



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Instituto de Ciencias

Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas

Tesis:

Análisis de los genes que codifican a la diguanilato ciclasa C y la fosfohidrolasa putativa tipo NUDIX de *Azospirillum baldaniorum* Sp245

Tesis presentada para obtener el grado de:

Doctor en Ciencias (Microbiología)

Presenta:

M.C. Daniel Sierra Cacho

Directora de Tesis:

D.C. Beatriz Eugenia Baca

Enero, 2022

Puebla, Pue. a 4 de enero 2022.

**A LA ACADEMIA DEL POSGRADO
EN MICROBIOLOGÍA
CICM-ICUAP
P R E S E N T E.**

Por este conducto los abajo firmantes, integrantes del Comité revisor de Tesis de Doctorado del alumno **Daniel Sierra Cacho**, les informamos que hemos revisado el escrito titulado:

“Análisis de los genes que codifican a la diguanilato ciclasa C y la fosfohidrolasa putativa tipo NUDIX de *Azospirillum baldaniorum* Sp245”


A nuestro juicio, el alumno **Daniel Sierra Cacho** puede proceder a la digitalización de la tesis y a la presentación del examen de grado correspondiente.

Sin más que agregar, nos despedimos afectuosamente de ustedes.

Atentamente.
“Pensar Bien Para Vivir Mejor”




D.C. Analilia Arroyo Becerra




D.C. Miguel Castañeda Lucio




D.C. Candelario Vázquez Cruz



D.C. Sandra Raquel Reyes Carmona



D.C. Claudia F. Martínez de la Peña



D.C. Antonino Báez Rogelio

Declaratoria del autor

Declaro que la presente tesis cuyo título es “Análisis de los genes que codifican a la diguanilato ciclasa C y la fosfohidrolasa putativa tipo NUDIX de *Azospirillum baldaniorum* Sp245” dirigida por la D.C. Beatriz Eugenia Baca y realizada en el Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla como uno de los requisitos para obtener el grado de Doctor en Ciencias (Microbiología) es original y de mi autoría y no ha sido utilizada para la obtención de algún grado académico en ninguna otra institución educativa. Aunque el contenido incluye información obtenida de otros trabajos publicados, ésta fue utilizada como antecedentes y los autores fueron debidamente citados, por lo cual no infringe en las leyes de los derechos de autor.

Atentamente:

A handwritten signature in blue ink, consisting of several loops and a long horizontal stroke at the end, positioned below the text 'Atentamente:'.

M.C. Daniel Sierra Cacho

Agradecimientos

Se agradece a la **Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado** por el apoyo otorgado para la conclusión de esta tesis dentro del Programa IV. Investigación y Posgrado. Apoyar a los programas de posgrado para lograr su incorporación al Padrón Nacional de Calidad. Indicador establecido en el Plan de Desarrollo Institucional 2017-2021.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** por haberme proporcionado los recursos económicos fundamentales para la obtención de este grado académico.

A mi asesora, la **D.C. Beatriz Eugenia Baca**, por brindarme la oportunidad de colaborar con ella y su equipo de trabajo durante mi estancia en su laboratorio. Por compartir sus conocimientos conmigo, así como fungir de guía a lo largo de todo este tiempo.

Al **D.C. Alberto Ramírez Mata** por contribuir significativamente en el desarrollo de este trabajo.

A la **D.C. Sandra Raquel Reyes Carmona** por todas las charlas y consejos tanto académicos como personales. Obrigado, Doc!

Un sincero agradecimiento a la **D.C. Analilia Arroyo Becerra**, al **D.C. Miguel Castañeda Lucio** y al **D.C. Candelario Vázquez Cruz**, quienes se desempeñaron como mis sinodales durante esta etapa. Mil gracias por sus valiosos comentarios, consejos e inquietudes emitidas durante la realización de los distintos tutorales, los cuales fueron de gran relevancia para la realización, enriquecimiento y culminación de este trabajo.

Gracias a la **D.C. Claudia Fabiola Martínez de la Peña** y al **D.C. Antonino Báez Rogelio** por su disposición, comentarios y sugerencias al revisar este texto y que permitieron mejorar este trabajo.

A la **Q.F.B. María Luisa Xiqui Vázquez** por toda su ayuda, consejos, enseñanzas y amistad.

A mis compañeros de laboratorio: **Paco, Iván, Ibelith, Ricardo, Enrique, Jesús Uriel, David, Uriel, Larissa, Iris, Diana, y Christopher; Saúl, Cynthia, Arely, Toño, Elvia, Roxana, Carlos, Zaira y Miguel**. Gracias por su amistad, apoyo y la diversión que hizo más amena la estancia en el laboratorio.

A **Ruth, Jocelyne y Emiliano**, por permitirme adoptar una faceta distinta. Gracias por tanto.

Astrid, me agradas.

A **mis padres** por todo su apoyo.

Héctor, sigo siendo tu fan.

Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNe	Ácido desoxirribonucleico extracelular
ADPR	ADP-ribosa
Amp	Ampicilina
Ap4A	Diadenosín tetrafosfato
Ap4AH	Diadenosín tetrafosfato hidrolasa
Cm	Cloranfenicol
CoAP	Coenzima A pirofosfohidrolasa
CTAB	Bromuro de cetiltrimetilamonio
CV	Cristal violeta
CW	Calcofluor-White
DGC	Diguanilato ciclasa
di-GMPc	Ácido di-(3'-5') guanosín monofosfato
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTP	Desoxinucleótido trifosfato
eGFP	Enhanced green fluorescent protein
EPS	Exopolisacáridos
GST	Glutación S-transferasa
Km	Kanamicina
LB*	LB modificado
Lac	Promotor <i>lac</i>
Gm	Gentamicina
GMP	Guanosín monofosfato
mL	Mililitro
mM	Milimolar
NADHP	Pirofosfohidrolasa del dinucleótido de nicotinamida
NFb	Medio para fijación de nitrógeno
NFb*	Medio para fijación de nitrógeno modificado
nm	Nanómetros
ORF	Marco de lectura abierto
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDE	Fosfodiesterasa
PGPR	Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal
pGpG	5'-fosfoguanilil-(3'-5') guanosina
rpm	Revoluciones por minuto
RppH	ARN pirofosfohidrolasa
Sac	Sacarosa
SPE	Sustancias poliméricas extracelulares
Tc	Tetraciclina
UFC	Unidades formadoras de colonia

Índice General

Declaratoria del autor

Agradecimientos

Abreviaturas

Resumen..... 1

Abstract..... 3

1. Introducción

1.1. El ácido (3'-5')-diguanylicil cíclico, guanosín bis-(3'-5') monofosfato dimérico (di-GMPc).. 5

1.2. Metabolismo del di-GMPc..... 6

1.3. Efectores del di-GMPc..... 10

1.4. di-GMPc y biopelícula..... 12

1.5. di-GMPc y sustancias poliméricas extracelulares..... 15

1.6. Técnicas para evaluar el metabolismo del di-GMPc..... 16

1.7. di-GMPc en rizobacterias..... 18

1.8. *Azospirillum*..... 20

1.9. Proteínas NUDIX..... 22

2. Justificación..... 25

3. Objetivos..... 25

3.1. General..... 25

3.2. Específicos..... 25

4. Hipótesis..... 25

5. Diagrama de trabajo..... 26

6. Materiales y Métodos..... 27

6.1. Material biológico..... 27

6.2. Vectores..... 28

6.3. Oligonucleótidos.....	29
6.4. Condiciones de cultivo.....	29
6.5. Extracción y manipulación del ADN.....	30
6.6. Análisis bioinformático.....	31
6.7. Determinación de la unidad transcripcional del gen <i>cdgC</i>	31
6.8. Evaluación de la secuencia proteica CdgC.....	32
6.9. Generación de la mutante <i>A. baldaniorum</i> 59C.....	32
6.10. Estrategias para la complementación de la mutante <i>A. baldaniorum</i> 59C.....	34
6.11. Marcaje de las cepas con proteínas fluorescentes.....	34
6.12. Curva de crecimiento.....	35
6.13. Producción de biopelícula.....	35
6.14. Determinación de la formación de biopelícula y producción de exopolisacáridos empleando microscopía confocal.....	36
6.15. Cuantificación de la unión de rojo Congo y calcoflúor a la matriz de la biopelícula.....	37
6.16. Movilidad bacteriana.....	38
6.17. Estimación de los niveles intracelulares del di-GMPc.....	38
6.18. Ensayos de colonización y competencia bacteriana hacia raíces de trigo.....	39
6.19. Cuantificación de la internalización bacteriana a raíces de trigo.....	40
6.20. Análisis estadístico.....	41
6.21. Búsqueda de probables proteínas tipo NUDIX en el genoma de <i>A. baldaniorum</i> Sp245.....	41
6.22. Depuración de secuencias.....	41
6.23. Clasificación de las probables proteínas NUDIX en subfamilias.....	42
7. Resultados	43
7.1. Determinación de la unidad transcripcional de gen <i>cdgC</i>	43
7.2. Evaluación de la secuencia proteica CdgC.....	45
7.3. Generación de la mutante <i>A. baldaniorum</i> 59C.....	48

7.4. Estrategias para la complementación de la mutante <i>A. baldaniorum</i> 59C.....	49
7.5. Curva de crecimiento.....	50
7.6. Producción de biopelícula.....	51
7.7. Determinación de formación de biopelícula y producción de exopolisacáridos empleando microscopía confocal.....	53
7.8. Cuantificación de la unión de calcoflúor a la matriz de la biopelícula.....	54
7.9. Movilidad bacteriana.....	55
7.10. Estimación de los niveles intracelulares del di-GMPc.....	56
7.11. Ensayos de colonización y competencia bacteriana hacia raíces de trigo.....	58
7.12. Cuantificación de la internalización bacteriana a raíces de trigo.....	60
7.13. Clasificación de las probables proteínas NUDIX en <i>A. baldaniorum</i> Sp245.....	60
7.14. Análisis de la proteína NudX.....	62
8. Discusión.....	66
9. Conclusiones.....	79
10. Perspectivas.....	80
11. Material complementario.....	81
12. Referencias.....	82
13. Publicaciones.....	95

Índice de Tablas

Tabla 1	Cepas empleadas en este trabajo.....	27
Tabla 2	Vectores utilizados en este trabajo.....	28
Tabla 3	Oligonucleótidos usados en este trabajo.....	29
Tabla 4	Probables proteínas NUDIX codificadas en el genoma de <i>A. baldaniorum</i> Sp245..	61
Tabla 5	Proteínas homólogas a CdgC codificadas en el genoma de <i>A. baldaniorum</i> Sp245... ..	75

Índice de Tablas Complementarias

Tabla C1	Composición del medio LB.....	81
Tabla C2	Composición del medio LB*.....	81
Tabla C3	Composición del medio rojo Congo.....	81

Índice de Figuras

Figura 1	Di-GMPc.....	6
Figura 2	Regulación por el di-GMPc.....	12
Figura 3	Biopelícula.....	14
Figura 4	Fenotipos regulados por el di-GMPc.....	22
Figura 5	Contexto genético del gen <i>cdgC</i>	43
Figura 6	Evaluación de la transcripción de los genes <i>cdgC</i> y <i>nudX</i>	44
Figura 7	Arquitectura de la proteína CdgC.....	45
Figura 8	Alineamiento de CdgC y estructura secundaria.....	46
Figura 9	Estructura terciaria de la proteína CdgC.....	47
Figura 10	Estrategia de mutación del gen <i>cdgC</i>	48
Figura 11	Electroforetograma de amplificado de las posibles mutantes del gen <i>cdgC</i>	49
Figura 12	Vectores usados en la complementación génica.....	50
Figura 13	Curvas de crecimiento.....	51
Figura 14	Producción de biopelícula.....	52
Figura 15	Formación de biopelícula y producción de exopolisacáridos.....	54
Figura 16	Cuantificación de la unión de calcoflúor a la matriz de la biopelícula.....	55
Figura 17	Movilidad bacteriana.....	56
Figura 18	Estimación de los niveles celulares del di-GMPc.....	57
Figura 19	Colonización bacteriana hacia las raíces de trigo.....	58
Figura 20	Patrones de colonización bacteriana hacia las raíces de trigo.....	59
Figura 21	Cuantificación de la internalización bacteriana a raíces de trigo.....	60
Figura 22	Alineamiento de la probable caja NUDIX de NudX.....	63
Figura 23	Búsqueda de la tirosina característica de las Ap4AH en NudX.....	64
Figura 24	Evaluación de la presencia de la prolina característica de las ADPR hidrolasas en NudX.....	64

Figura 25	Búsqueda del motivo de unión a NAD(H) en NudX.....	65
Figura 26	Alineamiento de NudX contra la CoAP de <i>D. radiodurans</i>	65
Figura 27	Proteínas homólogas a CdgC en <i>A. baldaniorum</i> Sp245.....	74
Figura 28	Contexto genético del gen codificante de la proteína AWJ908401.1.....	75

Resumen

El guanosín bis-(3'-5') monofosfato dimérico (di-GMPc), es un segundo mensajero distribuido ampliamente entre organismos procariotes. Este mensajero es sintetizado por la acción de enzimas de tipo diguanilato ciclasa (DGC), las cuales presentan un motivo conservado denominado como GGDEF (nombrado así debido a la conservación de sus aminoácidos), el cual funge como sitio activo. Estas proteínas emplean dos moléculas de GTP como sustrato y al Mg^{2+} como cofactor. Su degradación es efectuada por enzimas con actividad fosfodiesterasa (PDE) las cuales pueden presentar dominios EAL o HD-GYP, generando la molécula lineal pGpG o dos moléculas de GMP. Diversos trabajos señalan que el di-GMPc regula una plétora de actividades celulares entre las que destacan el ciclo celular, la virulencia bacteriana, la síntesis y ensamblaje de sistemas de secreción y el cambio de vida. Con respecto a ésta última, se ha descrito que concentraciones intracelulares altas del di-GMPc favorecen la formación de biopelícula, disminuyendo el torque flagelar y promoviendo la producción de exopolisacáridos; mientras que, niveles bajos de este mensajero se relacionan al estilo de vida móvil o planctónico por parte de la bacteria.

En este trabajo se evaluó experimentalmente la función del gen *cdgC* de *A. baldaniorum* Sp245, el cual codifica para una proteína con función de diguanilato ciclasa.

Con la finalidad de investigar el papel de la enzima CdgC, se generó una cepa mutante carente del gen que codifica para esta proteína. La cepa mutante *A. baldaniorum* 59C, contrario a lo esperado, no presentó una alteración en la movilidad bacteriana, así como tampoco una alteración en la formación de biopelícula cuando ésta se desarrolló en un medio mínimo adicionado con KNO_3 como fuente de nitrógeno; sin embargo, cuando la cepa fue sometida a condiciones de fijación biológica de nitrógeno, se observó que ésta presentaba una disminución de la producción de biopelícula, así como una producción pobre de exopolisacáridos con afinidad hacia el fluoróforo calcoflúor.

Estos datos sugirieron una probable alteración en la interacción bacteria-planta, lo cual se corroboró en ensayos de colonización bacteriana hacia raíces de trigo, donde, empleando microscopía confocal y proteínas fluorescentes, se mostró que la cepa mutante presentaba deficiencia en la internalización a las raíces de la planta, lo que posteriormente se confirmó con ensayos cuantificación de microorganismos endófitos mediante la desinfección

superficial de estas raíces. Por lo que se concluyó que el gen *cdgC* está involucrado en la síntesis de exopolisacáridos y en la internalización bacteriana hacia su planta hospedera.

Por otra parte, se analizó bioinformáticamente al gen *nudX*, el cual codifica para una proteína que probablemente forme parte de una superfamilia de hidrolasas que presentan afinidad hacia compuestos con estructura de tipo nucleósidos difosfato enlazados a una entidad X, razón por la que reciben el nombre de NUDIX. Entre los sustratos de estas enzimas se describen moléculas que son generadas por el metabolismo bacteriano, así como otras cuyos niveles intracelulares deben ser regulados durante el ciclo celular. Entre estas moléculas destacan los dNTPs (canónicos y oxidados), coenzimas, alarmonas, caperuzas de ARN, etcétera.

Al evaluar a la proteína NudX mediante plataformas bioinformáticas, no fue posible determinar si ésta presentaba actividad enzimática, así como tampoco se logró clasificar a dicha proteína en alguna de las múltiples subfamilias que conforman a la superfamilia de hidrolasas tipo NUDIX. Sin embargo, se sugiere llevar a cabo ensayos *in vitro* con la finalidad de elucidar la función del gen *nudX* así como de la proteína a la que codifica.

Abstract

The bis-(3'-5')-cyclic dimeric guanosine monophosphate (c-di-GMP), is a second messenger widely distributed among prokaryotic organisms. This messenger is synthesized by the action of diguanilate cyclase (DGC) type enzymes, which present the GGDEF conserved motif that is an active site. These proteins use two GTP molecules as substrate and Mg^{2+} as metal cofactor. Its degradation is performed by enzymes with phosphodiesterase activity (PDE) which can present EAL or HD-GYP domains, generating the linear pGpG molecule or two GMP molecules. Various studies indicate that c-di-GMP is able to regulate a plethora of cellular activities, among them the cell cycle, bacterial virulence, the synthesis and assembly of secretion systems and the switch of bacterial lifestyle. It has been described that high intracellular concentrations of c-di-GMP supports biofilm formation, reducing flagellar torque and promoting exopolysaccharides production; and low levels of this messenger are related to a bacterial mobile or planktonic lifestyle.

In this work, the function of *A. baldaniorum* Sp245 *cdgC* gene, which encodes for a protein functioning as diguanylate cyclase, was experimentally evaluated. In addition, the *nudX* gene, which codes for a protein involved in the degradation of compounds linked to phosphate entities, was bioinformatically analyzed.

In order to investigate the role of the CdgC enzyme, a mutant strain lacking the gene coding for this peptide was generated. The mutant strain *A. baldaniorum* 59C, contrary to expected, did not show an alteration on bacterial mobility, as well as in biofilm formation when it was grown in a minimal medium added with KNO_3 as a nitrogen source. However, when the strain was grown under biological nitrogen fixation conditions, a decrease in biofilm production, as well as a reduced production of exopolysaccharides with affinity towards the calcofluor fluorophore were shown.

These data indicated, a reduced bacteria-plant interaction, which was corroborated in tests of bacterial colonization towards wheat roots. Using confocal microscopy and fluorescent proteins, suggested that the mutant strain presented alteration in roots internalization, which was later confirmed by quantification tests of endophytic microorganisms by surface disinfection of these roots. Therefore, it was concluded that the *cdgC* gene is involved in the synthesis of exopolysaccharides and in bacterial internalization towards its host plant.

With respect to the NudX protein, which is probably forming part of superfamily of hydrolases that show affinity for compounds with a nucleoside diphosphate linked to an entity X structure, and therefore called NUDIX proteins. Among the substrates of these enzymes molecules are the generated by bacterial metabolism, as well as others whose intracellular levels must be regulated during the cell cycle. These molecules include dNTPs (canonical and oxidized), coenzymes, alarmones, RNA caps, etc.

The NudX protein was analyzed using bioinformatic platforms, and it was not possible to classify it in any of the multiple subfamilies making part of the NUDIX-type superfamily of hydrolases. However, we suggested to carry out *in vitro* tests in order to elucidate the function of the *nudX* gene as well as the protein it encodes.

1. Introducción

1.1. El ácido (3'-5')-diguanilil cíclico, guanosín bis-(3'-5') monofosfato dimérico (di-GMPc)

Los organismos procariotes se desarrollan en ambientes altamente competitivos y de condiciones fluctuantes, factores que exigen mecanismos de señalización y adaptación eficientes que aseguren la supervivencia bacteriana. Estos sistemas tienden a basarse en la detección de señales, las cuales son acopladas a mecanismos complejos de transducción. Estos sistemas emplean moléculas pequeñas, denominadas como segundos mensajeros, con la finalidad de amplificar y transmitir información a sensores intracelulares, así como a efectores cuya actividad es regulada por la concentración de estas moléculas. Entre estos segundos mensajeros se pueden listar a la alarmona guanosín tetra/penta-fosfato, (p)ppGpp, al di-guanosín monofosfato cíclico y al di-adenosín monofosfato cíclico; estos últimos que regulan múltiples funciones en procariotes (Kalia et al., 2013; Krol et al., 2020; Steinchen et al., 2020).

El ácido di-(3'-5') guanosín monofosfato cíclico, o di-GMPc, es responsable de controlar múltiples funciones celulares las cuales son importantes para la supervivencia bacteriana. Este mensajero fue identificado en 1987 como un activador alostérico implicado en la síntesis de celulosa en la bacteria *Gluconacetobacter xylinus* (Been et al., 2019; Ross et al., 1987; Seshasayee et al., 2010).

Numerosos reportes han demostrado que el di-GMPc regula una amplia variedad de procesos bacterianos, entre los que destacan la virulencia, resistencia al estrés oxidativo, progresión del ciclo celular, la internalización del microorganismo hacia su hospedero, el ensamblaje de sistemas de secreción, la reparación del ADN y otros procesos bioquímicos y fisiológicos (Fernandez & Waters, 2019; Jenal et al., 2017; Pérez-Mendoza et al., 2014). Sin embargo, dos de los fenotipos más ampliamente estudiados y relacionados con este segundo mensajero, son la movilidad bacteriana y la formación de biopelícula. Estas actividades, que se contraponen, son dependientes de la concentración intracelular del di-GMPc (**Fig. 1**). Niveles bajos de esta molécula favorecen el estado móvil o sésil de la bacteria; mientras que el incremento de este mensajero conlleva a un aumento en la expresión de genes relacionados con la síntesis de exopolisacáridos y adhesinas, así como en la alteración de la rotación flagelar, lo que desemboca en la formación de biopelícula. Un claro ejemplo de lo descrito

anteriormente es lo observado en *Vibrio cholerae*, donde el incremento en el di-GMPc promueve la pérdida de la actividad flagelar, mientras que favorece la producción de exopolisacáridos y la subsecuente producción de biopelícula (Bhasme et al., 2020; Chouhan et al., 2020; Fernandez & Waters, 2019; Kampf & Stülke, 2017; Nicastro et al., 2020).

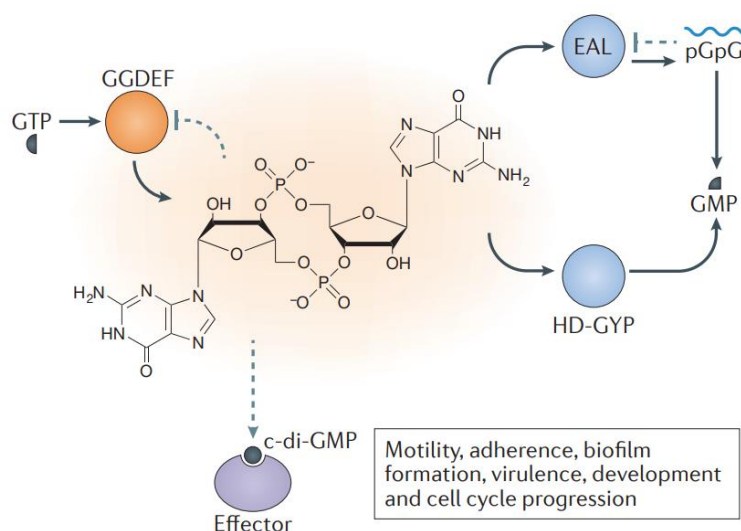


Figura 1. Di-GMPc. Síntesis y degradación del di-GMPc por enzimas específicas. Este segundo mensajero tiene la capacidad regular distintas actividades fisiológicas bacterianas mediante su interacción con proteínas efectoras. Tomado de Jenal et al., 2017.

Ya que el di-GMPc tiene la capacidad de actuar a nivel transcripcional, post-transcripcional y post-traducciona, es que numerosos grupos de investigación se han abocado al análisis del metabolismo, interacción y regulación que este mensajero puede presentar con diversas moléculas y cómo es que este complejo modifica el estilo de vida en los microorganismos (Pérez-Mendoza et al., 2014).

1.2. Metabolismo del di-GMPc

Debido a la plétora de actividades que son reguladas por el segundo mensajero, di-GMPc, su producción y degradación es mediada por dos clases distintas de enzimas cuya actividad es dependiente de diversas condiciones. El ácido (3'-5')-diguanilil cíclico, guanosín bis-(3'-5') monofosfato dimérico o simplemente di-GMPc, es sintetizado por enzimas con actividad

diguanilato ciclasa (DGC), mientras que su degradación ocurre por acción de proteínas hidrolíticas de tipo fosfodiesterasa (PDE) (Been et al., 2019; Chouhan et al., 2020; Chua et al., 2017; Nicastro et al., 2020).

Las enzimas DGC son las responsables de ciclar dos moléculas de GTP, las cuales se fusionan mediante un enlace fosfodiéster generado por un ataque nucleofílico del grupo 3'-OH de uno de estos nucleótidos estableciendo su unión con el fosfato α de la otra molécula de GTP; este mecanismo conlleva a la liberación de una molécula de pirofosfato en la reacción. Estas proteínas, que funcionan como dímeros, presentan un dominio denominado GGDEF, el cual recibe su nombre por la conservación que presenta esta secuencia, y corresponde al motivo catalítico de estas enzimas (Seshasayee et al., 2010). Los residuos aminoacídicos de glicina, dispuestos en tándem, están involucrados en la unión a GTP, mientras que el resto de los aminoácidos del sitio catalítico son los responsables de coordinar a los iones metálicos, principalmente Mg^{2+} , indispensables para la actividad de la enzima. Existen algunos reportes que han descrito modificaciones en esta secuencia; por ejemplo, algunas proteínas que presentan un motivo GGEEF, el cual es una variación de la secuencia GGDEF del sitio catalítico (Chouhan et al., 2020). En un estudio bioinformático, donde se analizaron cerca de 5000 proteínas con presunta actividad de DGC, se encontró que el 66% de estas presentan un sitio activo con la secuencia GGEEF. De manera similar, se han encontrado proteínas activas que exhiben degeneraciones en la primer glicina del motivo canónico GGDEF, como en el caso de *V. cholerae*, donde una de las DGC codificada en su genoma, presenta un motivo AGDEF, lo que sugiere que la función del primer aminoácido de este sitio no es indispensable para la actividad de la misma (Chouhan et al., 2020; Krol et al., 2020; Kunz & Graumann, 2020; Seshasayee et al., 2010).

Cinco residuos aminoacídicos río arriba al sitio catalítico, se encuentra un motivo conservado con secuencia RxxD. Este sitio, el cual funciona como inhibitorio, se encarga de regular alostéricamente la actividad catalítica de la enzima mediante la interacción con el di-GMPc. Esta inhibición por retroalimentación evita la dimerización de los dominios GGDEF. A pesar del papel que desempeña este motivo, no todas las DGC presentan este sitio inhibitorio, un ejemplo de esto es la proteína XCC4471 de *Xanthomonas campestris*, la cual sintetiza al di-GMPc sin ser inhibida por su producto (Kalia et al., 2013). Este tipo de enzimas son reguladas

por algunos otros mecanismos, usualmente mediados por dominios adicionales fusionados al GGDEF (Been et al., 2019; Fernandez & Waters, 2019; Krol et al., 2020; Valentini & Filloux, 2016).

