



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

ESCUELA DE BIOLOGÍA

Obtención de la mutante del gen *hskA* (cinasa histidínica putativa) por delección en *A. brasilense* Sp245

TESIS PRESENTADA COMO REQUISITO PARA OBTENER EL
TÍTULO DE:

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA:
Adrian González Martínez

TUTOR:
D.C. Alberto Ramírez Mata



PUEBLA, PUE.

Noviembre 2015

Agradecimientos

Al laboratorio Interacción Bacteria-Planta del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, por brindarme todas las facilidades para la realización de este trabajo.

A la Dra. Beatriz Eugenia Baca por haberme aceptado como parte de su equipo de trabajo en el laboratorio y brindarme todas las herramientas necesarias para llevar a cabo el tema de investigación.

A mi director de tesis, Dr. Alberto Ramírez Mata por el tiempo invertido en el asesoramiento de este trabajo y por su valiosa dirección en mi formación académica con sus comentarios y sugerencias que enriquecieron este trabajo.

Al Mtro. Joaquín Aguilar Piedras por ayudarme en la realización de varios experimentos, por su disposición y paciencia.

A la Mtra. María Luisa Xiqui por apoyarme y asesorarme en los experimentos realizados y por la confianza que me brindó.

A mi familia y a mi novia por otorgarme su cariño que me han inspirado a seguir adelante y nunca rendirme y por demostrándome su apoyo incondicional.

A todos mis compañeros de laboratorio que me brindaron su amistad e hicieron de mi estadía muy grata.

“Esta investigación fue realizada gracias al apoyo del Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Puebla”.

INDICE

Resumen	6
I. Introducción	8
I.1 Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal	8
I.2 <i>Azospirillum</i>	9
I.3 Secreción de exudados radiculares	10
I.4 Quimiotaxis y aerotaxis	10
I.5 Colonización y Asociación <i>Azospirillum</i> -planta	11
I.6 Transducción de señales	12
II. Antecedentes	13
II.1 Sistema de transducción de señales de dos componentes	13
II.3 Fosforrelevo	15
II.4 Sistema de dos componentes en <i>E. coli</i> y <i>A. brasilense</i>	15
III. Antecedentes directos	18
IV. Hipótesis	20
V. Justificación	20
VI. Objetivos	20
VI.1 General.....	20
VI.1.1 Específicos	20
VII. Material y métodos	21
VII.1 Material biológico.....	21
VII.2 Métodos	21
VII.2.1 Condiciones de cultivo	21
VII.2.2 Extracción de ADN genómico y plasmídico	22
VII.2.3 Diseño de oligonucleótidos.....	22
VII.2.4 Estandarización de las condiciones de amplificado.....	23
VII.2.5 Clonación de los fragmentos A y B en el vector pGEM-T easy	24
VII.2.6 Transformación de células.....	24
VII.2.7 Subclonación en el vector suicida pk18mobsacB y verificación	24
VII.2.8 Secuenciación	25

VII.2.9	Conjugación.....	25
VII.2.10	Electroporación.....	25
VII.2.11	Selección de mutantes	26
VIII.	Esquema general del trabajo.....	28
IX.	Resultados	29
IX.1	Amplificado de los fragmentos A y B del gen <i>hskA</i>	29
IX.2	Clonación en el vector de expresión pGEM-T easy.....	30
IX.3	Suclonación en el vector suicida pk18mobsacB y verificación	30
IX.4	Secuenciación	36
IX.5	Obtención de la mutante.....	36
X.	Discusión.....	38
	Bibliografía.....	42

Resumen

Azospirillum brasilense es una Rizobacteria promotora del crecimiento vegetal (PGPR) conocida por tener un amplio rango de plantas hospederas. Generalmente para una efectiva interacción bacteria-planta, *A. brasilense* Sp245 activa los procesos de quimiotaxis y aerotaxis en respuesta a los exudados radiculares que generan la efectiva colonización a la raíz, estas bacterias experimentan variaciones en cuanto a temperatura, salinidad, osmolaridad, pH así como de la disponibilidad de nutrientes y oxígeno, por lo que constantemente ajustan su metabolismo y comportamiento bajo distintos parámetros ambientales. En este comportamiento se encuentran participando sistemas de transducción de señales de dos componentes (TCS) mediante los cuales las bacterias pueden detectar y responder a su ambiente, estos sistemas generalmente comprenden un receptor cinasa histidínica que sensa una señal específica y traslada esa señal por medio de la fosforilación a un regulador de respuesta afín y es esta cascada de señalización la que permite generar una ventaja para encontrar recursos limitados y sobrevivir en el ambiente local donde la competitividad por los recursos son muy altos.

En *A. brasilense* Sp245 los análisis bioinformáticos identificaron un gen que codifica para una cinasa histidínica putativa (*hskA*) que se localiza en el plásmido 3 y que es parte de un operón de quimiotaxis, estos resultados *in silico* fueron corroborados con las mutantes *A. brasilense* ABHK::Tc^r y *A. brasilense* 204-4 Δ *hskA*::km^r las cuales presentaron una disminución en la movilidad con respecto a la cepa silvestre, sin embargo la presencia de un casete de tetraciclina y de kanamicina, respectivamente, genero un efecto polar asignando fenotipos mutantes donde se había perturbado el gen colindante *cheY*-Like, por lo que en el presente trabajo se implementó una nueva estrategia para generar una mutante sin marcador de selección utilizando el sistema del vector suicida pk18mobsacB, para tal estrategia se probaron varias condiciones de cultivo así como de dos técnicas de transferencia de genes (conjugación y electroporación) sin embargo el doble intercambio alélico en *A. brasilense* Sp245 parece ser un evento difícil de

llevarse a cabo por lo que hay una predominancia en obtener una mayor frecuencia de mutantes merodiploides.

I. Introducción

I.1 Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal

Las bacterias benéficas que habitan la rizósfera son conocidas como rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal, PGPRs debido a que son capaces de promover el crecimiento, mejorar la competitividad de las plantas y estimular respuestas a factores externos de estrés. Por lo general las PGPRs interactúan de manera positiva con las plantas generando una estimulación en el crecimiento por mecanismos directos tales como la solubilización de fosfatos, fijación de nitrógeno, producción y secreción de sustancias tales como reguladores de crecimiento o bien de manera indirecta por mecanismos como: exclusión competitiva de patógenos o remoción de sustancias fitotóxicas (Bhattacharyya *et al.*, 2012). Estas bacterias experimentan variaciones en cuanto a temperatura, salinidad, osmolaridad, pH así como de la disponibilidad de nutrientes y oxígeno, por lo que constantemente ajustan su metabolismo y comportamiento bajo distintos parámetros ambientales permitiéndoles de esa manera sobrevivir y desarrollarse (Paldi-Fibach *et al.*, 2011).

Actualmente la aplicación de la biotecnología ha promovido el estudio y aplicación de dichos microorganismos benéficos que se encuentran en el suelo por su capacidad para estimular el crecimiento vegetal aumentando los sistemas radiculares en cuanto a longitud de las raíces laterales y número de pelos radiculares estructuras que promueven en la planta una mayor absorción de nutrientes provenientes del subsuelo. También se han utilizado como agentes de control biológico de patógenos al secretar metabolitos anti-fungicos (AFMs), como fenazinas, 2, 4-diacetilfloroglucinol (DAPG), viscosinamidas, entre otras y para aspectos de biorremediación, con la finalidad de obtener una producción agrícola mayor y de esa manera disminuir la utilización de fertilizantes y productos químicos que empobrecen y contaminan los suelos (Bashan *et al.*, 1990; Perrig *et al.*, 2006; Martínez-Miranda *et al.*, 2007; Biari *et al.*, 2008).

I.2 Azospirillum

Una bacteria PGPR importante para la agricultura es *Azospirillum* la cual se ha aislado de plantas gramíneas, y no gramíneas. El género comprende especies como: *A. brasilense*, *A. lipoferum*, *A. amazonense*, *A. irakense*, *A. halopraeferens* y *A. largimobile*, que generalmente contienen un genoma que varía de un mínimo de 4.8 Mbp en *A. irakense* a 9.7 Mbp en *A. lipoferum* Sp59b, además contienen distintos plásmidos con tamaños que van de 40 kpb a 550 kpb, donde la información genética se encuentra distribuida en distintos replicones (Martin-Didonet *et al.*, 2000), estas bacterias son capaces de fijar el nitrógeno (N₂) ya sea como bacterias de vida libre o en asociación con plantas, se encuentran ampliamente distribuidas desde las zonas templadas hasta las zonas tropicales y subtropicales, son Gram negativas, en forma vibroide, con un flagelo polar y flagelos laterales (Sukiman & New, 1990; Biari *et al.*, 2008). Desde hace varios años el género *Azospirillum* ha sido utilizado por su capacidad para promover el crecimiento radical en distintas especies vegetales, particularmente en granos como: el arroz, el sorgo, el maíz y el trigo (Bashan *et al.*, 1990; Sukiman & New, 1990; Vande *et al.*, 1998). Además son capaces de inducir resistencia a patógenos, inhibir la proliferación de plantas parasitarias por la producción de sustancias microbiales tóxicas (bacteriocinas, y ácido fenilacético) y por estimular la producción de hormonas vegetales (auxinas, citocininas, giberelinas y óxido nítrico) las cuales promueven la diferenciación celular epidermica en los pelos radiculares que incrementan el número de sitios potenciales y longitud las raíces laterales (Bashan & Holguin., 1997; Tien *et al.*, 1979; Perrig *et al.*, 2006; Paldi-Fibach *et al.*, 2011) y cuando se encuentran en estados de estrés estas bacterias son capaces de formar quistes de resistencia como mecanismo de supervivencia en la rizósfera, estos quistes contienen poli-beta-hidroxibutirato (PHB) como material de reserva y también presentan un sistema de adquisición de hierro a través de sideróforos que le permite tomarlo de la rizósfera y de esa manera impedir que otros microorganismos puedan utilizarla (Parra & Cuevas, 2002).

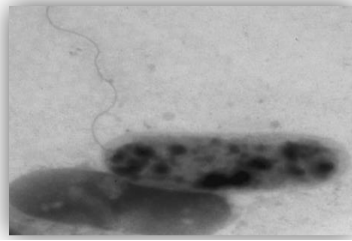


Fig. 1.- Microscopia de transmisión de electrones de *A. brasilense* Sp245, (Shelud'ko *et al.*, 2015).

I.3 Secreción de exudados radiculares

Cuando la planta se encuentra bajo ataque provee una actividad selectiva específica de elementos que permiten a las células rizodermicas secretar un amplio rango de compuestos que incluyen iones, ácidos orgánicos, iones inorgánicos, fitosideroforos, azúcares, vitaminas, aminoácidos, purinas y nucleosidos, tales compuestos son denominados exudados radiculares (Bulgarelli *et al.*, 2013), los cuales influyen en funciones específicas del microbioma, en el quorum sensing, en la regulación de la expresión de genes microbianos (Bakker *et al.*, 2013), por lo que estos son un importante recurso de nutrientes para los microorganismos presentes en el suelo donde se llevan a cabo procesos de colonización por mecanismos quimiotácticos.

I.4 Quimiotaxis y aerotaxis

En *A. brasilense* la quimiotaxis es un proceso activado por cambios en el pH, temperatura, osmolaridad y viscosidad de los exudados los cuales son sentidos por las bacterias que se encuentran cercanas a la planta, permitiendo activar esta habilidad para ser atraídas o repelidas por gradientes químicos de concentración, por lo que se encuentran regulados por múltiples comportamientos en respuesta a cambios en el ambiente que influyen en los patrones de motilidad, producción de exopolisacáridos estrechamente relacionados con la floculación y la interacción célula-célula, por ejemplo, en cianobacterias la quimiotaxis juega un papel importante para su establecimiento y mantenimiento, por lo que la capacidad para sensor quimiotácticamente y buscar superficies enriquecidas ofrece una ventaja bajo condiciones de escases de nutrientes (Pearl & Gallucci, 1985; Bashan &

Holguin, 1995; Bacilio-jimenez *et al.*, 2003). Así mismo la generación de energía y la capacidad para fijar nitrógeno se ven envueltos en un proceso denominado aerotaxis el cual requiere una alta motilidad y una alta tasa de respiración en *A. brasilense* que se ven afectados por el pH y por la inhibición de la respiración provocando una respuesta que guía hacia concentraciones óptimas de oxígeno 3-5 μM (Barak *et al.*, 1982, Xie *et al.*, 2010).

I.5 Colonización y Asociación *Azospirillum*-planta

A través del incremento de la secreción de exudados radiculares *Azospirillum* realiza un cambio en los patrones de flagelación promoviendo el desplazamiento y colonización a la raíz siendo el factor más importante para la estimulación posterior al crecimiento vegetal empleando así dos procesos de colonización que se caracterizan por su localización en la planta hospedera:

- a) Una población externa que se localiza en la superficie de la rizósfera en la capa de mucilago.
- b) Una población interna que se localiza en los espacios intercelulares de la corteza radical.

Este mecanismo complejo de colonización involucra dos pasos importantes, la primera ocurre por la migración de los microorganismos hacia la rizósfera que se acompaña del movimiento a lo largo de la raíz que es mediada por el flagelo polar y la aglutinación provocada por los exudados radiculares siendo aún reversible porque se compone principalmente de proteínas que se basan en uniones fisicoquímicas y la segunda ocurre en medios ricos en carbono y nitrógeno donde la bacteria se adhiere al sustrato y en ese momento la bacteria deja de ser de vida libre para ser sésil por lo que es un proceso irreversible, ya que se forma una biopelícula de polisacáridos que unen a la bacteria con la superficie radical que se encuentra estrechamente relacionado por el elevado nivel c-di-GMP intracelular que promueve esta transición de las células (Vande *et al.*, 1998; Bashan *et al.*, 2004; Alexandre *et al.*, 2010). Esta migración realizada desde el suelo puede variar desde unos pocos micrómetros hasta algunos centímetros y ocurre en un

ambiente de alta competencia donde los nutrientes y los sitios de colonización son esenciales para la supervivencia de los microorganismos.

