



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS



**“Estudio de la participación del gen AZOBR_140291
(proteína aceptora de metilos putativa) en la
quimiotaxis de *Azospirillum brasilense*”**

Tesis

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO (A) EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA)
CON OPCIÓN EN: BIOQUÍMICA Y GENÉTICA MICROBIANA**

PRESENTA:

IBQ. Sonia Areli Rodríguez Vázquez

ASESOR (ES) DE TESIS:

D.C. Alberto Ramírez Mata
D.C. Beatriz Eugenia Baca

PUEBLA, PUE.

Enero, 2016

INDICE

Resumen del trabajo.....	4
I. Introducción.....	5
I.1 Bacterias promotoras del crecimiento vegetal.....	5
I.2 <i>Azospirillum</i>	7
I.3 Genoma <i>Azospirillum</i>	8
I.4 Interacción <i>Azospirillum</i> - planta.....	8
II. Antecedentes.....	9
II.1 Sistemas de señalización.....	9
II.2 Movilidad y quimiotaxis.....	10
II. 3 Quimiotaxis en <i>Escherichia coli</i> y otros microorganismos.....	12
II. 4 Quimiorreceptores.....	17
II.5 Quimiorreceptores en <i>A. brasilense</i>	19
III. Antecedentes directos.....	21
IV. Justificación.....	22
V. Objetivos.....	22
V.1 Objetivo general.....	22
V.2 Objetivos particulares.....	22
VI. Hipótesis.....	22
VII. Materiales y métodos.....	23
VII. 1 Material biológico, plásmidos y construcciones.....	23
VII. 2 Esquema experimental.....	24
VII. 3 Métodos.....	25
VII. 3. 1 Condiciones de cultivo.....	25
VII. 3.2 Ensayo de movilidad.....	25
VII. 3.3 Ensayo de quimiotaxis.....	25
VII. 3.4 Análisis y manipulación de ADN.....	25
VII. 3.5 Diseño de iniciadores.....	26
VIII. Resultados	
VIII.1 Análisis de la secuencia <i>mcpA</i>	27

VIII.2 Análisis de los sitios de metilación.....	28
VIII.3 Análisis de secuencias promotoras y posibles operones en el contexto genético del gen <i>mcpA</i>	29
VIII.4 Amplificación del gen <i>mcpA</i>	33
VIII. 5 Construcción de la mutante <i>mcpA::Km^R</i>	34
VIII.5.1 Esquema de la construcción de la mutante <i>mcpA::Km^R</i>	35
VIII.5.2 Análisis de la clona pBSK <i>mcpA</i> de <i>E. coli</i> DH5α.....	36
VIII.5.3 Análisis de la clona pBSK <i>mcpA::Km^R</i> de <i>E.coli</i> DH5α.....	37
VIII.5.4 Análisis de la clona pSUP202 <i>mcpA::Km^R</i> de <i>E.coli</i> S17.1.....	37
VIII.5.5 Obtención de la mutante <i>mcpA::Km^R</i> de <i>A. brasilense</i> Sp245.....	39
VIII.6 Análisis de movilidad de la cepa silvestre <i>A. brasilense</i> Sp245 y <i>A. brasilense mcpA::Km^R</i>	41
VIII.7 Análisis de quimiotaxis de la cepa silvestre <i>A. brasilense</i> Sp245 y <i>A. brasilense mcpA::Km^R</i>	43
VIII.8 Observación de la oración de agregados celulares y presencia del flagelo polar en la cepa silvestre y la mutante <i>A. brasilense mcpA::Km^R</i> mediante microscopía de fluorescencia.....	46
IX. Discusión.....	47
X. Conclusiones.....	53
XI. Perspectivas.....	53
Bibliografía.....	54
Anexo.....	58
Preparación de medios de cultivo.....	58
Obtención de DNA genómico de bacterias.....	59
Obtención de ADN plasmídico por miniprep (Gilles Morelle).....	61
Resuspensión de iniciadores.....	63
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	63

Resumen

Azospirillum brasilense tiene la capacidad de colonizar la raíz de una amplia variedad de plantas de interés agronómico, y con ello favorece el crecimiento de esas plantas. La movilidad y la quimiotaxis desempeñan un papel importante en la colonización de *A. brasilense*, tales acciones pueden ser controladas por medio de proteínasceptoras de grupos metilo (MCP, methyl accepting protein). La señal percibida por estas proteínas, se transmite directamente al sistema de doble componente y al aparato flagelar, mediante la vía de la quimiotaxis (Danhorn & Fuqua, 2007). Las MCP son proteínas que se caracterizan por tener distintos dominios como, HAMP, PAS, PilZ, Cache, y el dominio característico MCP para transmitir la señal percibida al sistema de doble componente.

El análisis bioinformático del gen AZOBR_140291 (*mcpA*), realizado en este trabajo, nos indicó que el marco de lectura, contiene el dominio MCP, un dominio de interacción con CheW, y una región transmembranal. En base al contexto genómico y un estudio previo, en donde se obtuvo una mutante por inserción en el gen AZOBR_140288 (*cdgA::gm^R*), que codifica para una diguanilato ciclasa A (Romero Osorio, 2012; López Lara, 2014), se observó alteración en quimiotaxis, misma que no fue complementada por el gen silvestre. Los datos anteriores sugieren que la mutación de *cdgA::gm^R* afectó de manera polar, los genes que se encuentran río abajo en el mismo sentido de la transcripción. En este contexto genómico se encuentra un gen que codifica para una proteína hipotética con dominios PAS/PAC y el gen de la MCP en estudio. Por ello se sugiere, que estos genes probablemente participen en conjunto, detectando distintos estímulos ambientales y/o permitiendo cambiar el estilo de vida de la bacteria. Para probar esta hipótesis fue necesario generar una mutante en el gen *mcpA*, y analizar el fenotipo de la mutante *A. brasilense mcpA::Km^R*, y estudiar la participación de este gen en la quimiotaxis. Los resultados obtenidos fueron claramente la disminución de la movilidad y quimiotaxis en la mutante *A. brasilense mcpA::Km^R*, comparada con la cepa silvestre.

I. Introducción

Las plantas juegan un papel importante en los ecosistemas, debido a que ellas contribuyen para el establecimiento de nichos ecológicos microbianos. Esto se da particularmente en la rizosfera, el área de contacto del suelo con las raíces de las plantas, donde existe absorción de iones y agua, almacenamiento de nutrientes y crecimiento vegetativo de la planta, habiendo también un contacto estrecho con un amplio rango de poblaciones microbianas.

Las raíces de las plantas exudan una gran diversidad de nutrientes orgánicos (ácidos orgánicos, azúcares, vitaminas, aminoácidos, nucleósidos, mucílago, sideróforos) donde estos compuestos pueden funcionar como señales para atraer a las poblaciones microbianas, especialmente aquellas poblaciones capaces de metabolizar compuestos exudados por las plantas y que proliferan en este hábitat, esta comunidad asociada a las raíces de las plantas puede referirse al rizo- microbioma.

Dentro del rizo-microbioma, algunos microorganismos pueden promover el crecimiento y mejorar la salud de la planta a través de diversos mecanismos directos e indirectos. Las rizobacterias que benefician el crecimiento de las plantas se les denominan PGPRs, por sus siglas en inglés (Plant growth-promoting rhizobacteria) (Vacheron *et al.*, 2013). La estructura de la comunidad rizobacteriana está determinada por las especies de plantas, así como las diferencias en la composición y cantidad de los exudados radiculares (Pérez- Montañaño *et al.*, 2014).

I.1 Bacterias promotoras del crecimiento vegetal

Los beneficios de las interacciones microorganismo-planta incluyen, el crecimiento, la disminución de microorganismos causantes de enfermedades, la mejora de la disponibilidad y asimilación de nutrientes. Estos efectos benéficos sobre las plantas pueden lograrse por la interacción directa entre la planta hospedera, lo que incluye varios mecanismos, tales como: producción de ACC (1- aminociclopropano-1- carboxilato) deaminasa para reducir los niveles de etileno en las raíces de las plantas en desarrollo; producción de reguladores del crecimiento de las plantas como auxinas, giberelinas, citosinas y ciertos compuestos volátiles, fijación de nitrógeno, solubilización de fósforo mineral y otros nutrientes, etc.

La estimulación indirecta está relacionada al biocontrol por la actividad antagonista contra microorganismos fitopatogénicos, induciendo la respuesta de resistencia sistémica de la planta (Pérez- Montañaño *et al.*, 2014).

Para comprender y cuantificar el impacto de las PGPR sobre las plantas, se ha llevado a cabo una estrategia siendo esta la inoculación de las raíces con PGPR, monitoreando los efectos resultantes en la planta. Esto ha mostrado que muchas PGPR pueden reducir la velocidad de crecimiento de las raíces primarias, incrementando el número y/o la longitud de las raíces laterales, y estimulando la elongación de los pelos radiculares, de igual manera mejorando el transporte de agua y minerales (Fig. 1) (Vacheron *et al.*, 2013).

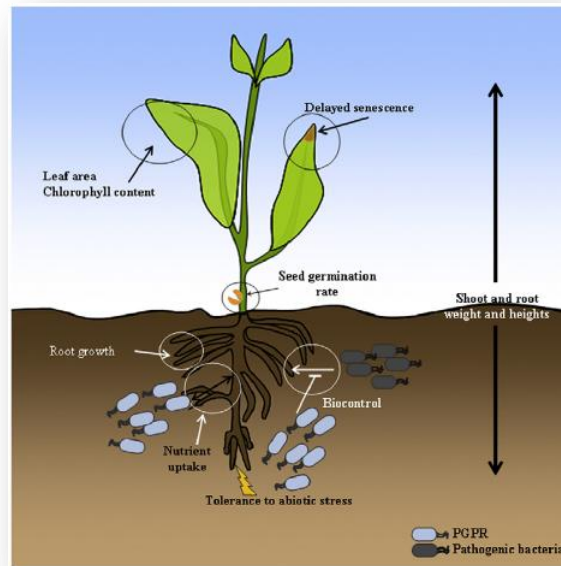


Figura 1. Beneficios a las plantas de las interacciones hospedero-PGPR (Pérez - Montaña *et al.*, 2013). Esos beneficios han incluido el incremento en la velocidad de germinación de la semilla, crecimiento de las raíces, hojas aéreas, transporte de nutrientes, contenido de proteínas, tolerancia a estrés abiótico, pesos y alturas de tallos y raíces, biocontrol y retraso de la senescencia.

Recientemente ha sido reportado que los microorganismos del suelo, incluyendo los de vida libre así como las rizobacterias pertenecen a una diversidad de géneros como los siguientes: *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Serratia*, *Xanthomonas*, exhibiendo una colonización exitosa en la rizósfera (Bhattacharyya & Jha, 2011).

1.2 *Azospirillum*

Azospirillum es una bacteria de vida libre promotora del crecimiento vegetal y producción de semillas, muchas de ellas con importancia ecológica y agronómica (Bashan & Bashan, 2004). Son bacterias gram negativas capaces de fijar nitrógeno, que muestran versatilidad para metabolizar fuentes de C y N, lo cual hace que logren adaptarse en el medio ambiente competitivo de la rizósfera. El amonio, nitrato, nitrito, aminoácidos y el nitrógeno molecular pueden servir como fuente de N (Steenhoudt & Vanderleyden, 2000). En condiciones desfavorables, tales como la desecación y limitación de nutrientes, *Azospirillum* se diferencia a formas similares a quistes. Este cambio morfológico está acompañado por el desarrollo de una cubierta externa de polisacáridos y por la acumulación de abundantes gránulos de poli- β -hidroxibutirato, que puede servir como fuente de C y energía, bajo condiciones de estrés e inanición. Actualmente este género cuenta con 18 especies (Figura 2), siendo las especies más estudiadas *Azospirillum brasilense* y *Azospirillum lipoferum*.

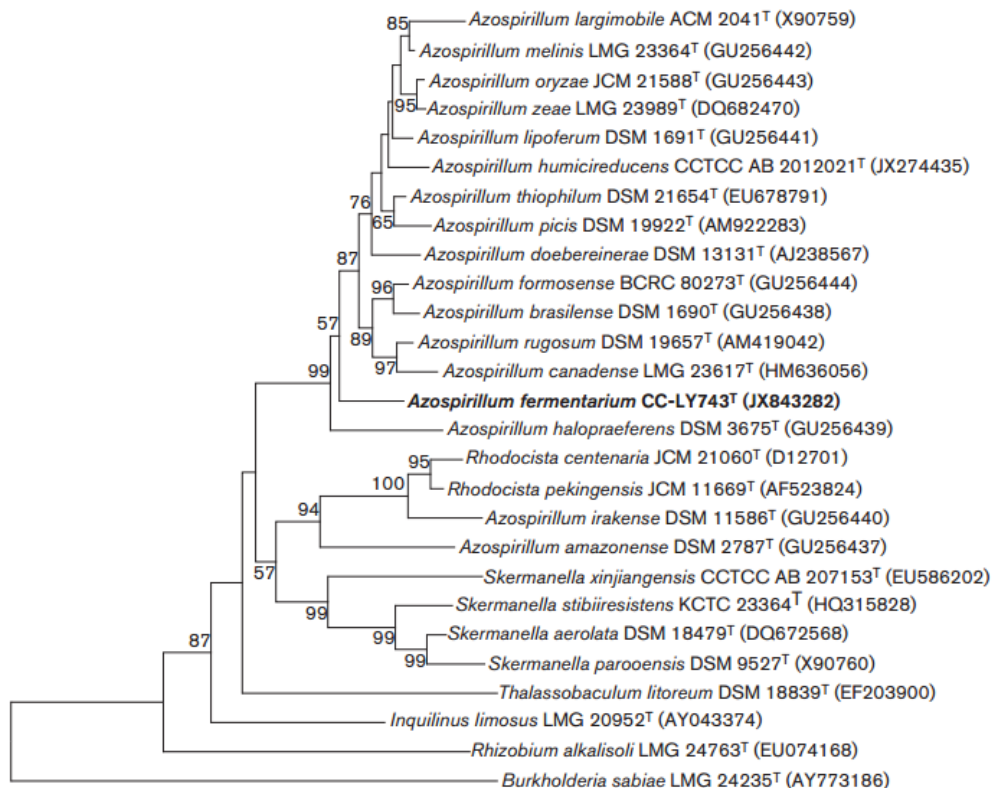


Figura 2. Filogenia de *Azospirillum* basado en la secuencia del gen rRNA 16S (Lin *et al.*, 2013).

I.3 Genoma *Azospirillum*

El genoma del género *Azospirillum* varía en todos tamaños, desde 4.8 Mpb en *A. irakense* hasta 9,7 Mpb en *A. lipoferum* Sp59b (Martin *et al.*, 2000). A nivel de su genoma *Azospirillum* contiene cerca de 6 plásmidos pequeños de 45 a 70 kb, megaplásmidos de 100 a 290 kb y dos megareplicones de 1700 a 1800 kb, también se ha referenciado para la mayoría de las especies la presencia de dos replicones, uno de 570 a 630 kb y otro de 910 a 980 kb (como microcromosomas), algunos de estos probablemente lineales. Igualmente presenta profagos o bacteriófagos asociados al cromosoma de longitudes entre 10 y 65 kb (revisado en Baca, 2009).

En 2011 (Wisniewski-Dye *et al.*, 2011) reportaron la secuencia completa del genoma de *A. brasilense* Sp245 revelando la presencia de un cromosoma principal y 6 plásmidos. Referencian que la mayoría de los genes contenidos en su genoma codifican las funciones críticas para la asociación con plantas y están catalogados como los genes transferidos horizontalmente. De manera interesante, se determinó que existe redundancia en esta cepa de las proteínas MCP y del operón Che, estando presentes 4 copias, de los cuales sólo Che1 se ha descrito de manera experimental, esta información será detallada más adelante (Russell *et al.*, 2013).

I.4 Interacción *Azospirillum*- planta

La colonización exitosa de las bacterias a las raíces de la planta depende de la movilidad activa y la quimiotaxis hacia los exudados radiculares (Wu *et al.*, 2011), todo esto conlleva al microorganismo la habilidad de detectar compuestos químicos liberados por la planta hospedera y navegar hacia el sistema radicular, así mismo contar con un metabolismo más versátil, incluyendo la fijación de nitrógeno, antagonismo hacia la competencia de microorganismos y formación de quistes, lo que le permite la supervivencia en condiciones adversas (Michiels *et al.*, 1991); todos estos factores son importantes en el establecimiento de *Azospirillum* (Greer *et al.*, 2004) en la planta.

La adherencia de *Azospirillum* a las raíces de las plantas se desarrolla en dos etapas completamente independientes:

La primera fase de adsorción es rápida (alcanza un tiempo máximo de 2 h de exposición de la bacteria a las raíces de la planta), es débil y reversible, probablemente gobernada por componentes proteínicos bacterianos.

La segunda fase es de anclaje, en la cual es firme y toma varias horas, es irreversible y está basada en la superficie extracelular de polisacáridos, involucrando una red de material fibrilar que conecta permanentemente la bacteria a la superficie de la planta (Bashan & Bashan, 2004).

Estudios realizados con *A. brasilense* en tomate, mostraron que tiende a concentrarse en sitios laterales de emergencia de la cápsula de la raíz, pelos radiculares y punta de la raíz. Este último es el lugar preferido para la colonización (Camelo *et al.*, 2011). Para que exista el establecimiento de la bacteria en la planta es necesario que haya sistemas de señalización capaces de detectar parámetros ambientales y llevarse a cabo la interacción bacteria- planta. A continuación se menciona la importancia de este grupo de proteínas en este proceso.

II. Antecedentes

II.1 Sistemas de señalización

Los sistemas de señalización también conocidos como sistemas de doble componente para la transducción de señales, son grupos de proteínas que llevan a cabo la detección de parámetros ambientales como: pH, temperatura, osmolaridad y luz, entre otros, en donde a través de una cinasa histidinica, se propaga la fosforilación a un regulador de respuesta (Szurmant & W. Ordal, 2004).

Un típico sistema de doble componente consiste en la proteína de señalización cinasa histidínica (HPK) y un regulador de respuesta (RR). En respuesta a un estímulo ambiental, la cinasa histidínica se autofosforila en su residuo conservado de histidina, usando ATP como fosfodoador. El grupo fosfato es entonces transferido a un residuo de ácido aspártico dentro del dominio receptor del regulador de respuesta. El regulador de respuesta fosforilado es capaz de regular la transducción de señal en la vía, interactuando con otras proteínas de señalización (Fig. 3) (Wu *et al.*, 2011).

Aunque la mayoría de estos sistemas, se compone de dos proteínas diferentes, un subconjunto de estos existe en bacterias, en los que una sola proteína contiene ambos dominios: regulador de respuesta y cinasa histidínica, y esta clase de proteínas generalmente se denomina como sistema de doble componente híbrido. Al igual que el sistema típico, se han reportado algunos sistemas híbridos que juegan un papel importante en la transducción de señales (Wu *et al.*, 2011).

II. 2 Movilidad y quimiotaxis

Todas las especies de *Azospirillum* son móviles debido a la presencia de un flagelo polar y varias especies también tienen un tipo de flagelación mixta. Por ejemplo, en *A. lipoferum* y *A. brasilense*, el flagelo polar es producido en un ambiente líquido, y numerosos flagelos laterales junto con el flagelo polar, son inducidos en medios viscosos y semisólidos (Borisov *et al.*, 2009). El flagelo polar es el responsable del fenotipo natatorio, mientras que el lateral, participa en el fenotipo de movilidad de superficie tipo “swarming” (Kearns, 2010).

La quimiotaxis es el proceso por el cual los microorganismos detectan los estímulos químicos ambientales, moviéndose hacia condiciones favorables, controlando la dirección de la rotación del flagelo (Wu *et al.*, 2011). La quimiotaxis integra las señales ambientales en una respuesta mediante el uso de una vía de transducción de señales. Esta vía está compuesta por transductores de quimiotaxis, cinasa histidínica CheA, una proteína acoplada a CheW, reguladores de respuesta CheY-CheZ y proteínas de adaptación, CheB-CheR (Stephens *et al.*, 2006)

Como ya se había mencionado anteriormente, la movilidad y la quimiotaxis son factores importantes para una eficiente colonización de la bacteria a la planta. Pero también la aerotaxis es un comportamiento principal de respuesta en *A. brasilense*, en donde guía a la bacteria a una concentración preferida de oxígeno aproximadamente de 4μM, la cual parece ser la concentración óptima de oxígeno para la generación de energía y fijación de nitrógeno.

Otro comportamiento que ya ha sido estudiado en *A. brasilense* es la taxis energética, la cual es un comportamiento dominante en esta bacteria, donde los cambios en el sistema de transporte de electrones gobiernan la mayoría de las respuestas, siendo procesados varios quimioefectores a través de este mecanismo. Para regular las respuestas quimiotácticas en bacterias móviles, los sistemas de transducción de señales pueden regular comportamientos celulares, así como la rotación flagelar en varias especies, incluyendo *A. brasilense* (Siuti *et al.*, 2011).