Contrario a la síntesis, la degradación del di-GMPc es efectuada por enzimas con actividad PDE. Estas proteínas pueden presentar motivos EAL o HD-GYP en su estructura. El primero de ellos hidroliza al segundo mensajero produciendo una molécula lineal, 5'-fosfoguanilil-(3'-5')-guanósín (pGpG), la cual posteriormente es degradada a dos moléculas de GMP por acción de la ribonucleasa Orn. Mientras que el segundo motivo, HD-GYP, degrada al di-GMPc en dos moléculas de GMP. Las enzimas que presentan el motivo EAL requieren de cofactores como el Mg^{2+} o Mn^{2+} para llevar a cabo su actividad, mientras que iones como el Ca^{2+} o Zn^{2+} inhiben su actividad (Ahmad et al., 2020; Bhasme et al., 2020; Chen et al., 2021).

Existe un tercer tipo de proteínas denominadas como híbridas, las cuales cuentan dentro de su estructura con un dominio GGDEF fusionado a un dominio EAL o viceversa (Valentini & Filloux, 2016).

Usualmente los dominios GGDEF y EAL están fusionados en su extremo N-terminal a otros dominios implicados en la transducción de señales o detección de las condiciones en las que se desarrolla el microorganismo, lo cual propicia o inhibe la actividad DGC o PDE de los dominios previamente descritos, conllevando a la modulación de la concentración intracelular del di-GMPc dependiendo de estímulos específicos. Entre estas señales o estímulos se pueden incluir al oxígeno, luz, óxido nítrico, metales, fitohormonas, nucleótidos, nutrientes o superficies de contacto (Jenal et al., 2017; Schumacher et al., 2021). Todas estas señales son detectadas por dominios accesorios como los transmembranales, PAS/PAC, GAF, CACHE, CHASE, MASE, BLUF, GAPES, REC, los cuales ligan y acoplan numerosas moléculas y señales intra y extracelulares que convergen en la regulación de la compleja señalización mediada por el di-GMPc (Ahmad et al., 2020; Chen et al., 2021; Hengge, 2016; Kalia et al., 2013; Sisti et al., 2013).

Los dominios REC, son conocidos por formar parte de los denominados sistemas de dos componentes. Estos cumplen con un papel como receptor de la fosforilación mediada por proteínas con actividad de cinasa histidínica (Krol et al., 2020).

El primer ejemplo de proteína DGC acoplado a un dominio REC fue el de PleD de *Caulobacter crescentus*, la cual cuenta con tres dominios en su estructura: REC1, REC2 y GGDEF. Los primeros dos dominios son los encargados de modular la actividad DGC de la proteína (Been et al., 2019). Otro ejemplo de DGC con dominio REC acoplado en su estructura es WspR de *P. aeruginosa*. De la misma manera que PleD, la activación del dominio GGDEF en WspR se desencadena posterior a la fosforilación de un ácido aspártico localizado en el dominio REC de esta proteína. Esta fosforilación favorece la dimerización de estas proteínas, lo que provoca la síntesis del di-GMPc (Been et al., 2019; Jenal et al., 2017; Kalia et al., 2013).

Al analizar diversos genomas bacterianos de manera *in silico*, se ha demostrado la presencia de un amplio número de genes que codifican para proteínas con actividad DGC o PDE y que este número varía entre géneros y especies bacterianas. Esta redundancia proteica le confiere al microorganismo la capacidad de responder de manera rápida y efectiva hacia determinados estímulos mediante la interacción del di-GMPc con diversos efectores (Chua et al., 2017; Hengge, 2016; Nicastro et al., 2020; Pérez-Mendoza et al., 2014).

En bacterias patógenas para el ser humano como *P. aeruginosa* PAO1, se han reportado 40 genes que codifican para proteínas implicadas en el metabolismo del di-GMPc: 16 de dominio único GGDEF, 16 proteínas híbridas, 8 con probable actividad PDE que se dividen en 5 con dominio EAL y 3 con HD-GYP (Bhasme et al., 2020; Maunders & Welch, 2017). Mientras que en *Escherichia coli* K-12 se han anotado 12 genes que codifican para probables DGC y 13 para proteínas PDE (Hengge, 2016). Otro ejemplo consiste en el patógeno *Bordetella bronchiseptica* RB50, cuyo genoma codifica 4 probables proteínas con dominio EAL, 10 con dominio GGDEF y 5 proteínas híbridas (Sisti et al., 2013).

En el caso de rizobacterias, se han analizado algunos genomas, como el de *Sinorhizobium meliloti* Rm2011 el cual codifica para 18 proteínas implicadas en el metabolismo del di-GMPc, de las cuales 6 presentan un dominio único GGDEF (Schäper et al., 2016). Otros organismos evaluados como *S. meliloti* y *Bradyrhizobium japonicum*, tienen 21 y 51 proteínas relacionadas con este nucleótido, respectivamente (S. Gao et al., 2014). En el caso de la bacteria *Azospirillum baldariorum* Sp245 se han reportado 20 genes relacionados con proteínas de dominio GGDEF, 5 con EAL y 10 proteínas híbridas (Ramírez-Mata et al.,

2018). Estos datos permiten hipotetizar que el número de proteínas de tipo DGC y PDE codificadas en los genomas bacterianos, responden a la alta competencia presentada en los ambientes donde se desarrollan estos microorganismos, como la rizósfera (S. Gao et al., 2014; Krol et al., 2020).

Es interesante el número amplio de enzimas DGC y PDE presentes en los diversos microorganismos. Con la finalidad de elucidar el porqué de esta redundancia proteica, se han realizado distintas investigaciones. En una de ellos, tras analizar cepas mutantes de *P. aeruginosa*, se llega a la conclusión de que, a pesar de presentar dos DGC distintas que controlan fenotipos similares en esta bacteria, el comportamiento bacteriano varía entre ellas a pesar de que la concentración intracelular del di-GMPc presenta niveles muy similares (Nicastro et al., 2020). Por otra parte, al realizar la sobreexpresión de genes que codifican para DGCs en el mismo modelo, se llega a la conclusión que no todos los genes tienen la misma relevancia, dado que las cepas mutantes en algunos de estos presentan fenotipos más marcados en comparación con otros. Esto podría ser explicado si las distintas DGC presentaran localizaciones diferentes, por lo que la producción de este segundo mensajero podría ser en zonas localizadas lo que conllevaría a diferentes fenotipos. De la misma forma, estas DGC podrían estar siendo reguladas por otros factores, además de que la cascada de regulación que desencadenan podría ser más compleja de lo que aparenta (Ahmad et al., 2020; Bhasme et al., 2020).

Se ha demostrado que fenotipos específicos son regulados por la acción de determinadas enzimas; se ha propuesto que esta regulación se encuentra relacionada con la localización espacial y temporal de cada una de las DGC o PDE, permitiendo así la creación de pozas subcelulares del di-GMPc, las cuales se encuentran próximas a efectores específicos. Esta compartimentalización del segundo mensajero agrega un nivel más a la compleja regulación de esta molécula (Nicastro et al., 2020; Pérez-Mendoza et al., 2014).

1.3. Efectores del di-GMPc

Debido al vasto número de proteínas DGC o PDE codificadas en los distintos genomas bacterianos, así como a las señales que responden cada uno de ellos, se ha establecido que estas enzimas conforman una compleja red de señalización la cual inicia con la detección de

un estímulo y culmina con la respuesta a éste. Basado en múltiples reportes, se ha establecido que el di-GMPc sintetizado por la activación de enzimas determinadas, interacciona con efectores específicos. Entre estos destacan proteínas que contienen dominios PilZ, reguladores transcripcionales, riboswitches y proteínas con dominios GGDEF y EAL degenerados (**Fig. 2**) (Jenal et al., 2017).

Las proteínas con dominios PilZ tienen la capacidad de formar un complejo con el di-GMPc mediante la interacción del nucleótido con los motivos RxxxR y/o (D/N)x(S/A)xxG presentes en estos dominios. Este dominio puede hallarse formando parte de proteínas multidominio o, bien, en aquellas con un solo dominio. Entre los primeros efectores con el dominio PilZ destacan Alg44 y YcgR, reportados en *P. aeruginosa* y *E. coli*, respectivamente. Mientras que Alg44 está relacionado con la síntesis de alginato, YcgR regula la movilidad bacteriana tras unir al di-GMP a su estructura. Este complejo, YcgR/di-GMPc, interacciona con el motor flagelar alterando el torque del flagelo (Krol et al., 2020; Kunz & Graumann, 2020; K. Paul et al., 2010).

En el caso de los factores transcripcionales dependientes del di-GMPc, se ha reportado que estos pueden regular la expresión de genes implicados en la síntesis del flagelo, así como de exopolisacáridos y factores de virulencia. VpsT y FleQ son reguladores transcripcionales de *V. cholerae* y *P. aeruginosa*, respectivamente, los cuales están implicados en la movilidad y formación de biopelícula (Hengge, 2016; Kunz & Graumann, 2020).

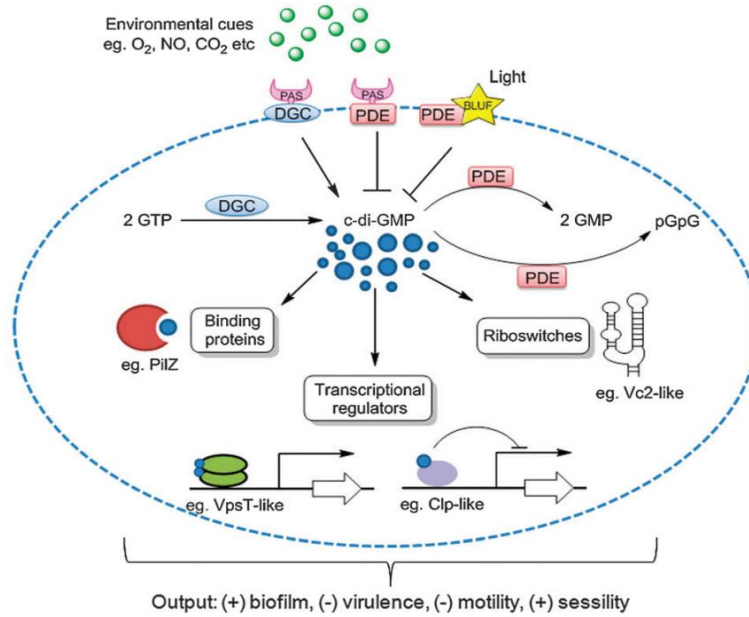


Figura 2. Regulación por el di-GMPc. El metabolismo del di-GMPc está dado por la acción de enzimas DGC o PDE, las cuales responden a estímulos extra e intracelulares detectados por dominios accesorios a estas enzimas. La regulación efectuada por este segundo mensajero puede ocurrir a niveles transcripcionales, post-transcripcionales y post-traduccionales mediante su interacción con diversos efectores. Tomado de Kalia et al., 2013.

Los riboswitches son secuencias no codificantes ubicadas en los extremos 5' de ARN mensajeros de genes que codifican para proteínas implicadas en el metabolismo del di-GMPc o reguladas por éste. La unión del nucleótido a estas estructuras conlleva a una modificación en la conformación tridimensional del riboswitch, lo que favorece o reprime la expresión de genes que se encuentran río abajo de estas estructuras (Hengge, 2016; Kunz & Graumann, 2020).

Finalmente, las proteínas que presentan dominios GGDEF y EAL degenerados puede unir al di-GMPc a pesar de no presentar actividad catalítica (Hengge, 2016).

1.4. di-GMPc y biopelícula

Previamente se ha mencionado el papel desempeñado por el di-GMPc en la regulación del comportamiento bacteriano. Una concentración intracelular baja de esta molécula promueve la expresión de genes relacionados con la formación del flagelo y el movimiento mediado

por este apéndice; mientras que niveles elevados de este segundo mensajero favorecen la adherencia del microorganismo hacia superficies bióticas o abióticas, la síntesis de exopolisacáridos y la subsiguiente formación de biopelícula (Chua et al., 2017; Seshasayee et al., 2010).

La biopelícula es una comunidad o agregado bacteriano densamente poblado, adherida a una superficie y la cual se encuentra embebida en una matriz auto-producida de sustancias poliméricas extracelulares (SPE). Entre estas destacan los exopolisacáridos, proteínas, ADN extracelular (ADNe), lípidos y moléculas pequeñas. Además de esta matriz, algunas estructuras como el flagelo, pili tipo IV, adhesinas y la cápsula bacteriana le confieren adhesión y rigidez a la estructura. Este estilo de vida le proporciona a la comunidad protección contra condiciones adversas, como la presencia de antibióticos, desecación, radiación, ataque de bacteriófagos, etcétera (**Fig. 3**) (Andersen et al., 2021; Bhasme et al., 2020; Duan et al., 2021; Flemming & Wingender, 2010; Hengge, 2016; Li et al., 2021; Nadell et al., 2016; Poulin & Kuperman, 2021; Shang et al., 2021; Vasicek et al., 2021; Wan et al., 2021).

La formación de biopelícula es un proceso complejo y secuencial en el cual influyen múltiples factores como el nivel intracelular del di-GMPc, y cuya formación variará entre distintas especies bacterianas (Poulin & Kuperman, 2021; Shang et al., 2021).

Este proceso sigue un orden secuencial el cual inicia con la adhesión bacteriana, seguida de una multiplicación de los microorganismos que conlleva a la formación de microcolonias, las cuales maduran formando estructuras tridimensionales y concluye con la dispersión bacteriana (Chouhan et al., 2020; Fernandez & Waters, 2019).

La formación de microcolonias propicia la reducción de la movilidad celular, así como la expresión de genes de virulencia. Conforme la biopelícula se desarrolla, las microcolonias crecen formando macrocolonias. Esta etapa es caracterizada por la producción y secreción de una gran cantidad de sustancias poliméricas extracelulares. En el caso de *P. aeruginosa*, entre estas SPE destacan exopolisacáridos como Pel, Psl y alginato. Si el flujo de nutrientes persiste, estas estructuras continúan su desarrollo hasta dar lugar a la formación de estructuras tridimensional de tipo “hongo”. Sin embargo, y si las condiciones no son favorables, estas

células pueden revertir su fenotipo, desprenderse de la biopelícula y movilizarse hacia un nuevo nicho (Maunder & Welch, 2017).

La dispersión celular se origina en respuesta a cambios en las condiciones ambientales en las que se desarrolla la biopelícula. Entre estas destacan la disminución en el suministro de nutrientes, limitaciones en el oxígeno disuelto en la comunidad, así como la presencia de moléculas que favorecen la dispersión, como el óxido nítrico (Nair et al., 2021).

Estas células, recién desprendidas de la biopelícula, presentan una concentración intracelular de di-GMPc distinta en comparación con las células planctónicas y sésiles, por lo que se sugiere cuentan también con una fisiología distinta a las bacterias que están conformando a la biopelícula (Chua et al., 2017). Se ha estimado que las células de *P. aeruginosa* que se encuentran en formación de biopelícula presentan una concentración intracelular de di-GMPc de 75-110 pmol/mg del extracto celular; mientras que las bacterias en estado planctónico contienen menos de 30 pmol/mg de este segundo mensajero (Valentini & Filloux, 2016).

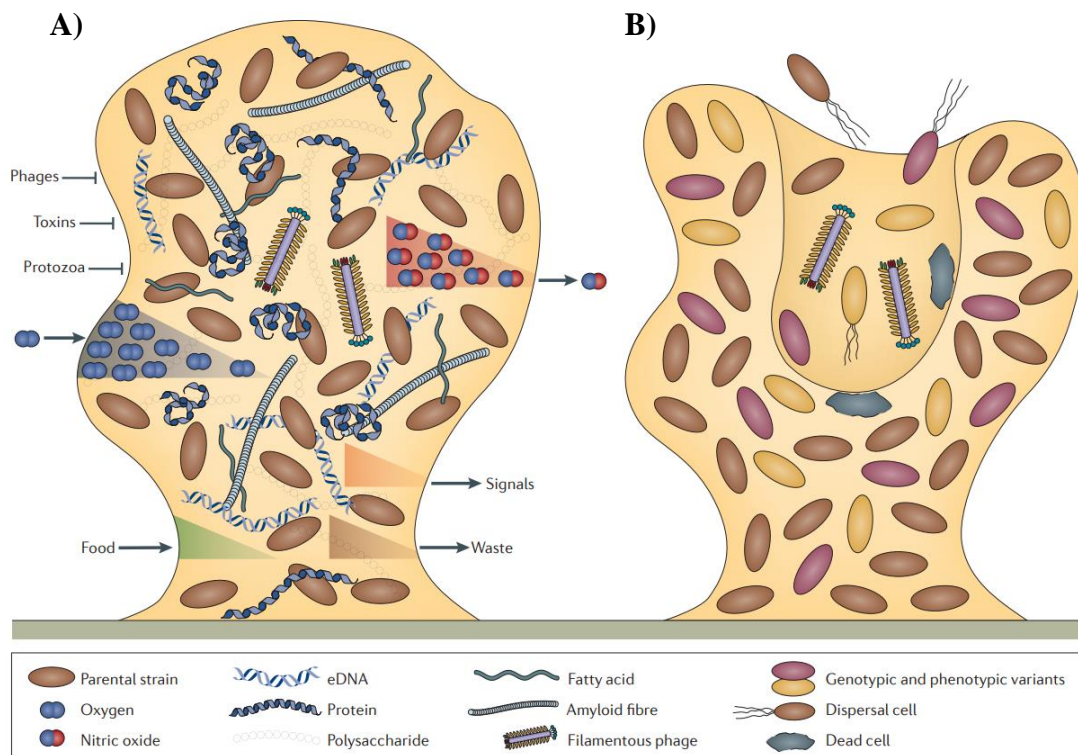


Figura 3. Biopelícula. A) La biopelícula consiste en una comunidad bacteriana embebida en una matriz autoproducta compuesta por sustancias poliméricas extracelulares. Esta estructura compleja provee de protección y nutrientes a la comunidad. B) Las distintas generaciones derivadas de las cepas fundadoras de la biopelícula, así la interacción con otros miembros de la comunidad genera la aparición de células con diversos genotipos y morfotipos. Tomado de Hengge, 2016.

De manera similar se ha descrito que las células que se encuentran formando parte de la biopelícula presentan fenotipos distintos, así como una expresión diferencial de genes con respecto a las células móviles. Al analizar la biopelícula generada por *P. aeruginosa*, se observa la presencia de algunas variaciones morfológicas de los miembros de esta comunidad. Al aislar y analizar los genomas y transcriptomas de individuos con distintos morfotipos, se descubre que estos presentan mutaciones en genes relacionados con la formación de biopelícula; igualmente se reporta que estos morfotipos contienen una concentración superior de di-GMPc en comparación con la cepa silvestre (Duan et al., 2021; Nair et al., 2021).

1.5. di-GMPc y sustancias poliméricas extracelulares

La biopelícula se encuentra inmersa en una matriz conformada por sustancias poliméricas extracelulares. Debido a las características fisicoquímicas de estas moléculas, esta matriz le confiere a la comunidad protección hacia condiciones de estrés, además de favorecer la interacción célula-célula. Este comportamiento cooperativo beneficia a la población, ya que las enzimas digestivas, adhesinas de superficie, moléculas señal, polímeros estructurales y demás compuestos sintetizados por algunos miembros de la comunidad son empleados por todos los microorganismos presentes en la biopelícula. Además de esto, la unión célula-célula favorece la transferencia horizontal de material genético entre las células involucradas, propiciando la aparición de nuevos genotipos y morfotipos en la comunidad (Nadell et al., 2016).

Entre los componentes de la matriz extracelular destacan tres biomoléculas: los exopolisacáridos, las proteínas y el ADNe. El porcentaje y composición de estas sustancias poliméricas dependerá de la especie y género bacteriano presente en la biopelícula, así como factores ambientales, la presencia de nutrientes en el medio en donde se desarrolle la comunidad y la fase de desarrollo de la biopelícula (Poulin & Kuperman, 2021).

Los polímeros más abundantes en las biopelículas son los exopolisacáridos. En diversos géneros bacterianos como *Yersinia*, *Salmonella* y *Pseudomonas*, se ha descrito que la síntesis y secreción de estas moléculas se encuentra regulada por la acción de las enzimas con

actividad diguanilato ciclasa y la concentración intracelular del di-GMPc (Chouhan et al., 2020).

Debido a su importancia médica, la bacteria *P. aeruginosa* ha sido empleada en numerosas investigaciones con la finalidad de revelar la composición química de los exopolisacáridos producidos por este microorganismo. La matriz de la biopelícula de este patógeno se encuentra conformada por, al menos, tres tipos distintos de exopolisacáridos: alginato, Pel y Psl. El alginato fue el primer exopolisacárido reportado de *P. aeruginosa*; este consta de unidades de ácido β -D-manurónico unidas a unidades de ácido α -L-gulurónico mediante enlaces β -1,4. El segundo exopolisacárido, Pel, fue denominado de esta manera debido a la presencia de este polímero en películas, comunidades bacterianas que se desarrollan en la interfase líquido-aire. Originalmente se había reportado que Pel se encontraba compuesto por unidades repetidas de glucosa, de manera similar a la celulosa, sin embargo, análisis recientes lo describen compuesto por unidades repetidas de N-acetilgalactosamina y N-acetilglucosamina. Este polisacárido interfiere en la adhesión celular y también interacciona con el ADNe con la finalidad de proveerle una estructura más sólida a la biopelícula. El tercer exopolisacárido, Psl, consiste en unidades repetidas de D-manosa-D-glucosa-L-ramnosa, el cual funciona como una especie de armazón encargado de mediar la unión célula-célula durante las primeras etapas de la formación de la biopelícula (Bhasme et al., 2020; Maunders & Welch, 2017; Poulin & Kuperman, 2021; Shang et al., 2021).

Además de los exopolisacáridos mencionados anteriormente, existen algunos otros que también forman parte de las biopelículas, como el PNAG y la celulosa. El poli-N-acetilglucosamina (PNAG), es un polímero lineal conformado por residuos de N-acetilglucosamina unidos entre ellos por enlaces glicosídicos β -1,6; mientras que la celulosa consiste en monómeros de glucosa asociados entre sí por enlaces β -1,4 (Poulin & Kuperman, 2021).

1.6. Técnicas para evaluar el metabolismo del di-GMPc

Debido a la importancia del segundo mensajero en la regulación de distintos procesos bioquímicos y fisiológicos en los microorganismos, se han diseñado y empleado diversas

técnicas con la finalidad de establecer la función de genes que codifican para proteínas DGC/PDE con la fluctuación en la concentración intracelular del di-GMPc para relacionar esto con la modificación en el comportamiento de la bacteria evaluada. Distintos grupos de investigación plantean los ensayos a realizar con base en datos bioinformáticos, con los cuales se pueden elucidar las condiciones en las cuales estas enzimas pudiesen estar siendo activadas o inhibidas, así como la presencia de cofactores o ligandos requeridos por éstas.

Una de las metodologías más empleadas para determinar la función de una proteína implicada en el metabolismo del di-GMPc consiste en la mutación o sobreexpresión del gen por el que es codificada. La cepa resultante es empleada en diversos ensayos que determinan, de manera indirecta, la fluctuación en el nivel intracelular de este segundo mensajero (Bhasme et al., 2020). Debido a que la formación de biopelícula y la movilidad bacteriana son los fenotipos más comúnmente regulados por el di-GMPc, la determinación de estos se emplea para evaluar la oscilación intracelular de esta molécula. Estos ensayos suelen ir acompañados del análisis del morfotipo de las cepas en estudio. Para esto se emplea al colorante rojo Congo (RC), el cual presenta afinidad hacia los β -glucanos presentes en algunos exopolisacáridos. Al adicionar RC al medio de cultivo donde se inoculan las cepas, se puede determinar el morfotipo rdar (denominado así por el inglés red, dry, and rough) el cual es generado por la presencia de celulosa y estructuras de tipo curli amiloideas que son secretadas por la bacteria en respuesta al incremento intracelular del di-GMPc (Ahmad et al., 2020; Chouhan et al., 2020).

Otra de las estrategias empleadas consiste en la expresión de proteínas DGC o PDE en algún modelo heterólogo que presente de manera natural, niveles intracelulares bajos del di-GMPc. Uno de los modelos más ampliamente empleado es *E. coli*. Posterior a la expresión de la proteína deseada, la cepa resultante es sometida a la evaluación de fenotipos relacionados con este segundo mensajero (Bhasme et al., 2020; Fernandez & Waters, 2019). Adicional a esto, en años recientes se ha incrementado la determinación directa del di-GMPc mediante la extracción y cuantificación de este nucleótido empleado técnicas de cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS) (Bhasme et al., 2020).

En años recientes, y aprovechando la capacidad del di-GMPc para interactuar con diversas moléculas, se ha incrementado el uso de biosensores con la finalidad de analizar las

oscilaciones intracelulares de este nucleótido. Estas estrategias se basan en riboswitches ligados a genes reporteros, los cuales usualmente corresponden a proteínas fluorescentes. Al aumentar la tasa de producción del di-GMPc, este se une a la estructura del riboswitch, favoreciendo la expresión de los genes que se localizan río debajo de esta estructura no codificante, por lo que la actividad de estos reporteros puede relacionarse directamente con la cantidad de di-GMPc presente en la célula. El empleo de esta metodología conlleva ciertas ventajas, entre las que destaca la semi-cuantificación en tiempo real de la producción del nucleótido (Martínez-Méndez et al., 2021; Zhou et al., 2016).

1.7. di-GMPc en rizobacterias

Las proteínas implicadas en la síntesis y degradación del di-GMPc, así como los diversos efectores dependientes de este segundo mensajero, han sido ampliamente evaluados en microorganismos patógenos para el ser humano. Diversos trabajos han conseguido elucidar algunos mecanismos de regulación del di-GMPc en microorganismos pertenecientes a diversos géneros bacterianos, entre los que destacan *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Vibrio* y *Salmonella* (Hengge, 2016; Lacanna et al., 2016; Ryjenkov et al., 2006; Sisti et al., 2013; Zamorano-Sánchez et al., 2019). Sin embargo, y a pesar del incremento de reportes, la investigación del di-GMPc y su vínculo con el comportamiento de bacterias asociadas a plantas es incipiente.

La movilidad y quimiotaxis, producción y secreción de exopolisacáridos y adhesinas que originan la formación de biopelícula, son mecanismos en común entre las bacterias asociadas al humano y las bacterias que interactúan con organismos vegetales, ya sea en relaciones mutualistas o patógenas (Pérez-Mendoza et al., 2014).

Una de las respuestas celulares dependientes del di-GMPc con mayor relevancia en la interacción bacteria-planta es la formación de biopelícula. Los microorganismos tienden a formar estas estructuras en la superficie de las raíces de plantas con la finalidad de prolongar su asociación a éstas, la cual puede ser benéfica o patógena. En el caso de las bacterias diazotróficas, la formación de biopelícula es un proceso fundamental para determinar su éxito en la fijación biológica de nitrógeno, ya que les facilita su adaptación fisiológica y

metabólica, además de favorecer su supervivencia en un ambiente que presenta condiciones fluctuantes como la rizósfera. Comparaciones entre bacterias fijadoras y no fijadoras de nitrógeno como *E. coli*, han determinado que aquellas diazotróficas producen biopelículas con mayor población, así como metabólicamente más activas (Shang et al., 2021).