Tal asociación de *Azospirillum* con la raíz involucra la expresión de patrones de flagelación, un flagelo polar que le permite nadar a través de ambientes líquidos (swimming) y flagelos laterales que le sirven para moverse sobre superficies sólidas o altamente viscosas (swarming) y que son de importancia para el éxito de la colonización (Vande *et al.*, 1998, McCarter, 2006), esta motilidad bacteriana detecta los cambios en las condiciones del ambiente y responde por navegación hacia nichos que ayudan al óptimo crecimiento, (Paldi-Fibach *et al.*, 2011) por lo que, presentan una quimiotaxis positiva para distintos quimioatrayentes como; azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos, compuestos aromáticos, exudados radiculares y mucilago provenientes de la raíz, los cuales provocan una respuesta en las bacterias de vida libre, tal habilidad para detectar y responder tácticamente y fisiológicamente a los parámetros ambientales se envuelven en la generación de energía.

I.6 Transducción de señales

Las señales biológicas poseen muchas vías para propagar los estímulos recibidos formando redes que ocurren de manera simultánea y cada componente del sistema participa en diferentes tipos de actividades permitiendo generar una dinámica de ensamble, de translocación, de degradación y de canales de reacciones químicas. El papel de muchos sistemas de señalización incluye receptores, transductores, enzimas y segundos mensajeros que crean diferentes señales ocasionando interacciones con una superficie externa que permiten transferir la información a un efector que es capaz de responder al estímulo biológico, en las bacterias este proceso es conocido como transducción de señales (Weng *et al.*, 1999). A nivel celular y molecular las bacterias cuentan con numerosos circuitos de sensor-respuesta que operan de manera simultánea y coordinada. Además este sistema sensor-respuesta no es exclusivo de bacterias ya que se encuentra presente en muchos organismos procariontes como

eucariontes (plantas, levaduras y hongos) como mecanismo para detectar cambios en su medio químico o físico (Sheen, 2002).

Por lo que las células exhiben la habilidad para procesar múltiples señales para mantener su homeostasis en una dinámica ambiental donde tienen que diversificar o especializar su comportamiento, siendo el elemento esencial la vía señal-transducción porque permite el procesamiento y transmisión de la información ambiental durante el proceso de colonización que se envuelve en este sistema (Whitaker *et al.*, 2012). Este sistema es responsable de las adaptaciones celulares para varios estímulos ambientales porque permite reaccionar bajo condiciones favorables o desfavorables permitiendo la regulación tanto temporal como espacial de la expresión de genes que pueden ser reguladas tanto por una retroalimentación positiva como negativa (Nakamura *et al.*, 2004; Khorchid & Ikura, 2006).

II. Antecedentes

II.1 Sistema de transducción de señales de dos componentes

Generalmente los sistemas de dos componentes se componen de un receptor o cinasa histidínica (HK) que se encarga de sensar una señal específica y de trasladarla al regulador de respuesta (RR) que se encarga de responder al estímulo. (Hoch, 2000; Calva *et al.*, 2006; Wuichet *et al.*, 2012). Todas las cinasas histidínicas contienen dos dominios altamente conservados, el dominio de dimerización y una fosfotransferasa histidínica (DHp), el cual contiene la histidina (His) conservada donde se llevan a cabo las reacciones de autofosforilación y fosfotransferencia. El sensor de la cinasa histidínica consiste de un N-terminal sensor modulador de estímulos específicos y un C-terminal que es un módulo efector, el cual comprende el dominio de dimerización/histidina fosfotransferasa (DHp) y el dominio catalítico de unión a ATP (CA), mientras que el RR contiene un dominio de regulación conservado. La mayoría de las cinasas también contienen al menos un dominio entre los dominios transmembranales y DHp que pueden ser los dominios PAS, HAMP y GAF, que podrían contribuir para la especificidad y estabilidad de la dimerización (Cheung *et al.*, 2010; Capra & Laud, 2012).

II.2 Cinasas histidínicas (HK) y Regulador de respuesta (RR)

Por lo general las cinasas operan como homodímeros, pudiendo encontrar dos clases de ellas. Tabla 1:

Cinasas histidínicas	
Primera clase	Comprende a las cinasas histidínicas canónicas que contienen una región variable N-terminal de sensado y una región central C-terminal llamado dominio transmisor.
Segunda clase	Estas cinasas histidínicas están especializadas en respuestas quimiotácticas, generalmente en estas proteínas el residuo de histidina (localizado en la caja H) está en el N-terminal de la proteína, llamado dominio P1, el siguiente modulo es el dominio P2 que se encarga de reconocer al RR afín y este es seguido por el dominio transmisor que contiene las cajas N (LTHLVRNSLDHG), G1 (VTDDGAGL), F (IFAPPGF) y G2 (GRGVG).

Tabla 1.- Clases de cinasas y sus principales características (Foussard *et al.*, 2001).

Mientras que los reguladores de respuesta pueden llegar a contener de 1 a 3 dominios, todos contienen en el N-terminal un dominio receptor conservado y aunque muchos solo contienen el dominio receptor la mayoría de los RR tienen un dominio efector en el C-terminal.

Por lo tanto la HK se encarga de catalizar una reacción de autofosforilación en un residuo conservado de Histidina (His) ATP-dependiente, este grupo fosforil es inmediatamente transferido a un Aspartato (Asp) conservado sobre un RR y este a su vez sufre un cambio conformacional que activa la respuesta de salida, alterando de esa manera las propiedades transcripcionales y enzimáticas, por lo que, la HK y el RR tienen una modularidad intrínseca que separa las señales entrantes, fosfotransfiere y responde a la salida de señales, siendo esta modularidad la que permite a la bacteria amplificar y diversificar sus señales (Cotter *et al.*, 1999).

II.3 Fosforrelevo

Una versión más compleja del esquema de fosfotransferencia en el sistema de transducción de señales de dos componentes es el fosforrelevo, el cual sigue la siguiente ruta: His-Asp-His-Asp. Este sistema envuelve múltiples pasos de fosfotransferencia y a menudo más de dos proteínas, generando así una expansión del sistema que proporcionan una gran versatilidad en estrategias de señalización y un gran número de sitios potenciales de regulación (West & Stock, 2001; Goulian, 2010). Se cree que la activación se lleva a cabo cuando se detecta una señal por un dominio sensor que se localiza en el periplasma, el cual se encarga de propagar la señal a través de las hélices transmembranales y el domino de unión hacia el centro catalítico de la cinasa, el cual sufre un cambio conformacional en la alineación de los residuos His conservados frente al bucle de unión a ATP formando así el sitio activo cinasa. (Khorchid & Iruka, 2006; Capra & Laud, 2012).

II.4 Sistema de dos componentes en *E. coli* y *A. brasilense*

Se ha identificado alrededor de 250 aminoácidos que se encuentran conservados en el módulo activador, que va desde un 20 % hasta un 50% de similitud. Diferentes sistemas de dos componentes aparecen para controlar los niveles de fosforilación del RR empleando distintos mecanismos, por ejemplo, en respuesta a un estímulo algunos sistemas alteran los niveles de fosforilación del RR para controlar las tasas de autofosforilación de HKs, en otros sistemas es la actividad de fosfatasa de la HK que regula la respuesta a un estímulo, esta diversidad permite generar una flexibilidad de la vía de dos componentes ya que puede ser modificado para operar en una variedad de diferentes contextos usando diferentes aspectos de estructuras proteicas básicas. Por ejemplo, *E. coli* es una bacteria que hace uso de este sistema al expresar alrededor de 30 circuitos distintos HK-RR (Chang & Stewart, 1998), entre el sistema más estudiado de dicha bacteria es el que envuelve los mecanismos quimiotácticos y aerotácticos que comprende la vía *Che1* que modula cambios en la matriz extracelular y contribuyen a la regulación de cambios en la superficie de las propiedades adhesivas que afectan

a las células para aglutinarse y flocular, así mismo se encuentra involucrado directamente en la regulación de cambios en la producción de expolisacáridos. Esta vía de transducción de señales de dos componentes funciona principalmente para controlar los cambios en los patrones de motilidad flagelar en respuesta a cambios fisicoquímicos detectados por receptores, permitiendo a estos receptores formar complejos de señales con proteínas quimiotácticas citoplasmáticas que incluyen un HK, CheA y una proteína adaptadora CheW. Este sistema funciona a partir de la autofosforilación de CheA en un residuo de (His) y fosforila a un regulador de respuesta CheY o como forma alternativa puede ser transferido a CheB. Una vez fosforilado CheY o CheB, se une a la proteína FliM que enciende el flagelo y permiten un cambio a nivel de expresión de genes que se encuentran principalmente dirigidos a controlar la dirección de rotación del flagelo en contra de las manecillas del reloj y en la velocidad de nado de la misma. Fig. 2., por lo que está actividad de señales de quimiorreceptores es modulado por antagonistas, la metiltransferasa cheR y metilesterasa CheB, que se encargan de la adaptación sensorial (Alexandre *et al.*, 2003; Edwards *et al.*, 2010; Green, 2010; Bible *et al.*, 2012).

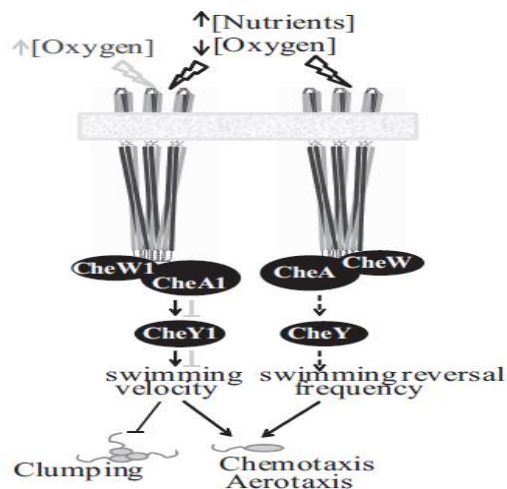


Fig. 2.- Esquema que muestra las proteínas involucradas en la vía de quimiotaxis en *A. brasilense*.

De acuerdo a Alexandre *et al.*, (2003), *E. coli* y *A. brasilense* comparten un ancestro en común que data de aproximadamente 1 billón de años, infiriendo que

no existen relaciones ortólogas entre el operón de la quimiotaxis, por lo que, en *A. brasilense* el operón quimiotaxis fue probablemente sujeto a eventos de transferencia lateral, por lo que CheW y CheY son significativamente divergentes siendo aparente que los procesos evolutivos en ambas bacterias son diferentes, probablemente porque realizan diferentes funciones dentro de la vía.

En tanto en *A. brasilense* el operón de la quimiotaxis comprende genes que codifican para la excitación central y vía de adaptación quimiotáctica que son homólogos a *E. coli*, a pesar de existir divergencia entre ambas especies las proteínas de la quimiotaxis de ambas son funcionalmente homólogos (Greer-Phillips *et al.*, 2004). Por lo que en *A. brasilense* la taxis energética es dominante y múltiples sistemas quimiotácticos están presentes y contribuyen a la quimiotaxis y aerotaxis (Stephens *et al.*, 2006), que han sido demostrados en mutantes en CheB y CheR, lo que sugiere que *A. brasilense* no solo responde tácticamente basado en la probabilidad de cambios en la dirección del nado del flagelo polar (cambios en la frecuencia de nado reverso, equivalente a agregados de *E. coli*) sino también para modular el incremento en la velocidad de nado.

Se ha encontrado homología de esta vía de *E. coli* con respecto a *A. brasilense* la cual contiene en su genoma 4 vías de codificación de transducción de señales para la quimiotaxis. Por lo que, Bible *et al.*, (2012) al realizar mutaciones en *Che1* y obtener las siguientes mutantes: $\Delta CheA1$, $\Delta CheB1$, $\Delta CheY1$, $\Delta CheR1$ y $\Delta CheB1-\Delta CheR1$, demostraron que todas las mutantes obtenidas disminuyen en la movilidad y se encuentran relacionados con los procesos de quimiotaxis y además difieren en la cantidad de floculación, así como en el tiempo en el que es formado con respecto a la cepa silvestre en *A. brasilense*, corroborando que este sistema presenta homología con los procesos de floculación en *E. coli*. Así mismo, la secuenciación realizada en los residuos de CheW demuestra que ambas bacterias presentan similitudes (Edwards *et al.*, 2010).

En otros estudios se ha demostrado que la expresión de sistemas de dos componentes híbridos en *A. brasilense* del dominio Org35 que se encuentra envuelto en la quimiotaxis debido a que contiene un N-terminal con dominios PAS así como un C-terminal sensor cinasa histidínica con dominio regulador híbrido,

que comprende un dominio cinasa histidínica (HK) y un dominio (RR). Por lo que Cui *et al.*, (2010), al realizar una mutación en el dominio Org35, corroboraron que las mutantes exhiben una alta motilidad de nado con una disminución en la quimiotaxis en comparación con la cepa silvestre de *A. brasilense*. Sugiriendo que Org35 no tiene ningún mecanismo de regulación de fosforilación como FrzE, sino que se encuentra envuelto con otras proteínas que permiten múltiples pasos de fosforrelevo.