Las respuestas de movilidad en las bacterias dependen de la maquinaria de transducción de señales que transmite la información del entorno ambiental al aparato de movilidad. Cambios en la concentración de varios efectores son detectados por quimiorreceptores especializados, denominados proteínas receptoras de grupos metilo (MCP, por sus siglas en inglés). La unión de un quimioefector a la proteína MCP, conduce a cambio conformacional transmitido al motor del flagelo por medio de una cascada de

fosforelevo, entre las proteínas citoplasmáticas de la maquinaria de señalización (Fig. 3) (Alexandre & Zhulin, 2001).

Se ha identificado una vía de transducción de señales de quimiotaxis en *A. brasilense*, que comprende los homólogos CheAWYBR. La secuenciación del genoma de *A. brasilense* indica que tiene tres grupos de genes de quimiotaxis, y uno más que es el recientemente estudiado, nombrado Che1. Sin embargo, existen evidencias que sugieren que la función primaria de esta vía, no es precisamente el control del comportamiento flagelar (Bible *et al.*, 2008), sino que modula los cambios en las propiedades adhesivas de la superficie celular impactando en la agregación y floculación de célula a célula (Siuti *et al.*, 2011).

Mutantes de *A. brasilense* obtenidas por delección en los genes *cheA1* y *cheY1*, que codifican para proteínas centrales que controlan la respuesta de salida a la vía de transducción de señales, generaron células que se agregan y flocculan más que la cepa silvestre. La mutante en donde todos los genes codificados por el agrupamiento génico de *che1*, presentaron un fenotipo similar a las cepas carentes de CheA1 o CheY1, y muestran quimiotaxis muy similar a la cepa silvestre, consistente con el papel de Che1 que es el de regular la habilidad de las células para floccular. En el caso de la mutante, que interrumpe la función de ambas proteínas CheB1 y CheR1, se encuentra severamente dañada en floculación, aunque tiene un fenotipo de quimiotaxis alterada de manera parcial, lo que sugiere que puede existir una conexión con otro sistema Che (Siuti *et al.*, 2011).

II. 3 Quimiotaxis en *Escherichia coli* y otros microorganismos

El sistema mejor estudiado es el de *E. coli*, el cual regula el movimiento natatorio en carreras/tumbos (quimiotaxis). Este sistema de transducción de señales consiste en un grupo de proteínas que incluye CheA, CheW, CheY y CheR y un grupo de quimiorreceptores (conocidas como proteínasceptoras de metilos) que perciben señales ambientales. Las señales detectadas por las MCPs modulan la actividad de la cinasa histidínica CheA asociada con receptores vía CheW. La fosfo-transferencia de CheA a CheY conlleva a la fosforilación y activación del regulador de respuesta (CheY-P), que puede desencadenar un cambio en la dirección de la rotación del flagelo (tumbos) (Bible *et al.*, 2008). La interacción de CheY-P con el motor flagelar induce la rotación a favor de las manecillas del reloj CW (abreviatura del inglés clockwise), de uno o varios flagelos y desestabilizándolo, causando un movimiento en reversa o tumbo de la célula (Bi & Lai, 2015). Los cuerpos celulares son reorientados y, en contraste, la unión del attractante inhibe la actividad de auto-fosforilación de CheA, reduciendo los niveles de CheY-P e induce la rotación del flagelo en sentido contrario a las manecillas del reloj CCW (acrónimo del inglés counter clockwise), provocando el movimiento natatorio mediante la propulsión del flagelo (Fig. 3).

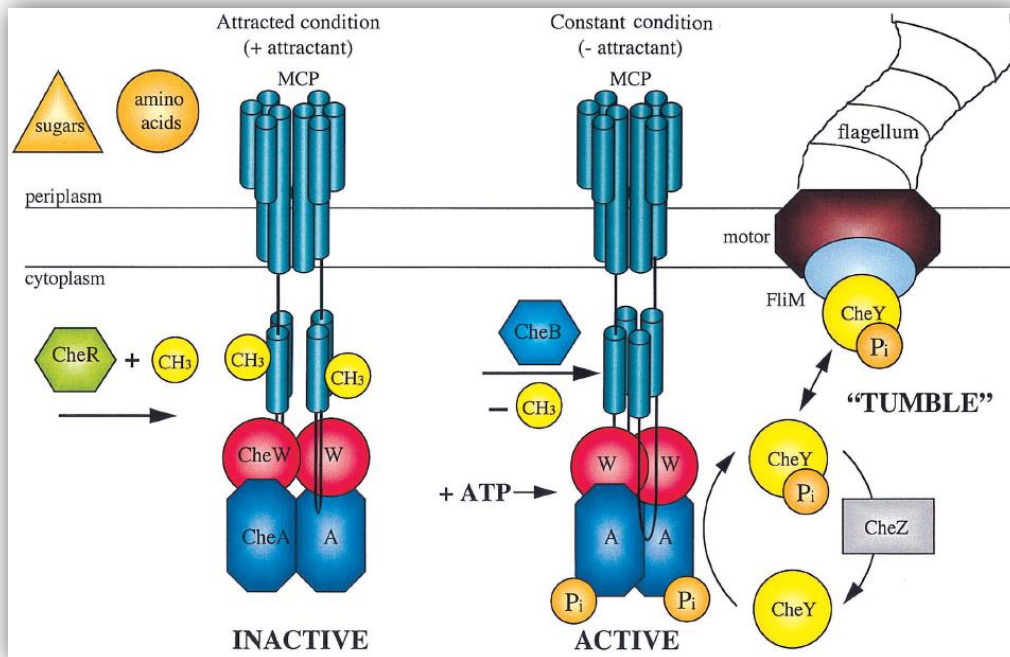


Figura 3. En *Escherichia coli* la detección de un estímulo es revelado a través de las proteínas MCPs (Aizawa *et al.*, 2000).

La actividad de CheB y CheR modula el estado de metilación de las MCPs, lo que afecta su sensibilidad. CheB, una metilesterasa, activada a través de la fosforilación por CheA, remueve los grupos metilo agregados a las MCPs por la metiltransferasa CheR (Bible *et al.*, 2008) (Fig. 3).

En *E. coli*, la unión del atractante inhibe la cinasa CheA, mientras que en *B. subtilis*, la unión del atractante estimula la actividad de esta proteína, por ello es importante comprender la estructura de los receptores y como se unen al atractante (o repelente) cambiando la actividad asociada a la cinasa CheA (Szurmant & Ordal, 2004).

El sistema de quimiotaxis consiste en dos estados:

Excitación: Una vía que involucra las proteínas de quimiotaxis (MCPs), transmitiendo la señal al sistema de doble componente, permitiendo la rotación del flagelo. Las señales que regulan la actividad de CheA y el estado de fosforilación de su regulador de respuesta CheY controla la afinidad con el motor flagelar, y,

Adaptación: Regula el estado de metilación de las MCPs mediante la metilesterasa CheB, un regulador de respuesta que es fosforilado por CheA, para estimular la eliminación de los grupos metilo de los receptores y la metiltransferasa CheR que incorpora un grupo metilo de manera constitutiva y específica a los residuos de glutamato de los receptores (Wuichet *et al.*, 2007). Por lo tanto, el movimiento natural de la bacteria requiere la habilidad para reconocer cuando la bacteria se está moviendo hacia la dirección errónea, o hacia las altas concentraciones de atractantes, así que, una “memoria” es requerida para indicar si se alcanzan las altas o bajas concentraciones del compuesto (Szurmant & Ordal, 2004).

Se ha revelado por medio del análisis de genomas secuenciados, que algunas especies bacterianas tienen múltiples vías homólogas de transducción de señales de la quimiotaxis (Tabla 1). En *E. coli* y en otras especies bacterianas estudiadas, cientos de proteínas receptoras están arregladas a lo largo de conjuntos proteicos, usualmente localizados en los polos de las células. En esos agrupamientos, los quimiorreceptores están organizados en trímeros o dímeros, en la cual forman complejos terciarios de señalización con CheA y CheW (Porter *et al.*, 2011).

-
- Metilación dependiente e independiente

Metilación dependiente

La metiltransferasa CheR transfiere grupos metilo del S-adenosilmetionina a los residuos de glutamato en los receptores, produciéndose S-adenosilhomocisteína. En *B. subtilis*, es requerida para la adaptación a repelentes, pero en el caso de *E. coli* esta proteína es necesaria para la adaptación a atractantes, uniéndose a ambas regiones del receptor, al extremo C-terminal y a la región de metilación del mismo, moviéndose a través del receptor de un lado a otro. A diferencia de CheR, CheB es regulada, tiene un dominio N-terminal regulador de respuesta, sujeto a fosforilación, y un dominio C-terminal con actividad enzimática. En *E. coli* CheB-P es 10 veces más activa cuando se encuentra fosforilada (Szurmant & Ordal, 2004).

Metilación independiente

Este tipo de metilación es llevado a cabo por una proteína similar a CheW, que en este caso es CheV, que cuenta con dos dominios N-terminal homólogos a CheW y un dominio regulador de respuesta. CheV puede ser solo un sistema de adaptación de *Helicobacter pylori*, donde están ausente CheR y CheB, existiendo tres CheVs, siendo únicamente CheV1 requerida para la quimiotaxis. CheC es una proteína que tiene la actividad de hidrolizar a CheY-P, elevando los niveles de CheA-P, de tal manera influenciando directa o indirectamente en la actividad de CheA (Szurmant & Ordal, 2004).

Tabla 1. Comparación de las vías de quimiotaxis de varias especies estudiadas (Porter *et al.*, 2011).

	<i>E. coli</i>	<i>R. sphaeroides</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Filo	Proteobacteria	Proteobacteria	Firmicutes	Proteobacteria
Clase	Gamaproteobacteria	Alfaproteobacteria	Bacilo	Gamaproteobacteria
Estímulo detectado	<ul style="list-style-type: none"> - Concentración periplásmática de atractantes - Oxígeno y aceptor final de electrones - Repelentes 	<ul style="list-style-type: none"> - Concentración periplásmática de atrayentes - Oxígeno y aceptor final de electrones - Luz - Estado metabólico de la célula 	<ul style="list-style-type: none"> - Concentración externa de atractantes - Oxígeno 	<ul style="list-style-type: none"> - Concentración periplásmática de atractantes - Oxígeno y aceptor final de electrones
Número de quimiorreceptores	5	13	10	26
Tipos de quimiorreceptores	Transmembranal	Transmembranal y citoplasmático	Transmembranal y citoplasmático	Transmembranal y citoplasmático
Vías de quimiotaxis	1	3	1	4
Grupos de genes que codifican para el flagelo	1	2	1	1
Número y posición del flagelo	4-6 peritricos	1, subpolar (Fla1); 3-4, polar (Fla2)	4-9, peritricos	1, polar; además se mueve usando retracción del pili tipo IV
Dirección de rotación	Bidireccional	Unidireccional, (Fla1)	Bidireccional	Bidireccional
Fuente de energía para la rotación	Fuerza protón motriz de electrones	Fuerza protón motriz de electrones (Fla1)	Fuerza protón motriz de electrones	Fuerza protón motriz de electrones
Efecto de CheY-P sobre la rotación del motor	Activación de la rotación en contra de las manecillas del reloj hacia favor de las manecillas.	Para la rotación, debido a la acción de un freno molecular	Activación de la rotación a favor de las manecillas del reloj hacia en contra de las manecillas del reloj	Promueve la activación (reversa)
Localización de proteínas de señalización	Polos de la célula	Polos de la célula y en el citoplasma	Polos de la célula	Polos de la célula
Mecanismos de terminación de la señal	CheZ tiene actividad de fosfatasa hacia CheY-P	No tiene CheZ; CheA, es una fosfatasa para CheY-P.	No tiene CheZ; CheC y FliY son fosfatasas para CheY-P	CheZ tiene actividad de fosfatasa hacia CheY-P

Continuación de la Tabla 1. (Porter *et al.*, 2011).

	<i>M. xanthus</i>	<i>S. meliloti</i>	<i>R. centenum</i>
Filo	Proteobacteria	Proteobacteria	Proteobacteria
Clase	Deltaproteobacteria	Alfaproteobacteria	Alfaproteobacteria
Estímulo detectado	- Atractantes y repelentes	- Concentración periplásmica de atractantes	- Concentración periplásmica de atractantes - Oxígeno y aceptor final de electrones - Luz
Número de quimiorreceptores	21	7	34
Tipos de quimiorreceptores	Transmembranal y citoplasmático	Transmembranal y citoplasmático	Transmembranal y citoplasmático
Vías de quimiotaxis	8	2	3
Grupos de genes que codifican para el flagelo	0	1	2
Número y posición del flagelo	No flagelada, usa pili tipo IV (S- movilidad) y A- movilidad	2-6, peritricos	1, polar (en medio líquido); >10, laterales (en medio sólido)
Dirección de rotación	No flagelada	Unidireccional y velocidad variable	Bidireccional
Fuente de energía para la rotación	No flagelada	Fuerza protón motriz de electrones	Desconocido
Efecto de CheY-P sobre la rotación del motor	El sistema Frz controla la frecuencia de reversas	La unión de CheY-P, induce la quimiocinesis lenta de la rotación	Promueve la activación
Localización de proteínas de señalización	Polos de la célula y en el citoplasma	Polos de la célula	Desconocido
Mecanismos de terminación de la señal	No tiene CheZ, tiene un homólogo de CheC	CheY, es un canal de fosfatasa para la unión de CheY al motor	No tiene CheZ o CheC; mecanismo desconocido, pero puede involucrar canales de fosfato

II. 4 Quimiorreceptores

Son receptores que inician la cascada de transducción de señales mediante el proceso de las señales ambientales e intracelulares, alterando la actividad de la cinasa histidínica CheA. Las secuencias de las MCPs típicamente consisten de un dominio sensor, un dominio HAMP y un dominio que interactúa con CheA (Fig. 4) (Wuichet *et al.*, 2007). La estructura de los receptores y algunos ejemplos de ellos, se muestran a continuación:

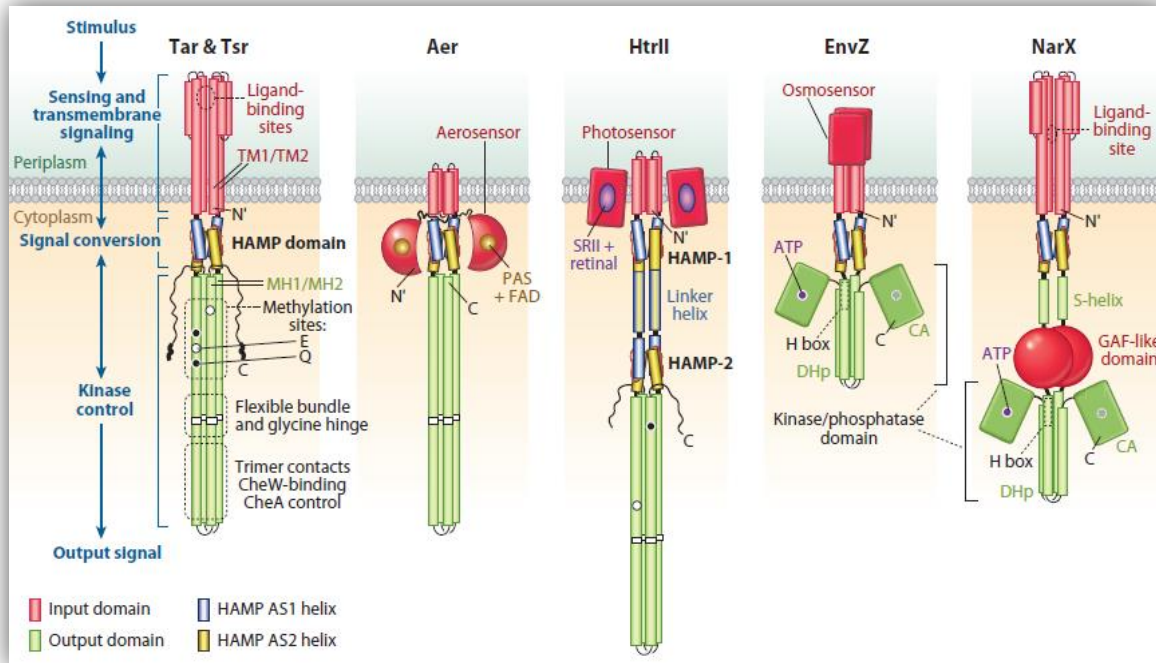


Figura 4. Estructura convencional de los receptores y cinasas. El C-terminal se representa (C) y el N-terminal (N). Los círculos en negro los dominios de metilación de Tar/Tsr y HtrII, sintetizados como glutamina y consecuentemente desamidado a glutamato; los círculos en blanco representan los glutamatos. TM1, TM2, representan los segmentos transmembranales 1,2; MH1, MH2, las hélices de metilación 1; CA dominio catalítico y de unión a ATP, DHP dominio de dimerización y fosfo transferencia de histidina; H box, segmento que contiene el sitio de auto-fosforilación (Parkinson, 2010).

De acuerdo a los mecanismos de señalización, esos elementos pueden ser divididos en: un módulo de señalización transmembrana que incluye un dominio periplasmático y transmembrana, un módulo de conversión de la señal, compuesto por el dominio HAMP y un módulo control de cinasa, constituido por una asa flexible y la región de contacto con otra proteína (Bi & Lai, 2015).

Los receptores de *E. coli* Tar y Tsr, detectan aspartato y serina, respectivamente, y de estos los menos abundantes en esta bacteria, Trg y Tap detectan ribosa/galactosa y dipéptidos, respectivamente. En la unión del quimiorreceptor al atrayente, se propone que interactúan directamente, pero en algunos casos particulares, las proteínas de unión se unen específicamente al quimioefector y el complejo se une el

receptor. Así, en *E. coli*, la galactosa se une a la proteína de unión a galactosa, la ribosa se une a la proteína de unión a la ribosa, y el complejo se une al receptor Trg. La maltosa se une a la proteína de unión a maltosa, y el complejo se une al receptor Tar de aspartato (Szurmant & Ordal, 2004).

Estos quimiorreceptores son homodímeros transmembranales con estructura secundaria de α -hélice, lo anterior sustentado en análisis de la estructura cristalina de las proteínas y de resonancia magnética nuclear, de las regiones periplasmática, HAMP y dominio citoplasmático (Sferdean *et al.*, 2012). Existen cuatro principales clases de MCP en base a la topología de la membrana, que son las siguientes (Fig. 5):

-Clase I: Tienen un dominio sensor periplasmático, anclado por una hélice transmembrana N-terminal (TM) y conectada por una hélice TM interna al dominio HAMP. Esta clase incluye los receptores, Tar, Tsr, Trg y Tap de *E. coli*.

-Clase II: Cuentan con un dominio sensor citoplasmático N-terminal, conectado por una hélice TM al dominio HAMP y dominio de señalización. Un ejemplo de estos, es el sensor de aerotaxis Aer de *E. coli*.

-Clase III: Esta clase se subdivide en dos grupos, sensores de clase IIIc y IIIm. Los sensores de clase IIIc, están ancladas en su extremo N-terminal por una hélice TM, seguido de residuos de amino ácidos que forman el dominio sensor citoplásmico, el dominio HAMP y el dominio de señalización citoplásmico. Las MCPs de clase IIIm, son como la anterior, excepto que el dominio sensor está unido a la membrana, en lugar de unirse a la región citoplásmica; Htr8, receptor de aerotaxis de *Halobacterium salinarum*, es un ejemplo de los receptores clase IIIm.

-Clase IV: Esta clase de MCPs, son completamente citoplasmáticas, carecen de regiones transmembranales y usualmente de dominios HAMP. El sensor de oxígeno HemAT de *B. subtilis*, es un ejemplo de este grupo de clase IV (Wuichet *et al.*, 2007).

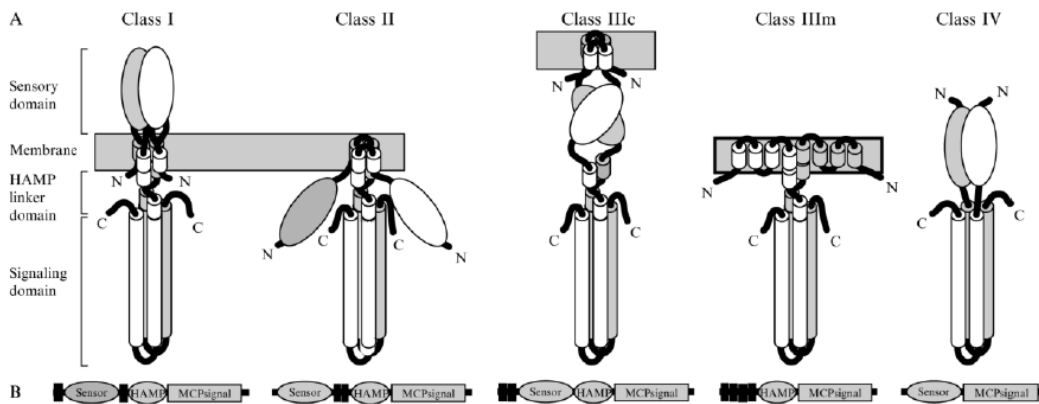


Figura 5. Clases de topología de membrana de los MCPs. A) Representación esquemática de la estructura tridimensional de los dímeros de MCP de las distintas clases. B) Clases de MCPs, determinados por sus dominios de arquitectura (Wuichet *et al.*, 2007).