En otros ejemplos de rizobacterias, se ha descrito la presencia de múltiples exopolisacáridos en biopelículas producidas por microorganismos pertenecientes a los géneros *Rhizobium*, *Gluconacetobacter* y *Azospirillum*. En el caso de rizobias como *R. etli* CFN42 y *R. leguminosarum* bv. *viciae* UPM791, al incrementar el di-GMPc, mediante la expresión de una DGC previamente reportada como PleD de *C. crescentus*, estas aumentaron la producción de exopolisacáridos, así como también se presentó un incremento en la unión de la matriz exopolimérica de la biopelícula hacia compuestos como el rojo Congo y el calcoflúor, lo cual es un indicativo de la síntesis de exopolisacáridos, principalmente celulosa (Pérez-Mendoza et al., 2014). Este comportamiento favoreció la adhesión de estas rizobias hacia raíces de frijol y arveja, concluyendo que el di-GMPc es un elemento que propicia la colonización de las bacterias a superficies bióticas. Por otra parte, en el caso específico de *A. brasilense* Sp7, se han reportado dos reguladores transcripcionales, TyrR y FlcA, los cuales están implicados en la regulación transcripcional de la producción de biopelícula mediante la síntesis de polisacáridos capsulares de la bacteria (Jijón-Moreno et al., 2019; Krol et al., 2020; Shang et al., 2021).

Con respecto a bacterias patógenas de plantas, el incremento en la concentración intracelular de di-GMPc favorece la producción de alginato en algunas cepas del género *Pseudomonas*, como *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 y *P. syringae* pv. *phaseolicola* 1448. Este exopolisacárido es de gran relevancia, dado que es importante para la colonización y adherencia bacteriana hacia superficies. Otros ejemplos de patógenos vegetales incluyen a *Dickeya dadantii* y *X. campestris*. En la primera, la producción de enzimas líticas de la pared vegetal depende de niveles intracelulares bajos del di-GMPc; mientras que, en la segunda, concentraciones elevadas de este segundo mensajero reprimen la virulencia de la bacteria (Krol et al., 2020; Pérez-Mendoza et al., 2014).

1.8. *Azospirillum*

El género *Azospirillum*, miembro de la familia *Rhodospirillaceae* y la clase alfa-proteobacteria, comprende a bacterias Gram-negativas, microaerofílicas, pleomórficas y diazótroficas de vida libre. Los microorganismos de este género presentan una morfología de tipo vibroide la cual es propulsada por un flagelo polar que se expresa cuando el microorganismo se desarrolla en medio líquido; mientras que en un medio semi-sólido es notable la presencia de múltiples flagelos peritricos. Estos órganos de locomoción favorecen la atracción y migración de la bacteria hacia diversos quimioattractantes entre los que destacan ácidos orgánicos, azúcares, alcoholes y aminoácidos, los cuales son secretados por las raíces de diversas especies vegetales. Cuando la bacteria es sometida a condiciones de estrés como desecación, radiación, cambios osmóticos o periodos de inanición, ésta modifica su morfología formando estructuras ovales recubiertas por exopolisacáridos. Estos morfotipos, denominados quistes, son menos móviles en comparación con su contraparte vibroide, además que producen y almacenan gránulos de poli- β -hidroxibutirato en su citoplasma, los cuales pueden ser metabolizados proveyéndole a la bacteria de una fuente de carbono (Bible et al., 2015; Hong et al., 2019; Lerner et al., 2009; Malinich & Bauer, 2018; Tikhonova et al., 2019).

Este género bacteriano presenta una amplia distribución, ya que sus distintos miembros han sido aislados de diferentes latitudes y regiones del mundo. Su presencia se ha constatado en zonas con clima tropical, subtropical y templado, además que pueden presentarse en la rizósfera asociadas con distintas especies vegetales, también en fermentadores, suelos contaminados con hidrocarburos, superficies salinas, aguas termales y algunos otros sitios más (Tikhonova et al., 2019; Toffoli et al., 2021; Zhao et al., 2020).

A la fecha se han reportado al menos 21 especies que conforman al género *Azospirillum*; de estas, *A. brasilense* y *A. lipoferum* son las más estudiadas. Se ha descrito que *A. brasilense* tienen la capacidad de asociarse con raíces de plantas de importancia agrícola, entre las que destacan el maíz, sorgo, trigo, arroz y algunas otras especies vegetales. Debido a que la bacteria puede establecer esta asociación mutualista, este microorganismo se ha clasificado como una rizobacteria promotora del crecimiento vegetal (del inglés Plant Growth-

Promoting Rhizobacteria) (Kukolj et al., 2020; Lerner et al., 2009; Tikhonova et al., 2019; Zhao et al., 2020).

Como su nombre lo indica, las PGPR tienen la capacidad de interactuar con especies vegetales y activar diversas respuestas bioquímicas y fisiológicas que favorecen su crecimiento e incrementan su producción. Este efecto benéfico es generado de manera directa e indirecta. Los mecanismos directos incluyen el suministro a la planta de bioelementos como el nitrógeno y fósforo, la inducción del crecimiento del sistema radicular el cual propicia un incremento en la adquisición de nutrientes y minerales por parte de la planta; mientras que de manera indirecta las PGPR fomentan la producción de compuestos antimicrobianos así como la activación de la respuesta inmune de la planta hacia organismos patógenos inhibiendo la proliferación de estos. Adicional a ello, se ha descrito que la presencia y acción de estos microorganismos modula diversos mecanismos moleculares y bioquímicos de la planta, los cuales desembocan en una alteración en la síntesis de metabolitos secundarios por parte de la especie vegetal (de Almeida et al., 2021; Fukami et al., 2018; Gualpa et al., 2019; Housh et al., 2021; Kolega et al., 2020).

En el caso concreto del género *Azospirillum*, este propicia el desarrollo de diversas especies vegetales mediante la producción de fitohormonas como el ácido abscísico, giberelinas y el ácido indol-3-acético; ésta última propicia una modificación del sistema radicular de la planta, favoreciendo el desarrollo de raíces laterales, así como el incremento de pelos radiculares mientras que disminuyen la longitud y grosor de la raíz principal, lo que conlleva a una mayor captación de agua y nutrientes. Agregado a esto, también se incrementa la tolerancia vegetal hacia condiciones de estrés (Cesari et al., 2020; Cortés-Patiño et al., 2021; García et al., 2020; Housh et al., 2021; Koul et al., 2020; Mariotti et al., 2021; Méndez-Gómez et al., 2021).

Para que estas bacterias promuevan el crecimiento vegetal es necesaria su movilización a las raíces de las plantas para posteriormente adherirse a éstas y comenzar su reproducción. Cuando se forman las colonias bacterianas, los microorganismos tienden a excretar polisacáridos con la finalidad de formar una biopelícula, la cual les confiere protección frente a condiciones ambientales adversas prologando de esta manera la interacción bacteria-planta, con los beneficios que esta asociación aporta a cada uno de los organismos.

Actividades como la movilidad o la formación de biopelícula se encuentran reguladas por la concentración intracelular de un segundo mensajero, el bis-(3'-5') guanosín monofosfato cíclico (di-GMPc). Éste es un dinucleótido cíclico que no sólo se encuentra inmiscuido en las actividades anteriormente mencionadas, también se ha reportado su función en el ciclo celular, virulencia, respuesta a condiciones de estrés, etcétera (**Fig. 4**).

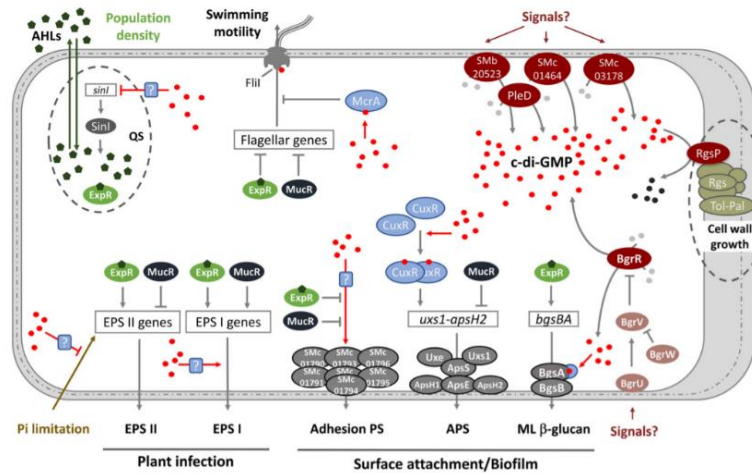


Figura 4. Fenotipos regulados por el di-GMPc. Esquemización de la compleja red involucrada en detección de señales y respuestas hacia estas en la rizobacteria *Sinorhizobium meliloti*. En la figura se incluyen ejemplos de DGC/PDE y efectores que median actividades celulares específicas. Tomado de Krol et al., 2020.

1.9. Proteínas NUDIX

Las enzimas denominadas como NUDIX, se encuentran distribuidas en organismos eucariotes, procariotes e inclusive virus. MutT fue la primer proteína NUDIX descrita y, debido a su capacidad de hidrolizar al 8-oxo-dGTP, se estableció que estas enzimas llevaban a cabo una función de “descontaminación”, eliminando nucleótidos oxidados los cuales pudiesen insertarse en la cadena de ADN generando efectos deletéreos (Drabinska et al., 2020; Treffers et al., 1954).

Estas proteínas NUDIX, cuyos tamaños rondan los 16-35 kDa, forman parte de una super familia de hidrolasas que presentan afinidad hacia compuestos que presentan una estructura de tipo nucleótido difosfato enlazado a una entidad X (NDP-X), razón por la cual fueron denominadas de esta manera (**N**ucleósido **d**ifosfato unido a un motivo **X**) (Bessman, 2019;

Foley et al., 2015). Estas enzimas presentan un motivo conservado de 23 aminoácidos, G[5X]E[7X]REUXEEEXGU, donde U representa a un residuo hidrofóbico como isoleucina, leucina o valina, mientras que la X hace referencia a cualquier aminoácido. Este motivo, denominado como caja NUDIX, se encuentra localizado en una estructura de tipo bucle-hélice-bucle la cual forma parte de un plegamiento característico $\alpha/\beta/\alpha$. Dentro del núcleo de este motivo, con secuencia REUXEE, el papel de los ácidos glutámicos es de gran relevancia, dado que estos residuos son los responsables de la unión de iones metálicos (usualmente Mg^{2+} o Mn^{2+}), los cuales son importantes para conferirle actividad pirofosfatasa a estas proteínas. Dado que esta caja NUDIX se encuentra involucrada en la coordinación de los cofactores, diversos grupos de investigación se enfocaron en la búsqueda de los motivos implicados en el reconocimiento e interacción de los distintos sustratos hacia los cuales presentan afinidad estas proteínas; los resultados de estas investigaciones demostraron que regiones río arriba o río debajo de la caja NUDIX son las responsables de conferirle afinidad hacia determinado sustrato y, por lo tanto, la presencia de éstas funcionan como un parámetro para clasificar a estas enzimas en diversas subfamilias (De La Peña et al., 2015; Drabinska et al., 2020; Duong-Ly et al., 2013; A. Gao et al., 2021; Kapoor et al., 2019; Kimura et al., 2020; Page et al., 2018; Song et al., 2013; Yoshimura & Shigeoka, 2015).

De acuerdo con diversos reportes, se han encontrado genomas bacterianos que carecen de secuencias codificantes para hidrolasas de este tipo, mientras que en algunos otros microorganismos, como *Deinococcus radiodurans*, se han reportado hasta 25 genes codificantes para proteínas NUDIX; por lo que la presencia y número de estas proteínas codificadas en cada genoma se ha relacionado con el estilo de vida y ambiente en el que se desarrolle el microorganismo (Fisher et al., 2004; Kimura et al., 2020).

A causa de los recientes descubrimientos con respecto a miembros de esta familia de hidrolasas, se estableció una clasificación basada en cuatro clases funcionales: pirofosfohidrolasas, glicosilasas específicas de adenina/guanina, isopentil difosfato isomerasas y proteínas que no presentan actividad catalítica pero que pueden interaccionar con algunas otras proteínas y funcionar como reguladores transcripcionales en respuesta a condiciones de estrés o patogénesis (Drabinska et al., 2020; Srouji et al., 2017).

Ya que el primer sustrato al que se demostró que MutT presentaba afinidad, un nucleótido oxidado, se estableció que estas enzimas eran responsables de eliminar este tipo de moléculas, confiriéndoles una acción de “saneamiento”. Sin embargo, y con base en diversos reportes, se ha descrito que estas enzimas también son responsables de regular las concentraciones intracelulares de moléculas señal, coenzimas, intermediarios metabólicos e inclusive al ARN (Bessman, 2019; Yoshimura & Shigeoka, 2015). Entre los sustratos predilectos de estas proteínas se pueden listar a nucleósidos di- y tri-fosfatos, tanto canónicos como oxidados, dinucleósidos polifosfatados, coenzimas como NAD, NADH, CoA, FAD, tiamina, azúcares nucleotídicas, caperuzas del ARNm, y otras moléculas fosfatadas, como la alarmona (p)ppGpp. Debido a esto, y con base en el sustrato al que presenten mayor afinidad, las distintas enzimas NUDIX han sido clasificadas en diversas subfamilias (Carreras-Puigvert et al., 2017; Dong & Wang, 2016; García-Saura et al., 2019; Kimura et al., 2018, 2020; Nguyen et al., 2016; O’Handley et al., 2001; Srouji et al., 2017).

2. Justificación

El di-GMPc es un segundo mensajero distribuido en múltiples géneros bacterianos. Esta molécula es capaz de regular múltiples actividades celulares entre las que destacan la formación de biopelícula, movilidad, quimiotaxis, ciclo celular y virulencia bacteriana. En el caso de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPRs) se ha descrito que el papel que desempeña el di-GMPc es de vital importancia en la interacción bacteria-planta. A pesar de la relevancia de este mensajero, los reportes de la regulación mediada por éste en la bacteria *A. baldaniorum* Sp245 son escasos, por lo que la información que brinde este trabajo permitirá una mayor comprensión del metabolismo de esta molécula así como la probable asociación que pudiese presentar el di-GMPc con las enzimas de tipo NUDIX, las cuales no han sido descritas en el modelo de estudio.

3. Objetivos

3.1. General

- Analizar la probable participación de los genes *cdgC* y *nudX* en fenotipos regulados por el segundo mensajero, di-GMPc, en la rizobacteria *A. baldaniorum* Sp245.

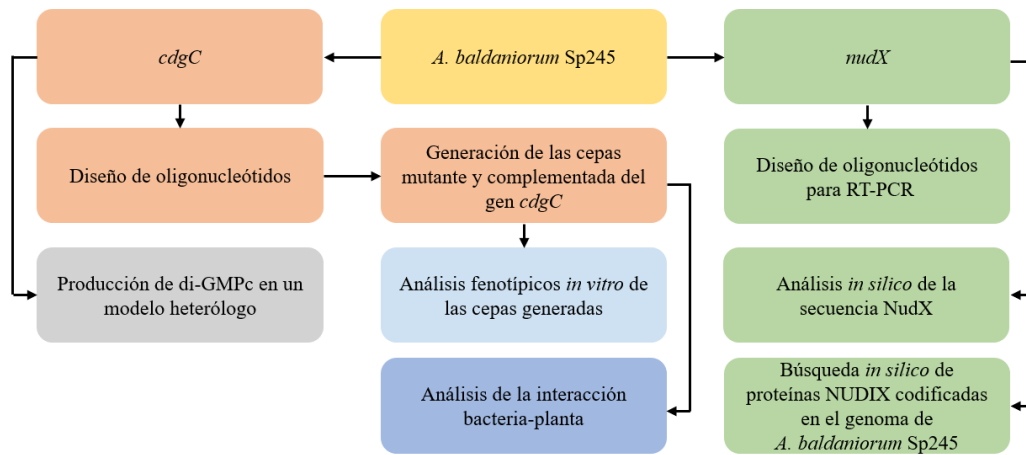
3.2. Específicos

1. Definir si los genes *cdgC* y *nudX* se encuentran formando parte de la misma unidad transcripcional.
2. Analizar *in silico* a las proteínas CdgC y NudX.
3. Generar las cepas mutante y complementada del gen *cdgC* en *A. baldaniorum* Sp245.
4. Evaluar los fenotipos de movilidad, formación de biopelícula y producción de sustancias poliméricas extracelulares empleando las cepas generadas.
5. Examinar la función de la proteína CdgC en la interacción bacteria-planta
6. Determinar la actividad DGC de la secuencia CdgC mediante el empleo de un biosensor en un modelo bacteriano heterólogo.
7. Establecer el número de probables proteínas tipo NUDIX codificadas en el genoma de *A. baldaniorum* Sp245.
8. Clasificar, mediante bioinformática, a las hidrolasas hipotéticas NUDIX de *A. baldaniorum* Sp245 en subfamilias con respecto a su probable sustrato afín.

4. Hipótesis

El gen *cdgC* es importante para establecer una adecuada interacción bacteria-planta, al influir sobre los niveles intracelulares del di-GMPc alterando la movilidad bacteriana, síntesis de sustancias poliméricas extracelulares y formación de biopelícula de la rizobacteria *A. baldaniorum* Sp245.

5. Diagrama de trabajo



6. Materiales y Métodos

6.1. Material Biológico

Tabla 1. Cepas empleadas en este trabajo

Cepa	Características	Referencia
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>F</i> ⁻ <i>endA1 glnV44 th-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG</i> ϕ 80 <i>dlacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169, <i>hsdR17</i> (<i>r_K⁻ m_K⁺</i>), λ	Thermo Fisher Scientific
<i>E. coli</i> S17.1	<i>recA thi pro hdsR4</i> (<i>r_K⁻ m_K⁺</i>) (RP4-2T:: <i>M-Km</i> ::Tn7) <i>Tp^r Sm^R λpir</i>	Simon et al., 1983
<i>E. coli</i> S17.1 pDZ-119 pQE-CdgA	Cepa derivada de <i>E. coli</i> S17.1, contiene el vector pLIL-2 y el biosensor de di-GMPc, pDZ-119	Este trabajo
<i>E. coli</i> S17.1 pDZ-119 pGEX-CdgC	Cepa derivada de <i>E. coli</i> S17.1, contiene el vector pGEX- <i>cdgC</i> y el biosensor de di-GMPc, pDZ-119	Este trabajo
<i>E. coli</i> S17.1 pDZ-119 pGEX	Cepa derivada de <i>E. coli</i> S17.1, contiene el vector pGEX-4T-1 y el biosensor de di-GMPc, pDZ-119	Este trabajo
<i>E. coli</i> S17.1 pDZ-119	Cepa derivada <i>E. coli</i> S17.1, contiene el biosensor de di-GMPc, pDZ-119	Este trabajo
<i>A. baldaniorum</i> Sp245	Cepa silvestre	Baldani et al., 1987
<i>A. baldaniorum</i> 59C	Cepa derivada de <i>A. baldaniorum</i> Sp245 (Δ <i>cdgC</i>)	Este trabajo
<i>A. baldaniorum</i> C21	Cepa derivada de <i>A. baldaniorum</i> 59C complementada en <i>cis</i> con el vector pAZBR- <i>cdgC</i> , Gm ^R	Este trabajo
<i>A. baldaniorum</i> C87	Cepa control derivada de <i>A. baldaniorum</i> 59C con el vector pAZBRT7, Gm ^R	Este trabajo
<i>A. baldaniorum</i> 3A13	Cepa complementada derivada de la mutante <i>A. baldniorum</i> 59C, contiene el vector pJB3- <i>cdgC</i> , Km ^R .	Este trabajo
<i>A. baldaniorum</i> 3D46	Cepa derivada de <i>A. baldniorum</i> 59C, contiene el vector pJB3Tc20	Este trabajo
<i>A. baldaniorum</i> Sp245-GFP	Cepa silvestre de <i>A. baldaniorum</i> Sp245 etiquetada con la eGFP, pMP2444, Gm ^R	Este trabajo
<i>A. baldaniorum</i> 59C-GFP	Cepa <i>A. baldaniorum</i> 59C etiquetada con la eGFP, pMP2444, codificada en el vector pMP2444, Gm ^R	Este trabajo
<i>A. baldaniorum</i> 2A65	Cepa <i>A. baldaniorum</i> 3A13 etiquetada con la eGFP pMP2444, Gm ^R .	Este trabajo
<i>A. baldaniorum</i> 2D8	Cepa control derivada de <i>A. baldaniorum</i> 3D46 etiquetada con la eGFP, codificada en el vector pMP2444, Gm ^R	Este trabajo
<i>A. baldniorum</i> 2449	Cepa silvestre de <i>A. baldaniorum</i> Sp245 etiquetada con la proteína mCherry, pMP2449-5. Gm ^R .	Ramirez-Mata et al., 2018
<i>A. baldaniorum</i> 2450	Cepa <i>A. baldaniorum</i> 59C etiquetada con la eGFP, pMP2450, Km ^R .	Este trabajo

6.2. Vectores

Tabla 2. Vectores utilizados en este trabajo

Vector	Características	Referencia
pGEM-T Easy	<i>F1 ori, ori, Amp^R, lacZα, promotor T7, lac, SP6, Amp^R</i>	Promega
pGEX-4T-1	Vector de expresión, promotor tac, etiqueta GST, Amp ^R	Promega
pLIL-2	Vector de expresión derivado de pQE31. Contiene clonado el gen <i>cdgA</i> de <i>A. brasilense</i> Sp7, Cm ^R , Amp ^R	Ramírez-Mata et al., 2016
pCDR	Vector suicida, <i>sacB</i> , Tc ^R	Cordero-Rivera, 2017
pJB3Tc20	RK2 OriT, Tc ^R , Amp ^R	Blatny et al., 1997
pBBR1MCS-5	Vector derivado de pBBR1MCS, <i>lacZ-α</i> , promotor T7, Gm ^R	Kovach et al., 1994
pAZBR-T7mCh	Vector suicida derivado de pJMS-Km, contiene clonado el gen <i>mCherry</i> , terminador Ω T7, Tc ^R , Gm ^R	Cruz-Pérez et al., 2021
pAZBR-T7-Gm	Vector suicida derivado de pAZBRT7mCh, terminador Ω T7, Tc ^R , Gm ^R	Espino-Aldaba, 2020
pMP2444	Vector de amplio rango de hospedero con la secuencia codificante de la <i>egfp</i> cuya expresión es regulada por el promotor <i>lac</i> , Gm ^R	ClonTech
pMP2449-5	Vector derivado de pMP2444. El gen <i>egfp</i> fue reemplazado por el gen <i>mCherry</i> , Gm ^R	Ramírez-Mata et al., 2018
pDZ-119	Biosensor de di-GMPc, Cm ^R	Martínez-Méndez et al., 2021
pGEM-FrgA	Vector derivado de pGEM-T Easy, contiene clonado un fragmento de 829 pb correspondiente a la región río arriba de la zona a eliminar del gen <i>cdgC</i> , Amp ^R	Este trabajo
pGEM-FrgB	Vector derivado de pGEM-T Easy, contiene clonado un fragmento de 864 pb correspondiente a la región río abajo de la zona a eliminar del gen <i>cdgC</i> , Amp ^R	Este trabajo
pGEM-PcdgC	Vector derivado de pGEM-T Easy, contiene clonado el ORF del gen <i>cdgC</i> , así como su probable región promotora, Amp ^R	Sierra-Cacho, 2017
pGEM-cdgC	Vector derivado de pGEM-T Easy, contiene clonado el ORF del gen <i>cdgC</i> , Amp ^R	Este trabajo
pGEM-Gm	Vector derivado de pGEM-T Easy, contiene clonado un casete de Gm ^R , Amp ^R	Espino-Aldaba, 2020
pGEX-cdgC	Vector derivado de pGEX-4T-1, contiene clonado el ORF del gen <i>cdgC</i> , Amp ^R	Este trabajo
pCDR Δ cdgC	Vector suicida derivado de pCDR <i>cdgC</i> . Originado por la ligación en <i>Xba</i> I de los fragmentos de 829 y 864 pb, Tc ^R .	Este trabajo
pJB3-Km ^R	Vector derivado de pJB3Tc20. El promotor <i>lac</i> y el gen Tc ^R fueron eliminados, insertando un casete de Km ^R .	Sierra-Cacho, 2017

pJB3- <i>cdgC</i>	Derivado de pJB3-Km ^R . Contiene un fragmento de 1089 pb del gen <i>cdgC</i> y su promotor nativo, Km ^R .	Sierra-Cacho, 2017
pAZBR- <i>cdgC</i>	Vector derivado de pAZBRT7, contiene clonado el ORF del gen <i>cdgC</i> , así como su probable región promotora, Gm ^R	Este trabajo
pMP2450	Derivado de pMP2444, Km ^R	Este trabajo

Amp: Ampicilina, Km: Kanamicina, Tc: Tetraciclina, Gm: Gentamicina, Cm: Cloranfenicol, Sac: Sacarosa

6.3. Oligonucleótidos

Tabla 3. Oligonucleótidos usados en este trabajo

Iniciador	Secuencia	Referencia
RT-Fw- <i>cdgC</i>	5' - ATTCGTTCCGCATGACCGCC - 3'	Este trabajo
RT-Rv- <i>cdgC</i>	5' - AGGGGACCACGCGATTCCG - 3'	Este trabajo
RT-Fw-NUD	5' - GCGGGCCAATGGGCGGTT - 3'	Este trabajo
RT-Rv-NUD	5' - CGTGAAGCTCCGCGAGGT - 3'	Este trabajo
CdgC13	5' - GCTCATTGCAGGGCGATGAT - 3'	Este trabajo
CdgC14	5' - CCATCTAGATGGTTCTGCTTCCCAACACCG - 3'	Este trabajo
CdgC17	5' - AAGTCTAGAAAGGATTCGGCCTGGGCAAG - 3'	Este trabajo
CdgC18	5' - TCGGGTGCTGTCCCGTCA - 3'	Este trabajo
Pkm-PstI-F	5' - TCTGCAGAACTTCGGAATAGGAACTTC - 3'	Cordero-Rivera, 2017
SacB-F	5' - ACTGCAGCGTCAAGATCTAAAGAGGAGAAATAC TAGATGAACA TCAAAAAGTTTGC - 3'	Cordero-Rivera, 2017
SacB-R	5' - ACTCGAGCCTAGGGCCCTCGGCATTTTCTTTTGC GTTT - 3'	Cordero-Rivera, 2017
Pr100206-F	5' - GGTACCGCTGTCCCCTCTCGCGTT - 3'	Sierra-Cacho, 2017
Pr100206-R	5' - GAATTCCTAAGGGGAGGGGACCACGC - 3'	Sierra-Cacho, 2017
<i>cdgC</i> -F	5' - TTGAATTCATGCGCGTGCTCATCGCC - 3'	Este trabajo
<i>cdgC</i> -R	5' - TCGTCGACCTAAGGGGAGGGGACCACGC - 3'	Este trabajo
Gm-F	5' - TGCCTCGAGGCACCTTGTCGCTTGCGTA - 3'	Este trabajo
Gm-R	5' - TGACTAGTCCTGGCGGCGTTGTGACAATT - 3'	Este trabajo

6.4. Condiciones de cultivo

Las cepas de *E. coli* fueron cultivadas en caldo Luria Bertani modificado (LB*, peptona de caseína 10 g/l; extracto de levadura 5 g/l; NaCl 5 g/l; CaCl₂ 2.5 mM; MgSO₄ 2.5 mM) (Sezonov et al., 2007) en agitación a 37 °C por tiempos variables dependiendo las

necesidades del ensayo. De acuerdo con cada cepa empleada, el medio fue adicionado con Amp [100 µg/mL], Tc [15 µg/mL], Km [50 µg/mL], Gm [30 µg/mL] o Cm [10 µg/mL]. La cepa de *E. coli* DH5α fue utilizada en reacciones de transformación y como vehículo de almacenamiento de las construcciones mientras que la cepa S17.1 fue empleada como donadora en ensayos de conjugación. Por otra parte, las cepas de *A. baldaniorum* fueron cultivadas en medio mínimo K-malato, LB*, rojo Congo (Rodríguez Caceres, 1982), NFb o NFb* (Arruebarrena Di Palma et al., 2013) en agitación o en condiciones estáticas a 30 °C dependiendo del ensayo a realizar. Los antibióticos empleados en este trabajo fueron Amp [50 µg/mL], Km [50 µg/mL], Gm [30 µg/mL] y Cm [15 µg/mL].

