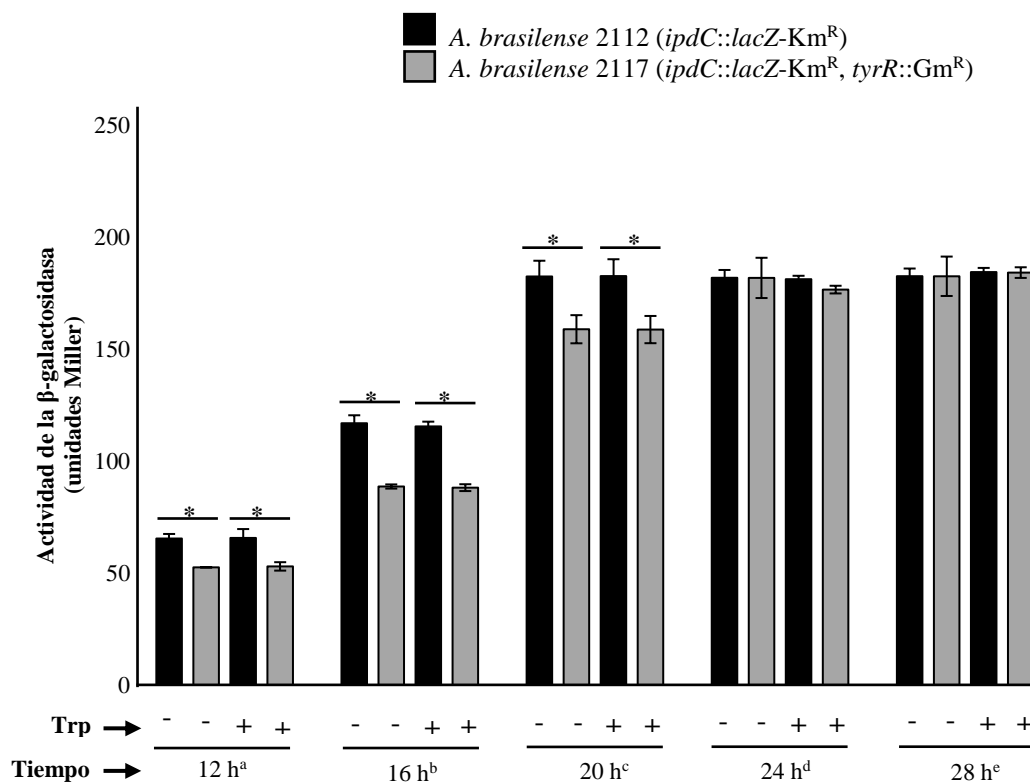
Cepa	Producción de AIA en µg/mg proteína a diferentes tiempos de crecimiento:			
	16 h <sup>a</sup>	24 h <sup>b</sup>	32 h <sup>c</sup>	40 h <sup>d</sup>
<i>A. brasilense</i> Sp7	6.38 (36.4 µM)	29.1 (166.1 µM)	37.4 (213.4 µM)	38.79 (221.4 µM)
<i>A. brasilense</i> 2116	3.84 (21.9 µM)	23.35 (133.2 µM)	30.66 (175 µM)	35.62 (203.3 µM)
<i>A. brasilense</i> 2112	ND	2.37 (13.5 µM)	4.05 (23.1 µM)	5.2 (26.6 µM)

\*, La determinación de la producción de AIA se llevó a cabo por HPLC como se indicó en material y métodos; ND, no determinado; <sup>a</sup>, cultivo en fase exponencial de crecimiento (DO<sub>600</sub> = 1.04 ± 0.01); <sup>b</sup>, cultivo en fase estacionaria temprana de crecimiento (DO<sub>600</sub> = 1.29 ± 0.01); <sup>c</sup>, cultivo en fase estacionaria tardía de crecimiento (DO<sub>600</sub> = 1.34 ± 0.02); <sup>d</sup>, cultivo en fase estacionaria tardía de crecimiento (DO<sub>600</sub> = 1.34 ± 0.01).

### 7.7. Efecto de la mutación de *tyrR* en la expresión de *ipdC*.

Debido a que la mutación de *tyrR* afectó negativamente la biosíntesis de AIA, se formuló la hipótesis de que, probablemente, TyrR regula la biosíntesis de AIA a través de la regulación transcripcional de *ipdC* en *A. brasilense*. Para corroborar esta hipótesis, *tyrR* de la cepa 2112 (*ipdC*::*lacZ*-Km<sup>R</sup>-Sm/Spc<sup>R</sup>) se mutó, obteniendo así la doble mutante *A. brasilense* 2117 (*ipdC*::*lacZ*-Km<sup>R</sup>-Sm/Spc<sup>R</sup>, *tyrR*::Gm<sup>R</sup>). Tanto en la

cepa 2112 como en la cepa 2117, la expresión del gen reportero *lacZ* es dirigida por el promotor de *ipdC*. La tasa de crecimiento de la cepa 2117 fue muy similar al de la cepa Sp7 y a la cepa 2112 en MMAB con malato como fuente de carbono (figura complementaria C1). La cinética de expresión del gen reportero *lacZ* se midió a través de la cuantificación de la actividad enzimática de la  $\beta$ -galactosidasa, el producto del gen *lacZ*, utilizando como sustrato el orto-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido (ONPG) en las cepas 2112 y 2117 crecidas en MMAB con malato como fuente carbono en la fase exponencial de crecimiento (12 y 16 horas,  $DO_{600}$  = 0.51 y 1.04, respectivamente) y en la fase estacionaria (20, 24 y 28 horas,  $DO_{600}$  = 1.18, 1.29 y 1.33, respectivamente) a intervalos de 4 h. A las 12 y 16 h, la actividad de la  $\beta$ -galactosidasa en la cepa 2117 fue menor en un 20 y 24%, respectivamente con respecto a la cepa 2112 (figura 15 y tabla 6). Sin embargo, el efecto no es estadísticamente significativo, a partir de las 20 h, incluso a las 24 y 28 h, la actividad de la  $\beta$ -galactosidasa en la cepa 2112 fue muy similar al de la cepa 2117. Para analizar el efecto del triptófano en la expresión de *ipdC*, las cepas 2112 y 2117 se crecieron en MMAB con malato complementado con 100  $\mu$ g/ml (0.49 mM) de triptófano, sin embargo, la actividad de la  $\beta$ -galactosidasa fue muy similar a los resultados obtenidos cuando las cepas se crecieron en ausencia de triptófano, lo cual indica que el triptófano no tiene un efecto en la expresión de *ipdC* en presencia o en ausencia de TyrR (figura 15 y tabla 6). Estos resultados indican que la expresión de *ipdC* no es controlada directamente por el regulador transcripcional TyrR, por lo que su contribución en la regulación de la biosíntesis de AIA podría ser a través de la regulación transcripcional de genes que contribuyen de una manera indirecta en la biosíntesis de AIA en *A. brasilense*.



**Figura 15. Cinética de la expresión de *ipdC* en las cepas 2112 y 2117.** La expresión de *ipdC* se determinó a través de la cuantificación de la actividad enzimática de la  $\beta$ -galactosidasa en las cepas 2112 y 2117 crecidas en MMAB con malato sin triptófano (-) o con 100  $\mu\text{g/ml}$  de triptófano (+) como se indicó en material y métodos. Los resultados están representados en unidades Miller y corresponden a la media de los valores de ensayos por duplicado de tres réplicas biológicas y las barras de error representan la desviación estándar. <sup>a</sup>, cultivo en fase exponencial temprana de crecimiento ( $\text{DO}_{600} = 0.51 \pm 0.06$ ); <sup>b</sup>, cultivo en fase exponencial tardía de crecimiento ( $\text{DO}_{600} = 1.04 \pm 0.01$ ); <sup>c</sup>, cultivo en fase estacionaria temprana de crecimiento ( $\text{DO}_{600} = 1.18 \pm 0.01$ ); <sup>d</sup>, cultivo en fase estacionaria temprana de crecimiento ( $\text{DO}_{600} = 1.29 \pm 0.01$ ); <sup>e</sup>, cultivo en fase estacionaria tardía de crecimiento ( $\text{DO}_{600} = 1.33 \pm 0.03$ ). Los asteriscos encima de las barras indican la significancia estadística en donde \*  $< 0.05$ .

**Tabla 6. Cinética de la expresión de *ipdC* en *A. brasilense* 2112 y *A. brasilense* 2117\***

Cepa	Trp*	Actividad de la $\beta$ -galactosidasa en unidades Miller a diferentes tiempos de crecimiento:				
		12 h	16 h	20 h	24 h	28h
<i>A. brasilense</i> 2112	-	65.38 ( $\pm 2.01$ )	116.84 ( $\pm 3.55$ )	182.36 ( $\pm 7.01$ )	181.78 ( $\pm 3.47$ )	182.5 ( $\pm 3.41$ )
<i>A. brasilense</i> 2117	-	52.51 ( $\pm 0.08$ )	88.6 ( $\pm 0.92$ )	158.81 ( $\pm 6.28$ )	181.72 ( $\pm 8.98$ )	182.45 ( $\pm 8.79$ )
<i>A. brasilense</i> 2112	+	65.64 ( $\pm 3.96$ )	115.43 ( $\pm 2.11$ )	182.547 ( $\pm 7.5$ )	181.14 ( $\pm 1.52$ )	184.32 ( $\pm 1.86$ )
<i>A. brasilense</i> 2117	+	52.93 ( $\pm 1.88$ )	88.08 ( $\pm 1.52$ )	158.66 ( $\pm 6.08$ )	176.5 ( $\pm 1.71$ )	184.09 ( $\pm 2.37$ )

\* , La expresión de *ipdC* se determinó a través de la cuantificación de la actividad enzimática de la  $\beta$ -galactosidasa en las cepas 2112 y 2117 crecidas en MMAB con malato sin triptófano (-) o con 100  $\mu\text{g/ml}$  de triptófano (+) como se indicó en material y métodos. Los resultados están representados en unidades Miller y corresponden a la media de los valores de ensayos por duplicado de tres réplicas biológicas. Los datos en paréntesis representan la desviación estándar. Trp, triptófano.

## 7.8. Predicción de sitios de unión a TyrR en el genoma de *A. brasilense* Sp7

Para analizar si TyrR regula la expresión de otros genes que podrían estar relacionados de manera indirecta con la producción de AIA, se realizó una búsqueda de sitios probables de unión en el genoma de la cepa Sp7 con el servidor bioinformático Find Individual Motif Occurrences (FIMO, <http://meme-suite.org/tools/fimo>) (Grant, *et al.*, 2011) utilizando como referencia la matriz de peso posicional (PWM [position weight matrix]) generada a partir de las cajas de reconocimiento de TyrR de *E. coli* (secuencia consenso TGTAAN<sub>6</sub>TTTACA) (Pittard *et al.*, 2005). A través de este análisis no se encontraron cajas de unión en la región río arriba de *ipdC*, lo cual concuerda con los datos experimentales obtenidos. Sin embargo, se encontró un sitio probable de unión a TyrR en la región río arriba de un probable operón (AMK58\_RS18435-AMK58\_RS18430-AMK58\_RS18425) que podría estar implicado en el transporte de aminoácidos como el triptófano (tabla 7).

**Tabla 7.** Predicción bioinformática de sitios probables de unión a TyrR en el genoma de *A. brasilense* Sp7.

Caja tyrR	Valor de P	Gen	Producto	Distancia al codón de inicio
CGTACAGAAATCGTTACA	1.44e-05	AMK58_RS07030	Regulador transcripcional TyrR	64-81
CGTACACGATTGTTTACG	1.86e-05	AMK58_RS07030	Regulador transcripcional TyrR	45-62
CGTACACAAATCGTTACA	2.57e-05	AMK58_RS07030	Regulador transcripcional TyrR	146-163
TGTAACGATTTCGTACG	6.89e-09	AMK58_RS07035	D-aminoácido deshidrogenasa	192-209
TGTAACGATTGTGTACG	1.33e-08	AMK58_RS07035	D-aminoácido deshidrogenasa	110-127
CGTAAACAATCGTGTACG	4.94e-06	AMK58_RS07035	D-aminoácido deshidrogenasa	211-228
TGAAAAGGTTCTCTGTACA	3.82e-05	AMK58_RS18435-AMK58_RS18430-AMK58_RS18425	Transportador ABC-permeasa	120-137
TGGAAAACCTTCCTGAACA	8.02e-05	AMK58_RS06400	Antranilato fosforibosiltransferasa	26-43
TGTAAGGACCTGTTCCTCA	8.19e-05	AMK58_RS12605	Fosforibosil antranilatoisomerasa	-1-17
TGTAATGTCCTGATTCCA	8.32e-05	AMK58_RS17410	Regulador transc. de la familia TetR	236-253
TGGAATGTTTTCTTTCCA	8.35e-05	AMK58_RS01275	Regulador transcripcional	294-311
TGTAAGCAACCTTGACA	4.27e-06	AMK58_RS26970-AMK58_RS26975	Proteína hipotética-regulador transcripcional	61-78
GGTAACCCGATATTTACG	4.81e-05	AMK58_RS03835	Regulador de respuesta de quimiotaxis (CheY)	152-169
TGTAACCTCAGTTTTCT	3.21e-05	AMK58_RS02000-AMK58_RS02005	Proteína de quimiotaxis (CheZ)-proteína hipotética	58-75
TGTAGGGTATATTTAACA	5.22e-05	AMK58_RS04505	Proteína de quimiotaxis MCP	64-81
TGTCAATCTATATGAACA	2.47e-05	AMK58_RS23860	Proteína de quimiotaxis MCP	178-195
TGGAACATCGGCTGTACG	5.26e-05	AMK58_RS04755	Adenilato/guanilato ciclasa	47-64
CGTCATGAATCGTTAACG	7.45e-05	AMK58_RS10265	Histidin cinasa con dominio PAS	85-102
CGTTACGCTTATTTTACA	4.98e-05	AMK58_RS14355	Proteína A de transporte de hierro	117-134
TGTTACGTTTTTCATGACG	7.61e-05	AMK58_RS19935	Proteína de simporte sodio-fosfato	67-84
TGTCACGTTACATGCACG	8.02e-05	AMK58_RS06745	Prot de membrana ompA	78-95
TGCAATTTAGTTTTTACT	8.05e-05	AMK58_RS22560	Autotransportador de membrana externa	116-133
CGTAATTTTTTCTTCACA	8.08e-05	AMK58_RS27315	Dicarboxilato-CoA ligasa PimA	150-167

También se encontró un sitio de unión río arriba del gen AMK58\_RS06400 el cual codifica para una antranilato fosforibosiltransferasa (TrpD) que cataliza la transferencia de un grupo fosforibosil a antranilato para formar fosforibosil antranilato en la segunda etapa de la biosíntesis de triptófano, y un sitio río arriba del gen AMK58\_RS12605 el cual codifica para una fosforibosil antranilatoisomerasa (TrpF) implicada en

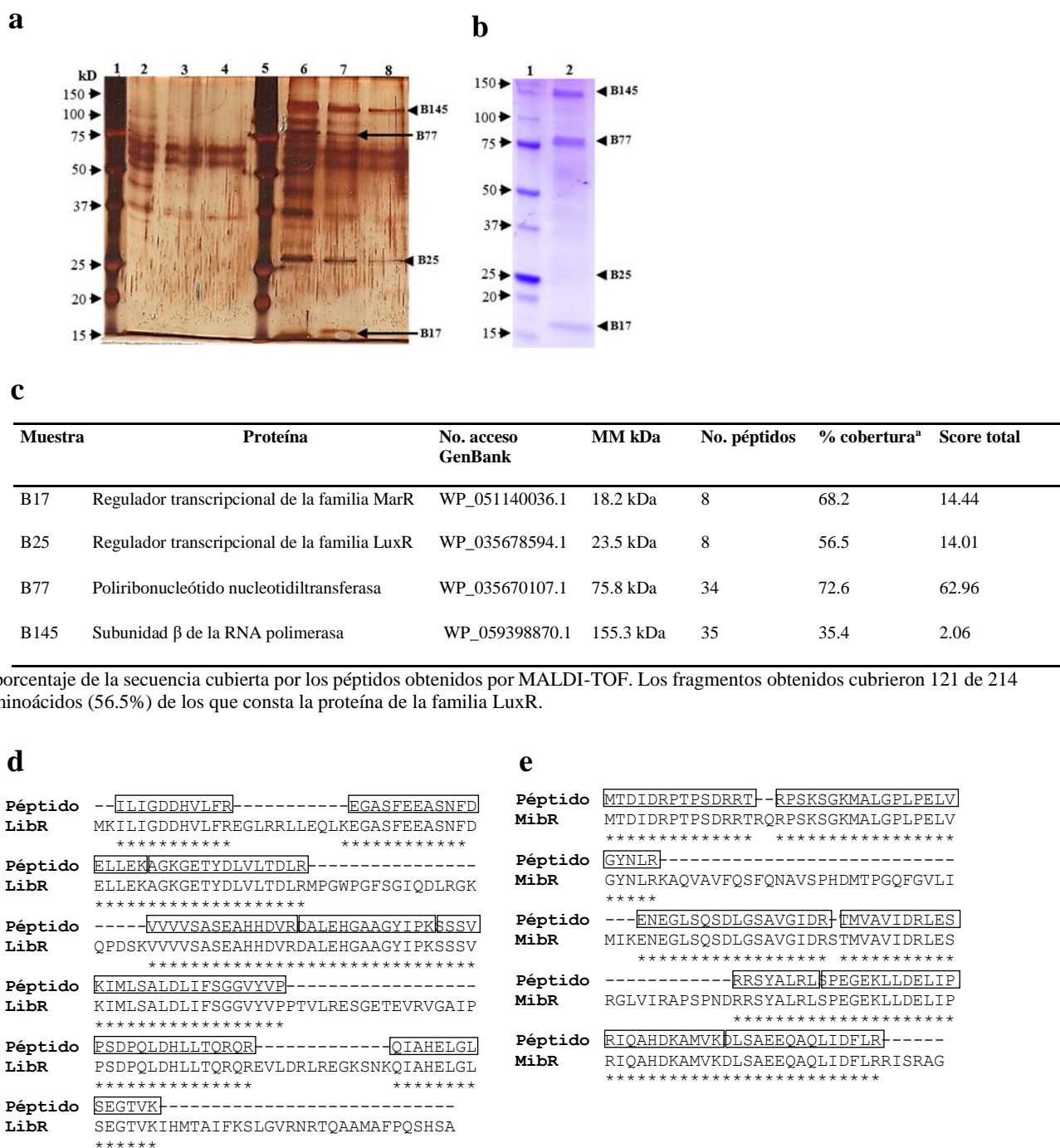
la tercera etapa de la biosíntesis de triptófano (tabla 7). Este análisis, indica que probablemente TyrR participa en el transporte y biosíntesis de triptófano, regulando así la biosíntesis de AIA en *A. brasilense*, sin embargo, serán necesarios otros experimentos para corroborar esta hipótesis.

Además, el análisis predijo tres sitios de unión a TyrR en la región intergénica entre *tyrR* y el gen AMK58\_RS07035, el cual codifica para una D-aminoácido deshidrogenasa (DadA) que está implicada en el catabolismo de aminoácidos como la L-alanina a través de la desaminación oxidativa de la D-alanina para producir amonio y piruvato (Reitzer, 1996) (tabla 7). Además, se encontró una caja de unión probable para el factor sigma 54 (CGCAAACGCGATGCCA) adyacente a una de las cajas TyrR en el promotor de *dadA*, lo cual sugiere que TyrR y el factor sigma 54 regulan el catabolismo de la D-alanina en *A. brasilense*. Esta última hipótesis es apoyada por el hecho de que la cepa 2116 fue incapaz de crecer en MMAB con DL-alanina (10 mM) como fuente de carbono a diferencia de la cepa Sp7 la cual mostró un crecimiento considerable formando pequeños flóculos después de las 48 horas de crecimiento (figura 3).

### **7.9. Aislamiento e identificación de proteínas de unión al promotor de *ipdC* por cromatografía de afinidad a DNA**

La presencia de algunos elementos en *cis* tales como la repetición invertida y el probable elemento de respuesta a auxinas en el promotor de *ipdC* (figura 6), sugiere que la regulación de este gen es controlada por factores de transcripción. Para comprobar esta hipótesis, se realizó una cromatografía de afinidad a DNA, la cual ha sido utilizada para el aislamiento y la posterior identificación de proteínas de unión a DNA incluyendo reguladores transcripcionales (Gerstmeir *et al.*, 2004; Jutras *et al.*, 2012; Longo *et al.*, 2013, Hyeon *et al.*, 2012). Para ello, se amplificó por PCR una región de 306 pb río arriba del ORF de *ipdC* de *A. brasilense* Sp7 utilizando un oligonucleótido delantero biotinilado en el extremo 5' y un oligonucleótido reverso (tabla 3). El fragmento amplificado se incubó con perlas magnéticas acopladas a estreptavidina y posteriormente este complejo se incubó con un extracto proteico de *A. brasilense* Sp7 obtenido a partir de un cultivo en MMAB con malato como fuente de carbono y triptófano (100 µg/ml) crecido hasta la fase estacionaria debido a que en esta fase hay una mayor expresión de *ipdC* (Carreño-López *et al.*, 2000). Además, se preparó un control para el cual se siguió el mismo procedimiento descrito anteriormente pero sin agregar la sonda de DNA biotinilado, esto con el fin de saber si existen proteínas que interactúan de manera inespecífica con las perlas de estreptavidina y diferenciarlas de aquellas que interactúan de manera específica con el DNA. Después de un proceso de lavado, las proteínas unidas se despegaron del promotor de *ipdC* y se separaron por PAGE-SDS, el cual fue teñido con nitrato de plata (figura 16a) o azul de Coomassie (fig. 16b). Se obtuvieron cuatro bandas, nombradas B145, B77, B25 y B17 (de acuerdo al peso

molecular de las proteínas expresado en kDa) las cuales fueron obtenidas de manera reproducible en tres ensayos independientes. La identificación por MALDI-TOF-TOF de B145, B77, B25 y B17 reveló la presencia de cuatro proteínas de *A. brasilense* Sp7; una subunidad  $\beta$  de la RNA polimerasa AMK58\_RS10445, una polirribonucleótido nucleotidiltransferasa AMK58\_RS00780, un regulador transcripcional de la familia LuxR AMK58\_RS19435 y un regulador transcripcional de la familia MarR AMK58\_RS00175, respectivamente (Figura 16c, 16d y 16e). Las últimas dos proteínas, AMK58\_RS19435 y AMK58\_RS00175 fueron las de mayor interés debido a que contienen un dominio de unión a DNA hélice-vuelta-hélice lo cual sugiere que podrían funcionar como reguladores transcripcionales y fueron nombradas LibR (por LuxR-like indole-3-acetic acid biosynthesis regulator) y MibR (por MarR-like indole-3-acetic acid biosynthesis regulator), respectivamente, por su participación en la biosíntesis de ácido indol-3-acético en *A. brasilense* como se mostrará más adelante.

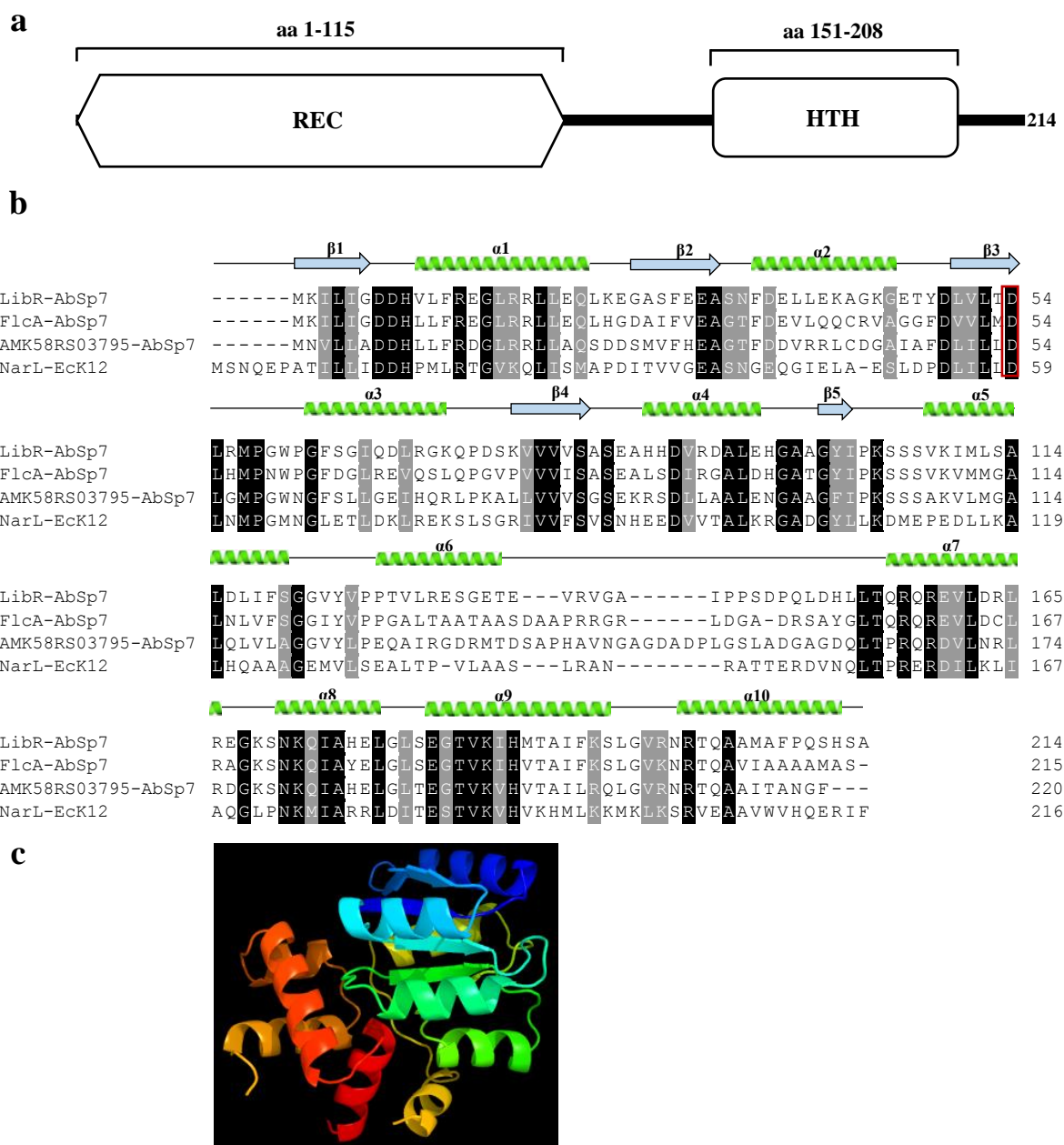


**Figura 16.** PAGE-SDS de proteínas de *A. brasilense* Sp7 obtenidas por cromatografía de unión a DNA utilizando como sonda la región del extremo 5' de *ipdC* e identificación por espectrofotometría de masas. Un fragmento de DNA biotinilado de 306 pb que corresponde a la región del extremo 5' de *ipdC* se incubó con un extracto proteico de *A. brasilense* Sp7 obtenido a partir de un cultivo en MMAB con malato y triptófano (100 µg/ml) en fase estacionaria de crecimiento como se indicó en material y métodos. (a) PAGE-SDS de proteínas obtenidas por cromatografía de afinidad a DNA teñidas con nitrato de plata. Los carriles 2, 3 y 4 corresponden a las proteínas obtenidas de un control negativo (sin DNA del promotor) al cual se le agregó buffer TE; fueron eluidas con un buffer que contenía NaCl a una concentración de 0.35, 0.7 y 1 M, respectivamente. Los carriles 6, 7 y 8 corresponden a las proteínas obtenidas por cromatografía de unión a DNA con DNA biotinilado eluidas con un buffer que contenía

NaCl a una concentración de 0.35, 0.7 y 1 M, respectivamente. Los carriles 1 y 5 corresponden al marcador de peso molecular (Precision Plus Protein™ Dual Color Standards, BIORAD). (b) PAGE-SDS de proteínas obtenidas por cromatografía de afinidad a DNA teñidas con Azul de Coomassie. El carril 1 corresponde al marcador de peso molecular y el carril 2 a las proteínas obtenidas por cromatografía de unión a DNA eluidas con un buffer que contenía NaCl a una concentración de 0.35 M. (c) Identificación de las proteínas obtenidas por cromatografía de afinidad a DNA por MALDI-TOF. (d) Alineamiento de los péptidos obtenidos por espectrometría de masas con la secuencia de aminoácidos de LibR. (e) Alineamiento de los péptidos obtenidos por espectrometría de masas con la secuencia de aminoácidos de MibR.

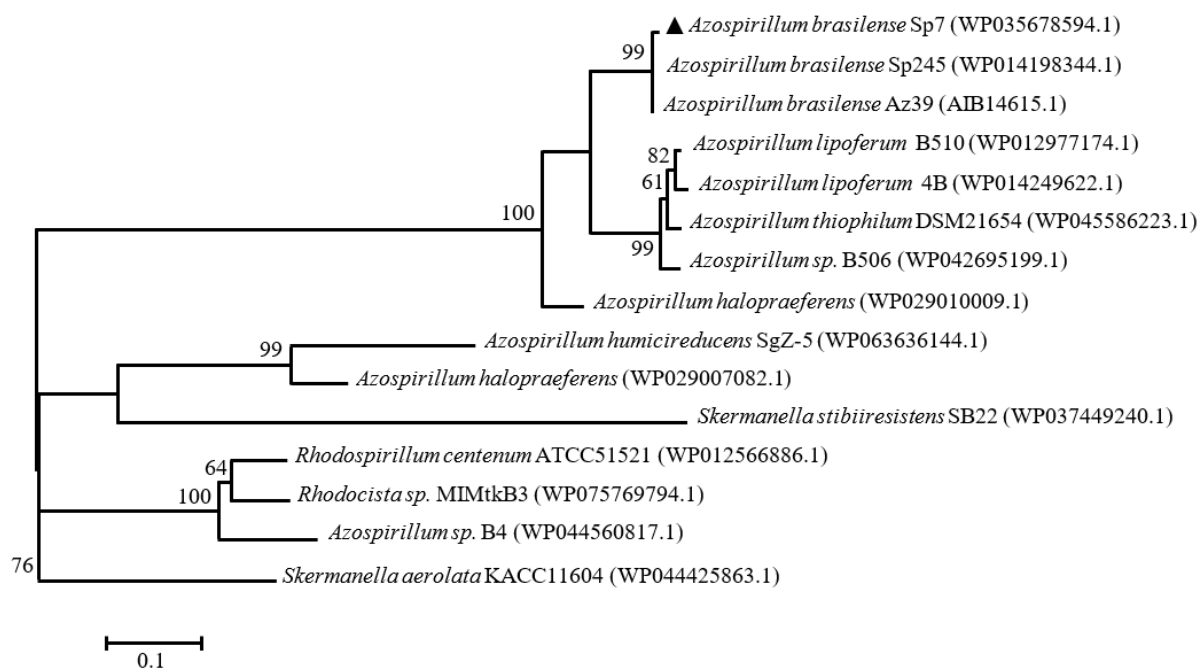
## 7.10. Análisis bioinformático de LibR

El análisis de la localización del gen *libR* reveló que se encuentra en el plásmido ABSP7\_P1 de *A. brasilense* Sp7 con un tamaño de 645 pb (figura 4). A 448 pb río arriba, codificado en la misma dirección que *libR*, se encuentra el gen AMK58\_RS19440 el cual codifica para una probable acil-CoA-deshidrogenasa y a 91 pb río abajo del ORF de *libR*, codificado en dirección opuesta, se encuentra el gen AMK58\_RS19430 el cual codifica para una probable inosina-5-monofosfato deshidrogenasa. En cuatro genomas de *Azospirillum* spp. se encontraron ORFs similares a *libR*. Dichos ORFs presentan la misma localización física en el plásmido 1 en las cepas de *A. brasilense* o en el plásmido 3 de *A. lipoferum* (figura complementaria C2), lo cual indica que estos ORFs presentan un arreglo genético similar que *libR* en el genoma de la cepa Sp7. La secuencia de LibR consta de 214 aminoácidos con una masa molecular teórica de 23.5 kDa. El análisis en SMART reveló que en el extremo amino terminal contiene un dominio receptor de la señal (REC [signal receiver domain], aminoácidos 1-115) característico de proteínas que forman parte de sistemas de doble componente y que en el extremo carboxilo terminal posee un dominio de unión a DNA hélice-vuelta-hélice (HTH [helix-turn-helix], aminoácidos 151-208) característico de reguladores transcripcionales de la familia LuxR (figura 17a). Generalmente, los reguladores transcripcionales con dominios REC-HTH son fosforilados en un residuo de ácido aspártico por una histidin cinasa sensora, provocando un cambio conformacional en el dominio REC que activa al dominio efector en el C-terminal para unirse a secuencias específicas del promotor e iniciar de la transcripción (Kern *et al.*, 1999, Leoni *et al.*, 2003). LibR contiene un residuo de ácido aspártico en la posición 54 (Asp54) el cual podría ser el sitio de fosforilación de acuerdo a la comparación con otros reguladores transcripcionales caracterizados como StyR de *P. fluorescens* (Leoni *et al.*, 2003) (figura 14a).



**Figura 17. Predicción bioinformática de los dominios de LibR de *A. brasilense* Sp7 y alineamiento múltiple con proteínas homólogas.** (a) Dominios de LibR de *A. brasilense* Sp7 de acuerdo a la predicción en el servidor bioinformático SMART. Se indican los aminoácidos (aa) que corresponden a cada dominio. (b) Alineamiento múltiple de homólogos a LibR de *A. brasilense* Sp7. (c) Modelo de la estructura terciaria de LibR de acuerdo al análisis en Phyre<sup>2</sup>. Las secuencias mostradas en el alineamiento corresponden a las secuencias de aminoácidos de LibR de *A. brasilense* Sp7 (LibR-AbSp7, número de acceso en GenBank WP\_035678594.1), FlcA de *A. brasilense* Sp7 (FlcA-AbSp7, WP\_035674679.1), AMK58\_RS03795 de *A. brasilense* Sp7 (AMK58\_RS03795, WP\_035675470.1) y NarL de *E. coli* (NarL-EcK12, número de acceso en UniProtKB P0AF28). 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 (<http://www.bioinformatics.org/sms/index.html>). La predicción de la estructura secundaria se realizó con Phyre<sup>2</sup>. Las hélices verdes representan las  $\alpha$  hélices y las flechas azules las hojas  $\beta$  plegadas.

Mediante un análisis en BLASTP, se encontró que, además de *libR*, el genoma de *A. brasilense* Sp7 contiene 15 genes que codifican proteínas con dominios REC-HTH de la familia LuxR, ocho de ellos están localizados en el cromosoma (*fIcA* [AMK58\_RS08050], AMK58\_RS03795, AMK58\_RS03520, AMK58\_RS07295, AMK58\_RS07055, AMK58\_RS08060, AMK58\_RS03800 y AMK58\_RS08735), uno en el plásmido ABSP7\_p1 (AMK58\_RS14380), cinco en el plásmido ABSP7\_p2 (AMK58\_RS24470, AMK58\_RS22840, *fixJ*, AMK58\_RS22070 y AMK58\_RS22065) y uno en el plásmido ABSP7\_p3 (AMK58\_RS25860) (ver figura complementaria C3). El alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos del dominio REC de estas proteínas mostró que tienen un 17-62% de identidad con el dominio REC de LibR (figura complementaria C4) y un 33-81% de identidad con el dominio HTH (Figura complementaria C5). LibR mostró un porcentaje de identidad con FlcA de 63% (76% de similitud), un regulador transcripcional implicado en la biosíntesis de polisacárido capsular, floculación y colonización a la raíz de trigo (Pereg-Gerk, *et al* 1998), seguido de AMK58\_RS03795 con un 51% de identidad (67% de similitud). LibR comparte solo un 32% de identidad (52% de similitud) con NarL de *E. coli*, el cual es un regulador transcripcional con dominios REC-HTH de la familia FixJ/LuxR que regula la expresión de operones cuyos productos están implicados en la respiración mediada por nitrato (Stewart, 1993). A pesar del bajo porcentaje de identidad de LibR con NarL, la predicción de la estructura secundaria y terciaria utilizando la herramienta bioinformática Phyre<sup>2</sup>, mostró que la estructura terciaria de LibR posee alta homología a la estructura terciaria de NarL (Baikalov *et al*, 1996), con 5 hojas  $\beta$  plegadas y 5 hélices  $\alpha$  en el dominio REC, 4 hélices  $\alpha$  en el dominio HTH y 1 hélice  $\alpha$  en el dominio conector (figura 17b y 17c). El análisis en BLAST, mostró que homólogos a LibR se encuentran distribuidos tanto en bacterias del género *Azospirillum* como en otros géneros filogenéticamente relacionados como *Skermanella* y *Rhodospirillum*. De acuerdo al análisis filogenético, LibR se agrupa en el mismo cluster con sus homólogos en *A. brasilense* Sp245 y *A. brasilense* Az39 (figura 18).