II. 5 Quimiorreceptores en *A. brasilense*

En *A. brasilense*, se ha estudiado una proteína denominada SbpA (sugar protein binding A), involucrada en el transporte de D-galactosa y funciones de quimiotaxis hacia otros azúcares como: D- galactosa, L- arabinosa y D- fucosa, la expresión de este gen *sbpA*, requiere de la presencia de alguno de los azúcares mencionados en el medio de crecimiento (Van Bastelaere *et al.*, 1999).

Han sido estudiados y caracterizados algunos receptores presentes en *A. brasilense*, los cuales son AerC y Tlp1. AerC sensor citoplasmático de taxis energética (Xie *et al.*, 2009). Este receptor se caracteriza por poseer dominios PAS, su estructura predice que su ubica en el citoplasma; el contexto genético indicó que se localiza en el operón *nif*, con un promotor regulado por el regulador transcripcional NifA. Este receptor funciona como un transductor de la taxis energética, aumentando su expresión en condiciones de fijación biológica de nitrógeno y detectando la poza celular de FAD. Por lo que, la localización celular y su contribución al comportamiento se correlaciona con los cambios metabólicos, bajo las condiciones de fijación de nitrógeno, proponiendo un mecanismo por la cual la quimiotaxis está coordinada con los cambios dinámicos en la fisiología celular.

El quimiorreceptor transmembranal, Tlp1, el cual también funciona en la taxis energética, se encuentra en el periplasma y carece de un motivo reconocible para la detección de energía y el estado redox, por lo tanto los estímulos primarios que afectan a Tlp1 siguen siendo desconocidos. Curiosamente, Tlp1 contiene un dominio PilZ en su extremo C-terminal, estos dominios PilZ son omnipresentes en los

genomas de bacterias y se sabe que se une al segundo mensajero di-GMPc. Cuando hay presencia de oxígeno y la poza intracelular de di-GMPc es elevada, Tlp1 une di-GMPc, éste sufre un cambio conformacional y se activa la cascada de señalización que involucra a Che1. Así los elevados niveles intracelulares de di - GMPc de manera transitoria posibilitan que la bacteria se dirija a sitios de baja concentración de oxígeno. Si el estímulo persiste promueven la transición de células móviles a un estilo de vida sésil. Mientras que concentraciones bajas de oxígeno o compuestos, mediante aerotaxis o quimiotaxis, permiten que células móviles exploren su entorno (Russell *et al.*, 2013).

III. Antecedentes directos

Romero Osorio en 2012, obtuvo la mutante del gen *cdgA* que codifica para una diguanilato ciclasa (CdgA), que nombró *A. brasilense* 1428-A (*cdgA::gm^R*). El análisis fenotípico incluyó ensayos de formación de biopelícula, producción de exopolisacáridos (EPS) y movilidad con distintos quimioattractantes, comparando los resultados con la cepa silvestre *A. brasilense* Sp7 observó una disminución en la formación de biopelícula y de los EPS, como se esperaba y una disminución drástica en la movilidad, resultado contradictorio. Para corroborar si este gen es importante para la movilidad se prosiguió a complementar la mutante con el gen silvestre, la cual logró revertir el fenotipo de biopelícula y EPS pero no el de movilidad, sugiriendo que la proteína CdgA no participa en este fenotipo.

Esto condujo a analizar el contexto genómico del gen *cdgA*, en *A. brasilense* Sp245, localizando corriente abajo genes que codifican para proteínas relacionadas con la movilidad del tipo “methyl-accepting chemotaxis sensory transducer”(MCP), que presenta el mismo sentido de transcripción, como se muestra en la figura 6 , lo que es muy posible que el efecto observado de movilidad alterada y no complementada por *dgcA* sea muy probablemente debido a un efecto polar en la transcripción de los genes aledaños.

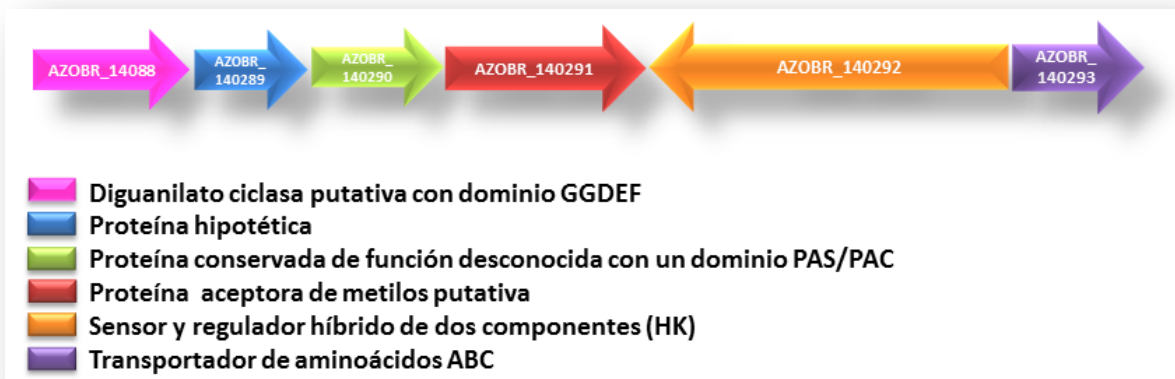


Figura 6. Mapa de genético del fragmento que contiene la secuencia de genes que codifica para las proteínas. AZOBR_140287 (Diguanilato ciclasa CdgA), AZOBR_140288 (Proteína hipotética), AZOBR_140289 (proteína conservada de función desconocida con dominio PAS/PAC), AZOBR_140291 (proteína putativa aceptora de grupos metilo, MCP), AZOBR_140292 (sensor y regulador híbrido de dos componentes HK), AZOBR_140293 (transportador ABC).

IV. Justificación

A través de la energía de taxis, las bacterias buscan el ambiente más favorable para su crecimiento. La taxis hacia el oxígeno y otros atrayentes promueven la colonización de las raíces por *A. brasilense*.

Por lo tanto es relevante estudiar la quimiotaxis de *Azospirillum* debido a que se considera como uno de los géneros bacterianos más importantes que mejoran el crecimiento e incrementa el rendimiento de un gran número de especies cultivables en todo el mundo.

V. Objetivos

V.1 Objetivo general

Estudiar el gen (AZOBR_140291) que codifica para la McpA, que participa en la quimiotaxis en *A. brasilense*.

V. 2 Objetivos particulares

- ✚ Construir una mutante *A. brasilense* (*mcpA::Km^R*).
- ✚ Efectuar ensayos de quimiotaxis de la mutante *A. brasilense* (*mcpA::Km^R*) y la cepa silvestre *A. brasilense* Sp245.

VI. Hipótesis

La proteína McpA (AZOBR_140291) de *A. brasilense* tienen una función importante en la movilidad y quimiotaxis, mediante la detección de compuestos químicos, en busca de condiciones óptimas para el crecimiento de la bacteria.

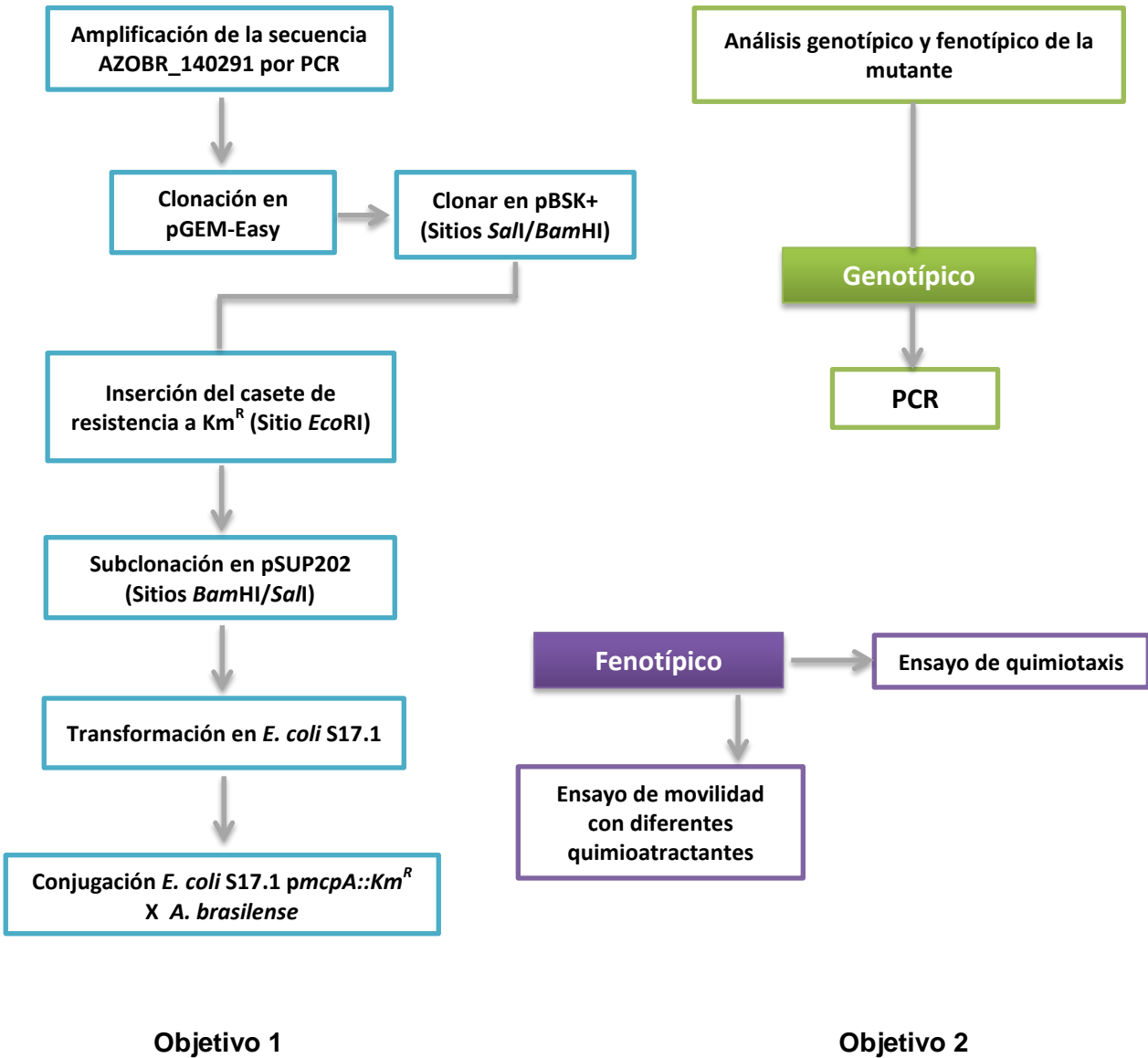
VII. Material y métodos

VII.1 Material biológico, plásmidos y construcciones

Cepa	Características	Referencia
<i>A. brasilense</i> Sp245	Cepa silvestre, aislada de la superficie de raíces de trigo	Baldani <i>et al.</i> , 1987
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>fhuA2</i> Δ (<i>argF-lacZ</i>) <i>U169</i> <i>phoA</i> <i>glnV44</i> Φ 80 Δ (<i>lacZ</i>) <i>M15</i> <i>gyrA96</i> <i>recA1</i> <i>relA1</i> <i>endA1</i> <i>thi-1</i> <i>hsdR17</i>	Hanahan, 1983.
<i>E. coli</i> S17.1	<i>pro</i> , <i>thi</i> <i>hsd</i> , <i>recA</i> , integración cromosómica de RP4-2 Tc:: Mu- Km Tn7	Simon <i>et al.</i> , 1983
<i>A. brasilense-mcpA</i> ::Km ^R	Cepa mutante que contiene el gen <i>mcpA</i> con la inserción de un casete de resistencia a Km ^R	Este trabajo
<i>A. brasilense</i> Sp245- GFP	Cepa silvestre que contiene el plásmido p2444 con la proteína verde fluorescente y la resistencia a Gm	Este trabajo
<i>A. brasilense mcpA</i> ::Km ^R - GFP	Cepa mutante que contiene el plásmido p2444 con la proteína verde fluorescente y la resistencia a Gm	Este trabajo

Plásmidos y construcciones	Características	Referencia
pGEM- T easy	Vector de clonación	
pSUP202	Vector suicida	Simon <i>et al.</i> 1983
pBluescript II SK(+)	Vector de clonación	
pBluescript II SK(+)-Km	Vector con el casete de resistencia a Km	Este trabajo
pGEMmcpA	Vector de clonación que contiene un fragmento 1920 pb que integran el gen <i>mcpA</i>	
pBSKmcpA	Derivado del vector pBluescript II SK(+) que contiene un fragmento de 1920 pb que integran el gen <i>mcpA</i>	Este trabajo
pBSKmcpA::Km ^R	Derivado del vector pBluescript II SK(+) que contiene un fragmento de 1920 pb que integran el gen <i>mcpA</i> y el casete de resistencia a Km de 1500 pb	Este trabajo
pSUP202 <i>mcpA</i> ::Km ^R	Derivado del vector pSUP202 que contiene un fragmento de 3.5 kb que integran el gen mutado <i>mcpA</i> ::km ^R	Este trabajo

VII. 2 Esquema experimental



VII. 3 Métodos

VII. 3. 1 Condiciones de cultivo

Las cepas de *E. coli* S17.1 y *E.coli* DH5 α , fueron cultivadas en medio LB, durante 16 h, en medio Luria Bertani (LB), incubadas a 37°C. La cepa de *A. brasilense* Sp245 y la mutante generada *mcp::Km^R* fueron cultivadas en medio D (Difco), medio mínimo K-malato y rojo congo a 30°C.

VII. 3. 2 Ensayo de movilidad

Para ensayos de movilidad partiendo de un inóculo de medio LB modificado a una D.O. ($\lambda=600\text{nm}$) de 1.1 a 1.3, se coloca 5 μL ($1.25- 1.5 \times 10^7$ UFC) en una placa de medio mínimo base-K con el quimio-atractor a evaluar, a una concentración de 34 mM (Malato, Piruvato, Succinato, Fumarato, Glutamato, Gluconato, Lactato, Prolina, Fructosa) y agar suave a una concentración de 0.25%, se incubaron a 30 °C, midiendo los halos quimiotácticos a las 24 y 48 horas. Se llevaron a cabo tres ensayos independientes, por duplicado cada uno.

VII. 3. 3 Ensayo de quimiotaxis

Los ensayos de quimiotaxis se llevaron a cabo, evaluando los mismos quimioatractantes a 34mM contenidos en un cilindro de agar (CA) con 1% de agar bacteriológico y solución reguladora de quimiotaxis (10mM de K_2HPO_4 , 10mM KH_2PO_4 y 0.1mM EDTA, pH 6.9-7); por otro lado el cultivo de bacterias, se resuspendieron en buffer de quimiotaxis y agar suave al 0.3 %. Colocando el CA en la placa que contiene el cultivo, se incubó a 30° C durante cuatro horas. Transcurrido ese tiempo se miden los halos quimiotácticos. Se llevaron a cabo tres ensayos independientes, por duplicado cada uno.

VII. 3.4 Análisis y manipulación de ADN

La extracción de DNA plasmídico se realizó mediante la técnica de Gilles Morelle (1989), la extracción de DNA genómico por la técnica de CTAB, la transformación y conjugación, de acuerdo a Sambrook *et al.*, (2001). La reacción en cadena de la polimerasa se realizó con la polimerasa *Taq platinum* de acuerdo a las especificaciones del proveedor (Invitrogen). Las enzimas de restricción fueron utilizadas de acuerdo a las indicaciones del proveedor (Invitrogen y Fermentas). Las condiciones de PCR para la ampliación son las siguientes:

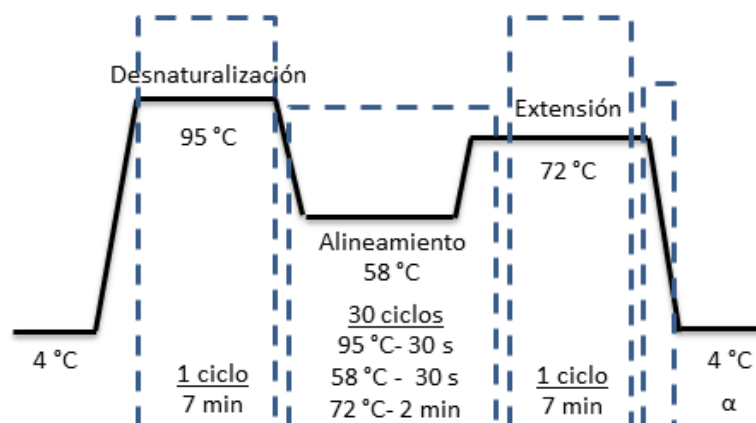


Figura 7. Condiciones de PCR para la amplificación del gen AZOBR_140291.

VII. 3. 5 Diseño de iniciadores

Se diseñaron una par de iniciadores utilizando el Primer Select del software DNASTar, a partir de la secuencia del gen AZOBR_140291 que codifica para la proteína McpA de *A. brasilense* Sp245, la cual amplifica un fragmento de 1920 pares de bases, 261 pares de bases río arriba y 390 río abajo del gen. En el delantero (F) se le agregó el sitio de restricción *Bam*HI y en el reverso (R) el sitio *Sal*I, para su posterior subclonación en el vector suicida pSUP202, los iniciadores diseñados se muestran a continuación:

	Nombre de oligo	Secuencias	Tamaño amplificado (bases)	Sitios de restricción	Tm (°C)
Forward	<i>Fmcp_01</i>	ACCC GGATC CCCCATGTCACGCCGGTTTTTC	1920	<i>Bam</i> HI	59.6
				GGATCC	
Reverse	<i>Rmcp_02</i>	AACC GTCGAC AGGATTCGGCCTGTTGATGG		<i>Sal</i> I	56.1
				GTCGAC	

VIII. RESULTADOS

VIII.1 Análisis de la secuencia *mcpA*

Partiendo de la secuencia de la McpA putativa, proveniente de la banca genómica de *A. brasilense* Sp7, y considerando la secuencia del gen AZOBR_140291 con un tamaño de 1263 pb del genoma secuenciado de *A. brasilense* Sp245, se realizó el análisis estructural, en donde este gen codifica para una proteína de 420 aminoácidos, donde la secuencia peptídica y sus dominios, se muestran a continuación:

```
1   MAALMSGAQVYGLATGDAIAALLGLLAVLPCLAAIRWLVLNRTIRKASTVIAAAEKGDLQPRILNIHGASSIA
76  DMLRTINRLLDRVESFGKEANAAMQHAATEGQYYRRIVMTGMVGEFGAYARQINDGLAAMDGKSREFVESAT
147 RIGANIKEVAQSLASAAQLEASSTAMTATAATASEQSFSAASAAEQVSSNVDGVAAATGEVSGAIGEVAQGV
220 SRTADLARSSVEKVVREADATIRSLAASDQIGAVVQLINDIASQTNLLALNATIEAARAGEAGKGFVAVTEVKNL
296 ANQTAKATEDITAQITQVQSVTRDTAAVIQHVGGMIHDIDEIAVGIAGAAEQQSAAIDEISRSIREASAGVRTVA
371 DAVTSVSSGAQDASAAASQVLSSAGELARRAVTLNGDIDNFVARVCGGQR
```

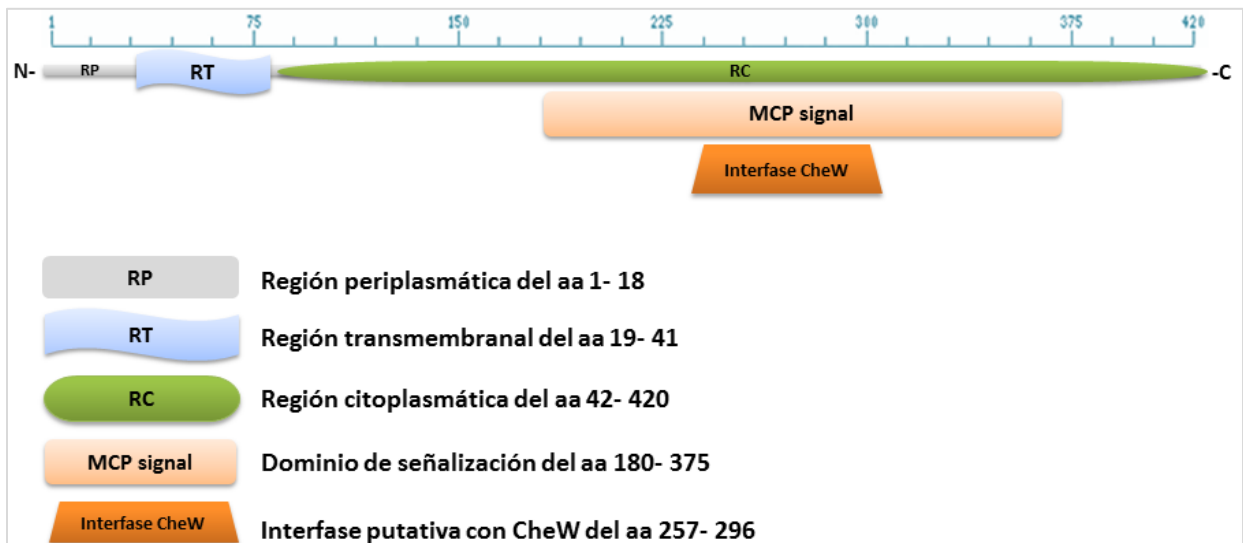


Figura 8. Análisis de la secuencia proteica. RP, RT, RC (Interproscan), Interfase CheW (protein Blast), MCP signal (protein Blast, Interproscan, Pfam, Smart), RT (Interproscan, TMHMM, HMMTOP).