6.5. Extracción y manipulación del ADN

La extracción de ADN genómico y plasmídico, así como transformación de células quimiocompetentes de las cepas de *E. coli* DH5α y S17.1, fue realizada siguiendo los protocolos descritos por Green & Sambrook, 2012. Para la amplificación de ADN mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa se emplearon los siguientes componentes: buffer de reacción de PCR [1 X], MgCl₂ [3 mM], dNTPs [0.2 mM], iniciadores [0.5 µM], ADN [50-100 ng], *Taq* DNA polimerasa recombinante o *Taq* DNA polimerasa Platinum (Invitrogen) [1.25 U], dimetilsulfóxido [DMSO, 5 % v/v] y agua en un volumen de reacción de 20 µl.

Las condiciones para la amplificación por PCR de los distintos fragmentos de ADN empleados fueron las siguientes: un ciclo de desnaturalización inicial de 5 min a 95 °C, 35 ciclos compuestos por una etapa de desnaturalización de 30 seg a 95 °C, una etapa de alineamiento de 30 seg con una temperatura dependiendo de los oligonucleótidos empleados y una etapa de elongación a 72 °C con una duración variable (1 min/kb amplificado), seguidos de un ciclo de elongación final a 72 °C con una duración de 7 min. Los productos de las reacciones de PCR fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa [0.8 % p/v] utilizando tampón Tris-Acetato-EDTA (TAE) [1X].

6.6. Análisis bioinformático

Con la finalidad de plantear las estrategias de mutación y complementación del gen *cdgC*, se procedió a analizar el contexto genético del mismo. Empleando la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information), se obtuvo la secuencia nucleotídica del gen en estudio, así como también las regiones río arriba y río debajo del mismo. Con esta información se generó un archivo en el programa SnapGene Viewer, el cual facilitó el análisis del gen *cdgC*, los sitios de restricción que se encuentran presentes en la secuencia de éste, así como el análisis de la proteína producto de la traducción de este gen. Debido a las características con las que cuenta dicho software, el archivo generado anteriormente fue empleado para diseñar los iniciadores encargados de delimitar la zona nucleotídica que se eliminaría en la cepa mutante, así como también aquellos cebadores que se utilizarían para los ensayos de RT-PCR y finalmente los oligonucleótidos responsables de amplificar el ORF del gen para ser clonado en el vector de expresión. Los iniciadores diseñados fueron evaluados en las plataformas BLASTn para corroborar que estos hibridarían en su secuencia blanco y en OligoAnalyzer Tool (Integrated DNA Technologies) con la finalidad de analizar la formación de estructuras secundarias y dímeros entre los cebadores. Una vez determinadas las secuencias de los cebadores a emplear, se procedió a construir, de manera *in silico*, los diversos vectores empleados en este trabajo.

6.7. Determinación de la unidad transcripcional del gen *cdgC*

Debido a las características del contexto genético en el que se encuentra el gen *cdgC*, se decidieron realizar ensayos de RT-PCR con la finalidad de determinar si éste se encuentra formando parte de un operón. Para dicho fin, la cepa *A. baldaniorum* Sp245 fue cultivada en medio mínimo K-malato a 30°C y 150 rpm. Una vez que el cultivo presentó una DO_{600nm} de 1.6 (fase estacionaria), se extrajo el ARN empleando el método de CTAB (L. Wang & Stegemann, 2010). El ARN fue tratado con la enzima TURBO DNasa, de acuerdo con las indicaciones del proveedor (Invitrogen), con la finalidad de eliminar restos de ADN que pudiesen interferir en las reacciones subsecuentes. El ARN purificado fue sometido a un proceso de retrotranscripción y el ADNc obtenido fue empleado en reacciones de amplificación con la enzima Dream Taq Green DNA Polymerase (Thermo Scientific). Para

evaluar la transcripción del gen *cdgC*, y el gen río abajo de este (denominado provisionalmente como *nudX*), se utilizaron los cebadores RT-Fw/Rv-*cdgC* y RT-Fw/Rv-NUD, los cuales generan amplificadores con tamaños de 138 pb y 150 pb, respectivamente. Finalmente, y para analizar si los genes descritos anteriormente se expresaban en un ARN policistrónico, se empleó una combinación de los iniciadores RT-Fw-*cdgC* y RT-Rv-NUD, cuyo amplificador sería de 478 pb.

6.8. Evaluación de la secuencia proteica CdgC

La secuencia de aminoácidos de la proteína CdgC, fue analizada en las plataformas SMART (Letunic & Bork, 2018) e InterPro (Mitchell et al., 2019) con el propósito de evaluar los dominios que presenta dicha proteína en su estructura así como para localizar los residuos aminoacídicos importantes para la actividad catalítica de la misma. Adicional a esto, se realizó un alineamiento múltiple con las secuencias de las proteínas CdgC, WspR (De et al., 2008) proveniente de *P. aeruginosa* PA3702 (PDB: 3BRE) y PleD (Wassmann et al., 2007) de *C. vibroides* CB15 (PDB: 2V0N), estas últimas fueron empleadas como referencias. El alineamiento se llevó a cabo en el software Clustal Omega (Sievers et al., 2011), mientras que para la presentación del mismo se empleó la plataforma JalView 2.11.1.3 (Waterhouse et al., 2009).

La estructura secundaria de la proteína CdgC se predijo usando el software Phyre2 (Kelley et al., 2016), mientras que el modelado tridimensional se realizó con el servidor I-Tasser (Jianyi Yang et al., 2014) empleando a WspR como molde. Las figuras generadas del modelo fueron realizadas con el programa UCSF Chimera (Pettersen et al., 2004). Finalmente, los logos correspondientes al sitio inhibitorio y catalítico presentes en el dominio diguanilato ciclase de CdgC fueron creados mediante el programa WebLogo 3 (Crooks et al., 2004)

6.9. Generación de la mutante *A. baldaniorum* 59C

Para generar la mutación por eliminación del gen *cdgC*, se diseñaron dos pares de oligonucleótidos los cuales tienen la función de amplificar regiones aledañas a la zona a eliminar. Estos brazos homólogos se denominaron fragmento A y B, los cuales presentan

tamaños de 829 y 859 pb y que fueron amplificados mediante PCR utilizando los iniciadores CdgC13/14 y CdgC17/18, respectivamente.

Los productos de la amplificación, correspondientes a los fragmentos A y B, se clonaron de manera independiente en el vector de mantenimiento pGEM-T Easy empleando a la T4 DNA ligasa (Promega) de acuerdo con las indicaciones del proveedor. Estas construcciones fueron transformadas en células quimiocompetentes de la cepa de *E. coli* DH5 α , seleccionando las clonas que contuvieron esta construcción mediante extracción de ADN plasmídico y sometiendo al material genético a una amplificación de dichos fragmentos utilizando los oligonucleótidos específicos para los mismos mediante la técnica de PCR. De igual manera, y para verificar la fidelidad de los amplificados, estas construcciones fueron secuenciadas por la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Posteriormente, las construcciones se sometieron a ensayos de restricción con las enzimas *NotI/XbaI* y *EcoRI/XbaI* en el caso de pGEM-A y pGEM-B, respectivamente. A la par, el vector suicida pCDR se digirió con las enzimas *NotI/EcoRI*. Los distintos fragmentos y el vector fueron purificados con el kit comercial Zymoclean Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research) para posteriormente llevar a cabo la ligación entre ambos fragmentos y subsecuentemente al vector suicida siguiendo las indicaciones del proveedor. La construcción pCDR Δ *cdgC* se corroboró por PCR y análisis de restricción. Finalmente se llevó a cabo una conjugación biparental entre las cepas *E. coli* S17.1 (pCDR Δ *cdgC*) y la cepa silvestre de *A. baldaniorum* Sp245. Para la selección de la clona que hubiese llevado a cabo el doble entrecruzamiento y por consiguiente la eliminación del gen *cdgC*, las candidatas fueron sembradas en placas de medio mínimo adicionado con sacarosa; las que presentaron crecimiento en el mismo se sometieron a una contraselección en K-malato-Tc. Finalmente, la cepa mutante fue corroborada por PCR empleando los oligonucleótidos Pr100206-F/Pr100206-R y CdgC13/CdgC18.

6.10. Estrategias para la complementación génica de la mutante *A. baldaniorum* 59C

Una vez obtenida la cepa mutante, se procedió a la complementación de ésta. Para dicha tarea se emplearon dos estrategias distintas. Para la primera de ellas, la complementación génica en *trans*, se realizó una conjugación biparental entre las cepas *E. coli* S17.1, la cual cuenta con la construcción pJB3-*cdgC* (Sierra-Cacho, 2017), y *A. baldaniorum* 59C. La cepa complementada fue seleccionada mediante estriado en K-malato adicionado con Km. La cepa se confirmó por la extracción de ADN plasmídico y amplificación por PCR utilizando los oligonucleótidos Pr100206F/ Pr100206R.

Para la segunda estrategia, la cual consistió en una complementación génica en *cis*, se utilizó el vector suicida pAZBRT7-*cdgC*. Para la construcción de este plásmido, se procedió a digerir el vector pJB3-*cdgC* con las enzimas *Sna*BI y *Eco*RI con la finalidad de liberar el fragmento correspondiente al ORF del gen *cdgC* así como a su probable promotor nativo. Dicho fragmento fue clonado en el vector pAZBRT7-Gm en los sitios de restricción mencionados anteriormente. La construcción se corroboró mediante ensayos de restricción para posteriormente ser empleada en la transformación de células quimiocompetentes de *E. coli* S17.1. Una vez seleccionada la clona que contuviera la construcción, ésta se empleó como célula donadora en ensayos de conjugación donde la cepa receptora fue *A. baldaniorum* 59C. La cepa complementada se seleccionó mediante el cultivo de esta en medio mínimo adicionado con Gm o Tc. Aquellas clonas Gm^R y Tc^S se corroboraron mediante ensayos de PCR.

6.11. Marcaje de las cepas con proteínas fluorescentes

Finalmente, y para evaluar la formación de biopelícula y la interacción bacteria-planta, las cepas se etiquetaron con las proteínas fluorescentes eGFP o mCherry (Ramirez-Mata et al., 2018). Las bacterias marcadas con fluorescencia se obtuvieron mediante conjugación biparental entre las cepas de *E. coli* S17.1 (que contuviera el vector pMP2444, pMP2449-5 o pMP2450, respectivamente) y las cepas de *A. baldaniorum* Sp245, 59C, 3A13 y 3D46. La transferencia exitosa de estos vectores se verificó sembrando a las cepas en medio mínimo

adicionado con Gm y/o Km además de la presencia de la fluorescencia característica de cada una de las proteínas puesta de manifiesto empleando un microscopio de epifluorescencia (Nikon Ti2, invertido).

6.12. Curva de crecimiento

La evaluación del crecimiento de las distintas cepas analizadas se realizó empleando medio mínimo NFb. Los cultivos bacterianos se incubaron a 30 °C con agitación (150 rpm) durante 20 h. El crecimiento se monitoreó durante este lapso registrando la densidad óptica a 600 nm (DO_{600nm}) del cultivo en intervalos de tres horas.

6.13. Producción de biopelícula

La formación de biopelícula se realizó empleando medio NFb o NFb* (relación C/N=2) en condiciones estáticas (Arruebarrena Di Palma et al., 2013). Brevemente, 2-3 colonias provenientes de cajas de rojo Congo de la cepa de *Azospirillum* a evaluar se inocularon a un matraz con 15 mL de medio LB* el cual se sometió a incubación de 30 °C, con agitación (150 rpm) durante 14-16 h hasta que el cultivo alcanzó una DO_{600nm} de 1.1-1.4. Posteriormente, se centrifugó 1 mL de este por 5 min a 5000 rpm. El sobrenadante fue descartado y el paquete celular se resuspendió en un tampón de fosfatos pH 7 [66 mM] con la finalidad de obtener una DO_{600nm} de 2; el volumen a emplear del tampón se calcula de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{Volumen del tampón (mL)} = \frac{DO_{600nm} \text{ cultivo}}{2}$$

Empleando esta disolución, se realizó una dilución 1:100 con medio NFb o NFb* para posteriormente inocular con 2 mL de ésta a placas de 24 pozos de poliestireno (Corning Incorporated), la cual se incubó en condiciones estáticas a 30 °C durante 5 días. Finalizada la incubación, la formación de biopelícula se evaluó agregando 0.5 mL de cristal violeta (CV) [0.05 % p/v] a cada pozo e incubando por 30 min. A continuación, el CV se removió y se

procedieron a realizar lavados con agua destilada. El CV adherido a la biopelícula en cada uno de los pozos se recuperó añadiendo 2 mL de ácido acético [33 % v/v]. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 30 min, el CV solubilizado fue recuperado y cuantificado utilizando una placa de 96 pozos a la que se le añadieron 0.2 mL de la muestra diluida. Las lecturas se realizaron a 590 nm. Con la finalidad de normalizar la producción de biopelícula, a la par de la cuantificación del CV se procedió a determinar la densidad celular de las distintas cepas analizadas; para este fin se midió el crecimiento de estas empleando una longitud de onda de 600 nm (O'Toole, 2010). La producción de biopelícula normalizada se reportó como CV/crecimiento (DO_{595nm}/DO_{600nm}).

6.14. Determinación de la formación de biopelícula y producción de exopolisacáridos empleando microscopía confocal

Con la finalidad de evaluar la formación de biopelícula, así como su estructura tridimensional y la matriz por la que está compuesta, se recurrió a la microscopía confocal. Para dicho ensayo, se emplearon las cepas *A. baldaniorum* Sp245-GFP, 59C-GFP, 2A65 y 2D8, las cuales están etiquetadas con la proteína eGFP. Para este experimento se inocularon matraces con 15 mL con 2-3 colonias provenientes de placas de rojo Congo de las cepas mencionadas anteriormente. Los cultivos se incubaron a 30 °C, 150 rpm durante 14-16 h hasta alcanzar la DO_{600nm} de 1.1-1.4. Posteriormente se centrifugaron 1 mL de cada cultivo a 5000 rpm por 5 min, se descartó el sobrenadante y los paquetes celulares se resuspendieron en tampón de fosfatos pH 7 [66 mM] para tener DO_{600nm} de 2. A continuación se procedió a realizar una dilución 1:100 con medio NFb* transfiriendo 3.9 mL de esta suspensión a una placa de cultivo celular FluoroDish (World Precision Instruments). A la par, se añadió el fluoróforo calcofluor-white (CW) a una concentración final de 85 μ M. Los cultivos se incubaron a 30 °C en condiciones estáticas y cámara húmeda por 5 días. La producción de biopelícula y exopolisacáridos se evaluó empleando un microscopio invertido CLSM Nikon Eclipse Ti-E C2+ (Nikon Instruments, Melville, New York) y un objetivo 60x Plan lambda. Las longitudes de onda de excitación y emisión de la eGFP y el CW fueron 488/508nm y 380/475nm, respectivamente. Las imágenes obtenidas, representativas de 3 experimentos independientes,

se analizaron y editaron usando el software NIS Elements Advanced Research (Nikon Instruments Inc.).

6.15. Cuantificación de la unión de rojo Congo y calcoflúor a la matriz de la biopelícula

Para cuantificar indirectamente a las sustancias poliméricas extracelulares (SPE) presentes en la matriz de la biopelícula producida por las distintas cepas evaluadas, se empleó el fluoróforo Calcofluor White y el colorante rojo Congo (RC) (Sigma-Aldrich) (Spiers et al., 2003) los cuales presentan afinidad hacia las SPE.

Para evaluar la presencia de SPE con afinidad hacia el rojo Congo, la biopelícula madura (5 días), adherida a los pozos de poliestireno, se recuperó en su totalidad utilizando tubos de polipropileno centrifugando las muestras a 10000 rpm durante 3 min. El sobrenadante se descartó y el paquete celular se resuspendió con 1 ml de medio NFb* adicionado con RC a una concentración de 40 µg/mL. Las células se incubaron durante 2 h a 30 °C y 150 rpm. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 13000 por 5 min. El sobrenadante, el cual contiene la fracción de RC que no se adhirió a las células se cuantificó en un espectrofotómetro (EON-Biotek) a 490nm. Los datos obtenidos se extrapolaron a una curva estándar previamente realizada de RC [0-40 µg/mL]. La unión de RC fue normalizada contra la cantidad de proteínas presente en las distintas muestras (DO_{490nm}/DO_{610nm}) (Bradford, 1976). Para determinar la unión del calcoflúor hacia los exopolisacáridos constituyentes de la matriz de la biopelícula se empleó una técnica descrita previamente (Spiers et al., 2003). Es conveniente mencionar que, para la formación de biopelícula, las cepas fueron crecidas en medio NFb y NFb*. Una vez que las biopelículas maduraron (5 días), el sobrenadante de cada pozo donde se desarrolló la biopelícula fue removido para posteriormente añadir 1 mL de NFb o NFb* adicionado con CW a una concentración de 50 µg/mL. Las células fueron incubadas durante 2 h a 30 °C bajo condiciones estáticas y cámara húmeda. Finalizado este lapso, el medio adicionado con CW fue reemplazado por 1 mL de etanol al 96%. A continuación, el contenido de cada pozo fue recuperado mediante centrifugación a 13000 rpm durante 5 minutos. Finalmente, la cantidad de CW adherido a cada una de las cepas fue determinado mediante la lectura espectrofotométrica a 355 nm de cada uno de los

sobrenadantes. La concentración de CW presente en las muestras fue obtenida al extrapolar los datos obtenidos previamente en una curva estándar. La unión de CW fue normalizada con respecto a la densidad celular de los cultivos (DO_{355nm}/DO_{600nm}) (O'Toole, 2010).

6.16. Movilidad bacteriana

Los ensayos de movilidad fueron realizados de acuerdo a lo reportado anteriormente (Alexandre et al., 2000) con algunas modificaciones. De 2-3 colonias provenientes de cajas de rojo Congo de las cepas evaluadas fueron inoculadas en matraces con 15 mL de medio LB* con una concentración de NaCl de 10 mM. Los cultivos se incubaron a 30°C, 150 rpm por 14-16 h. Una gota con 5 µl de cultivo, conteniendo $2.5-3.0 \times 10^6$ UFC, fue inoculada en cajas de medio mínimo con agar [0.25 % p/v] y adicionado con succinato, malato, piruvato, prolina o fructosa como los quimioattractantes a evaluar a una concentración de 10 mM. Las placas fueron incubadas en condiciones estáticas a 30 °C y monitoreadas a las 24 y 48 h post inoculación. El halo quimiotáctico fue medido y analizado estadísticamente.

6.17. Estimación de los niveles intracelulares del di-GMPc

Para evaluar, de manera indirecta, la actividad diguanilato ciclasa de la proteína CdgC, se procedió a su expresión en un modelo bacteriano heterólogo y evaluar la fluctuación en el nivel intracelular del di-GMP-c mediante el uso de un biosensor específico para este segundo mensajero.

El ORF correspondiente a CdgC fue amplificado empleando los oligonucleótidos cdgC-F y cdgC-R. El producto de PCR fue clonado en el vector pGEM-T Easy para posteriormente ser subclonado en los sitios de restricción *EcoRI* y *SalI* presentes en el vector de expresión pGEX-4T-1. La construcción generada, pGEX-CdgC fue empleada para transformar células quimiocompetentes de *E. coli* S17.1 a las cuales previamente se les había introducido el biosensor de di-GMPc, pDZ-119 (Martínez Méndez et al., 2021). Las cepas generadas pGEX-cdgC/pDZ-119, pGEX-4T-1/pDZ-119 y pDZ-119 fueron sembradas en medio LB adicionado con Amp [100 µg/mL] y/o Cm [10 µg/mL]. La proteína CdgA, una diguanilato ciclasa previamente caracterizada (Ramírez-Mata et al., 2016) y clonada en el vector pLIL-

2, fue empleada como control positivo. Una vez obtenidas las cepas a emplear en los ensayos, estos fueron realizados de acuerdo con lo reportado previamente (Zhou et al., 2016). Brevemente, las cepas de *E. coli* S17.1 fueron inoculadas en medio líquido de LB e incubadas a 30 °C en agitación de 150 rpm, hasta que los cultivos presentaron una DO_{600nm} de 0.6. Posteriormente, a los cultivos se les añadió el inductor IPTG a una concentración final de 0.01 o 0.1 mM. La inducción se llevó a cabo a 30 °C durante 24 h y 150 rpm. Finalizado este tiempo, se tomó 1 mL de cada uno de los cultivos y se concentró 10 veces, resuspendiendo el paquete celular en agua destilada. La producción de di-GMPc en las distintas cepas fue evaluada de manera macroscópica relacionando la intensidad del color de los cultivos con la concentración intracelular de este mensajero en las mismas cepas. Para evaluar de manera microscópica la producción de di-GMPc, una gota de cada uno de los cultivos inducidos fue depositada en un cubreobjetos cubriendo la misma con agarosa [1 % p/v] con la finalidad de disminuir la movilidad y facilitar la observación microscópica. La excitación y emisión de la proteína fluorescente AmCyan fue registrada a 475 y 520 nm, respectivamente. Mientras que el fluoróforo TurboRFP fue excitado a 553 nm, mientras que su emisión fue evaluada a 574 nm. Para esta visualización microscópica se empleó un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse TE2000U, mientras que las imágenes obtenidas fueron editadas empleando el software NIS Elements Advanced Research (Nikon Instruments Inc).

6.18. Ensayos de colonización y competencia bacteriana hacia raíces de trigo

Con la finalidad de evaluar la colonización de las distintas cepas de *Azospirillum* generadas en este trabajo, se emplearon plántulas de trigo (Ramirez-Mata et al., 2018). Para estos ensayos, se desinfectaron superficialmente semillas de trigo (*Triticum aestivum*) con etanol [70 % v/v] por 1 min, hipoclorito de sodio [1 % v/v] por 30 min y una mezcla de ciclohexamida [150 µg/mL], estreptomina [250 µg/mL], tetraciclina [20 µg/mL] y fluconazol [150 µg/mL]. Finalmente, las semillas fueron lavadas 4 veces con agua destilada estéril durante 1 min y colocadas en placas Petri con agar semisólido [0.6 % p/v] y germinadas durante 2 días a 30 °C. Las plántulas que no presentaron signos de infección fúngica fueron transferidas a tubos estériles de vidrio que contenían 15 mL de solución hidropónica de Hoagland adicionada con KNO₃ [25 mM] y fueron mantenidas en una cámara

ambiental por 7 días con una humedad relativa del 80 % con fotoperiodos de 14 h de luz a 25 °C y 10 h de oscuridad a 16 °C. Posteriormente, 6 plántulas para cada cepa evaluada, fueron inoculadas con 10^7 UFC/mL de la cepa *A. baldaniorum* 2449-5 o *A. baldaniorum* 2450, respectivamente. Para los ensayos de competencia, se realizó una mezcla en proporción 1:1 con las cepas mencionadas anteriormente, inoculando aproximadamente 5×10^6 UFC/mL con cada una de ellas. Las plantas fueron mantenidas en las mismas condiciones mencionadas anteriormente durante 7 días. Finalmente, las raíces fueron maceradas utilizando un tampón de fosfatos pH 6.8 y la colonización bacteriana fue cuantificada mediante el conteo de las UFC utilizando medio rojo Congo adicionado con el antibiótico correspondiente.

A la par, y con la finalidad de analizar los patrones de colonización de las cepas mencionadas, las raíces fueron cortadas transversalmente obteniendo secciones de éstas, las cuales fueron examinadas con un microscopio confocal invertido Eclipse Ti-E C2+ (Nikon Instruments, Melville, New York). Las imágenes obtenidas fueron editadas empleando el software NIS Elements Advanced Research.

6.19. Cuantificación de la internalización bacteriana a raíces de trigo

Debido a que *A. baldaniorum* Sp245 presenta un comportamiento endofítico hacia las raíces de distintas plantas, se decidió analizar si la cepa mutante *A. baldaniorum* 59C presentaba una alteración con respecto a este fenotipo, se procedió a realizar la cuantificación de las bacterias endófitas en raíces de trigo. Para este ensayo se procedió con un esterilizado superficial de las raíces (Alexandre, 2017) para eliminar a las bacterias adheridas a la parte externa de las mismas. Para dicho fin, las raíces se sumergieron en hipoclorito de sodio [0.6 % v/v] durante 15 seg. Posteriormente se lavaron en tres ocasiones con tampón de fosfatos pH 6.8: dos lavados tuvieron una duración de 15 seg mientras que la del tercero fue de 20 seg. Las raíces fueron pesadas y subsecuentemente maceradas adicionando 1 mL de tampón de fosfatos. El número de bacterias endófitas se determinó mediante el conteo de UFC en medio rojo Congo adicionado con el antibiótico adecuado.

6.20. Análisis estadístico

La información cuantitativa de los diferentes ensayos realizados se analizó mediante el software SigmaPlot (Systat Software, San Jose, CA) aplicando pruebas de t-Student con la finalidad de determinar si existía diferencia estadísticamente significativa entre las cepas evaluadas. Las diferencias fueron reportadas como significantes cuando los valores de $p < 0.05$.

6.21. Búsqueda de probables proteínas tipo NUDIX en el genoma de *A. baldaniorum* Sp245

Empleando el genoma de *A. baldaniorum* Sp245, depositado en la plataforma RAST (Rapid Annotation Subsystem Technology 2.0) (Brettin et al., 2015), se realizó una búsqueda tipo BLAST utilizando las secuencias de las proteínas MutT y RppH de *E. coli* (números de acceso PDB: 3A6U y 6D13, respectivamente), DR0079 y CoAsa de *D. radiodurans* (PDB: 2O5F y 1NQY, respectivamente); las cuales son proteínas tipo NUDIX ampliamente caracterizadas (Buchko et al., 2008; Gao et al., 2018; Kang et al., 2003; Nakamura et al., 2010).