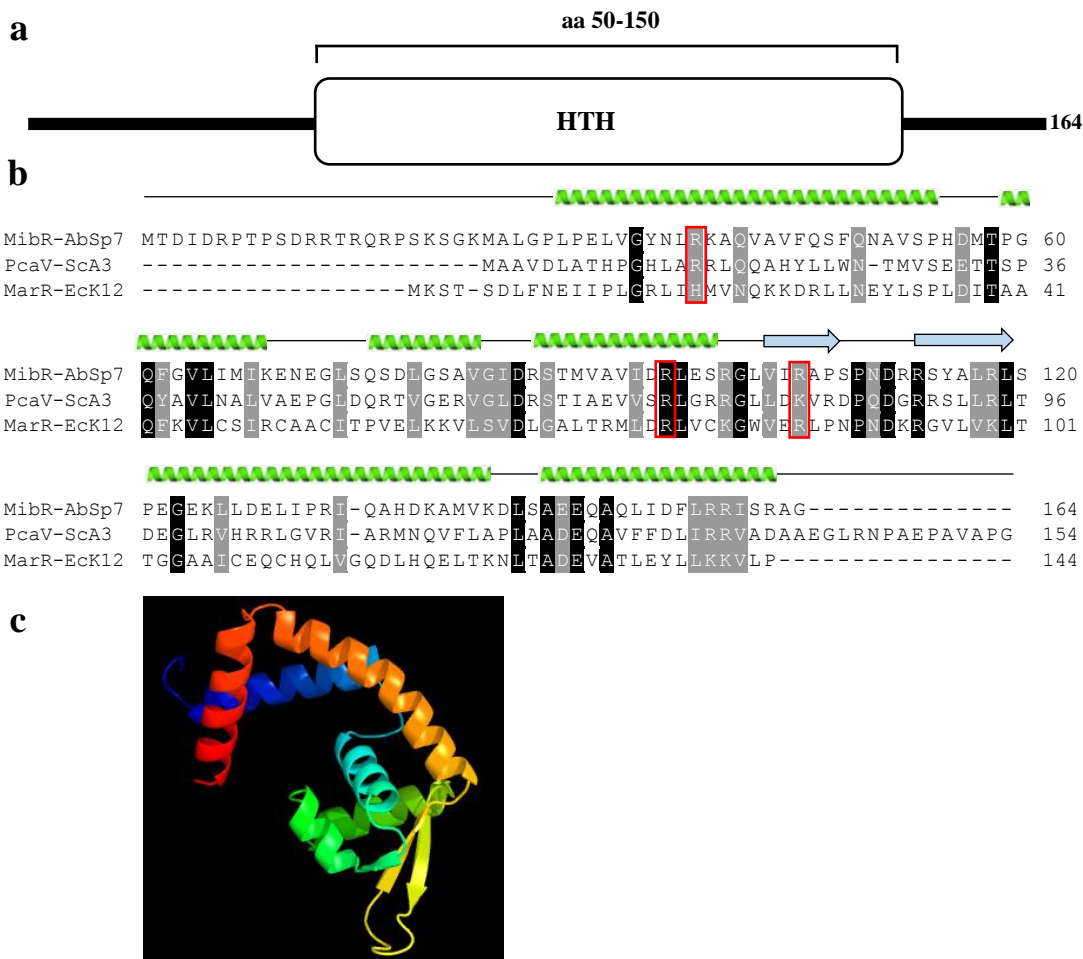
**Figura 18. Arbol filogenético de proteínas homólogas a LibR.** La secuencia de aminoácidos de LibR de *A. brasilense* Sp7 (mostrada con un triángulo negro) se utilizó como referencia para la búsqueda de sus homólogos en GenBank utilizando BLAST y los números de acceso en GenBank correspondientes se muestran en paréntesis. El alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos se llevó a cabo con MEGA5.0 utilizando el algoritmo Muscle y el árbol filogenético no enraizado se construyó con el método Maximum Likelihood basado en el modelo de Whelan y Goldman (Whelan y Goldman, 2001) utilizando el mismo programa con un valor bootstrap de 1000 réplicas. Los números en las ramas del filograma indican los valores de bootstrap mayores al 50%. La barra de escala corresponde a 0.1 sustituciones por cada 15 aminoácidos.

### 7.11. Análisis bioinformático de MibR

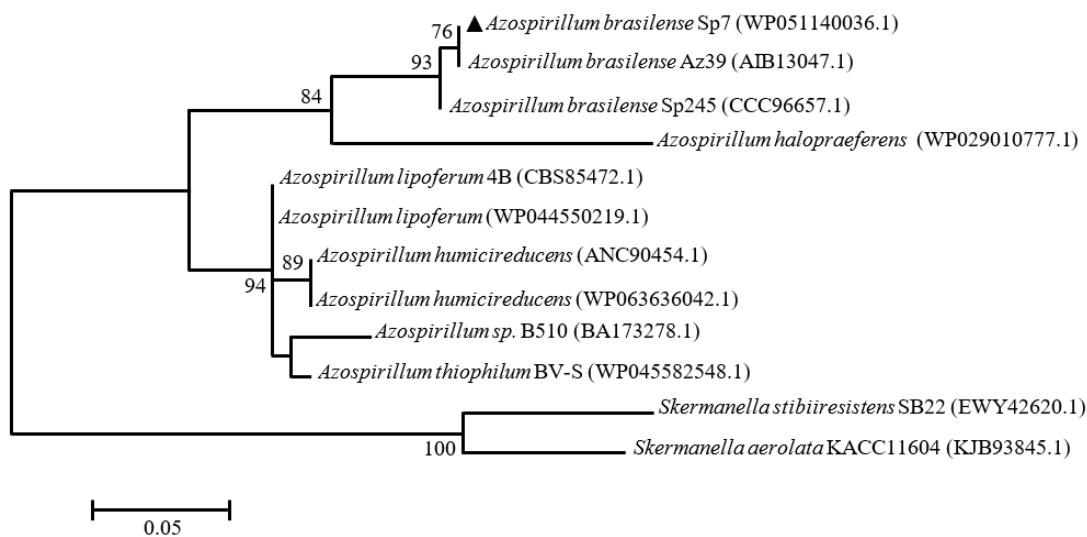
El análisis de la localización del gen *mibR* reveló que se encuentra en cromosoma de *A. brasilense* Sp7 con un tamaño de 495 pb (figura 5). A 397 pb río arriba, codificado en dirección opuesta a *mibR*, se encuentra el gen AMK58\_RS00180 el cual codifica para una probable fumaril acetoacetato hidrolasa y a 89 pb río abajo, codificado en dirección opuesta, se encuentra el gen AMK58\_RS00170 el cual codifica para una probable peptidasa. El análisis en BLAST mostró que existen otros ORFs similares a *mibR* en otras cepas de *Azospirillum* spp. como *A. brasilense* Sp245, *A. brasilense* Az39, *A. lipoferum* 4B y *Azospirillum* sp. B510. Dichos ORFs presentan la misma localización física en el cromosoma de las cepas analizadas (figura complementaria C6), lo cual indica que estos ORFs presentan un arreglo genético similar que *libR* en el genoma de la cepa Sp7. La secuencia de MibR consta de 164 aminoácidos con una masa molecular teórica de 18.2 kDa. El análisis en SMART reveló que contiene un dominio de unión a DNA hélice-vuelta-hélice (aminoácidos 50-150) (figura 16a). Los reguladores transcripcionales de la familia MarR regulan de manera positiva o negativa la expresión de genes implicados en diversos procesos como la resistencia a antibióticos,

respuesta al estrés, virulencia y el catabolismo de compuestos aromáticos (Inoka y Grove, 2010) y por lo regular se unen a pequeñas moléculas que actúan como ligandos que controlan la unión al DNA.

Mediante un análisis en BLASTP, se encontró que, además de MibR, el genoma de *A. brasilense* Sp7 contiene 8 genes que codifican probables reguladores transcripcionales de la familia MarR (figura complementaria C10). Cuatro de ellos en el cromosoma (AMK58\_RS10530, AMK58\_RS07190, AMK58\_RS06760 y AMK58\_RS13020), dos en el plásmido ABSP7\_p1 (AMK58\_RS18225 y AMK58\_RS17905), uno en el plásmido ABSP7\_p2 (AMK58\_RS22800) y uno en el plásmido ABSP7\_p3 (AMK58\_RS26030). El alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos del dominio HTH mostró que comparten un porcentaje de identidad de 22-31% (figura complementaria C8). El alineamiento de la secuencia de aminoácidos de MibR con proteínas homólogas de otros géneros bacterianos mostró que comparte un porcentaje de identidad del 23% (51% de similitud, valor E 5e-04) con el regulador transcripcional IacR de *Acinetobacter baumannii* el cual regula de manera negativa la expresión del operón *iac* implicado en la degradación de AIA (Yu *et al.*, 2015), 35% de identidad (53% de similitud, valor E 4e-22) con el regulador transcripcional PcaV de *Streptomyces coelicolor* A3 y 29% de identidad (55% de similitud, valor E 3e-17) con el regulador transcripcional MarR de *E. coli* K12 (Figura 19b). A pesar del bajo porcentaje de identidad de MibR con PcaV, la predicción de la estructura secundaria y terciaria utilizando la herramienta bioinformática Phyre<sup>2</sup>, mostró que la estructura terciaria de MibR posee alta homología a la estructura terciaria de PcaV de *Streptomyces coelicolor* A3 (Davis *et al.*, 2013), con 2 hojas  $\beta$  plegadas y 6 hélices  $\alpha$  (figura 19b y 19c). El análisis en BLASTP, mostró que homólogos a MibR se encuentran distribuidos principalmente en bacterias del género *Azospirillum*. De acuerdo al análisis filogenético, MibR de Sp7 se agrupa en el mismo cluster con sus homólogos en *A. brasilense* Sp245 y *A. brasilense* Az39 (figura 20).



**Figura 19. Predicción bioinformática de los dominios de MibR de *A. brasilense* Sp7 y alineamiento múltiple con proteínas homólogas.** (a) Dominios de MibR de *A. brasilense* Sp7 de acuerdo a la predicción en el servidor bioinformático SMART. Se indican los aminoácidos (aa) que corresponden a cada dominio. (b) Alineamiento múltiple de homólogos a MibR de *A. brasilense* Sp7. (c) Modelo de la estructura terciaria de MibR de acuerdo al análisis en Phyre<sup>2</sup>. Las secuencias mostradas en el alineamiento corresponden a las secuencias de aminoácidos de MibR de *A. brasilense* Sp7 (MibR-AbSp7, número de acceso en GenBank WP\_051140036.1), PcaV de *Streptomyces coelicolor* A3 (PcaV-ScA3, NP\_630777.1) y MarR de *E. coli* K12 (MarR-EcK12, NP\_416047.1). En cuadros rojos se muestran los residuos que probablemente interactúan con el DNA de acuerdo a la comparación con PcaV de *S. coelicolor* A3 (Davis *et al.*, 2013) y con MarR de *E. coli* (Duval *et al.*, 2013). 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 (<http://www.bioinformatics.org/sms/index.html>). La predicción de la estructura secundaria se realizó con Phyre<sup>2</sup>. Las hélices verdes representan las  $\alpha$  hélices y las flechas azules las hojas  $\beta$  plegadas.



**Figura 20. Árbol filogenético de proteínas homólogas a MibR.** La secuencia de aminoácidos de MibR de *A. brasilense* Sp7 (mostrada con un triángulo negro) se utilizó como referencia para la búsqueda de sus homólogos en GenBank utilizando BLAST y los números de acceso en GenBank correspondientes se muestran en paréntesis. El alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos se llevó a cabo con MEGA5.0 utilizando el algoritmo Muscle y el árbol filogenético no enraizado se construyó con el método Maximum Likelihood basado en el modelo de Whelan y Goldman (Whelan y Goldman, 2001) utilizando el mismo programa con un valor bootstrap de 1000 réplicas. Los números en las ramas del filograma indican los valores de bootstrap mayores al 50%. La barra de escala corresponde a 0.05 sustituciones por cada 15 aminoácidos.

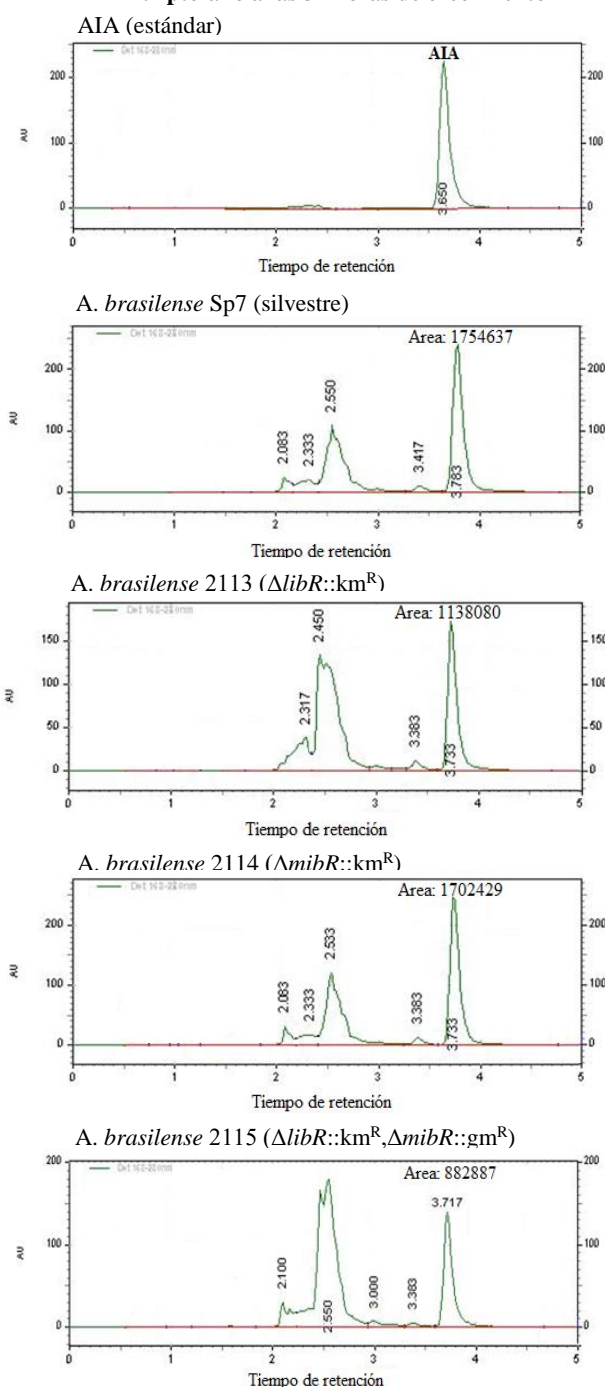
## 7.12. Efecto de la mutación de *libR* y *mibR* en la biosíntesis de AIA

Con el fin de analizar la posible participación de *libR* y *mibR* en la producción de AIA, se obtuvieron las mutantes de estos genes por reemplazo alélico utilizando el plásmido suicida pJMS-km el cual contiene un gen de resistencia a Km flanqueado por sitios múltiples de clonación (Ramírez-Mata *et al.*, 2016). La comprobación de ambas mutantes se llevó a cabo por PCR y RT-PCR y se describen con detalle en la figura 4 y 5, respectivamente. La mutación de *libR* se hizo eliminando la secuencia codificante para 202 aminoácidos de los 214 aminoácidos de los que consta LibR (del aa Leu4 al aa Ala205), mientras que la mutación de *mibR* se hizo eliminando la secuencia codificante para 148 aminoácidos de los 164 aminoácidos de los que consta MibR (del aa Asp3 al aa Gln150). Las cepas mutantes simples *libR* y *mibR* se nombraron como *A. brasilense* 2113 y *A. brasilense* 2114, respectivamente. En placas de MMAB con malato adicionado con rojo congo, las colonias de las cepas Sp7 y 2114 mostraron una coloración rojo escarlata característico de cepas de *A. brasilense*, mientras que las colonias de la cepa 2113 resultaron ser más opacas, lo cual indican que se afectó su capacidad para absorber el rojo congo del medio sin afectar su crecimiento (figura 4). Además, se construyó una doble mutante *libR-mibR* la cual fue nombrada *A. brasilense* 2115. Para complementar la mutación de *libR* se colonó el gen *libR* junto con una región de 762 pb río arriba del ORF en el plásmido de bajo número de copias pJB3Tc20 (Blatny *et al.*, 1997) y el plásmido

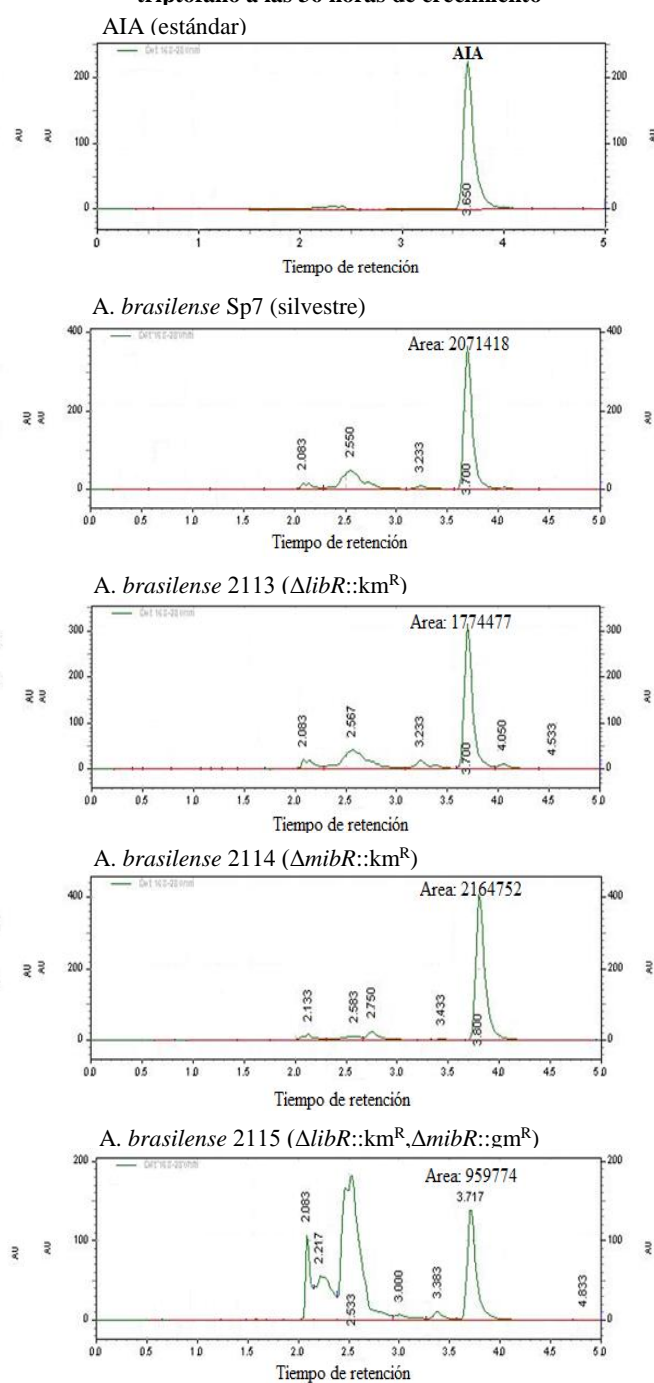
resultante pJB3*libR* se introdujo a la cepa 2113. Las colonias de la cepa complementada, nombrada *A. brasilense* 2113-*libR*<sup>+</sup>, mostró un color rojo escarlata intenso en MMAB con malato adicionado con rojo congo (figura 4). Para complementar la doble mutante *libR-mibR* (cepa 2115), la región codificante de *mibR* junto con una región río arriba del mismo (775 pb), la cual incluyó el probable promotor, se clonó en el plásmido pJB3*libR* y el plásmido resultante pJB3*mibR-libR* se introdujo a la cepa 2115. La comprobación de la complementación de ambas mutaciones se realizó por PCR y por corte con enzimas de restricción de los plásmidos (no mostrado). La mutación de *libR* o *mibR* o ambos no afectó la tasa de crecimiento en medio líquido MMAB con malato o con gluconato como fuente de carbono (figura complementaria C9), sin embargo, se observaron diferencias en ambas fuentes de carbono, por ejemplo, en MMAB con malato la fase de latencia en todas las cepas, incluyendo la cepa silvestre Sp7, duró aproximadamente 8 h, mientras que en MMAB con gluconato duró aproximadamente 14 h. Respecto a la fase exponencial, ésta fue más prolongada en MMAB con gluconato comparado con el crecimiento en MMAB con malato como fuente de carbono.

Para analizar el efecto de la mutación de *mibR* o *libR* o de ambos en la biosíntesis de AIA, la cepa Sp7, las cepas 2113, 2114 y 2115 se cultivaron en MMAB con malato como fuente de carbono complementado con triptófano. La cantidad de AIA producido se determinó por HPLC a partir de las 16 h hasta las 40 h de crecimiento (fase exponencial tardía hasta la fase estacionaria tardía, respectivamente) a intervalos de 8 h y los valores obtenidos fueron normalizados con la cantidad de proteínas totales del cultivo bacteriano. El AIA fue detectado en un tiempo de retención de 3.7 minutos de acuerdo a los cromatogramas obtenidos por HPLC (figura 21a y 21b).

**a. Producción de AIA en MMAB con malato y triptófano a las 32 horas de crecimiento**

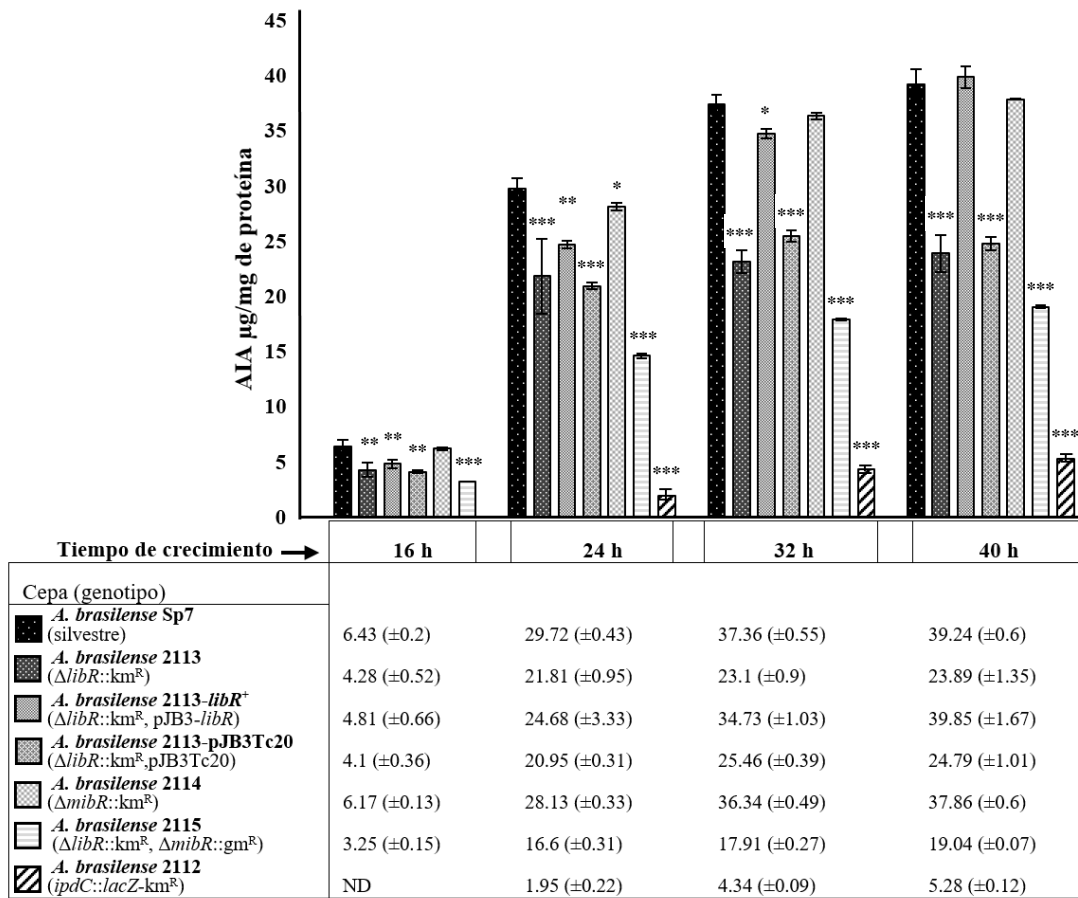


**b. Producción de AIA en MMAB con gluconato y triptófano a las 36 horas de crecimiento**

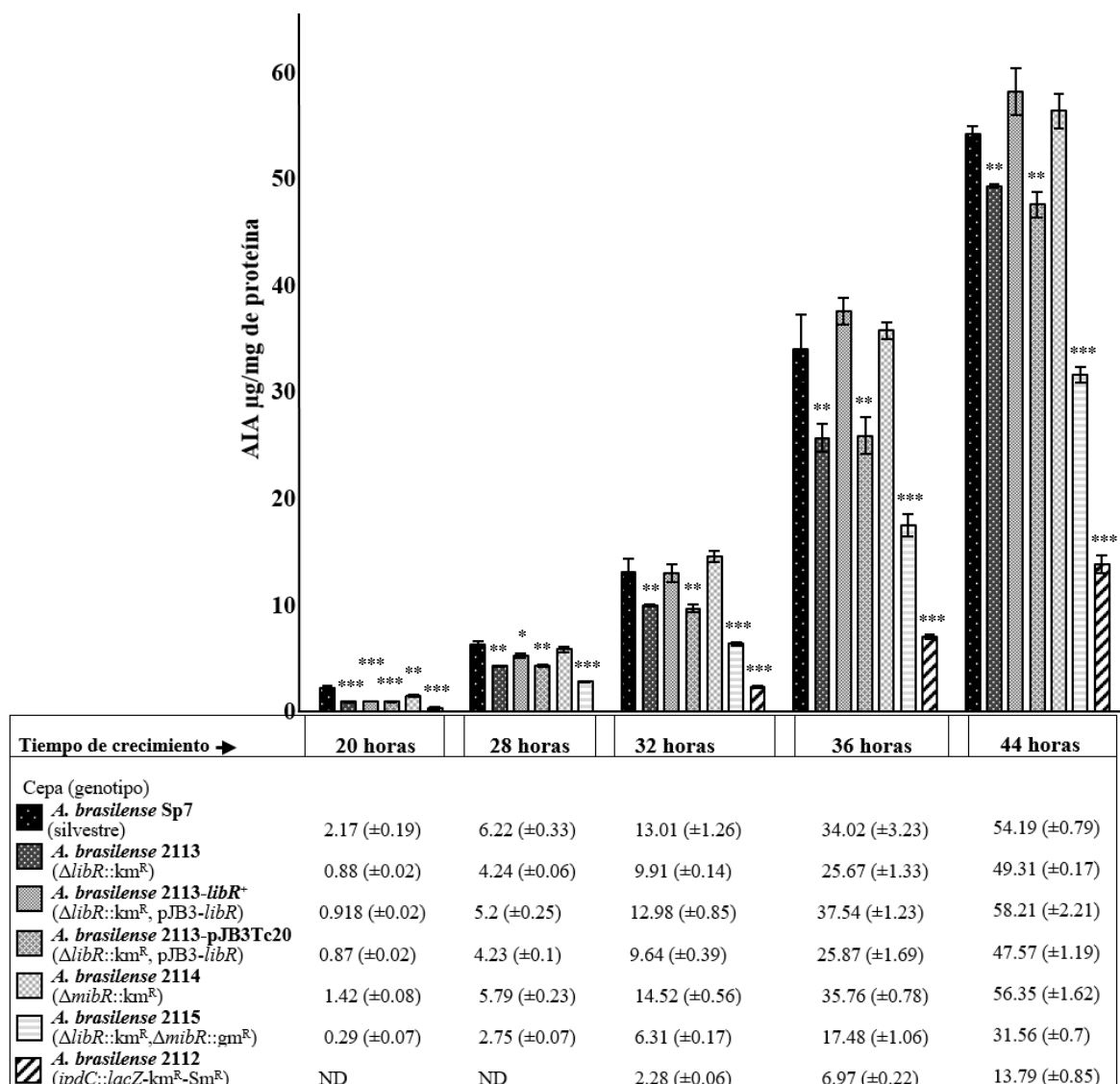


**Figura 21. Cromatogramas de HPLC de la cuantificación de AIA producido por cepas de *A. brasilense*.** (a) Cromatogramas de HPLC de la cuantificación de AIA en MMAB con malato como fuente de carbono y triptófano (100  $\mu$ g/ml) a las 32 horas de crecimiento. (b) Cromatogramas de HPLC de la cuantificación de AIA en MMAB con gluconato como fuente de carbono y triptófano a las 36 horas de crecimiento. La cuantificación de AIA se realizó a partir del sobrenadante de cultivos de cepas de *A. brasilense* indicadas en la parte superior de cada figura como se describió en material y métodos. En el eje X de cada gráfica se indica en el tiempo de retención en minutos y en el eje Y se indican las unidades de absorbancia (AU) determinadas a 280 nm.

Como se muestra en la figura 22, la mutante 2113 produjo en promedio 35% menos AIA que la cepa silvestre tanto en la fase exponencial como en la fase estacionaria de crecimiento. La complementación en trans de *libR* en el fondo genético de la mutante 2113 (cepa 2113-*libR*<sup>+</sup>) restauró los niveles de AIA en fase estacionaria de crecimiento alcanzando niveles similares a la cepa silvestre. La cepa 2113-pJB3Tc20 produjo niveles similares de AIA que la mutante 2113, lo cual indica que el plásmido vacío pJB3Tc20 no tuvo ningún efecto en la producción de AIA. La mutación de *mibR* (cepa 2114) no redujo la biosíntesis de AIA en ninguno de los tiempos evaluados. Sin embargo, cuando se analizó la doble mutante *libR-mibR* (cepa 2115), la biosíntesis de AIA se redujo en 51%, tanto en fase exponencial como en la fase estacionaria. Como se reportó previamente (Carreño-López *et al.*, 2000), la mutación de *ipdC* (cepa 2112) causó una reducción de 87% en la biosíntesis de AIA al compararlo con la cepa Sp7 (figura 22). Con el fin de evaluar la influencia de otras fuentes de carbono en la biosíntesis de AIA, las cepas se cultivaron en MMAB con gluconato como fuente de carbono complementado con triptófano y la cantidad de AIA producido se determinó como se indicó anteriormente. Como se muestra en la figura 23, la mutante 2113 y la doble mutante 2115 produjeron 27 y 52% menos AIA que la cepa Sp7 en fase exponencial de crecimiento (28, 32 y 36 h de crecimiento), respectivamente. La cepa 2113-*libR*<sup>+</sup> produjo niveles similares de AIA que la cepa silvestre en fase estacionaria, lo cual indica que la complementación en trans de *libR* restauró el fenotipo en cuestión. La cepa 2113pJB3Tc20 produjo niveles similares de AIA que la mutante 2113, lo cual indica que el plásmido vacío pJB3Tc20 no tuvo ningún efecto en la producción de AIA. En la cepa 2115, el defecto en la biosíntesis de AIA se mantuvo hasta la fase estacionaria de crecimiento (44 h), mientras que en la cepa 2113 el defecto fue de solo el 9%. La cepa 2114 produjo 35% menos AIA que la cepa Sp7 en la fase exponencial temprana (20 h), sin embargo, en fase exponencial tardía y en la fase estacionaria, los niveles fueron similares a los de la cepa Sp7 (figura 23). Estos resultados indican que LibR y MibR regulan de manera positiva la biosíntesis de AIA en *A. brasilense*.



**Figura 22. Producción de AIA por cepas de *A. brasilense* en MMAB con malato a diferentes tiempos de crecimiento.** Las cepas se crecieron en MMAB con malato como fuente de carbono y triptófano (100 µg/ml [0.49 mM]). En los tiempos indicados se tomó una alícuota de cada cultivo para la cuantificación de AIA por HPLC y de proteínas totales como se indicó en material y métodos. Los resultados corresponden a la media de los valores de dos ensayos independientes con tres réplicas biológicas y las barras de error representan la desviación estándar. ND, no determinado. Los asteriscos encima de las barras indican la significancia estadística en donde \* <0.05, \*\*<0.001\*\*\* <0.0001, de acuerdo a la prueba *t* de student.

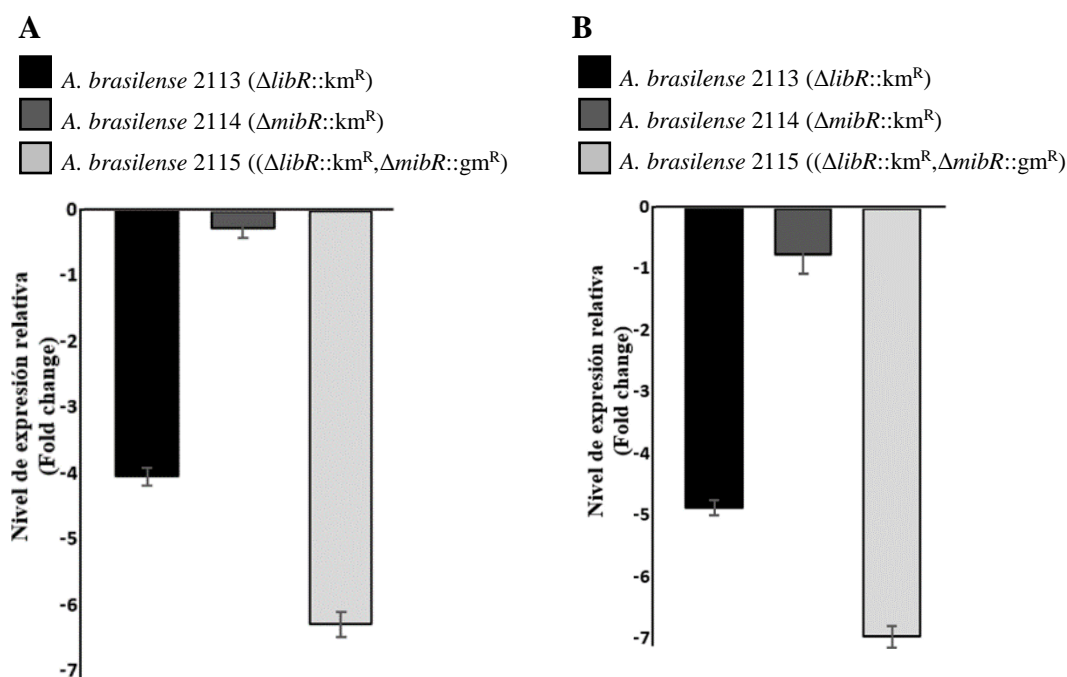


**Figura 23. Producción de AIA por cepas de *A. brasilense* en MMAB con gluconato a diferentes tiempos de crecimiento.** Las cepas se crecieron en MMAB con gluconato como fuente de carbono y triptófano (100 µg/ml [0.49 mM]). En los tiempos indicados se tomó una alícuota de cada cultivo para la cuantificación de AIA por HPLC y de proteínas totales como se indicó en material y métodos. Los resultados corresponden a la media de los valores de dos ensayos independientes y tres réplicas biológicas y las barras de error representan la desviación estándar. ND, no determinado. Los asteriscos encima de las barras indican la significancia estadística en donde \* <0.05, \*\*<0.001 \*\*\* <0.0001, de acuerdo a la prueba *t* de student.