La proteína según el análisis *in silico*, tiene una región transmembranal por lo que es probable que se localice anclada a la membrana citoplasmática de la célula. Contiene un dominio de señalización MCP (“MCP signal”), característico de este tipo de proteínas y un dominio de interfase CheW, sitio de unión a polipéptido, donde interactúa con la cinasa histidínica CheA a través de la proteína adaptadora CheW.

TCGCCAAGGCGCACGCCGACCAAGGACCGCGAACTGACCGTCAATTGGGGCCAGCGCAGCTACGAGGAGGCGGTCCCTTCGTCCGGCCACCAACCCG
CCTGTCCAGCCTGACCAAGGCCGTCTTCTGCGACAGCACCGGAAACCTGGGCGGCATCGTCCGGCGTGATCCACGACCTGACCGAAGGGCTGCCAGC
GAGGAGCGGCTTCAGGCGATCCTGGAGCAGAGCCCGATCGGCGTGTGGTGTCCGCGCCGACGACGGCAAGATCATCTTCGTCAACACCCGCTTCG
CCGAGCTGATCGGTTTGAAGCGCGAGGATCTGATCGGCCGGCAGGCGCGGACTATTATCTGGACCGGCACCAGCGTGAGCGGGTCATCGATCGTCT
CGGCTCCTACGGTTCGGTACCAACATGGAGGTGCAGTTCGCCCGGGCCGACGGGTGCTCCTTTTGACCGTGTTCACGGTCAACCAGGCGGTGATC
CAGGGCGTTCAGGTGAATCTCGCCTGGATCTACGACTACACCGACCGCCGGAACATGGAGGAGGCGTGCGCGACATGGCGTCCCAGGATCCTCTGA
CGGGAATCTACAACCGCGCTTCTTCATGGAAGTGGCGCGCTCGCAACTGGCCCGCGCCACCGCTTCAGCGAGCCGATGTGGTCTTCGTCTCGGA
CGTGGACATTTCAAGCGCATCAACGACAGCTACGGCCAGCCACCGGCGACGACGCCCTGGGCATGGTGGCCGGCGGCTGTCAGGCCATCCTGCGC
GAATACGACATTTCTCGGTTCGGTTCGGCGCGGAGGAGTTCGTGGTGGTCTGCCCGGCGCCACCGCAGAGGAATCCCGCGTGGTGGCGGAACGGGTGC
GCCGCATCTGTCCGCGATGGCATTCCCGGGCCGAAGGC CGGTTTCATTTGACCAGCAGCATCGGCATCTCGGCACTGGACGGTTCCTACGACAC
GCTGGAAAAGGCGATTACCCGGGCGCAGCTCGCCCTTACCCGGCCAAAGCGCGAGGGCCGGAATCGCGTTCGTGGTCTACGAACCCGGCATGTGATCC
-35 Promotor 2 -10
ACCATCTCGGAGAGAAAATCGATCCAAATTTGTTACAGGATGGATCTGGTTTTTCTCTCTTTGGACTCCGTATCGTTCGCTCCGATTCAACCACTTATG
CGCGTGAGCGCATGTGGTACAATTTGTGCGCAGCTGAGCGCCGCTCGTTTTTAAGGCAATCCAAATTATTACGTACGCTATGAGTCGAGGGCAGAAGATA
TTACCAACCGTTGGGTTGGTGAACCTGTTGTCGGGTGA TTTGTTTACCCGGGTTTGAAGCGGACGGTCAATGGCGGTTCGGCACGGGCGGCATACA
-35
Promotor 3 -10
TGGTTCCTGACCGGGCGGGAGCGGACCTTTACCCGGGATGAGATCATCGTCTCGAAGACGGATCTCAAGGGCCGATCACCTACGCCAACGACGTC
TTCTGCGCATCAGCGTTACAGCGAAGCGGAGTTGCTGGGGCAACCCACAACATCGTCCGCCATTCCGACATGCCGCGCTGCGTCTACAAGCTGC
TGTGGACCCGCATCGAGGCCGAAGCGAAATCTTCGCCTATGTCATCAACCGGGCGAAGGACGGCGACCATTATTGGGTGTTCCGCCATGTCACGCC
GGTTTTTCGGCAATCCGGACAGCGGAAACGGGGCGGACCATCACCGGCTACCATTTCGAGCCGGCGGTGCCGGCGGTCCCGCGGTGGAGGCGGCGGGC
GGCCTCTACGCCCGCTGCGGGCGGAAGAGGGCGGCCACCGGACCGGAAACCGGGCATGGCGGCCCTCCGGTGCCATGCTGGAAAATCTCTCGCGG
ACAAGGGCACGAGCTATGACGAGTTTGTCTTTCAGTCTCTAAATCGCTCGCCGCGCCGCTTTGGCCGCCCTGATGTGGGGGCGCAGGCGGTGTACG
GTCTCGCCACCGGCGACGCCATCGCCGCCCTGCTGGGCTGCTGGCGGTTCTTCCCTGTCTTCCCGGATCCGCTGGTGGTGTCTACCAACCGGAC
CATCCGGAAGGCCAGCAGCGTTCATCGCCGGGCGGAGAAGGGCGACCTTCAGCCACGCATCCTGAACATCCACGGCGCCAGCTCGATCGCCGACATG
CTGCGGACCATCAACCGCTGCTCGACCGGCTCGAATCCTTCGGCAAGGAGGCCAACCGCCCATGCAGCACGCGGGGAGGGACAATACTACCGGC
GCATCGTGATGACCGGCATGGTCCGTGAATTCGGTGCCTACGCCCGCCAGATCAACGACGGGCTGGCGGCCATGGACGGCAAGAGCCGCGAGTTCGT
CGAGAGCGCGACCCGCATCGGCGCCAACATCAAGGAGGTGGCGCAGAGCCTGTCGGCCAGCGCCCGCCAGCTCGAAGCGTCTTCCACCGCCATGACG
GCGACCGCCGCCACGGCCAGCGAGCAGTCTTCTCCGCGGCTCCGCGCCGAGCAGGTGTCTTCGAACGTGGACGGCGTGGCCGCGGCGACCGGTG
AGGTATCGGGGCCATCGGGAGGTGGCCAGGGTGTCTCCCGCACCGCCGATCTCGCCCGCAGTTCGGTGGAGAAGGTGCGGGAAGCCGACGCCAC
CATCCGTTCCCTGCTGGCCGCTCCGATCAGATCGGCGCGTGGTGCACCTCATCAACGACATCGCCAGCCAGACCAATCTGCTGGCCCTCAACGCC
ACGATCGAGGGCGCACGGGCCGGGAGGCCGCAAGGGGTTCCCGTGGTCCGCGACGGAGGTGAAGAACCCTCGCCAACCAGACCGCCAAGGCGACGG
AGGACATCACCGCCAGATCACCCAGTCCAGTCCGTGACCCGCGACACGGCGGGGTGATCCAGCATGTCCGGCGGCATGATCCATGACATCGACGA
GATCGCGGTGGGCATCGCCGGCGCTGCCAACAGCAGAGCGCGCCATCGACGAGATCAGCCGCTCCATCCGCGAGGGCTCGGCCGGGTGCGCACG
GTTGCCGACCGGTGACGAGCGTGTCTTCCGGCGCCAGGACGCCAGCGCCGCCAGCCAGGTCTGTCTCCCGGGCGAGTTGGCGCGCCGCGC
CCGTGACCTTGAACCGCGACATCGACAACCTTCGTCCGCGCGGTTTGGCGGGGCGAGCGTTGA

Texto resaltado:

Treonina fosfato descarboxilasa

Diguanilato ciclasa A

Proteína hipotética

Proteína con función desconocida con dominios PAS/PAC

Proteína aceptora de metilos putativa

Figura 10. Búsqueda de promotores putativos del contexto genético de *dgcA*, por medio del programa SoftBerry BPRM.

Las posibles secuencias promotoras, se muestran a continuación:

✚ 250 pb río arriba del gen *cdgA* y el gen *cdgA*

1Promotor

-10 box at pos. 220 CGCAAGAAT Score 31

-35 box at pos. 202 TTGTTT Score 40

2Promoter

-10 box at pos. 1724 CGGTTTCAT Score 34

-35 box at pos. 1707 TTCCCG Score 35

✚ 250 pb río arriba del gen que codifica para la proteína hipotética (pH) y el marco de lectura abierto de este gen.

3 Promotor

-10 box at pos. 303 TGGTACAAT Score 78

-35 box at pos. 284 CTTATG Score -2

✚ 250 pb río arriba del gen que codifica para la proteína con función desconocida PAS/PAC y el marco de lectura abierto de este gen.

4 Promotor

-10 box at pos. 96 TGGTACAAT Score 78

-35 box at pos. 77 CTTATG Score -2

✚ 250 pb río arriba del gen *mcpA* y el gen *mcpA*

No se encontró ningún promotor.

Debido a los resultados obtenidos mediante el análisis de dominios y la carencia de promotores para el gen *mcpA*, posteriormente se analizó los posibles operones con los programas DOOR² Y FGENES, en donde ambos programas nos indican que probablemente los genes de la proteína hipotética, la proteína con función desconocida PAS/PAC y la proteína aceptora de metilos putativa, estén formando un Operón (Fig. 11).

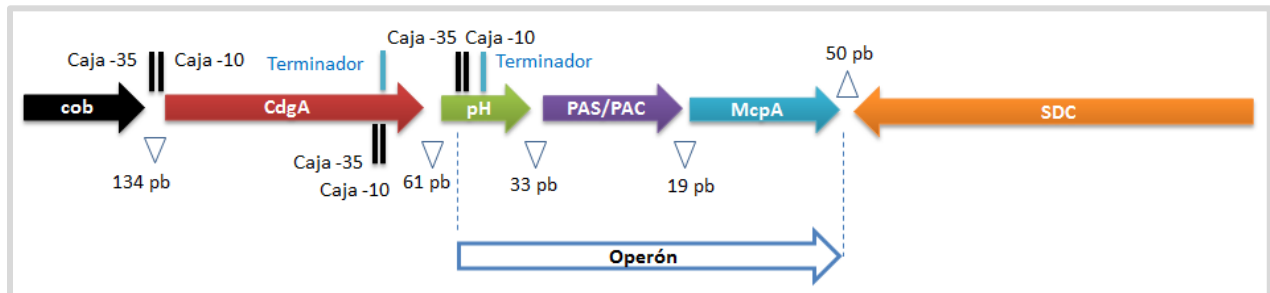


Figura 11. Búsqueda de operones putativos del contexto genético de *mcpA*, por medio del programa DOOR² y FGENES. Cob: Treoniana descarboxilasa, CdgA: Diguanilato ciclasa A, PH: Proteína hipotética, PAS/PAC: Proteína con dominios PAS/PAC, McpA: Proteína aceptora de metilos putativa, SDC: Sistema híbrido de doble componente.

VIII. 4 Amplificación del gen *mcpA*

Se diseñaron un par de iniciadores, a partir de la secuencia del gen AZOBR_140291 que codifica para la proteína McpA de *A. brasilense* Sp245, la cual amplifica un fragmento de 1920 pares de bases con sitios de restricción *Bam*HI y *Sal*I, para realizar una clonación dirigida en el vector pSUP202, el amplificado y las condiciones de PCR, se muestra a continuación:

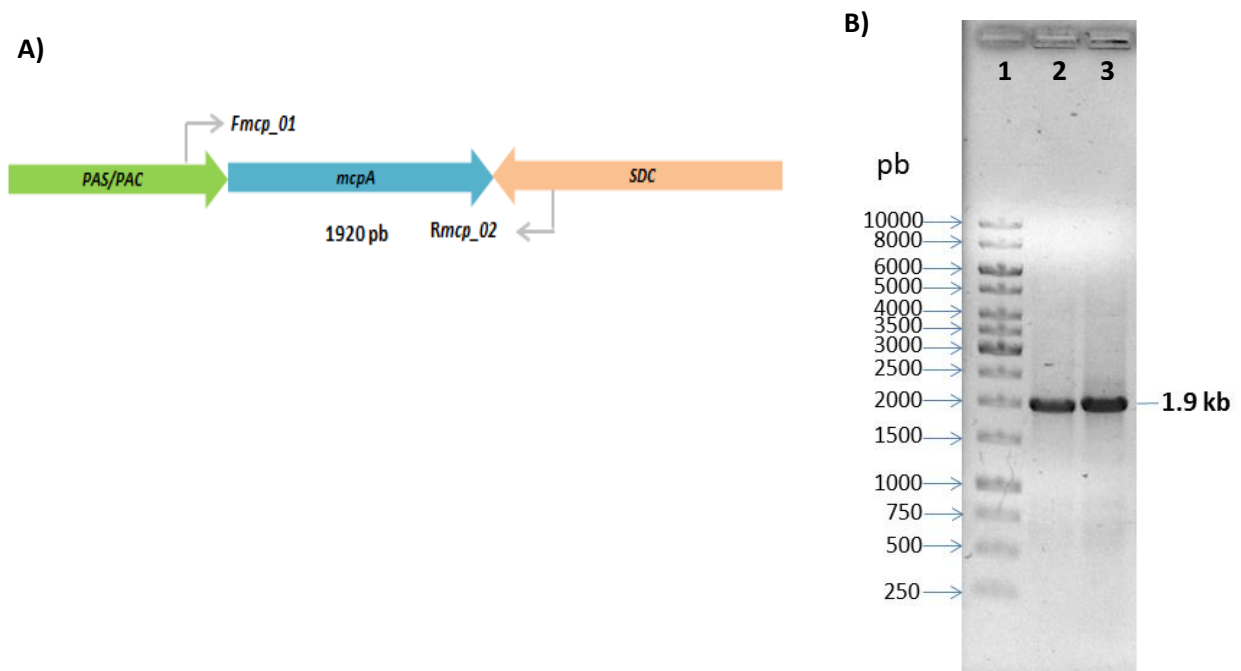


Figura 12. A) Contexto genético del gen *mcpA* (AZOBR_140291) de *A. brasilense* Sp245. B) Amplificado del gen *mcpA* de 1920 pb con los iniciadores *Fmcp_01* y *Rmcp_02*. Carril 1: MPM, carril 2: PCR ADNg con 1µL de DMSO, carril 3: PCR ADNg con 1µL de DMSO.

Una vez amplificado el fragmento de 1920 pb, se clonó en el vector pGEM T- easy vector, a través de la *Taq* polimerasa (*Taq* platinum), se realizó la transformación química en *E. coli* DH5α, las colonias obtenidas se analizaron mediante la resistencia a Ampicilina (100µg/ml). La comprobación de la clona 1 (pGEM*mcpA*) se muestra a continuación:

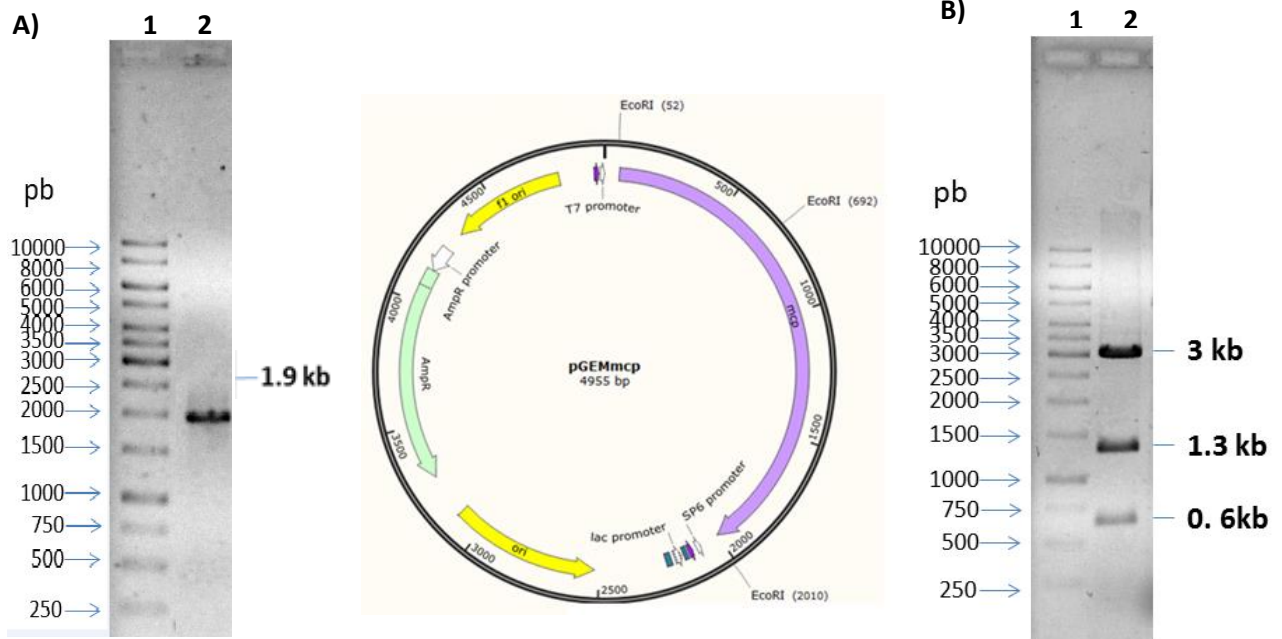
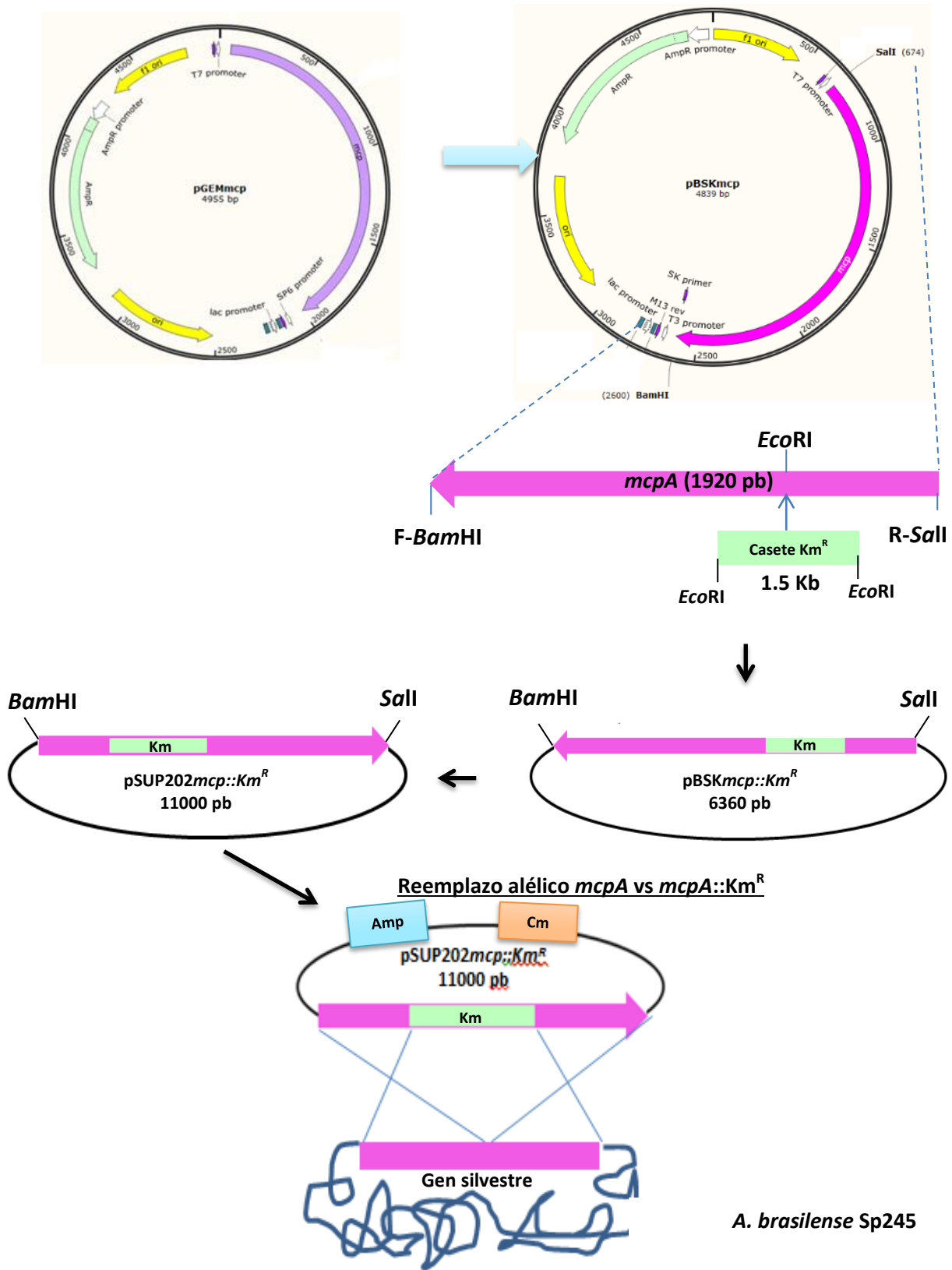


Figura 13. Comprobación de Clona 1 por PCR y patrones de Restricción. A) Amplificado del gen *mcpA* de la clona 1; carril 1: MPM, carril 2: Amplificado del gen *mcpA* de 1920 pb con los iniciadores *Fmcp_01* y *Rmcp_02*. B) Patrón de restricción con la enzima *EcoRI* de a clona 1; carril 1: MPM, carril 2; fragmentos de restricción: 3 kb, 1.3 kb y 0.6 kb.