6.22. Depuración de secuencias

Las secuencias proteicas halladas en la búsqueda BLAST, se sometieron a una depuración mediante el análisis de las mismas en las bases de datos SMART (Letunic & Bork, 2018) y Pfam (El-Gebali et al., 2019), esto con la finalidad de descartar a las proteínas que no presentaran un dominio NUDIX en su estructura ($E\text{-value} \leq 1E^{-7}$). Las secuencias que superaron este filtro fueron alineadas, empleando el software CLUSTAL Omega (Madeira et al., 2019), contra proteínas NUDIX caracterizadas con el propósito de excluir aquellas en las que los ácidos glutámicos ubicados en la caja NUDIX no estuviesen conservados.

6.23. Clasificación de las probables proteínas NUDIX en subfamilias

Aquellas secuencias que presentaron una caja NUDIX conservada, fueron sometidas a distintos análisis para determinar el probable sustrato al cual presentan afinidad. El primero de ellos fue llevado a cabo en la plataforma InterPro (Jones et al., 2014; Mitchell et al., 2019), la cual permitió un primer acercamiento que fue corroborado mediante el alineamiento de las secuencias contra miembros de las diversas subfamilias de proteínas NUDIX reportadas con la finalidad de detectar y ubicar los residuos o motivos necesarios para la unión del sustrato. Entre las enzimas empleadas de referencia se enlistan a MutT, RppH, la ADP-ribosa hidrolasa y la NADH pirofosfohidrolasa (códigos de acceso PDB: 3A6S, 6VCR, 1VIQ, 1VK6, respectivamente) de *E. coli*; y a la Ap4A hidrolasa y CoA pirofosfohidrolasa (PDB: 1F3Y y 1NQY, respectivamente) de *Lupin angustifolius* y *D. radiodurans*, respectivamente. Adicional a esto, se estableció que las proteínas debían presentar un porcentaje de identidad de ≥ 30 % con respecto a proteínas NUDIX previamente caracterizadas y que fueron empleadas como referencia para clasificar a las probables hidrolasas de *A. baldaniorum* Sp245 en las distintas subfamilias de estas pirofosfohidrolasas.

7. Resultados

7.1. Determinación de la unidad transcripcional del gen *cdgC*

En resultados reportados previamente (Sierra-Cacho, 2017) se localizó una probable región promotora del gen *cdgC*. Ésta se encontró albergada en una zona comprendida por 150 pb río arriba del inicio del ORF. Dicha región fue considerada para generar los vectores empleados en la complementación génica.

Al analizar las secuencias río abajo de *cdgC*, se encontró un ORF que codifica para una proteína con probable actividad hidrolasa tipo NUDIX. Esto cobra relevancia debido a que este tipo de proteínas presentan afinidad hacia moléculas de tipo nucleósido unido a grupos fosfato (Ogawa et al., 2008). Este gen denominado temporalmente como *nudX*, se encuentra separado por 68 pb del gen *cdgC* (**Fig. 5**). La importancia de esto radica en que, además de la pequeña región intergénica que existe entre *nudX* y *cdgC*, estos presentan la misma dirección de transcripción, lo cual nos llevó a hipotetizar que ambos formaban parte de un sistema de operón. Para apoyar o descartar esta hipótesis, se evaluó, de manera *in silico*, la presencia de algún elemento promotor en una región de 350 pb río arriba a *nudX*, dicha secuencia abarca la región intergénica entre estos genes y una fracción de *cdgC*. Sin embargo, los distintos programas bioinformáticos empleados no arrojaron resultados positivos (Sierra-Cacho, 2017). No obstante, se decidió evaluar experimentalmente la transcripción de estos genes mediante experimentos de RT-PCR.



Figura 5. Contexto genético del gen *cdgC*. El gen *cdgC* (azul) se encuentra separado del gen *nudX* (amarillo) por una región intergénica de 68 pb. Estos presentan un tamaño de 885 pb y 552 pb, respectivamente. En el esquema se aprecia el sentido de transcripción de los genes descritos.

Empleando ADNc, se realizaron ensayos de PCR utilizando oligonucleótidos específicos para amplificar parcialmente cada uno de los genes; además, empleando una combinación de estos cebadores se pudo evaluar si *cdgC* y *nudX* se contrascriben en una cadena de ARN

mensajero. El resultado obtenido demostró que cada uno de los genes en estudio conforman unidades transcripcionales individuales (**Fig. 6**).

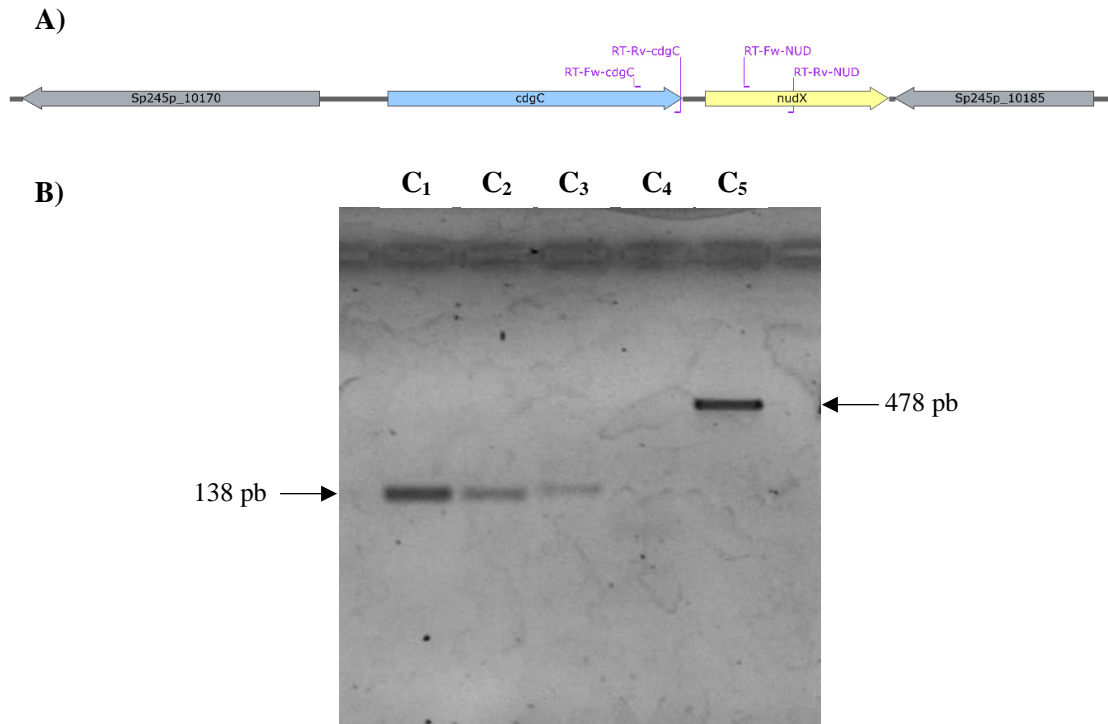


Figura 6. Evaluación de la transcripción de los genes *cdgC* y *nudX*. La transcripción de los genes *cdgC* y *nudX* se evaluó mediante la extracción de ARN y la posterior síntesis de ADN complementario (ADNc) el cual sirvió de molde para ensayos de PCR. **A)** Contexto de los genes *cdgC* y *nudX*. En la figura se muestran los sitios de hibridación de los iniciadores para amplificar parcialmente a *cdgC* (RT-Fw-*cdgC*/RT-Rv-*cdgC*) y *nudX* (RT-Fw-*NUD*/RT-Rv-*NUD*) obteniendo fragmentos que presentan tamaños de 138 y 150 pb, respectivamente. La combinación de los cebadores RT-Fw-*cdgC* y RT-Rv-*NUD* permitió evaluar la co-expresión de *cdgC* y *nudX* cuyo amplificado refiere a 478 pb. **B)** Productos de PCR obtenidos al emplear los oligonucleótidos RT-Fw-*cdgC*/RT-Rv-*cdgC* y RT-Fw-*NUD*/RT-Rv-*NUD*. C1: Control positivo, amplificado parcial del gen *cdgC* empleando ADN genómico. C2: Amplificado parcial del gen *cdgC* utilizando ADN complementario. C3: Amplificado parcial del gen *nudX* usando ADN complementario como molde. C4: Amplificado de los genes *cdgC* y *nudX* empleando los iniciadores RT-Fw-*cdgC* y RT-Rv-*NUD* a partir de ADN complementario. C5: Amplificado de *cdgC* y *nudX* usando ADN genómico.

7.2. Evaluación de la secuencia proteica CdgC

El genoma bacteriano de *A. baldaniorum* Sp245 codifica para 20 proteínas con probable actividad diguanilato ciclasa (Ramírez-Mata et al., 2018). De entre estas secuencias, se decidió evaluar a la proteína AWJ90124.1, nombrada en este trabajo como CdgC. Tras un análisis en la plataforma SMART, se evidenció que ésta presenta una longitud de 294 aminoácidos distribuidos en dos dominios: uno de ellos, receptor (REC) localizado en el extremo N-terminal de la proteína, que abarca los residuos aminoacídicos 1-114; y un dominio diguanilato ciclasa (DGC) dispuesto en el extremo C-terminal, ubicado en la posición 120-293 (**Fig. 7**). Dada la arquitectura de esta proteína, un dominio DGC fusionado a un REC, resaltó su similitud con la proteína WspR, una diguanilato ciclasa ampliamente caracterizada aislada de *P. aeruginosa* (Ganesh & Rai, 2018; Güvener & Harwood, 2007).

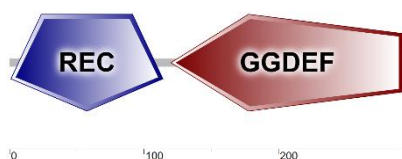


Figura 7. Arquitectura de la proteína CdgC. El software SMART demostró la presencia de dos dominios en la proteína CdgC: REC (azul) y DGC (rojo). El dominio receptor abarca los residuos aminoacídicos 1-114; mientras que los aminoácidos 120-293 corresponden al dominio DGC.

Empleando el software InterPro se ubicaron los aminoácidos importantes que le confieren actividad a este tipo de proteínas. Entre estos se enlistan el ácido aspártico, presente en el dominio REC en la posición 51 (**Fig. 8A**), el cual debe ser fosforilado para alterar la estructura tridimensional de la proteína y favorecer su interacción con la molécula sustrato (De et al., 2008). Mientras que en el dominio DGC sobresalen los residuos GG(D/E)EF, que corresponden al sitio catalítico, y el motivo RxxD, también denominado sitio I, implicado en la inhibición por retroalimentación de la proteína (**Fig. 8B**) (Chan et al., 2004; Vorobiev et al., 2012). De acuerdo con el alineamiento múltiple de secuencias realizado en la plataforma Clustal Omega, en el que se tomó como referencia a las proteínas WspR y PleD de *P. aeruginosa* y *C. vibroides*, respectivamente, los residuos del sitio activo (Gly²¹⁰, Gly²¹¹, Glu²¹², Glu²¹³ y Phe²¹⁴) se encuentran completamente conservados; mientras que los aminoácidos que conforman el sitio inhibitorio, localizado 5 residuos río arriba del motivo catalítico, también están conservados (Arg²⁰¹, Pro²⁰², Gly²⁰³ y Asp²⁰⁴) (Malone et al., 2007;

Römling et al., 2013, 2017). Con respecto al porcentaje de identidad, valor empleado para establecer relación entre dos secuencias, el dominio REC de CdgC presentó 33.3 % y 25 % de identidad hacia el primer y segundo dominio REC de PleD, respectivamente, y 25.5 % de identidad con el dominio REC de WspR. Mientras que el dominio DGC exhibió 41 % y 39.6 % con respecto a los dominios correspondientes de PleD y WspR, respectivamente.

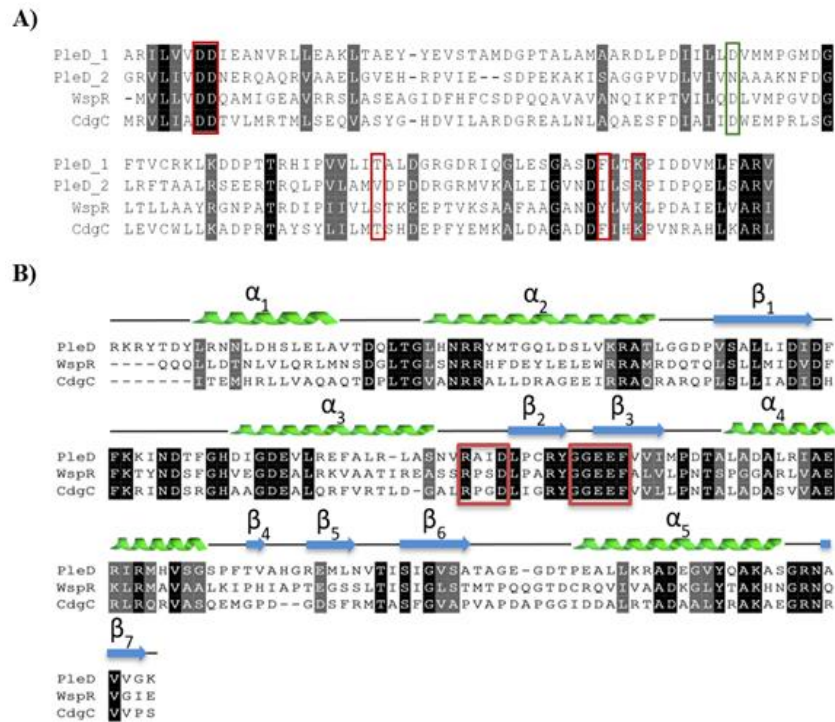


Figura 8. Alineamiento de CdgC y estructura secundaria. Alineamiento aminoacídico de la proteína CdgC contra las proteínas caracterizadas PleD y WspR de *C. vibroides* y *P. aeruginosa*, respectivamente. **A)** Alineamiento de los dominios REC de las tres proteínas antes mencionadas; el ácido aspártico receptor del grupo fosfato se encuentra encerrado en un rectángulo verde, mientras que otros residuos importantes se presentan limitados por rectángulos rojos. **B)** Alineamiento del dominio DGC de CdgC comparado contra PleD y WspR. Los listones verdes hacen referencia a α -hélices mientras que las flechas azules refieren a láminas- β . En cuadrados rojos se ubican los motivos correspondientes al sitio inhibitorio (ubicado entre α_3 y β_2) y el sitio activo activo (localizado entre β_2 y β_3). El fondo gris o negro presente en algunos aminoácidos hace referencia a la conservación de estos entre las tres proteínas evaluadas.

Con respecto a la estructura secundaria, CdgC presenta una distribución α_1 - α_2 - β_1 - α_3 - β_2 - β_3 - α_4 - β_4 - β_5 - β_6 - α_5 - β_7 , donde el motivo GG(D/E)EF se localiza entre las β_2 - β_3 . Al comparar esta disposición contra las observadas en PleD y WspR, la correspondiente a CdgC se encuentra

conservada (**Fig. 8B**) (Römling et al., 2017; Whiteley & Lee, 2015). Finalmente se realizó un modelado tridimensional de la proteína en estudio empleando la plataforma I-Tasser, utilizando al cristal de WspR (PDB ID: 3BRE) de *P. aeruginosa* PA3702 como molde. El dominio REC (C-score: 1.38) presentó una distribución espacial similar a WspR (**Fig. 9A**); mientras que los resultados del modelado correspondiente al dominio DGC (C-score: 1.71) demostraron que este se encuentra conformado por cinco α -hélices y siete láminas- β (**Fig. 9B**). Finalmente, el alineamiento y representación de los sitios catalítico e inhibitorio, realizado en los programas JalView y WebLogo, corroboró la conservación de ambos motivos (**Fig. 9CD**) (Chan et al., 2004; Römling et al., 2017). En conjunto, estos resultados sugirieron que la proteína CdgC pudiese presentar actividad catalítica.

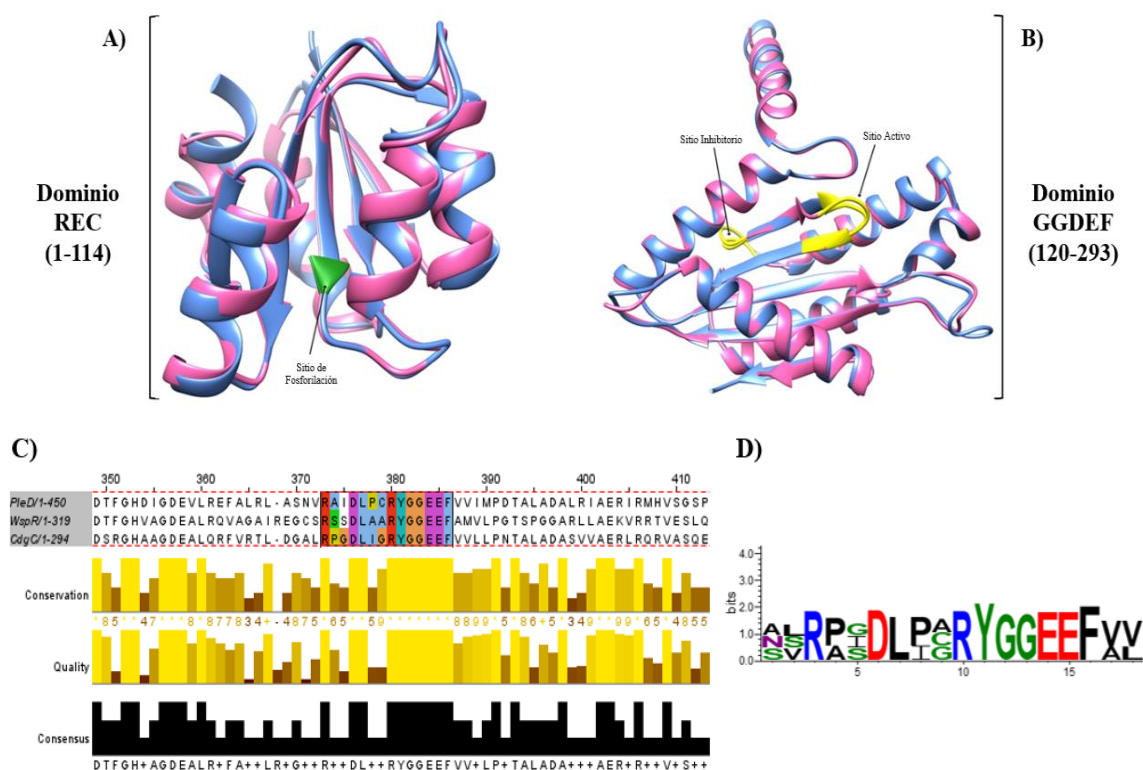


Figura 9. Estructura terciaria de la proteína CdgC. A) Superposición estructural del dominio REC de CdgC (rosa) contra el dominio REC de la proteína WspR (azul). El ácido aspártico involucrado en la fosforilación está coloreado en verde. Valores del modelo de este dominio proporcionado por I-Tasser: C-score: 1.38; TM-score: 0.91 ± 0.06 ; RMSD: 1.7 ± 1.4 Å. B) Alineamiento de la estructura terciaria del dominio DGC de CdgC (rosa) contra el dominio DGC de WspR (azul). En amarillo se encuentran marcados los motivos que conforman al sitio inhibitorio y activo. Valores del modelo generado por I-Tasser: C-score: 1.71; TM-score: 0.95 ± 0.05 ; RMSD: 1.8 ± 1.5 Å. C) Alineamiento del sitio catalítico e inhibitorio de CdgC con respecto a los correspondientes de PleD y WspR. D) Logo de los motivos inhibitorio y activo.

7.3. Generación de la mutante *A. baldaniorum* 59C

Con el objetivo de analizar el papel del gen *cdgC* se procedió a realizar la mutación del mismo. De acuerdo con lo descrito en el apartado de Materiales y Métodos, se diseñaron dos pares de iniciadores con la finalidad de amplificar dos fragmentos o brazos de homología, los cuales son necesarios para que se lleve a cabo la recombinación homóloga en el cromosoma de la cepa silvestre. Para establecer los sitios de hibridación de estos oligonucleótidos y, por consiguiente, los fragmentos a amplificar, se evaluó la secuencia nucleotídica del gen *cdgC*, así como la estructura primaria del producto proteico de éste. Con base en este análisis y al realizar la mutación de *cdgC*, se conservaron las zonas aledañas a los nucleótidos que codifican para los aminoácidos que forman parte de los sitios de fosforilación (dominio REC), así como del sitio inhibitorio y activo (ambos presentes en el dominio DGC). En la **Fig. 10** se esquematiza el planteamiento para la generación de la cepa mutante. Posteriormente se realizaron ensayos de PCR para clonar los fragmentos generados en el vector de mantenimiento pGEM-T Easy. Estas construcciones fueron intermediarias para la generación del plásmido pCDR Δ *cdgC*, el cual fue empleado para llevar a cabo la recombinación homóloga y obtener la cepa bacteriana carente del gen en estudio. Las probables cepas recombinantes fueron sometidas a rondas de selección y contraselección mediante su siembra en cajas de medio mínimo adicionado con Tc y/o sacarosa.

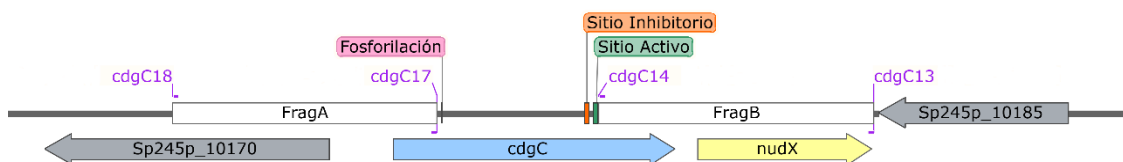


Figura 10. Estrategia de mutación del gen *cdgC*. Representación del contexto genético de gen *cdgC* (azul). Los nucleótidos que codifican para los motivos que corresponden a los sitios de fosforilación, inhibición y catalítico están coloreados en rosa, naranja y verde, respectivamente. Los sitios de hibridación de los oligonucleótidos empleados para amplificar los brazos homólogos para la recombinación (FragA y FragB) se encuentran marcados con los nombres correspondientes descritos en la sección de Materiales y Métodos.

Las clonas candidatas fueron sometidas a extracción de ADN genómico, el cual se empleó de molde para realizar ensayos de PCR utilizando los oligonucleótidos CdgC13/CdgC18, los cuales hibridan en las regiones que flanquean a la zona donde ocurrió la mutación. Aquellas clonas que realizaron el doble entrecruzamiento y, por lo tanto, la eliminación del gen *cdgC*,

presentaron un amplificado con tamaño de 1693 pb, comparado con los 2202 pb observados en el producto de PCR correspondiente a la cepa silvestre, lo que implicó una eliminación de 509 pb (**Fig. 11**). A partir de estos resultados, se seleccionó a la cepa *A. baldaniorum* 59C ($\Delta cdgC$) para realizar los ensayos posteriores.

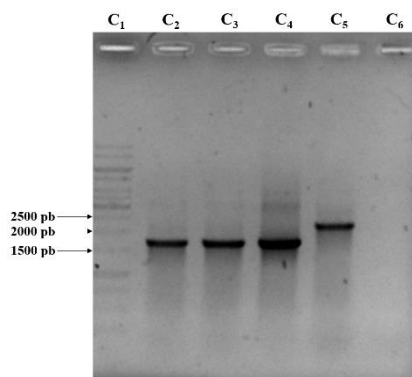


Figura 11. Electroforetograma de amplificado de las posibles mutantes del gen *cdgC*. Comprobación de la obtención de la mutante $\Delta cdgC$ mediante PCR y el uso de los iniciadores CdgC13/18. C₁: Marcador de peso molecular; C₂: Clona 59C C₃: Clona 59D C₄: Vector pCDR $\Delta cdgC$; C₅: ADN de *A. baldaniorum* Sp245; C₆: Control negativo. La electroforesis se realizó en un gel de agarosa [0.8 %].

7.4. Estrategias para la complementación génica de la mutante *A. baldaniorum* 59C

Con la finalidad de confirmar la función del gen *cdgC*, se procedió a realizar la complementación de éste en el fondo genético de la cepa mutante (*A. baldaniorum* 59C). Para cumplir con este objetivo, se diseñaron dos estrategias de complementación: la primera, en *trans*, clonando al gen *cdgC* y su probable promotor nativo en un vector de bajo número de copias, obteniendo así la construcción pJB3-*cdgC* (Sierra-Cacho, 2017) (**Fig. 12A**); la segunda estrategia consistió en insertar al gen en estudio y su presumible región promotora en el vector suicida pAZBR-T7-Gm (Espino-Aldaba, 2020), generando la construcción pAZBR-*cdgC* (**Fig. 12B**) permitiendo así la complementación en *cis*.

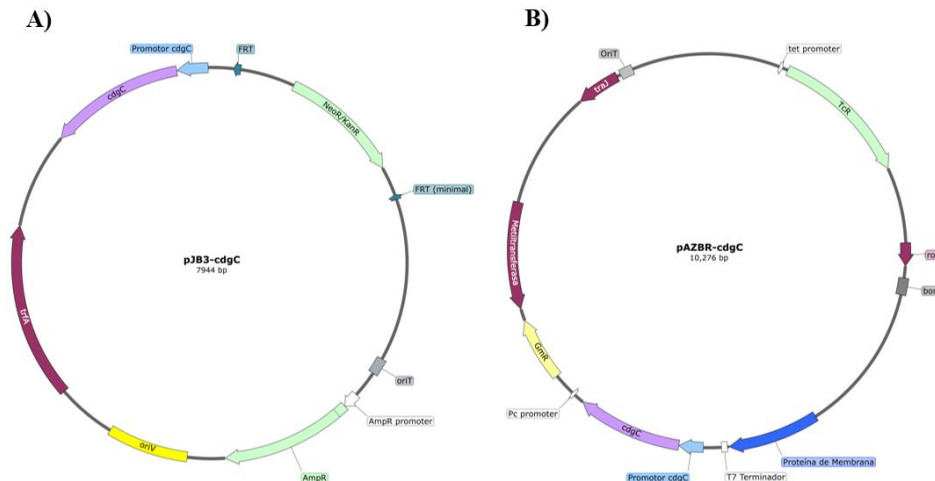


Figura 12. Vectores usados en la complementación génica. A) Diagrama del vector pJB3-*cdgC* empleado para la complementación en *trans* con el gen *cdgC*. B) Esquema del plásmido pAZBR-*cdgC* utilizado para complementar en *cis* el gen en estudio. Se visualizan en este vector los brazos homólogos, empleados para la recombinación, flanqueando al gen *cdgC* y su secuencia promotora. En ambas metodologías, la expresión del gen *cdgC* fue regulada por su promotor nativo. Las figuras fueron generadas en el software SnapGene Viewer.