### 7.13. Efecto de la mutación de *libR* y *mibR* en la expresión de *ipdC*

Con el fin de analizar si LibR, MibR o ambos regulan la expresión de *ipdC* en *A. brasilense*, se llevó a cabo la cuantificación de la expresión de *ipdC* de las cepas 2113, 2114 y 2115 y de la cepa Sp7 mediante PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) utilizando el método comparativo C<sub>T</sub> (2<sup>-ΔΔCT</sup>). Para ello, el RNA fue extraído de las células crecidas hasta la fase estacionaria (24 horas de crecimiento) en MMAB

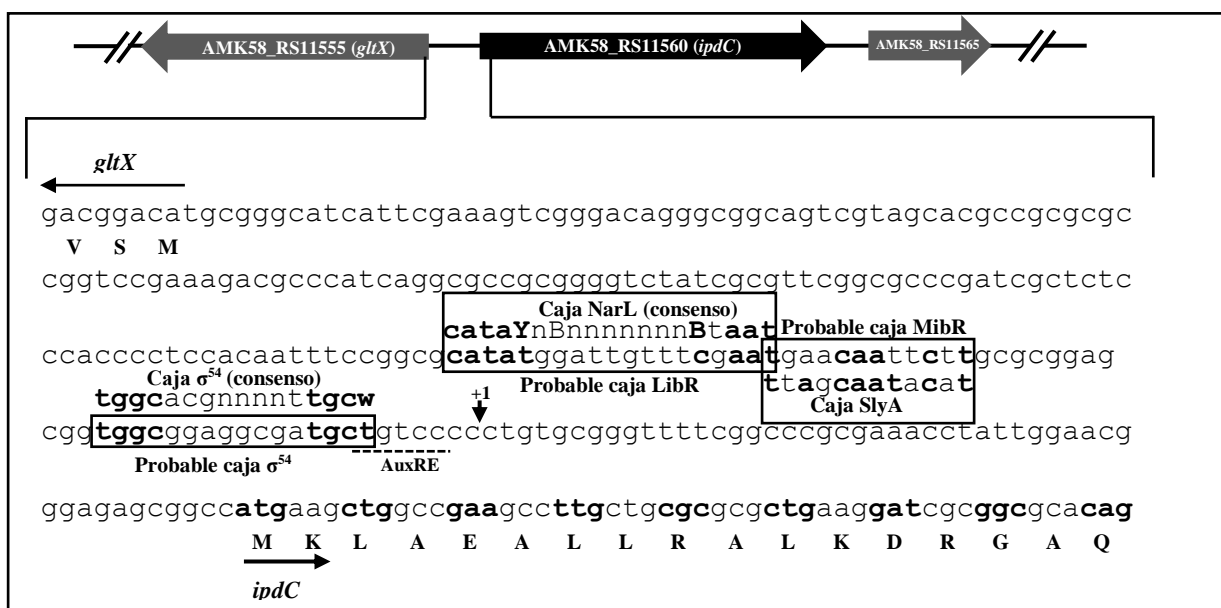
con malato como fuente de carbono en presencia o en ausencia de triptófano. El gen *gyrA*, el cual codifica la subunidad A de la DNA girasa y el gen *rho*, el cual codifica el terminador transcripcional Rho, se utilizaron como genes de referencia para normalizar la expresión de *ipdC*. *gyrA* se eligió como gen de referencia debido a que, de acuerdo a un estudio previo, mostró ser uno de los genes de *A. brasilense* cuya expresión fue más estable en diferentes condiciones de cultivo (McMillan & Pereg, 2014). Como se muestra en la figura 24, en ausencia de triptófano, la expresión de *ipdC* disminuyó 4 veces en la cepa 2113 y 6 veces en la cepa 2115 comparado con la cepa silvestre, mientras que los niveles de expresión en la cepa 2114 fueron ligeramente menores a la cepa Sp7, pero esta diferencia no fue estadísticamente significativa. Cuando el medio se complementó con triptófano, la expresión de *ipdC* disminuyó 5 veces en la cepa 2113 y 7 veces en la cepa 2115, mientras que en la cepa 2114 la disminución de la expresión no fue estadísticamente significativa (figura 24). Estos resultados indican que LibR regula de manera positiva la expresión de *ipdC* en *A. brasilense*. Este experimento no muestra una función clara de MibR en la expresión de *ipdC*, aunque los datos obtenidos con la doble mutante sugieren que posiblemente actúe como un regulador positivo.



**Figura 24. Análisis de la expresión de *ipdC* en las cepas 2113, 2114 y 2115 con respecto a la cepa Sp7 en MMAB con malato en presencia o en ausencia de triptófano.** A. Niveles de expresión de *ipdC* en las mutantes 2113, 2114 y 2115 relativo a los niveles de expresión en la cepa Sp7 crecidas en medio mínimo con malato en ausencia de triptófano. Los niveles de expresión fueron normalizados con los niveles de expresión de *gyrA*. B. Nivel de expresión de *ipdC* en las mutantes 2113, 2114 y 2115 relativo a los niveles de expresión en la cepa Sp7 crecidas en medio mínimo con malato en presencia de triptófano. Los resultados corresponden a la media de los valores de tres ensayos independientes y las barras de error representan la desviación estándar.

### 7.14. Predicción de sitios de unión a LibR y MibR en la región reguladora de *ipdC*

Como se mencionó anteriormente, LibR posee una alta homología a nivel de estructura terciaria con NarL de *E. coli*, el cual es un regulador transcripcional con dominios REC-HTH de la familia FixJ/LuxR que regula la expresión de operones cuyos productos están implicados en la respiración mediada por nitrato (Stewart, 1993). Las secuencias de las cajas de unión de NarL han sido caracterizadas a detalle y han sido utilizadas para la generación de una matriz de peso posicional (PWM) en el servidor Virtual footprinting de la base de datos PRODORIC (Münch *et al.*, 2005). Utilizando dicha matriz, se analizó la región reguladora de *ipdC* con el fin de saber si existe alguna probable caja de unión de LibR. Como se muestra en la figura 22, se localizó una caja similar a la secuencia de reconocimiento de NarL con una puntuación considerable (de 5.24, considerando que la puntuación mínimo es de 0.25 y la máxima de 5.39). Esta caja está localizada río arriba de la probable caja de unión a  $\sigma^{54}$  y se sobrelapa con la repetición invertida (figura 25).



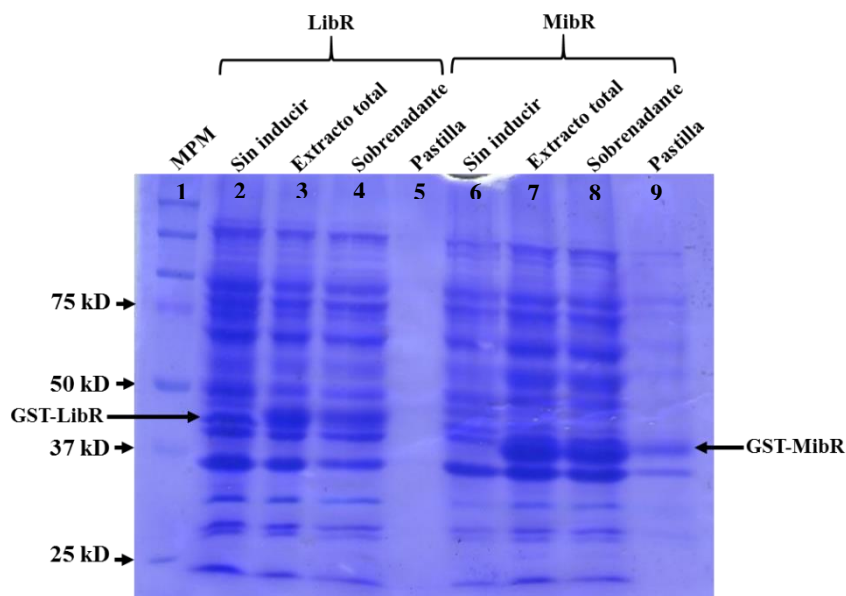
**Figura 25. Predicción bioinformática de los sitios de unión a LibR y MibR en la región reguladora de *ipdC*.** Las probables cajas LibR, MibR y  $\sigma^{54}$  se muestran en cuadros negros. La caja AuxRE está indicada con una línea discontinua y el inicio de la región codificante de *ipdC* y *gltX* está indicado con flechas negras. Y = C o T; B = T, C o G.

En el promotor de *ipdC* se encontró una secuencia que presenta alta homología a la secuencia de unión de SlyA, un regulador transcripcional de la familia MarR de *Salmonella typhimurium* implicado en virulencia (Stapleton *et al.*, 2002). Esta caja se sobrelapa parcialmente con la probable caja LibR en el promotor de *ipdC* (figura 25). Por lo general, los reguladores transcripcionales de la familia MarR se unen a secuencias de DNA que tienen la característica de ser palíndricas o pseudopalíndricas (Perera & Grove, 2010),

aunque algunos homólogos pueden unirse a secuencias totalmente degeneradas (Rouanet *et al.*, 2004) por lo que ha sido difícil establecer una secuencia consenso de unión. Debido a esto, no ha sido posible generar una PWM para proteínas de la familia MarR en servidores como PRODORIC.

### 7.15. Clonación y expresión de *libR* y *mibR*

Con el fin de expresar y purificar LibR y MibR, los genes *libR* y *mibR* se clonaron por separado en el plásmido de expresión PGEX-4T1 (GE Healthcare Life Sciences) obteniendo los plásmidos pGEXGST-*libR* y pGEXGST-*mibR*, respectivamente, los cuales fueron comprobados por secuenciación (no mostrado). En pGEXGST-*libR*, *libR* quedó fusionado de manera traduccional al gen *gst* generando una proteína híbrida GST-*libR* de aproximadamente 49 kDa. De igual forma, en pGEXGST-*mibR*, *mibR* quedó fusionado de manera traduccional al gen *gst* generando una proteína híbrida GST-*mibR* de aproximadamente 43 kDa. Ambos plásmidos se transfirieron de manera separada a *E. coli* BL21 y se evaluaron las condiciones para la expresión de ambas proteínas. La máxima expresión de LibR y MibR se obtuvo en medio LB (DO<sub>600</sub> de ~0.5) complementado con 0.1 mM de IPTG como inductor con un tiempo de inducción de 3 horas a 22 °C. Como se muestra en la figura 26, la mayor cantidad de proteína tanto de LibR como de MibR se obtuvo en la fracción soluble (sobrenadante).



**Figura 26. Expresión de LibR y MibR en *E. coli* BL21.** El carril 1 corresponde al marcado de peso molecular (Precision Plus Protein™ Dual Color Standards, BIORAD); en los carriles 2 y 6 se muestra el extracto de las proteínas obtenidas de un control sin agregar el inductor IPTG al medio de cultivo; en los carriles 3 y 7 se muestra el extracto total de las proteínas obtenidas de un cultivo con 0.1 mM de IPTG; en los carriles 4 y 8 se muestra el extracto de las proteínas obtenidas del sobrenadante después de la lisis celular; en los carriles 5 y 9 se muestra el extracto de las proteínas obtenidas de la pastilla después de la lisis celular.

## 8. DISCUSIÓN

La biosíntesis de AIA en bacterias asociadas a plantas ha sido un tema de gran interés debido a que es uno de los principales mecanismos implicados en la estimulación del desarrollo de la planta. Se han realizado importantes avances particularmente en el estudio de las vías de biosíntesis de AIA y de los genes implicados en cada una de ellas. En *A. brasilense* y en otras PGPRs, uno de los genes claves en la biosíntesis de AIA es el gen *ipdC*. En el promotor de *ipdC* de la cepa Sp245 se han localizado varios elementos en *cis* que pudieran ser importantes para la expresión del gen, entre ellos, un elemento de respuesta a auxinas, un probable sitio de unión para el factor  $\sigma^{54}$ , una repetición invertida (ATTGTTTC(GAAT)GAAACAAT), dos secuencias palíndromes, un probable sitio de unión a ribosoma, así como el sitio de inicio de la transcripción (Rothballer *et al.*, 2005, Lambrecht *et al.*, 1999, Vande Broek *et al.*, 2005) (figura 6). En *A. brasilense* Sp245 la región reguladora de *ipdC* contiene una secuencia de 150 pb que no está presente en otras cepas como la Sp7 y SM (Rothballer *et al.*, 2005; Malhotra & Srivastava, 2008). Esta variabilidad podría estar directamente relacionada con la cantidad de AIA producido cuando se analizan diferentes cepas de *A. brasilense*, por lo cual en este trabajo se analizó la variabilidad de la región codificante de *ipdC* así como de la región del extremo 5' de *Azospirillum* spp. aisladas de diferentes plantas y sitios geográficos (tabla 2). Los resultados de PCR mostraron dos grupos de amplicones; el grupo I de 2.75 kb (tomando como referencia la cepa Sp245) y el grupo II de 1.9 kb (tomando como referencia la cepa Sp7). Esta diferencia en el tamaño de los amplicones se debió a que, de la misma forma que en la cepa Sp245, algunas poseen una secuencia de 150 pb en la región reguladora de *ipdC* misma que no está presente en otras cepas como la 42M, C15 y 15-2B (figura 9). Además, se encontró que en algunas cepas, inmediatamente río abajo de *ipdC* se encuentra un gen conocido como *iaaC* el cual codifica una probable proteasa de respuesta a estrés en *A. brasilense* Sp245 que regula de manera negativa la biosíntesis de AIA pero no la expresión de *ipdC* (Vande Broek *et al.*, 2005; Malhotra & Srivastava, 2008), mientras que en otras cepas este gen no está presente. Se propone que las bacterias que carecen de *iaaC* la biosíntesis de AIA se regula de manera diferente (Malhotra & Srivastava, 2008). La cuantificación de AIA mostró que esta diferencia en el promotor de *ipdC* no tiene una correlación con la cantidad de AIA producido (figura 12). Por otro lado, el análisis de la secuencia de nucleótidos de *ipdC* y de la secuencia deducida de aminoácidos

mostró que no existe variabilidad entre las cepas de *A. brasilense* estudiadas a pesar de haber sido aisladas de diferentes plantas y sitios geográficos. *ipdC* resultó estar muy conservado en un total de 34 cepas de *A. brasilense* analizadas (Jijón-Moreno *et al.*, 2015), lo cual indica que la vía del ácido indol-3-pirúvico está ampliamente distribuida en esta especie y a su vez, refleja la importancia del AIA en *A. brasilense* como una estrategia para lograr adaptarse al ambiente rizosférico y para establecer una asociación exitosa con su planta hospedera.

Desde el aislamiento, clonación y secuenciación de *ipdC* en *A. brasilense* (Zimmer *et al.*, 1998) se han realizado importantes avances en cuanto a su regulación a nivel fisiológico. En *A. brasilense*, *ipdC* se induce en respuesta a varios factores como el pH ácido y bajo condiciones anaeróbicas (Ona *et al.*, 2005, Vande Broek *et al.*, 2005), auxinas como el AIA y el ácido naftalenoacético, el ácido 2,4-diclorofenoxipropiónico y por el ácido clorofenoxiacético (Malhotra and Srivastava, 2008; Vande Broek *et al.*, 1999). Se propone que la respuesta al AIA podría estar mediada por reguladores transcripcionales que utilizan esta auxina como ligando para modular la transcripción de *ipdC* a través de un mecanismo similar a la regulación de la expresión de genes de respuesta a auxinas de *Arabidopsis thaliana* y otras plantas (Mockaitis & Stelle, 2008). Esta hipótesis es apoyada por el hecho de que en el promotor de *ipdC* existe una repetición invertida que es importante para la inducción de la expresión de *ipdC* por el AIA (Vande Broek *et al.*, 2005) y podría ser el sitio de unión para algún factor de transcripción que utiliza el AIA como ligando para modular la expresión de *ipdC*.

En *E. cloacae*, la expresión de *ipdC* es regulada de manera positiva por el regulador transcripcional TyrR el cual regula la expresión de genes involucrados en el transporte y metabolismo de aminoácidos en *E. coli* en respuesta a aminoácidos aromáticos como el triptófano, tirosina y fenilalanina (Ryu & Patten, 2008; Pittard *et al.*, 2005). En este trabajo, a través de un análisis bioinformático se localizó un gen en el genoma de *A. brasilense* Sp7 que codifica una proteína homóloga a TyrR de *E. coli* la cual posee un dominio PAS en el extremo amino terminal, un dominio de interacción con el factor  $\sigma^{54}$  en el dominio central y un motivo HTH en el extremo carboxilo terminal (figura 13a). Estas características la agrupan en la familia de las proteínas de unión a potenciadores bacteriano (bEBPs) las cuales regulan la expresión de genes dependientes de  $\sigma^{54}$  (Bush & Dixon, 2012). El alineamiento múltiple mostró que TyrR de la cepa Sp7 posee un motivo GSFTGA (figura 13b) que no está presente en otros homólogos como TyrR de *E. coli* ni

en TyrR de *E. cloacae*. Este motivo es importante para la interacción con  $\sigma^{54}$  y suele ser característico de las bEBPs (Bush & Dixon, 2012). De hecho, las bEBPs que carecen de este motivo no son capaces de regular la expresión de genes dependientes de  $\sigma^{54}$  (Pittard *et al.*, 2005). La presencia de una probable caja de unión a  $\sigma^{54}$  en el promotor de *ipdC* condujo a formular la hipótesis que su expresión podría ser regulada por una bEBP como TyrR. Para corroborar esta hipótesis, se generó una cepa mutante en el gen *tyrR*, la cual se denominó *A. brasilense* 2116. En la cepa 2116 la producción de AIA disminuyó en alrededor de un 18% comparada con la cepa silvestre Sp7 en fase exponencial del crecimiento, sin embargo, en fase estacionaria el nivel de producción fue similar al de la cepa silvestre (figura 14, tabla 5). Un análisis transcripcional utilizando una fusión transcripcional cromosómica *ipdC-lacZ* mostró que TyrR no está implicado en la regulación de la expresión de *ipdC* ya que la actividad enzimática de la  $\beta$ -galactosidasa fue similar al de la cepa silvestre (figura 15, tabla 6). Estos resultados concuerdan con el hecho de que en el promotor de *ipdC* no se encontró ninguna caja similar a la secuencia de reconocimiento de TyrR. Una posible explicación a la disminución en la biosíntesis de AIA en la mutante 2116 es que la mutación de *tyrR* afectó la expresión de genes implicados de manera indirecta en la biosíntesis de AIA. Esta hipótesis se apoya por el hecho de que un análisis bioinformático del genoma de *A. brasilense* Sp7 mostró la presencia de probables sitios de unión para TyrR en promotores de genes cuyos productos proteicos podrían estar implicados en el transporte y biosíntesis de triptófano, el precursor para la biosíntesis de AIA, pero no en la región 5' río arriba de *ipdC*. Por ejemplo, una de las cajas TyrR se encontró río arriba del gen AMK58\_RS06400, el cual codifica una antranilato fosforibosiltransferasa (TrpD) que cataliza la transferencia de un grupo fosforibosil a antranilato para formar fosforibosil antranilato en la segunda etapa de la biosíntesis de triptófano, y un sitio río arriba del gen AMK58\_RS12605, el cual codifica una fosforibosil antranilatoisomerasa (TrpF) implicada en la tercera etapa de la biosíntesis de triptófano (Dosselaere & Vanderleyden, 2001) (tabla 7). En *A. brasilense*, *trpD* se identificó como parte de un operón junto con *trpG* y *trpC* que al ser expresado en *A. irakense* KA3, una cepa con una baja producción de AIA, causó un aumento en la biosíntesis de esta fitohormona (Zimmer *et al.*, 1991; Zimmer & Elmerich, 1992).

El análisis bioinformático predijo varios sitios de unión a TyrR en la región intergénica entre *tyrR* y el gen AMK58\_RS07035 el cual codifica para una D-aminoácido deshidrogenasa (GenBank:

ALJ35196), que está implicada en el catabolismo de aminoácidos como la L-alanina a través de la desaminación oxidativa de la D-alanina para producir amonio y piruvato (Reitzer, 1996). Tres de estas cajas están localizadas inmediatamente río arriba de *tyrR* lo cual sugiere que TyrR regula su propia expresión de forma similar que en *E. coli* (Kamakaris & Pittard, 1982) (Tabla 7). Otras tres cajas TyrR se encontraron en una región adyacente a una probable caja de unión al factor  $\sigma^{54}$  (CGCAAACGCGATGCCA) río arriba del gen *dadA*, lo cual sugiere que TyrR y el factor  $\sigma^{54}$  podrían regular de manera positiva la expresión de este gen y con ello el catabolismo de la D-alanina en *A. brasilense* y a su vez, representa la primera evidencia de que TyrR podría ser capaz de interactuar con el factor  $\sigma^{54}$  para regular la transcripción a diferencia de sus homólogos en *E. coli* y *E. cloacae*, los cuales solo regulan promotores dependientes de sigma 70 (Pittard *et al.*, 2005, Ryu y Patten, 2008). De hecho, la cepa 2116 fue incapaz de crecer en MMAB con DL-alanina como fuente de carbono a diferencia de la cepa Sp7 la cual mostró un crecimiento considerable formando pequeños flóculos después de las 48 horas de crecimiento (figura 3). La presencia de probables sitios de unión a TyrR y para el factor  $\sigma^{54}$  río arriba de genes de transporte de tipo ABC de aminoácidos sugiere que además de regular el catabolismo de la D-alanina, TyrR y  $\sigma^{54}$  podrían regular el transporte de éste y otros aminoácidos en *A. brasilense* a través de un mecanismo hasta ahora desconocido (Tabla 7). Este hallazgo puede ser utilizado como un antecedente para futuras investigaciones sobre el mecanismo molecular que regula la captación y metabolismo de fuentes de carbono y nitrógeno alternativas en bacterias asociadas a planta como una estrategia para su supervivencia en el ambiente rizosférico.

Con el fin de identificar los elementos en *trans* que regulan la expresión de *ipdC*, en este trabajo se llevaron a cabo ensayos de cromatografía de afinidad a DNA, la cual es una técnica que ha sido utilizada en diversos trabajos para la identificación de proteínas de unión a DNA incluyendo reguladores transcripcionales (Gerstmeir *et al.*, 2004; Jutras *et al.*, 2012; Longo *et al.*, 2013, Hyeon *et al.*, 2012). Con esta técnica y a través del uso de la espectrometría de masas, se aislaron e identificaron dos proteínas con dominios HTH característico de la mayoría de los reguladores transcripcionales, las cuales interactuaron con el promotor de *ipdC* utilizado como sonda (figura 16). Una de estas proteínas corresponde a un regulador transcripcional de la familia LuxR el cual, debido a su participación en la biosíntesis de AIA, fue nombrado LibR (LuxR-family indole-3-

acetic acid biosynthesis regulator) (figura 16). En la mayoría de las bacterias Gram-negativas como *Vibrio fischeri*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Agrobacterium tumefaciens*, los reguladores transcripcionales de la familia LuxR están implicados en un sistema de señalización conocido como “quorum sensing” en el cual, la enzima LuxI (acilo homoserina sintetasa) sintetiza una molécula de tipo N-acil homoserina lactona que se une al dominio de unión al autoinductor de un regulador transcripcional de la familia LuxR, el cual a su vez se une al DNA para regular la expresión génica (Miller & Bassler, 2001). Aunque LibR se agrupa dentro de la familia LuxR de reguladores transcripcionales, no posee un dominio de unión al autoinductor, en su lugar, posee un dominio REC característico de los reguladores de sistemas de doble componente como NarL u OmpR (Galperin, 2006). Este sistema involucra a la cinasa histidínica que, tras detectar una determinada señal del entorno, se autofosforila en un residuo de histidina y posteriormente este grupo fosforilo es transferido a un residuo de ácido aspártico (D) del dominio REC del regulador transcripcional, promoviendo un cambio conformacional del dominio REC favoreciendo la formación de homodímeros para unirse a secuencias específicas del DNA regulando el inicio de la transcripción (Kern *et al.*, 1999, Leoni *et al.*, 2003). En otros casos, la fosforilación del dominio REC induce un cambio conformacional en el regulador transcripcional que provoca su disociación del DNA (Plate & Marletta, 2013). La presencia de un residuo D conservado en el dominio REC de LibR, sugiere que la fosforilación es un requisito para modular su actividad reguladora ya sea para unirse o disociarse del DNA (figura 17). Generalmente en los sistemas de doble componente tanto la cinasa histidínica como el regulador de la respuesta están codificados de manera adyacente en el genoma (Stewart, 1993; Rodríguez-Moya *et al.*, 2010), sin embargo, el análisis de la relación sinténica entre cepas de *Azospirillum* spp. no mostró la presencia de alguna cinasa histidínica en la región cercana a *libR* en ninguna de las cepas analizadas (figura complementaria C2). *A. brasilense* posee 74 cinasas histidínicas clásicas y 55 híbridas (Borland *et al.*, 2015) por lo que es probable que alguna de ellas regule el estado de fosforilación de LibR actuando como una cinasa histidínica y probablemente como una fosfatasa modulando su actividad reguladora sobre *ipdC*. Los reguladores con dominios REC-LuxR están implicados en diversos procesos celulares como la floculación y biosíntesis de exopolisacáridos (EPS) (Pereg-Gerk *et al.*, 1998), respiración mediada por nitrato (Stewart, 1993), fijación de nitrógeno (Foussard *et al.*, 1997), formación de biofilm (Dubern *et al.*, 2008) y la utilización de fuentes de carbono como la ectoína (Rodríguez-

Moya *et al.*, 2010) y se unen a secuencias de DNA que tienen la característica de ser repeticiones invertidas (Darwin & Stewart, 1996). Se ha encontrado que estas secuencias pueden variar entre diferentes miembros de la familia LuxR a pesar de la gran similitud que existe entre sus dominios de unión a DNA (Belcheva *et al.*, 2009; Davlieva *et al.*, 2015).

Con el fin de analizar la participación de LibR en la biosíntesis de AIA, se generó una mutante en el gen *libR* la cual se denominó *A. brasilense* 2113. La cuantificación de AIA mostró que la producción de esta fitohormona disminuyó en alrededor de un 31% comparado con la cepa silvestre lo cual indica claramente que LibR regula de manera positiva la biosíntesis de AIA en *A. brasilense*. La complementación en *trans* de la mutante 2113 con el gen silvestre *libR* restauró la biosíntesis de AIA, lo cual indica que la afectación en este fenotipo se debió específicamente a la mutación de *libR* y no como resultado de un efecto polar (figuras 22 y 23). Por otro lado, mediante RT-qPCR se encontró que la expresión de *ipdC* se afectó significativamente tras la mutación de *libR*, lo cual indica que LibR regula de manera positiva la expresión de *ipdC* (figura 24).

Un análisis fenotípico adicional a la producción de AIA mostró que la mutación de *libR* afectó la capacidad de la bacteria para absorber el rojo congo en medio sólido formando colonias opacas a diferencia de la cepa silvestre la cual formó colonias de color rojo escarlata característico de cepas de *A. brasilense* (figura 4). Cuando la cepa 2113 se complementó en *trans* con el gen silvestre *libR*, dicho fenotipo se restauró observándose colonias con un color rojo incluso más intenso comparado con la cepa silvestre (figura 4). Este cambio de coloración generalmente está asociado a la afectación en la producción de EPS y se ha utilizado como una técnica rápida para cuantificar su producción en diversas bacterias (Freeman *et al.*, 1989). De hecho, la mutante 2113 produjo alrededor de un 50% menos exopolisacáridos y biopelícula comparado con la cepa silvestre (resultados no mostrados). Estos resultados sugieren que LibR y probablemente otros reguladores de la familia LuxR regulan tanto la producción de biopelícula como de AIA en *A. brasilense*. Es probable que ambos procesos estén acoplados a través de un mecanismo aún desconocido. Esta hipótesis es apoyada por otros trabajos en el que se ha encontrado que el AIA induce la expresión de genes de biosíntesis de EPS en *Bradyrhizobium japonicum* (Donati *et al.*, 2013) y en *A. brasilense* (Puyvelde *et al.*, 2011).

Como se mencionó anteriormente, se propone que la expresión de *ipdC* podría ser dependiente del factor  $\sigma^{54}$  debido a la presencia de una probable caja de unión a  $\sigma^{54}$  en la región reguladora de *ipdC* (figura 3). La activación de la transcripción de genes dependientes de  $\sigma^{54}$ , un factor de transcripción de la familia de las bEBPs interactúa con  $\sigma^{54}$  a través de un motivo GAFTGA presente en el dominio AAA (ATPasas asociadas a varias actividades celulares) y acopla la energía generada por la hidrólisis de ATP lo cual permite la formación del complejo abierto en el proceso de la transcripción (Bush & Dixon, 2012). De acuerdo al análisis bioinformático, LibR no posee ningún dominio característico de las bEBPs (i. e. Walker A, Walker B) y carece del motivo GAFTGA. Por lo general, los reguladores que carecen de este motivo no son capaces de activar la expresión de genes dependientes de  $\sigma^{54}$  (Studholme & Doxon, 2003), sin embargo, existe la evidencia de que proteínas que no pertenecen a la familia de las bEBPs pueden participar en la regulación de la expresión de genes dependientes de  $\sigma^{54}$  (Huo *et al.*, 2006; Bertoni *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1998). EraR es un regulador atípico de *A. brasilense* Sp7 debido a que a pesar de carecer de los motivos característicos de las bEBPs es capaz de interactuar con  $\sigma^{54}$  para regular la expresión del gen *lexA* el cual codifica una quinoproteína alcohol deshidrogenasa implicada en la utilización de glicerol como fuente de carbono (Singh *et al.*, 2017). De la misma forma que LibR, EraR pertenece a la familia LuxR de reguladores transcripcionales y posee dominios REC-LuxR, por lo cual es probable que LibR, de manera similar a EraR, interactúe con  $\sigma^{54}$  para regular la expresión de *ipdC*.

Además de LibR, el análisis por espectrometría de masas de las bandas secuenciadas mostró la presencia de un regulador transcripcional de la familia MarR la cual no ha sido caracterizada en *A. brasilense* (figura 16). Debido a su participación en la biosíntesis de AIA, esta proteína se nombró MibR. Los reguladores transcripcionales de la familia MarR constituyen un grupo diverso de proteínas encontradas en bacterias y arqueobacterias que actúan como represores o como activadores de la transcripción de genes implicados en diversos procesos celulares como la resistencia a antibióticos, respuesta a diversos tipos de estrés, virulencia y catabolismo de compuestos aromáticos (Perera & Grove, 2010). Por lo general, los reguladores transcripcionales de la familia MarR se unen a secuencias de DNA de 16-20 pb que tienen la característica de ser

palíndricas o pseudopalíndricas (Perera & Grove, 2010), aunque algunos homólogos pueden unirse a secuencias totalmente degeneradas (Rouanet *et al.*, 2004) por lo que ha sido difícil establecer una secuencia consenso de unión. Estas secuencias suelen estar muy cerca o incluso se traslapan con el promotor, por lo cual, la unión del regulador transcripcional bloquea el acceso de la RNA polimerasa al promotor (Martin & Rosner, 1995). A este tipo de represión se le conoce como represión por impedimento estérico (Browning & Busby, 2016) y es uno de los mecanismos más comunes de represión de la expresión de genes bacterianos.

Otra de las características de la mayoría de los reguladores transcripcionales de la familia MarR es que su actividad reguladora requiere de la unión de ligandos específicos que les permiten unirse o disociarse del DNA modulando así la expresión génica. Algunos de estos ligandos suelen ser metabolitos derivados de vías biosintéticas que son reguladas por el propio regulador transcripcional al que se unen (Zhu *et al.*, 2013), por ejemplo, el antibiótico pentalenolactona sirve como ligando de PenR de *Streptomyces exfoliatus* provocando la liberación de la proteína del DNA (Zhu *et al.*, 2013). Se ha demostrado que el AIA puede modular la expresión génica en bacterias actuando como un ligando de reguladores transcripcionales. Mediante ensayos de EMSA, se encontró que IacR de *A. baumannii* se une al promotor del operón *iac*, cuyos genes que lo constituyen están implicados en la degradación de AIA, reprimiendo su expresión, sin embargo, en presencia de AIA el regulador perdió su capacidad para unirse al DNA, lo cual sugiere que el AIA podría interactuar con IacR causando que éste se disocie del promotor permitiendo así la expresión del operón *iac* (Shu *et al.*, 2015).

Los resultados de RT-qPCR mostraron que la mutación de *mibR* causó una ligera disminución tanto en la expresión de *ipdC* como en la biosíntesis de AIA (figuras 22, 23 y 24), lo cual indica que MibR no actúa como un represor de *ipdC*, sino posiblemente como un activador para la expresión de *ipdC*. Otra posible explicación a este comportamiento es que posiblemente la expresión de *mibR* sea un proceso estrictamente controlado el cual no fue posible imitar bajo las condiciones de trabajo. La función de MibR como regulador positivo de la expresión de *ipdC* fue más evidente cuando *libR* se mutó en el fondo genético de la mutante 2114 (doble mutante *A. brasilense* 2115) ya que se observó un mayor efecto tanto en la expresión de *ipdC* como en la biosíntesis de AIA comparado con la mutación de *libR* o *mibR* solos. A pesar de la ausencia de LibR y MibR, la doble mutante 2115 fue capaz de producir alrededor de un 50% de AIA residual

comparado con la cepa silvestre (figura 22 y 23), lo cual sugiere que otros reguladores podrían estar implicados en la biosíntesis de AIA. Esta hipótesis es apoyada por el hecho de que de acuerdo al análisis *in silico* del genoma de la cepa Sp7 existen, además de *libR*, 15 genes que codifican proteínas con dominios REC-LuxR y, además de *MibR*, 8 genes que codifican proteínas de la familia MarR (figuras complementarias C3 y C7). Uno de estos parálogos incluye al regulador transcripcional *FlcA*, el cual está implicado en la biosíntesis de polisacárido capsular, floculación y colonización a la raíz de trigo en *A. brasilense* Sp7 (Pereg-Gerk *et al.*, 1998). *FlcA*, al igual que *LibR*, contiene un dominio REC en el carboxilo terminal y un dominio HTH en el amino terminal característico de los reguladores transcripcionales de la familia LuxR. Ambas proteínas comparten una identidad del 63% (76% de similitud) (figura 17). Otra posible explicación a la producción residual de AIA en la cepa 2115 es que otro factor o factores de transcripción que no fueron aislados con la metodología utilizada podrían también estar implicados en la regulación de *ipdC* o bien que a pesar de la ausencia de *LibR* y *MibR*, la RNA polimerasa por si sola es capaz de llevar a cabo la transcripción de *ipdC* a una menor tasa de expresión.

El análisis *in silico* del promotor de *ipdC* mostró la existencia de una secuencia similar a la secuencia de unión para factores de transcripción de la familia LuxR como *NarL*, así como una secuencia similar a la secuencia de unión para factores de transcripción de la familia MarR como *SlyA* (figura 25). Ambas secuencias se traslapan una con otra y se localizan en una repetición invertida adyacente a una probable caja de unión a  $\sigma^{54}$ . En un trabajo previo se publicó la evidencia de la presencia de dos proteínas, (denominadas proteína A y proteína B) que se unen a dicha repetición invertida del promotor de *ipdC* en *A. lipoferum* (Yagi *et al.*, 2001). La proteína A, se une a la secuencia 5'-TGAAACAATTCT-3', mientras que el sitio de unión de la proteína B abarca toda la repetición invertida 5'-TGGATTGTTTCGAATGAAACAATTCT-3', sin embargo, estas proteínas no fueron identificadas. Tomando como referencia estos antecedentes y los resultados de este trabajo se sugiere que la expresión de *ipdC* es regulada de manera positiva por *LibR* y *MibR* los cuales compiten por el sitio de unión en el promotor de *ipdC* en respuesta a señales intracelulares o extracelulares específicas aún desconocidas. Este mecanismo de competencia por el sitio de unión ya ha sido descrito en reguladores transcripcionales de la familia MarR. Por ejemplo, *MdrA*, un regulador transcripcional de la familia MarR de *Brucella abortus* compite con

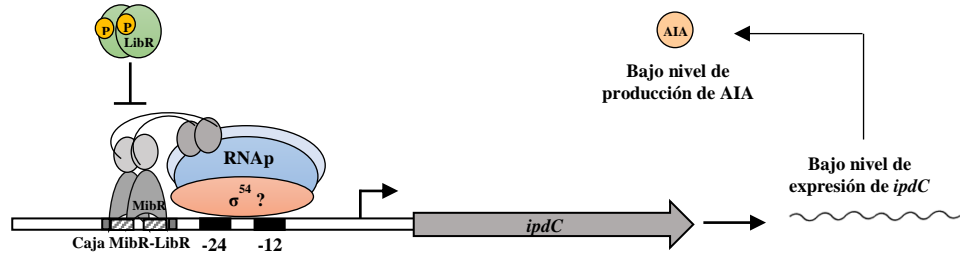
IHF y HutC para regular de manera positiva la transcripción del operón *virB* cuyos genes que lo constituyen codifican el sistema de secreción tipo IV (Sieira *et al.*, 2012).

En conjunto, los resultados encontrados en este y en los trabajos antes mencionados permiten proponer un modelo hipotético de la regulación transcripcional de *ipdC* en *A. brasilense* mediado por LibR y MibR. En este modelo se sugiere que en fase exponencial de crecimiento bacteriano MibR se une al promotor en ausencia de AIA activando la expresión de *ipdC* a un bajo nivel de expresión. Este bajo nivel de expresión probablemente se debe a que MibR no interactúa adecuadamente con el factor sigma debido a que carece del dominio de unión a  $\sigma^{54}$  tal y como lo muestra el análisis bioinformático (figura 19). En esta fase de crecimiento comienza la síntesis de AIA el cual, alcanza un nivel que le permite unirse a MibR provocando un cambio conformacional que causa que éste se disocie del DNA. La disociación de MibR del promotor permite la unión de LibR en su estado fosforilado el cual interactúa físicamente con el factor  $\sigma^{54}$  para activar la expresión de *ipdC* a una mayor tasa de expresión cuando la densidad celular alcanza la fase estacionaria de crecimiento (figura 27).

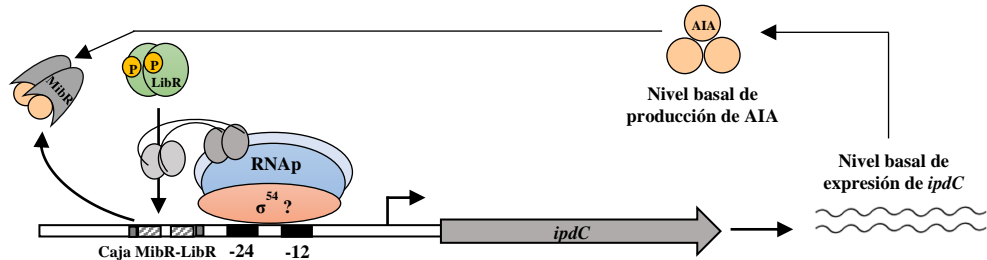
Los resultados de este trabajo indican que la regulación de la expresión de *ipdC* es un proceso muy complejo debido a que la actividad de su promotor es modulada por al menos dos reguladores transcripcionales, LibR y MibR. Sin embargo, serán necesarios otros estudios que permitan saber si: 1) otras proteínas de la familia MarR y/o de la familia LuxR presentes en la cepa Sp7 participan en la expresión de *ipdC* y en la biosíntesis de AIA, 2) si LibR y MibR se unen de manera específica al promotor de *ipdC*, 3) si la unión de LibR al DNA requiere de la fosforilación del dominio REC y 4) si el AIA u otro cofactor son necesarios para la unión o disociación de uno o ambos reguladores del DNA. En conjunto, dichos experimentos junto con los presentados en este trabajo permitirán esclarecer el mecanismo molecular por el cual *A. brasilense* regula la biosíntesis de AIA.