VIII. 5 Construcción de la mutante *mcpA::Km^R*

Con la construcción *pGEMmcpA*, se prosiguió con la subclonación en el vector *pBSK+*, una vez obtenida la inserción del fragmento que porta el gen *mcpA* se procedió a realizar la inserción del casete de resistencia *Km*, en el sitio *EcoRI* del gen *mcpA*. Se obtuvo así la mutación por inserción *mcpA::Km^R*. Posteriormente se subclonó en el vector suicida *pSUP202* en los sitios *BamHI/SalI*. Ver siguiente esquema.

VIII. 5. 1 Esquema de la construcción de la mutante *mcpA::Km^R*



VIII. 5. 2 Análisis de la clona pBSK*mcpA* de *E. coli* DH5α

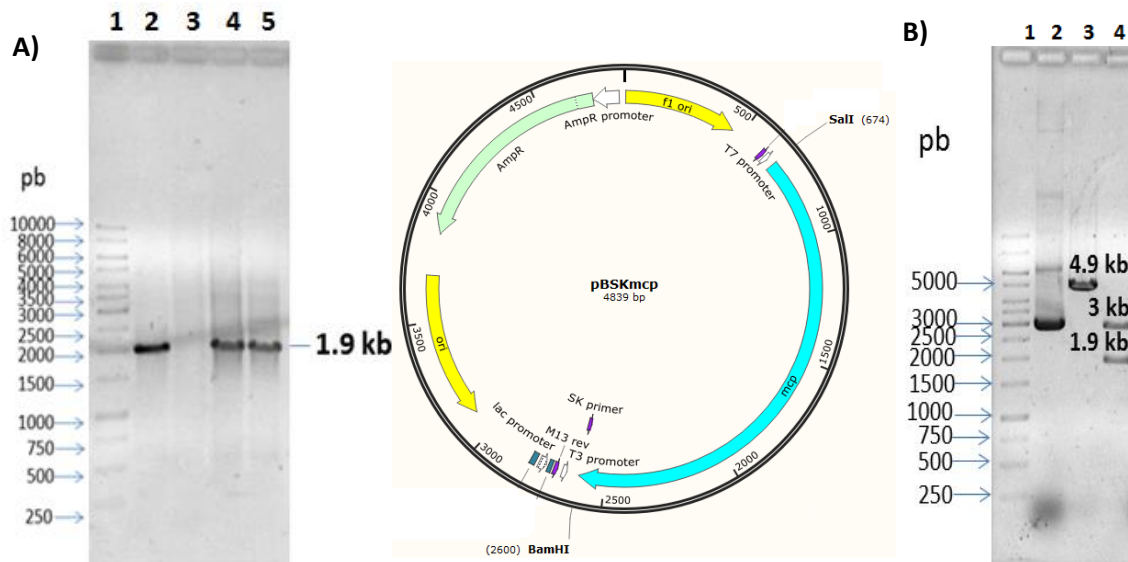


Figura 14. Comprobación de Clona 1 por PCR y patrones de Restricción. A) Amplificado del gen *mcpA* de la clona 1; carril 1: MPM, carril 2: Amplificado del gen *mcpA* de 1920 pb con los iniciadores *Fmcp_01* y *Rmcp_02*, del ADN genómico de *A. brasilense* Sp245, carril 3: control (-), carril 4: Amplificado del gen *mcpA* de 1920 pb con los iniciadores *Fmcp_01* y *Rmcp_02* de la clona 1. B) Patrón de restricción de la clona 1; carril 1: MPM, carril 2: Restricción con *EcoRI*, lineariza el plásmido de 4.9 kb; carril 4: doble restricción *BamHI/SalI*: fragmentos 3kb y 1.9 kb.

A partir del plásmido pBSK::*mcpA*, se secuenció el fragmento de 2700 pb, utilizando los iniciadores M13F y M13R, la secuencia resultante fue analizada con el software BLASTN de NCBI obteniendo un porcentaje de identidad del 92%, comparada con el gen AZOBR_140291, que codifica para la probable proteína aceptora de metilos del genoma de *A. brasilense* Sp245, depositado en el GenBank.

VIII. 5. 3 Análisis de la clona pBSKmcpA::Km^R de *E.coli* DH5α

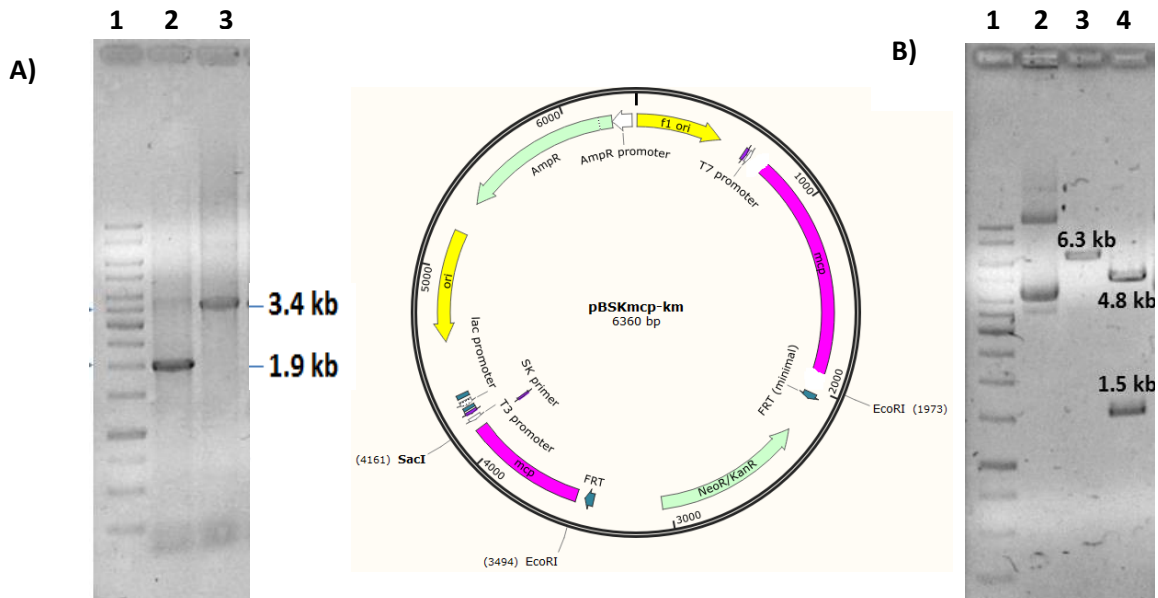


Figura 15. Comprobación de Clona 1 por PCR y patrones de Restricción. A) Amplificado del gen *mcpA*::Km^R de la clona 1; carril 1: MPM, carril 2: Amplificado del gen *mcpA* de 1920 pb con los iniciadores *Fmcp_01* y *Rmcp_02*, del ADNg de *A. brasilense* Sp245, carril 3: Amplificado del gen *mcpA*::Km^R de 3.4 Kb con los iniciadores *Fmcp_01* y *Rmcp_02* de la clona 1. B) Patrón de restricción de la clona 1; carril 1: MPM, carril 2: Restricción con *SacI*, lineariza el plásmido de 6.3 kb; carril 4: restricción *EcoRI*: fragmentos 4.8 kb y 1.5 kb.

VIII. 5. 4 Análisis de la clona pSUP202*mcpA*::Km^R de *E.coli* S17.1

Posteriormente de la obtención de la construcción en el vector pBSKmcpA::Km^R, se continuó con la subclonación dirigida en el vector suicida pSUP202, en los sitios *Bam*HI/*Sal*I, en la dirección 5'-3' del gen *mcpA*, se transformó en cepas de *E. coli* S17.1, para luego llevar a cabo el reemplazo alélico del gen mutado por el gen silvestre en la cepa de *A. brasilense* Sp245.

En la siguiente figura se observa el análisis de una clona con la construcción pSUP202*mcpA*::Km^R de *E. coli* S17.1:

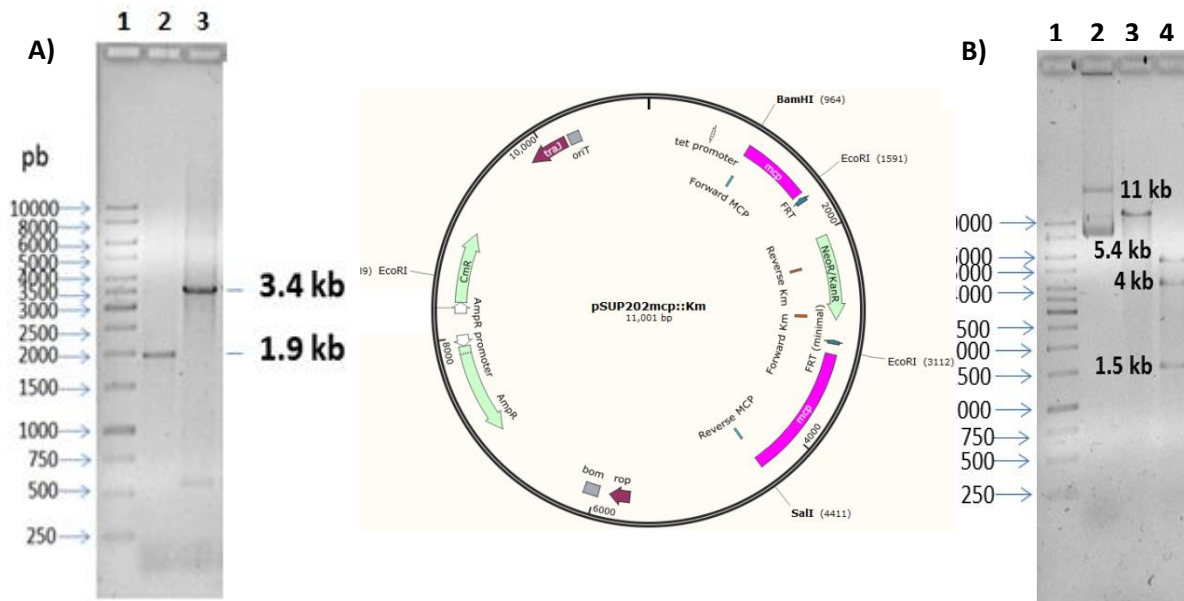
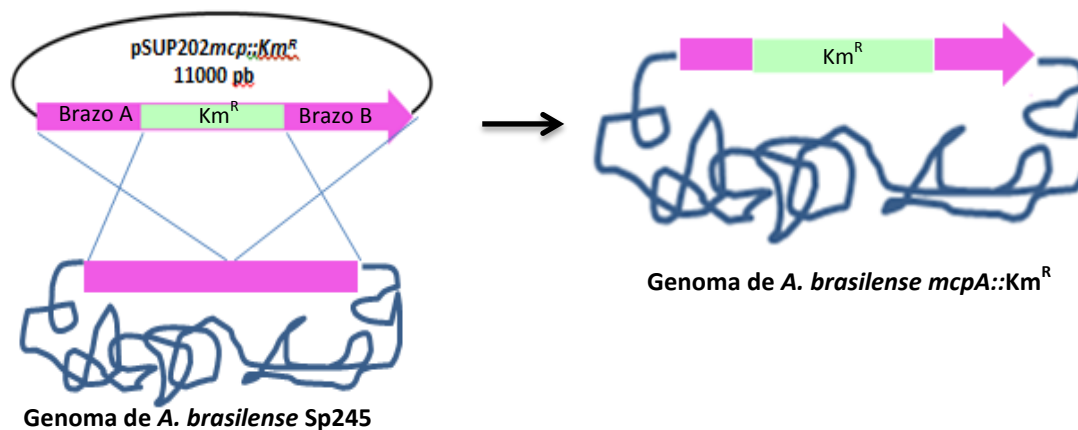


Figura 16. Comprobación de Clona 1 por PCR y patrones de Restricción. A) Amplificado del gen *mcpA::Km^R* de la clona 1 ; carril 1: MPM, carril 2: Amplificado del gen *mcpA* de 1920 pb con los iniciadores *Fmcp_01* y *Rmcp_02*, del ADNg de *A. brasilense* Sp245, carril 3: Amplificado del gen *mcpA::Km^R* de 3.4 Kb con los iniciadores *Fmcp_01* y *Rmcp_02* de la clona 1. B) Patrón de restricción de la clona 1; carril 1: MPM, carril 2: Restricción con *Bam*HI, lineariza el plásmido de 11 kb; carril 4: restricción con *Eco*RI: fragmentos 5.4 kb, 4 kb y 1.5 kb.

Posteriormente se llevó a cabo la conjugación bacteriana de *E. coli* S17.1 p *mcp::km^R* X *A. brasilense* Sp245 en medio LB modificado y la selección de las posibles mutantes se realizó mediante la resistencia a Km (50 µg/mL) y la contraselección con cloranfenicol (70 µg/mL), las transconjugantes sensibles a Cm, se les realizó PCR. El esquema de a continuación muestra el intercambio alélico del gen silvestre por el gen mutado, y el análisis de las posibles transformantes:



VIII. 5. 5 Obtención de la mutante *mcpA::Km^R* de *A. brasilense* Sp245

Se analizaron tres posibles mutantes donde se observa el fragmento amplificado de 3.4 kb del ADN genómico de *A. brasilense mcpA::Km^R* en los carriles 4, 5 y 7, utilizando los iniciadores que amplifican el gen, teniendo como control positivo la construcción de pSUP202*mcpA::Km^R* y como control negativo ADN genómico de cepa silvestre.

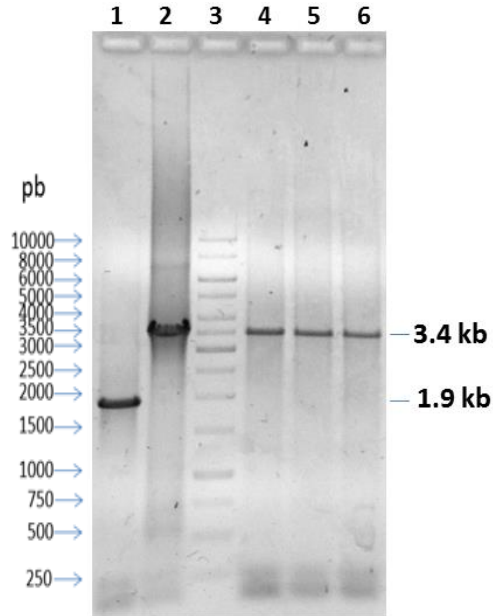


Figura 17. Comprobación de las posibles mutantes *A. brasilense mcpA::Km^R*. Carril 1: Amplificado del gen *mcpA* de 1920 pb con los iniciadores *Fmcp_01* y *Rmcp_02*, del ADNg de *A. brasilense* Sp245; carril 2: ADNp de pSUP202*mcpA::Km^R*, carril 3: MPM; carril 4, 5, 7: ADNg de las posibles mutantes *A. brasilense* Sp245 *mcpA::Km^R*.

Posteriormente para comprobar la inserción del casete de Km en el locus del gen *mcpA*, se llevó a cabo la PCR con los iniciadores del gen y los iniciadores de Km, como se muestra en la figura 17, obteniéndose los dos fragmentos A y B, en las tres posibles mutantes.



Figura 18. Representación de los fragmentos utilizando iniciadores del gen *mcpA* e iniciadores del casete de Km.

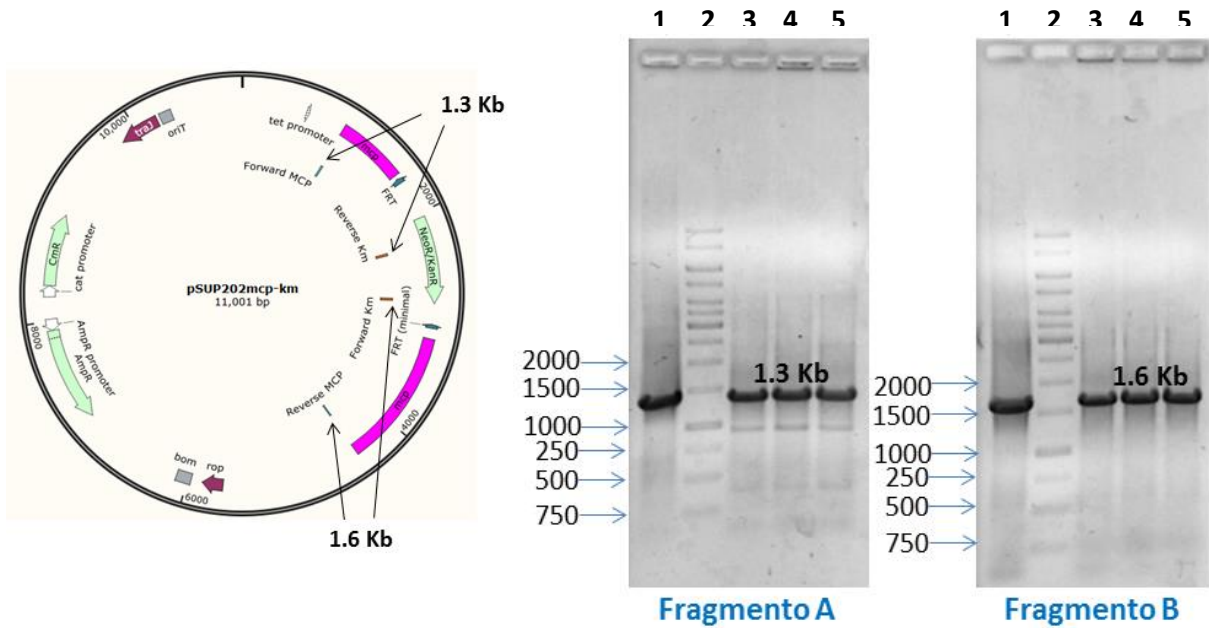
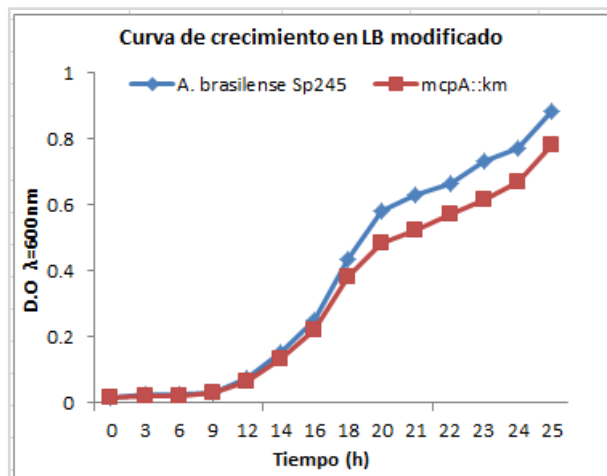
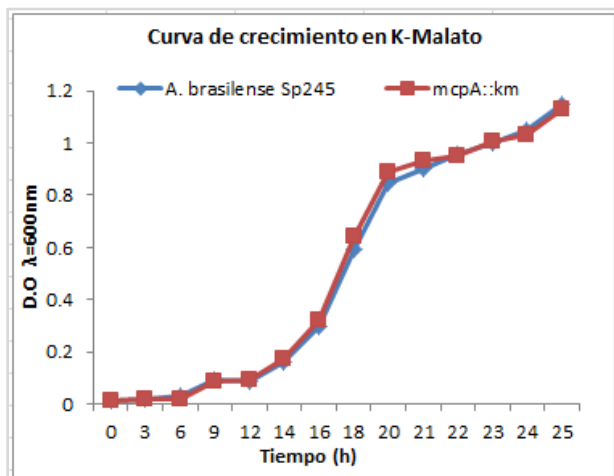


Figura 19. Comprobación de las posibles mutantes *A. brasilense mcpA::Km^R*. Carril 1: Amplificado del gen *mcpA::Km^R* de ADNp de pSUP202mcpA::Km^R; carril 2: MPM; carril 3, 4, 5: ADN g de las posibles mutantes *A. brasilense* Sp245. *mcpA::Km^R*.

En el análisis *in silico* se mostraban dos fragmentos a amplificar, un fragmento de 1.3 kb denominado fragmento “A”, utilizando el delantero del gen *mcpA* y el reverso de Km; y de 1.6 kb denominado fragmento “B”, utilizando un delantero de Km y el reverso del gen *mcpA*. Con estos resultados se concluye la obtención de la mutante por inserción de un casete de Km denominada: *A. brasilense mcpA::Km^R*.

Las curvas de crecimiento se llevaron a cabo en medio mínimo con Malato como única fuente de carbono, donde no se observó diferencia estadística significativa con respecto a la cepa silvestre, lo que significa, que la mutación no tuvo un efecto en el crecimiento de la bacteria (Gráfica 1a). También se evaluó el crecimiento en medio rico LB modificado, y en este caso, si hay diferencia en el crecimiento de la cepa mutante con respecto a la cepa silvestre, este efecto se observa a partir de las 18 horas (Gráfica 1b). El medio rico LB modificado contiene alta concentración de NaCl, lo cual afecta el crecimiento de esta bacteria. Un estudio previo se analizó el efecto altas concentraciones de este compuesto, observando que efectivamente el NaCl afecta el crecimiento de la *A. brasilense* Sp245 (Gamboa, 2012).