Estas construcciones fueron empleadas para transformar células quimiocompetentes de *E. coli* S71.1, la cual funcionó como cepa donadora en ensayos de conjugación con la cepa *A. baldaniorum* 59C. Tras varias rondas de selección y contraselección, se obtuvieron las cepas *A. baldaniorum* 3A13 y *A. baldaniorum* C21, que presentaron complementación génica en *trans* y *cis*, respectivamente. Cabe mencionar que a la par de estas cepas, también se generaron sus respectivos controles (*A. baldaniorum* 3D46 y *A. baldaniorum* C87, respectivamente).

7.5. Curva de crecimiento

Una vez obtenidas las distintas cepas a emplear en este trabajo, se procedió a evaluar el comportamiento de éstas con respecto a su crecimiento. Este análisis es de gran importancia dado que un retraso en el crecimiento bacteriano puede influir directamente sobre algunos otros fenotipos. De acuerdo con los resultados obtenidos empleando medio mínimo K-malato, no se generó un retraso en el crecimiento bacteriano en la cepa mutante del gen *cdgC* (*A. baldaniorum* 59C) cuando ésta fue comparada contra la cepa silvestre (**Fig. 13A**). Un comportamiento similar se observa en la cepa complementada con el gen en *trans* (*A.*

baldaniorum 3A13). Lo que representa que, a pesar de que esta bacteria presenta una mayor dosis génica con respecto a la silvestre, esto no fue significativo para generar una alteración en el crecimiento de la cepa evaluada.

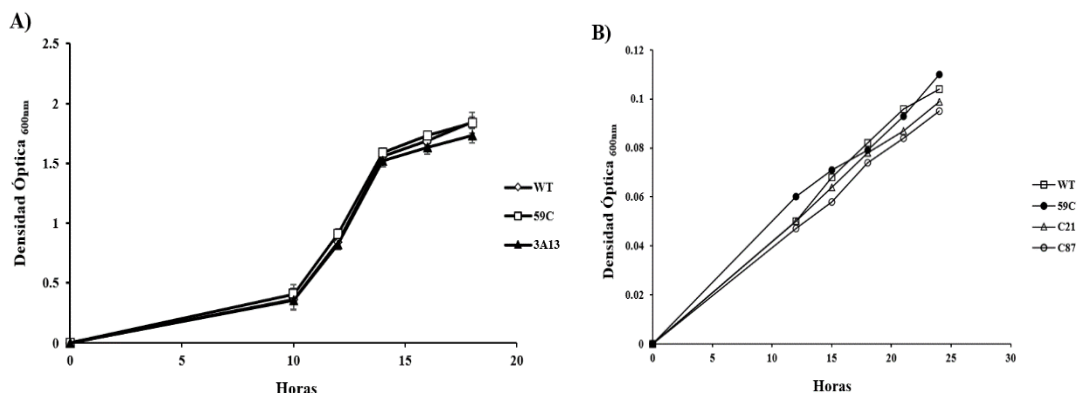


Figura 13. Curvas de crecimiento. **A)** El crecimiento de las cepas silvestre (WT), $\Delta cdgC$ (59C) y complementada en *trans* (3A13) fue evaluado en medio mínimo K-malato, realizando lecturas espectrofotométricas cada 2 horas. **B)** La evaluación de este fenotipo en la cepa complementada en *cis* (C21) y su respectivo control (C87), fue hecho empleando medio NFb, realizando lecturas cada 3 horas. La densidad óptica de los cultivos fue cuantificada en un espectrofotómetro con una longitud de onda de 600nm. La gráfica corresponde a tres ensayos independientes.

Posteriormente, se evaluó si al emplear un medio carente de fuente de nitrógeno, la densidad bacteriana de los cultivos se alteraba. Al realizar la curva de crecimiento con medio NFb no se observó una diferencia en el comportamiento de la cepa mutante (*A. baldaniorum* 59C) con respecto a la silvestre (**Fig. 13B**). De igual manera se confirmó que la cepa complementada en *cis* con el gen *cdgC* (*A. baldaniorum* C21), así como su control (*A. baldaniorum* C87) no presentaron un retraso en su crecimiento al ser comparadas contra la cepa silvestre (*A. baldaniorum* Sp245).

7.6. Producción de biopelícula

El estilo de vida planctónico y sésil es uno de los fenotipos regulado por las fluctuaciones en la concentración intracelular del di-GMPc (Ahmad et al., 2020; Ha & O'Toole, 2015). La formación de biopelícula es un proceso complejo y con un alto grado de regulación, dado que una gran variedad de factores influye sobre la misma. De igual manera se ha determinado una relación entre la producción de biopelícula, la disponibilidad de nitrógeno en el medio y la fijación biológica del mismo (He et al., 2021; D. Wang et al., 2017). Bajo esta premisa, se

procedió a analizar la producción de biopelícula en las distintas cepas generadas utilizando el método de cristal violeta.

Al emplear medio NFb*, el cual cuenta con malato y KNO_3 en su formulación como fuente de carbono y nitrógeno respectivamente, no se observó diferencia estadísticamente significativa entre las cepas evaluadas con respecto a la formación de biopelícula (**Fig. 14A**). Con base en estos resultados, se plantearon nuevos ensayos con la finalidad de determinar si la regulación de este fenotipo se encontraba relacionada con la fuente de nitrógeno disponible en el medio; razón por la cual se utilizó medio NFb, el cual carece de este bioelemento en su fórmula. Al analizar la formación de biopelícula en la cepa mutante (59C), se observó que ésta presenta una marcada disminución con respecto al comportamiento presentado en la cepa silvestre (WT). Por lo que se concluyó que el gen *cdgC* es importante en la producción de biopelícula cuando la bacteria se encuentra en condiciones de fijación de nitrógeno; esta aseveración fue confirmada al evaluar este fenotipo en la cepa complementada (C21), la cual restauró la formación de biopelícula a niveles similares presentados en la bacteria silvestre (**Fig. 14B**).

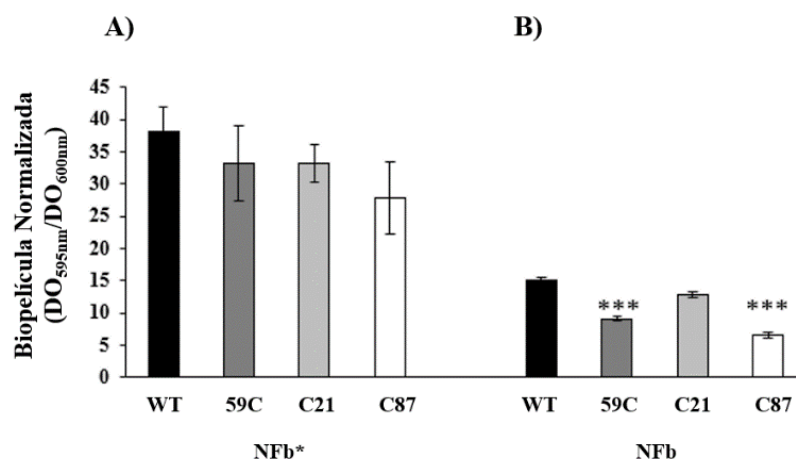


Figura 14. Producción de biopelícula. La formación de biopelícula fue evaluada con el método de cristal violeta en medio NFb* el cual presenta una relación de $C/N=2$ en su formulación (**A**), y en medio NFb, libre de nitrógeno (**B**). El CV adherido a la biopelícula se cuantificó a una longitud de onda de 595 nm. La normalización del experimento se llevó a cabo relacionando la lectura del CV con el crecimiento bacteriano del cultivo ($\text{DO}_{600\text{nm}}$). Cepa silvestre (WT), ΔcdgC (59C), cepa complementada (C21), control (C87). La gráfica fue realizada a partir de tres ensayos independientes. Los asteriscos refieren a diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) entre las barras correspondientes a las cepas mutante y control con respecto a las referentes de la silvestre y complementada en medio NFb.

7.7. Determinación de formación de biopelícula y producción de exopolisacáridos empleando microscopía confocal

La biopelícula es una comunidad bacteriana que se encuentra en constante modificación, alterando no solamente su composición, sino también su distribución espacial (Davey & O'toole, 2000; Hartmann et al., 2019). Estas comunidades de microorganismos se encuentran embebidas en una matriz compuesta principalmente por proteínas, polisacáridos y ADNe (Flemming & Wingender, 2010). Debido a esto, se han desarrollado diversas técnicas para estudiar la arquitectura y composición de las biopelículas producidas por distintos géneros bacterianos (Ravaioli et al., 2020).

En este estudio, se etiquetaron las cepas con la proteína verde fluorescente (eGFP) codificada en el vector pMP2444. Esto permitió analizar, mediante microscopía confocal, la configuración tridimensional adoptada por estas comunidades bacterianas, mientras que el uso de un fluoróforo, como el Calcofluor-White, con afinidad hacia compuestos con enlaces β -1,3 y β -1,4 (Del Gallo et al., 1989), posibilitó la visualización de probables exopolisacáridos, componente de la matriz de la biopelícula. De acuerdo con los resultados generados, la cepa mutante (*A. baldaniorum* 59C-GFP) no presentó una alteración en la arquitectura y grosor de esta estructura al ser comparada con la cepa silvestre (*A. baldaniorum* GFP). Sin embargo, al analizar la producción de los exopolisacáridos, las cepas silvestre y complementada (*A. baldaniorum* 2A65) mostraron una distribución homogénea (**Fig. 15**) de la fluorescencia azul, la cual corresponde a la unión de probables exopolisacáridos con el CW. Por el contrario, las cepas mutante y control (*A. baldaniorum* 2D8) presentaron una producción pobre de estas moléculas, lo cual quedó de manifiesto en los paneles correspondientes al calcoflúor así como en los gráficos de intensidad de fluorescencia (**Fig. 15**).

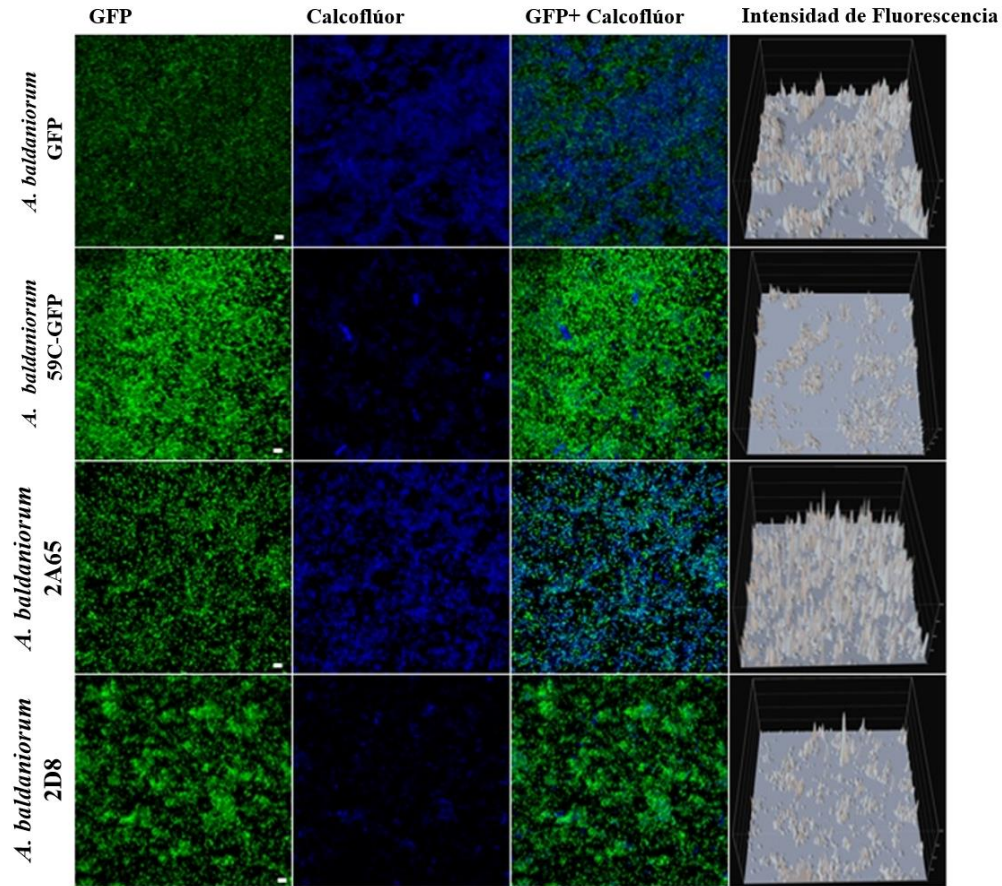


Figura 15. Formación de biopelícula y producción de exopolisacáridos. Ensayos empleando cultivos de biopelícula madura (5 días). Los paneles GFP corresponden a las bacterias marcadas con la proteína verde fluorescente. En la columna Calcoflúor se visualiza el componente de la matriz de la biopelícula con afinidad hacia este fluoróforo. En los paneles del extremo derecho, se graficó la intensidad de la fluorescencia emitida por el calcoflúor. Cepa silvestre (*A. baldaniorum* GFP), $\Delta cdgC$ (*A. baldaniorum* 59C-GFP), cepa complementada (*A. baldaniorum* 2A65), control (*A. baldaniorum* 2D8). Las imágenes son representativas de tres ensayos independientes.

7.8. Cuantificación de la unión de calcoflúor a la matriz de la biopelícula

Para corroborar los resultados obtenidos en los ensayos de formación de biopelícula previamente realizados, se plantearon experimentos para cuantificar la unión del calcoflúor a la matriz de la biopelícula. Estos ensayos se realizaron empleando dos medios distintos, uno de ellos con una desproporción de fuente de carbono/nitrógeno (NFb*), mientras que el segundo medio fue carente de nitrógeno (NFb). Las cepas inoculadas en medio NFb* no presentaron diferencia estadísticamente significativa entre ellas (**Fig. 16A**); mientras que, en los cultivos con NFb, la cepa mutante presentó una disminución en la unión a calcoflúor con

respecto a la silvestre, comportamiento que fue restaurado en la cepa complementada (**Fig. 16B**).

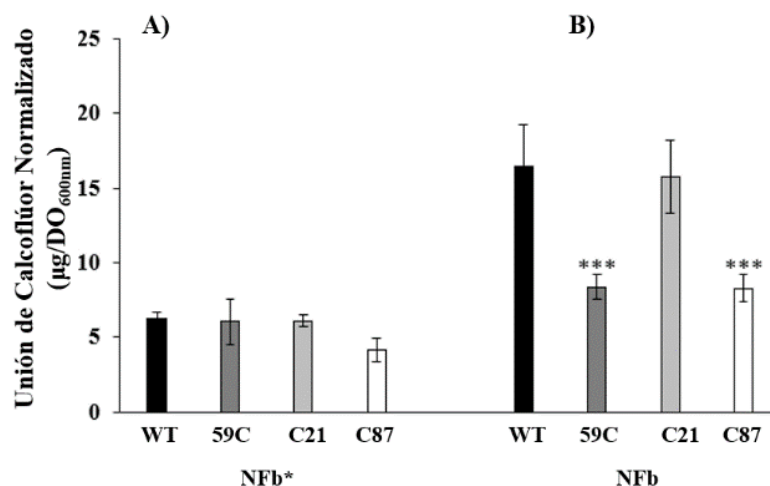


Figura 16. Cuantificación de la unión de calcoflúor a la matriz de la biopelícula. La unión hacia el fluoróforo fue evaluada en medio NFb* el cual presenta una relación de C/N =2 en su formulación (**A**), y en medio NFb, libre de nitrógeno (**B**). El calcoflúor adherido a la matriz de la biopelícula fue cuantificado a longitud de onda de 355 nm y extrapolando el resultado en una curva estándar. La normalización del experimento se llevó a cabo relacionando la lectura del CW con el crecimiento bacteriano del cultivo (DO_{600nm}). Cepa silvestre (WT), $\Delta cdgC$ (59C), cepa complementada (C21), control (C87). La gráfica fue realizada a partir de tres ensayos independientes. Los asteriscos refieren a diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) entre las cepas mutante y control con respecto a las cepas silvestre y complementada en medio NFb.

7.9. Movilidad bacteriana

De manera similar que la formación de biopelícula, el di-GMPc está involucrado con la movilidad bacteriana. Existen numerosos reportes que asocian concentraciones intracelulares altas de este segundo mensajero con la formación de biopelícula (Hengge, 2009; Jenal et al., 2017), mientras que niveles bajos de esta molécula favorecen la taxis bacteriana (McDougald et al., 2012; Richter et al., 2019; Valentini & Filloux, 2016).

Bajo la premisa que la mutación de una DGC, como teóricamente es CdgC, conlleva a una disminución en la poza intracelular del di-GMPc, lo cual se traduce en un incremento en el desplazamiento bacteriano, se decidió evaluar y comparar la movilidad de las distintas cepas reportadas en este trabajo. Para analizar la posible alteración en dicho comportamiento se empleó medio mínimo adicionado con succinato, malato, piruvato, prolina y fructosa, fuentes de carbono hacia las cuales el modelo de estudio presenta afinidad (Alexandre et al., 2000);

sin embargo, y contrario a lo esperado, no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre las cepas a pesar de haber probado con distintos quimioattractantes (Fig. 17).

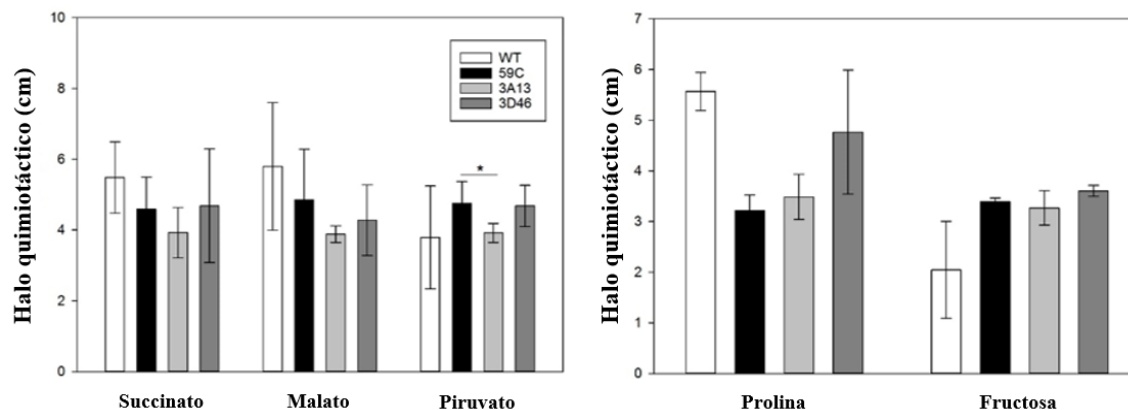


Figura 17. Movilidad bacteriana. Para esta determinación se inocularon 5 μ L de cultivo, conteniendo 2.5-3.0 $\times 10^6$ UFC, en cajas de medio mínimo con agar [0.25 % p/v] adicionado con distintas fuentes de carbono [10 mM]. Tras 24 y 48 h de incubación se midió el halo quimiotáctico (eje Y en la gráfica). Cepa silvestre (WT), $\Delta cdgC$ (59C), cepa complementada (3A13), control (3D48). Las gráficas generadas fueron producto de tres ensayos independientes. Las barras representan la desviación estándar mientras que los asteriscos refieren a una diferencia estadísticamente significativa.

7.10. Estimación de los niveles intracelulares del di-GMPc

De manera cotidiana, el monitoreo de las fluctuaciones en los niveles intracelulares del di-GMPc se realiza de manera indirecta mediante el análisis de fenotipos regulados por este segundo mensajero; esto debido a que estas técnicas son poco costosas y no requieren de equipo sofisticado. Sin embargo, se han desarrollado y aplicado nuevas metodologías las cuales permiten cuantificar de manera directa a este segundo mensajero (Fernandez & Waters, 2019a; Nicastro et al., 2020).

Para estimar los niveles intracelulares de esta molécula, se expresó a la proteína CdgC en un modelo bacteriano heterólogo (Zhou et al., 2016), el cual cuenta con los mecanismos necesarios para la activación de esta proteína, lo que conllevaría a incrementar los niveles intracelulares del di-GMPc, validando así los resultados obtenidos de manera *in silico*.

Para realizar estos ensayos, se empleó un biosensor que presenta afinidad hacia este mensajero (Martínez-Méndez et al., 2021), por lo que al formarse el complejo riboswitch/di-GMPc se favorece la expresión del gen reportero que codifica para la proteína fluorescente

TurboRFP; por lo que la intensidad de la fluorescencia es directamente proporcional a la concentración intracelular de di-GMPc.

De acuerdo con los resultados obtenidos, la proteína CdgC presenta actividad catalítica (**Fig. 18C**) no obstante su expresión se realizó en un modelo heterólogo. Esta producción fue dependiente de la adición del inductor IPTG al medio, el cual propició la síntesis de CdgC, responsable de la producción del segundo mensajero y desencadenar el proceso mencionado anteriormente. Para corroborar la funcionalidad del biosensor, así como de la metodología, se usó como control a la proteína CdgA, una DGC caracterizada de *A. brasilense* Sp7 (Ramírez-Mata et al., 2016). Al analizar la fluorescencia presentada por la cepa que expresa esta proteína, *E. coli* S71.1 pDZ-119 pQE-CdgA, se reafirmaron los resultados descritos (**Fig. 18D**). Finalmente se descartó que el incremento en la producción de di-GMPc haya sido ocasionado por el biosensor o el vector de expresión, esto fue descartado con los controles correspondientes, *E. coli* S71.1 pDZ-119 y *E. coli* S71.1 pGEX, los cuales presentaron mayormente la fluorescencia verde, asignada a la proteína AmCyan (**Fig. 18A-B**).

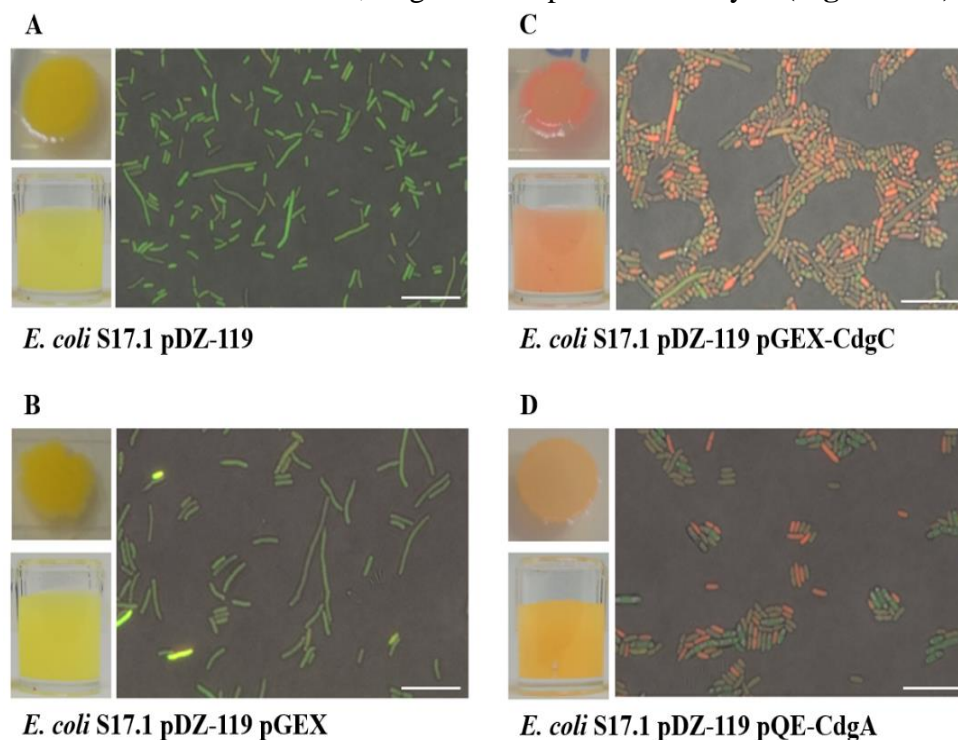


Figura 18. Estimación de los niveles celulares del di-GMPc. **A, B)** Controles negativos (*E. coli* S71.1 pDZ-119, *E. coli* S71.1 pGEX), los cuales presentan la fluorescencia asignada a la proteína AmCyan. **C)** Cepa empleada (*E. coli* S71.1 pDZ-119 pGEX-CdgC) para evaluar la actividad DGC de la proteína CdgC. **D)** Control positivo (*E. coli* S71.1 pDZ-119 pQE-CdgA), donde predomina la fluorescencia roja (TurboRFP). Los paneles presentados corresponden a la superposición de los canales asignados a la TurboRFP, AmCyan y el campo claro. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes en los que se evaluaron al menos tres campos ópticos en cada uno de ellos.

7.11. Ensayos de colonización y competencia bacteriana hacia raíces de trigo

Con base en los resultados obtenidos a hasta este punto, se decidió analizar si la alteración en la producción de exopolisacáridos influía en la interacción de la bacteria con la planta, por lo que se realizaron ensayos de colonización y competencia bacteriana hacia las raíces de trigo. Se inocularon plántulas de trigo con la cepa silvestre, etiquetada con el vector pMP2449 (*A. baldaniorum* 2449), o con la cepa mutante (*A. baldaniorum* 2450) que contenía el plásmido pMP2450. Este marcaje facilitó la cuantificación de las UFC que se encontraron asociadas a la raíz, así como para visualizar la colonización bacteriana hacia esta estructura vegetal al emplear microscopía confocal. En este ensayo de colonización también se llevó a cabo una co-inoculación con ambas cepas en una relación 1:1 para analizar si la presencia de una de éstas influía sobre el comportamiento de la otra.

Los resultados de la colonización demostraron que la cepa mutante (*A. baldaniorum* 2450) no presentó una diferencia estadísticamente significativa en su capacidad de colonizar las raíces de trigo con respecto a la cepa silvestre (**Fig. 19**). Sin embargo, lo interesante radicó en la co-inoculación, la cual exhibió una disminución estadísticamente significativa con respecto a la colonización mostrada por la cepa silvestre (**Fig. 19**).

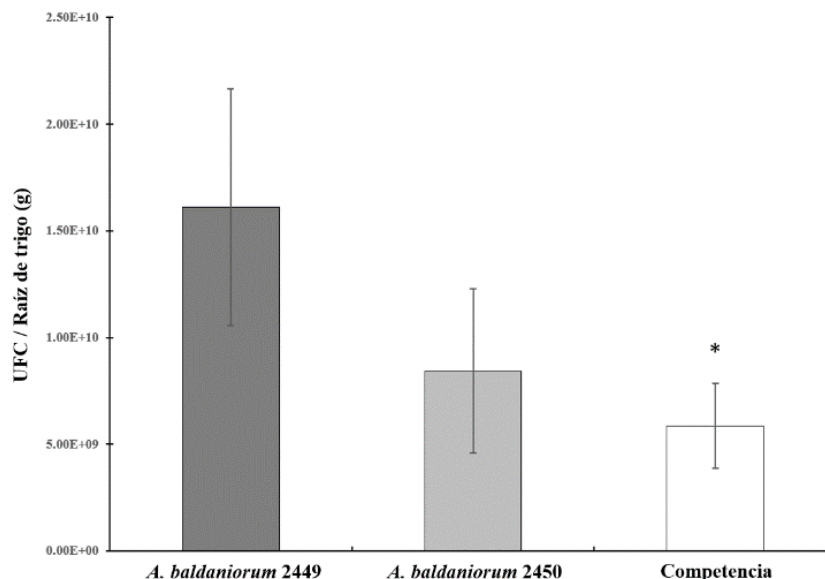


Figura 19. Colonización bacteriana hacia las raíces de trigo. La determinación se realizó empleando a las cepas silvestre (*A. baldaniorum* 2449), mutante (*A. baldaniorum* 2450) y la co-inoculación con las mismas e una relación 1:1 (competencia). La gráfica presentada es producto de tres experimentos independientes. Las barras indican la desviación estándar mientras que los asteriscos refieren diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$).