III. Antecedentes directos

En estudios más recientes, particularmente en *A. brasilense* Sp245 se encontró en una banca genómica un gen que codifica para una cinasa histidínica putativa, denominada *hskA* en el plásmido 3 (AZOBR_p350062). Fig. 2., con un tamaño de 3654 pb cuyo producto de traducción es de 1217 aminoácidos, con una masa molecular de 128.2 kDa. Presentando en la región N-terminal un posible péptido señal, dos regiones TMDs Transmembranales que conforman un dominio periplásmico de 400 aminoácidos y en la región C-terminal un dominio transmisor de la HK dividida en sus dos dominios funcionales HisKA y HATPasa. Una vez localizado el gen en el contexto Villareal-Astorga, (2012) generó una mutación por inserción de un casete de tetraciclina (Tc), obteniendo *A. brasilense* ABHK::Tc, demostrando que dicho gen estaba envuelto en los sistemas de movilidad debido a que la mutante mostraba una disminución en presencia de Malato como quimioatrayentes así como en medio LB modificado. Para corroborar lo antes dicho, Cosme-Herrera, (2014) realizó una mutación por delección e inserción de un casete de Kanamicina entre el dominio de autofosforilación y fosforrelevo (un segmento del RR donde se ubica el residuo de aspartato); reportando un defecto parcial en la movilidad debido a que la mutante denominada *A. brasilense* 204-4 $\Delta hskA::Km^r$ presenta una disminución en la movilidad con respecto a la cepa silvestre, sin embargo, comparada con la cepa mutante *A. brasilense* ABHK::Tc la movilidad es mayor, sugiriendo que la cinasa es parte de un sistema de quimiotaxis ya que las diferencias observadas en el fenotipo tanto en *A. brasilense* ABHK::Tc como en *A. brasilense* 204-4 $\Delta hskA::Km^r$, podría deberse a la inserción

del casete de Tc y km respectivamente y que generan una mutación de tipo polar afectando el gen que se localiza río abajo, tal afectación fue demostrada al realizar un ensayo de RT-PCR del gen *CheY*-Like (localizado corriente abajo del gen *hskA*), utilizando como control la cepa silvestre y que corrobora una disminución en la expresión de dicho gen.

Este efecto parcial que mostró la mutación por inserción en *A. brasilense* 204-4 $\Delta hskA::Km^r$ puede deberse a la compleja regulación de la transducción de señales, por la reiteración de genes que codifican para cinasas histidínicas que ocurren en el genoma de *A. brasilense* Sp245; infiriendo que el gen *hskA* no es la única cinasa que detecta y activa al regulador de respuesta (*CheY*-like), formando quizá parte de un sistema de transducción ramificado que aporta el grupo fosfato a *CheY*-like.

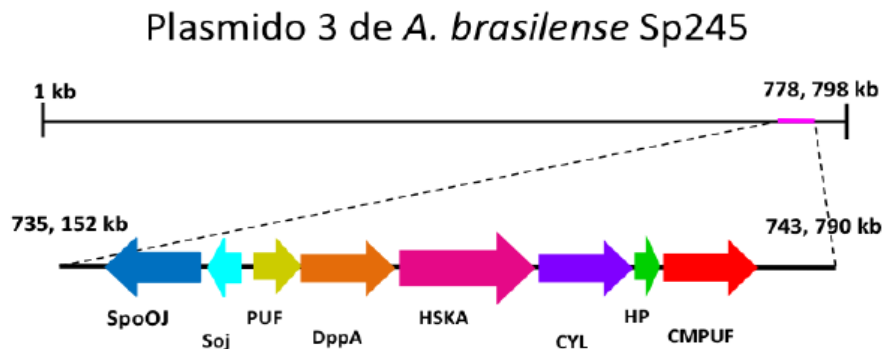


Fig. 3.- Contexto genético del gen *hskA* de *A. brasilense* Sp245. Se indica la ubicación y sentido de la transcripción de cada gen: **SpoOJ** (Proteína de división cromosómica); **SoJ** (Proteína de división cromosómica); **PUF** (Proteína de función desconocida); **DppA** (Proteína precursora de transporte de dipéptidos periplásmica); **hskA** (Cinasa histidínica putativa); **CYL** (Proteína receptora *CheY*-Like); **PUF** (Proteína de función desconocida); **CMPUF** (Proteína de membrana con función desconocida conservada) (Villareal-Astorga, 2012).

Tales datos obligan a la generación de una deleción limpia que no altere la expresión del gen antes citado, para lo cual es necesario utilizar el sistema del plásmido pK18mobsacB que permite la clonación de 2 fragmentos con un tamaño de 1000 pb aproximadamente en dirección 5'-3', proporcionando las bases

necesarias para la selección de transconjugantes a partir de la adición de kanamicina y sacarosa esta última fungiendo como una toxina en el medio al sintetizar levanas (moléculas de alto peso molecular sintetizados por la enzima levansacarasa) que son tóxicas para el vector suicida (Srikanth *et al.*, 2015), forzando así la recombinación para el reemplazo alélico del gen silvestre por el gen mutado.

IV. Hipótesis

La mutante por delección en el dominio HK del gen *hskA* de *A. brasilense* Sp245 se podrá obtener utilizando el sistema de contraselección del vector suicida pk18mobsacB.

V. Justificación

Desde hace varios años el género *Azospirillum* ha sido utilizado por su capacidad para promover el crecimiento radical en distintas especies vegetales, particularmente en granos de interés económico, sin embargo, actualmente la formulación de inoculantes no suelen ser tan eficientes debido a la escasez de conocimiento sobre las interacciones moleculares y procesos involucrados entre las bacterias PGPRs y las plantas, por lo que, en el presente trabajo se pretende generar una mutación sin marcar en el gen *hskA* de *A. brasilense* Sp245 el cual se encuentra envuelto en un sistema de transducción de señales de doble componente.

VI. Objetivos

VI.1 General

Obtener una mutante por delección en el dominio HK del gen *hskA* de *A. brasilense* Sp245.

VI.1.1 Específicos

Obtener la construcción pk18 Δ *hskA*:km^r.

Conjugar la construcción al fondo genético de *A. brasilense* Sp245.

VII. Material y métodos

VII.1 Material biológico

Cepa	Descripción	Referencia
<i>A. brasilense</i> Sp245	Cepa silvestre	Baldini <i>et al.</i> , 1987
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>fhuA2</i> $\Delta(\argF-lacZ)U169$ <i>phoA</i> <i>glnV44</i> $\Phi80$ $\Delta(lacZ)M15$ <i>gyrA96</i> <i>recA1</i> <i>relA1</i> <i>endA1</i> <i>thi-1</i> <i>hsdR17</i>	Hanahan, D. 1983
<i>E. coli</i> S17.1 Sm^r	Rec- derivative of 294 with 34 RP4-2Tc::Mu Km ^r ::Tn7 in the chromosome	Simon <i>et al.</i> , 1982
<i>A. brasilense</i> $\Delta hskA$	Cepa mutante merodiploide	Este trabajo

Plásmido	Descripción	Referencia
pGEM-T easy	Vector Ap ^r	Promega
Pk18mobsacB	Vector suicida; lacZ mob; Km ^r	Schafer <i>et al.</i> , 1994
pGEM-T+hskFA	Vector Ap ^r	Este trabajo
pGEM-T+hskFB	Vector Ap ^r	Este trabajo
pK18+hskFA	Vector suicida; lacZ mob; Km ^r	Este trabajo
pk18 $\Delta hskA$:km ^r	Construcción; lacZ, mob; Km ^r	Este trabajo

VII.2 Métodos

VII.2.1 Condiciones de cultivo

Las cepas de *A. brasilense* Sp245 y la mutante obtenida se crecieron en medio mínimo K-malato (para la selección de mutantes se ajustó el ácido málico a 7.5mM y 15mM) y en medio Rojo Congo con sus respectivos antibióticos, así

mismo a los medios de cultivo para seleccionar la cepa mutante se les agrego sacarosa utilizándose tres concentraciones 10%, 20% y 30%. Ambas fueron incubadas a 30° C.

Las cepas de *E. coli* se crecieron en medio Luria-Bertani (LB) adicionado con sus respectivos antibióticos y se incubaron a 37° C por 12 horas.

Se utilizaron los siguientes antibióticos: Ampicilina (Ap) a 50 mg/ml, Kanamicina (Km) a 50 mg/ml, Estreptomicina (Sm) a 50 mg/ml.

VII.2.2 Extracción de ADN genómico y plasmídico

La extracción de ADN genómico se realizó mediante la técnica de CTAB (Sambrook & Russel, 2001) y la extracción de ADN plasmídico por la técnica de Gilles Morelle, (1989). Las enzimas de restricción se utilizaron de acuerdo al proveedor (Invitrogen o Fermentas).

VII.2.3 Diseño de oligonucleótidos

Se diseñaron un par de oligonucleótidos para el gen *hskA* (cinasa histidínica putativa, CCD03046.1) de *A. brasilense* Sp245, generando así una delección del dominio HK, los oligonucleótidos proporcionaron dos fragmentos a los cuales se les designo como fragmento A y fragmento B, ambos fragmentos flanquean al dominio HK uno en el extremo 5' y el otro en el extremo 3' proporcionando amplificadores de 1000 pb aproximadamente. Estos fueron diseñados de acuerdo a la Temperatura de fusión, porcentaje de Guaninas/Citocinas, número de hairpins y longitud, para su diseño se utilizaron los programas bioinformáticos Snapgene y Primerselect y se eligieron los mejores que arrojaron dichos programas. Además a cada oligonucleótido se le añadió un sitio de restricción que permitió clonar de una manera dirigida ambos fragmentos en el plásmido pk18mobsacB los cuales mantienen la dirección que se encuentra en el genoma de *A. brasilense* Sp245. tabla. 2.

Nombre del oligo	Cantidad de bases	Secuencia adaptadora	oligonucleótidos	Sitio de restricción	Tamaño del fragmento
Fpk18A	28	GCT	5'GACAACGCCCGCAGCATCT3'	GGATCC (BamHI)	1065 pb
Rpk18A	28	TAT	5'CGCCAGGAAGGAGGACTTC3'	TCTAGA (XbaI)	1065 pb
Fpk18B	29	CAC	5'GTGGTGGCTGTCGGCTTCGA3'	GTCGAC (SalI)	1065 pb
Rpk18B	29	CAG	5'CATGCCAGGAAATCGCCGA3'	AAGCTT (HindIII)	1065 pb
M13-fwd	17	---	5'ACTGGCCGTCGTTTTAC3'	-----	-----
M13-rev	17	---	5'CAGGAAACAGCTATGAC3'	-----	-----
KmR-F6	21	---	5'GCATCGCCTTCTATCGCCTTC3'	-----	-----
KmR-R	21	---	5'CAGTGACAACGTCGAGCACAG3'	-----	-----

Tabla 2.- Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los fragmentos A y B respectivamente, así como los oligonucleótidos universales M13 usados para la secuenciación y los oligonucleótidos del casete de Km.

VII.2.4 Estandarización de las condiciones de amplificado

Se realizaron pruebas de PCR para estandarizar las condiciones de amplificado para ambos fragmentos, que consistió en evaluar los ciclos de reacción, partiendo de 3 ciclos estandarizados; la primera ocurre a 95° C (proceso donde se lleva a cabo la desnaturalización del DNA), el segundo ciclo corresponde al proceso de alineamiento del DNA donde los oligonucleótidos quedarán alineados con el DNA a 60° C y el tercer ciclo corresponde a la extensión a 72° C proceso donde la polimerasa alcanza su máxima actividad y continua la síntesis de los fragmentos de DNA a partir de los oligonucleótidos de acuerdo a las especificaciones del proveedor (IDT Integrated DNA Technologies), a partir de estas condiciones se cambió la temperatura y tiempo en la fase de alineamiento. Además se estandarizaron las cantidades de: H₂O, DMSO, buffer de MgCl₂, MgCl₂, deoxinucleótidos (dNTPs), oligonucleótidos sentido y antisentido, enzima Taq polimerasa y DNA. Tabla 3.

Fragmento A		Fragmento B	
Tm de alineamiento	67° C	Tm de alineamiento	67° C
H ₂ O	6.45 µl	H ₂ O	6.45 µl
DMSO	1 µl	DMSO	1 µl
Buffer MgCl ₂	2 µl	Buffer MgCl ₂	2 µl
MgCl ₂	1.25 µl	MgCl ₂	1.25 µl
dNTP's	4 µl	dNTP's	4 µl
Fpk18A	1 µl	Fpk18B	1 µl
Rpk18A	1 µl	Rpk18B	1 µl
Taq polimerasa (<i>Platinum</i>)	.30 µl	Taq polimerasa (<i>Platinum</i>)	.30 µl
DNA	3 µl	DNA	3 µl

Tabla 3.- condiciones para la amplificación del fragmento A y B.

VII.2.5 Clonación de los fragmentos A y B en el vector pGEM-T easy

Una vez estandarizados las condiciones para la amplificación de ambos fragmentos y con el objetivo de clonar el producto de PCR se utilizó el vector pGEM-T easy el cual contiene dos sitios de reconocimiento para la enzima de restricción *EcoRI* que flanquean al inserto de DNA y permiten su comprobación de manera más fácil, por lo que fue necesario eliminar de las muestras el exceso de DMSO precipitando con glucógeno, de esta manera se impidió que el DMSO pudiera interferir en la clonación de dichos fragmentos con el vector de expresión pGEM-T easy.