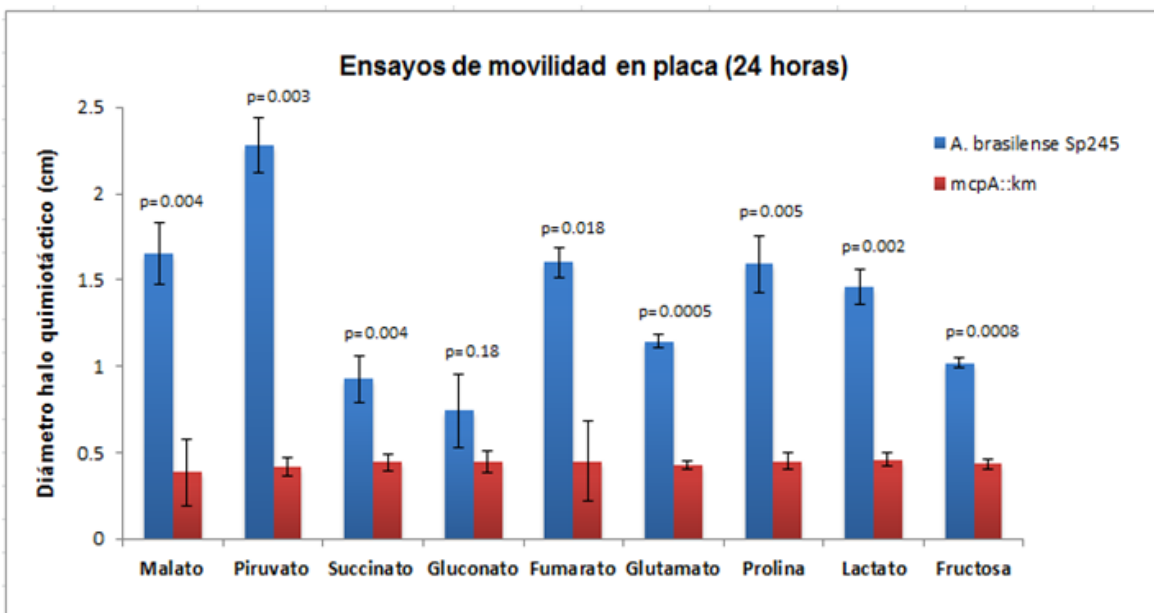


Gráfica 1a, 1b. Curvas de crecimiento de la cepa silvestre *A. brasilense* Sp245 y la mutante isogénica de *A. brasilense* *mcpA::Km^R*. Las lecturas se realizaron a 600nm durante 25 horas en 3 ensayos independientes.

VIII. 6 Análisis de movilidad de la cepa silvestre *A. brasilense* Sp245 y *A. brasilense* *mcpA::Km^R*

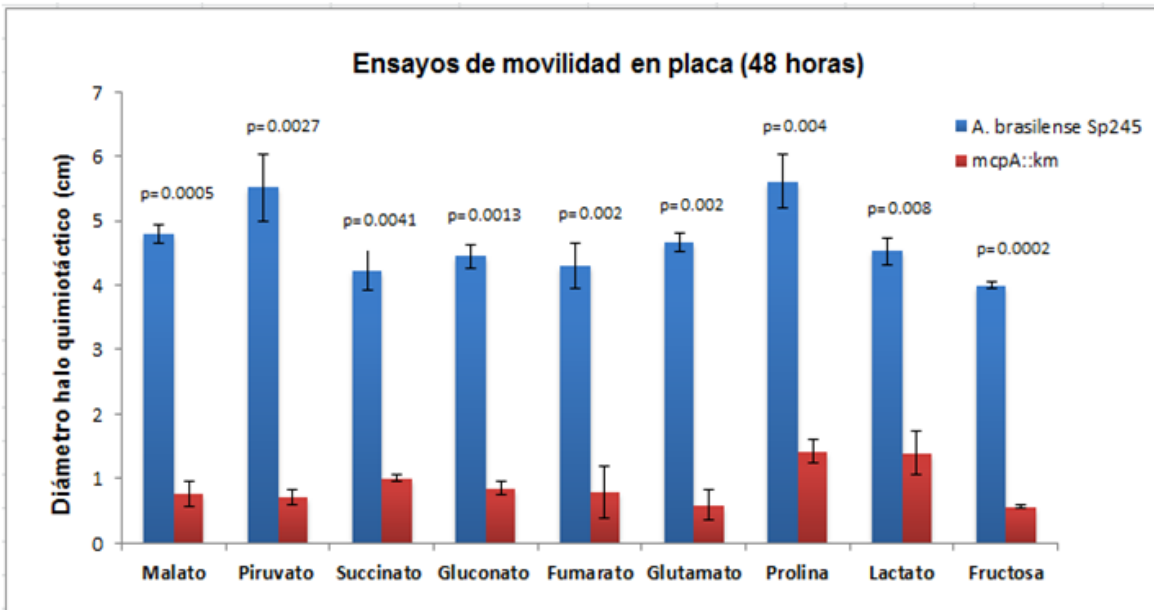
En este ensayo se evalúa la movilidad y el metabolismo de ambas cepas, *A. brasilense* Sp245 y la mutante *A. brasilense* *mcpA::Km^R*; debido a que el medio donde se encuentran, contiene todos los nutrientes necesarios, para que la bacteria pueda crecer. Fueron evaluados distintos atrayentes a una concentración de 34mM, disueltos en base-K, con agar suave al 0.25%. A las 24 horas existe disminución de la movilidad en la mutante *A. brasilense* *mcpA::Km^R* de aproximadamente el 60%, en la mayoría de los atrayentes, con respecto a la cepa silvestre *A. brasilense* Sp245, a diferencia de la movilidad que fue observada como única fuente de carbono Gluconato, donde no hubo diferencia estadística significativa de la cepa mutante, comparada con la cepa silvestre (Gráfica 2).

Los halos de movilidad a las 48 horas presentaron una disminución en *A. brasilense* *mcpA::Km^R* de aproximadamente el 70%, con respecto a la cepa silvestre en todos los atrayentes evaluados como única fuente de carbono (Gráfica 3). Todos los datos son estadísticamente significativos.



<i>A. brasilense</i>	1.65	2.28	0.92	0.74	1.6	1.14	1.59	1.45	1.01
<i>mcpA::km^R</i>	0.38	0.41	0.44	0.44	0.45	0.42	0.45	0.45	0.43




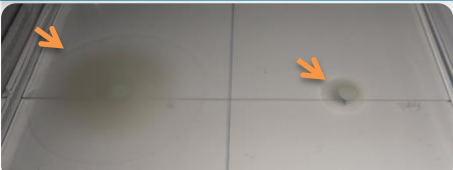
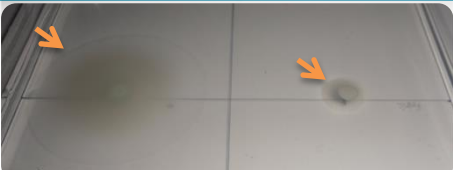
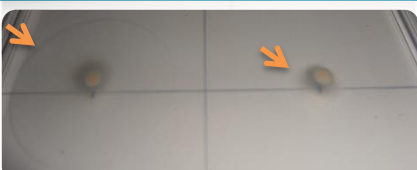


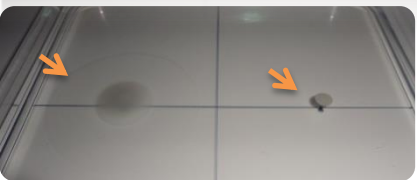


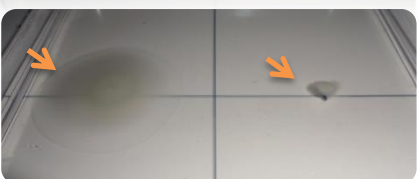
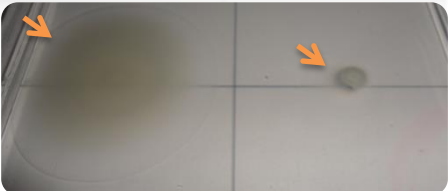
Gráfica 2. Movilidad en placa de la cepa silvestre *A. brasilense* Sp245 y la mutante isogénica de *A. brasilense* *mcpA::km^R* con distintos atrayentes, a las 24 horas.



<i>A. brasilense</i>	4.79	5.51	4.24	4.45	4.3	4.66	5.61	4.53	4
<i>mcpA::km^R</i>	0.76	0.71	1	0.85	0.78	0.59	1.42	1.4	0.56

Gráfica 3. Movilidad en placa de la cepa silvestre *A. brasilense* Sp245 y la mutante isogénica de *A. brasilense* *mcpA::km^R* con distintos atrayentes, a las 48 horas.

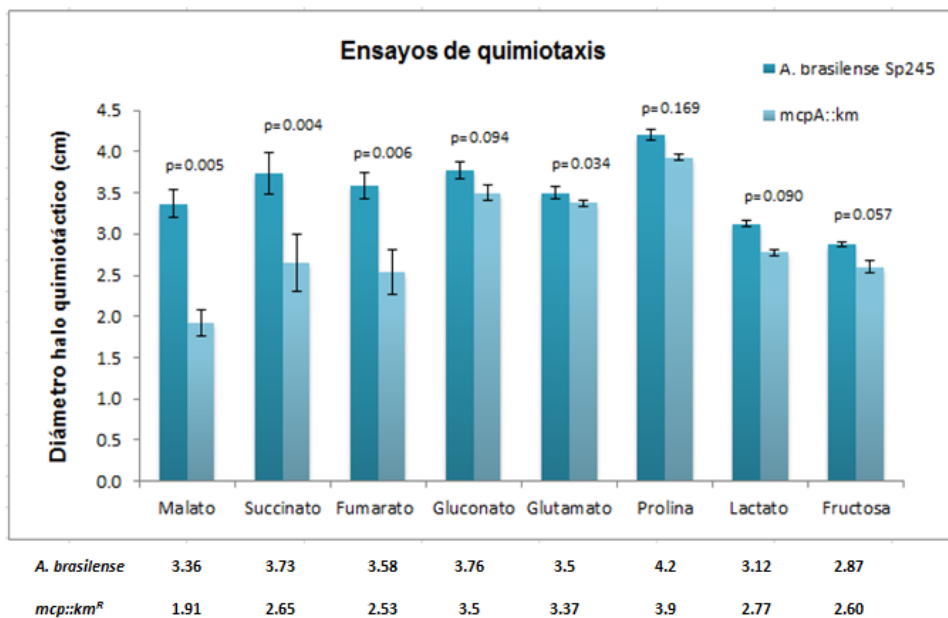
Tabla 2. Halos de movilidad a las 48 horas de *A. brasilense* Sp245 y de *A. brasilense* *mcpA::km^R* en los distintos atractantes evaluados.

Atractante evaluado	<i>A. brasilense</i> Sp245	<i>mcpA::km^R</i>	<i>A. brasilense</i> Sp245	<i>mcpA::km^R</i>
Malato			Piruvato	
Succinato			Gluconato	
Fumarato			Glutamato	
Prolina			Lactato	
Fructosa				

VIII. 7 Análisis de quimiotaxis de la cepa silvestre *A. brasilense* Sp245 y *A. brasilense* *mcpA::Km^R*

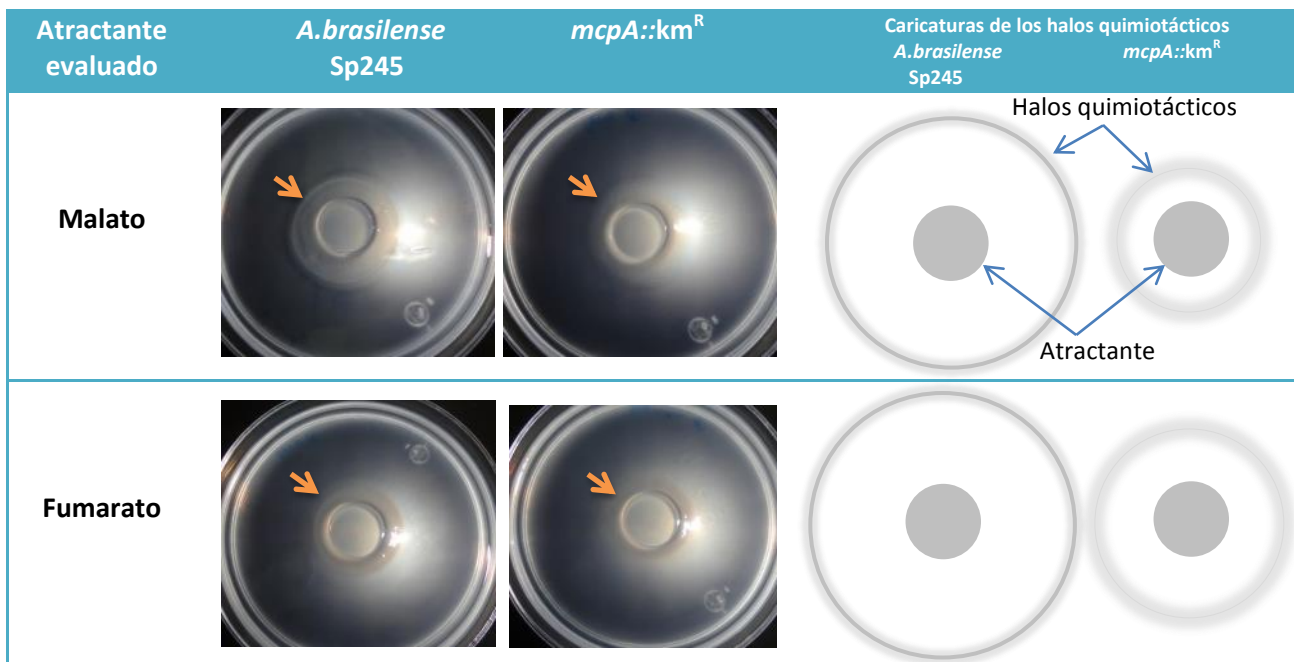
Una vez analizada la movilidad se evaluó la quimiotaxis con cilindros de agar que contienen el atractante a evaluar a 34mM. Este ensayo a diferencia del anterior se evalúa únicamente la quimiotaxis, es decir, el movimiento de la bacteria hacia un atractante, mediante el sensado de compuestos químicos. Los resultados muestran que existe diferencia estadística significativa en Malato, Succinato y Fumarato, entre la *A. brasilense* Sp245 y *A. brasilense* *mcpA::Km^R*. Sin embargo en Glutamato, Gluconato, Prolina,



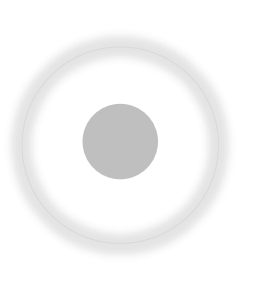
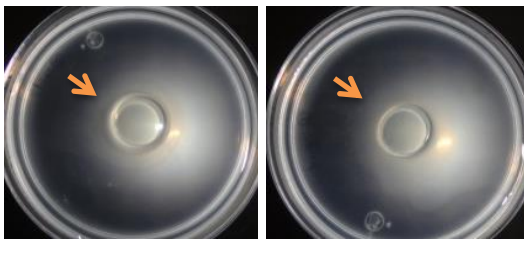

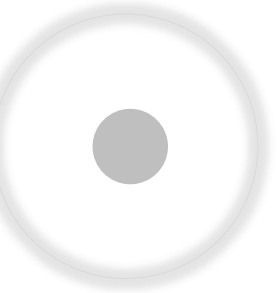
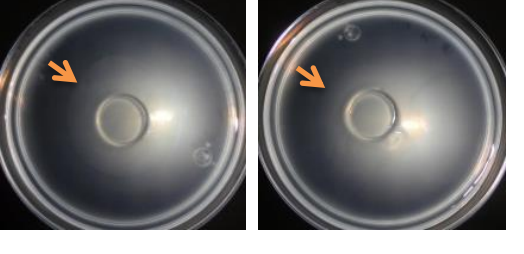
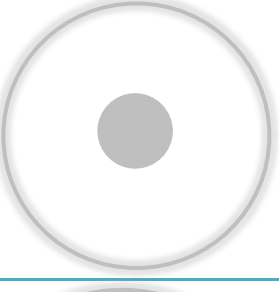
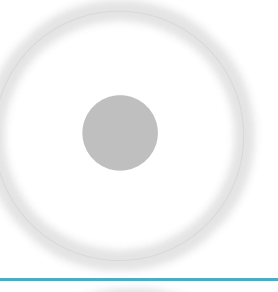
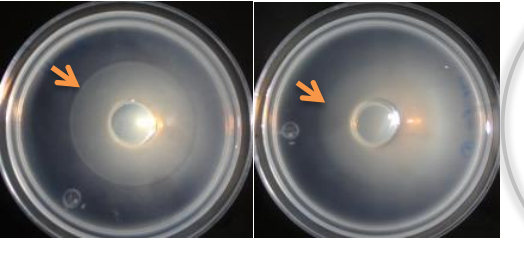


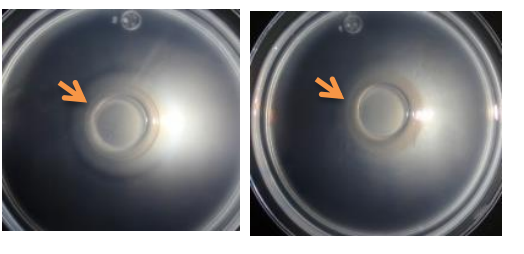
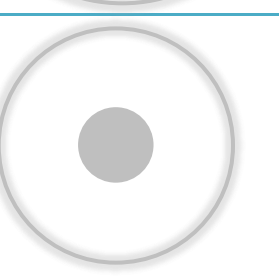
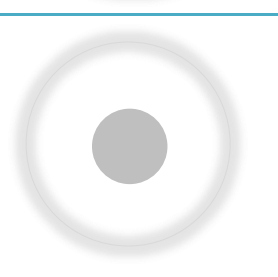
Lactato y Fructosa, no se observó diferencia estadística entre la cepa mutante con respecto a la cepa silvestre (Gráfica 4, Tabla 3).



Gráfica 4. Movilidad en placa de la cepa silvestre *A. brasilense* Sp245 y la mutante *A. brasilense mcpA::km^R* con distintos atractantes, a 4 las horas.

Tabla 3. Halos de quimiotácticos a las 4 horas, de *A. brasilense* Sp245 y de *A. brasilense mcpA::km^R* en los distintos atractantes evaluados.



Succinato			
Gluconato			
Glutamato			
Prolina			
Lactato			



VIII. 8 Observación de la formación de rosetas y presencia del flagelo polar en la cepa silvestre y la mutante *A. brasilense mcpA::Km^R* mediante microscopia de fluorescencia

Debido al efecto en la quimiotaxis por la mutación en el gen *mcpA*, se obtuvieron imágenes de ambas cepas, para ver la formación de rosetas o agregados celulares, a través de la microscopia de fluorescencia, mediante la tinción con DAPI y anticuerpos antiflagelina. Estas imágenes nos permitieron observar que existe mayor formación de rosetas en la cepa mutante a diferencia de la cepa silvestre, donde las células se encuentran individuales; y por otro lado, observamos la presencia del flagelo en ambas cepas.

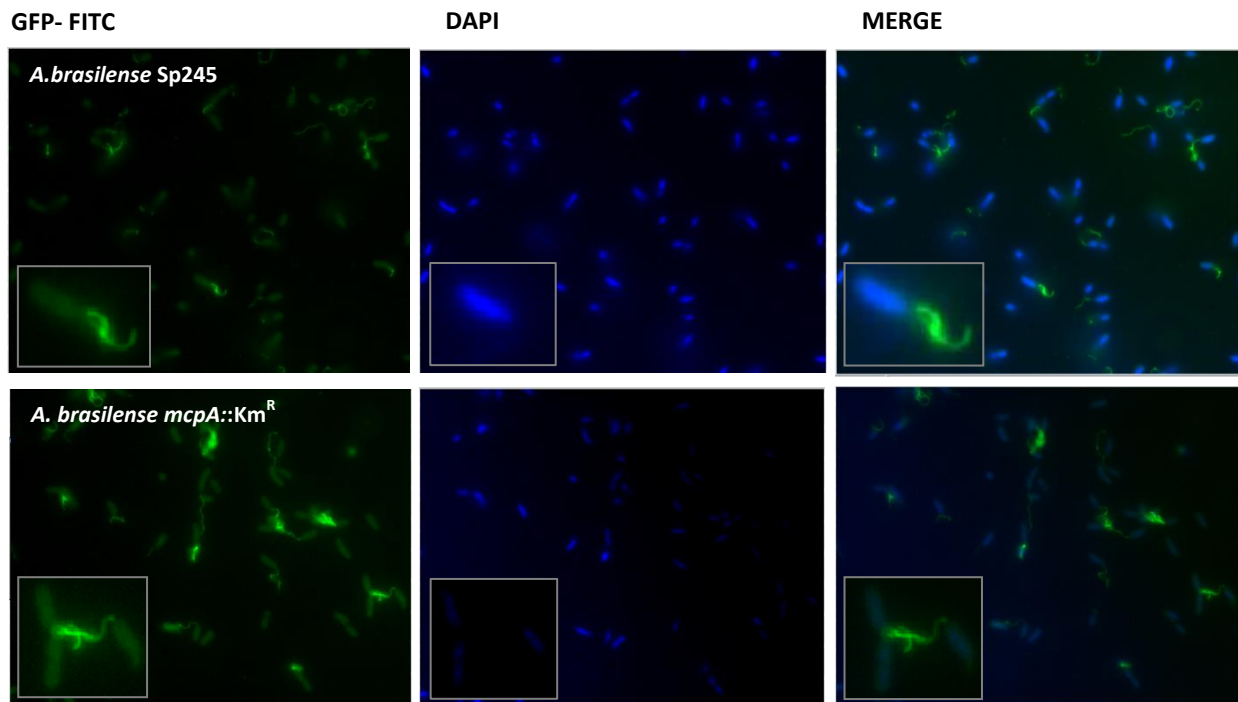


Figura 20. Microscopia de fluorescencia de *A. brasilense* Sp245 (WT) y la mutante isogénica *mcpA::Km^R* de *A. brasilense* Sp245. Las células fueron fijadas, posteriormente fueron tratadas con el anticuerpo primario antiflagelina, seguido del anticuerpo secundario (goat anti- rabbit FITC).