Los resultados obtenidos permitieron hipotetizar una alteración con respecto a la colonización de la cepa mutante hacia las raíces de trigo, por lo que, aprovechando el marcaje de las cepas analizadas con las proteínas fluorescentes mCherry y eGFP (codificadas en los vectores pMP2449 y pMP2450), se procedió a seccionar raíces de trigo, previamente inoculadas individualmente con estas cepas, para evaluar sus patrones de colonización mediante el uso de la microscopía confocal.

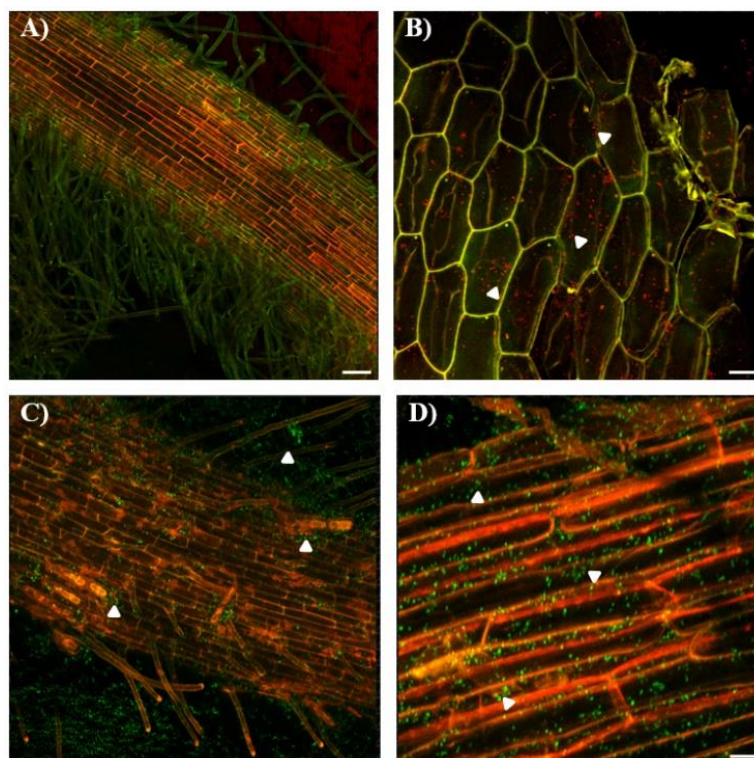


Figura 20. Patrones de colonización bacteriana hacia las raíces de trigo. A) Colonización típica de la cepa silvestre, la cual exhibe la fluorescencia roja característica de la proteína mCherry; mientras que la fluorescencia verde corresponde a la autofluorescencia de la raíz. B) Corte longitudinal de la raíz de trigo; las bacterias se encuentran habitando el espacio intracelular de la raíz. La imagen corresponde a una superposición de los canales verde y rojo. C) Colonización alterada de la cepa mutante. En verde se presentan las bacterias adheridas al exterior de la raíz de trigo, mientras que la fluorescencia roja refiere a la raíz. D) Amplificación sobre la imagen del inciso C. En los incisos B, C y D, las bacterias se encuentran señaladas por puntas de flecha.

Los resultados indicaron que la cepa mutante (*A. baldaniorum* 2450) se encontraba principalmente en la superficie de las raíces formando agregados bacterianos (**Fig. 20C-D**), a diferencia de la cepa silvestre (*A. baldaniorum* 2449) la cual presentó la internalización característica de esta bacteria hacia las raíces de la planta (**Fig. 20A-B**).

7.12. Cuantificación de la internalización bacteriana a raíces de trigo

Azospirillum baldaniorum Sp245 (anteriormente reportada como *A. brasilense* Sp245) es una rizobacteria que tiende colonizar el interior de las raíces de una amplia variedad de plantas (Schloter & Hartmann, 1998). Debido a la alteración en el patrón de colonización hacia raíces de trigo presentado en la cepa mutante (*A. baldaniorum* 59C) se decidió corroborar este comportamiento mediante un ensayo cuantitativo. Para esto, se probaron diversos protocolos de desinfección externa enfocados en eliminar las bacterias adheridas al exterior de la raíz. La metodología establecida, basada en el uso de hipoclorito de sodio, determinó que la cepa mutante disminuyó su capacidad de internalizar y habitar en el espacio intracelular de las raíces de trigo (**Fig. 21**) en comparación con la cepa silvestre. Este fenotipo se revirtió en la cepa complementada (**Fig. 21**), por lo cual se concluyó que el gen *cdgC*, y por consiguiente la proteína que codifica, es importante para permitir una eficiente internalización hacia las raíces de trigo en la bacteria *A. baldaniorum* Sp245.

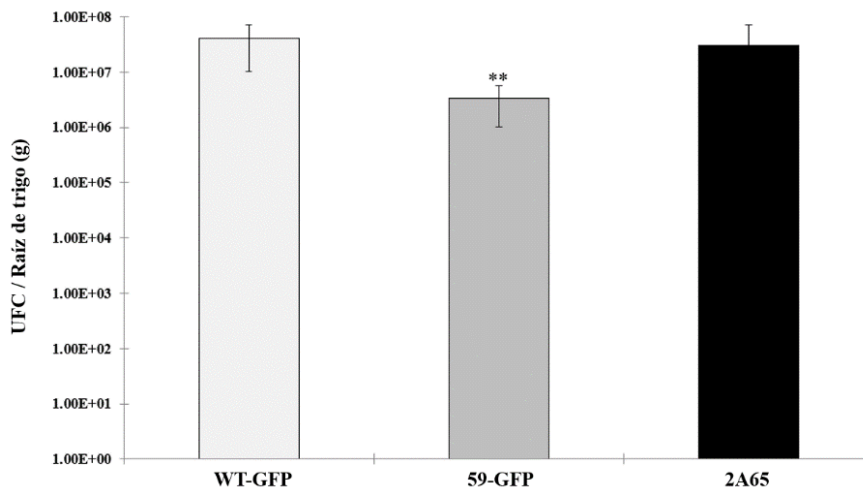


Figura 21. Cuantificación de la internalización bacteriana a raíces de trigo. Seis plantas de trigo fueron inoculadas con 1×10^7 UFC/mL de las cepas silvestre (WT-GFP), mutante (59C-GFP) y complementada (2A65). Las raíces fueron desinfectadas superficialmente, pesadas, maceradas y este producto fue cultivado en cajas de rojo Congo adicionado con Gm. El gráfico generado es producto de tres ensayos independientes. Las barras representan la desviación estándar mientras que los asteriscos refieren a una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$).

7.13. Clasificación de las probables proteínas NUDIX en *A. baldaniorum* Sp245

Los primeros reportes de búsquedas de proteínas NUDIX en diversos organismos, relacionaban el número de estas con respecto al tamaño del genoma (McLennan, 2006).

Sin embargo, diversas investigaciones llevadas a cabo en los últimos años hipotetizan que la cantidad de hidrolasas tipo NUDIX codificadas en los genomas, es dependiente del grado de complejidad del ciclo de vida de los organismos. Esta conjetura puede sustentarse al analizar a la bacteria radiotolerante *D. radiodurans*, la cual presenta hasta 26 genes relacionados con estas enzimas, mientras que en el organismo patógeno *Mycobacterium tuberculosis* se han reportado 9 proteínas tipo NUDIX. Un caso excepcional son las especies pertenecientes al género intracelular *Mycoplasma*, las cuales carecen de genes codificantes para estas hidrolasas (Awile et al., 2010; Fisher et al., 2004; Kapoor et al., 2019).

En el caso de *A. baldaniorum* Sp245, y de acuerdo con los parámetros establecidos, se localizaron 14 secuencias codificantes para proteínas tipo NUDIX. La mayoría de estas secuencias se ubicaron en el cromosoma bacteriano, seguido por el crómido uno, que presenta dos probables proteínas. El resto de estas se distribuyeron en los crómidos tres y cuatro, y en el plásmido seis (**Tabla 4**).

Tabla 4. Probables proteínas NUDIX codificadas en el genoma de *A. baldaniorum*

Localización	Proteína	Longitud (aa)	Dominios (SMART)	E-value (SMART)	Peso Teórico (kDa)	Probable Sustrato	Caja NUDIX G-(X5)-E-(X7)-R-E-(X2)-E-E-x-G-U
Cromosoma (*9)	AWJ90875.1	148	NUDIX NUDIX_4	2.2E-21 9.8E-24	15.88	8-oxo-dGTP	GKVDAGETPEAALVRELKEELGI
	AWJ90658.1	166	NUDIX	1.10E-26	18.62	Ap ₄ A / ARNm	GGIDEGEGVHEAALRELKEEIGT
	AWJ89801.1	203	NUDIX	2.20E-17	22.48	ADP-Ribosa	GLLDDGETPEQVARREALLEEAGC
	AWJ90328.1	323	NUDIX-like NADH-Ppase NUDIX	7.6E-8 7.5E-11 2.4E-19	34.49	NAD ⁺ (H)	GFIEAGETIEQAARRETREEAGV
	AWJ91035.1	314	NUDIX-like NADH-PPase NUDIX	1E-13 1.5E-10 2.9E-15	34.3	NAD ⁺ (H)	GFVEPGESLEDSVREVL EEVGL
	AWJ89098.1	283	DUF4743	1.20E-26	31.46	Tiamina	GGQPIGLTLAENLVKEAQEEAGI
	AWJ89870.1	197	NUDIX	6.30E-17	21.65	Desconocido	GALNPGEEPLAAAKRELLEETGY
	AWJ90853.1	197	NUDIX	1.10E-13	21.85	Desconocido	GGGKKGVEPVESAKRELLEETGQ
	AWJ90737.1	195	Nudix_N_2 NUDIX	1.2E-10 1.2E-11	21.92	FAD	GFMEERESTMEGAAREAWEEARA
	AWJ90125.1	183	*NUDIX	*8.8E-5	19.8	Desconocido	GGYESVTSPLAALQRLFHEQTGL
Crómido 1 (2)	AWJ92450.1	244	NUDIX	4.70E-16	26.61	CoA	GRMESDDRDPEPTALRETEEEIGL
	AWJ92124.1	181	NUDIX	3.80E-19	19.78	Desconocido	GGVGKGESLVEAMRREVREEVGL
Crómido 3	AWJ93311.1	572	NUDIX DUF2213	3.9E-20 1.2E-59	62.5	Desconocido	GGADPGETAQAATRESLEEIGR
Crómido 4	AWJ94876.1	154	NUDIX	4.60E-18	16.8	Desconocido	GAQSVGETVFETAVREVLEETGL
Plásmido 6	AWJ93447.1	193	NUDIX	9.70E-15	21.54	Desconocido	GHLSTGEDPLEAAQRELLEETGF

Con respecto a la clasificación en subfamilias de estas probables enzimas NUDIX, se encontraron proteínas con presunta afinidad hacia nucleótidos oxidados, Ap4A, NAD(H), tiamina, FAD y CoA. Por otro lado, y mediante la estrategia empleada, no fue posible identificar los posibles sustratos de 6 de estas secuencias.

Con base en estos resultados preliminares, se podría plantear la presencia de un “core” o núcleo de enzimas implicadas en la regulación de los niveles intracelulares de moléculas o metabolitos cuya acumulación pudiese resultar perjudicial para la bacteria. Dentro de este núcleo, fue interesante hallar dos posibles NAD⁺(H) hidrolasas. Al evaluar las secuencias, una de ellas (AWJ90328.1) presentó un porcentaje de identidad de 27 % con respecto a la proteína de *E. coli* usado de referencia; además que ésta presenta una degeneración parcial en el motivo de unión a NAD⁺(H), por lo que la afinidad hacia esta molécula podría ser inferior con respecto a la exhibida por la proteína AWJ91035.1 (datos no presentados).

7.14. Análisis de la proteína NudX

La proteína AWJ90125.1, denominada en este trabajo como NudX, presenta características interesantes para analizar. Se encuentra codificada en el cromosoma de *A. baldaniorum* Sp245 y está constituida por 552 pb que codifican para 183 aminoácidos. El peso molecular teórico es de aproximadamente 19.8 kDa (**Tabla 1**). Al evaluar su estructura primaria en la plataforma SMART, y a diferencia de las otras 14 probables proteínas presentadas en la Tabla 1, NudX no presentó un dominio NUDIX en su estructura, sino que cuenta con un dominio denominado “**d1mut_**” ubicado en los aminoácidos 1-96 con un E-value de 2E-7. Este dominio forma parte de la clase E.C.3.6.1, la cual comprende a hidrolasas que actúan sobre anhídridos que contienen fósforo en su estructura. Análisis posteriores de NudX en la plataforma Pfam, arrojaron la presencia de un dominio NUDIX en ésta. Éste abarca del aminoácido 1 al 150 y presenta un E-value de 8.8E-5.

Con la finalidad de profundizar en este análisis y evaluar la presencia de la caja NUDIX en esta proteína, el grado de conservación de ésta, así como la existencia de motivos de unión hacia diversos sustratos, se procedieron a realizar alineamientos contra hidrolasas NUDIX previamente caracterizadas como MutT, la ARN pirofosfohidrolasa, NADH hidrolasa y

ADP-ribosa hidrolasa de *E. coli*, así como a la diadenosín tetrafosfato hidrolasa de *L. angustifolius* y la CoA pirofosfohidrolasa de *D. radiodurans*.

El alineamiento de la caja NUDIX, demostró que la región correspondiente a este motivo en la proteína NudX (residuos 47-69) de *A. baldaniorum* Sp245 presenta marcadas degeneraciones (**Fig. 22**). Los sitios donde se deberían encontrar ácidos glutámicos (posiciones 7, 16 y 19 de la caja NUDIX) están ocupados por treonina, leucina y glutamina, respectivamente. Debido a la relevancia de los ácidos glutámicos con respecto a la coordinación de los iones metálicos necesarios para la actividad catalítica de estas enzimas, este hallazgo pone en entredicho la probable actividad enzimática de NudX; sin embargo, no se descarta un comportamiento no canónico de ésta o la probable regulación mediante la interacción con otras proteínas que pudiese presentar dicha proteína.

MutT_Ecoli	G	K	I	E	M	G	E	T	P	E	Q	A	V	V	R	E	L	Q	E	E	V	G	I
RppH_Ecoli	G	G	I	N	P	G	E	S	A	E	Q	A	M	Y	R	E	L	F	E	E	V	G	L
ADPR_Ecoli	G	M	I	E	E	G	E	S	V	E	D	V	A	R	R	E	A	I	E	E	A	G	L
NADHP_Ecoli	G	F	V	E	V	G	E	T	L	E	Q	A	V	A	R	E	V	M	E	E	S	G	I
Ap4AH_Langustifolis	G	G	I	D	E	G	E	D	P	R	N	A	A	I	R	E	L	R	E	E	T	G	V
CoAP_Dradiodurans	G	S	L	D	A	G	E	T	P	T	Q	A	A	L	R	E	A	Q	E	E	V	A	L
NudX	G	G	Y	E	S	V	T	S	P	L	A	A	L	Q	R	L	F	H	E	Q	T	G	L

Figura 22. Alineamiento de la probable caja NUDIX de NudX. Presentación y alineamiento de la caja NUDIX de NudX contra este motivo de enzimas caracterizadas y aisladas de *E. coli*, *L. angustifolius* y *D. radiodurans*. Encerrados en rectángulos rojos se presentan aminoácidos relevantes en este motivo.

Debido a los resultados previamente descritos, y con el propósito de identificar probables sitios de unión hacia sustratos, se procedieron a realizar alineamientos contra motivos descritos de hidrolasas NUDIX representativas de diversas subfamilias.

El diadenosín tetrafosfato (Ap4A) es un miembro del grupo del diadenosín polifosfato (N=3-6). Esta molécula se encuentra presente en eucariotes, procariotes y virus. En bacterias, se ha descrito que fluctuaciones en la concentración intracelular del Ap4A está relacionado con la respuesta hacia condiciones de estrés (Kraszewska, 2008; Lundin et al., 2003). Un aspecto importante a considerar en las enzimas implicadas en la degradación del Ap4A, es que presentan un residuo conservado de tirosina localizado a 16-18 aminoácidos río abajo con respecto a la última glicina que forma parte de la caja NUDIX (Kraszewska, 2008; Srouji et

al., 2017). Al realizar la búsqueda de esta tirosina en la secuencia de NudX, los resultados fueron infructíferos, dado que esta proteína carece de este aminoácido en comparación con la Ap4A hidrolasa de *L. angustifolius* y la probable Ap4AH de *A. baldaniorum* Sp245 (AWJ90658.1) (Fig. 23).

```

Ap4AH_Langustifolius  DAWQMPQGGIDEGEDPRNAAIRELREETGVTSAEVIAEVPYWLTYYDFP
AWJ90658.1          DAWQMPQGGIDEGEGVHEAALRELKEEIGTDKAEILGETAEKLRYYDLP
NudX                GQWAVPGGGYESVTSPLAALQRLFHEQTGLAFPDGRTAE-----
  
```

Figura 23. Búsqueda de la tirosina característica de las Ap4AH en NudX. Alineamiento de la caja NUDIX y su región río abajo de la diadenosín tetrafosfato hidrolasa de *L. angustifolius* contra AWJ90658.1 y NudX. En rojo se encuentra delimitada la caja NUDIX mientras que la tirosina, característica de esta subfamilia enzimática, se presenta encerrada en un rectángulo verde.

Para continuar la búsqueda de posibles sitios de reconocimiento hacia sustratos se comparó la secuencia de NudX contra la ADP-ribosa hidrolasa de *E. coli*, la cual es un miembro de una subfamilia de enzimas NUDIX con afinidad hacia esta molécula y que presentan una prolina conservada y ubicada 14-16 aminoácidos río abajo de la última glicina que constituye a la caja NUDIX (Gabelli et al., 2001; Okuda et al., 2005). Sin embargo, los resultados demostraron que NudX carece de este residuo en comparación con la ADPR de *E. coli* y la secuencia AWJ89801.1 de *A. baldaniorum* Sp245, la cual pudiese ser clasificada en esta subfamilia (Fig. 24).

```

ADPR_Ecoli          GMIEEGESVEDVARREAIEEAGLIVKRTKPVLS-----FLASPPGG
AWJ89801.1         GLLDDGETPEQVARREALLEEAGCTVQDIETICD-----YYPSPGA
NudX               GGYESVTSPLAALQRLFHEQTGLAFPDGRTAEPWRPTSRSTLYFVPMTGL
  
```

Figura 24. Evaluación de la presencia de la prolina característica de las ADPR hidrolasas en NudX. Alineamiento de la caja NUDIX (rectángulo rojo) y su región río abajo. En las proteínas ADPR hidrolasa de *E. coli* y la probable proteína con función similar, AWJ89801.1, de *A. baldaniorum* Sp245, la prolina (rectángulo verde) se encuentra distanciado por 15 residuos con respecto a la última glicina de la caja NUDIX en comparación con la secuencia de NudX, la cual presenta una treonina en dicha posición.

Finalmente, la secuencia de NudX fue comparada contra la NADH y CoA pirofosfohidrolasa de *E. coli* y *D. radiodurans*, respectivamente.

Las enzimas pertenecientes a la subfamilia con afinidad hacia el NAD⁺(H) cuentan en su estructura con un motivo conservado de unión a esta molécula, cuya secuencia es

SQPWFPXS, donde la X refiere a cualquier aminoácido, separado por 10 residuos de la caja NUDIX (Fisher et al., 2004; Kimura et al., 2018). Sin embargo, al analizar a la proteína NudX, se descubrió que ésta carece de este motivo en comparación con la NADHP de *E. coli* y las secuencias AWJ90328.1 y AWJ91035.1 de *A. baldaniorum* Sp245 (**Fig. 25**).

```
NADHP_Ecoli VLA GFVEVGETLEQAVAREVMEESGIKVKNLRYVTSQPWFPQSLM
AWJ90328.1 GFA GFIEAGETIEQAARRETR EAGV DLVSVRYLFSQPWFPFHVLT
AWJ91035.1 VLA GFVEPGESLEDSVRREVL EEVGL E VTD IRYHSSQPWFPFSSLM
NudX      - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
```

Figura 25. Búsqueda del motivo de unión a NAD(H) en NudX. Delimitadas por un rectángulo rojo se presentan las cajas NUDIX de la proteína de estudio y aquellas empleadas como referencias. Río abajo, y encerrados por un rectángulo rojo, se muestra el motivo de unión a NAD(H) con secuencia conservada SQPWFPxS. Las proteínas AWJ90328.1 y AWJ91035.1 corresponden a probables NADHP de *A. baldaniorum* Sp245.

Con el objetivo de evaluar si NudX es miembro de las CoA hidrolasas, se realizó el alineamiento correspondiente empleando a la CoA pirofosfohidrolasa del extremófilo *D. radiodurans* como proteína de referencia. Cabe mencionar que las CoA hidrolasas cuentan en su estructura con un motivo denominado como UPF0035, NuCoA o caja CoA, el cual presenta una secuencia (L/M)(L/F)TXR(S/A)[3X](R/K)[3X]G[3X]FPGG localizado río arriba de la caja NUDIX y el cual se hipotetiza que está encargada en el reconocimiento y catálisis de la CoA (Fisher et al., 2004; Kang et al., 2003; Kerr et al., 2019). De acuerdo con el resultado del alineamiento, NudX presenta algunos aminoácidos conservados de la NuCoA, sin embargo, es notable la degeneración en la mayor parte del motivo (**Fig. 26**). Al evaluar el porcentaje de identidad de NudX hacia la CoAP de *D. radiodurans*, éste es de aproximadamente 21 %, mientras que la proteína AWJ92450.1, catalogada como una probable CoAP, muestra un porcentaje cercano al 32 %.

```
CoAP_Dradiodurans L L T - - VRSELPTHKGQIAFPGGSLDAGE - TPTQAALREAQEVEALDPAA
AWJ92450.1       I F T - - QRTANLTAHAGQISFPGRMESDDRDPEdTALRETEEEIGLGRDH
NudX            W W G R S P A E P R V I D A A G Q W A V P G G Y E S V T - S P L A A L Q R L F H E Q T G L A F P D
```

Figura 26. Alineamiento de NudX contra la CoAP de *D. radiodurans*. La secuencia de NudX se alineada y comparada contra la CoAP de *D. radiodurans*, la cual se empleó como proteínas de referencia. Encerrado en un rectángulo azul se muestra la NuCoA o caja CoA, mientras que delimitadas por un rectángulo rojo se presentan las cajas NUDIX. La proteína AWJ92450.1 corresponde a una probable CoAP de *A. baldaniorum* Sp245.

8. Discusión

Debido a la plétora de actividades influenciadas por la concentración intracelular del segundo mensajero, di-GMPc, la síntesis y degradación de éste se lleva a cabo de manera precisa y regulada. La producción de esta molécula es efectuada por diguanilato ciclasa (DGC) mientras que su degradación es realizada por fosfodiesterasas (PDE). Diversos reportes señalan que la cantidad de genes codificantes para proteínas implicadas en el metabolismo del di-GMPc en genomas bacterianos depende del estilo de vida del microorganismo y las diversas actividades que pudiese realizar (Valentini & Filloux, 2016); por lo que en bacterias como *E. coli* K-12 y *P. aeruginosa* PAO1, se han reportado 29 y 40 proteínas responsables de la transformación del di-GMPc, respectivamente (Feng et al., 2020; Lacanna et al., 2016); mientras que en *V. cholerae*, un microorganismo que puede colonizar tanto el aparato gastrointestinal del ser humano como adherirse a estructuras quitinosas de moluscos, cuenta con 53 enzimas de este tipo (Zamorano-Sánchez et al., 2019). En el caso de rizobacterias fijadoras de nitrógeno como *S. meliloti* Rm1021 o *B. japonicum*, se han encontrado 21 y 55 proteínas respectivamente codificadas en sus genomas que están relacionadas con el metabolismo del di-GMPc (Schäper et al., 2016). Finalmente, y en nuestro modelo de estudio *A. baldaniorum* Sp245 (previamente clasificado como *A. brasilense* Sp245) (Ferreira et al., 2020), destaca la presencia de 35 enzimas implicadas en regular los niveles intracelulares del di-GMPc; de éstas, 20 corresponden a proteínas de tipo DGC, 5 con actividad PDE y las 10 restantes híbridas que presentan ambos dominios en su estructura (Ramírez-Mata et al., 2018).

Entre estas proteínas de tipo DGC codificadas por el genoma de *A. baldaniorum* Sp245 se encuentra la enzima analizada en este trabajo, la cual fue denominada como CdgC. La secuencia del gen *cdgC* (código NCBI: Sp245p_10175) que codifica para la proteína AWJ90124.1 o CdgC (**Fig. 7-9**), se encuentra presente en el cromosoma de *A. baldaniorum* Sp245. Experimentos llevados a cabo previamente demostraron que la mutación de este gen mediante la inserción del gen reportero de la glucoronidasa así como un casete de resistencia a estreptomycin (*uidA/aad*), produce una cepa que presenta un retraso en el crecimiento así como una disminución en la formación de biopelícula y movilidad bacteriana (Romero-Pérez, 2015); este último fenotipo refiere un comportamiento no canónico, el cual se puede haber generado por la sobreexpresión del gen río abajo de *cdgC*, denominado como *nudX*, ya

que reportes señalan que el uso de este bloque (*uidA/aad*) conlleva a la alteración en la tasa de transcripción de los genes que se encuentren río abajo de la inserción (Metcalf & Wanner, 1993). Es importante mencionar que se hipotetizó que los genes *cdgC* y *nudX* conformaban una misma unidad transcripcional, esto debido a que ambos presentan el mismo sentido de transcripción además de que la región intergénica entre ellos es de 68 pb (**Fig. 5**) y de acuerdo con datos generados *in silico*, no se evidenciaba la presencia de probables elementos promotores regidos por $\sigma 70$ en esa dicha región lo cuales pudiesen regular la expresión de *nudX*. Sin embargo, al evaluar la expresión de dichos genes, se descubrió que cada uno de ellos conforma su propia unidad transcripcional (**Fig. 6**), descartando que se tratara del operón *cdgC* y *nudX*. Adicional a esta evidencia experimental, el empleo de nuevos programas bioinformáticos evidenció la presencia de probables cajas -12 y -24, elementos necesarios para la regulación mediada por $\sigma 54$ (Toscano-Jiménez, 2021).