VII.2.6 Transformación de células

Realizada la ligación se procedió a transformar el producto en células competentes DH5 α , esto se llevó a cabo debido a que las células competentes tienen en su medio Ca²⁺, el cual al recibir un choque térmico de 42° C permite la apertura de poros que ayudan a la captación de ADN exógeno, realizado este proceso se colocó las células en medio LB adicionado con Ap 50 µg/ml.

VII.2.7 Subclonación en el vector suicida pk18mobsacB y verificación

Con el propósito de transferir de manera dirigida los fragmentos A y B al vector pk18mobsacB se estandarizaron las condiciones para llevar a cabo la liberación de los fragmentos del vector pGEM-T easy, así como su ligación en el vector suicida. En primera instancia se realizaron dobles digestiones en el vector pGEM-T easy con las enzimas correspondientes *BamHI/XbaI* y *HindIII/SalI* que

corresponden a los sitios de restricción que se colocaron en los iniciadores de cada fragmento con la finalidad de mantener la dirección de la secuencia así como su especificidad en el sitio de ligación. El producto de la ligación se transformó con células DH5 α y se inocularon en medio LB sólido con Kanamicina (50 $\mu\text{g/ml}$) a 37 $^{\circ}$ C toda la noche, todas las colonias que crecieron fueron inoculadas en medio LB líquido adicionada con Km y se extrajo ADN plasmídico para realizar un ensayo de comprobación mediante PCR.

VII.2.8 Secuenciación

Para verificar la autenticidad de los fragmentos A y B, se mandó a secuenciar la construcción pk18 Δ hskA:Km^r con oligos universales M13 delantero y M13 reverso, ambos oligos se encuentran presentes en el vector permitiendo corroborar la identidad de los fragmentos.

VII.2.9 Conjugación

Se realizó una conjugación biparental con la cepa donadora *E. coli* S17.1 que contiene la construcción pk18 Δ hskA:Km^r y la cepa receptora *A. brasilense* Sp245 de acuerdo a Carreño *et al.*, (2000). Para lo cual se midieron las D.O_{600nm} para ambas cepas, en el caso de *E. coli* S17.1 una D.O₆₀₀ de 0.3 y para *A. brasilense* Sp245 una D.O_{600nm} de 0.6.

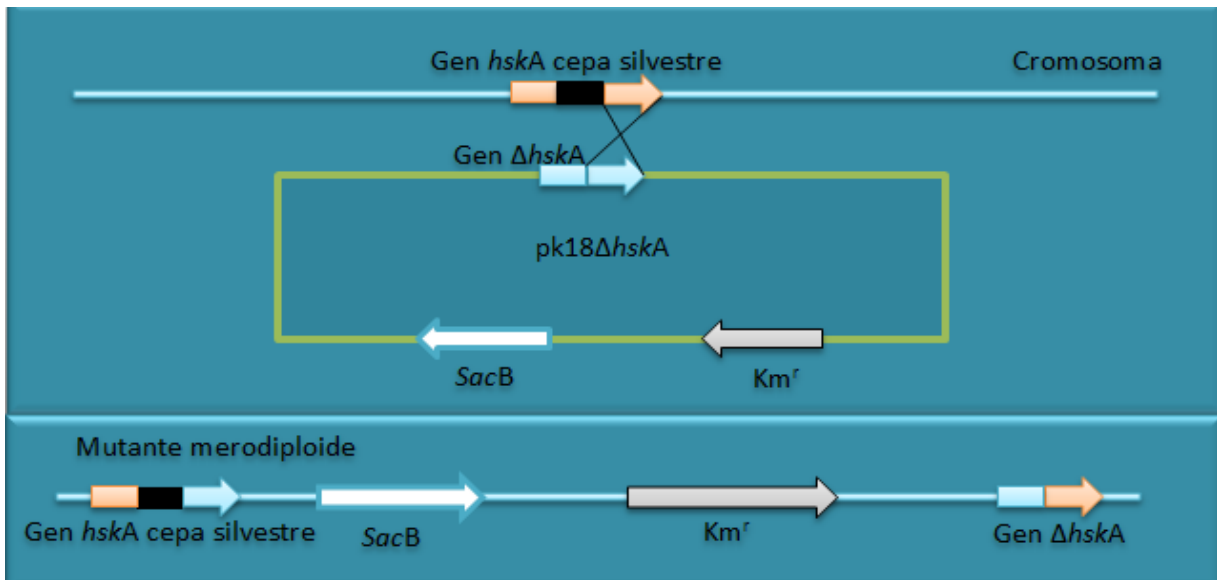
VII.2.10 Electroporación

Alternativo al método de transformación por conjugación se implementó la técnica por electroporación el cual requiere de un choque eléctrico de 7.5 KV/cm en las células competentes de *A. brasilense* Sp245 con la finalidad de generar poros en la membrana que permitan la entrada de ADN exógeno (Broek *et al.*, 1989; Sant'Ann *et al.*, 2011), para lo cual las células fueron colocadas en un contenedor de 0.2 cm de grosor y se usó un electroporador micropulser de la marca Biorad mediante el cual se realizaron varios ensayos probando distintos voltajes (2 KV/cm, 2.5 KV/cm y 3 KV/cm) con 5 ms de exposición al choque eléctrico.

VII.2.11 Selección de mutantes

Se seleccionaron las transconjugantes a partir de las colonias obtenidas mediante conjugación y Electroporación las cuales fueron sembradas en medio mínimo K-malato adicionado con Km (50 µg/ml), posteriormente las colonias resistentes a Km se seleccionaron y se sembraron en medio mínimo K-malato con sacarosa 10%, permitiendo analizar aquellas colonias que son (sacarosa resistentes y Km sensibles) han perdido el plásmido y por lo tanto han llevado con éxito la doble recombinación homóloga (Sallam *et al.*, 2010; Alexandre, 2013), tales eventos de recombinación se muestran en la figura 3.

Primer evento de recombinación (selección con Km)



Segundo evento de recombinación (selección con sacarosa)

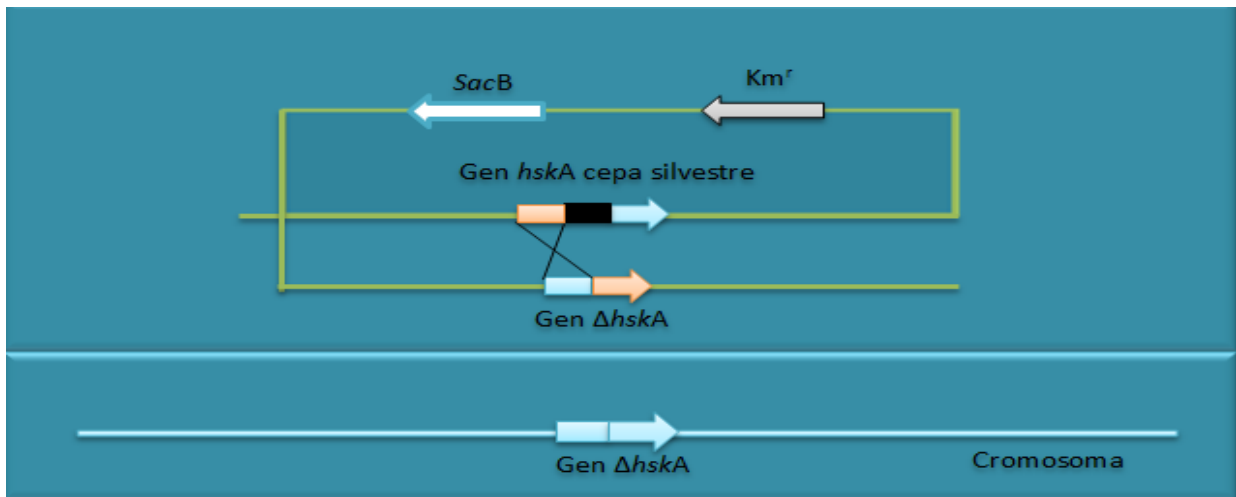
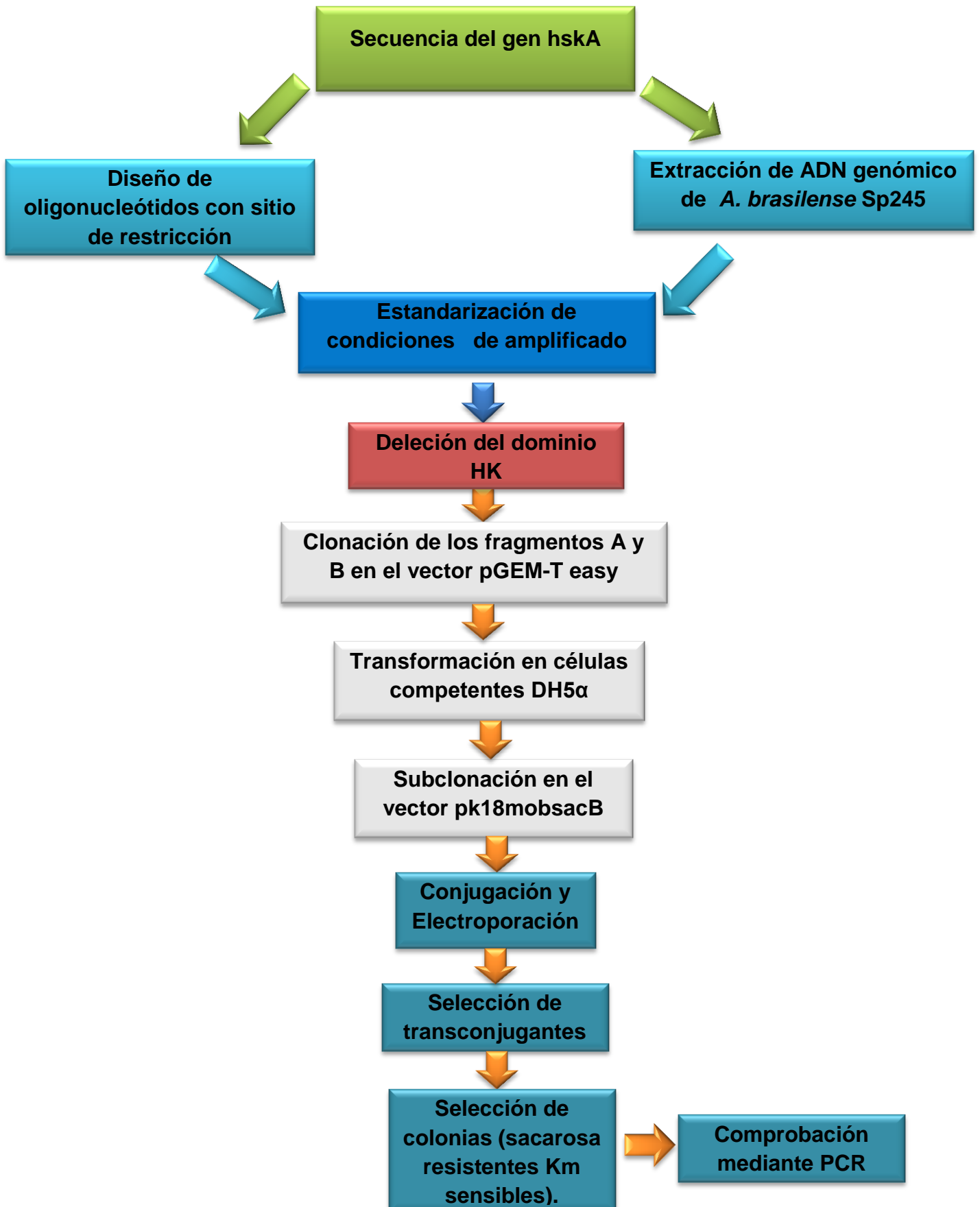


Fig. 4.- Esquema que muestra los eventos de recombinación homóloga con la construcción $pk18\Delta hskA:Km^r$ en *A. brasilense* Sp245.

VIII. Esquema general del trabajo



IX. Resultados

IX.1 Amplificado de los fragmentos A y B del gen *hskA*

A partir el gen *hskA* (cinasa histidínica putativa) de *A. brasilense* Sp245 se generaron dos pares de iniciadores que flanquean el dominio HK uno en el extremo 5' y otro en el extremo 3', tales amplificados tienen una longitud de aproximadamente 1000 pb. Denominando a cada fragmento como: fragmento A y fragmento B. Figura 5.

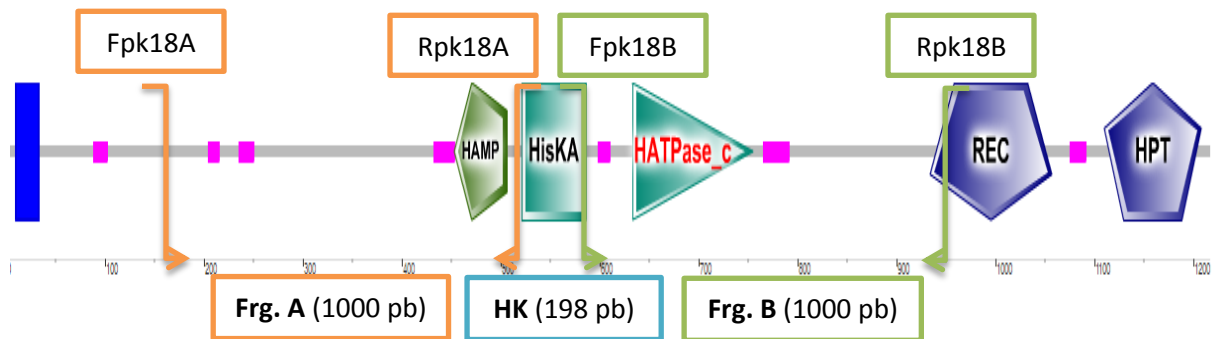


Fig. 5.- Esquema del gen *hskA* (cinasa histidínica putativa), generado con el programa SMART donde se muestran las ubicaciones de los iniciadores, así mismo se representan los dominios, **HAMP** (Cinasas histidínica, adenilil ciclasas, proteínas de unión a metil, dominios fosfatasa), **HisKA** (cinasa His A (dominio fosfo-aceptor)), **HATPase_c** (cinasa histidínica tipo ATPasa), **REC** (Dominio aceptor homologa a cheY) y **HPT** (Dominio de fosfotransferencia histidínica).