## Modelo propuesto de la regulación transcripcional de *ipdC* en *A. brasilense* Sp7

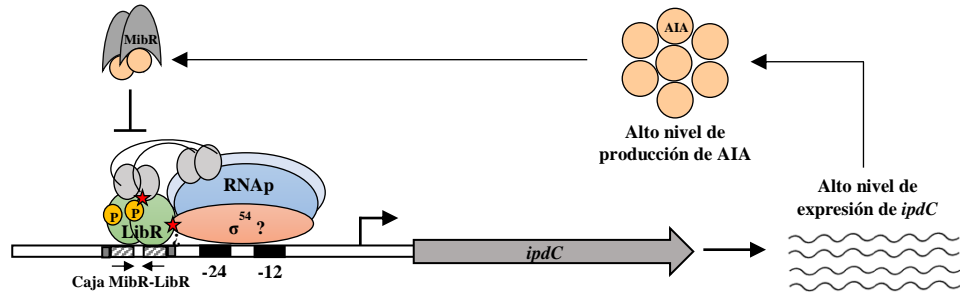
### a. Fase exponencial temprana de crecimiento



### b. Fase exponencial tardía de crecimiento



### c. Fase estacionaria de crecimiento



**Figura 27. Modelo propuesto de la regulación transcripcional de *ipdC* en *A. brasilense* Sp7.** (a) En fase exponencial temprana del crecimiento bacteriano, MibR se une al promotor en ausencia de AIA activando la expresión de *ipdC* junto con el factor sigma 54 a un bajo nivel de expresión. Este bajo nivel de expresión probablemente se debe a que MarR no interactúa adecuadamente con el factor sigma debido a que carece del dominio de unión a  $\sigma^{54}$  o posiblemente debido a una interacción débil con el DNA. (b) En la fase exponencial tardía de crecimiento, comienza la síntesis de AIA (mostrado en círculos de color anaranjado) el cual, alcanza un nivel basal que le permite unirse a MibR provocando un cambio conformacional que causa que éste se disocie del DNA. (c) En la fase estacionaria de crecimiento, la alta concentración de AIA mantiene a MibR en su estado inactivo permitiendo la unión de LibR fosforilado al promotor (mostrado con un círculo amarillo) el cual posiblemente interactúa físicamente con la RNA polimerasa y con el factor  $\sigma^{54}$  (mostrado con estrellas de color rojo) para activar la expresión de *ipdC* a una mayor tasa de expresión.

## 9. CONCLUSIONES

En este trabajo se encontró que *ipdC*, el gen que codifica la enzima fenilpiruvato descarboxilasa (PPDC) está muy conservado en diversas cepas de *A. brasilense* aisladas de diferentes plantas y regiones geográficas. La secuencia de nucleótidos de la región reguladora de *ipdC* y la secuencia deducida de aminoácidos de las PPDCs presentan poca variabilidad genética entre diferentes cepas de *A. brasilense*.

Por otro lado, los datos mostrados en este trabajo indican que MibR y LibR, dos reguladores transcripcionales identificados en este trabajo, regulan de manera positiva la expresión de *ipdC* y la biosíntesis de AIA en *A. brasilense*. La participación de ambos reguladores transcripcionales en la expresión de *ipdC* sugiere que *A. brasilense* modula la biosíntesis de AIA a través de un mecanismo complejo que merece futuras investigaciones.

## 10. TRABAJOS FUTUROS

**Serán necesarios otros experimentos que permitan dar respuesta a las siguientes preguntas:**

- 1) ¿LibR y MibR se unen de manera específica al promotor de *ipdC*?
- 2) ¿El AIA u otro cofactor son necesarios para la unión o disociación de uno o ambos reguladores del DNA?
- 3) ¿La unión de LibR al DNA requiere de la fosforilación del dominio REC?
- 4) ¿LibR y MibR interactúan físicamente para modular la expresión de *ipdC*?

**Para saber si LibR y MibR se unen de manera específica al promotor de *ipdC* se propone:**

Purificar ambas proteínas y realizar ensayos de retardo de la movilidad en gel (EMSA) considerando lo siguiente:

- Es probable que la unión al DNA (o disociación) de LibR, MibR o ambos requiera de la presencia de moléculas como el AIA y el triptófano que actúen como ligandos.
- Es probable que la unión de LibR al DNA requiera de la fosforilación del dominio REC, por lo que podría ser necesario el uso de un donador de fosfatos (p. ej. acetil fosfato).

**Por otro lado, para saber si LibR y MibR interactúan físicamente para unirse al DNA se propone:**

Realizar ensayos de doble híbrido bacteriano

De acuerdo a los resultados de este trabajo, LibR es un regulador transcripcional que está implicado en la biosíntesis de AIA y presenta una alta homología con FlcA, un regulador transcripcional de la familia LuxR implicado en la biosíntesis de exopolisacáridos en *A. brasilense* (Pereg-Gerk *et al.*, 1998). Además, se mostró la evidencia que LibR también podría estar implicado en la producción de exopolisacáridos.

Este hallazgo puede servir como base para trabajos futuros que puedan dar respuesta a las siguientes preguntas:

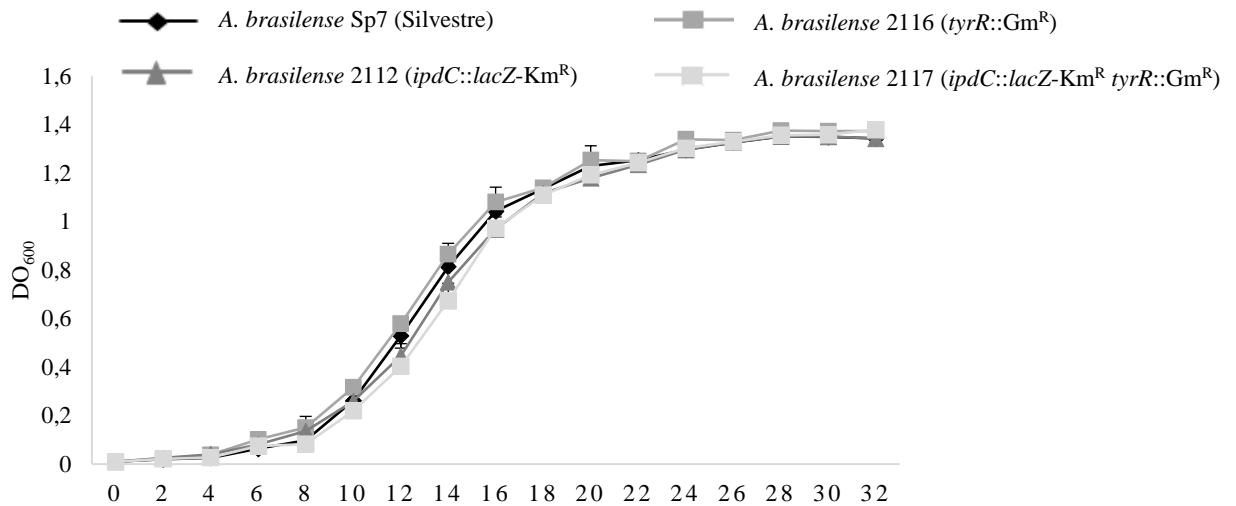
¿Existe una relación fisiológica y/o bioquímica entre la biosíntesis de AIA y la producción de exopolisacáridos?. Si es así, ¿cuál es el mecanismo molecular por el que ambos procesos están acoplados?.

¿Este mecanismo podría estar mediado a nivel molecular por LibR?

## 11. MATERIAL COMPLEMENTARIO

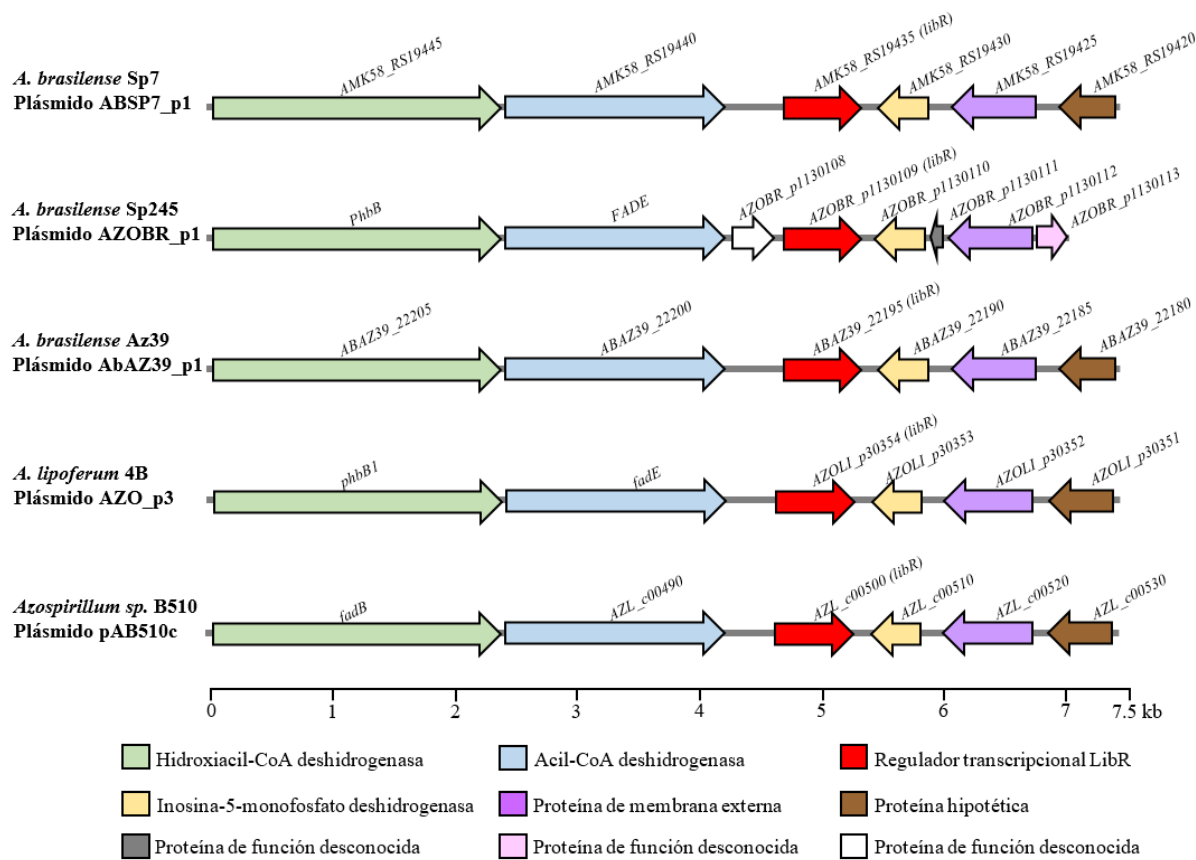
### 11.1 Figuras complementarias

**Figura C1.** Cinética de crecimiento de cepas de *A. brasilense* en MMAB con malato.



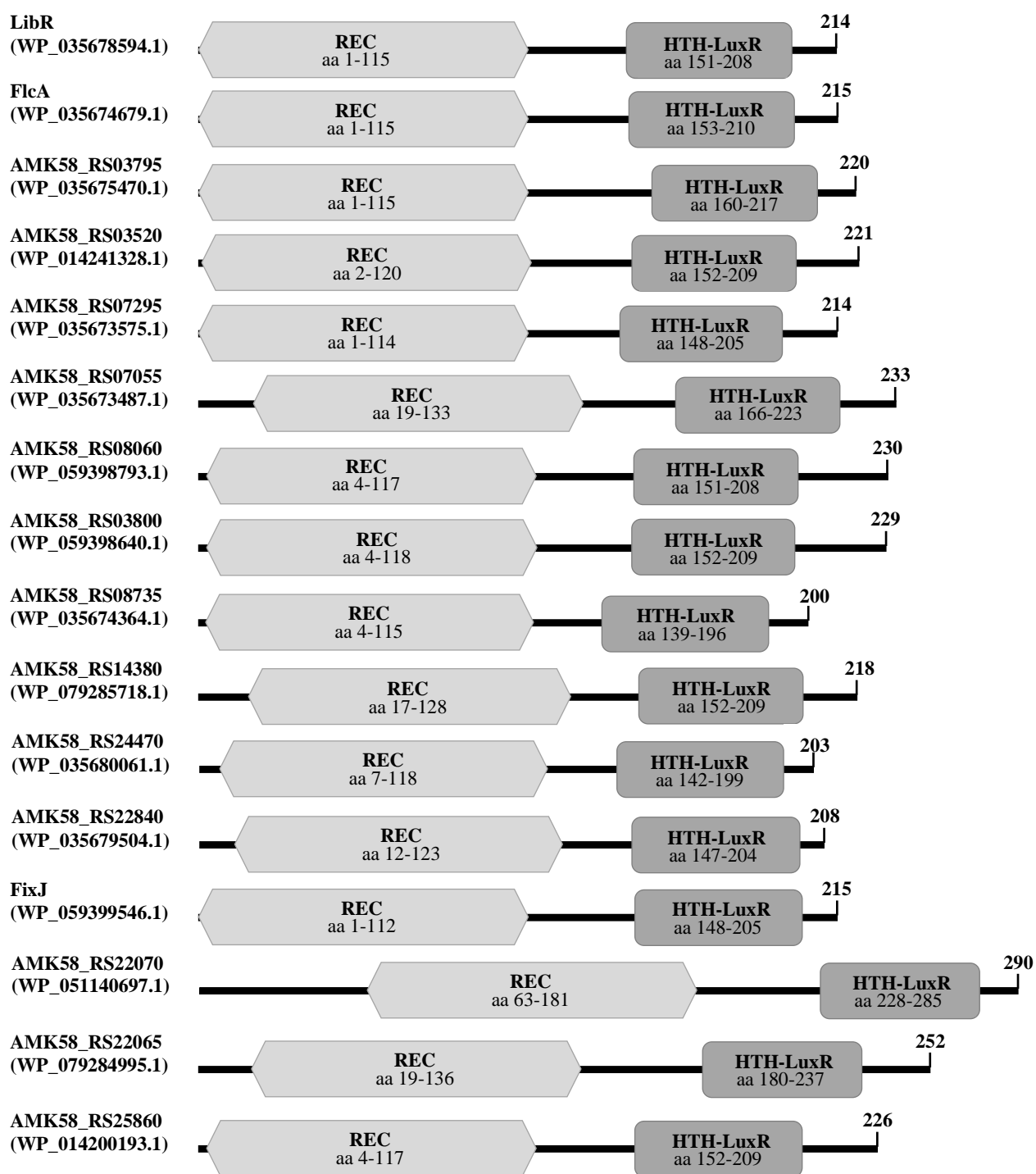
**Figura C1.** Cinética de crecimiento de las cepas Sp7, 2112, 2116 y 2117 en medio mínimo con malato como fuente de carbono. Las cepas se crecieron en MMAB con 37 mM de malato como se describió en material y métodos. El crecimiento fue monitoreado midiendo la  $DO_{600}$  del cultivo cada dos h durante un periodo de 32 h. Los datos corresponden a la media de los valores de dos ensayos independientes con tres réplicas biológicas y las barras de error representan la desviación estándar.

**Figura C2.** Relación sinténica de genes homólogos a *libR* en bacterias del género *Azospirillum* con respecto a *A. brasilense* Sp7



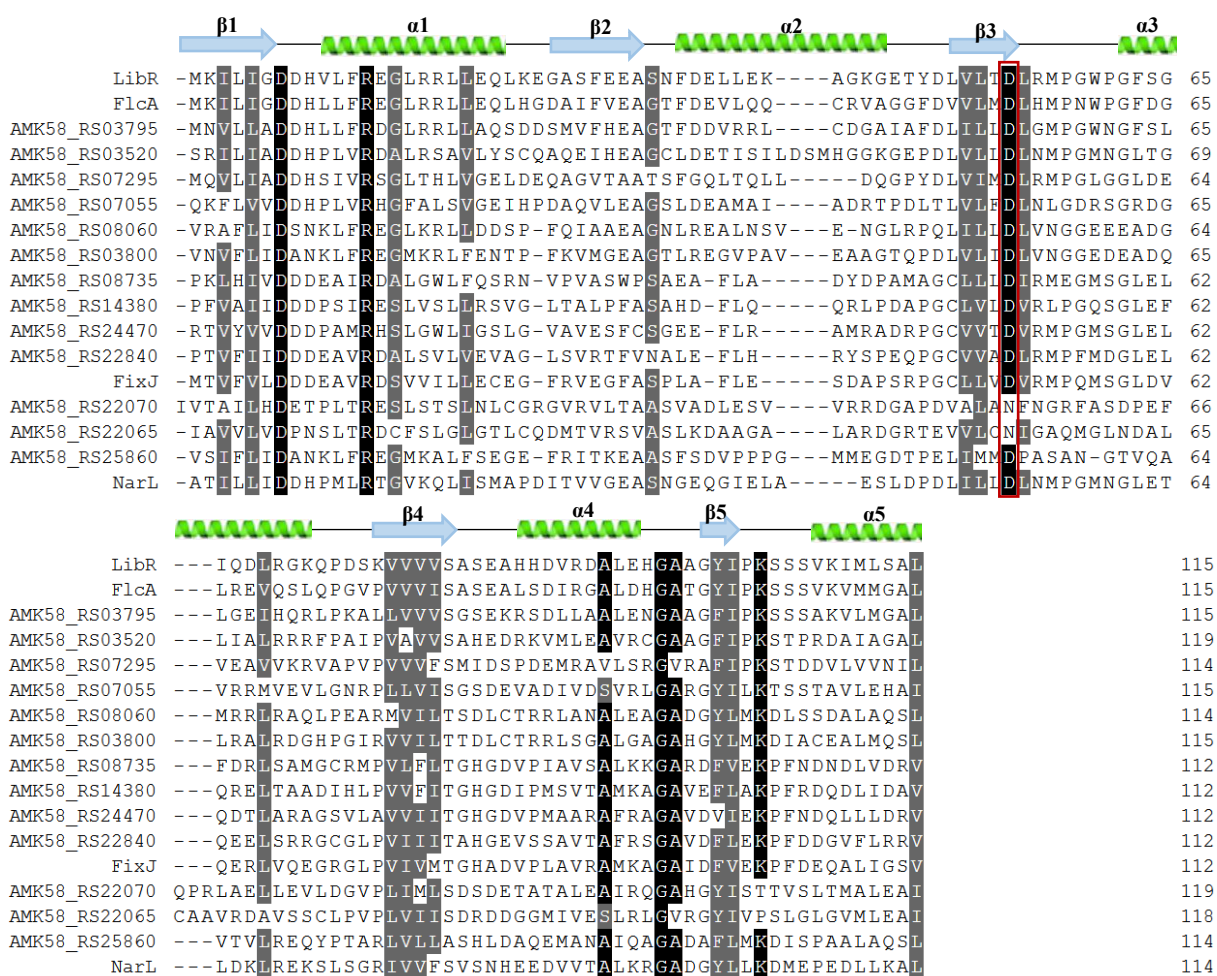
**Figura C2.** Relación sinténica de genes homólogos a *libR* en bacterias del género *Azospirillum* con respecto a *A. brasilense* Sp7. Representación esquemática que muestra la sintenia de *libR* (representado con una flecha roja) en bacterias del género *Azospirillum*. La secuencia de nucleótidos de *libR* de *A. brasilense* Sp7 se utilizó para realizar la búsqueda de genes homólogos en el genoma de cepas de *Azospirillum* spp. utilizando el servidor BLAST. En la parte inferior se indica el producto de cada uno de los genes que se encuentran en el mismo cluster que *libR*. Los genes representados con flechas del mismo color son aquellos que son homólogos unos con otros.

**Figura C3.** LibR y proteínas homólogas de la familia LuxR con dominios REC-HTH encontradas en el genoma de *A. brasilense* Sp7



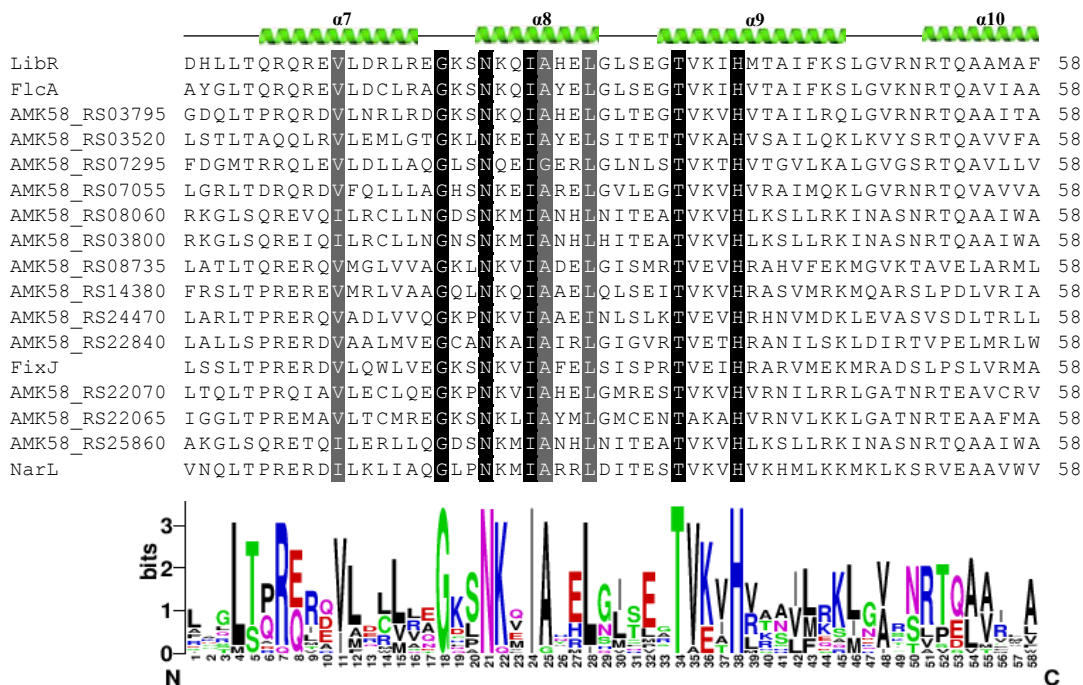
**Figura C3.** LibR y proteínas homólogas de la familia LuxR con dominios REC-HTH localizadas en el genoma de *A. brasilense* Sp7. La predicción de los dominios de cada proteína se realizó con el servidor SMART. Se indica la longitud en aminoácidos de cada dominio y la longitud de la secuencia completa de cada proteína, así como sus respectivos números de acceso en NCBI.

**Figura C4.** Alineamiento múltiple del dominio REC de LibR con el dominio REC de proteínas homólogas encontradas en el genoma de *A. brasilense* Sp7



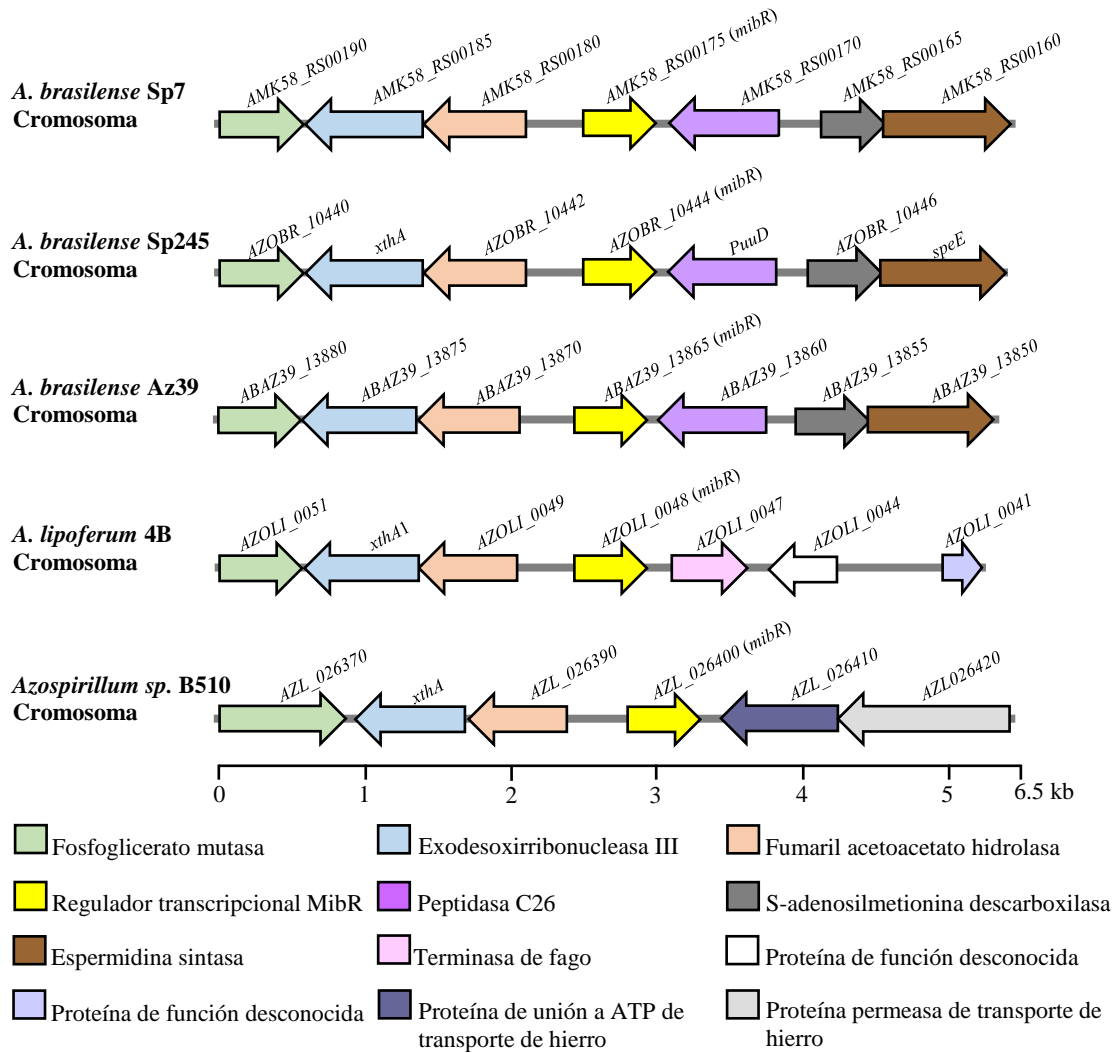
**Figura C4.** Alineamiento múltiple del dominio REC de LibR con el dominio REC de proteínas homólogas localizadas en el genoma de *A. brasilense* Sp7. Las secuencias mostradas en el alineamiento corresponden a las secuencias de aminoácidos del dominio REC de LibR (número de acceso en GenBank WP\_035678594.1), de FlcA (WP\_035674679.1), de AMK58\_RS03795 (WP\_035675470.1), de AMK58\_RS03520 (WP\_014241328.1), de AMK58\_RS07295 (WP\_035673575.1), de AMK58\_RS07055 (WP\_035673487.1), de AMK58\_RS08060 (WP\_059398793.1), de AMK58\_RS03800 (WP\_059398640.1), de AMK58\_RS08735 (WP\_035674364.1), de AMK58\_RS14380 (WP\_079285718.1), de AMK58\_RS24470 (WP\_035680061.1), de AMK58\_RS22840 (WP\_035679504.1), de FixJ (WP\_059399546.1), de AMK58\_RS22070 (WP\_051140697.1), de AMK58\_RS22065 (WP\_079284995.1) y de NarL (WP\_014200193.1). 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 (<http://www.bioinformatics.org/sms/index.html>). La predicción de la estructura secundaria se realizó con Phyre<sup>2</sup>. Las hélices verdes representan las  $\alpha$  hélices y las flechas azules las hojas  $\beta$  plegadas.

**Figura C5.** Alineamiento múltiple del dominio HTH de LibR con el dominio HTH de proteínas homólogas localizadas en el genoma de *A. brasilense* Sp7



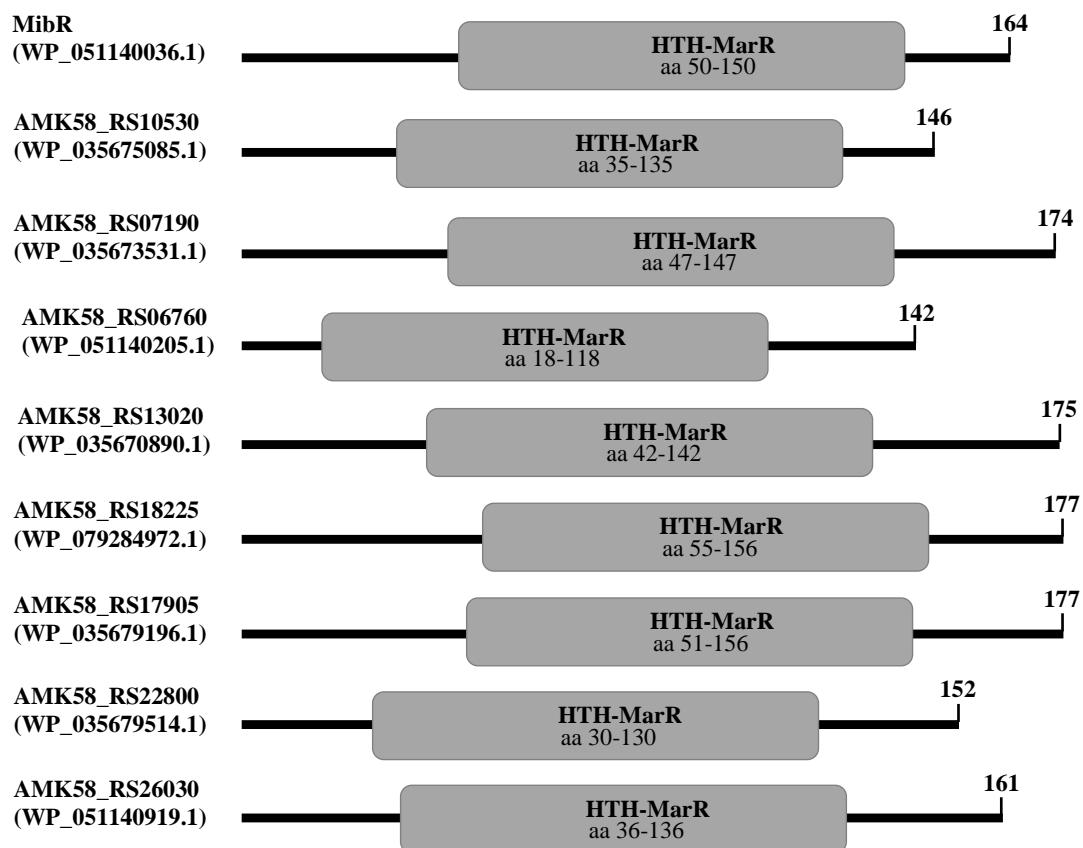
**Figura C5.** Alineamiento múltiple del dominio HTH de LibR con el dominio HTH de proteínas homólogas encontradas en el genoma de *A. brasilense* Sp7. Las secuencias mostradas en el alineamiento corresponden a las secuencias de aminoácidos del dominio HTH de LibR (número de acceso en GenBank WP\_035678594.1), de FlcA (WP\_035674679.1), de AMK58\_RS03795 (WP\_035675470.1), de AMK58\_RS03520 (WP\_014241328.1), de AMK58\_RS07295 (WP\_035673575.1), de AMK58\_RS07055 (WP\_035673487.1), de AMK58\_RS08060 (WP\_059398793.1), de AMK58\_RS03800 (WP\_059398640.1), de AMK58\_RS08735 (WP\_035674364.1), de AMK58\_RS14380 (WP\_079285718.1), de AMK58\_RS24470 (WP\_035680061.1), de AMK58\_RS22840 (WP\_035679504.1), de FixJ (WP\_059399546.1), de AMK58\_RS22070 (WP\_051140697.1), de AMK58\_RS22065 (WP\_079284995.1) y de NarL (WP\_014200193.1). 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 (<http://www.bioinformatics.org/sms/index.html>). La predicción de la estructura secundaria se realizó con Phyre<sup>2</sup>. Las hélices verdes representan las  $\alpha$  hélices. En la parte inferior se muestra el diagrama weblogo (Crooks *et al.*, 2004) que indica la prevalencia de aminoácidos en posiciones específicas y están coloreados de acuerdo a sus características fisicoquímicas.

**Figura C6.** Relación sinténica de genes homólogos a *mibR* en bacterias del género *Azospirillum* con respecto a *A. brasilense* Sp7.



**Figura C6.** Relación sinténica de genes homólogos a *mibR* en bacterias del género *Azospirillum* con respecto a *A. brasilense* Sp7. Representación esquemática que muestra la sintenia de *mibR* (representado con una flecha amarilla) en bacterias del género *Azospirillum*. La secuencia de nucleótidos de *libR* de *A. brasilense* Sp7 se utilizó para realizar la búsqueda de genes homólogos en el genoma de cepas de *Azospirillum* spp. utilizando el servidor BLAST. En la parte inferior se indica el producto de cada uno de los genes que se encuentran en el mismo cluster que *mibR*. Los genes representados con flechas del mismo color son aquellos que son homólogos unos con otros.

**Figura C7.** MibR y proteínas homólogas de la familia MarR encontradas en el genoma de *A. brasilense* Sp7



**Figura C7.** MibR y proteínas homólogas de la familia MarR encontradas en el genoma de *A. brasilense* Sp7. La predicción de los dominios de cada proteína se realizó con el servidor SMART. Se indica la longitud en aminoácidos del dominio HTH y la longitud de la secuencia completa de cada proteína, así como sus respectivos números de acceso en NCBI.