IX. Discusión

Las taxis han sido observadas en respuesta a distintos tipos de estímulos ambientales, tales como metabolitos, temperatura, luz, salinidad, oxígeno, campo magnético y pH (Krell *et al.*, 2011). La quimiotaxis es un mecanismo utilizado por las bacterias móviles del suelo para navegar y encontrar un entorno óptimo para la supervivencia (Webb *et al.*, 2014). La quimiotaxis bacteriana es también importante como paso inicial para las interacciones ecológicas como la simbiosis, infección y colonización de las raíces (Oku *et al.*, 2014). En la quimiotaxis, las señales químicas son detectadas por receptores específicos que transmiten la información al motor flagelar, a través de una cascada de transducción de señales (Russell *et al.*, 2013). La especificidad de una respuesta táctica es determinada por las proteínas MCPs (Krell *et al.*, 2011).

Lacal y colaboradores en el 2010 realizaron un análisis del número de MCPs por genoma, interesantemente fue encontrada la correlación que existe entre el estilo de vida de la bacteria con el número de genes *mcp* (Krell *et al.*, 2011). Ejemplo es el bajo número de MCPs por enterobacteria, en la cual habitan ambientes estables (Lacal *et al.*, 2010a), como es el caso de *Bacillus anthracis* y *Yersinia pestis* Nepal516 (Krell *et al.*, 2011) que poseen un solo gen *mcp*, a diferencia del número elevado de estos genes, para microorganismos del suelo y acuáticos, que son caracterizados por una alta versatilidad metabólica (Lacal *et al.*, 2010a), tales como *Myxococcus xanthus* y *Magnetospirillum magnetotacticum* con 21 y 61 genes *mcp* respectivamente (Krell *et al.*, 2011).

Un sistema modelo para el estudio de la quimiotaxis es el de *E. coli*, que es una bacteria móvil en medio líquido, a través del uso de varios flagelos peritricos (Berleman & Bauer, 2005), que a diferencia de *A. brasilense* Sp245, *E. coli* cuenta con cinco receptores, de los cuales son, Tar sensor de aspartato y maltosa, Tsr para serina, Trg para ribosa y galactosa, y Tap para dipéptidos, así como Aer, sensor de oxígeno (Meier *et al.*, 2007). El análisis de la secuencia del genoma de *A. brasilense* Sp245, reveló 48 genes quimiorreceptores (Wisniewski-Dyé *et al.* 2011), de los cuales únicamente dos de ellos han sido estudiados, Tlp1 y AerC (Russell *et al.*, 2013; Xie *et al.*, 2010). Puntualizando lo descrito por Lacal y colaboradores en el 2010, se puede decir, que la abundancia de quimiorreceptores como es el caso de *A. brasilense* radica en su estilo de vida, ya que se encuentra en ambientes limitantes de nutrientes, donde su principal requerimiento es encontrar los compuestos orgánicos exudados por las raíces de las plantas (Zhulin & Armitage, 1993).

Los estudios bioinformáticos y de cristalografía de algunas MCPs estudiadas, revelan que estas proteínas están constituidas por un dominio de unión a ligando (LBD, acrónimo del Inglés Ligand binding domain), un dominio de señalización (MA signal) y un dominio de adaptación (Krell *et al.*, 2011). La inspección de la base de datos de SMART revela que la mayoría de los LBDs permanecen aún sin ser registrados y en el caso de las MCPs con LBDs anotados, los dominios pertenecen a las familias TarH, PAS, GAF, CACHE y CHASE (Lacal *et al.*, 2010b).

Basándose en la estructura predicha por los programas SMART y PFAM de la proteína McpA de *A. brasilense* y comparándola con la clasificación de las MCPs por las topologías de membrana, realizada por Wuichet y colaboradores en el 2009 (Fig. 5), la proteína no coincide completamente con las clases descritas. Todos los grupos dentro de esta clasificación contienen un dominio sensor y un dominio HAMP, éste último transmisor de la señal, donde ambos dominios se encuentran ausentes en la proteína McpA. La proteína consiste de un dominio transmembranal, un dominio MA signal, donde se encuentra el dímero de interfase de unión con CheW (Fig. 8), y carece del dominio sensor, ya que sólo cuenta con 18 residuos de aminoácidos que se localizarían en el periplasma y del dominio HAMP, lo anterior la ubicaría en una subclase II, de la clase II, el cual sea un dominio probablemente aún no anotado en las bases de datos SMART y PFAM.

El alineamiento de McpA con las proteínas Tar/Tsr de *E. coli*, indicó que los residuos aminoacídicos que deben ser metilados durante la etapa de adaptación, están ausentes en McpA (E: Glutamato, Q: Glutamina) (Fig. 9); por lo que a diferencia de lo que ocurre con los receptores Tar/Tsr dependientes de metilación (Rice & Dahlquist, 1991; Bollinger *et al.*, 1984), sugiere que otro mecanismo regula la transducción del estímulo, el cual será independiente de metilación. En *A. brasilense* Zhulin y Armitage (1992) propusieron que el sistema quimiotáctico dominante, se sustenta en la vía independiente de metilación, e indicaron que las taxis hacia aceptores de electrones y oxígeno, son tan fuertes que a menudo enmascaran las respuestas a otros compuestos químicos, lo que sugiere un papel dominante para las respuestas dependientes del estado redox en esta bacteria. En efecto, evidencia experimental reciente mostró que en *A. brasilense* la adaptación de los receptores de taxis energética AerC y Tlp1 es independiente de metilación (Russell, 2013; Xie *et al.*, 2010). De la misma manera que lo descrito en *E. coli* donde el receptor Aer, que detecta el estado redox de la célula a través de la unión del FAD (flavín adenín dinucleótido) involucra un mecanismo de adaptación sensorial a los estímulos aerotácticos, cuyo comportamiento es independiente de metilación (Bibikov *et al.*, 2004). No obstante visto la enorme

complejidad que sugiere el análisis bioinformático con respecto a la presencia de 48 receptores, no se debe descartar la posibilidad de presentar ambos mecanismos de adaptación.

Los resultados obtenidos precedentemente, los datos obtenidos del análisis bioinformático, así como la ubicación del gen *mcpA* en el contexto genético nos motivó a iniciar su estudio fenotípico. Para lo cual se generó la mutante por inserción de un casete de Km en el gen *mcpA* (*A. brasilense mcpA::Km^R*), con este fin, se realizaron ensayos de movilidad, midiendo los halos de crecimiento a las 24 y 48 horas, y de quimiotaxis a las 4 horas posteriores del experimento. Por otro lado, la mutación por inserción del casete de Km, no afectó el marco de lectura del gen que se encuentra río abajo, debido a que éste se transcribe en dirección inversa, aspecto que no tendría efecto sobre el fenotipo observado.

En el ensayo de movilidad, se observa disminución en el desplazamiento en todos los atractantes evaluados en la mutante *A. brasilense mcpA::Km^R* comparada con la cepa silvestre (Gráfica 3, Tabla 2). Las microfotografías de fluorescencia nos permitió observar mayor formación de rosetas (agregados celulares) en la cepa mutante *A. brasilense mcpA::Km^R* a diferencia de la cepa silvestre (Fig. 20); además de observar la presencia del flagelo en ambas cepas. La mutación en el gen *mcpA*, conlleva la disminución en la movilidad, debido probablemente a su participación directa en la transducción de señales hacia el motor flagelar. Esta mutante también conlleva la formación de rosetas o agregados celulares, que aunque son formadas por células móviles, se comportan como incapaces de explorar su entorno, utilizando una vía dependiente de quimiotaxis (Bible *et al.*, 2012). Alexandre (2015) describe que las células en estos agregados en *A. brasilense*, se adhieren a través del polo opuesto flagelar, pero en las microfotografías tomadas en el presente trabajo de ambas cepas, se presentan unidas a través del flagelo. Se ha estudiado que los sistemas de quimiotaxis en otras bacterias, controlan la agregación celular mediante los receptores de quimiotaxis dedicados a sensar la entrada de la señal, regulando estos comportamientos (Alexandre, 2015); tal es el caso del sistema quimiotáctico *frz* de *Mixococcus xanthus*, en donde el receptor FrzCD detecta señales que controlan la agregación, “swarming vegetativo” y la respuesta repelente. Interesantemente FrzCD, es un receptor citoplasmático, que al igual que McpA, carecen de dominios de sensado, en donde suponen que el dominio C-terminal presente en todas las MCPs, pueda estar involucrado en la percepción y transmisión de la señal (Bustamante *et al.*, 2004).

Los ensayos de quimiotaxis (Gráfica 4, Tabla 3), donde se evalúa de manera estricta el movimiento de la bacteria hacia el atractante, se observó la disminución de la atracción en tres de los ocho atractantes evaluados Malato, Succinato y Fumarato, con respecto a la cepa silvestre. Estudios realizados en las

MCPs, McpS y McpT de *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 (Oku *et al.*, 2014) y McpS y McpQ de *Pseudomonas putida* KT2440 (Martín- Mora *et al.*, 2015), mostraron que ambas proteínas perciben de manera específica intermediarios del ciclo de Krebs, como: malato, succinato, fumarato y citrato. McpS de ambas bacterias *P. fluorescens* Pf0-1 y *P. putida* KT2440 contienen un dominio periplasmático HBM (Helice Bimodular) que funciona como el dominio sensor, diferencia ya indicada en McpA. Ortega y Krell en el 2013, reportaron la estructura 3D del dominio sensor HBM de la proteína McpS de *P. putida* KT2440, incluye dos módulos, en donde el malato y succinato se unen al módulo de la membrana proximal, mientras que citrato se une al módulo de la membrana distal. La mayoría de las MCPs reportadas que participan en quimiotaxis en otros géneros bacterianos, tienen dominios sensores, sin embargo, en el caso de TlpA de *Helicobacter pylori*, sensor de arginina y bicarbonato (Cerda *et al.*, 2011), así como McpA de *A. brasilense* (en estudio) que participa en la quimiotaxis hacia compuestos como, malato, succinato y fumarato, no cuentan con este tipo de dominios.

Las diferencias observadas en el resultado de los diferentes experimentos practicados, son debidas a la posibilidad de la bacteria de responder de diversas formas al mismo estímulo (Alexandre & Zhulin, 2001), en el primer caso se revela el mecanismo de quimiotaxis, así como el de redox taxis; en este último se explora también la capacidad que tiene la bacteria de metabolizar el quimioattractante. La redotaxis en *A. brasilense* es dependiente del metabolismo de los atractantes, es decir, los sustratos más eficientes para el crecimiento, son los atrayentes más fuertes en *A. brasilense* (Alexandre *et al.*, 2000; Russell, 2013; Xie *et al.*, 2010). Mientras que en el segundo ensayo se mide únicamente la velocidad del movimiento natatorio y disminución de reversión del flagelo. Por lo cual consideramos que McpA está involucrada en el proceso de quimiotaxis y redotaxis en esta bacteria.

También fue interesante considerar si el gen *mcpA* forma un operón con los genes que se encuentran río arriba, lo que nos condujo analizar la presencia de un posible operon y secuencias promotoras. Los datos predichos por los programas considerados sugieren la presencia de tres posibles promotores, uno en la secuencia del gen que codifica para la proteína hipotética PAS/PAC, otro en la secuencia del gen *cdgA* y uno más, río arriba del gen *cdgA* (Fig. 10). El resultado de un posible operón formado por los siguientes genes: el gen que codifica para la proteína hipotética PAS/PAC y el gen *mcpA* (Fig. 11); por lo tanto se infiere que probablemente estas proteínas estén acopladas para detectar la señal, y llevar a cabo la quimiotaxis hacia estos compuestos. Proteínas MCPs funcionales se han descrito incluidas en operones, junto con proteínas del sistema de doble componente, como es el caso de *Mixococcus xanthus* (Moine *et al.*, 2014), *Rhizobium leguminosarum* (Miller *et al.*, 2006) y *Rhodospirillum centenum* (Berleman & Bauer,

2005) y en *A. brasilense* Sp7, AerC se ubica en el operón Nif, que juega un rol importante en la fijación de nitrógeno en esta bacteria (Xie *et al.*, 2010).

Se propone un modelo, en el cual la proteína McpA junto con alguno de los cuatros probables sistemas de quimiotaxis que se localizaron en el genoma de *A. brasilense* Sp245, está probablemente recibiendo la señal, a través de la proteína de dominios PAS/PAC. La mayoría de los dominios PAS parecen desempeñar un papel en la transducción de señales, realizando una variedad de funciones en las proteínas modulares de señalización, promoviendo la interacción proteína- proteína, o transfiriendo la señal y además detectando directamente ciertos estímulos (Henry & Crosson, 2011). La unión de pequeñas moléculas a estos dominios, como es el caso del FAD, le sirve para percatarse de los cambios en el estado redox de la célula (Bi & Lai, 2015). Por otro lado la transferencia de la señal se infiere que sería mediante la interacción con la proteína adaptadora CheW (Vu *et al.*, 2011) y la cinasa histidínica CheA, esta se autofosforila, para posteriormente transferir el grupo fosfato al regulador de respuesta CheY y CheY fosforilada (CheY-P) interactúa con el motor flagelar, provocando el movimiento de la bacteria (Bi & Lai, 2015).

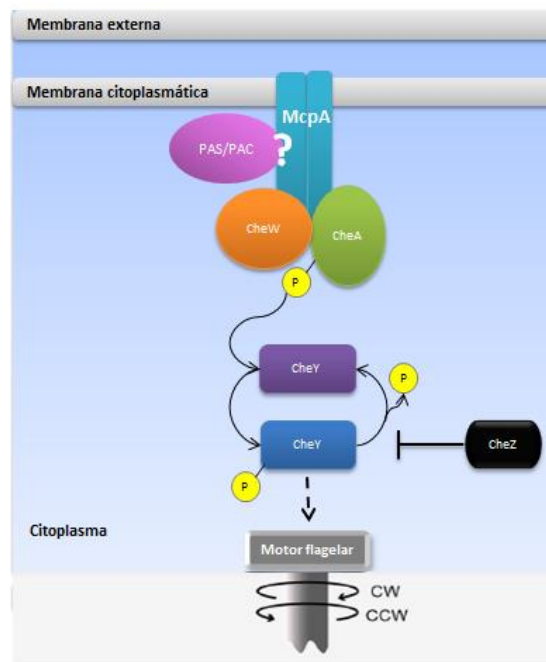


Figura 21. Esquema propuesto de la transducción de señales en donde participa la proteína McpA, CheW

Este esquema es propuesto, basándose en el estudio fenotípico y análisis bioinformáticos del gen *mcpA*. Es importante mencionar que hasta el momento, no hay proteínas MCPs reportadas que estén

acoplándose a proteínas PAS/PAC para detectar ciertos compuestos. Es tentador especular que la función de las proteínas McpA y PAS/PAC, podrían compararse con la función de Aer de *E. coli*, (Bibikov *et al.*, 2004) o AerC de *A. brasilense* (Xie *et al.*, 2010), los cuales son receptores de redox taxis. Cabe indicar que Aer de *E. coli*, presenta el mecanismo de adaptación independiente de metilación, como quizás sea el caso de la proteína McpA. No obstante, McpA y Aer son estructuralmente diferentes, ésta última presenta los dominios HAMP y PAS (Bibikov *et al.*, 2004), mientras que McpA, no los tiene, entonces un modelo probable de percepción de la señal sería el siguiente: la proteína PAS/PAC detectaría el estado redox de la célula y mediante una interacción directa con McpA, modular su función como receptor de quimiotaxis.

X. Conclusiones

El gen AZOBR_140291 que codifica para la proteína McpA, participa en la quimiotaxis en *A. brasilense* Sp245, mediante la detección de atractantes evaluados en las condiciones de este ensayo.

La búsqueda de los posibles promotores, dio una posibilidad de que probablemente el gen *mcpA*, funcione como operón con los genes que se encuentran río arriba del gen en estudio.

XI. Perspectivas

Complementar la cepa mutante *mcpA::Km^R* de *A. brasilense* Sp245, con el gen silvestre *mcpA* y evaluar los fenotipos.

Evaluar la quimiotaxis mediante la colonización en plantas de trigo, y comparar si hay una disminución en la colonización de la cepa mutante vs cepa silvestre.

Expresar la proteína McpA y realizar ensayos de interacción proteína- proteína, y analizar con que proteína está interaccionando.

Realizar la mutación por delección, del gen que codifica para la proteína con dominios PAS/PAC y analizar los fenotipos de quimiotaxis hacia distintos atractantes.

Bibliografía

1. Alexandre, G. (2015). Minireview: chemotaxis control of transient cell aggregation. *Journal of Bacteriology*, 197 (20), 3230-3237. DOI: 10.1128/JB.00121-15.
2. Alexandre, G., Greer, S. E., & Zhulin, I. B. (2000). Energy Taxis Is the Dominant Behavior in *Azospirillum brasilense*. *Journal of Bacteriology*, 182(21), 6042–6048.
3. Alexandre, G., & Zhulin, I. B. (2001). More Than One Way To Sense Chemicals. *Journal of Bacteriology*, 183(16), 4681–4686. DOI: 10.1128/JB.183.16.4681-4686.200.
4. Aizawa, S.-I., Harwood, C. S., & Kadner, R. J. (2000). Signaling Components in Bacterial Locomotion and Sensory Reception. *Journal of Bacteriology*, 182(6), 1459–1471.
5. Baca, B. (2009). Bases moleculares de la interacción planta-bacteria: Modelo *Azospirillum*. 1-37.
6. Baldani, V., Baldani, J., & Döbereiner, J. (1987). Inoculation of field-grown wheat (*Triticum aestivum*) with *Azospirillum* spp. in Brazil. *Biology and Fertility of Soils*, 4 (1), 37-40.
7. Bashan, Y., Holguin, G., & de-Bashan, L. (2004). *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). *Canadian Journal of Microbiology*, 50, 521-577. DOI: 10.1139/w04-035.
8. Berleman, J., & Bauer, C. (2005). A che- like signal transduction cascaded involved in controlling flagella biosynthesis in *Rhodospirillum centenum*. *Molecular Microbiology*, 55(5), 1390-1402. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2005.04489.x.
9. Bhattacharyya, P., & Jha, D. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28, 1327-1350. DOI: 10.1007/s11274-011-0979-9.
10. Bi, S., & Lai, L. (2015). Bacterial chemoreceptors and chemoeffectors. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72 (4), 691-708. DOI: 10.1007/s00018-014-1770-5.
11. 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. Doi: 10.1128/JB.00310-12.
12. Bible, A. N., Stephens, B. B., Ortega, D. R., Xie, Z., & Alexandre, G. (2008). Function of a Chemotaxis-Like Signal Transduction Pathway in Modulating Motility, Cell Clumping, and Cell Length in the Alphaproteobacterium *Azospirillum brasilense*. *Journal of Bacteriology*, 190 (19), 6365–6375. DOI:10.1128/JB.00734-0.
13. Bibikov, S. I., Miller, A. C., Gosink, K. K., & Parkinson, J. S. (2004). Methylation-Independent Aerotaxis Mediated by the *Escherichia coli* Aer Protein. *Journal of Bacteriology*, 186(12), 3730–3737. DOI: 10.1128/JB.186.12.3730-3737.2004
14. Bollinger, J., Park, C., Harayama, S., & Hazelbauer, G. L. (1984). Structure of the Trg protein: Homologies with and differences from other sensory transducers of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81(11), 3287–3291.
15. Borisov, I., Schelud'ko, A., Petrova, L., & Katsy, E. (2009). Changes in *Azospirillum brasilense* motility and the effect of wheat seedling exudates. *Microbiological Research*, 164 (5), 578–587. DOI:10.1016/j.micres.2007.07.003.
16. Bustamante, V., Martínez-Flores, I., Vlamaki, H., & Zusman, D. (2004). Analysis of the Frz signal transduction system of *Myxococcus xanthus* shows the importance of the conserved C-terminal region of the cytoplasmic chemoreceptor FrzCD in sensing signals. *Molecular Microbiology*, 53 (5), 1501-1513. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2004.04221.x.