Se establecieron las condiciones de PCR para amplificar los fragmentos A y B del gen *hskA*, para lo cual se utilizaron los dos pares de iniciadores para generar la delección en el dominio HK generando productos de 1000 pb aproximadamente. Figura. 6.

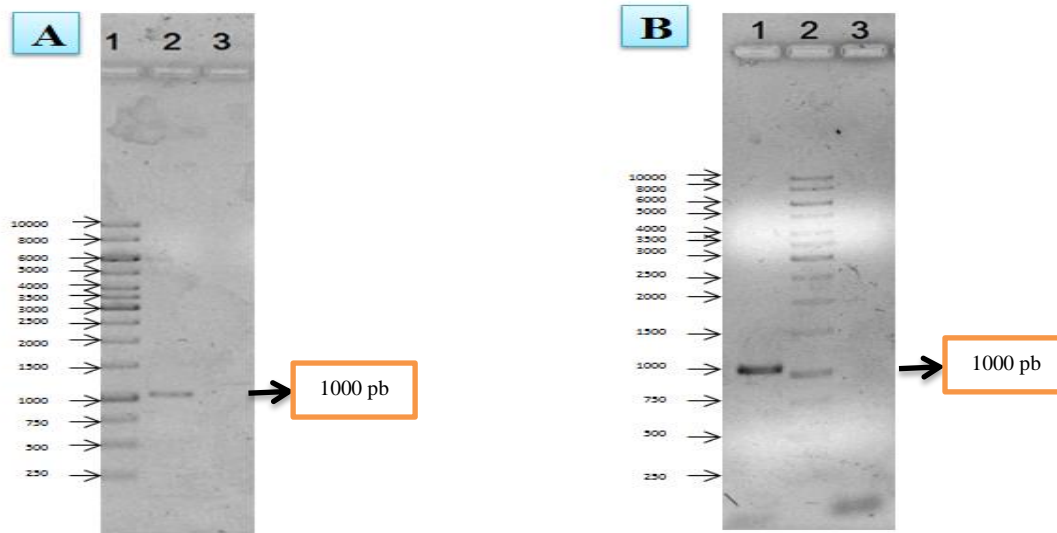


Fig. 6.- Amplificado de los fragmentos A y B del gen *hskA* de *A. brasilense* Sp245. A).- 1) Marcador de peso molecular. 2) Fragmento A. 3) Control negativo. B).- 1) Fragmento B. 2) Marcador de peso molecular. 3) Control negativo.

IX.2 Clonación en el vector de expresión pGEM-T easy

Se llevó a cabo la ligación de ambos fragmentos en el vector siguiendo las condiciones indicadas por el fabricante (Promega), posteriormente fueron transformadas en células competentes DH5 α , seleccionando solo aquellas que tomaban una tonalidad blanca, mientras que las que se tornaban azules se desechaban, esto se debe principalmente por la adición de un cromóforo X-GAL al medio de cultivo, evidenciando que se ha interrumpido el gen *lacZ* por la inserción de ambos fragmentos en el vector y por lo tanto ya no puede utilizar esta vía para generar la coloración azul. (Cada experimento se llevó a cabo de manera independiente).

IX.3 Suclonación en el vector suicida pk18mobsacB y verificación

Se extrajo ADN plasmídico del vector suicida pk18mobsacB para corroborar su identidad de manera que se buscaron dos enzimas mediante ensayos *in silico* que pudieran demostrar el tamaño del objeto de estudio. El programa NEBcutter predijo que tanto la enzima *SacI* como la enzima *XbaI* proporcionarían bandas de 3979 pb, 1740 pb y 5719 pb respectivamente, por lo que se utilizaron dichas

enzimas para llevar a cabo la digestión del vector, corroborándose de esta manera su identidad. Figura 7.

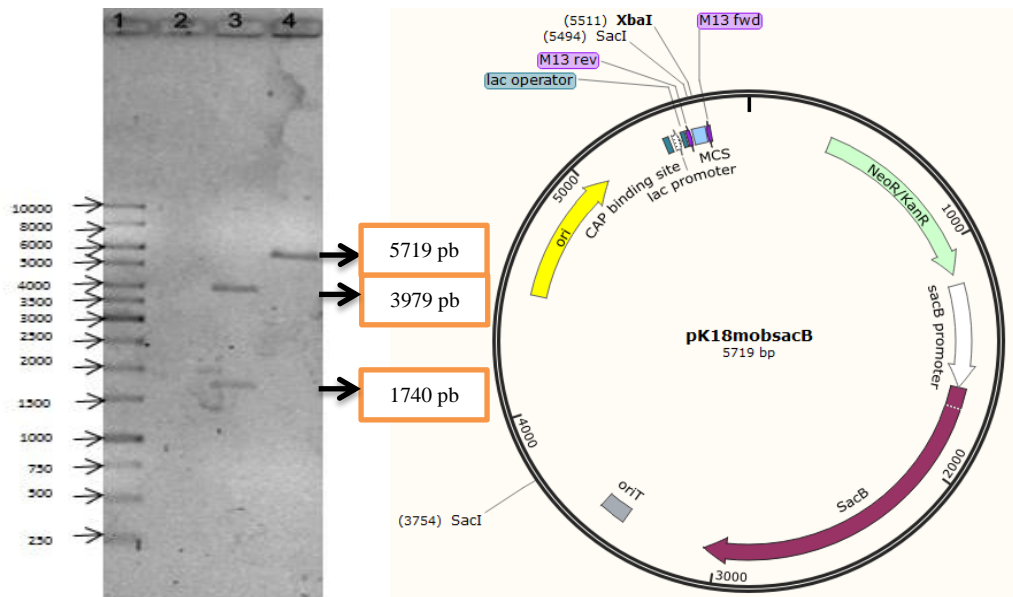


Fig. 7.- Digestión enzimática para comprobar la identidad del vector pK18mobsacB y su representación esquemática. 1) Marcador de peso molecular. 2) DNA sin digerir. 3) Digestión con SacI 3979 pb y 1740 pb. 4) Digestión con XbaI 5719 pb.

Una vez obtenida la clonación en el vector de expresión pGEM –T easy de ambos fragmentos y la verificación del vector suicida pk18mobsacB mediante patrones de restricción, se llevaron a cabo los ensayos de restricción para la subclonación de los dos fragmentos en el vector pk18mobsacB, para lo cual se estandarizaron las condiciones para llevar a cabo la doble digestión permitiendo generar la ligación de manera dirigida en los extremos que contienen los sitios de restricción *Bam*HI/*Xba*I tanto para el vector suicida como para el fragmento A y los sitios de restricción para el fragmento B *Hind*III/*Sac*I como para el vector.

La doble digestión en el vector suicida permitió que el ADN plasmídico quedara totalmente linearizado dejando expuestos los extremos que presentan los sitios de restricción *Bam*HI y *Xba*I. Figura 8. De la misma manera el fragmento A al ser liberado del vector pGEM-T easy sus extremos con sitio de restricción generaron

complementariedad con los extremos del vector suicida. Figura 9.

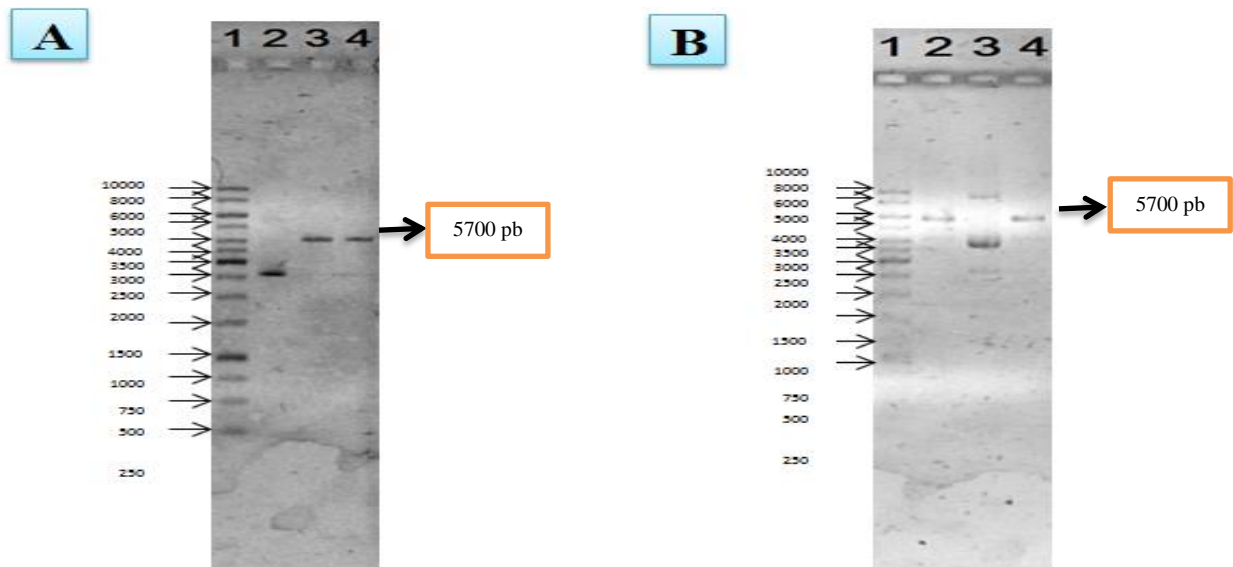


Fig. 8.- Digestión del vector suicida pk18mobsacB. A).- 1) Marcador de peso molecular. 2) ADNp. 3) Digestión con *Bam*HI 5700 pb. 4) Digestión con *Xba*I 5700 pb. **B).-** 1) Marcador de peso molecular. 2) Digestión con *Bam*HI/*Xba*I 5700 pb. 3) ADNp pk18mobsacB. 4) Digestión con *Xba*I/*Bam*HI 5700 pb.

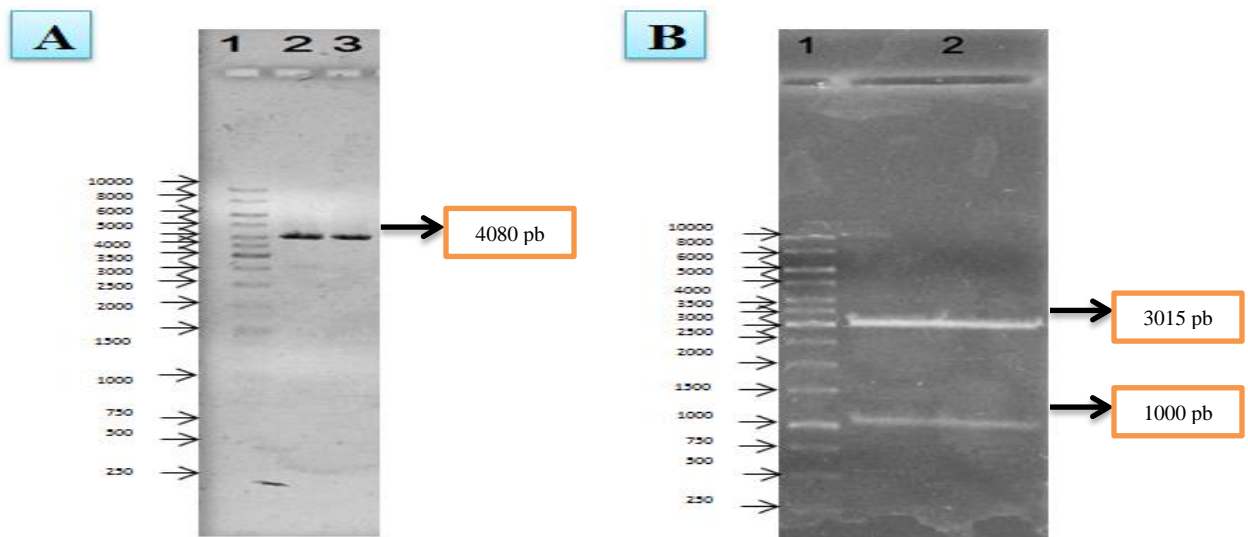


Fig. 9.- Digestión del vector pGEM-T+hskFA. A).- 1) Marcador de peso molecular. 2) Restricción con *Bam*HI 4080 pb. 3) Restricción con *Xba*I 4080 pb. **B).-** 1) marcador de peso molecular. 2) Doble digestión *Bam*HI/*Xba*I 3015 pb y 1000 pb.

Una vez realizada las digestiones tanto para el fragmento A como para el vector suicida pk18mobsacB se realizó la ligación de acuerdo a las especificaciones del proveedor (Thermoscientific). Al producto de la ligación se transformó con células DH5 α y se realizaron grupos de 4 colonias para corroborar la presencia del fragmento a partir de un PCR en colonia. Figura 10. Con la confirmación positiva del PCR se separó el grupo y se extrajo el DNA plasmídico para verificar la clonación mediante patrones de restricción, por lo que, se realizó una doble digestión con las enzimas *Bam*HI/*Xba*I proporcionando una banda de 5719 pb y 1065 pb que corresponden al tamaño del vector suicida y el fragmento A. Figura 11.