**Figura C8.** Alineamiento múltiple del dominio HTH de MibR con el dominio HTH de proteínas homólogas encontradas en el genoma de *A. brasilense* Sp7

```

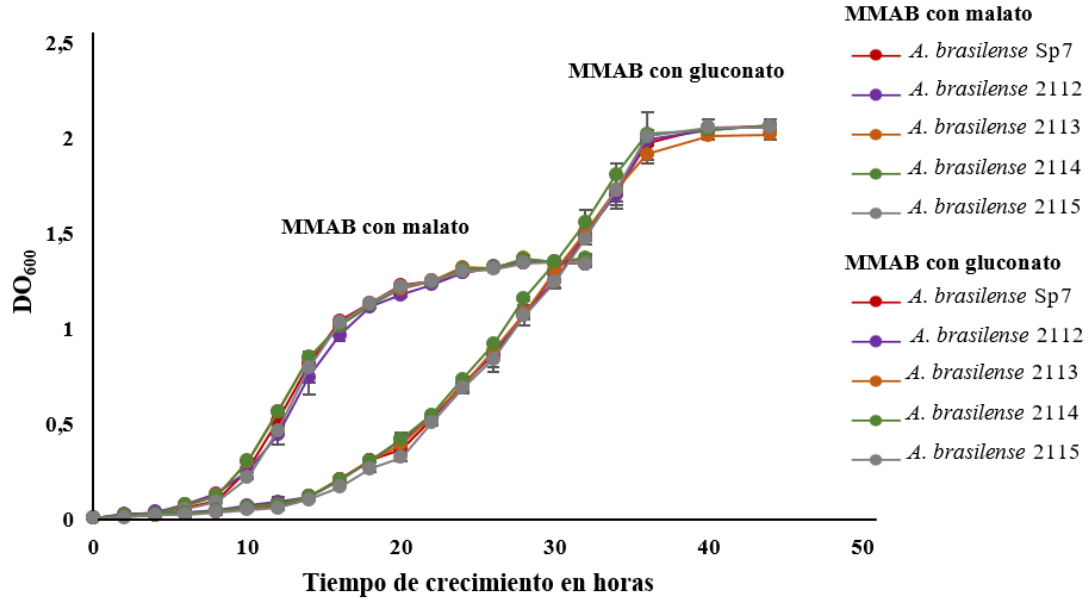
MibR      NAVSPHDMTPGQFGVLMIK-ENEGTSSQSDLGSAVGIDRSMTVAVIDRLESRGLVIRAPS 59
AMK58_RS10530 DMIGDSQLTPTQWGALVTLR-TERSTLSQNQLGRLTFMDPATTTQGVILRLVERNLVERQPD 59
AMK58_RS07190 IRIVDHGVSVMGQWYFLRALW-EEDGTTQRELSQRVGMMEPTTVTALNNLERCDLVQRVRN 59
AMK58_RS06760 LDDARLGLTAGEARALVYVC-RHPGSRQSVLATHMWVEPMTLVGFLLDRLEARGLVVREPD 59
AMK58_RS13020 LYEKRFGITIPERWVTAVLG-GGETLSAGETAQRTAMDKVQVSRAISRMLDSGLILRESG 59
AMK58_RS18225 RLRDEFSTTQPRFDLCLLDRQPEGITMGE LSKRMMVTNGNVTGIVERLCADGLVTRAAA 60
AMK58_RS17905 SRIGIDDISPVQVMMLLNIS--NGEISVRDLIERGYLGSNASYNLKQLVDSGYVDRSAS 58
AMK58_RS22800 AKLAGRGVTVAEWVVLRLDLY-GQDGMAPSLADRLGMTRGAISKLADRLAAKGLLTQTAD 59
AMK58_RS26030 EECAEFNMTVPQYSVLTALV-DRPDL DQVTLGAQIGIDRTTTAGVLARLARLAERGLIQRAS 59
PcaV      NTMVSEETTSPOYAVLNALV-AEPGLDQRTVGERVGLDRSTIAEVVSRLLGRRGLLDKVRD 59

MibR      PNDRRSYALRLSPEGEKLLDELIPRIQAHDKAMVKDLSAEEQ----- 101
AMK58_RS10530 PQDRRRTSVSLTRAGQSLVSTLENATRAHHRTLDPLTPEEQ----- 101
AMK58_RS07190 PYDRRKVNIYLTTPK GKALRADLTPNVEEIEEAATQGIAPSEL----- 101
AMK58_RS06760 PADRRRAKIVQPTPQAEPLALQVLEAFRNERESAMADLSAEEI----- 101
AMK58_RS13020 ATDRRKAQLTLTPKALAIYTEIVPLALAYERELTGALTEEEM----- 101
AMK58_RS18225 SNDRRMQFVRITPEGSALAQATAAAQRRWLAEELTAGMPHGDV----- 102
AMK58_RS17905 PRDKRAARLKLSPRGLELCERTRHMASVHSDGLIRTEGDSQDFEVTYR 106
AMK58_RS22800 PDDRRYQTLALTPEGRALVPDLSALADRNDAEFFGHIDPAER----- 101
AMK58_RS26030 PVDKRMKLAATTAEGRKLRRMDKKAQRAHDRTIAPLPKEDR----- 101
PcaV      PQDGRSSLRLTDEGLRVHRRLGVR IARMNQVFLAFLAADEQ----- 101

```

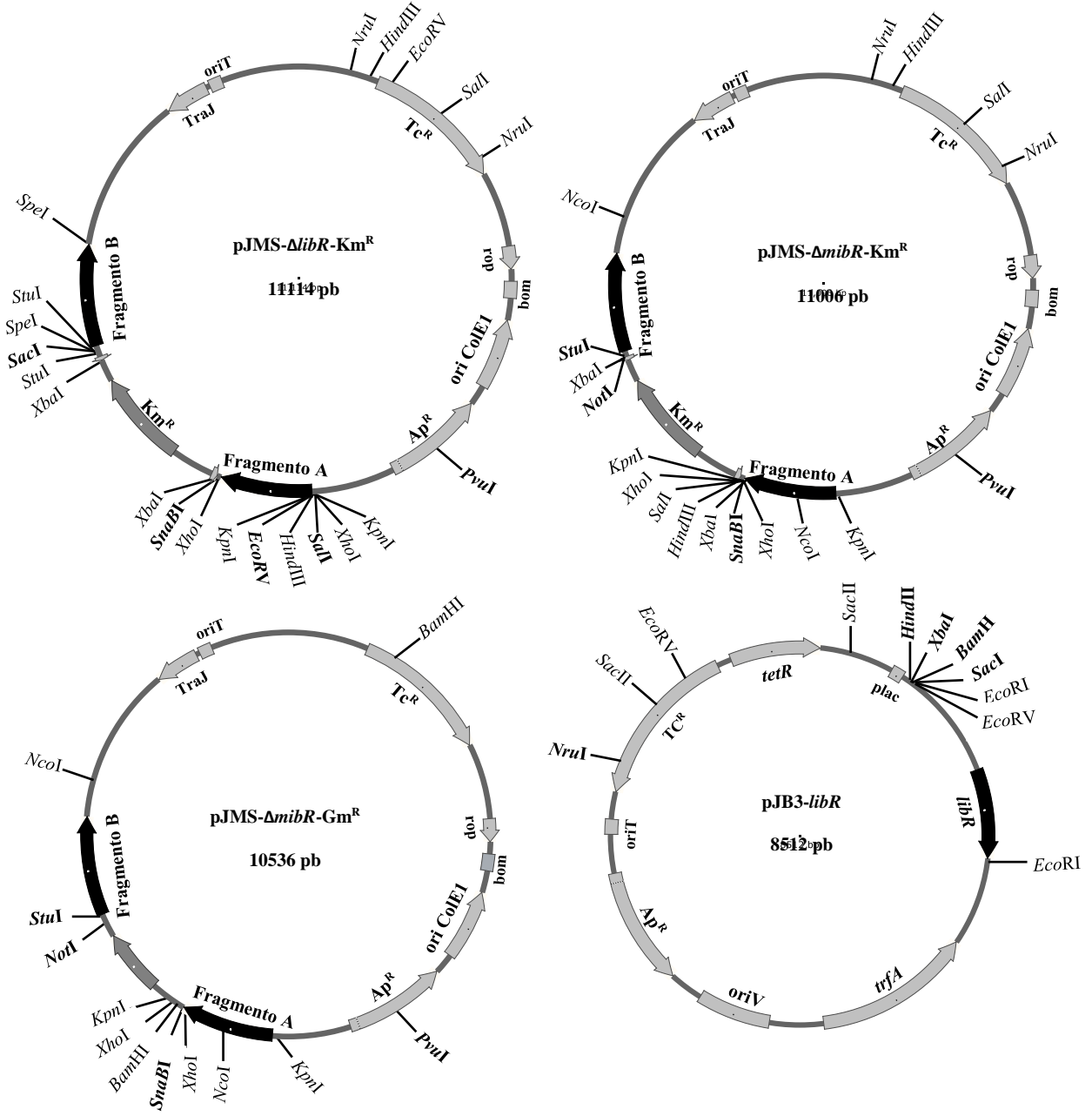
**Figura C8.** Alineamiento múltiple del dominio HTH de MibR con el dominio HTH de proteínas homólogas encontradas en el genoma de *A. brasilense* Sp7. Las secuencias mostradas en el alineamiento corresponden a las secuencias de aminoácidos del dominio HTH de MibR (número de acceso en GenBank WP\_051140036.1), de AMK58\_RS10530 (WP\_035675085.1), de AMK58\_RS07190 (WP\_035673531.1), de AMK58\_RS06760 (WP\_051140205.1), de AMK58\_RS13020 (WP\_035670890.1), de AMK58\_RS18225 (WP\_079284972.1), de AMK58\_RS17905 (WP\_035679196.1), de AMK58\_RS22800 (WP\_035679514.1), de AMK58\_RS26030 (WP\_051140919.1) y de PcaV de *Streptomyces coelicolor* A3 (NP\_630777.1). 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 (<http://www.bioinformatics.org/sms/index.html>).

**Figura C9.** Cinética de crecimiento de cepas de *A. brasilense* en medio mínimo con malato o con gluconato



**Figura C9.** Cinética de crecimiento de las cepas Sp7, 2112, 2113, 2114 y 2115 en medio mínimo con malato o con gluconato como fuente de carbono. Las cepas se crecieron en MMAB con 37 mM de malato o con 37 mM de gluconato como se describió en material y métodos. El crecimiento fue monitoreado midiendo la DO<sub>600</sub> del cultivo cada dos h durante un periodo de 32 h. Los datos corresponden a la media de los valores de dos ensayos independientes y tres réplicas biológicas y las barras de error representan la desviación estándar.

**Figura C10.** Plásmidos construídos en este trabajo



Plásmidos construídos en este trabajo (continuación)

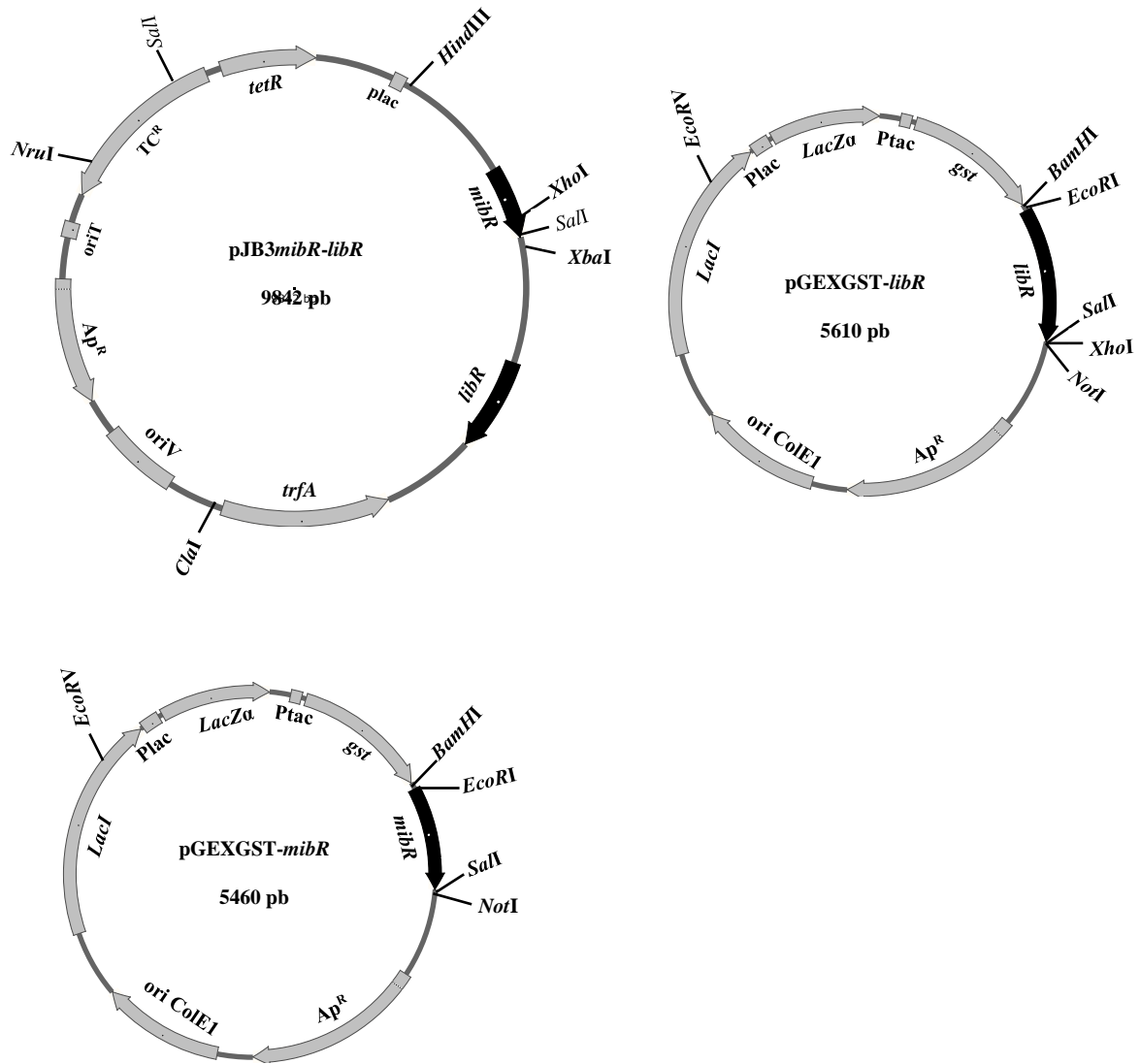
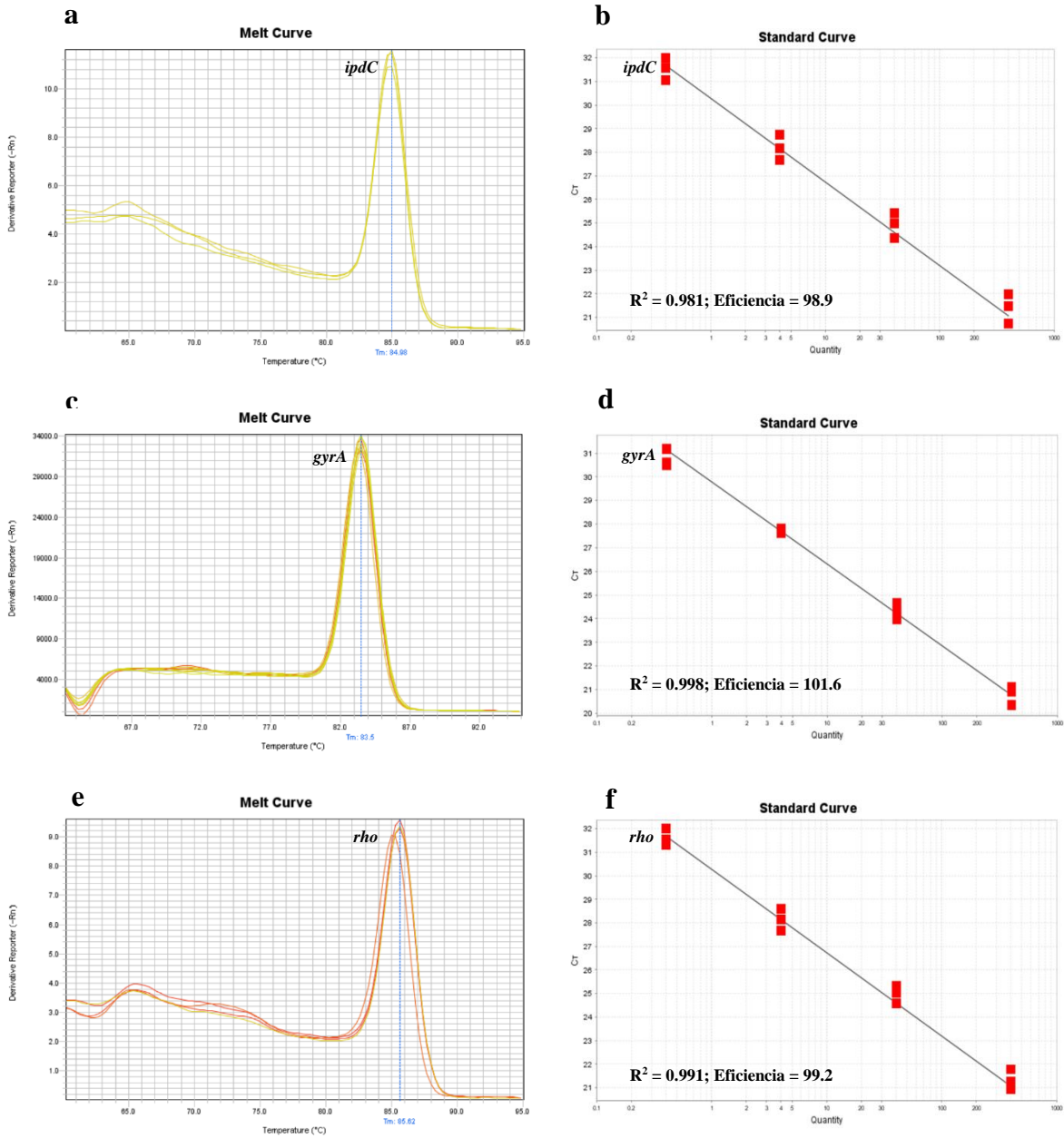


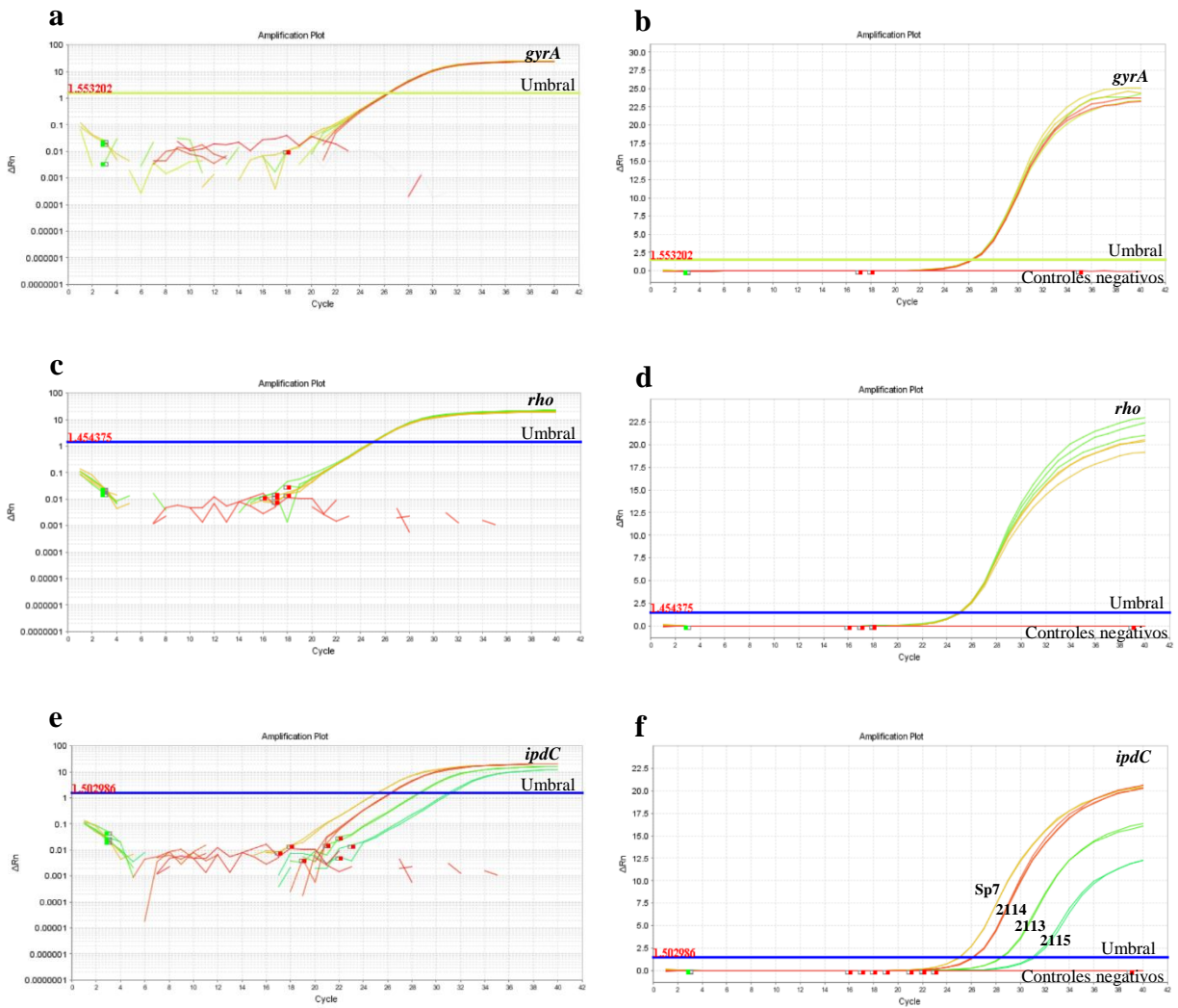
Figura C10. Plásmidos construídos en este trabajo. Se indican los sitios de restricción para las enzimas utilizadas con mayor frecuencia. Los sitios únicos de restricción se indican en negritas.

**Figura C11.** Curvas de disociación y determinación de la eficiencia de amplificación de *ipdC*, *gyrA* y *rho* por RT-qPCR.



**Figura C11. Curvas de disociación y determinación de la eficiencia de amplificación de *ipdC*, *gyrA* y *rho* por RT-qPCR.** (a) Curva de disociación de *ipdC*. (b) Determinación del coeficiente de determinación ( $R^2$ ) y eficiencia de amplificación de *ipdC*. (c) Curva de disociación de *gyrA*. (d) Determinación del coeficiente de determinación y eficiencia de amplificación de *gyrA*. (e) Curva de disociación de *rho*. (f) Determinación del coeficiente de determinación y eficiencia de amplificación de *rho*. Las reacciones para la RT-qPCR se realizaron por triplicado utilizando DNA genómico de *A. brasilense* Sp7. Para la determinación del coeficiente de determinación y eficiencia de amplificación agregaron 400, 40, 4 y 0.04 ng de DNA genómico por cada reacción de PCR (4 diluciones seriadas por triplicado) como se indicó en material y métodos.

**Figura C12.** Gráficas de amplificación de *ipdC*, *gyrA* y *rho* obtenidas por RT-qPCR.



**Figura C12.** Gráficas de amplificación de *ipdC*, *gyrA* y *rho* obtenidas por RT-qPCR. (a) Gráfica de amplificación logarítmica de *gyrA* de las cepas Sp7, 2113, 2114 y 2115. (b) Gráfica de amplificación lineal de *gyrA* de las cepas Sp7, 2113, 2114 y 2115. (c) Gráfica de amplificación logarítmica de *rho* de las cepas Sp7, 2113, 2114 y 2115. (d) Gráfica de amplificación lineal de *rho* de las cepas Sp7, 2113, 2114 y 2115. (e) Gráfica de amplificación logarítmica de *ipdC* de las cepas Sp7, 2113, 2114 y 2115. (f) Gráfica de amplificación lineal de *ipdC* de las cepas Sp7, 2113, 2114 y 2115. Las reacciones para la RT-qPCR se realizaron por triplicado utilizando cDNA de las cepas indicadas como se indicó en material y métodos.

## 11.2 Tablas complementarias

**Tabla C1.** Medios de cultivo bacteriano utilizados en este trabajo

MEDIO DE CULTIVO	COMPONENTE	CANTIDAD POR LITRO	PREPARACIÓN
LB	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Peptona de caseína</li> <li>2. Extracto de levadura</li> <li>3. Cloruro de sodio</li> </ol>	<p>10 g 5 g 10 g</p>	Disolver poco a poco todos los componentes en 960 ml de agua bidestilada, ajustar a un pH de 7.0 con NaOH 1 N, aforar a 1 litro con agua bidestilada y esterilizar a 15 lb por 20 minutos. Almacenar a 4°C.
LB modificado	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Peptona de caseína</li> <li>2. Extracto de levadura</li> <li>3. Cloruro de sodio</li> <li>4. Cloruro de calcio</li> <li>5. Sulfato de magnesio</li> </ol>	<p>10 g 5 g 5 g 0.367 g 0.616 g</p>	Disolver poco a poco todos los componentes en 960 ml de agua bidestilada, ajustar a un pH de 7.0 con NaOH 1 N, aforar a 1 litro con agua bidestilada y esterilizar a 15 lb por 20 minutos. Almacenar a 4°C.
SOC	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Peptona de caseína</li> <li>2. Extracto de levadura</li> <li>3. Glucosa</li> <li>4. Cloruro de sodio</li> <li>5. Cloruro de potasio</li> <li>6. Cloruro de magnesio</li> </ol>	<p>20 g 5 g 20 mM 10 mM 2.5 mM 10 mM</p>	Disolver poco a poco todos los componentes en 960 ml de agua bidestilada, ajustar a un pH de 7.0 con NaOH 1 N, aforar a 1 litro con agua bidestilada y esterilizar a 5 lb por 30 minutos. Almacenar a 4°C.
MMAB con malato	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Ácido málico</li> <li>2. Fosfato de potasio monobásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)</li> <li>3. Fosfato de potasio dibásico (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)</li> <li>4. Sulfato de magnesio heptahidratado (MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O)</li> <li>5. Cloruro de sodio (NaCl)</li> <li>6. Hidróxido de potasio (KOH)</li> <li>7. Cloruro de calcio dihidratado (CaCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O)</li> <li>8. Cloruro férrico (FeCl<sub>3</sub>)</li> <li>9. Molibdato de sodio dihidratado (NaMoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O)</li> <li>10. Cloruro de amonio (NH<sub>4</sub>Cl)</li> <li>11. Sulfato de manganeso (MnSO<sub>4</sub>)</li> <li>12. Ácido bórico (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>)</li> <li>13. Sulfato de cobre pentahidratado (CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O)</li> <li>14. Sulfato de cobalto heptahidratado (CoSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O)</li> <li>15. Sulfato de zinc heptahidratado (ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O)</li> </ol>	<p>5 g 0.87 g 1.67 g 0.2 g 0.1 g 4.0 g 0.02 g 0.01 g 2.0 mg 1.0 g 2.1 mg 2.8 mg 0.04 mg 0.04 mg 0.24 mg</p>	Preparar el componente 7 en solución al 2%, el componente 8 al 1%, el componente 9 al 0.2% y el componente 10 al 20% (todos de manera separada en agua bidestilada) y por otro lado, preparar una solución de oligoelementos concentrada 100 veces (100X) disolviendo cada uno de los componentes 11-15 (todos en una misma solución 100 veces más de la cantidad especificada por litro de medio) y esterilizar todas las soluciones a 5 lb por 30 minutos. Por otro lado, disolver los componentes 1-6 (medio base) en 970 ml de agua bidestilada, ajustar a un pH de 6.8 con KOH al 10%, aforar a 991 ml con agua bidestilada y esterilizar a 5 lb por 30 minutos. Dejar enfriar el medio base a temperatura ambiente y, en condiciones de esterilidad, agregar 1 ml de cada una de las soluciones de los componentes 7, 8, 9 y de la solución de oligoelementos y 5 ml de la solución del componente 10. Almacenar a 4°C.
MMAB con gluconato	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Ácido glucónico</li> <li>2. Fosfato de potasio monobásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)</li> <li>3. Fosfato de potasio dibásico (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)</li> <li>4. Sulfato de magnesio heptahidratado (MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O)</li> <li>5. Cloruro de sodio (NaCl)</li> <li>6. Cloruro de calcio dihidratado (CaCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O)</li> <li>7. Cloruro férrico (FeCl<sub>3</sub>)</li> <li>8. Molibdato de sodio dihidratado (NaMoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O)</li> <li>9. Cloruro de amonio (NH<sub>4</sub>Cl)</li> <li>10. Sulfato de manganeso (MnSO<sub>4</sub>)</li> <li>11. Ácido bórico (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>)</li> <li>12. Sulfato de cobre pentahidratado (CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O)</li> <li>13. Sulfato de cobalto heptahidratado (CoSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O)</li> <li>14. Sulfato de zinc heptahidratado (ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O)</li> </ol>	<p>8.18 g 0.87 g 1.67 g 0.2 g 0.1 g 0.02 g 0.01 g 2.0 mg 1.0 g 2.1 mg 2.8 mg 0.04 mg 0.04 mg 0.24 mg</p>	Preparar el componente 6 en solución al 2%, el componente 7 al 1%, el componente 8 al 0.2% y el componente 9 al 20% (todos de manera separada en agua bidestilada) y por otro lado, preparar una solución de oligoelementos concentrada 100 veces (100X) disolviendo cada uno de los componentes 10-14 (todos en una misma solución 100 veces más de la cantidad especificada por litro de medio) y esterilizar todas las soluciones a 5 lb por 30 minutos. Por otro lado, disolver los componentes 1-5 (medio base) en 970 ml de agua bidestilada, ajustar a un pH de 6.8 con KOH al 10%, aforar a 991 ml con agua bidestilada y esterilizar a 5 lb por 30 minutos. Dejar enfriar el medio base a temperatura ambiente y, en condiciones de esterilidad, agregar 1 ml de cada una de las soluciones de los componentes 6, 7, 8 y de la solución de oligoelementos y 5 ml de la solución del componente 9. Almacenar a 4°C.

**Tabla C2.** Reactivos y soluciones utilizadas para la cromatografía de afinidad a DNA

TÉCNICA	REACTIVO O SOLUCIÓN	FÓRMULA	PREPARACIÓN
Cromatografía de afinidad a DNA	Buffer TN	Tris-HCl 50 mM, pH 7.5 NaCl 50 mM	<b>Para 100 ml:</b> disolver 0.6057 g de Tris y 0,292 g de NaCl en 95 ml de agua bidestilada, ajustar a pH 7.5 con HCl y aforar a 100 ml. Esterilizar a 15 lb por 20 minutos.
	Buffer TE	Tris-HCl 10 mM, pH 7.5 EDTA 1 mM	<b>Para 50 ml:</b> disolver 0.06057 g de Tris y 0.01861 g de EDTA en 45 ml de agua bidestilada, ajustar a pH 7.5 con HCl y aforar a 50 ml con agua. Esterilizar a 15 libras por 20 minutos. Almacenar a temperatura ambiente.
	Buffer de sonicación	Tris-HCl 10 mM, pH 7.5 EDTA 1 mM NaCl 100 mM Triton X-100 0.05% (v/v) Dietiotreitol (DTT) 1 mM MgCl <sub>2</sub> 10 mM Glicerol 10% Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 0.5 mM Lisozima 2 mg/ml	<b>Para 50 ml:</b> pesar 0.06057 g de Tris, 0.01861 g de EDTA, 0.292 g de NaCl, 0.00771 g de dietiotreitol (DTT), 0,0476 de MgCl <sub>2</sub> . Disolver los componentes en 40 ml de agua bidestilada, agregar 5 ml de glicerol puro y 25 µl de Triton X-100, ajustar el pH a 7.5 con HCl 1 N, aforar la solución a 50 ml y esterilizar con un filtro con tamaño de poro de 0.4 µm. Al momento del ensayo tomar 4 ml del buffer y agregar 20 µl de una solución stock de 100 mM de PMSF (disuelto en isopropanol) y 0.008 g de lisozima.
	Buffer de unión/lavado	Tris-HCl 10 mM, pH 7.5 NaCl 100 mM EDTA 1 mM Triton X-100 0.05% (v/v) Dietiotreitol (DTT) 1 mM MgCl <sub>2</sub> 10 mM Glicerol 10% PMSF 0.5 mM	Este buffer es el mismo que el buffer de lisis pero sin lisozima. Tomar una alícuota del buffer de lisis sin lisozima para el ensayo.
	Buffer de lavado 2x B/W	Tris HCl 10 mM, pH 7.5 EDTA 1 mM NaCl 2 M Triton X-100 0.05%	<b>Para 25 ml:</b> disolver 0.0302 g de Tris, 0.0093 g de EDTA y 2.92 g de NaCl en 20 ml de agua bidestilada, agregar 12.5 µl de Triton X-100 ajustar a pH 7.5 con HCl y aforar a 25 ml. Esterilizar a 15 libras por 20 minutos. Almacenar a temperatura ambiente.
	Buffer de elusión	Tris HCl 25 mM, pH 7.5 EDTA 1 mM Triton X-100 0.05% NaCl: 200 mM, 350 mM, 500 mM, 700 mM y 1 M	<b>Para 25 ml:</b> disolver 0.0757 g de Tris, 0.0093 g de EDTA en 20 ml de agua bidestilada, agregar 12.5 µl de Triton X-100 ajustar a pH 7.5 con HCl y aforar a 25 ml. Esterilizar a 15 libras por 20 minutos. Tomar 1 ml del buffer para preparar cada una de los buffers de elusión y agregar 0.01168 g de NaCl para el de 200 mM, 0,02044 g para el de 350 mM, 0,0292 g para el de 500 mM, 0,0408 g para el de 700 mM y 0.0584 g de NaCl para el de 1 M. Almacenar a temperatura ambiente.
	Poly dI-dC	Poly(deoxyinosinic-deoxycytidylic) acid sodium salt	La presentación del Poly dI-dC es en forma de una pequeña cápsula algodonosa de la que se puede tomar un pequeño fragmento y colocarlo en un tubo Eppendorf de 1.5 ml. Agregar 1 ml de un buffer que contiene 20 mM de fosfato de sodio y 100 mM de cloruro de sodio, pH 7.0. Homogenizar y determinar la concentración en ng/µl de la misma forma en que se determina la concentración de muestras de DNA (DO <sub>260</sub> ).

**Tabla C3.** Reactivos y soluciones utilizadas para la purificación de RNA de bacterias

TÉCNICA	REACTIVO O SOLUCIÓN	FÓRMULA	PREPARACIÓN
Purificación de RNA de bacterias	Buffer TE	Tris-HCl 10 mM pH 8; EDTA 1 mM	<b>Para 50 ml:</b> disolver 0.06057 g de Tris y 0.01861 g de EDTA en 45 ml de agua bidestilada, ajustar a pH 8.0 con HCl y aforar a 50 ml. Esterilizar a 15 libras por 20 minutos. Almacenar a temperatura ambiente.
	SDS 10%	SDS 10%	<b>Para 20 ml:</b> (NOTA: utilizar máscara o cubre boca para pesar). Disolver poco a poco 2 g de SDS en 15 ml de agua bidestilada, aforar a 20 ml y esterilizar a 15 lb por 20 minutos. Almacenar a temperatura ambiente.
	Buffer de cetiltrimetil amonio (CTAB)	Bromuro de Cetiltrimetilamonio (CTAB) 2%, NaCl 2 M.	<b>Para 20 ml:</b> Disolver poco a poco 2,336 g de NaCl en 15 ml de agua bidestilada, colocar la solución en baño María a 65°C. Agitar con bala magnética y agregar poco a poco 0.4 g de CTAB hasta disolver completamente. Ajustar el volumen a 20 ml con agua bidestilada. Esterilizar a 15 lb durante 20 min. Almacenar a temperatura ambiente.
	Fenol puro en buffer Tris-HCl	Fenol puro; Tris-HCl pH 8.0	<b>Para 100 ml:</b> Descongelar el fenol en baño María a 65°C, tomar 20 ml y colocarlo en frasco ámbar (si el fenol está en forma de cristales, pesar 20 g de fenol), agregar 20 ml de agua bidestilada estéril, colocar un agitador magnético y agitar por 2 horas, dejar que se separe la fase orgánica de la fase acuosa (puede llevar 3 horas o más), retirar el agua de la parte superior y agregar 20 ml de buffer Tris-HCl 0.5 M pH 8.0 estéril, agitar por 2 horas, dejar que se separen las fases, retirar el buffer de la parte superior y agregar 20 ml de buffer Tris-HCl 0.1 M pH 8.0 estéril, agitar por 2 horas (no retirar el buffer) y almacenar a 4°C protegido de la luz.
	Cloroformo:alcohol isoamílico (24:1)	Cloroformo 24 ml; alcohol isoamílico 1 ml	<b>Para 25 ml:</b> con una probeta medir 24 ml de cloroformo puro y agregar 1 ml de alcohol isoamílico. Almacenar a temperatura ambiente.
	Solución de lisozima	Lisozima 5 mg/ml	<b>Para 1 ml:</b> Preparar al momento del ensayo: pesar 0.005 g de lisozima en un tubo Eppendorf estéril, agregar 1 ml de buffer TE y homogenizar con vórtex.
	Agua de PC (para limpiar material)	Agua bidestilada, dietilpirocarbonato (DEPC) al 0.1%	<b>Para 500 ml:</b> A 499.5 ml de agua bidestilada esteril agregar 0.5 ml de dietilpirocarbonato (DEPC), homogenizar durante 2 horas a 37°C y almacenar a temperatura ambiente o a 4 °C. Esta solución no debe esterilizarse para mantener el dietilpirocarbonato activo, de esta forma, la solución se puede utilizar para limpiar el material. NOTA: El DEPC no debe combinarse con buffer de tris como el TE o con etanol.
	Agua de PC estéril (para resuspensión de RNA)	Agua mili Q, dietilpirocarbonato (DEPC) al 0.1%	<b>Para 5 ml:</b> agregar 5 µl de dietilpirocarbonato a 4.95 ml de agua mili Q, <b>IMPORTANTE:</b> esterilizar a 15 lb por 20 minutos, almacenar a -20 °C.

**Tabla C4.** Reactivos y soluciones utilizadas para la actividad enzimática de la  $\beta$ -galactosidasa

TÉCNICA	REACTIVO O SOLUCIÓN	FÓRMULA	PREPARACIÓN
Actividad enzimática de la $\beta$ -galactosidasa	Buffer Z	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 60 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 40 mM KCl 10 mM MgSO <sub>4</sub> 1 mM pH 7.0	<b>Para 100 ml:</b> Pesar 0.8517 g de Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> y 0,5519 g de NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0,0745 g de KCl y 0,0246 g de MgSO <sub>4</sub> . Disolver todos los componentes en 90 ml de agua bidestilada, ajustar el pH a 7.0 y aforar a 100 ml. Esterilizar a 15 lb por 20 minutos.
	SDS 0.1 %	SDS 0.1 %	<b>Para 20 ml:</b> disolver 0.02 g de SDS en 15 ml de agua bidestilada, aforar a 20 ml y esterilizar a 15 lb por 20 minutos.
	Solución sustrato	ONPG (O-nitrofenil- $\beta$ -D-galactosido) 8 mg/ml	<b>Para 2 ml:</b> Disolver 0.016 g de ONPG (O-nitrofenil- $\beta$ -D-galactosido) en 2 ml de buffer de fosfatos preincubado a 37 °C y mantener a 37 °C hasta el momento del ensayo. Para disolver el ONPG es necesario homogenizar el tubo constantemente manteniendo la mezcla a 37 °C (NOTA: preparar solo la cantidad que se necesitará en el momento del ensayo).
	Solución de paro	Carbonato de sodio (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ) 1 M	<b>Para 30 ml:</b> Disolver poco a poco 3,179 g de Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> en 25 ml de agua bidestilada, aforar a 30 ml y esterilizar a 15 lb por 20 minutos.

## 12.PUBLICACIONES Y CONGRESOS

### 12.1 Publicaciones:

1. **Jijón-Moreno S, Marcos Jiménez C, Pedraza RO, Ramírez Mata A, de Salomone IG, Fernández-Escavino A, Vásquez Hernández CA, Soto Urzúa L, Baca BE, 2015.** The *ipdC*, *hisC1* and *hisC2* genes involved in indole-3-acetic production used as alternative phylogenetic markers in *Azospirillum brasilense*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2015 107: 1501-1517.
2. **Ramírez-Mata A, López-Lara LI, Xiqui-Vázquez ML, Jijón-Moreno S, Romero-Osorio A, Baca BE.** The cyclic-di-GMP diguanylate cyclase CdgA has a role in biofilm formation and exopolysaccharide production in *Azospirillum brasilense*. *Res Microbiol* 167:190-201.