17. Camelo R., M., Vera M., S., & Bonilla B., R. (2011). Mechanisms of action of plant growth promoting rhizobacteria. *Corpoica*, 12 (2), 159-166.
18. Cerda, O., Núñez Villena, F., Soto, S., Ugalde, J., López Solís, R., & Toledo, H. (2011). tlpA gene expression is required for arginine and bicarbonate chemotaxis in *Helicobacter pylori*. *Biological Research*, 44(3), 277-282. DOI: /S0716-97602011000300009.
19. Danhorn, T., & Fuqua, C. (2007). Biofilm Formation by Plant-Associated Bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 61, 401-422. DOI: 10.1146/annurev.micro.61.080706.093316
20. Greer-Phillips, S. E., Stephens, B. B., & Alexandre, G. (2004). An Energy Taxis Transducer Promotes Root Colonization by *Azospirillum brasilense*. *Journal of Bacteriology*, 186 (19), 6595-6604. DOI: 10.1128/JB.186.19.6595-6604.2004.
21. Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of molecular biology*, 166(4), 557-580.
22. Henry, J. T., & Crosson, S. (2011). Ligand binding PAS domains in a genomic, cellular, and structural context. *Annual Review of Microbiology*, 65, 261–286. DOI: 10.1146/annurev-micro-121809-151631.
23. Kaneko, T., Minamisawa, K., Isawa, T., Nakatsukasa, H., Mitsui, H., Kawaharada, Y., ... Sato, S. (2010). Complete Genomic Structure of the Cultivated Rice Endophyte *Azospirillum* sp. B510. *DNA Research: An International Journal for Rapid Publication of Reports on Genes and Genomes*, 17(1), 37–50. DOI:10.1093/dnares/dsp026.
24. Kearns, D. B. (2010). A field guide to bacterial swarming motility. *Nature Reviews. Microbiology*, 8(9), 634–644. DOI: 10.1038/nrmicro2405.
25. Krell, T., Lacal, J., Muñoz Martínez, F., Reyes Darias, J., Hilal Cadirci, B., García Fontana, C., & Ramos, J. (2011). Diversity at its best: bacterial taxis. *Environmental Microbiology*, 13(5), 1115-1124. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2010.02383.x.
26. Lacal, J., Alfonso, C., Liu, X., Parales, R., Conejero Lara, F., Morel, B., . . . Krell, T. (2010a). Identification of a Chemoreceptor for Tricarboxylic Acid Cycle Intermediates. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(30), 23126–23136. DOI: 10.1074/jbc.M110.110403.
27. Lacal, J., García Fontana, C., Muñoz Martínez, F., Ramos, J., & Krell, T. (2010b). Sensing of environmental signals: classification of chemoreceptors according to the size of their ligand binding regions. *Environmental Microbiology*, 12 (11), 287328-84. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2010.02325.x
28. Lin SY, S., Liu, YC., Hameed, A., Hsu, YH., Lai, WA., Shen, FT., & Young, CC. (2013). *Azospirillum fermentarium* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from a fermenter. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63, 3762-8. DOI: 10.1099/ijs.0.050872-0.
29. Martin-Didonet, C. C. G., Chubatsu, L. S., Souza, E. M., Kleina, M., Rego, F. G. M., Rigo, L. U., ... Pedrosa, F. O. (2000). Genome Structure of the Genus *Azospirillum*. *Journal of Bacteriology*, 182(14), 4113–4116.
30. Martín-Mora, D., Reyes-Darias, J.-A., Ortega, Á., Corral-Lugo, A., Matilla, M. A. and Krell, T. (2015), McpQ is a specific citrate chemoreceptor that responds preferentially to citrate/metal ion complexes. *Environmental Microbiology*. DOI: 10.1111/1462-2920.13030.
31. Meier, V. M., Muschler, P., & Scharf, B. E. (2007). Functional Analysis of Nine Putative Chemoreceptor Proteins in *Sinorhizobium meliloti*, *Journal of Bacteriology*, 189(5), 1816–1826. DOI: 10.1128/JB.00883-06.
32. Michiels, K., Croes, C., & Vanderleyden, J. (1991). Two different modes of attachment of *Azospirillum brasilense* Sp7 to wheat roots. *Microbiology*, 137 (9), 2241-2246. DOI: 10.1099/00221287-137-9-2241.
33. Miller, L., Yost, C., Hynes, M., & Alexandre, G. (2006). The major chemotaxis gene cluster of *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae is essential for competitive nodulation. *Molecular Microbiology*, 63 (2), 3483-62. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2006.05515.x

-
34. Moine, A., Agrebi, R., Espinosa, L., Kirby, J. R., Zusman, D. R., Mignot, T., & Mauriello, E. M. F. (2014). Functional Organization of a Multimodular Bacterial Chemosensory Apparatus. *PLoS Genetics*, 10(3), e1004164. Doi: 10.1371/journal.pgen.1004164.
 35. Oku, S., Komatsu, A., Nakashimada, Y., Tajima, T., & Kato, J. (2014). Identification of *Pseudomonas fluorescens* Chemotaxis Sensory Proteins for Malate, Succinate, and Fumarate, and Their Involvement in Root Colonization. *Microbes and Environments*, 29(4), 413–419. DOI: 10.1264/jsme2.ME14128
 36. Ortega, Á., & Krell, T. (2014). The HBM domain: Introducing bimodularity to bacterial sensing. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, 23(3), 332–336. DOI: 10.1002/pro.2410
 37. Parkinson, J. S. (2010). Signaling Mechanisms of HAMP Domains in Chemoreceptors and Sensor Kinases. *Annual Review of Microbiology*, 64, 101-122. DOI: 10.1146/annurev.micro.112408.134215.
 38. Pérez-Montano, F., Alías-Villegas, C., Bellogín, R., del Cerro, P., Espuny, M., Jiménez-Guerrero, I., . . . Cubo, T. (2014). Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: From microorganism capacities to crop production. *Microbiological Research*, 169, 325–336. doi:10.1016/j.micres.2013.09.011
 39. Porter, S., Wadhams, G., & Armitage, J. (2011). Signal processing in complex chemotaxis pathways. *Nature Reviews Microbiology*, 9 (3), 153-165. DOI: 10.1038/nrmicro2505.
 40. Rice, M., & Dahlquist, F. (1991). Sites of Deamidation and Methylation in Tsr, a Bacterial Chemotaxis Sensory Transducer. *The Journal of Biological Chemistry*, 266 (16), 9746-9753.
 41. Russell, M. H., Bible, A. N., Fang, X., Gooding, J. R., Campagna, S. R., Gomelsky, M., & Alexandre, G. (2013). Integration of the Second Messenger c-di-GMP into the Chemotactic Signaling Pathway. *mBio*, 4(2), 1-13. DOI:10.1128/mBio.00001-13
 42. Simon R, Priefer U and Puler A (1983). A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering. *Biotechnology*, 1, 784–791.
 43. Sferdean, F. C., Weis, R. M., & Thompson, L. K. (2012). Ligand Affinity and Kinase Activity are Independent of Bacterial Chemotaxis Receptor Concentration: Insight into Signaling Mechanisms. *Biochemistry*, 51(35), 6920–6931. DOI: 10.1021/bi3007466.
 44. Szurmant, H., & Ordal, G. W. (2004). Diversity in Chemotaxis Mechanisms among the Bacteria and Archaea. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68 (2), 301–319. DOI:10.1128/MMBR.68.2.301-319.2004
 45. Steenhoudt, O., & Vanderleyden, J. (2000). *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiology Reviews*, 24, 487-506. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2000.tb00552.
 46. Stephens, B. B., Loar, S. N., & Alexandre, G. (2006). Role of CheB and CheR in the Complex Chemotactic and Aerotactic Pathway of *Azospirillum brasilense*. *Journal of Bacteriology*, 188(13), 4759–4768. DOI: 10.1128/JB.00267-06.
 47. Siuti, P., Green, C., Nicole Edwards, A., Doktycz, M., & Alexandre, G. (2011). The chemotaxis- like Che1 pathway has an indirect role in adhesive cell properties of *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiology*, 23 (2), 105-12. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2011.02366.
 48. Vacheron, J., Desbrosses, G., Bouffaud, M.-L., Touraine, B., Moënne-Loccoz, Y., Muller, D., . . . Prigent-Combaret, C. (2013). Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Front Plant Science*, 4, 356. DOI: 10.3389/fpls.2013.00356
 49. Van Bastelaere, E., Lambrecht, M., Vermeiren, H., Van Dommelen, A., Keijers, V., Proost, P., & Vanderleyden, J. (1999). Characterization of a sugar-binding protein from *Azospirillum brasilense* mediating chemotaxis to and uptake of sugars. *Molecular Microbiology*, 32(4), 703-714. DOI: 10.1046/j.1365-2958.1999.01384.x.

-
50. Vu, A., Wang, X., Zhou, H., & Dahlquist, F. W. (2012). The Receptor-CheW Binding Interface in Bacterial Chemotaxis. *Journal of Molecular Biology*, 415(4), 759–767. Doi: 10.1016/j.jmb.2011.11.043.
 51. Webb, B. A., Hildreth, S., Helm, R. F., & Scharf, B. E. (2014). *Sinorhizobium meliloti* Chemoreceptor McpU Mediates Chemotaxis toward Host Plant Exudates through Direct Proline Sensing. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(11), 3404–3415. DOI: 10.1128/AEM.00115-1.
 52. Wisniewski-Dyé, F., Borziak, K., Khalsa-Moyers, G., Alexandre, G., Sukharnikov, L. O., Wuichet, K., ... Zhulin, I. B. (2011). *Azospirillum* Genomes Reveal Transition of Bacteria from Aquatic to Terrestrial Environments. *PLoS Genetics*, 7(12), e1002430. DOI:10.1371/journal.pgen.1002430
 53. 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 (8), 606–617. DOI:10.1016/j.micres.2010.12.001
 54. Wuichet, K., Alexander, R. P., & Zhulin, I. B. (2007). Comparative Genomic and Protein Sequence Analyses of a Complex System Controlling Bacterial Chemotaxis. *Methods in Enzymology*, 422, 1–31. DOI: 10.1016/S0076-6879(06)22001-9.
 55. Xie, Z., Ulrich, L. E., Zhulin, I. B., & Alexandre, G. (2010). PAS domain containing chemoreceptor couples dynamic changes in metabolism with chemotaxis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(5), 2235–2240. DOI: 10.1073/pnas.0910055107.
 56. Zhulin, I. B., & Armitage, J. P. (1993). Motility, chemokinesis, and methylation-independent chemotaxis in *Azospirillum brasilense*. *Journal of Bacteriology*, 175 (4), 952–958.

Anexos

Preparación de medios de cultivo

✚ Medio Rojo congo

Reactivos	Cantidades para preparar 1 L
D.L. málico	5 g
Extracto de levadura	0.5 g
K ₂ HPO ₄	0.5 g
MgSO ₄ *7H ₂ O (10%)	2 mL
NaCl (10 %)	1mL
FeCl ₃	1.4 mL
Na ₂ MoO ₄ * 2H ₂ O (0.1%)	2 mL
Ajustar pH 6.8 con KOH	
Rojo congo	15 mL
Agar bacteriológico 1.5%	15 g

Esterilizar a 15 Lb durante 20 minutos.

✚ Medio Luria Bertani


Reactivos	Cantidades para preparar 1 L
Peptona de caseína	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g
Ajustar el pH a 7 con NaOH 10 N	
Agar bacteriológico 1.5 %	15 g

Esterilizar a 15 Lb durante 20 minutos.

✚ Medio LB modificado


Reactivos	Cantidades para preparar 1 L
Peptona de caseína	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	5 g
CaCl ₂	0.3675 g
MgSO ₄	0.6162 g
Ajusta el pH a 7 con NaOH 10 N	
Agar bacteriológico 1.5 %	15 g

Esterilizar a 15 Lb durante 20 minutos.

 Medio Difco

Reactivos	Cantidades para preparar 1 L
Nutriente Broth	8 g
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0.25 g
KCl	1 g
MnCl ₂	0.01 g
Ajustar el pH 6.8 con KOH	
Agar bacteriológico 1.5 %	15 g

Esterilizar a 15 Lb durante 20 minutos.

 Medio K- malato

Reactivos	Cantidades para preparar 1 L
KH ₂ PO ₄	0.87 g
K ₂ H PO ₄	1.67 g
MgSO ₄	0.29 g
NaCl	0.48 g
Ácido Málico	4.5326 g
Ajustar pH 6.9 con KOH	
Agar bacteriológico 1.5 %	15 g

Esterilizar a 15 Lb durante 20 minutos.

Posteriormente, complementar el medio en condiciones de esterilidad, con las siguientes soluciones:

Soluciones	Cantidades para preparar 1 L
CaCl ₂ (0.7 %)	10 mL
FeCl ₃ (1.0 %)	1 mL
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O (0.5 %)	1 mL
NH ₄ Cl (20 %)	5 mL
Oligoelementos 10x	1 mL

Obtención de ADN genómico de bacterias

Soluciones:

Buffer STE (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH =8)

Buffer TE (10 mM Tris/1 mM EDTA)

Fenol saturado con Tris-HCl pH = 8

Cloroformo- alcohol isoamílico (24:1).

RNasa 10 mg/ml o 1 mg/ml.

1. Preparar un precultivo resuspendiendo una colonia bacteriana en 5 ml del medio adecuado.
2. Agregar una alícuota del precultivo a un tubo de ensaye que contenga 5 del medio de elección (para 5 ml de cultivo agregar 50 μ L de precultivo). Incubar a la temperatura y tiempo necesario, por ejemplo, 30 °C por 18 horas a 150 rpm para *Azospirillum* spp.
3. Centrifugar 3 ml del cultivo bacteriano en un tubo Eppendorf a 10000 rpm durante 2 minutos. Descartar el sobrenadante y resuspender el paquete celular en 400 μ L de buffer STE.
4. Centrifugar a 10000 rpm por 2 minutos.
5. Eliminar el sobrenadante y resuspender el paquete celular en 200 μ L de buffer TE.
6. Agregar 100 μ L de fenol saturado con Tris-HCl (pH =8). Homogeneizar con vórtex a máxima velocidad durante 2 minutos para lisar las células.
7. Centrifugar a 13000 rpm por 5 minutos a 4°C para separar la fase acosa de la fase orgánica.
8. Separar el sobrenadante (fase acosa) con ayuda de una pipeta de 200 μ L y una punta amarilla a la que se le haya cortado la punta con una tijera. Colocar el sobrenadante en un nuevo tubo.
NOTA: Cada vez que se separe el sobrenadante de la fase orgánica se recomienda cortar el extremo de la punta, con ello se evita aspirar la fase orgánica.
9. Agregar 50 μ L de buffer TE y 200 μ L de cloroformo-alcohol isoamílico, homogeneizar por 1 minuto y centrifugar a 13000 rpm por 5 minutos.
10. Separar el sobrenadante (recuerde cortar el extremo de la punta) y pasarlo a un nuevo tubo.
11. Agregar 3 μ L de una solución de RNasa a 10 mg/ml o bien 50 μ L de una solución de RNasa a 1 mg/ml. Incubar por 15 minutos a 37 °C.
12. Correr 3 μ L de muestra mediante una electroforesis en gel de agarosa al 0.7%.

Fuente: Cheng HR, Jiang N. 2006. Extremely rapid extraction of DNA from bacteria and yeasts. *Biotechnology Letters* 28: 55–59

Obtención de ADN plasmídico por miniprep (Gilles Morelle)

Tomar una colonia de un cultivo fresco y crecer la bacteria a 37 °C durante 14-16 horas con aireación vigorosa a 200 rpm en 5 ml de medio LB en tubos de 16x150mm conteniendo el antibiótico adecuado.

Cosechar los cultivos (de 3 a 5 ml) bacterianos por centrifugación a baja velocidad (8,000 rpm por 1min) en tubos de microcentrífuga (eppendorff de 1.5 mL).

Eliminar sobrenadante por decantación y quedarse solamente con el paquete celular.

Resuspender en 200µl de solución reguladora de lisis (Solución 1) 50 mM de Tris-HCl (pH 8.0) y de EDTA 10 mM previamente esterilizada por 20 minutos a 15 libras y 121°C; agregar lisozima hecha al momento (4 mg/ml).

Mantener el tubo con la solución 1 durante 5 minutos a °T ambiente.

Después agregar 400µl de la solución de lisis (Solución 2) NaOH 200 mM y (SDS) sodium dodecyl sulfate al 1%, mezclar por inversión suavemente de 3-6 veces y mantener 5 minutos en hielo, no excederse de ese tiempo. Nota: La suspensión debe ser clara y viscosa.

Agregar 300µl la solución de precipitado (Solución 3) de acetato de potasio 3.0 M pH 5.5 ajustado con ácido acético, mezclar suavemente por inversión de 3 a 6 veces.

Incubar a -20 °C por 30 minutos para que precipite el mayor contenido en proteína, RNA de alto peso molecular y DNA cromosómico.

Centrifugar por 15 min a 14,000 rpm y a 4 °C (Centrífuga refrigerada).

Tomar el sobrenadante por aspiración y transferirlo a un segundo tubo limpio y estéril, centrifugar nuevamente a 14000 rpm por 15 minutos.

Tomar el sobrenadante por aspiración y transferirlo a otro tubo limpio y estéril, agregar 200 µL fenol saturado con Tris/HCl 0.1 M ajustado a un pH= 8 y 200 µL Cloroformo-alcohol Isoamílico, previamente preparados; mezclar suavemente por inversión durante 5 minutos y centrifugar a 10,000 rpm por 5 minutos.

Separar sobrenadante por aspiración y transferirlo a otro tubo limpio estéril, agregar 200 µL fenol saturado con Tris/HCl 0.1 M, ajustado a un pH= 8 y 200 µL Cloroformo-alcohol Isoamílico, mezclar suavemente por inversión durante 5 minutos y centrifugar a 10,000 rpm por 5 minutos.

Después de haber hecho dos lavados con la mezcla de fenol/cloroformo-alcohol isoamílico hacer un último lavado con Cloroformo- Alcohol-Isoamílico para eliminar el exceso de fenol; mezclar por inversión y centrifugar a 10,000 rpm por 5 minutos.

Aspirar el sobrenadante y transferirlo a un tubo nuevo y estéril tratando de estimar la cantidad obtenida para calcular la cantidad de isopropanol a utilizar.

Añadir 0.6 volúmenes de Isopropanol (400µl-500µl) e incubar a °T ambiente por 10 minutos para precipitar el DNA que se encuentra en el sobrenadante.

Centrifugar por 30 minutos a 14,000 rpm a 4° C (Centrífuga refrigerada)

Eliminar el sobrenadante por decantación cuidando no perder la pastilla que se encuentra en el fondo del tubo que presenta un aspecto, que va de transparente a blanco

Posteriormente eliminar las sales que puedan haber precipitado junto con la pastilla, con un mililitro de etanol al 70%, mezclar suavemente por inversión de 2-3 veces y centrifugar por 5 minutos a 10,000 rpm a 4 °C en la centrífuga refrigerada, repetir el proceso 2 veces.

Poner los tubos invertidos sobre un papel filtro para secar la pastilla y eliminar el exceso de etanol hacerlo de 15 a 30 minutos a °T ambiente.

Resuspender la pastilla en 50µL de una solución de RNAsa de 0.1mg/ml e incubar a 37 °C por 20-30 minutos.

Preparación de soluciones.

- Fenol saturado con Tris/HCl 0.1 M ajustado a un pH= 8

Se hace en base al protocolo indicado por el proveedor (Invitrogen Ultra Pure Phenol)

- Cloroformo /Alcohol Isoamílico (Se encuentran en el área de solventes)

48 mL de Cloroformo

2 mL de Alcohol Isoamílico

Preparar 50 mL (Hacerlo en la campana de extracción)

Almacenar a 4°C en un frasco ámbar

- Isopropanol (Se encuentra en el área de solventes)

Hacer una alícuota de 50 ml

Almacenar a 4°C en un frasco ámbar

- Etanol al 70 %

70 ml de alcohol etílico absoluto (Se encuentra en el área de solventes)

30 ml de H₂O inyectable

Ajustar el volumen a 100 ml con H₂O

Almacenar a 4°C en un frasco ámbar

- Solución de RNAsa (Almacenada a -20 °C)

Para un mililitro: 990 µl de H₂O + 10 µl de una solución stock que se encuentra a 10 mg/ml de RNAsa.

Resuspensión de iniciadores

Los iniciadores adquiridos están a 0.0322 μmol y se resuspenden en 0.000322 L, para obtenerlos a una concentración de 100 μM , de los cuales se hicieron tres alícuotas a una concentración de 10 μM , requerida para llevar a cabo la reacción de PCR.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa, conocida como PCR por sus siglas en inglés (*Polymerase Chain Reaction*), es una técnica de biología molecular desarrollada en 1986 por Kary Mullis, cuyo objetivo era y es obtener un gran número de copias de un fragmento de DNA determinado, partiendo de una cadena molde.

Las condiciones para la mezcla de PCR para amplificar el gen silvestre y el gen con la inserción del casete de Km son las siguientes:

H ₂ O	9.3 μL	1 ciclo	95°C - 7 min
DMSO	1 μL	30 ciclos	95°C - 30s
10x PCR Buffer (-Mg)	2 μL		58°C - 30s
25mM MgCl ₂	1.25 μL		72°C - 2min
10mM dNTP	4 μL	1 ciclo	72°C - 7min
Forward	0.5 μL		4°C - α
Reverse	0.5 μL		
DNA (1:10)	1.25 μL		
Taq Platinum	0.2 μL		

Nota: En el caso de la mutante, el tiempo de extensión es de 3.5 minutos.