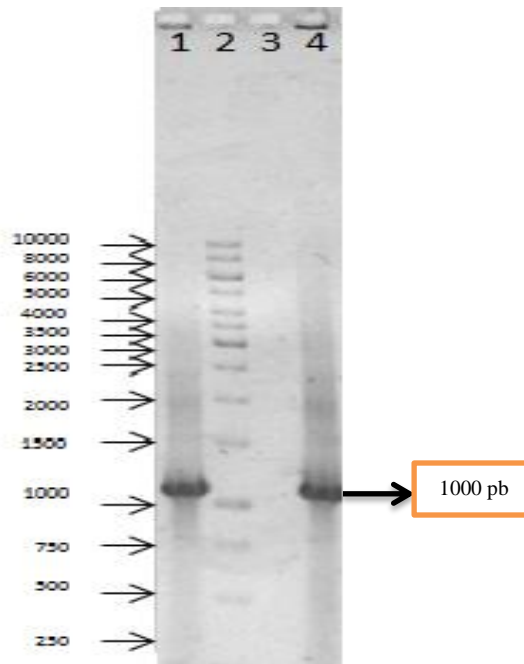


Fig. 10.- PCR en colonia. A).- 1) Grupo “1” obtenida de la ligación. 2) Marcador de peso molecular. 3) Control negativo. 4) Grupo “2” obtenida de la ligación.

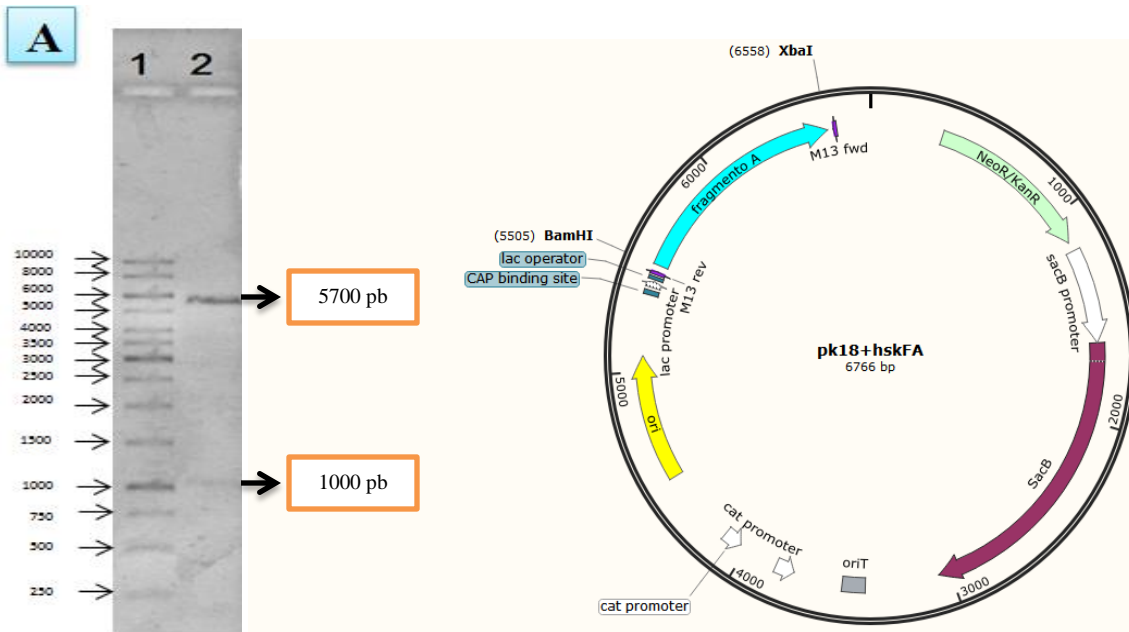


Fig. 11.- Digestión del vector pk18+hskFA y esquema que muestra los sitios de restricción. A).- 1) Marcador de peso molecular. 2) Restricción con BamHI/XbaI.

Una vez ligado el fragmento A, se procedió a insertar el fragmento B dentro de la construcción pk18+hskFA, para lo cual se realizó una doble digestión tanto para el vector pk18mobsacB como para el vector pGEM+hskFB con las enzimas *HindIII/SalI* que permitieron el empalme de los extremos de cada sitio de restricción. Posteriormente se llevó a cabo la ligación y se seleccionaron varias clonas a las cuales se les extrajo DNA plasmídico y se les realizó un PCR utilizando los iniciadores Fpk18A y Rpk18B los cuales proporcionan un tamaño de aproximadamente 2000 pb y que corresponden al tamaño de ambos fragmentos clonados en el vector suicida pk18mobsacB, así mismo se comprobó por doble restricción utilizando las enzimas que se localizan a los costados de cada fragmento (*HindIII* y *BamHI*). Figura 12.

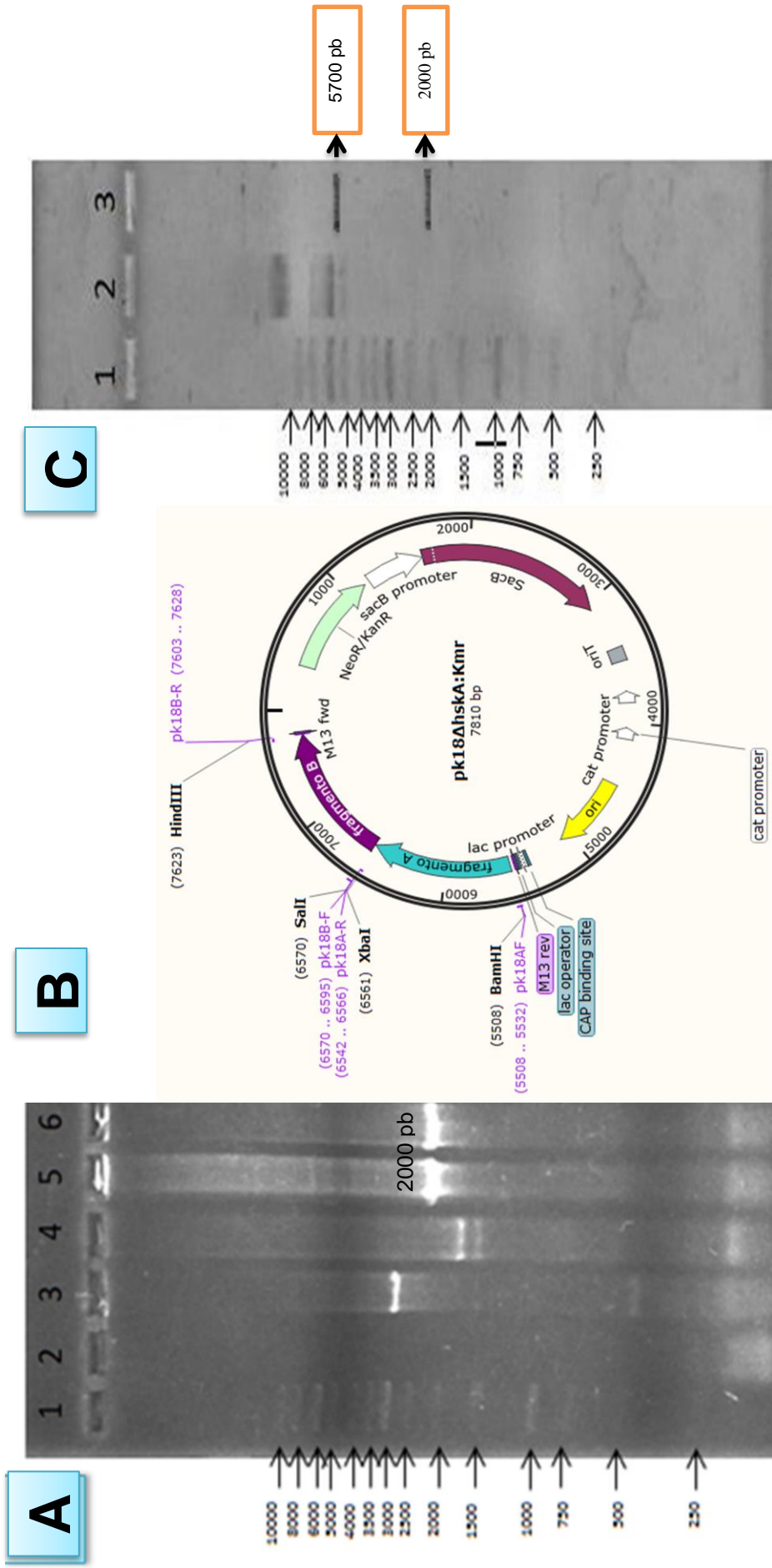


Fig. 12.- Verificación de ambos fragmentos en la construcción $pk18\Delta hskA:kmr$ con un tamaño de aproximadamente 2000 pb. A.- 1) Marcador de peso molecular. 2) Control negativo. 3) *A. brasilense* Sp245. 4) Clona 11. 5) Clona 12. 6) Clona 13. **B)-** Esquema de la construcción $pk18\Delta hskA:Kmr$. **C)-** Verificación de la construcción por medio de restricciones HindIII/BamHI. 1) Marcador de peso molecular. 2) plásmido sin digerir, clona 14. 3) vector suicida $pk18mobsacB$ 5700 y fragmento A y B 2000 pb.

IX.4 Secuenciación

Se confirmó por secuenciación la clonación de dichos fragmentos, obteniendo un 99% de identidad con el fragmento A y un 95% de identidad con el fragmento B, permitiendo inferir que la subclonación se llevó a cabo de manera exitosa. Tabla 4.

Sequence ID: lcl|Query_18077 Length: 904 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 904 [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1655 bits(896)	0.0	901/904(99%)	0/904(0%)	Plus/Plus

99% de similitud entre la secuencia original y la clonada en el vector suicida pk18mobsacB del fragmento A.

Sequence ID: lcl|Query_111619 Length: 1054 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 1054 [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1742 bits(943)	0.0	1021/1056(97%)	16/1056(1%)	Plus/Plus

97% de similitud entre la secuencia original y la clonada en el vector suicida pk18mobsacB del fragmento B.

Tabla 4.- BLAST de las secuencias A y B, con sus respectivos porcentajes de similitud con la secuencia original.

IX.5 Obtención de la mutante

Se realizaron varias conjugaciones para que se llevara a cabo el doble intercambio alélico entre la construcción pk18 Δ hskA:Km^r y el genoma de *A. brasilense* Sp245, a la par, se ha implementado una nueva técnica basada en electroporar la cepa receptora para que los eventos de recombinación sean más rápidos y como consecuencia obtener la mutante, debido a que la frecuencia de transconjugantes obtenidas era muy baja. Se analizaron varias clonas a las cuales se les realizó PCR con los iniciadores Fpk18A y Rpk18B con la finalidad de obtener el tamaño esperado 2000 pb, sin embargo solo se ha obtenido una mutante merodiploide

generada a partir de la conjugación y que presenta resistencia a Km por lo que se sugiere darle pases en sacarosa para que se pierda la resistencia. Fig. 13. Así mismo se realizó un PCR con el oligo reverso de Km y el oligo delantero del fragmento B con el cual se confirmó la presencia del casete de kanamicina tanto en la construcción $pk18\Delta hskA:Km^r$ como en la posible mutante Ck_{80} , proporcionando un tamaño aproximado de 1842 pb. Fig. 14.

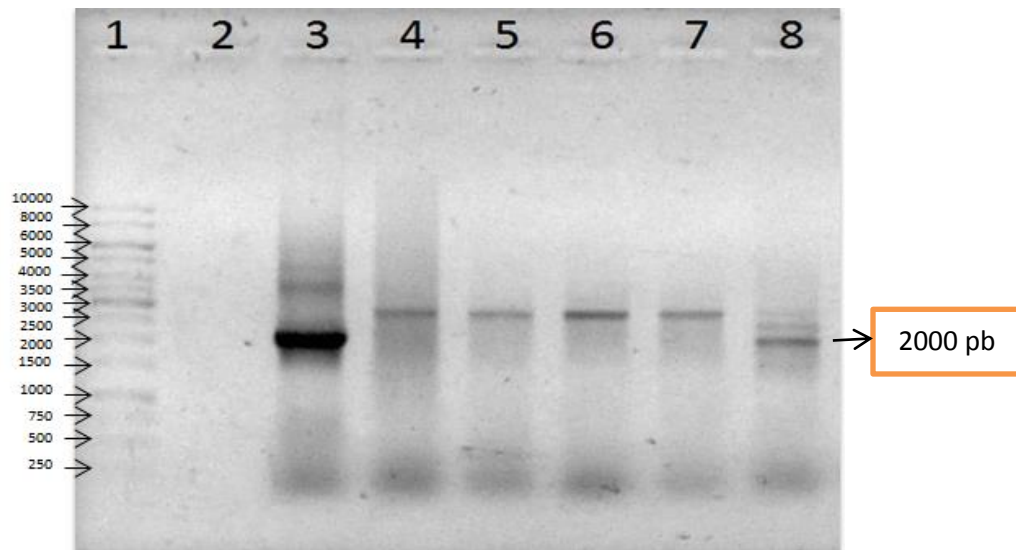


Fig. 13.- Análisis por PCR de posibles mutantes A).- 1) Marcador de peso molecular. 2) Control negativo. 3) Construcción $pk18\Delta hskA:Km^r$. 4) *A. brasilense* Sp245. 5) Clona 17 de electroporación. 6) Clona 23 de electroporación. 7) Clona 51 de conjugación. 8) Clona 80 de conjugación (Ck_{80}).