### 12.2 Congresos:

1. **XXIX Congreso Nacional de Bioquímica**, Oaxaca, Oaxaca, 11-17 de noviembre de 2012.
2. **XV Congreso Nacional de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas**, Xcaret Quintana Roo, 21-25 de octubre de 2013.
3. **V Encuentro Nacional de Ciencias “Luis Rivera Terrazas”** Puebla, Puebla, 1-5 de septiembre de 2014.
4. **VI International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology- BioMicroWorld 2015**, Barcelona, España, 28-30 de octubre de 2015.

## The *ipdC*, *hisC1* and *hisC2* genes involved in indole-3-acetic production used as alternative phylogenetic markers in *Azospirillum brasilense*

Saúl Jijón-Moreno · Cynthia Marcos-Jiménez · Raúl O. Pedraza · Alberto Ramírez-Mata · I. García de Salamone · Ana Fernández-Scavino · Claudia A. Vásquez-Hernández · Lucía Soto-Urzuá · Beatriz E. Baca

Received: 13 January 2015 / Accepted: 29 March 2015 / Published online: 5 April 2015  
© Springer International Publishing Switzerland 2015

**Abstract** Plant growth-promoting bacteria of the genus *Azospirillum* are present in the rhizosphere and as endophytes of many crops. In this research we studied 40 *Azospirillum* strains isolated from different plants and geographic regions. They were first characterized by 16S rDNA restriction analysis, and their phylogenetic position was established by sequencing the genes 16S rDNA, *ipdC*, *hisC1*, and *hisC2*. The latter three genes are involved in the indole-3-pyruvic acid (IPyA) biosynthesis pathway of indole-3-acetic acid (IAA). Furthermore, the suitability of the 16S-23S rDNA intergenic spacer sequence (IGS) for the differentiation of closely related *Azospirillum* taxa and development of PCR protocols allows for specific detection of strains. The IGS-RFLP analysis enabled intraspecies differentiation, particularly of

*Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum* strains. Results demonstrated that the *ipdC*, *hisC1*, and *hisC2* genes are highly conserved in all the assessed *A. brasilense* isolates, suggesting that these genes can be used as an alternative phylogenetic marker. In addition, IAA production determined by HPLC ranged from 0.17 to 98.2  $\mu\text{g mg}^{-1}$  protein. Southern hybridization with the *A. brasilense ipdC* gene probe did not show, a hybridization signal with *A. lipoferum*, *Azospirillum amazonense*, *Azospirillum halopreferans* and *Azospirillum irakense* genomic DNA. This suggests that these species produce IAA by other pathways. Because IAA is mainly synthesized via the IPyA pathway in *A. brasilense* strains, a species that is used worldwide in agriculture, the identification of *ipdC*, *hisC1*, and *hisC2* genes by PCR may be suitable for selecting exploitable strains.

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s10482-015-0444-0) contains supplementary material, which is available to authorized users.

S. Jijón-Moreno · C. Marcos-Jiménez ·  
A. Ramírez-Mata · C. A. Vásquez-Hernández ·  
L. Soto-Urzuá · B. E. Baca (✉)  
Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas,  
Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP),  
72000 Puebla, Puebla, Mexico  
e-mail: beatriz.baca@correo.buap.mx  
URL: <http://orcid.org/0000-0002-4699-7630>

I. G. de Salamone  
Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires,  
Buenos Aires, Argentina

A. Fernández-Scavino  
Facultad de Química Universidad de la República,  
11100 Montevideo, Uruguay

R. O. Pedraza  
Facultad de Agronomía y Zootecnia, Universidad  
Nacional de Tucumán, San Miguel de Tucumán,  
Argentina

**Keywords** *Azospirillum* · Indole-3-acetic acid production · *ipdC*, *hisC1*, *hisC2* · 16S-23SrDNA intergenic spacer region

## Introduction

The term rhizosphere is used to describe the portion of soil in which growth of microorganisms is influenced by the presence of the root system (Hartmann et al. 2008). The interactions between plants and microbes are essential for plant health and growth and should be considered when combining high yields with environmentally friendly farm practices. Interactions in the rhizosphere, which is the part of the soil that is highly influenced by roots, are of central importance (Lugtenberg et al. 2013). The composition, abundance and dynamics of the microbial community in the rhizosphere play an important role and may have a positive or negative influence on plant growth. Microbes are essential for the mobilization of plant nutrients and may produce plant growth hormones that are important for plant development (Lugtenberg et al. 2013). Some microorganisms can act as biocontrol agents and protect plants from phytopathogenic bacteria and fungi (Bashan and de Bashan 2010). One of the most studied bacterial genera that is able to promote the growth of several plants of agronomic importance is *Azospirillum* (Baldani et al. 2014). It is included within the plant growth-promoting bacteria (PGPB) group (Bashan and de Bashan 2010). Added to their value as crop inoculants, the potential benefits of PGPB have been used in environmental applications. *Azospirillum* species enhance bioremediation of wastewater treated with microalgae by increasing proliferation and metabolism of the microalgae; hence increasing the effectiveness of the microalgae to clean wastewater better than when used without PGPB (Pérez-García et al. 2011).

There are different mechanisms by which *Azospirillum* can affect plant growth directly, namely fixing atmospheric nitrogen, synthesizing several phytohormones and enzymes, producing nitric oxide and siderophores, and solubilizing mineral nutrients; or indirectly, such as exerting antimicrobial activity, enhancing membrane activity, and by inducing systemic resistance. *Azospirillum* may exhibit more than one of these mechanisms in the same strain. In

fact, it has been suggested that the simultaneous and cumulative action of several of these mechanisms explain the beneficial effect observed after inoculation with *Azospirillum*-strains, which has resulted in the “additive hypothesis” (Bashan and de Bashan 2010).

Species of this genus are widely distributed in nature, living in soils of tropical, subtropical and temperate regions. This well-studied PGPB is able to produce indole-3-acetic acid (IAA), gibberellins, cytokinins and abscisic acid and can increase mineral uptake, water status, and growth of plants (Baca and Elmerich 2007; Creus et al. 2004; Bashan et al. 2014). Presently, 18 species have been described for the genus *Azospirillum* (Baldani et al. 2014); however, few of them are reported to exert plant growth-promotion, *Azospirillum brasilense* is the species most frequently used as an inoculant to improve plant yield under field conditions.

*A. brasilense* synthesizes IAA from tryptophan (Trp) via three pathways: the indole pyruvic acid (IPyA), the tryptamine and the indole acetonitrile pathways (Carreño-López et al. 2000; Spaepen et al. 2007a, b). The best characterized pathway for the conversion of Trp to IAA is the IPyA pathway, in which Trp is transaminated to IPyA via the aromatic amino acid aminotransferases (AATs), subsequently decarboxylated to indole acetaldehyde, and then oxidized to IAA. Two AATs, namely AAT1 and AAT2 have been characterized (Pedraza et al. 2004). The *hisC1* and *hisC2* genes encoding these enzymes have been identified (Castro-Guerrero et al. 2012). The key enzyme in this pathway is phenyl pyruvate decarboxylase (PPDC), which is encoded by the *ipdC* gene (Spaepen et al. 2007a, b; Carreño-López et al. 2000).

Although the 16S rDNA gene is the most widely used, the 16S-23S rDNA intergenic spacer sequence (IGS) region has received increased attention as a target in molecular detection and identification schemes (García-Martínez et al. 1999). In contrast to rDNA genes, which are remarkably well conserved throughout most bacterial species, the IGS region exhibits a large degree of sequence diversity and length variation (García-Martínez et al. 1999). Even within species, the IGS sequence variation may be very high, thus allowing intraspecies strain differentiation, as shown for *Azospirillum* strains (Baudoin et al. 2010).

Even though significant beneficial effects has been demonstrated by this bacterium in laboratory and greenhouse studies (Bashan et al. 2014), it is necessary to perform additional fundamentally research studies to obtain consistent results in field trails. In this study, we identified the *hisC1*, *hisC2*, and *ipdC* genes and determined IAA production in several *Azospirillum* strains, which were isolated from different geographic locations and plants. We proposed that these procedures are useful as genetic markers for identifying *A. brasilense*, a species worldwide used as an inoculant in agriculture.

## Materials and methods

### Bacterial strains and growth conditions

*A. brasilense* Sp7 (ATCC 29145<sup>T</sup>) and Sp245, *Azospirillum lipoferum* Sp59b (ATCC 29707<sup>T</sup>), *Azospirillum amazonense* Y2 (ATCC 35119<sup>T</sup>), *A. irakense*, and *A. halopraeferens* were used as references strains; *Pseudomonas stutzeri* A1501 and *Sphingomonas* spp. were used as negative control strains. All other strains tested were isolated as *Azospirillum* strains by phenotypic and biochemical studies (Mascarua-Esparza et al. 1988; Díaz-Zorita and Fernández-Canigia 2009; Di Salvo et al. 2014; Garcia de Salamone et al. 1996; Pedraza et al. 2007; Rariz et al. 2013). The strains were grown in D medium (Nutrient broth 8 g L<sup>-1</sup>; BD Difco Franklin Lakes NJ), containing 1.15 mM SO<sub>4</sub>Mg<sub>2</sub>, 0.05 mM MgCl<sub>2</sub>, 13.4 mM KCl, at pH 6.8. Either Red Congo medium or K-malate medium (Castro-Guerrero et al. 2012) was used to identify and maintain the strains, respectively.

### Extraction of DNA and techniques for DNA manipulation

Isolated colonies of *Azospirillum* strains growing in LB\* (Luria Broth supplemented with 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>), were lysed with a thermal cellular technique (Pedraza et al. 2007). The DNA obtained for use in PCR reactions was obtained after cell lysis at 95 °C for 10 min (Ausubel et al. 1995; Pedraza et al. 2007). For a more accurate determination, the genomic DNA was also prepared using standard methods

(Ausubel et al. 1995). PCR for identifying bacteria from 16S rDNA sequences was performed with the universal 16S rDNA primers 27F and 1492R (Doty et al. 2005). The specific primers for the *Azospirillum* genus designed in this research were rRNA-AzoF and rRNA-AzoR. The reaction mixture consisted of 5 µL of template DNA (5–25 ng) and a 24 µL aliquot of a PCR mix, which contained 1 × buffer (Invitrogen, Carlsbad, CA), 1.25 mM dNTPs, 3.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 % DMSO (wt/vol), 250 nM of each primer, and 1 U/25 µL of high-fidelity *Taq* Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA). The PCR conditions are shown in Table 1. The PCR products were purified using a purification kit (QIAquick, Qiagen, Germany) according to the manufacturer's protocol. The products were checked by electrophoresis in 1 % (wt/vol) agarose gel followed by staining with ethidium bromide.

For Southern hybridization experiments, genomic DNA of *A. lipoferum* Sp59b, *A. lipoferum* USA5b, *A. amazonense* Y1, *A. irakense*, and *A. halopraeferens* was digested with *EcoRI* and *BglIII*. The digestion products and an internal *ipdC* 1170 bp fragment, which was used as a probe, were blotted onto Hybond N<sup>+</sup> nylon membranes (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) with a vacuum blotter (Fisher Scientific, Waltham, MA). The DNA was fixed by exposure to a 312 nm transilluminator for 4 min. The pre-hybridization, labeling, purification, and hybridization of the probe were performed as described by Carreño-López et al. (2000).

### Amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA)

To avoid sequencing identical 16S rDNA genes, 5 µL of the PCR products were digested with the restriction endonuclease *AluI* (Invitrogen, Carlsbad, CA), according to the manufacturer's recommendation. The restriction reaction was stopped by thermal inactivation at 65 °C for 30 min. Then, 15 µL of the restriction fragment patterns were then analyzed by 3 % agarose gel electrophoresis at 70 V. Strains with an identical ARDRA pattern were considered members of the same Operational Taxonomic Unit (OTU). Representative strains of each OTU were subjected to 16S rDNA gene sequencing. Both DNA strands were sequenced and analyzed to determine their phylogenetic affiliation with described species.

**Table 1** Primers used in this study

Primer name	Sequence 5'-3'	Target DNA (product length)	PCR conditions	Reference
<i>Eubacterial 16S rDNA</i>				
27F	GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	16S rRNA (1.5 kb)	95 °C 5 min; 95 °C 1 min; 60 °C 1 min; 72 °C 2 min (35 cycles); 72 °C 5 min	Lane, 1991
1492R	CTACGGCTACCTTGTACGA			Lane, 1991
rRNA-AzoF	TGAGAAGGGATGGCAGGGCG	16S rRNA (1.75 kb)	95 °C 5 min; 95 °C 1 min; 72 °C 1 min; 72 °C 2 min (12 cycles); 95 °C 0.5 min; 64 °C 1 min; 72 °C 2 min (22 cycles); 72 °C 5 min	This study
rRNA-AzoR	CCGTGAGAAAGGGATGCGCCG			This study
<i>ipdC A. brasilense</i>				
FipdC1	GAGAAAGTCGCCGGTGTGTCAT	<i>ipdC</i> (1170 bp)	95 °C 5 min; 95 °C 1 min; 67 °C 1 min; 72 °C 1.5 min (35 cycles); 72 °C 5 min	This study
RipdC1	CCGCCAGTGTCCAGGTCAATTG			This study
FipdC2	GAAAGCTGGCCGAAAGCCTTGCTGC	<i>ipdC</i> (1597 bp)	95 °C 5 min; 95 °C 1 min; 68 °C 1 min; 72 °C 2 min (35 cycles); 72 °C 5 min	This study
RipdC2	GACGAAGCGGGCCAGCGTGTC			This study
FRegR-2	GTCCGAAAGACGCCCATC	<i>ipdC</i> (2139 bp)	95 °C 5 min; 95 °C 1 min; 70 °C 1 min; 72 °C 2.5 min (12 cycles); 95 °C 0.5 min; 62 °C 1 min; 72 °C 2.5 min (22 cycles); 72 °C 5 min	This study
iaaCR1	TCATAGACGCCGAGCCCGA			This study
FipdC-int	ACGCAGTTCACAGGTGTTCAA	<i>ipdC</i> (2049 bp)	95 °C 5 min; 95 °C 1 min; 70 °C 1 min; 72 °C 2 min (12 cycles); 95 °C 0.5 min; 62 °C 1 min; 72 °C 2 min (22 cycles); 72 °C 5 min	This study
RiaaC-Stop	TTAGCGGGCCAGCCCCGATC			This study
<i>hisC1 A. brasilense and A. lipoferrum</i>				
FhisC1	GCTGGGACCCGGCAAGAAGG	<i>hisC1</i> (961 bp)	95 °C 5 min; 95 °C 1 min; 66 °C 1 min; 72 °C 1 min (35 cycles); 72 °C 5 min	This study
RhisC1	TCC CAG AGC CGC GAC CAG AG			This study
PhisC1-F	GCGCACAAAGTACCCTGGCCAG	<i>hisC1</i> (582 bp)	95 °C 5 min; 95 °C 1 min; 70 °C 1 min; 72 °C 1 min (12 cycles); 95 °C 1 min; 62 °C 1 min; 72 °C 1 min (22 cycles); 72 °C 5 min	This study
PhisC1-R	CAGCGACAGGTGACCCATGC			This study

Table 1 continued

Primer name	Sequence 5'-3'	Target DNA (product length)	PCR conditions	Reference
hisC1-AzoF	GGTCAAGGAGGTTCTGGACG	<i>hisC1</i> (786 bp)	95 °C 5 min; 95 °C 1 min; 70 °C 1 min; 72 °C 1 min (12 cycles); 95 °C 0.5 min; 62 °C 1 min; 72 °C 1 min (22 cycles); 72 °C 5 min	This study
hisC1-intR	TCGATCATCGCCTCGACATC			This study
hisC1-1-23F	ATGGACCTGCTCAGCCCCCGTCC	<i>hisC1</i> (615 bp)	95 °C 5 min; 95 °C 1 min; 70 °C 1 min; 72 °C 1 min (12 cycles); 95 °C 0.5 min; 62 °C 1 min; 72 °C 1 min (22 cycles); 72 °C 5 min	This study
hisC1-615R	GACGATCTCCGTCCCGTGGCTGTAGT			This study
<i>hisC2 A. brasiliense</i> and <i>A. lipoforum</i>				
FhisC2	CAACCCGACCCGGCACCTACAT	<i>hisC2</i> (573 bp)	95 °C 5 min; 95 °C 1 min; 65 °C 1 min; 72 °C 1 min (35 cycles); 72 °C 5 min	This study
RhisC2	GCCTCCGTGCCGATGGTG			This study
FhisC2-Ab	CGCGCCGTAGGTCTGGTAGG	<i>hisC2</i> (3134 bp)	95 °C 5 min; 95 °C 1 min; 70 °C 1 min; 72 °C 3 min (12 cycles); 95 °C 0.5 min; 62 °C 1 min; 72 °C 3 min (22 cycles); 72 °C 5 min	This study
R720-2	CACATCGTCACCACTTGTC			This study
FhisC2-Ab	CGCGCCGTAGGTCTGGTAGG	<i>hisC2</i> (2337 bp)	95 °C 5 min; 95 °C 1 min; 70 °C 1 min; 72 °C 2.5 min (12 cycles); 95 °C 0.5 min; 62 °C 1 min; 72 °C 2.5 min (22 cycles); 72 °C 5 min	This study
R1 hisC2-Stop	TTACGCCGCCAGGAAGTCCTTC			This study
F2.2.meIX	CCGACAGGTAGGTGATGTGCG	<i>hisC2</i> (3708 bp)	95 °C 5 min; 95 °C 1 min; 70 °C 1 min; 72 °C 3.5 min (12 cycles); 95 °C 0.5 min; 62 °C 1 min; 72 °C 3.5 min (22 cycles); 72 °C 5 min	This study
R720-2	CACATCGTCACCACTTGTC			This study
Fem-AzII	TCCATCTGGTCGAGGTGGCCG	<i>hisC2</i> (2066 bp)	95 °C 5 min; 95 °C 1 min; 70 °C 1 min; 72 °C 2 min (12 cycles); 95 °C 0.5 min; 62 °C 1 min; 72 °C 2 min (22 cycles); 72 °C 5 min	This study
ReodA-AzII	GCAAGCCCGATCTGGTGGTTC			This study

Table 1 continued

Primer name	Sequence 5'-3'	Target DNA (product length)	PCR conditions	Reference
Fcm-Az12	ATGACCGCGGTCAACACCCC	<i>hisC2</i> (2571 bp)	95 °C 5 min; 95 °C 1 min; 70 °C 1 min; 72 °C 2.5 min (12 cycles); 95 °C 0.5 min; 62 °C 1 min; 72 °C 2.5 min (22 cycles); 72 °C 5 min	This study
RcodA-Az12	TGCATGTGCGCCAGATGACC			This study
Genus <i>Azospirillum</i>	rDNA 16S-rDNA 23S internal spacer region	IGS (~500 bp)	95 °C 5 min; 95 °C 1 min; 70 °C 1 min; 72 °C 1 min (12 cycles); 95 °C 0.5 min; 62 °C 1 min; 72 °C 1 min (22 cycles); 72 °C 5 min	Baudoin et al. (2010) Baudoin et al. (2010)
fAZO	GGCGCATCCCTTCTCACGG			
rAZO	GCTTGGCGCCACGCGCAGG			

### PCR of *ipdC*, *hisC1*, and *hisC2* genes

The primer pairs used for the amplification of bacterial strains are listed in Table 1. These, correspond to the *hisC1* and *hisC2* genes and were designed for analysis of the genomes of *A. brasilense* Sp 245 and *A. lipoferum* 5B (Wisniewski-Dye et al. 2011) and *A. lipoferum* spB510 (Kaneko et al. 2010), as shown in supplementary Fig. S1. The conditions used for corresponding PCRs are also described in Table 1. Representative strains were chosen for further DNA sequencing studies of the *ipdC*, *hisC1*, and *hisC2* genes. That was performed by the Biotechnological Institute of the Universidad Nacional Autónoma de México (IBT-UNAM) using universal and custom oligonucleotides primers.

### PCR amplification of IGS (16S-23S rDNA internal spacer region) and RFLP (restriction fragments length polymorphism) analysis

The genomic DNA was prepared as previously described, and the PCR was carried out with 25 ng of DNA. The primers pair fAZO/rAZO for group-specific PCR was previously described by Baudoin et al. (2010) and used with the conditions indicated in Table 1. The reactions were run on a 1 % agarose gel to ensure the amplification was successful. Unsuccessful reactions were attempted a second time. Aliquots (10 µL) of the PCR products were digested with 2 U of restriction endonuclease in 20 µL reaction volumes using the manufacturer's recommended buffer and incubation conditions. The following restriction enzymes were used: *AluI*, *HaeIII* and *TaqI* (Invitrogen, Carlsbad, CA). The restricted DNA was analyzed by vertical electrophoresis in a 7 % polyacrylamide gel (Sigma Aldrich), in TBE buffer at pH 8.0 (89 mM Tris, 89 mM boric acid and 20 mM EDTA) at 4 °C at 70 V. The experiments were performed twice.

### Phylogenetic analysis

The sequences were assembled using the DNA Baser sequence assembler software (Heracle Biosoft, Bremen, Germany). Comparisons of sequences in public databases were performed using NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), using the BLASTN algorithm (Altschul et al. 1997). The sequences were submitted to GenBank and accession numbers were obtained. For



**Table 2** Isolates and reference strains used in this study

Strain	Host plant	Geographic origin	Reference
<i>A. brasilense</i> RLC1 <sup>a</sup>	<i>Fragaria ananassa</i>	Tucumán, Argentina	Pedraza et al. (2007)
<i>A. brasilense</i> RLC2	<i>Fragaria ananassa</i>	Tucumán, Argentina	Pedraza et al. (2007)
<i>A. brasilense</i> RLC3	<i>Fragaria ananassa</i>	Tucumán, Argentina	Pedraza et al. (2007)
<i>A. brasilense</i> RLC4	<i>Fragaria ananassa</i>	Tucumán, Argentina	Pedraza et al. (2007)
<i>A. brasilense</i> RLC5	<i>Fragaria ananassa</i>	Tucumán, Argentina	Pedraza et al. (2007)
<i>A. brasilense</i> RLC7	<i>Fragaria ananassa</i>	Tucumán, Argentina	Pedraza et al. 2007
<i>A. brasilense</i> RLC8	<i>Fragaria ananassa</i>	Tucumán, Argentina	Pedraza et al. 2007
<i>A. brasilense</i> REC2	<i>Fragaria ananassa</i>	Tucumán, Argentina	Pedraza et al. (2007)
<i>A. brasilense</i> REC3	<i>Fragaria ananassa</i>	Tucumán, Argentina	Pedraza et al. 2007
<i>A. brasilense</i> REC4	<i>Fragaria ananassa</i>	Tucumán, Argentina	Pedraza et al. (2007)
<i>A. brasilense</i> REC8	<i>Fragaria ananassa</i>	Tucumán, Argentina	Pedraza et al. (2007)
<i>A. brasilense</i> PEC3	<i>Fragaria ananassa</i>	Tucumán, Argentina	Pedraza et al. (2007)
<i>A. brasilense</i> PEC5	<i>Fragaria ananassa</i>	Tucumán, Argentina	Pedraza et al. (2007)
<i>A. brasilense</i> M-1 <sup>b</sup>	<i>Saccharum officinarum</i>	Tucumán, Argentina	This study
<i>A. brasilense</i> UAP14 <sup>b</sup>	<i>Stenocereus stellatus</i>	Puebla, Pue. México	Mascarua-Esparza et al. (1988)
<i>A. brasilense</i> UAP151	<i>Zea mays</i>	Puebla, Pue. México	Mascarua-Esparza et al. (1988)
<i>A. brasilense</i> UAP154	<i>Zea mays</i>	Puebla, Pue. México	Mascarua-Esparza et al. (1988)
<i>A. brasilense</i> 40M	<i>Zea mays</i> L.	Trenque Lauquen, Argentina	García de Salamone et al. (1996)
<i>A. brasilense</i> 42M	<i>Zea mays</i> L.	Trenque Lauquen, Argentina	García de Salamone et al. (1996)
<i>A. brasilense</i> Az 39	<i>Triticum turgidum</i>	Entre Ríos, Argentina	Díaz-Zorita and Fernández-Canigia (2009)
<i>A. brasilense</i> 7-2 <sup>a</sup>	<i>Saccharum officinarum</i>	Tucumán, Argentina	This study
<i>A. brasilense</i> 12-2B	<i>Saccharum officinarum</i>	Tucumán, Argentina	This study
<i>A. brasilense</i> 13-2C	<i>Saccharum officinarum</i>	Tucumán, Argentina	This study
<i>A. brasilense</i> 15-2B	<i>Saccharum officinarum</i>	Tucumán, Argentina	This study
<i>A. brasilense</i> 23-5B	<i>Saccharum officinarum</i>	Tucumán, Argentina	This study
<i>A. brasilense</i> 11-1	<i>Saccharum officinarum</i>	Tucumán, Argentina	This study
<i>A. brasilense</i> 8-1	<i>Saccharum officinarum</i>	Tucumán, Argentina	This study
<i>A. brasilense</i> H-1	<i>Saccharum officinarum</i>	Tucumán, Argentina	This study
<i>A. brasilense</i> M-3	<i>Saccharum officinarum</i>	Tucumán, Argentina	This study
<i>A. brasilense</i> A-1	<i>Saccharum officinarum</i>	Tucumán, Argentina	This study
<i>A. brasilense</i> UAP46 <sup>c</sup>	<i>Zea mays</i>	Puebla, Pue. México	Mascarua-Esparza et al. (1988)
<i>A. brasilense</i> C-15	<i>Panicum maximum</i> Jacq	Bogotá, Colombia	This study
<i>A. brasilense</i> C-16	<i>Panicum maximum</i> Jacq	Bogotá, Colombia	This study
<i>A. brasilense</i> M-1	<i>Saccharum officinarum</i>	Tucumán, Argentina	This study
<i>A. lipoferum</i> UAP6 <sup>c</sup>	<i>Opuntia ficus-indica</i>	Puebla, Pue. México	Mascarua-Esparza et al. (1988)
<i>A. lipoferum</i> USA5b	<i>Triticum turgidum</i>	California, USA	Tarrand et al. (1978)
<i>A. lipoferum</i> Sp59b	<i>Triticum turgidum</i>	Río de Janeiro, Brazil	Tarrand et al. (1978)
<i>A. lipoferum</i> 5 <sup>d</sup>	<i>Oryza sativa</i>	INIA <sup>e</sup> Tacuarembó, Uruguay	Rariz et al. (2013)
<i>A. lipoferum</i> 45	<i>Oryza sativa</i>	INIA <sup>e</sup> Tacuarembó, Uruguay	Rariz et al. (2013)
<i>A. lipoferum</i> 64	<i>Oryza sativa</i>	INIA <sup>e</sup> Tacuarembó, Uruguay	Rariz et al. (2013)
<i>A. halopraeferens</i>	<i>Leptochloa fusca</i>	Pujab, Pakistan	Reinhold et al. (1987)
<i>A. irakense</i>	<i>Oryza sativa</i>	Diwaniyah, Iraq	Khammas et al. (1989)

**Table 2** continued

Strain	Host plant	Geographic origin	Reference
<i>A. brasilense</i> Sp7	<i>Digitaria decumbens</i>	ATCC 29145 <sup>T</sup>	Tarrand et al. (1978)
<i>A. brasilense</i> Sp245	<i>Triticum turgidum</i>	Río de Janeiro, Brazil	Tarrand et al. (1978)
<i>A. amazonense</i> Y2	forage grasses	Mato Grosso du Sul, Brazil	Magalhães et al. (1983)

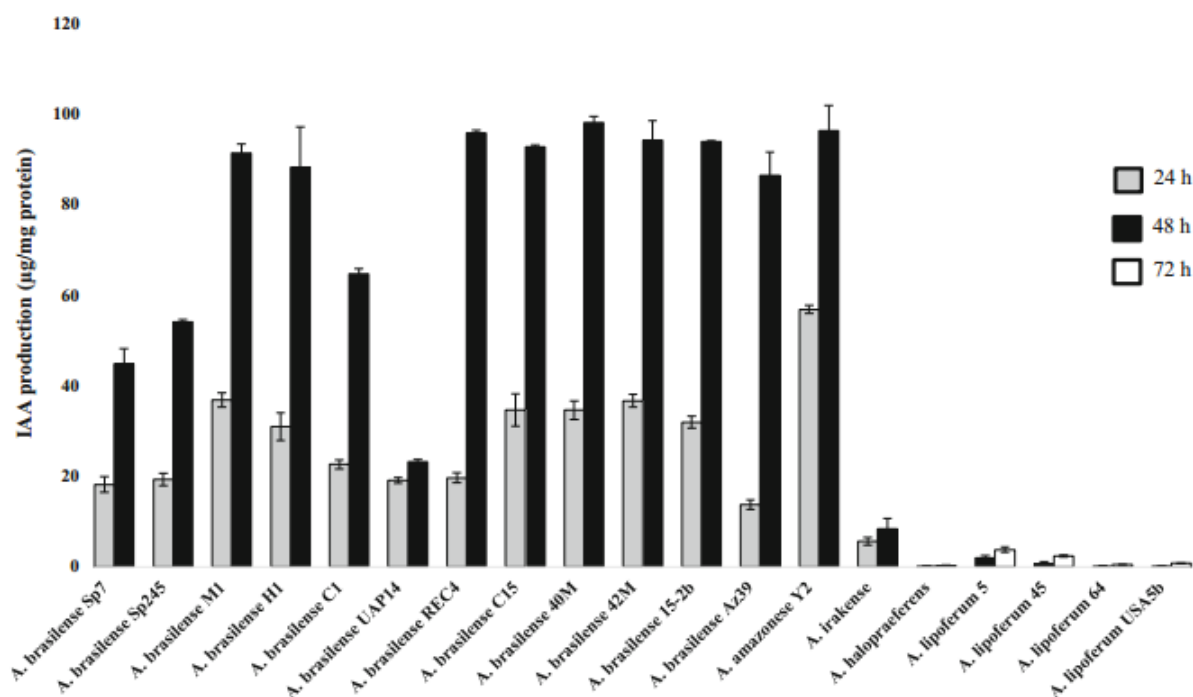
<sup>a</sup> *A. brasilense* isolates from washed roots (RCL1–8), surface sterilized roots (REC1–7), and stolons (PEC3 and PEC5) of strawberry plants

<sup>b</sup> Surface-sterilized root from Maize, Wheat, and Sugar cane

<sup>c</sup> Surface-sterilized root from *Opuntia*

<sup>d</sup> *A. lipoferum* isolated from sterilized rice roots

<sup>e</sup> INIA (Instituto, Nacional de Investigaciones Agrícolas, Zona Este)

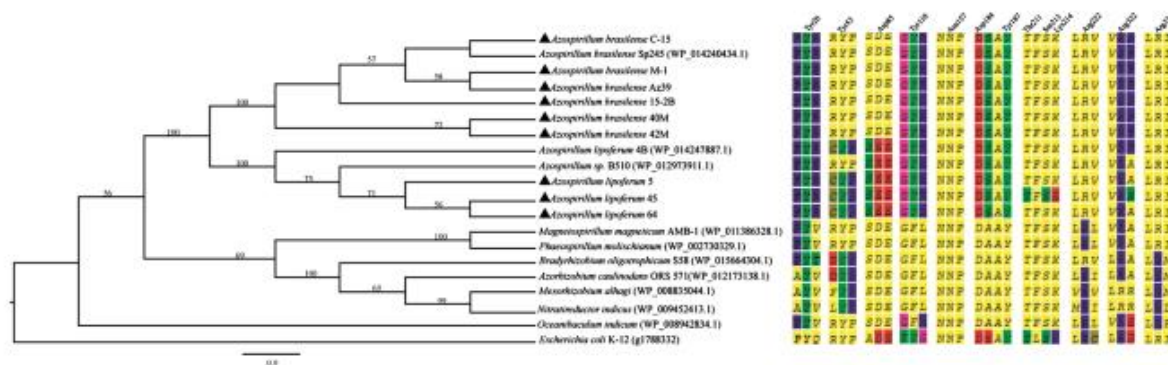


**Fig. 2** IAA produced by selected isolates of *Azospirillum* strains that was measured by HPLC. The strains were grown in minimal medium K-lactate, supplemented with 100 µg mL<sup>-1</sup> L-

tryptophan for 24, 48 and 72 h. Three independent replicate experiments were performed per strain, and the values shown are ±SD

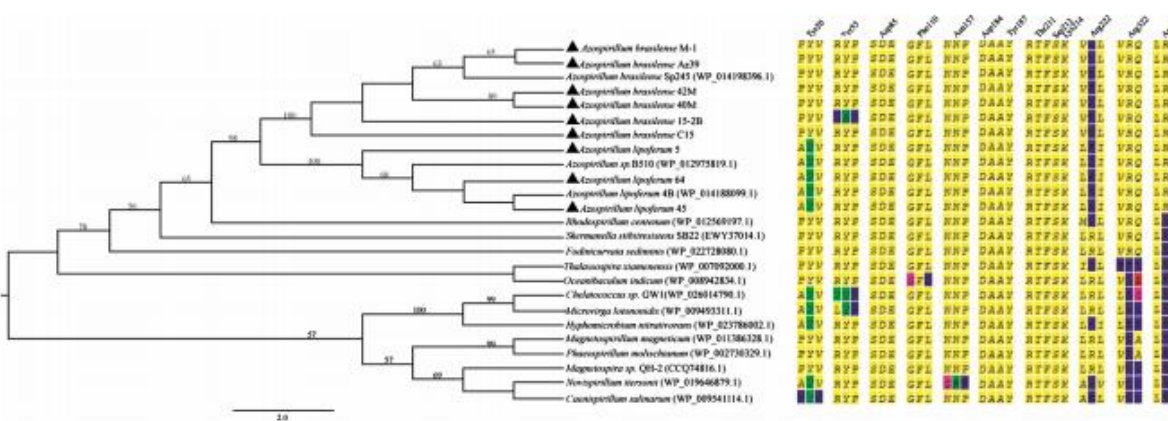
Liquid C18 (Beckman Coulter, Brea CA) housed in an Agilent 1200 chromatograph (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). A gradient (10–90 %) of an acetonitrile–water system containing 1 % acetic acid was programmed over 12 min at a flow rate of 1 mL min<sup>-1</sup> and the effluents were detected at

280 nm. The IAA in the cultures was quantified using a standard IAA (Sigma-Aldrich). Extracts from three independent growth studies were analyzed for each treatment. The total protein of the cultures was quantified by the Bradford reagent (BioRad Laboratories, Hercules, CA).



**Fig. 3** Maximum Likelihood phylogenetical tree is based on the translated amino acid sequence of the *hisC1* gene (1121 bp). Amplification of *hisC1* genes was obtained using the FhisC1/RhisC1 primers, and amplicons were sequenced as described in the methods section. The sequences obtained in this study are indicated with *black triangles*, and the most closely related sequences obtained from the GenBank. The accession numbers

are listed in *parenthesis*. The labeled amino acid residues are distinguished by their similarity to sequence of *Escherichia coli* with known function (Sivaraman et al. 2001). The node numbers are shown as occurrence percentages from 1000 bootstrapped trees; only the values greater than 50 % are shown. The phylogenetic analysis was performed using MEGA 5.2 (Tamura et al. 2011)



**Fig. 4** Maximum Likelihood phylogenetical tree is based on the translated amino acid sequence of the *hisC2* gene (1000 bp). Amplification of *hisC2* genes from *A. brasilense* genomic DNA was obtained using the Fmext1/R720.2 primers, and from *A. lipoferum* DNA was obtained using FcmAz11/or FcmAz12/RcodAz12. Amplicons were sequenced as described in the methods section. The sequences obtained in this study are indicated with *black triangles*, and the most closely related

sequences obtained from the GenBank. The accession numbers are listed in *parenthesis*. The labeled amino acid residues are distinguished by their similarity to sequence of *Escherichia coli* with known function (Sivaraman et al. 2001). The node numbers are shown as occurrence percentages from 1000 bootstrapped trees; only the values greater than 50 % are shown. The phylogenetic analysis was performed using MEGA 5.2 (Tamura et al. 2011)

**Results**

**ARDRA 16S**

Forty *Azospirillum* strains that were isolated from different plants and geographic regions were previously identified, together with six type strains, which were used as controls were grouped by ARDRA 16S (Fig. 1a). The sizes of the amplified 16S rDNA

fragments ranged from 1400 to 1500 bp. According to their fingerprint-pattern after enzyme restriction, the strains were grouped in different OTUs, which also coincided with the different species of *Azospirillum* used as references. At least two strains from each group were sequenced, shown to be *A. brasilense* and *A. lipoferum*, and considered for further analyses (Fig. 1; Table 2). The nucleotide sequences of the genes 16S rDNA, *ipdc*, *hisC1*, and *hisC2* were

deposited in the GenBank database under the following accession numbers: from KM972378 to KM972392, KP676391 to KP76407 and KP406602.