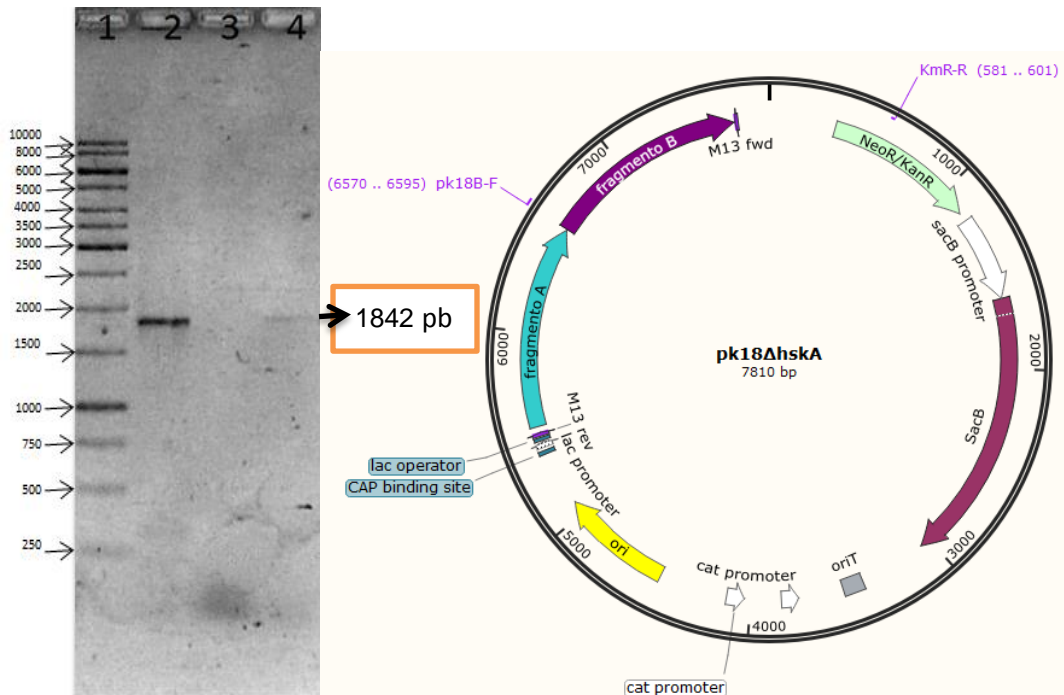


Fig. 14.- PCR con el oligonucleótido reverso de KmR-R y el oligonucleótido delantero del fragmento B. A).- 1) Marcador de peso molecular. 2) Construcción pk18ΔhskA:Km^r. 3) *A. brasilense* Sp245. 4) clona Ck₈₀.

X. Discusión

En la actualidad muchas bacterias son utilizadas para fines agrícolas donde se busca una alta producción a bajos costos o bien son usadas para aspectos de biorremediación o como agentes de control de patógenos, por dicha razón desde hace varios años se han realizado gran cantidad de trabajos que involucran el estudio y aplicación de estas bacterias, principalmente se ha puesto énfasis en aquellas bacterias denominadas PGPRs debido a que son bacterias que promueven el crecimiento vegetal de muchas especies de interés económico (Bashan & Bashan, 2005; Bashan & Bashan, 2010; Bhattacharyya *et al.*, 2012), entre estas bacterias se encuentra nuestro modelo de estudio *A. brasilense* Sp245 la cual es capaz de estimular el crecimiento de las plantas.

A. brasilense cuenta con aproximadamente 4 sistemas de quimiotaxis los cuales se encuentran envueltos en los procesos de colonización por lo que futuros estudios permitirán analizar el gen *hskA* (cinasa histidínica putativa) y corroborar

los estudios bioinformáticos de Cosme-Herrera, (2014) donde se infirió que dicho gen se encuentra dentro de un operón de quimiotaxis y que utiliza el sistema de transducción de señales de doble componente que le permite a *A. brasilense* Sp245 generar respuestas a distintos estímulos ambientales en los que se encuentra inmersa y que esta cascada de señalización es la que permite generar una ventaja para encontrar recursos limitados y sobrevivir en el ambiente local donde la competitividad por los recursos son muy altos (Wisniewski-Dye *et al.*, 2011). Con los estudios experimentales realizados por Villareal-Astorga, (2012) y Cosme-Herrera, (2014) con la generación de las mutantes *A. brasilense* ABHK::Tc^r y *A. brasilense* 204-4 Δ *hskA*::km^r, respectivamente, se corroboró lo predicho por los análisis *in silico* sobre la participación del gen *hskA* en los mecanismos de movilidad (quimiotaxis y aerotaxis) y que tal mutación provoca una disminución drástica en estos mecanismos y que en última instancia el gen que se localiza río abajo *CheY*-Like es quien recibe al grupo fosfato y se encarga de cambiar la rotación del flagelo al unirse específicamente a FliM (Brown *et al.*, 2011), sin embargo estas inferencias deben ser corroboradas con una mutante sin marcador de selección que no presente una afectación de tipo polar como las mutantes generadas por la inserción del casete de Tetraciclina (Tc) y Kanamicina (Km), tal efecto polar asignó fenotipos mutantes donde se había perturbado la expresión del gen colindante *cheY*-Like.

Por otra parte la generación de una mutante utilizando el sistema por doble selección permite la construcción definida de mutantes sin marcar que no afectan la transcripción de genes aledaños. Por lo que en el presente trabajo se propuso un nuevo método de selección para la obtención de mutantes usando el sistema de contraselección del vector suicida *pk18mobsacB* que es de utilidad debido a que por medio de este vector se pueden obtener mutantes por delección sin la necesidad de insertar un casete de selección (Sallam *et al.*, 2010), este sistema ha sido probado en distintas bacterias (*A. brasilense* Sp7, *Agrobacterium tumefaciens*, *Anabaena* sp., *Erwinia chrysanthemi*, *H. pylori*, *Klebsiella pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Rhizobium* sp., *Xanthomonas* sp., y *Yersinia* sp), (Reyrat *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 2011; Wu *et al.*,

2012) obteniendo resultados positivos porque las levanas se acumulan en el periplasma resultando tóxicas, sin embargo en este estudio se encontró que en *A. brasilense* Sp245 el sistema parece ser menos eficiente debido a que existe una tasa muy baja de eventos de conjugación y posiblemente los eventos de doble recombinación homóloga son menos frecuentes coincidiendo con lo reportado por Ávalos-Rangel, (2015) en comparación con el número de transconjugantes obtenidas con el vector suicida pSUP202 (Carreño *et al.*, 2000) tales datos fueron comprobados al momento de llevar a cabo varias repeticiones de conjugación obteniendo siempre un bajo número de colonias (sacarosa resistentes/ kanamicina sensibles) las cuales tienen una predominancia de ser mutantes merodiploides probablemente porque la bacteria prefiere asimilar el gen de resistencia de Km porque le confiere una ventaja adaptativa impidiendo que se lleve a cabo el segundo intercambio alélico. En consecuencia con los resultados anteriores se implementó una herramienta alternativa (electroporación) para la transferencia de genes la cual permitiría obtener la mutante de manera más rápida al presentar una mayor frecuencia de transformación (Vee-Aune & Aachmann, 2010). Sin embargo en nuestro modelo de estudio *A. brasilense* Sp245 la constitución de la pared celular fungió como un obstáculo para la transferencia de DNA así como otros factores que pudieron influir de manera negativa (Voltaje, tiempo de exposición al pulso eléctrico y cantidad de células) con la asimilación de DNA foráneo, por lo que no coincidimos con lo reportado por Broek *et al.*, (1987) y Sant-Ann *et al.*, (2011) en *A. brasilense* y *A. amazonense*, concluyendo en este trabajo que la mejor manera para transferir material genético en *A. brasilense* Sp245 es a través de la conjugación.

Por otro lado, la producción de levanas y la expresión del gen *sacB* son un requisito para presionar el segundo evento de recombinación, sin embargo en *A. brasilense* Sp245 nos cuestionamos sobre si este vector es funcional con el gen de estudio. No obstante en estudios realizados por Link *et al.*, (1997), Belghith *et al.*, (2012) y Esawy *et al.*, (2013) demostraron que en *E. coli*, *Bacillus subtilis* NRC1aza y *Bacillus* Sp., la concentración de sacarosa, fuentes de nitrógeno, pH y temperatura son factores que influyen de manera directa en la inducción de la

enzima levansacarasa o en el crecimiento celular, debido a que altas concentraciones de sacarosa (más del 10%) como fuente de carbono resultan en una mayor tasa de inducción de enzima pero como consecuencia el crecimiento celular se inhibe, lo que se atribuye a la acumulación de oligosacáridos que promueven el incremento de la viscosidad en las células por una preferencia en la reacción de hidrólisis sobre la reacción de formación de levanas, por lo que ellos ajustan la concentración de sacarosa corroborándose que a una concentración alta el crecimiento se ve disminuido y el tiempo de la misma es relativamente mayor que con una concentración menor. Así mismo se ajustó la fuente de carbono (ácido málico) en el medio k-malato en nuestros ensayos para la obtención de las transconjugantes, porque se infirió que estaba interfiriendo en los eventos de doble recombinación homóloga y que la concentración inicial 30mM estaba afectando la presión del doble entrecruzamiento, sin embargo se comprobó que a una concentración de 7.5 mM de ácido málico como fuente de carbono el crecimiento es menor en comparación a una concentración de 15 mM y 30 mM por lo que la obtención de bacterias que presenten el fenotipo esperado disminuyó considerablemente.

Dado los datos anteriores es probable que el promotor del gen *sacB* no es eficiente en *A. brasilense* Sp245 impidiendo se lleve a cabo el doble entrecruzamiento, por lo que se debe evaluar la eficiencia en la síntesis de la enzima levansacarasa y en caso de obtener un resultado negativo se sugiere adecuar la construcción generada en este trabajo en donde se busca sustituir el promotor nativo del gen *sacB* (Tan *et al.*, 2012) por uno que pueda ser compatible con *A. brasilense* Sp245 y entonces permitir la expresión del gen *sacB*, por lo que en trabajos posteriores se propone utilizar alguno de los siguientes promotores; el promotor de kanamicina, el promotor *lacZ/T3* los cuales ya han sido probados en el laboratorio y se conoce que inducen la expresión de genes en *Azospirillum* o bien utilizar el promotor del gen *omaA* el cual se expresa constitutivamente en *A. brasilense*.

Ambas estrategias generan una gran expectativa para futuros experimentos donde la baja obtención de transconjugantes y la poca o nula expresión del promotor *sacB* son un obstáculo que no permiten obtener mutantes que no afecten la expresión de genes que se encuentren formando operones.

IV. Conclusiones

1. Se generó la construcción *pk18ΔhskA:Km^r* con los fragmentos A y B en dirección 5'-3'.
2. La secuenciación de la construcción *pk18ΔhskA:Km^r* corrobora que ambos fragmentos corresponden al gen *hskA*.
3. La obtención de la construcción permitió estandarizar las condiciones para llevar a cabo el doble intercambio alélico y de esa manera generar la mutante merodiploide *A. brasilense ΔhskA* mediante conjugación.
4. El sistema de contraselección del vector suicida *pk18mobsacB* es menos eficiente en *A. brasilense* Sp245 con respecto a otras Rizobacterias.
5. Al parecer el gen *sacB* no es tan eficiente en *A. brasilense* Sp245 por lo que la producción de levanas para forzar el doble reemplazo alélico es muy poca.
6. La conjugación parece ser el mejor sistema para obtener la mutante a pesar de la poca frecuencia de colonias obtenidas.

V. Perspectivas

1. Evaluar la síntesis de levanas del vector *pk18mobsacB*.
2. Generar una fusión transcripcional río arriba del gen *sacB* que sea compatible con *A. brasilense* Sp245.
3. Implementar nuevas estrategias como la quimiotransformación/electroporación para obtener una mutante de manera más rápida y eficiente.

Bibliografía

1. Alexandre Gladys. (2010). Coupling metabolism and chemotaxis-dependent behaviours by energy taxis receptors. *Microbiology*. 156: 2283-2293.
2. Alexandre, G., Zhulin, I. B. (2003). Different evolutionary constraints on chemotaxis proteins cheW and CheY revealed by heterologous expression

- studies and protein sequence analysis. *Journal of bacteriology*. 185 (2): 544-552.
3. Ávalos-Rangel, M. A. (2015). Participación de la diguanilato ciclasa E de *A. brasilense* Sp245 en crecimiento y estrés. Tesis de maestría. Posgrado en microbiología CICM, ICUAP.
 4. Bacilio-Jimenez, M., Aguilar-Flores, S., Ventura-Zapata, E., Perez-Campos E., Bouquelet, S., Zenteno, E. (2003). Chemical characterization of root exudates from rice (*Oryza sativa*) and their effects on the chemotactic response of endophytic bacteria. *Plant and soil*. 249: 271-277.
 5. Baldani, V., Baldani, J., and Döbereiner, J. 1987. Inoculation of field-growth wheat (*Triticum aestivum* L.) with *Azospirillum* sp. *Fertil. Soils*. 4: 37-40.
 6. Barak, R., Nur, I., Okon, Y. (1982). Aerotactic Response of *Azospirillum brasilense*. *Journal of bacteriology*. 152 (2): 643-649.
 7. Bakker. P., L. berendsen. R., F. Doornbos. R., C. A. Wintermans. P., m. j. pieterse. C. (2013). The rhizosphere revisited: root microbiomics. *Frontiers in plant science*. 165 (4): 1-7.
 8. Bashan, Y., & de Bashan, L. E. (2005). Plant growth-promoting. *Encyclopedia of soils in the environment*. 1: 103-115.
 9. Bashan, Y., Bashan, L. E. (2010). How the Plant Growth-Promoting Bacterium *Azospirillum* Promotes Plant Growth-Critical. *Assessment. Advances in Agronomy*. 108: 77-137.
 10. Bashan, Y., Harrison, S.K., Whitmoyer, R.E. (1990). Enhanced Growth of Wheat and Soybean Plants Inoculated with *Azospirillum brasilense* Is Not Necessarily Due to General Enhancement of Mineral Uptake. *Applied and Environmental Microbiology*. 56 (3): 769-775.
 11. Bashan, Y., Holguin, G. (1995). Inter-Root Movement of *Azospirillum brasilense* and Subsequent Root Colonization of Crop and Weed Seedlings Growing in Soil. *Microbial ecology*. 29 (3): 269-281.
 12. Bashan, Y., Holguin, G. (1997). *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). *Can. J. microbial*. 43: 103-121.