#### IAA production by *Azospirillum* strains

IAA production is widespread among *Azospirillum* strains and its positive effects on plant-growth have been well documented (Bashan and de Bashan 2010). Quantification of IAA produced by some selected strains was determined, and the results are shown in Fig. 2. The *A. lipoferum*, *A. irakense*, and *A. halopraeferens* strains produced low levels of IAA ranging from 0.25 to 2.4  $\mu\text{g mg}^{-1}$  protein at 48 or 72 h of growth. IAA production by *A. brasilense* and *A. amazonense* Y2 strains ranged from 23 to 98  $\mu\text{g mg}^{-1}$  protein at 24 or 48 h of growth, which was considerably higher than the levels produced by strains of *A. lipoferum*, *A. irakense*, and *A. halopraeferens*. Several isolates of *A. brasilense* produced higher IAA levels than the Sp7 and Sp245 control strains. Only *A. brasilense* UAP14 isolated from the Baja organ pipe cactus *Stenocereus stellatus* in Mexico produced less IAA than the levels produced by the control strains, and wild isolates (Fig. 2 and Table 2).

#### In silico analysis, amplification, and sequence of *ipdC*, *hisC1*, and *hisC2* genes

Several reports described the principal pathway for IAA production in *A. brasilense* is the IPyA pathway and that the AAT1 and AAT2 enzymes encoded by *hisC1*, and *hisC2* genes, respectively, and the PPDC enzyme encoded by the *ipdC* gene catalyzes the first and second steps of this pathway (Spaepen et al. 2007a, b; Malhotra and Srivatava 2008a; Carreño-López et al. 2000; Pedraza et al. 2004; Castro-Guerrero et al. 2012). Therefore, the *ipdC*, *hisC1*, and *hisC2* genes were identified in *Azospirillum* isolates using the primers designed in this work (Supplementary Fig. S1; Table 1). Amplicons of the expected size, as indicated in Table 1, were obtained from all examined isolates of *A. brasilense* species, and the determination of the nucleotide sequences and their corresponding translate proteins confirmed that the amplicons encodes AATs and PPDC proteins, respectively, with high similarity (95–99 %) at nucleotide levels (98–99 % identity at the amino acid level), although the three genes showed 100 %

identity at the nucleotide level to the genomic DNA purified from *A. brasilense* 40 M and 42 M strains. The genomic DNA obtained from *A. lipoferum* USA5b, *A. lipoferum* 59b and the isolates *A. lipoferum* UAP6, *A. lipoferum* 5, 45, and 64 strains yielded amplicons corresponding to the *hisC1*, and *hisC2* genes. The comparison of the AAT1 and AAT2 sequences with sequences recovered from the GenBank data-base facilitated assembly of the phylogenetic trees shown in Figs. 3 and 4. As expected, the phylogenetic trees revealed that all the isolates examined clustered with *Azospirillum* species. As shown in Figs. 3 and 4, Tyr55, Asp85, Asn157, Asp184, Tyr187, Thr211 Ser213, Lys214, and Arg222 are the amino acid residues that bond to PLP. The amino acid residues Tyr20, Arg322, and Arg335 are involved in binding to substrates, as was described previously (Sivaraman et al. 2001). Alignments made with sequences of the AAT1 and ATT2 proteins from *A. brasilense* isolates showed 62 % similarity. The AAT1 and AAT2 protein sequences were grouped in different clades belonging to *A. brasilense* or *A. lipoferum* strains (Figs. 3 and 4). The proteins share approximately 45 % identity (scores  $6e-10^8$  to  $2e-10^2$ ) over their entire lengths and may have resulted from ancient gene duplications, indicating that they belong to a superfamily of aromatic aminotransferases enzymes, namely subfamily I $\beta$  (Jensen and Gu 1996).

The primer pair FipdC-int/RiaaC-Stop was used to amplify the whole *ipdC* promoter region and *ipdC* gene (~2139 bp). The *ipdC* was amplified in 34 isolates belonging to *A. brasilense* species. The amplicons were then subjected to restriction analysis. Very light differences in the restriction patterns were obtained with the enzymes *Bgl*II, *Alu*I, *Nco*I, and *Bst*XI, suggesting that *ipdC* is a conserved gene (Supplementary Fig. S2 a, b, c, and d). We were unable to obtain PCR product from the genomic DNAs obtained from the other *A. lipoferum*, *A. amazonense* Y1, *A. irakense*, and *A. halopraeferens* strains, and *Sphingomonas* spp and *Pseudomonas stutzeri* A1501 that were used as negative control strains, using the primers designed to amplify the *ipdC* gene. To avoid the potential presence of the *ipdC* gene in these strains, hybridization of the genomic DNA, using *ipdC* as the probe, was performed under strict or relaxed conditions, and a hybridization signal was not obtained (data not shown), indicating that the *ipdC* gene is not

**a**

**I**

```

Sp245  CCGCTCTCCCGCCCGGGAGAGGGTGGCGCCGAGGGCCCGGGTGGAGGGTGTGTCGGAGGATCAAGACACCAGCCCTTGGCGACACCCTCA 90
M-1    CCGCTCTCCCGCCCGGGAGAGGGTGGCGCCGAGGGCCCGGGTGGAGGGTGTGTCGGAGGATCAAGACACCAGCCCTTGGCGACACCCTCA 90
Az39   CCGCTCTCCCGCCCGGGAGAGGGTGGCGCCGAGGGTGGCGGGTGGAGGGTGTGTCGGAGGATCAAGACACCAGCCCTTGGCGACACCCTCA 90
USA5a  -----GGCGCCGAGGGCCCGGGTGGAGGGTGTGTCGGAGGATCAAGTACCAGTCTTGGCGGCACCCTCA 65
15-2B  TCCTT----- 5
SM     TCGCT----- 5
Sp7    TCGCT----- 5
42Mb   ----- 5
C-15   ----- 5
    
```

**II**

```

Sp245  CCCTTCCCACGCTGCGCGTGGGCCCTCCCTCTCCCGGGACGGGAGAGGGGATATCAAGCGCGCCCTCCACCCCTCCACAATTTCCGGC 180
M-1    CCCTTCCCACGCTGCGCGTGGGCCCTCCCTCTCCCGGGACGGGAGAGGGGATATCAAGCGCGCCCTCCACCCCTCCACAATTTCCGGC 180
Az39   CCCTT-----CCCTCTCCCGGGACGGGAGAGGGGATATCAAGCGCGCCCTCCACCCCTCCACAATTTCCGGC 157
USA5a  CCCTTCCCACGCTGCGCGTGGGCCCTCCCTCTCCCGGGACGGGAGAGGGGATTTTAATTTGCCCGCCGACTCTCCACAATTTCCGGC 155
15-2B  -----GTCCACTCTCCACAATTTCCGGC 30
SM     -----CTCCACCCCTCCACAATTTCCGGC 30
Sp7    -----CTCCACCCCTCCACAATTTCCGGC 30
42Mb   -----CTCCGCTCTCCATAAATTCAGC 30
C-15   ----- 30
    
```

**III**                      **IV**                      **V**                      **VI**

```

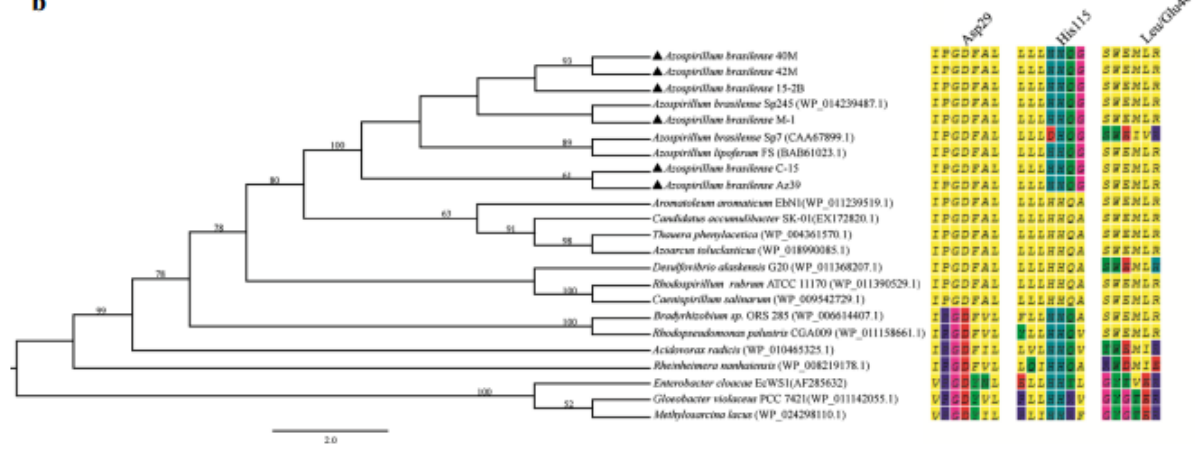
Sp245  GCGAATGGATTGTTTCGAATGAAACAATCTTTGCGCGGAGCGGTGGCGGAGGC-GATGCTGTCCCTGTGCGGGTTTTCGACCCGCGAA 269
M-1    GCGAATGGATTGTTTCGAATGAAACAATCTTTGCGCGGAGCGGTGGCGGAGGC-GATGCTGTCCCTGTGCGGGTTTTCGACCCGCGAA 269
Az39   GCATATGGATTGTTTCGAATGAAACAATCTTTGCGCGGAGCGGTGGCGGAGGC-GATGCTGTCCCTGTGCGGGTTTTCGACCCGCGAA 246
USA5a  GCATATGGATTGTTTCGAATGAAACAATCTTTGCGCGGAGCGGTGGCGGAGGC-GATGCTGTCCCTGTGCGGGTTTTCGACCCGCGAA 244
15-2B  GCAACCGGATTGTTTCGAATGAAACAATCTTTGCGCGGAGCGGTGGCGGAGGC-GATGCTGTCCCTGTGCGGGTTTTCGACCCGCGAA 119
SM     GCATATGGATTGTTTCGAATGAAACAATCTTTGCGCGGAGCGGTGGCGGAGGC-GATGCTGTCCCTGTGCGGGTTTTCGACCCGCGAA 119
Sp7    GCATATGGATTGTTTCGAATGAAACAATCTTTGCGCGGAGCGGTGGCGGAGGC-GATGCTGTCCCTGTGCGGGTTTTCGACCCGCGAA 119
42Mb   GCAATATGATTGTTTCGAATGAAACAATCTTTGCGCGGAGCGGTGGCGGAGGC-GATGCTGTCCCTGTGCGGGTTTTCGACCCGCGAA 119
C-15   -----TTTCGAATGAAACAATCTTTGCGCGGAGCGGTGGCGGAGGC-GATGCTGTCCCTGTGCGGGTTTTCGACCCGCGAA 77
          *****
    
```

**VII**

```

Sp245  ACCAATGGAACGGAGGCGGCCATG 296
M-1    ACCAATGGAACGGAGGCGGCCATG 296
Az39   ACCAATGGAACGGAGGCGGCCATG 273
USA5a  ACCAATGGAACGGAGGCGGCCATG 271
15-2B  ACCAATGGAACGGAGGCGGCCATG 146
SM     ACCAATGGAACGGAGGCGGCCATG 146
Sp7    ACCAATGGAACGGAGGCGGCCATG 146
42Mb   ACCAATGGAACGGAGGCGGCCATG 146
C-15   ACCAATGGAACGGAGGCGGCCATG 104
          *** *****
    
```

**b**



**Fig. 5 a** Multiple sequence alignment of the nucleotide sequences of the region upstream of the *ipdC* gene in *A. brasilense* strains. Amplification of *ipdC* genes was using the FRegR-2/iaaCR1 primers, and amplicons were sequenced as described in the methods section. The sequences obtained in this study are indicated with *black triangles*, and the most closely related sequences obtained from the GenBank. The accession numbers are listed in *parenthesis*. The *boxes* indicate the palindromic sequences (*I, II*), inverted repeat (*III*), RpoN binding site (*IV*), AuxRE site (*V*), transcription initiation site TIS (*VI*), and the ribosome-binding site RBS (*VII*). The 150 bp insertion found in strains Sp245, M-1, Az39 and USA5a is shown in *blue*. **b** Molecular phylogenetic analysis of PPDC. Maximum Likelihood phylogenetic tree is based on the translated amino acid sequence of the *ipdC* gene (1521 bp). The labeled amino acid residues are distinguished by their similarity to sequences with known function. The node numbers are shown as occurrence percentages from 1000 bootstrapped trees; only the values greater than 50 % are shown. The phylogenetic analysis was performed using MEGA 5.2 (Tamura et al. 2011)

present in these strains. This agrees with the genomic sequence of *A. lipoferum* 4B, *Azospirillum* spB510, and *A. amazonense* Y1, which do not contain the *ipdC* gene (Kaneko et al. 2010; Sant'Anna et al. 2011; Wisniewski-Dye et al. 2011). The nucleotide sequences obtained from all isolates belong to *A. brasilense* and the multiple alignments of the translated proteins include the region comprising the well-conserved thiamine pyrophosphate-binding motif (TPP). *A. brasilense* proteins show a leucine residue in place of a conserved glutamate in the catalytically important amino acids found in other  $\alpha$ -keto acid decarboxylases (Asp-His-Glu catalytic triad; Fig. 5b). Hence, the *ipdC* genes were grouped in the cluster corresponding to PPDC protein, as described by Spaepen et al. (2007a, b).

The sequence of the promoter regions were also analyzed, and the multiple nucleotide sequence alignment revealed the occurrence of the auxin responsive *cis*-element AuxRE TGTCNC, and the palindromic sequences required for positive feedback regulation (Fig. 5a; Vande Broek et al. 2005; Malhotra and Srivatava 2008b; Rothballer et al. 2005). The *ipdC* promoter region could be classified into two groups: those whose promoter region is similar to that found in the *A. brasilense* Sp245, and those similar to *A. brasilense* Sp7, in which an insertion of 150 bp is missing (Fig. 5a). Our results do not reveal a correlation between the IAA produced by the strains and the existence of the 150 bp sequence or not in their promoter region. For instance, *A. brasilense* M-1, Az39, 15-2B, 42 M and C-15, isolated in different

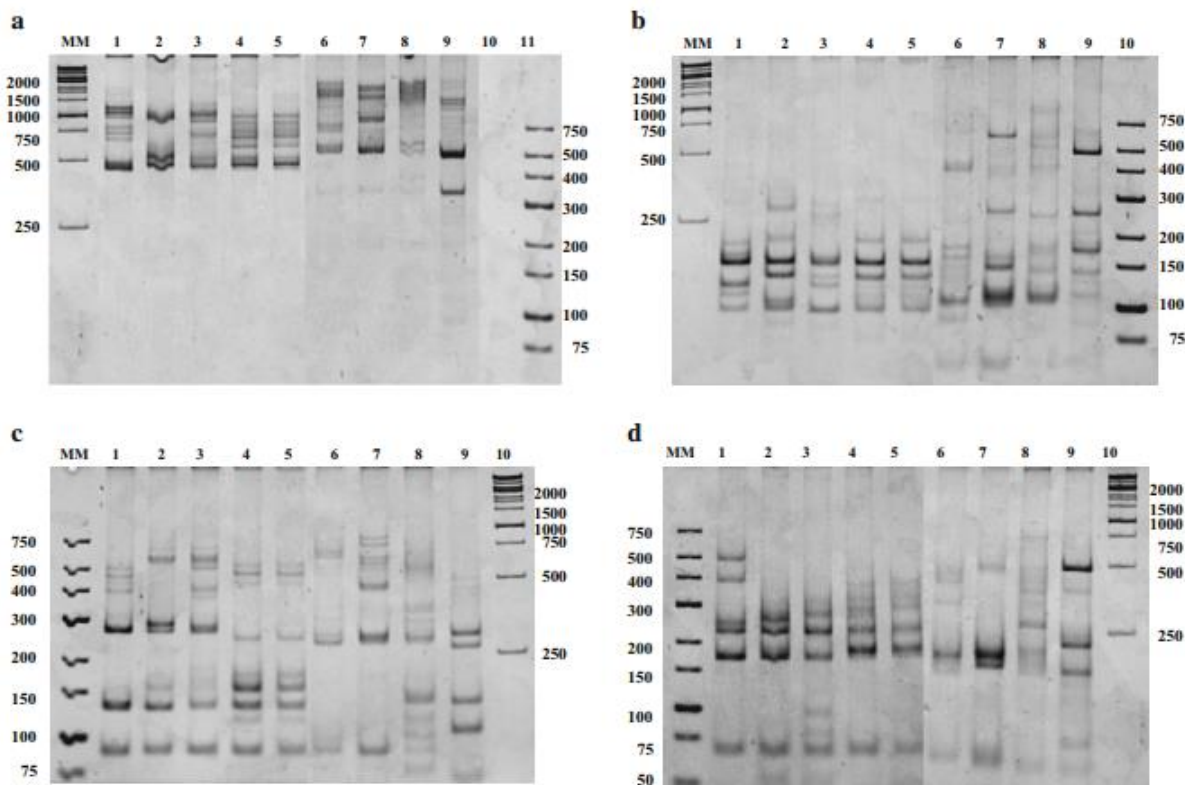
plants and countries, do not contain the 150 bp region, that was found in the Sp7 and SM (Malhotra and Srivatava 2008b; Rothballer et al. 2005). However, the amount of IAA produced by the former strains was considerably higher than that produced by Sp7 and SM. In contrast, *A. brasilense* Sp245 and M-1 and Az39, contains the *ipdC* regulatory region with the insertion of the 150 bp IAA produced by these last two strains was higher than IAA levels produced by Sp245.

#### Amplification and RFLP of the 16S-23S rDNA spacer region

The selected isolates were then differentiated at the strain level. An *in silico* study of the available sequence information of the 16S-23S rDNA spacer region in *A. brasilense* Sp 245 and *A. lipoferum* 4B genomes has shown that the bacteria have multiple copies of the rDNA operons. This indicates that spacer variations between strains and species may be used for differentiation purposes. An *in silico* analysis using the GenBank 16S-23S spacer region was performed. Using the primers designed by Baudoin et al. (2010) (Table 1), a PCR-RFLP analysis yielded the results shown in Fig. 6. Estimating the sizes of the IGS PCR products of all strains revealed production of several PCR products ranging from >700 to 450 bp, depending on the strain (Fig. 6a). Similar results were published by Baudoin et al. (2010) and Vezyri et al. (2013). The differences in the size of the PCR products may be partly explained by two tRNA genes, and in the variability sequence found the IGS regions by summing the sizes of the restriction fragments (Fig. 6a–d). Each isolate exhibited distinct banding patterns of IGS-PCR-RFLP, suggesting that these isolates may be different strains, with the exception of 40 M and 42 M.

#### Discussion

The central goal of this study was to determine if the *ipdC*, *hisC1*, and *hisC2* genes are suitable for studying the phylogeny of *Azospirillum* strains that produce high IAA by using physiological and molecular approaches. To date, mainly 16S rDNA and a few other housekeeping genes have been considered for studying species phylogeny because these are conserved, ubiquitous, and universal (Vinuesa et al. 1998;



**Fig. 6** Amplification of IGS 16SrDNA-23rDNA and PCR-RFLP patterns. **a** PCR-IGS from genomic DNAs. Lane 1 10 kb molecular marker (Invitrogen); Lane 2 *A. brasilense* Sp245; Lane 3 *A. brasilense* Sp7 (Included as positive control); Lane 4 *A. lipoferum* 64; Lane 5 *A. lipoferum* 45; Lane 6 *A. lipoferum* 5; Lane 7 *A. brasilense* Az39; Lane 8 *A. brasilense* M42; Lane 9 *A. brasilense* M40; Lane 10 genomic DNA from *Sphingomonas* (Included as negative control). **b** PCR-IGS pattern from

corresponding genomic amplicons digested with the *Hae*III restriction enzyme. **c** PCR-IGS pattern from corresponding genomic amplicons digested with the *Taq*I restriction enzyme. **d** PCR-IGS pattern from corresponding genomic amplicons digested with the *Alu*I restriction enzyme. 1000-bp DNA ladder molecular marker (Thermo Scientific). All experiments were carried out twice

Lin et al. 2011; Venieraki et al. 2011). Different isolates and several reference strains were characterized genotypically at different levels of taxonomic resolution through computer-assisted analysis of the 16S rDNA, PCR-RFLPs, and 16S-23S rDNA intergenic spacer sequence RFLPs. A comparison of the 16SrDNA and *ipdC*, *hisC1*, and *hisC2* genes and their phylogenetic trees revealed that the phylogeny of the three latter genes showed a resemblance to ARDRA characterization based on the 16SrDNA gene. We demonstrated the usefulness of the *ipdC*, *hisC1*, and *hisC2* genes, which are involved in beneficial plant activities, can be applied for phylogeny studies of species of this genus (Pedraza et al. 2004; Castro-Guerrero et al. 2012). In combination with the IGS, this technique has been used by many researchers for

demonstrating genetic diversity of bacterial strains and communities associated with plants, particularly with isolates belonging to the *Azospirillum* genus (Baudoín et al. 2010; García-Martínez et al. 1999; Vezyri et al. 2013). Therefore, we combining molecular methods with biochemical and phenotypic studies is also a particularly useful strategy for investigating diversity among *Azospirillum* populations. The data we presented are consistent with previously published data of a partial 16SrDNA sequence. The IGS-PCR-RFLP analysis of strains of different species showed that these were clearly differentiated from each other. Thus, the IGS results exhibits large variability, and it is useful for differentiating genomic groups at the intraspecific level. In fact, this approach is a useful fingerprinting method for

characterizing strains at a higher level than that obtained with ARDRA or 16S rDNA sequencing (Baudoin et al. 2010; García-Martínez et al. 1999; Vezyri et al. 2013).

However, an exception was found with *A. brasilense* 40 M and 42 M. Both strains contained *ipdC*, *hisC1*, and *hisC2* genes with 100 % identity and an identical RFLP pattern after IGS-PCR digestion with the three restriction enzymes that were used (Fig. 6). A recent study of the biochemical and phenotypic properties of these strains showed that 40 M and 42 M, which were isolated from maize in Argentina (García de Salamone et al. 1996), are similar but not physiologically identical and have also shown different ACC deaminase activity and fatty acid methyl ester profiles of their cells (Di Salvo et al. 2014). Thus, we cannot rule out the possibility that these two isolates are very closely related strains of different biotypes. However, grain-yield performance and aerial biomass production exerted by both strains when inoculated independently of each other, to several cereal crops were not always similar (Di Salvo et al. 2012).

In the promoter region and *ipdC* gene, this gene has been determined only in *A. brasilense* and *A. zeae* (Carreño-López et al. 2000; Spaepen et al. 2007a, b; Venieraki et al. 2011); however, it will be important to assess whether its existence in *Azospirillum* isolates belong to others species. We did not find a correlation between the occurrence of the 150 bp insertion in the promoter region of *ipdC* gene and level of IAA production; (Malhotra and Srivastava 2008a) found that the knock-out *ipdC* gene from *A. brasilense* SM isolated from India exhibited 50 % less IAA production compared with the SM wild-type strain. This suggests that the variability in the copy number of the *ipdC* gene within the same bacterial species may possibly contribute to the variability in IAA production between members of the same species. Our analysis of all of the strains by PCR-RFLP (Fig. S2) and Southern blot indicated that only one copy was present. This could not be the reason for explaining the high level of IAA production obtained with our isolates. However, previous studies have demonstrated that phenotypic variants of *A. brasilense* Sp245 and *A. brasilense* Sp7 collected after prolonged starvation or stocking periods showed quite different PCR pattern and plasmid profiles, as well as phenotypic variations (Lerner et al. 2010; Vial et al. 2006). Therefore, it is conceivable that a long period of

preservation and continuous culture may be responsible for modifying IAA production. Determination of IAA production was performed using the method described by Szkop and Bielaswki (2013), which involves the use of non-IAA solvent extraction, and the data obtained herein showed that this is a better method for IAA determination, compared with previous results obtained in our laboratory (Pedraza et al. 2004; Soto-Urzuá et al. 1996).

In conclusion, although the exact mode of action through which *Azospirillum* enhances plant growth is not yet fully understood, the plant growth-promoting activity is mainly attributed to IAA phytohormonal activity (Dobbelaere et al. 2001; Bashan and de Bashan 2010). Our data indicate that isolates from different regions constituted a homogenous population in terms of their *ipdC*, *hisC1*, and *hisC2* genes. Because the *ipdC* gene encodes PPDC, which is a key enzyme in producing the growth hormone IAA, its highly conserved nature makes it an ideal molecular tool for determining *A. brasilense* strains that can be used as inoculants. PCR is a useful and simple method for rapidly discrimination of *A. brasilense* strains and for developing new strain-specific DNA markers for identifying agriculturally important strains. Therefore, the newly designed primers used in this study might be used as alternative molecular marker to identify soil populations of *A. brasilense* strains and monitor their presence after inoculation.

**Acknowledgments** We are grateful to Dr. C. Elmerich to the gift of *Pseudomonas stutzeri* A1501 strain, Noé Arroyo for technical assistance, and Ira Fogel for English editing. This work was supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología to B.E.B (CONACYT grant 49227-Z) and funding by a collaborative grant to B.E.B., R.P., I. G de S. and A.F.S. from Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED). S. J. M., C. M. J. and L.S.U. are recipients CONACYT fellowships, respectively. Authors appreciate to Editor and Reviewers for constructive and valuable comments.

## References

- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA et al (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25:3389–3402. doi:10.1093/nar/25.17.3389
- Ausubel F, Brent R, Kingston RE et al (1995) Short protocols in molecular biology. Wiley, New York
- Baca BE, Elmerich C (2007) Microbial production of plants hormones by microorganisms. In: Elmerich C, Newton WE

- (eds) Associative nitrogen-fixation bacteria and cyanobacteria. IV Series: nitrogen fixation: origins, applications, and research progress. Springer Life Science, Dordrecht
- Baldani JJ, Sampaio Videira S, dos Santos Teixeira KR, Massena Reis V, Martinez de Oliveira AL, Schwab S, Maltempi de Souza E, Pedraza RO, Baldani VLD, Hartmann A (2014) The family rhodospirillaceae. In: Rosenberg E et al (eds) The prokaryotes—alphaproteobacteria and betaproteobacteria. Springer, Berlin. doi:10.1007/978-3-642-30197-1\_300
- Bashan Y, de Bashan LE (2010) How plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth—a critical assessment. In: Spark D (ed) Advances in agronomy, vol 108. Academic Press, Burlington, pp 77–136
- Bashan Y, de Bashan LE, Prabhu R, Hernandez JP (2014) Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives. Plant Soil 378:1–33. doi:10.1007/s11104-013-1956
- Baudoin E, Couillerot O, Spaepen S, Moëgne-Loccoz Y, Nazaret S (2010) Applicability of 16S-23S rDNA internal spacer for PCR detection of the phyto-stimulatory PGPR inoculant *Azospirillum lipoferum* CRT1 in field soil. J Appl Microbiol 108:25–38
- Carreño-López R, Campos-Reales NB, Elmerich C, Baca BE (2000) Physiological evidence for differently regulated tryptophan-dependent pathways for indole-3-acetic acid synthesis in *Azospirillum brasilense* Sp7. Mol Gen Genet 264:521–530
- Castro-Guerrero J, Romero-Osorio A, Aguilar-Piedras JJ, Xiqui-Vázquez ML, Sandoval-Romero JO, Baca BE (2012) The gene *hisC1* of *Azospirillum brasilense* Sp7, encoding the aromatic amino acid aminotransferase-1, is expressed in wheat. Plant Soil 356:139–150
- Creus CM, Sueldo RJ, Barassi CA (2004) Water relations and yield in *Azospirillum*—inoculated wheat exposed to drought in the field. Can J Bot 82:273–281
- Di Salvo LP, Carlino ME, Cellucci GC, García de Salamone IE (2012) *Azospirillum brasilense* y fertilización nitrogenada: incremento sustentable del rendimiento de maíz. In: XIX Congreso Latinoamericano de la Ciencia del Suelo. XXIII Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo. ISBN 978-987-1829-11-8. <http://www.academia.edu/4241273/AZOSPIRILLUM>
- Di Salvo L, Silva E, Teixeira KRS, Esquivel-Cote R, Pereyra MA, García de Salamone I (2014) Physiological and biochemical characterization of *Azospirillum brasilense* strains commonly used as plant growth-promoting rhizobacteria. J Basic Microbiol 54:1–12
- Díaz-Zorita M, Fernández-Canigia M (2009) Field performance of a liquid formulation of *Azospirillum brasilense* on dryland wheat productivity. Eur J Soil Biol 45:3–11
- Dobbelaere S, Croonenborghs A, Thys A, Ptacek D et al (2001) Response of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. Aust J Plant Physiol 28:871–879
- Doty SL, Doshier MR, Singleton GL (2005) Identification of an endophytic rhizobium in stems of *Populus*. Symbiosis 39:27–35
- García de Salamone IE, Döbereiner J, Urquiaga S, Boddey RM (1996) Biological nitrogen fixation in *Azospirillum* strain-maize genotype associations as evaluated by the a <sup>15</sup>N isotope dilution technique. Biol Fertil Soils 23:249–256
- García-Martínez J, Acinas SG, Antón AI, Rodríguez-Valera F (1999) Use of the 16S-23S ribosomal genes spacer region in studies of prokaryotic diversity. J Microbiol Methods 36:55–64
- Hartmann A, Rothballer M, Schmid M (2008) Lorenz Hiltner, a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research. Plant Soil 312:7–14
- Jensen RA, Gu W (1996) Evolutionary recruitment of biochemical specialized subdivisions of family I within the protein superfamily of aminotransferases. J Bacteriol 178:2161–2171
- Kaneko T, Minamisawa K, Isawa T, Nakatsukasa H et al (2010) Complete genomic structure of the cultivated rice endophyte *Azospirillum* sp. B510. DNA Res. doi:10.1093/dnares/dsp026
- Khammas KM, Ageron E, Grimont PAD, Kaiser P (1989) *Azospirillum irakense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. Rev Microbiol 140:679–693
- Lerner A, Valverde A, Castro-Sowinski S, Lerner H, Okon Y, Burman S (2010) Phenotypic variation in *Azospirillum* exposed to starvation. Environ Microbiol Rep 2:577–586
- Lin SY, Shen FT, Young CC (2011) Rapid detection and identification of the free-living nitrogen-fixing genus *Azospirillum* by 16SrRNA-gene-targeted genus-specific primers. Antonie van Leeuwenhoek J 99:837–844
- Lugtenberg BJJ, Malfanova N, Kamilova F, Berg G (2013) Plant growth promotion by microbes. In: de Bruijn FJ (ed) Molecular microbial ecology of the rhizosphere, vol 2. Wiley, Hoboken, pp 561–573
- Magalhães FMM, Baldani JJ, Souto SM, Kuykendall JR, Döbereiner J (1983) A new acid tolerant *Azospirillum* species. Ann Acad Bras Cienc 55:417–430
- Malhotra M, Srivatava S (2008a) An *ipdC* gene knout-out of *Azospirillum* strain SM and its implications on the indole-3-acetic acid biosynthesis and plant growth promotion. Antonie van Leeuwenhoek J 3:425–433
- Malhotra M, Srivatava S (2008b) Organization of the *ipdC* region regulates IAA levels in different *Azospirillum brasilense* strains: molecular and functional analysis of *ipdC* in strain SM. Environ Microbiol 10:1365–1373
- Mascarua-Esparza MA, Villa-González R, Caballero-Mellado J (1988) Acetylene reduction and indoleacetic acid production by *Azospirillum* isolates from Cactaceae plants. Plant Soil 106:91–95
- Pedraza RO, Ramírez-Mata A, Xiqui-Vázquez MA, Baca BE (2004) Aromatic amino acid amino transferase activity and indole-3-acetic acid production by associative nitrogen-fixing bacteria. FEMS Microbiol Lett 233:15–21
- Pedraza RO, Motok J, Tortora ML, Salazar SM, Díaz-Ricci JC (2007) Natural occurrence of *Azospirillum brasilense* in strawberry plants. Plant Soil 295:169–178
- Pérez-García O, Escalante FME, de Bashan LE, Bashan Y (2011) Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. Water Res 45:11–36
- Rariz G, Martínez A, Ferrando L, Menes RJ, Fernández-Scavino A (2013) Characterization and interactions between rice-associated bacteria with plant-growth promoting properties. Rev Agron N O Argent 33:13–24

- Reinhold B, Hurek T, Fendrik I, Pot B, Gillis M, Kersters K, Thielemans S, De Ley J (1987) *Azospirillum halopraeferens* sp. nov., a nitrogen-fixing organism associated with roots of Kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth). *Int J Syst Bacteriol* 37:43–51
- Rothballer M, Schmid M, Fekete A, Hartmann A (2005) Comparative in situ analysis of *ipdC-gfpmut3* promoter fusions of *Azospirillum brasilense* strains Sp7 and Sp245. *Environ Microbiol* 7:1839–1846
- Sant'Anna FH, Almeida LGP, Cecagno R, Reolon LA et al (2011) Genomic insights into the versatility of the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum amazonense*. *BMC Genomics* 12:409. doi:10.1186/1471-2164-12-409
- Sivaraman J, Li Y, Larocque R, Chrag J, Cygler M, Matte A (2001) Crystal structures of histidinol phosphate amino transferase (HisC) from *Escherichia coli*, and its covalent complex with pyridoxal phosphate-5'-phosphate. *J Mol Biol* 311:761–776
- Soto-Urzuá L, Xochihua-Corona YG, Flores-Encarnación M, Baca BE (1996) Purification and properties of aromatic amino acid aminotransferase from *Azospirillum brasilense* UAP 14 strain. *Can J Microbiol* 42:294–298
- Spaepen S, Vanderleyden J, Remans R (2007a) Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiol Rev* 31:425–438
- Spaepen S, Versées W, Gocke D, Pohl M, Steyaert J, Vanderleyden J (2007b) Characterization of phenylpyruvate decarboxylase, involved in auxin production of *Azospirillum brasilense*. *J Bacteriol* 180:7626–7763
- Szkop M, Bielaswki W (2013) A simple method for simultaneous RP-HPLC determination of indolic compounds related to bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Antonie van Leeuwenhoek J* 103:683–691
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary parsimony methods. *Mol Biol Evol*. doi:10.1093/molbev/msr121
- Tarrand JJ, Krieg NR, Döbereiner J (1978) A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. *Can J Microbiol* 24:967–980
- Vande Broek A, Gysegom P, Ona O, Hendrickx N, Prinsen E, Van Impe J, Vanderleyden J (2005) Transcriptional analysis of the *Azospirillum brasilense* indole-3-pyruvate decarboxylase gene and identification of a cis-acting sequence involved in auxin responsive expression. *Mol Plant Microbe Interact* 18:311–323
- Venieraki A, Dimou M, Pergalis P, Kefalogianni I, Chatzipavlidis I, Katinakis P (2011) The genetic diversity of culturable nitrogen-fixing bacteria in the rhizosphere of wheat. *Microbial Ecol* 61:277–285. doi:10.1007/s00248-010-9747-1-9
- Vezyri E, Venieraki A, Dimou M, Chatzipavlidis I, Tampakaki A, Katinakis P (2013) Phylogenetic analysis of *Azospirillum* species isolated from the rhizosphere of field-grown wheat based on genetic and phenotypic features. In: de Bruijn FJ (ed) *Molecular microbial ecology of the rhizosphere*, vol 1. Wiley, Hoboken
- Vial L, Lavire C, Mavingui P, Blaha D, Haurat J, Moenne-Loccoz Y, Bally R, Wisniewski-Dye F (2006) Phase variation and genomic architecture changes in *Azospirillum*. *J Bacteriol* 188:5364–5373
- Vinuesa P, Radamarker JLW, de Bruijn FJ, Werner D (1998) Genotypic characterization of *Bradyrhizobium* strains nodulating endemic woody legumes of the Canary Islands by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of genes encoding 16S rRNA (16S rDNA) and 16S-23S rDNA intergenic spacers, repetitive extragenic palindromic PCR genomic fingerprinting, and partial 16S rDNA Sequencing. *Appl Environ Microbiol* 64:2096–2104
- Wisniewski-Dye F, Borziak K, Khalsa-Moyers G, Alexandre G, Sukharnikov LO et al (2011) *Azospirillum* Genomes reveal transition of bacteria from aquatic to terrestrial environments. *PLoS Genet* 7:e1002430. doi:10.1371/journal.pgen.1002430

## 13.REFERENCIAS

1. **Ahemad M, Kibret M.** 2014. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *J King Saud Univ Sci* 26:1-20.
2. **Ahmad F, Ahmad I, Khan MS.** 2008. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiol Res* 163:173-181.
3. **Ahmer BM, van Reeuwijk J, Timmers CD, Valentine PJ, Heffron F.** 1998. *Salmonella typhimurium* encodes an SdiA homolog, a putative quorum sensor of the LuxR family, that regulates genes on the virulence plasmid. *J Bacteriol* 180:1185-1193.
4. **Alexeyev MF, Shokolenko IN, Croughan TP.** 1995. Improved antibiotic-resistance gene cassettes and omega elements for *Escherichia coli* vector construction and in vitro deletion/insertion mutagenesis. *Gene* 160:63-67.
5. **Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ.** 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25:3389-3402.
6. **Andrew J. Donati, Hae-In Lee, Johan H. J. Leveau, and Woo-Suk Chang.** 2013. Effects of indole-3-acetic acid on the transcriptional activities and stress tolerance of *Bradyrhizobium japonicum*. *PLoS One* 8:e76559.
7. **Baca BE, Soto-Urzuá L, Xochinua-Corona YG, Cuervo-García A.** 1994. Characterization of two aromatic amino acid aminotransferases and production of indole acetic acid in *Azospirillum* strains. *Soil Biol Biochem* 26:57-63.
8. **Baikalov I, Schröder I, Kaczor-Grzeskowiak M, Grzeskowiak K, Gunsalus RP, Dickerson RE.** 1996. Structure of the *Escherichia coli* response regulator NarL. *Biochemistry* 35:11053-11061.
9. **Bashan Y, de-Bashan LE.** 2010. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth-a critical assessment. *Advances Agron* 108:77-136.
10. **Bassler BL, Losick R.** 2006. Bacterially speaking. *Cell* 125:237-246.
11. **Belcheva A, Verma V, Golemi-Kotra D.** 2009. DNA-binding activity of the vancomycin resistance associated regulator protein VraR and the role of phosphorylation in transcriptional regulation of the vraSR operon. *Biochemistry* 48:5592-5601.
12. **Benková E, Michniewicz M, Sauer M, Teichmann T, Seifertová D, Jürgens G, Friml J.** 2003. Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell* 115:591-602.
13. **Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Wheeler DL.** 2005. GenBank. *Nucleic Acids Res* 33:34-38.
14. **Bertoni G, Fujita N, Ishihama A, Lorenzo V.** 1998. Active recruitment of  $\sigma^{54}$ -RNA polymerase to the *Pu* promoter of *Pseudomonas putida*: role of IHF and  $\alpha$ CTD. *The EMBO Journal* 17:5120-5128.
15. **Bianco C, Imperlini E, Defez R.** 2009. Legumes like more IAA. *Plant Signal Behav* 4:763-765.
16. **Blatny, J. M., T. Brautaset, H. C. Winther-Larsen, K. Haugan, and S. Valla.** 1997. Construction and use of a versatile set of broad-host-range cloning and expression vectors based on the RK2 replicon. *Appl Environ Microbiol* 63:370-379.
17. **Bottini R, Fulchieri M, Pearce D, Pharis RP.** 1989. Identification of gibberellins A1, A3 and iso-A3 in cultures of *Azospirillum lipoferum*. *Plant Physiol* 90:45-47.
18. **Borland S, Oudart A, Prigent-Combaret C, Brochier-Armanet C, Wisniewski-Dyé F.** 2015. Genome-wide survey of two-component signal transduction systems in the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum*. *BMC Genomics* 16:833.
19. **Bush M, Dixon R.** 2012. The Role of bacterial enhancer binding proteins as specialized activators of  $\sigma^{54}$ -dependent transcription. *Microbiol Mol Biol Rev* 76:497-529.
20. **Camilli A, Bassler BL.** 2006. Bacterial Small-Molecule Signaling Pathway. *Science* 311:1113-1116.
21. **Carreño-López, R., Campos-Reales, N., Elmerich, C., and Baca, B. E.** 2000. Physiological evidence for differently regulated tryptophan-dependent pathways for indole-3-acetic acid synthesis in *Azospirillum brasilense*. *Mol. Gen. Genet.* 264:521-530.
22. **Case RJ, Labbate M, Kjelleberg S.** 2008. AHL-driven quorum-sensing circuits: Their frequency and function among the Proteobacteria. *ISME J* 2:345-349.
23. **Castanié-Cornet, M. P., Cam, K., Bastiat, B., Cros, A., Bordes, P., and Gutierrez, C.** 2010. Acid stress response in *Escherichia coli*: mechanism of regulation of gadA transcription by RcsB and GadE. *Nucleic Acids Res* 38:3546-3554.
24. **Castro-Guerrero J, Romero A, Aguilar JJ, Xiqui ML, Sandoval JO, Baca BE.** 2012. The *hisC1* gene, encoding aromatic amino acid aminotransferase-1 in *Azospirillum brasilense* Sp7, expressed in wheat. *Plant Soil* 356:139-150.
25. **Crooks GE, Hon G, Chandonia JM, Brenner SE.** 2004. WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res* 14:1188-1190.
26. **Chevallet M, Luche S, Rabilloud T.** 2006. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Nat Protoc* 1:1852-1858.
27. **Churchill MEA, Chen L.** 2011. Structural basis of acyl-homoserine lactone-dependent signaling. *Chem Rev* 111:68-85.
28. **Cohen AC, Bottini R, Piccoli PN.** 2008. *Azospirillum brasilense* Sp 245 produces ABA in chemically-defined culture medium and increases ABA content in *Arabidopsis* plants. *Plant Growth Regul* 54:97-103.
29. **Costacurta A, Keijers V, Vanderleyden J.** 1994. Molecular cloning and sequence analysis of an *Azospirillum brasilense* indole-3-pyruvate decarboxylase gene. *Mol Gen Genet* 243:463-472.
30. **Coulthurst SJ.** 2013. The Type VI secretion system - a widespread and versatile cell targeting system. *Research in Microbiology* 164:640-654.

31. **Creus CM, Graziano M, Casanovas EM, Pereyra MA, Simontacchi M, Puntarulo S, Barassi CA, Lamattina L.** 2005. Nitric oxide is involved in the *Azospirillum brasilense*-induced lateral root formation in tomato. *Planta* 221:297-303.
32. **Crozier A, Arruda P, Jazmin JM, Monteiro AM, Sandberg G.** 1988. Analysis of indole-3-acetic acid and related indoles in culture medium from *Azospirillum lipoferum* and *Azospirillum brasilense*. *Appl Environ Microbiol* 54:2833-2837.
33. **Darwin AJ, Li J, Stewart V.** 1996. Analysis of nitrate regulatory protein NarL-binding sites in the *fdnG* and *narG* operon control regions of *Escherichia coli* K-12. *Mol Microbiol* 20:621-632.
34. **Davlieva M, Shi Y, Leonard PG, Johnson TA, Zianni MR, Arias CA, Ladbury JE, Shamooy Y.** 2015. A variable DNA recognition site organization establishes the LiaR-mediated cell envelope stress response of enterococci to daptomycin. *Nucleic Acids Res* 43:4758-4773.
35. **Doi A, Nakamura H, Shiro Y, Sugimoto H.** 2015. Structure of the response regulator ChrA in the haem-sensing two-component system of *Corynebacterium diphtheria*. 71: Acta Crystallogr F Struct Biol Commun 966-971.
36. **Donati AJ, Lee HI, Leveau JH, Chang WS.** 2013. Effects of indole-3-acetic acid on the transcriptional activities and stress tolerance of *Bradyrhizobium japonicum*. *Plos One* 8:e76559.
37. **Dosselaere F, Vanderleyden J.** 2001. A metabolic node in action: chorismate-utilizing enzymes in microorganisms. *Crit Rev Microbiol* 27: 75-131.
38. **Dubern JF, Diggle SP.** 2008. Quorum sensing by 2-alkyl-4-quinolones in *Pseudomonas aeruginosa* and other bacterial species. *Mol Biosyst* 4:882-888.
39. **Dubern JF, Coppoolse ER, Stiekema WJ, Bloemberg GV.** 2008. Genetic and functional characterization of the gene cluster directing the biosynthesis of putisolvin I and II in *Pseudomonas putida* strain PCL1445. *Microbiology* 154:2070-2083.
40. **Duca D, Lorv J, Patten CL, Rose D, Glick BR.** 2014. Indole-3-acetic acid in plant-microbe interactions. *Antonie van Leeuwenhoek* 106:85-125.
41. **Duca D, Rose DR, Glick BR.** 2014. Characterization of a nitrilase and a nitrile hydratase from *Pseudomonas sp.* Strain UW4 that converts indole-3-acetonitrile to indole-3-acetic acid. *Appl Environ Microbiol* 80:4640-4649.
42. **Eberhard A, Burlingame AL, Eberhard C, Kenyon GL, Neelson KH, Oppenheimer NJ.** 1981. Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fischeri* luciferase. *Biochemistry* 20:2444-2449.
43. **Ellis CM, Nagpal P, Young JC, Hagen G, Guilfoyle TJ, Reed JW.** 2005. Auxin Response Factor1 and Auxin Response Factor2 regulate senescence and floral organ abscission in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 132:4563-4574.
44. **Fioravanti E, Durá MA, Lascoux D, Micossi E, Franzetti B, McSweeney S.** 2008. Structure of the stress response protein DR1199 from *Deinococcus radiodurans*: a member of the DJ-1 superfamily. *Biochemistry* 47:11581-11589.
45. **Flavier AB, Clough SJ, Schell MA, Denny TP.** 1997. Identification of 3-hydroxypalmitic acid methyl ester as a novel autoregulator controlling virulence in *Ralstonia solanacearum*. *Mol Microbiol* 26:251-259.
46. **Foussard M, Garnerone AM, Ni F, Soupène E, Boistard P, Batut J.** 1997. Negative autoregulation of the *Rhizobium meliloti fixK* gene is indirect and requires a newly identified regulator, FixT. *Mol Microbiol* 25:27-37.
47. **Freeman DJ, Falkiner FR, Keane CT.** 1989. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *J Clin Pathol* 42:852-854.
48. **Friml J, Vieten A, Sauer M, Weijers D, Schwarz H, Hamann T, Offringa R, Jürgens G.** 2003. Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of *Arabidopsis*. *Nature* 426:147-153.
49. **Friml J, Wiśniewska J, Benková E, Mendgen K, Palme K.** 2002. Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in *Arabidopsis*. *Nature* 415:806-809.
50. **Fukami J, Nogueira MA, Araujo RS, Hungria M.** 2016. Accessing inoculation methods of maize and wheat with *Azospirillum brasilense*. *AMB Express* 6:3.
51. **Fuqua C, Parsek MR, Greenberg EP.** 2001. Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing. *Annu Rev Genet* 35:439-468.
52. **Galperin MY.** 2006. Structural Classification of Bacterial Response Regulators: Diversity of Output Domains and Domain Combinations. *J Bacteriol* 188:4169-4182.
53. **Ge SM, Tao L, Chen SF.** 2009. Expression and functional analysis of aminotransferase involved in indole-3-acetic acid biosynthesis in *Azospirillum brasilense* Yu62. *Biochemistry (Mosc)* 74:81-84.
54. **Gerstmeir R, Cramer A, Dangel P, Schaffer S, Eikmanns BJ.** 2004. RamB, a novel transcriptional regulator of genes involved in acetate metabolism of *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol* 186:2798-2809.
55. **Glick BR, Penrose DM, Li J.** 1998. A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria. *J Theor Biol* 190:63-68.
56. **Glick BR.** 2005. Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. *FEMS Microbiol Lett* 251:1-7.
57. **González JF, Vittorio V.** 2013. A novel widespread interkingdom signaling circuit. *Trends Plant Sci* 18:167-174.
58. **Grant CE, Bailey TL, Noble WS.** 2011. FIMO: scanning for occurrences of a given motif. *Bioinformatics* 27:1017-1018.
59. **Hamilton S, Bongaerts RJ, Mulholland F, Cochrane B, Porter J, Lucchini S, Lappin-Scott HM, Hinton JC.** 2009. The transcriptional programme of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* reveals a key role for tryptophan metabolism in biofilms. *BMC Genomics* 10:599.
60. **Hartmann A, Rothballer M, Schmid M.** 2008. Lorenz Hiltner, a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research. *Plant Soil* 312:7-14.

61. **Hassen AI, Labuschagne N.** 2010. Root colonization and growth enhancement in wheat and tomato by rhizobacteria isolated from the rhizoplane of grasses. *World J Microbiol Biotechnol* 26:1837-1846.
62. **Howden AJ, Rico A, Mentlak T, Miguet L, Preston GM.** 2009. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a hydrolyses indole-3-acetonitrile to the plant hormone indole-3-acetic acid. *Mol Plant Pathol* 10:857-865.
63. **Huffman JL, Brennan RG.** 2002. Prokaryotic transcription regulators: more than just the helix–turn–helix motif. *Curr Opin Struct Biol* 12:98-106.
64. **Huo Y X, Nan B Y, You C H, Tian Z X, Kolb A, and Wang Y P.** 2006. FIS activates *glnAp2* in *Escherichia coli*: Role of a DNA bend centered at -55, upstream of the transcription start site. *FEMS Microbiol. Lett* 257:99-105.
65. **Hyeon JE, Kang DH, Kim YI, You SK, Han SO.** 2012. GntR-Type transcriptional regulator PckR negatively regulates the expression of phosphoenolpyruvate carboxykinase in *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol* 194:2181-2188.
66. **Idris EE, Iglesias DJ, Talon M, Borriss R.** 2007. Tryptophan-dependent production of indole-3-acetic acid (IAA) affects level of plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Mol Plant Microbe Interact.* 20:619-26.
67. **Ivanova EG, Doronina NV, Trotsenko IuA.** 2001. Aerobic methylobacteria are capable of synthesizing auxins. *Mikrobiologiya* 70:452-458.
68. **Jiang X, Gao J, Xu F, Cao Y, Tang X, Zhang X.** 2013. Diversity of endophytic bacteria in rice seeds and their secretion of indole acetic acid. *Wei Sheng Wu Xue Bao* 53:269-275.
69. **Jijón-moreno, Marcos-Jiménez C, Pedraza RO, Ramírez-Mata A, de Salomone IG, Fernández-Escavino A, Vásquez-Hernández CA, Soto-Urzúa L, Baca BE.** 2015. The *ipdC*, *hisC1* and *hisC2* genes involved in indole-3-acetic production used as alternative phylogenetic markers in *Azospirillum brasilense*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 107:1501-1517.
70. **Jutras BL, Verma A, Stevenson B.** 2012. Identification of novel DNA binding proteins using DNA affinity chromatography-pulldown. *Curr Protoc Microbiol* 1F.1.1-13.
71. **Kachlany SC, Levery SB, Kim JS, Reuhs BL, Lion LW.** 2001. Structure and carbohydrate analysis of the exopolysaccharide capsule of *Pseudomonas putida* G7. *Environ Microbiol* 3:774-784.
72. **Kazan K, Manners JM.** 2009. Linking development to defense: auxin in plant–pathogen interactions. *Trends Plant Sci* 14:373-382.
73. **Kern D, Volkman BF, Luginbühl P, Nohaile MJ, Kustu S, Wemmer DE.** 1999. Structure of a transiently phosphorylated switch in bacterial signal transduction. *Nature* 402:894-898.
74. **Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, Wass MN, Sternberg MJ.** 2015. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat Protoc* 10:845-858.
75. **Kloepper JW, Schroth MN.** 1978. Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. In *Station de Pathologie, Proceedings of the 4th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria, Tours, France, 27 August–2 September 1978; Végétale et Phyto-Bactériologie*, Ed. pp. 879-882.
76. **Kobayashi M, Izui H, Nagasawa T, Yamada H.** 1993. Nitrilase in biosynthesis of the plant hormone indole-3-acetic acid from indole-3-acetonitrile: cloning of the *Alcaligenes* gene and site-directed mutagenesis of cysteine residues. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:247-251.
77. **Koga J, Syono K, Ichikawa T, Adachi T.** 1994. Involvement of L-tryptophan aminotransferase in indole-3-acetic acid biosynthesis in *Enterobacter cloacae*. *Biochim Biophys Acta* 1209:241-247.
78. **Kumar S, Stecher K, Tamura K.** 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol* 33:1870-1874.
79. **Lambers H, Mougél C, Jaillard B, Hinsinger P.** 2009. Plant-microbe-soil interactions in the rhizosphere: an evolutionary perspective. *Plant Soil* 321:83-115.
80. **Lambrecht M, Vande Broek A, Dosselaere F, and Vanderleyden J.** 1999. The *ipdC* promoter auxin-responsive element of *Azospirillum brasilense*, a prokaryotic ancestral form of the plant AuxRE? *Mol Microbiol* 32:889-891.
81. **Latifi A, Foglino M, Tanaka K, Williams P, Lazdunski A.** 1996. A hierarchical quorum-sensing cascade in *Pseudomonas aeruginosa* links the transcriptional activators LasR and RhIR (VsmR) to expression of the stationary phase sigma factor RpoS. *Mol Microbiol* 21:1137-1146.
82. **Lebuhn M, Heulin T, Hartmann A.** 1997. Production of auxin and other indolic and phenolic compounds by *Paenibacillus polymyxa* strains isolated from different proximity to plant roots. *FEMS Microbiol Ecol* 22:325-334.
83. **Leoni L, Ascenzi P, Bocedi A, Rampioni G, Castellini L, Zennaro E.** 2003. Styrene-catabolism regulation in *Pseudomonas fluorescens* ST: phosphorylation of StyR induces dimerization and cooperative DNA-binding. *Biochem Biophys Res Commun* 303:926-931.
84. **Lin L, Xu X.** 2013. Indole-3-acetic acid production by endophytic *Streptomyces* sp. isolated from Medicinal Plants. *Curr Microbiol* 67:209-17.
85. **Longo F, Rampioni G, Bondi R, Imperi F, Fimia GM, Visca P, Zennaro E, Leoni L.** 2013. A new transcriptional repressor of the *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing receptor gene *lasR*. *Plos One* 8:e69554.
86. **Lundgren BR, Thornton W, Dornan MH, Villegas-Peñaranda LR, Boddy CN, Nomura CT.** 2013. Gene PA2449 is essential for glycine metabolism and pyocyanin biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol* 195:2087-2100.
87. **Mai X, Adams MW.** 1994. Indolepyruvate ferredoxin oxidoreductase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. A new enzyme involved in peptide fermentation. *J Biol Chem* 269:16726-16732.
88. **Malhotra M, Srivastava S.** 2008. An *ipdC* gene knock-out of *Azospirillum brasilense* strain SM and its implications on indole-3-acetic acid biosynthesis and plant growth promotion. *Antonie van Leeuwenhoek* 93:425-433.

89. **Mattsson J, Kcurshumova W, Berleth T.** 2003. Auxin signaling in *Arabidopsis* leaf vascular development. *Plant Physiol* 131:1327-1339.
90. **Malhotra V, Agrawal R, Duncan TR, Saini DK, Clark-Curtiss JE.** 2015. *Mycobacterium tuberculosis* response regulators, DevR and NarL, interact in vivo and co-regulate gene expression during aerobic nitrate metabolism. *J Biol Chem* 290:8294-8309.
91. **Maris AE, Sawaya MR, Kaczor-Grzeskowiak M, Jarvis MR, Bearson SM, Kopka ML, Schröder I, Gunsalus RP, Dickerson RE.** 2002. Dimerization allows DNA target site recognition by the NarL response regulator. *Nat Struct Biol* 9:771-8.
92. **Martin, RG, Rosner, JL.** (1995). Binding of purified multiple antibiotic-resistance repressor protein (MarR) to mar operator sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:5456-5460.
93. **McMillan M, Pereg L.** 2014. Evaluation of reference genes for gene expression analysis using quantitative RT-PCR in *Azospirillum brasilense*. *Plos One* 9:e98162.
94. **Michael B, Smith JN, Swift S, Heffron F, Ahmer BM.** 2001. SdiA of *Salmonella enterica* is a LuxR homolog that detects mixed microbial communities. *J Bacteriol* 183:5733-5742.
95. **Milcamps A, van Dommelen A, Stigter J, Vanderleyden J, de Bruijn FJ.** 1996. The *Azospirillum brasilense rpoN* gene is involved in nitrogen fixation, nitrate assimilation, ammonium uptake, and flagellar biosynthesis. *Can J Microbiol* 42:467-478.
96. **Miller MB, Bassler BL.** 2001. Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol* 55:165-199.
97. **McMillan M, Pereg L.** 2014. Evaluation of Reference Genes for Gene Expression Analysis Using Quantitative RT-PCR in *Azospirillum brasilense*. *PLoS One*. 9: e98162.
98. **Miller.** Experiments in molecular genetics. 1972. Cold Spring Harbor Laboratories pages. 352-355.
99. **Mockaitis K, Estelle M.** 2008. Auxin Receptors and Plant Development: A New Signaling Paradigm. *Annu Rev Cell Dev Biol* 24:55-80.
100. **Münc R, Hiller K, Grote A, Scheer M, Klein J, Schobert M, Jahn D.** 2005. Virtual Footprint and PRODORIC: an integrative framework for regulon prediction in prokaryotes. *Bioinformatics* 21:4187-4189.
101. **Nagasawa T, Mauger J, Yamada H.** 1990. A novel nitrilase, arylacetone nitrilase, of *Alcaligenes faecalis* JM3. *Eur J Biochem* 194:765-772.
102. **Naveed M, Qureshi MA, Zahir ZA, Hussain MB, Sessitsch A, Mitter B.** 2015. L-Tryptophan-dependent biosynthesis of indole-3-acetic acid (IAA) improves plant growth and colonization of maize by *Burkholderia phytofirmans* PsJN. *Ann Microbiol* 65:1381-1389.
103. **Neidhardt FC, Curtiss R, Ingraham JL, Lin ECC, Low KB, Magasanik B, Reznikoff WS, Riley M, Schaechter M, Umberger HE.** 1996. *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. American Society for Microbiology.
104. **Okon Y, Albrecht SL, Burris RH.** 1977. Methods for growing *Spirillum lipoferum* and for counting it in pure culture and in association with plants. *Appl Environ Microbiol* 33:85-88.
105. **Omay SH, Schmidt WA, Martin P, Bangerth F.** 1993. Indole acetic acid production by the rhizosphere bacterium *Azospirillum brasilense* Cd under *in vitro* conditions. *Can J Microbiol* 39:187-192.
106. **Omay SH, Schmidt WA, Martin P, Bangerth F.** 1993. Indoleacetic acid production by the rhizosphere bacterium *Azospirillum brasilense* cd under *in vitro* conditions. *Can J Microbiol* 39:187-192.
107. **Ona O, Van Impe J, Prinsen E, Vanderleyden J.** 2005. Growth and indole-3-acetic acid biosynthesis of *Azospirillum brasilense* Sp245 is environmentally controlled. *FEMS Microbiol Lett* 246:125-132.
108. **Pannen D, Fabisch M, Gausling L, Schnetz K.** 2016. Interaction of the RcsB Response Regulator with Auxiliary Transcription Regulators in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 291:2357-2370.
109. **Patten CL, Blakney AJ, Coulson TJ.** 2012. Activity, distribution and function of indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in bacteria. *Crit Rev Microbiol* 39:395-415.
110. **Patten CL, Glick BR.** 2002. Regulation of indoleacetic acid production in *Pseudomonas putida* GR12-2 by tryptophan and the stationary phase sigma factor RpoS. *Can J Microbiol* 48:635-642.
111. **Patten CL, Glick BR.** 2002. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Appl Environ Microbiol* 68:3795-3801.
112. **Pedraza RO, Ramirez-Mata A, Xiqui ML, Baca BE.** 2004. Aromatic amino acid aminotransferase activity and indole-3-acetic acid production by associate nitrogen-fixing bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 233:15-21.
113. **Perera IC, Grove A.** 2010. Molecular mechanisms of ligand-mediated attenuation of DNA binding by MarR family transcriptional regulators. *J Mol Cell Biol* 2:243-254.
114. **Philippot L, Raaijmakers JM, Lemanceau P, van der Putten WH.** 2013. Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nat Rev Microbiol* 11:789-799.
115. **Plate L, Marletta MA.** 2013. Phosphorylation-dependent derepression by the response regulator HnoC in the *Shewanella oneidensis* nitric oxide signaling network. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:4648-4657.
116. **Pittard J, Camakaris H, Yang J.** 2005. The TyrR regulon. *Mol Microbiol* 55:16-26.
117. **Pollmann S, Müller A, Weiler EW.** 2006. Many roads lead to "auxin": of nitrilases, synthases, and amidases. *Plant Biol* 8:326-333.
118. **Prinsen, E., Costacurta, A., Michiels, K., Vanderleyden, J., and Van Onckelen, H.** 1993. *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid biosynthesis: evidence for a non-tryptophan dependent pathway. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 6:609-615.

119. Puyvelde SV, 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. *Microb Ecol* 62:723-728.
120. Raddidi N, Cherif A, Boudabous A, Daffonchio D. 2008. Screening of plant growth promoting traits of *Bacillus thuringiensis*. *Ann Microbiol* 58:47-52.
121. Ramírez-Mata A, López-Lara LI, Xiqui-Vázquez ML, Jijón-Moreno S, Romero-Osorio A, Baca BE. 2016. The cyclic-di-GMP diguanylate cyclase CdgA has a role in biofilm formation and exopolysaccharide production in *Azospirillum brasilense*. *Res Microbiol* 167:190-201.
122. Rariz G, Martínez A, Ferrando L, Menes RJ, Fernández-Scavino A. 2013. Characterization and interactions between rice-associated bacteria with plant-growth promoting properties. *Rev Agron N O Argent* 33:13-24.
123. Reinhardt D, Mandel T, Kuhlemeier C. 2000. Auxin regulates the initiation and radial position of plant lateral organs. *Plant Cell* 12:507-518.
124. Reitzer, LJ. 1996. Ammonia assimilation and the biosynthesis of glutamine, glutamate, aspartate, asparagine, L-alanine, and D-alanine. p. 391-407.
125. Rodríguez-Moya J, Argandoña M, Reina-Bueno M, Nieto JJ, Iglesias-Guerra F, Jebbar M, Vargas C. 2010. Involvement of EupR, a response regulator of the NarL/FixJ family, in the control of the uptake of the compatible solutes ectoines by the halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigenis*. *BMC Microbiol* 10:256.
126. Rothballer M, Schmid M, Fekete A, Hartmann A. 2005. Comparative in situ analysis of *ipdC-gfpmut3* promoter fusions of *Azospirillum brasilense* strains Sp7 and Sp245. *Enviro Microbiol* 7:1839-1846.
127. Rouanet, C., Reverchon, S., Rodionov, D.A., and Nasser, W. 2004. Definition of a consensus DNA-binding site for PecS, a global regulator of virulence gene expression in *Erwinia chrysanthemi* and identification of new members of the PecS regulon. *J Biol Chem* 279:30158-30167.
128. Ruckdäschel E, Kittell BL, Helinski DR, Klingmüller W. 1988. Aromatic amino acid aminotransferases of *Azospirillum lipoferum* and their possible involvement in IAA biosynthesis. In *Azospirillum IV: Genetics, physiology, ecology* (ed. Klingmüller W) Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
129. Ryu RJ, Patten CL. 2008. Aromatic amino acid-dependent expression of indole-3-pyruvate decarboxylase is regulated by TyrR in *Enterobacter cloacae* UW5. *J Bacteriol* 190:7200-7208.
130. Saleh SS, Glick BR. 2001. Involvement of *gacS* and *rpoS* in enhancement of the plant growth-promoting capabilities of *Enterobacter cloacae* CAL2 and UW4. *Can J Microbiol* 47:698-705.
131. Salunkhe P, Töpfer T, Buer J, Tümmler B. 2005. Genome-wide transcriptional profiling of the steady-state response of *Pseudomonas aeruginosa* to hydrogen peroxide. *J Bacteriol* 187:2565-2572.
132. Sambrook J, Russell DW. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual. CSHL Press 4<sup>th</sup> ed.
133. Schell MA. 1993. Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators. *Annu Rev Microbiol* 47:597-626.
134. Schaefer AL, Greenberg EP, Oliver CM, Oda Y, Huang JJ, Bittan-Banin G, Peres CM, Schmidt S, Juhaszova K, Sufrin JR, Harwood CS. 2008. A new class of homoserine lactone quorum-sensing signals. *Nature* 454:595-599.
135. Schägger H. 2006. Tricine-SDS-PAGE. *Nat Protoc* 1:16-22.
136. Schultz J, Milpetz F, Bork P, Ponting CP. 1998. SMART, a simple modular architecture research tool: Identification of signaling domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:5857-5864.
137. Schütz A, Golbik S, König S, Hübner G, Tittmann K. 2005. Intermediates and transition states in thiamin diphosphate-dependent decarboxylases. A kinetic and NMR study on wild-type indolepyruvate decarboxylase and variants using indolepyruvate, benzoylformate, and pyruvate as substrates. *Biochemistry* 44:6164-6179.
138. Shao J, Li S, Zhang N, Cui X, Zhou X, Zhang G, Shen Q, Zhang R. 2015. Analysis and cloning of the synthetic pathway of the phytohormone indole-3-acetic acid in the plant-beneficial *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9. *Microb Cell Fact* 14:130.
139. Shu HY, Lin LC, Lin TK, Chen HP, Yang HH, Peng KC, Lin GH. 2015. Transcriptional regulation of the *iac* locus from *Acinetobacter baumannii* by the phytohormone indole-3-acetic acid. *Antonie van Leeuwenhoek* 107:1237-1247.
140. Sievers F, Wilm A, Dineen D, Gibson TJ, Karplus K, Li W, Lopez R, McWilliam H, Remmert M, Söding J, Thompson JD, Higgins DG. 2011. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol* 7:539.
141. Singh VS, Dubey AP, Gupta A, Singh S, Singh BN, Tripathi AK. 2017. Regulation of a Glycerol-Induced Quinoprotein Alcohol Dehydrogenase by  $\sigma_{54}$  and a LuxR-Type Regulator in *Azospirillum brasilense* Sp7. *J Bacteriol* 199: e00035-17.
142. Simon S, Petrášek J. 2011. Why plants need more than one type of auxin. *Plant Sci* 180:454-460.
143. Smidt M, Kosuge T. 1978. The role of indole-3-acetic acid accumulation by alpha methyl tryptophan-resistant mutants of *Pseudomonas savastanoi* in gall formation on oleanders. *Physiol Plant Pathol* 13:203-214.
144. Smith JN, Ahmer BM. 2003. Detection of other microbial species by *Salmonella*: expression of the SdiA regulon. *J Bacteriol* 185:1357-1366.
145. Sokolova MG, Akimova GP, Vaishlia OB. 2011. Effect of phytohormones synthesized by rhizosphere bacteria on plants. *Prikl Biokhim Mikrobiol* 47:302-307.
146. Somers E, Ptacek D, Gysegom P, Srinivasan M, Vanderleyden J. 2005. *Azospirillum brasilense* produces the auxin-like phenylacetic acid by using the key enzyme for indole-3-acetic acid biosynthesis. *Appl Environ Microbiol* 71:1803-1810.
147. Soto-Urzúa L, Xochinua-Corona YG, Flores-Encarnación M, Baca BE. 1996. Purification and properties of aromatic amino acid aminotransferases from *Azospirillum brasilense* UAP 14 strain. *Can J Microbiol* 42:294-298.
148. Spaepen S, Vanderleyden J. 2010. Auxin and plant-microbe interactions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3:a001438.

149. Spaepen S, Versées W, Gocke D, Pohl M, Steyaert J, Vanderleyden J. 2007. Characterization of phenylpyruvate decarboxylase, involved in auxin production of *Azospirillum brasilense*. *J Bacteriol* 189:7626-7633.
150. Spirig T, Tiaden A, Kiefer P, Buchrieser C, Vorholt JA, Hilbi H. 2008. The *Legionella* autoinducer synthase LqsA produces an alpha-hydroxyketone signaling molecule. *J Biol Chem* 283:18113-18123.
151. Stapleton MR, Norte VA, Read RC, Green J. 2002. Interaction of the *Salmonella typhimurium* transcription and virulence factor SlyA with target DNA and identification of members of the SlyA regulon. *J Biol Chem* 277:17630-17637.
152. Stewart V. 1993. Nitrate regulation of anaerobic respiratory gene expression in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 9:425-434.
153. Studholme DJ, Dixon R. 2003. Domain architectures of sigma54-dependent transcriptional activators. *J Bacteriol* 185:1757-1767.
154. Subramoni S, Venturi V. 2009. LuxR-family 'solos': bachelor sensors/regulators of signalling molecules. *Microbiology* 155:1377-1385.
155. Szkop M, Bielawski W. 2013. *tyrB-2* and *phhC* genes of *Pseudomonas putida* encode aromatic amino acid aminotransferase isozymes: evidence at the protein level. *Amino Acids* 45:351-358.
156. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28:2731-2739.
157. Thepsukhon A, Choonluchanon S, Tajima S, Nomura M, Ruamrungsri S. 2013. Identification of endophytic bacteria associated with N<sub>2</sub> fixation and indole acetic acid synthesis as growth promoters in *Curcuma alismatifolia* gagnep. *J Plant Nutr* 36:1424-1438.
158. Thomashow LS, Reeves S, Thomashow MF. 1984. Crown gall oncogenesis: evidence that a T-DNA gene from the *Agrobacterium* Ti plasmid pTiA6 encodes an enzyme that catalyzes synthesis of indoleacetic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:5071-5075.
159. Tien TM, Gaskins MH, Hubbell DH. 1979. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of Pearl Millet (*Pennisetum americanum* L.). *Appl Environ Microbiol* 37:1016-1024.
160. Vande Broek A, Gysegom P, Ona O, Hendrickx N, Prinsen E, Van Impe J, Vanderleyden J. 2005. Transcriptional analysis of the *Azospirillum brasilense* indole-3-pyruvate decarboxylase gene and identification of a cis acting sequence involved in auxin responsive expression. *Mol Plant Microbe Interact* 18:311-323.
161. Vande Broek A, Lambrecht M, Eggermont K, Vanderleyden J. 1999. Auxins upregulate expression of the indole-3-pyruvate decarboxylase gene in *Azospirillum brasilense*. *J Bacteriol* 181:1338-1342.
162. Vande Broek A, Lambrecht M, Eggermont K, Vanderleyden J. 1999. Auxins upregulate expression of the indole-3-pyruvate decarboxylase gene in *Azospirillum brasilense*. *J Bacteriol* 181:1338-1342.
163. Vande Broek A., Gysegom, P., Ona, O., Hendrickx, N., Prinsen, E., Van Impe, J., and Vanderleyden, J. 2005. Transcriptional analysis of the *Azospirillum brasilense* indole-3-pyruvate decarboxylase gene and identification of a cis-acting sequence involved in auxin responsive expression. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 18:311-323.
164. Venkatesh GR, Kembou Koungni FC, Paukner A, Stratmann T, Blissenbach B, Schnetz K. 2010. BglJ-RcsB heterodimers relieve repression of the *Escherichia coli* *bgl* operon by H-NS. *J Bacteriol* 192:6456-6464.
165. Vessey JK. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as bio-fertilizers. *Plant Soil* 255:571-586.
166. Wang Y, Kolb A, Buck M, Wen J, Gara F, Buc H. 1998. CRP interacts with promoter-bound  $\sigma$ 54 RNA polymerase and blocks transcriptional activation of the *dctA* promoter. *The EMBO Journal* 17:786-796.
167. Wang S, Bai Y, Shen C, Wu Y, Zhang S, Jiang D, Guilfoyle TJ, Chen M, Qi Y. 2010. Auxin-related gene families in abiotic stress response in *Sorghum bicolor* *Funct Integr Genomics* 10:533-546.
168. Wehland M, Kiecker C, Coplin DL, Kelm O, Saenger W, Bernhard F. 1999. Identification of an RcsA/RcsB recognition motif in the promoters of exopolysaccharide biosynthetic operons from *Erwinia amylovora* and *Pantoea stewartii* subspecies *stewartii*. *J Biol Chem* 274:3300-3307.
169. Whelan S, Goldman N. 2001. A general empirical model of protein evolution derived from multiple protein families using a maximum-likelihood approach. *Mol Biol Evol* 18:691-699.
170. Wisniewski-Dyé F, Lozano L, Acosta-Cruz E, Borland S, Drogue B, Prigent-Combaret C, Rouy Z, Barbe V, Mendoza-Herrera A, González V, Mavingui P. 2012. Genome sequence of *Azospirillum brasilense* CBG497 and comparative analyses of *Azospirillum* core and accessory genomes provide insight into niche adaptation. *Genes* 3:576-602.
171. Yuan ZC, Haudecoeur E, Faure D, Kerr KF, Nester EW. 2008. Comparative transcriptome analysis of *Agrobacterium tumefaciens* in response to plant signal salicylic acid, indole-3-acetic acid and g-amino butyric acid reveals signalling cross-talk and *Agrobacterium*-plant co-evolution. *Cell Microbiol* 10:2339-2354.
172. Zhang RG, Pappas KM, Brace JL, Miller PC, Oulmassov T, Molyneaux JM, Anderson JC, Bashkin JK, Winans SC, Joachimiak A. 2002. Structure of a bacterial quorum-sensing transcription factor complexed with pheromone and DNA. *Nature* 417:971-974.
173. Zimmer W, Wesche M, Timmermans L. 1998. Identification and isolation of the indole-3-pyruvate decarboxylase gene from *Azospirillum brasilense* Sp7: sequencing and functional analysis of the gene locus. *Curr Microbiol* 36:327-331.
174. Zimmer W, Aparicio C, Elmerich C. 1991. Relationship between tryptophan biosynthesis and indole-3-acetic acid production in *Azospirillum*: identification and sequencing of a *trpGDC* cluster. *Mol gen genet* 229:41-51.
175. Zimmer W, Elmerich C. 1992. Organization of *trpG*, *trpD* and *trpC* in *Azospirillum brasilense* Sp7. *Symbiosis* 13:133-137.