13. Bashan, Y., Holguin, G., Bashan, L. E. (2004). Azospirillum-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). *Can. J. Microbiol.* 50: 521-577.
14. Belghith, K. S., Dahech, I., Belghith H., Mejdoub H. (2012). Microbial production of levansucrase for synthesis of fructooligosaccharides and levan. *International journal of biological macromolecules.* 50: 451-458.
15. Bhattacharyya, P. N., Jha, D.K. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agricultura. *World J Microbiol Biotechnol.* 28: 1327-1350.
16. Biari, A., Gholami, A., Rahmani, H. A. (2008). Growth Promotion and Enhanced Nutrient Uptake of Maize (*Zea mays* L.) by Application of Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Arid Region of Iran. *Journal of biological sciences.* 8 (6): 1015-1020.
17. Bible, A., Russell, M. H., Alexandre, G. (2012). The *Azospirillum brasilense* che1 chemotaxis pathway controls swimming velocity, Which affects transient cell-to-cell clumping. *journal of bacteriology.* 194 (13): 3343-3355.
18. Broek, A., Gold, A., Vanderleyden, J. (1989). Electroporation of *Azospirillum brasilense* with plasmid DNA. *FEMS Microbiology.* 61: 177-182.
19. Brown, M. T., Delalez, N. J., Armitage, J. P. (2011). Protein dynamics and mechanisms controlling the rotational behaviour of the bacterial flagellar motor. *Current opinion in Microbiology.* 14: 734-740.
20. Bulgarelli, D., Schlaeppi, K., Spaepen, S., Van Themaat, E., Schulze-Lefert, P. (2013). Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. *Annual Review of Plant Biology.* 64: 807-838.
21. Calva, E., Oropeza, R. (2006). Two-component signal transduction systems, environmental signals, and virulence. *Microbial ecology.* 51 (2): 166-176.
22. Capra, E., Laub, M. (2012). Evolution of two-component signal transduction systems. *Annual Review Microbiology.* 66: 325-347.
23. Carreño-Lopez, R., Campos-Reales, N., Elmerich, C., Baca, B.E. (2000). Physiological evidence for differently regulated tryptophan-dependent

- pathways for indole-3-acetic acid synthesis in *Azospirillum brasilense*. *Mol. Gen. Genet.* 264(4): 521-530.
24. Chang, C., Stewart, R. C. (1998). The Two-Component System: Regulation of Diverse Signaling Pathways in Prokaryotes and Eukaryotes. *American Society of Plant Biologists.* 117 (3): 723-731.
25. Cheung, J., & Hendrickson, W. A. (2010). Sensor domains of two-component regulatory systems. *Current opinion in microbiology*, 13 (2): 116-123.
26. Cosme, Herrera, Y. 2014. Análisis de la participación del gen *hskA* de *A. brasilense* en movilidad. Tesis de maestría. Posgrado en microbiología CICM, ICUAP.
27. Cotter, P., Emerson, N., Gahan, C., & Hill, C. (1999). Identification and disruption of *lisRK*, a genetic locus encoding a two-component signal transduction system involved in stress tolerance and virulence in *Listeria monocytogenes*. *Journal of bacteriology.* 181 (21): 6840-6843.
28. Cui, Y., Tu, R., Wu, L., Hong, Y., Chen, S. (2010). A hybrid two-component system protein from *Azospirillum brasilense* sp7 was involved in chemotaxis. *Microbiological research.* 1-10.
29. Edwards, A. N., Siuti, P., Bible, A. N., Alexandre, G., Retterer, S. T., Doltycz, M. J., Morrell-Falvey, J. L. (2010). Characterization of cell surface and extracellular matrix remodeling of *Azospirillum brasilense* chemotaxis-like 1 signal transduction pathway mutants by atomic force microscopy. *FEMS microbiol lett.* 314: 131-139.
30. Esawy, M. A., Abdel-Fattah, A. M., Ali, M., Helmy, W. A., Salama, B. M., Taie, H. A., Hashem, A. M., Awad, G. A. (2013). Levansucrase optimization using solid state fermentation and levan biological activities studies. *Carbohydrate polymers.* 96: 332-341.
31. Foussard, M., Cabantous, S., Pédelacq, J., Guillet, V., Trainer, S., Mourey, L., Birck, C., Samama, J. (2001). The molecular puzzle of two-component signaling cascades. *Microbes and infection.* 3: 417-424.

32. Goulian, M. (2010). Two-component signaling circuit structure and properties. *Current opinion in microbiology*. 13: 184-189.
33. Green, C. (2010). Characterizing cell-cell and cell-surface interactions in the rhizobacterium *Azospirillum brasilense*. *University of Tennessee Knoxville*. Masters theses.
34. Greer-Phillips, S., Stephens, B., Alexandre, G. (2004). An energy taxis transducer promotes root colonization by *Azospirillum brasilense*. *Journal of bacteriology*. 186 (19): 6595-6604.
35. Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of molecular biology*, 166 (4): 557-580.
36. Hoch, J. (2000). Two-component and phosphorelay signal transduction. *Current opinion in microbiology*. 3: 165-170.
37. Khorchid, A., Ikura, M. (2006). Bacterial histidine kinase as signal sensor and transducer. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 38: 307-312.
38. Link, A., Phillips, D., Church, G. (1997). Methods for generating precise deletions and insertions in the genome of wild-type *Escherichia coli*: application to open Reading frame characterization. *Journal of bacteriology*. 179 (20): 6228-6237.
39. Martin-Didonet, C., Chubatsu, L, S., Souza, E, M., Kleina, M., Rego, F, G., Rigo, L, U., Yates, M, G., Pedrosa, F, O. (2000). Genome structure of the genus *Azospirillum*. *Journal of bacteriology. American society for microbiology*. 182 (14): 4113-4116.
40. Martínez-Miranda. M. del R., Martínez-Delgadillo, J., Alarcón, A., Cerrato-Ferrera, R. (2007). Degradación de fenantreno por microorganismos en la rizósfera del pasto alemán. *Terra latinoamericana*. 25 (1): 25-33.
41. McCarter, L. (2006). Regulation of flagella. *Current Opinion in Microbiology*. 9: 180-186
42. Nakamura, H., Kumita, H., Imai, K., Lizuka, T., Shiro, Y., Haselkorn, R. (2004). ADP Reduces the Oxygen-Binding Affinity of a Sensory Histidine

- Kinase, FixL: The Possibility of an Enhanced Reciprocating Kinase Reaction. *National Academy of Sciences*. 101 (9): 2742-2746.
43. Paldi-Fibach, S., Burdman, S., Okon, Y. (2011). Key physiological properties contributing to rhizosphere adaptation and plant growth promotion abilities of *Azospirillum brasilense*. *FEMS microbiol.* 326; 99-108.
44. Parra, Y., Cuevas, F. (2002). Potencialidades de *Azospirillum* como inoculante para la agricultura. *Cultivos tropicales*. 23 (3): 31-41.
45. Pearl, H. W., Gallucci, K. (1985). Role of Chemotaxis in Establishing a Specific Nitrogen-Fixing Cyanobacterial-Bacterial Association. *Science*. 227 (4687):647-649.
46. Perrig, D., Boiero, M., Masciarelli, O., Penna, C., Ruiz, O., Cassan, F., Luna, V. (2006). Plant growth promoting compound produced by two agronomically important strains of *Azospirillum brasilense*, and their implications for inoculant formulation. *Applied microbiology and biotechnology*. 1-22.
47. Reyrat, J. M., Pelicic, V., Gicquel, B., Rppuoli, R. (1998). Counterselectable markers: Uptapped tools for bacterial genetics and pathogenesis. *Infection and immunity*. 66 (9): 4011-4017.
48. Sallam, K. I., Tamura, N., Imoto, N., Tamura, T. (2010). New vector system for random, single-step integration of multiple copies of DNA into the *Rhodococcus* genome. *Applied and environmental microbiology*. 76 (8): 2531-2539.
49. Sant'Anna, F., Andrade, D., Trentini, D., Weber, S., Schrank, I. (2011). Tools for genetic manipulation of the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum amazonense*. *BMC Microbiology*. 11: 107.
50. Schafer, A., Tauch, A., Jager, W., Kalinowski, J., Thierbach, G., Puhler, A. (1994). Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene*. 145:69-73.

51. Simon, R., U. Priefer, and A. Piihler. (1982). A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram-negative bacteria. *Biotechnology*. 1:784-791.
52. Sheen, J. (2002). Phosphorelay and transcription control in cytokinin signal transduction. *American association for the advancement of science*. 296 (5573):1650-165.
53. Shelud'ko, A., Filip'echeva, Y., Shumilova, E., Khlebtsov, B., Burov, A., Petrova, L., Katsy, E. (2015). Changes in biofilm formation in the nonflagellated *flhB1* mutant of *Azospirillum brasilense* Sp245. *Microbiology*. 84 (2): 144-151.
54. Srikanth, R., Sundhar-Reddy, C, H., Siddartha, G., Ramaiah, J., Uppuluri, K. (2015). Review on producción, characterization and applications of microbial levan. *Carbohydrate polymers*. 120: 102-114.
55. Stephens, B. B., Loar, S.N., Alexandre, G. (2006). Role of CheB and CheR in the complex chemotactic and aerotactic pathway of *Azospirillum brasilense*. *J Bacteriol*. 188: 4759–4768.
56. Sukiman, H.I., New, P. B. (1990). Relationship between Root Colonization and Initial Adsorption of *Azospirillum* to Plant Roots. *Microbial ecology*. 20 (1): 65-74.
57. Tan, Y., Xu, D., Li, Y., Wang, X. (2012). Construction of a novel *sacB*-based system for marker-free gene deletion in *Corynebacterium glutamicum*. *Plasmid*. 67: 44-52.
58. Tien, T. M., Gaskins, M. H., Hubbell, D. H. (1979). Plant Growth Substances Produced by *Azospirillum brasilense* and Their Effect on the Growth of Pearl Millet (*Pennisetum americanum* L.). *Applied and Environmental Microbiology*. 37 (5): 1016-1024.
59. Vande, B. A., Lambrecht, M., Vanderleyden, J. (1998). Bacterial chemotactic motility is important for the initiation of wheat root colonication by *Azospirillum brasilense*. *Microbiology*. 144: 2599-2606.

60. Vee, Aune, T. E., & Aachmann, F. L. (2010). Methodologies to increase the transformation efficiencies and the range of bacteria that can be transformed. *Appl Microbiol Biotechnol.* 85: 1301-1313.
61. Villareal-Astorga, (2012). Caracterización Parcial De Una Cinasa Histidínica de *Azospirillum brasilense*. Tesis de Maestría. Posgrado en microbiología CICM, ICUAP.
62. Weng, G., Bhalla, U.S., Iyengar, R. (1999). Complexity in Biological Signaling Systems. *Science.* 284 (5411): 92-96.
63. West, A., Stock, A. (2001). Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *TRENDS in biochemical Sciences.* 26 (6): 369- 373.
64. Wisniewski-Dye, F., Borziak, K., Khalsa-Moyers, G., Alexandre, G., Sukharnikov, L., Wuichet, K., Hurst, Gregory B., McDonald, W. H., Robertson, John, S., Barbe, V., Calteau, A., Rouy, Z., Mangenot, S., Prigent-Combaret, C., Normand, P., Boyer, M., Siguier, P., Dessaux, Y., Elmerich, C., Condemine, G., Krishnen, G., Kennedy, I., Paterson, Andrew, H., González, V., Mavingui, P., Zhulin, B. I. (2011). *Azospirillum* genomes reveal transition of bacteria from aquatic to terrestrial environments. *Plos genetics.* 7 (12): 1-13.
65. Whitaker, W., Davis, S., Arkin, A., Dueber, J. (2012). Engineering robust control of two-component system phosphotransfer using modular scaffolds. *National academy of sciences.* 109 (44): 18090-18095.
66. Wu, L., Cui, Y., Hong, Y., Chen, S. (2011). A *CheR/CheB* fusion protein is involved in cyst cell development and chemotaxis in *Azospirillum brasilense* Sp7. *Microbiological Research.* 166: 606-617.
67. Wu, L., Cui, Y., Li, H., Tu, R., Chen, S. (2012). Mutants of the hybrid sensor kinase CstA affect cyst cell development in *Azospirillum brasilense* Sp7. *African Journal of Microbiology Research.* 6 (2): 348-354.
68. Wuichet, K., Zhulin, I. (2012). Origins and diversification of a complex signal transduction system in prokaryotes. *Sci signal.* 3 (128): 1-27.

69. Xie, Z., Ulrich, L.E., Zhulin, I. B., Alexandre, G., Haselkorn, R. (2010). PAS domain containing chemoreceptor couples dynamic changes in metabolism with chemotaxis. *National Academy of Sciences*. 107 (5): 2235-2240.