Puesto que la producción y degradación del di-GMP se desencadena por las condiciones del medio en donde se desarrolle el microorganismo, no es de sorprender que la actividad de las enzimas DGC o PDE sea regulada por dominios accesorios presentes en la misma estructura proteica. Estos dominios son los encargados de detectar y responder, mediante la activación o inhibición del dominio aledaño a ellos, hacia diversos estímulos ambientales, extracelulares o intracelulares. De manera general, estos dominios accesorios pueden percibir a los denominados como primeros mensajeros (luz, pH, condiciones REDOX, O₂, NO, fitohormonas, etcétera), ligarlos y producir un cambio conformacional en la estructura tridimensional de la proteína alterando su función. Entre estos dominios de detección o accesorios se pueden enlistar a los transmembranales, REC, PAS/PAC, CACHE, CHASE, GAF, MASE (Cruz-Pérez et al., 2021; Ribbe et al., 2017; Valentini & Filloux, 2016).

La proteína CdgC se encuentra conformada por un dominio REC y un dominio GGDEF (**Fig. 7**), por lo que presenta una arquitectura similar a la enzima WspR de *P. aeruginosa*; mientras que también presenta cierta similitud a PleD de *C. crescentus*; ambas proteínas han sido ampliamente estudiadas, presentan actividad DGC (Aldridge et al., 2003; Hickman et al., 2005). A diferencia de PleD, que presenta 2 dominios REC asociados a un GGDEF, involucrada en el desarrollo del ciclo celular de *C. crescentus* (Paul et al., 2004), WspR cuenta con un dominio REC ligado a un GGDEF (**Fig. 8**). Esta proteína está implicada en un

sistema de transducción de señales, denominado como Wsp, el cual se activa en respuesta a la adherencia bacteriana sobre una superficie sólida. Esta activación y señalización mediada por el sistema Wsp converge en la fosforilación del dominio REC conllevando a la activación del dominio GGDEF incrementando la concentración intracelular del di-GMPc y, favoreciendo así, la formación de biopelícula (Güvener & Harwood, 2007; Malone et al., 2007). Debido a la homología presentada hacia WspR y PleD, se hipotetizó que CdgC podría estar implicada en la regulación de fenotipos similares a los controlados por las proteínas previamente mencionados. Con respecto al dominio REC de CdgC, éste presentó el ácido aspártico (D₅₁) característico, que es sometido a fosforilación para promover la activación del dominio GGDEF (**Fig. 8A**) (Bourret, 2010; Chan et al., 2004), en una posición similar a los residuos correspondientes de los dominios REC1 y REC de PleD y WspR, respectivamente (**Fig. 8A**).

El gen *wspR* en *P. aeruginosa*, ocupa el último lugar en un clúster génico comprendido por los miembros codificantes del sistema Wsp (*wspABCDEF*) donde cada uno de ellos cumple una función específica en la transducción de la señal, la cual concluye en la fosforilación, mediada por la cinasa histidínica WspE, y activación de la proteína WspR (Francis et al., 2017; Güvener & Harwood, 2007; Kessler et al., 2021). Al analizar el contexto genético del gen *cdgC* (regiones flanqueantes a éste de 14 Kb) con la finalidad de localizar el gen codificante para la probable cinasa histidínica encargada de la fosforilación del dominio REC de CdgC, no se encontró ningún gen que pudiese codificar para este tipo de proteína (datos no mostrados), por lo que hipotetizamos que CdgC se podría catalogar como un regulador de respuesta huérfano el cual pudiese ser activado por alguna de las más de 200 histidín cinasas codificadas en el genoma de *A. baldaniorum* Sp245 (Borland et al., 2015).

Con respecto al dominio GGDEF de CdgC, éste está conformado por 154 aminoácidos; sin embargo y a diferencia de otros dominios de este tipo reportados en la literatura, el CdgC-GGDEF presenta en su estructura tridimensional 5 láminas β -plegadas de acuerdo con los resultados obtenidos en los softwares Phyre2 y I-Tasser (**Fig. 8B-9B**). No obstante, esta alteración en su estructura secundaria, CdgC conserva el núcleo característico $(\alpha/\beta)_5$ de las diguanilato ciclasas. Al comparar contra otras proteínas, CdgC presentó una mayor similitud con respecto a la DGC PA0847, involucrada en la movilidad de *P. aeruginosa* PAO1, cuyo

dominio GGDEF se encuentra conformado por 5 láminas β -plegadas rodeadas por 5 α -hélices, por lo que estos resultados sugerían que CdgC sería funcional (Deepthi et al., 2014; Zähringer et al., 2013).

El di-GMPc controla procesos celulares complejos como la formación de biopelícula, movilidad bacteriana, quimiotaxis, virulencia y progresión del ciclo celular; sin embargo, los fenotipos más comúnmente reportados dependientes de la concentración intracelular de este segundo mensajero son la movilidad y la formación de biopelícula. (Feng et al., 2020; Maunders & Welch, 2017).

Reportes en *P. aeruginosa* han demostrado la contribución diferencial y temporal de las diversas DGC y PDE codificadas en su genoma con respecto a la evolución de la biopelícula. Proteínas como SadC y RoeA están implicadas en las fases tempranas de la formación de esta estructura, mientras que GcbA y NicD son importantes en la etapa de dispersión de esta comunidad bacteriana (Valentini & Filloux, 2016). En el caso de la bacteria de estudio, se ha reportado a una DGC, denominada como CdgD, como pieza importante en el desarrollo de la biopelícula. A diferencia de CdgC, CdgD presenta dominios CHASE, GGDEF y EAL en su estructura; debido a esta conformación, se podrían hipotetizar algunos de los ligandos que pudiesen activar a esta proteína, por ejemplo, el aminoácido prolina. Al mutar el gen codificante de esta enzima, se describió que la formación de biopelícula disminuía sin importar la fuente de nitrógeno presente en el medio, aunque este descenso fue más marcado en presencia de KNO_3 . Con respecto a su papel en la formación de biopelícula, se evaluó la expresión del gen *cdgD* mediante genes reporteros llegando a la conclusión que éste presenta una constante transcripción en las primeras etapas de la producción de biopelícula y que ésta decae posterior a la maduración de esta estructura (Cruz-Pérez et al., 2021). En el caso de CdgC y al no presentar dominios accesorios como PAS/PAC, CHASE o GAF, a excepción de REC, resulta complicado establecer las probables moléculas que activen a la proteína. Distinto a CdgD, la cepa mutante del gen *cdgC* no presentó una disminución en su capacidad de formar biopelícula cuando ésta fue expuesta a medio NFb* adicionado con KNO_3 como fuente de nitrógeno (**Fig. 14A**); sin embargo, al eliminar el KNO_3 del medio y encontrarse en condiciones de fijación de nitrógeno, la cepa mutante presentó un decremento estadísticamente significativo en la formación de biopelícula con respecto a las cepas

silvestre y complementada (**Fig. 14B**), de acuerdo a lo reportado en *A. brasilense* Sp7 y *Pseudomonas stutzeri*, donde la variación de la fuente de nitrógeno disponible en el medio conlleva a una alteración en este fenotipo (Bible et al., 2015; Shang et al., 2021; D. Wang et al., 2017).

La biopelícula refiere a una comunidad bacteriana que se encuentra inmersa en una matriz hidratada compuesta por sustancias poliméricas extracelulares. Estas últimas comprenden principalmente a los exopolisacáridos, ADNe y proteínas, las cuales favorecen la adhesión celular hacia superficies bióticas o abióticas, además que se encuentran implicadas en la interacción célula-célula y cuya función principal es proveer de protección a la comunidad bacteriana (Feng et al., 2020; Flemming & Wingender, 2010; Viruega-Góngora et al., 2020).

En este trabajo se evaluó si la mutación del gen *cdgC* conllevaba a una alteración en la producción de los exopolisacáridos presentes en la matriz de la biopelícula. Para esta determinación se empleó al fluoróforo calcoflúor, el cual presenta afinidad hacia compuestos que cuentan con enlaces β -1,3 y β -1,4 en su estructura (Del Gallo et al., 1989; Viruega-Góngora et al., 2020). Los datos cualitativos obtenidos mediante microscopía confocal demostraron que la cepa *A. baldaniorum* 59C presentó una disminución en la unión de este fluoróforo hacia la biopelícula; este resultado fue corroborado al cuantificar esta unión exopolisacáridos-calcoflúor en las distintas cepas evaluadas. Similar a la determinación de la producción de biopelícula, no se presentó diferencia entre las cepas cuando éstas se cultivaron en medio NFb* (**Fig. 16A**), sin embargo, en condiciones de fijación de nitrógeno (NFb), la cepa mutante presentó una disminución de la captación de este fluoróforo con respecto a las cepas silvestre y complementada (**Fig. 16B**), por lo que, la mutación del gen *cdgC* provocó una alteración en la cantidad de exopolisacáridos que presentan afinidad hacia este fluoróforo. En bacterias Gram-negativas, como *A. baldaniorum* Sp245, se ha descrito la presencia de al menos 3 tipos distintos de exopolisacáridos asociados a la superficie celular: los exopolisacáridos (con uniones débiles al cuerpo bacteriano), los lipopolisacáridos y los polisacáridos capsulares (enlazados de manera covalente a la célula), los cuales son de suma importancia en el proceso de agregación bacteriana así como en la formación de biopelícula (Burdman et al., 2000; Lerner et al., 2009). Dentro de estos polímeros, los polisacáridos capsulares y exopolisacáridos son los que tienen afinidad hacia el calcoflúor, por lo que

podríamos inferir que la producción de estos disminuyó al mutar el gen *cdgC* (Del Gallo et al., 1989; Sheludko et al., 2008). El mecanismo por medio del cual se regula la producción de los exopolisacáridos deberá definirse en posteriores estudios.

Se ha descrito en distintos modelos bacterianos, que los exopolisacáridos presentes en la biopelícula varían con respecto a factores ambientales, la fuente de carbono y/o nitrógeno presente en el medio, así como que la composición de estos difiere durante las distintas etapas de la biopelícula. Un caso relacionado con este comportamiento es el del originado por la ausencia de la proteína DgcP de *P. aeruginosa* PA14 que se encuentra involucrada en la virulencia. La mutación del gen que codifica para esta proteína conllevó a una disminución en la producción de biopelícula cuando se empleó un medio rico como el LB, mientras que en un medio mínimo M63, la cepa mutante demostró un comportamiento similar a la cepa silvestre con respecto al fenotipo evaluado (Nicastro et al., 2020).

De manera similar, se ha demostrado que, a pesar de que algunas DGC o PDE estén implicadas en la regulación de un mismo fenotipo, el efecto que ejerzan sobre éste será distinto; por ejemplo, las DGC SadC y WspR promueven la producción de los exopolisacáridos Pel y alginato en *P. aeruginosa*, sin embargo, la contribución de SadC en la elaboración de estas moléculas será mayor a la aportada por WspR, sin embargo, ésta última presenta una mayor tasa de síntesis del di-GMPc en comparación con SadC, por lo que se concluye que las distintas DGC codificadas en un genoma bacteriano, contribuirán de manera diferencial en los niveles intracelulares del segundo mensajero; por lo que lo anteriormente planteado pudiese responder en parte la razón por la que la inactivación de la proteína CdgC no genere una alteración en el patrón de movilidad de *A. baldaniorum* 59C, así como produzca una disminución parcial en la producción de biopelícula y en los exopolisacáridos que conforman a esta estructura.

Dada la compleja regulación en las actividades celulares mediadas por el di-GMPc, se ha descrito la especialización de las proteínas DGC y PDE. Por ejemplo, en la cepa de *P. aeruginosa* PA14, la DGC denominada como RoeA está a cargo de la producción de exopolisacáridos, mientras que SadC, otra enzima con actividad DGC, se encuentra involucrada en el control de la rotación flagelar (Ribbe et al., 2017). Esta especialización proteica, o “división de labores” como se le ha denominado en *V. cholerae* (Zamorano-

Sánchez et al., 2019), adicionado con la reiteración de genes codificantes para DGC, pudiese explicar que, en la cepa mutante, *A. baldaniorum* 59C, no se presentara diferencia en la movilidad bacteriana hacia los distintos quimioattractantes empleados (**Fig.17**), por lo que, y tomando como referencia a la rizobacteria *S. meliloti* Rm2011, donde la mutación de manera individual de diversos genes que codifican para DGC no conllevó a una alteración en la producción de biopelícula, movilidad celular ni tampoco una disrupción en la simbiosis hacia *Medicago sativa* (Schäper et al., 2016), se sugiere considerar la generación de mutantes dobles y/o triples de genes que codifiquen para proteínas con una arquitectura similar a CdgC.

Debido a la capacidad de *A. baldaniorum* para interactuar con diversas especies vegetales, esta bacteria ha sido catalogada como una rizobacteria que favorece el crecimiento de las plantas (PGPR). Para que la colonización hacia éstas sea llevada a cabo de manera exitosa, la bacteria hace uso de una serie de distintos mecanismos. Se ha descrito que el primer paso para la colonización comprende la movilización celular hacia las raíces vegetales, seguido de una adhesión débil y reversible de los microorganismos hacia estas apéndices, la cual es mediada principalmente por el flagelo; posteriormente esta interacción se torna más fuerte e irreversible dado que las bacterias comienzan a producir exopolisacáridos los cuales promueven su anclaje a la superficie de la raíz (Fernández-Llamosas et al., 2021; Lerner et al., 2009; Rossi et al., 2016; Viruega-Góngora et al., 2020). Tras recapitular, el di-GMPc, que regula la quimiotaxis y formación de biopelícula, es una molécula que media la interacción bacteria-planta, por lo que una alteración en la concentración intracelular bacteriana de esta molécula podría provocar una alteración en esta asociación. De acuerdo con los datos obtenidos por microscopía confocal (**Fig. 20**), la cepa mutante *A. baldaniorum* 59C presentó un patrón de colonización distinto al observado en la cepa silvestre, lo cual sería ocasionado por la modificación en la producción de los exopolisacáridos asociados a la superficie celular, lo que conllevaba a una alteración en la adhesión del microorganismo hacia superficies bióticas (Egorenkova et al., 2001; Shelud'ko et al., 2019; Skvortsov & Ignatov, 1998).

Una gran parte de los microorganismos asociados a plantas presentan un comportamiento endofítico, haciendo referencia a que estos cuentan con la capacidad de internalizar en los tejidos vegetales, sin causarle daño a la planta. En el caso de *A. baldaniorum* Sp245 se ha

descrito que éste puede colonizar el interior de las raíces de diversas plantas, habitando en el xilema y espacio apoplástico de éstas (Hong et al., 2019; Mariotti et al., 2021; Ramirez-Mata et al., 2018); a diferencia de la cepa *A. brasilense* Sp7 la cual coloniza de manera exclusiva la superficie externa de las raíces (Pogorelova et al., 2009). Usualmente estos endófitos emplean heridas o zonas de brote de raíces laterales como puerta de entrada hacia la planta (Fernández-Llamosas, 2021); sin embargo, algunos de estos microorganismos cuentan con genes que codifican para proteínas cuya función consiste en degradar la pared vegetal de las raíces de la planta y así permitir la internalización bacteriana. En el fitopatógeno *D. dadantii* se ha descrito la presencia de enzimas de tipo pectato liasas, las cuales son empleadas por la bacteria para internalizarse en su hospedero. Recientemente se ha reportado que dos enzimas, GcpA y EGcpB, una DGC y PDE, respectivamente, regulan la síntesis de la pectato liasa a través del pequeño ARN RsmB (Yuan et al., 2020). En el caso de la bacteria analizada en este trabajo, *A. baldaniorum* Sp245, se ha evidenciado que ésta presenta actividad celulolítica. Al evaluar el genoma de esta cepa, se localizaron de tres genes que codifican para proteínas ortólogas a celulasas caracterizadas previamente (Wisniewski-Dyé et al., 2011), por lo que no se descarta que fluctuaciones en la concentración intracelular del di-GMPc influya sobre la capacidad celulolítica de las proteínas anteriormente mencionadas, lo que haya conllevado a la alteración en el patrón de colonización presentado por la cepa mutante (**Fig. 20**).

De acuerdo con los resultados cualitativos obtenidos mediante la microscopía confocal y el etiquetado de las cepas con proteínas fluorescentes y, posterior a la cuantificación de las bacterias que lograron internalizar a las raíces de trigo, se reafirmó la alteración en el comportamiento endofítico de la cepa mutante, la cual presentó una disminución en las UFC/g de raíz obtenidas tras la desinfección superficial y macerado de las raíces, lo que corrobora la información cualitativa obtenida empleando proteínas fluorescentes y microscopía confocal. Estos resultados son similares a los presentados en la rizobacteria *Azoarcus* sp. CIB, donde al mutar el gen *epsF*, implicado en la síntesis de exopolisacáridos, la cepa mutante presentó una disminución de aproximadamente 36 % en la internalización bacteriana hacia las raíces de arroz en comparación con la cepa silvestre (Fernández-Llamosas et al., 2021).

En conjunto, estos resultados demostraron que el gen *cdgC* es importante en la producción de exopolisacáridos que presentan afinidad hacia el calcoflúor y, que la disminución de estos genera una alteración en la interacción de la bacteria con las raíces de trigo; sin embargo, y quizás contrario a lo esperado, la ausencia de la proteína CdgC no evidenció una modificación en la movilidad bacteriana, al menos bajo las condiciones aquí probadas. Este efecto pudiese explicarse mediante la probable especialización de la enzima CdgC (Ribbe et al., 2017; Zamorano-Sánchez et al., 2019). Adicional a esto, es interesante evaluar el amplio número de genes presentes en el genoma de *A. baldaniorum* Sp245 que codifican para presunta proteínas de tipo DGC (Ramírez-Mata et al., 2018). Con base en lo anterior, es digno de mencionar y discutir la presencia de 3 genes que codifican para probables DGC con una arquitectura similar a CdgC (**Fig. 27**).

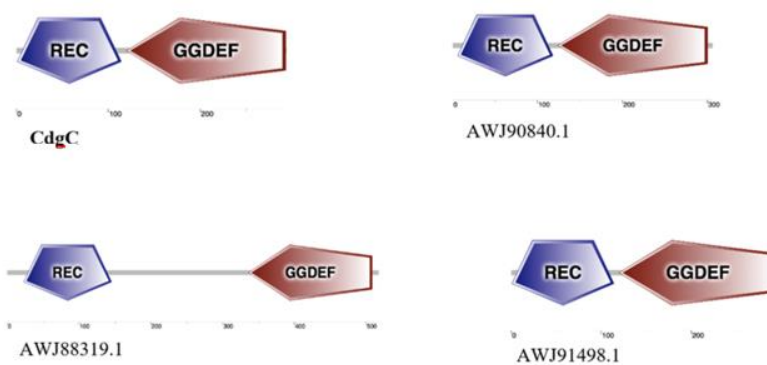


Figura 27. Proteínas homólogas a CdgC en *A. baldaniorum* Sp245. Proteínas de tipo WspR homólogas a CdgC codificadas por el genoma de *A. baldaniorum* Sp245. Las proteínas cuentan con dominios REC ligados a dominios GGDEF. La homología se estableció con un porcentaje de identidad ≥ 30 % con respecto a la secuencia de CdgC.

Al analizar a las proteínas homólogas de CdgC, éstas presentaron porcentajes de identidad en el rango de 38-42 %, lo que sugiere que pudiesen reemplazar la función de CdgC (**Tabla 2**) en la cepa mutante *A. baldaniorum* 59C.

Tabla 5. Proteínas homólogas a CdgC codificadas en el genoma de *A. baldaniorum* Sp245

Cromosoma						
ID	Tamaño	Dominio REC	E-value	Dominio GGDEF	E-value	Porcentaje de Identidad
Cdg	294 aa	1-114	9.92e-33	120-293	4.23e-64	-----
AWJ90840.1	306 aa	6-118	8.69e-38	124-300	5.17e-68	40.74
AWJ88319.1	517 aa	23-145	0.0492	336-508	1.99e-60	38.91
Crómido Uno						
ID	Tamaño	Dominio REC	E-value	Dominio GGDEF	E-value	Porcentaje de Identidad
AWJ91498.1	298 aa	1-114	9.01e-13	120-295	3.55e-57	42.66

Tras un breve análisis en los contextos genéticos de los genes mencionados anteriormente, resulta llamativa la ubicación del gen Sp245p_14075, localizado en el cromosoma bacteriano, el cual codifica para la proteína AWJ90840.1, y río arriba de éste se encuentra un gen que codifica para una probable cinasa histidínica híbrida, la cual podría ser la encargada de fosforilar el ácido aspártico (D₅₅) presente en el dominio REC de AWJ90840.1. Adicional a lo anterior, también resulta interesante mencionar que ambos genes podrían formar parte de un operón de acuerdo con la dirección de transcripción entre estos y los genes aledaños a los mismos (**Fig. 28**).

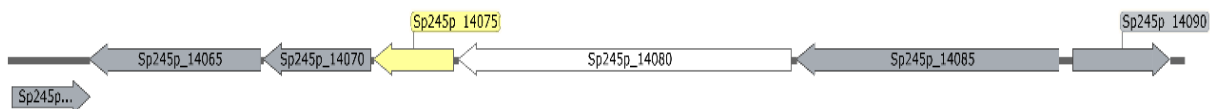


Figura 28. Contexto genético del gen codificante de la proteína AWJ908401.1. Representación del clúster génico donde se encuentra Sp245p_14075. En amarillo se presenta el gen mencionado anteriormente, el cual codifica para la proteína homóloga de CdgC, AWJ90840.1. Coloreado en blanco se muestra el gen Sp245p_14080 cuyo producto es una proteína de tipo cinasa histidínica híbrida. Debido a la dirección de los genes y la región intergénica entre ellos, se hipotetiza la conformación de un operón.

Las proteínas clasificadas dentro de la superfamilia de enzimas tipo NUDIX presentan afinidad hacia sustratos que cuentan en su estructura con entes fosfatados. Entre los sustratos comúnmente reportados se encuentran a los (d)NTPs (canónicos y oxidados), diadenosín polifosfato, coenzimas, caperuzas de ARNm (p)ppGpp (Carreras-Puigvert et al., 2017; García-Saura et al., 2019; Kimura et al., 2018; O’Handley et al., 2001; Srouji et al., 2017). Estas enzimas cuentan, en su secuencia aminoacídica, con un motivo característico y conservado entre los distintos miembros de esta superfamilia. Este motivo, denominado

como caja NUDIX está constituido por 23 aminoácidos (G[5X]E[7X]REUXEEXGU) entre los que destacan los ácidos glutámicos, encargados de la coordinación de los iones metálicos (Mg^{2+} o Mn^{2+}) indispensables para la actividad catalítica de estas enzimas (Duong-Ly et al., 2013; Gabelli et al., 2001; Mildvan et al., 2005; Page et al., 2018; Wolff et al., 2015).

El análisis bioinformático de NudX, la probable proteína de tipo NUDIX evaluada en este trabajo, reveló que ésta presenta un peso molecular teórico que ronda los 19 kDa, un resultado acorde a lo reportado en distintas enzimas NUDIX, las cuales tienden a presentar tamaños que rondan los 16-35 kDa (Duong-Ly et al., 2011; Kraszewska, 2008; McLennan, 2006). Sin embargo, tras analizar la estructura primaria de esta proteína, se descubrió que ésta presenta una caja NUDIX con una secuencia GGYESVTSPLAALQRLFHEQTGL degenerada al ser comparada contra la secuencia canónica G[5X]E[7X]REXXEEXGU. Dentro de esta misma caja se puede delimitar a un motivo denominado como el núcleo de ésta, el cual comprende a la secuencia **REXXEE**, donde destacan los ácidos glutámicos encargados en la unión al cofactor metálico (McLennan, 2006; Mildvan et al., 2005). Al realizar alineamientos entre NudX y enzimas de tipo NUDIX previamente caracterizadas, se confirmó la ausencia de los ácidos glutámicos en el núcleo de NudX (**RLFHEQ**), por lo que, con base en estos resultados, se podría hipotetizar que dicha proteína carece de actividad catalítica o que ésta podría ser mediada por un mecanismo no canónico que no ha sido reportado a la fecha.

A pesar de estos resultados poco alentadores, se continuó analizando a la proteína NudX. Dentro de las distintas subfamilias que conforman a la superfamilia de enzimas NUDIX, existe una caracterizada por su afinidad hacia la GDP-manosa, denominada como GDP-manosa hidrolasas. Estas proteínas presentan una excepción a la regla en cuanto al grado de conservación de la caja NUDIX, dado que exhiben un núcleo con secuencia **RLTMAE** en reemplazo del canónico **REXXEE** (Gabelli et al., 2004; Mildvan et al., 2005); sin embargo, al evaluar la presencia de esta secuencia en NudX, se encontró que esta última cuenta con un núcleo **RLFHEQ**, por lo se podría descartar a la GDP-manosa como sustrato de NudX.

Debido a lo anterior, se prosiguió con la búsqueda de sitios de reconocimiento hacia distintos sustratos por parte de NudX, lo que derivó en la examinación de la secuencia de esta proteína con la finalidad de ubicar a los motivos **UPF0035** y **SQPWFPXS**, los cuales son responsables de unir a la enzima con la CoA o NAD(H), respectivamente (Fisher et al., 2004;

Kang et al., 2003; Kerr et al., 2019; Kimura et al., 2018). Este análisis resultó infructífero, dado que NudX carece de los motivos previamente descritos (**Fig. 25-26**), descartando así la afinidad de esta proteína hacia estos sustratos.

Finalmente se investigó si NudX pudiese reconocer a moléculas como el Ap4A o la ADP-ribosa, para la cual se examinó la secuencia proteica con la finalidad de determinar la presencia de los aminoácidos conservados tirosina y prolina, los cuales son característicos de las diadenosín tetrafosfato hidrolasas y ADP-ribosa hidrolasas, respectivamente (Gabelli et al., 2001; Kraszewska, 2008; Okuda et al., 2005; Srouji et al., 2017); sin embargo, y de manera similar a las búsquedas realizadas previamente, los resultados fueron desfavorables, descartando así la hidrólisis de Ap4A y ADP-ribosa (**Fig. 23-24**), así como de CoA y NAD(H) mediada por NudX en comparación con la degradación de estas moléculas que pudiese ser efectuada por alguna de las otras probables proteínas de tipo NUDIX codificadas en el genoma de *A. badalniorum* Sp245 (**Tabla 3**).

La sumatoria de todos estos resultados obtenidos mediante bioinformática de la proteína NudX nos permitió hipotetizar sobre la probable carencia de actividad enzimática de esta proteína, así como sugerir que, si ésta cuenta con una función catalítica, ésta pudiese ser mediada por un mecanismo distinto a lo reportado en las enzimas NUDIX, como la representativa MutT, la cual fue la primer enzima de este tipo descrita en la literatura (Treffers et al., 1954). Aunado a lo anterior, se podría suponer que NudX demuestre afinidad hacia un compuesto fosfatado poco reportado en la literatura como el (p)ppGpp.

El guanosín tetra- o penta-fosfato, (p)ppGpp es catalogado como una alarmona la cual es producida en respuesta a condiciones de estrés como pueden ser la presencia de algún antibiótico en el medio, o bien, por un decremento en el flujo de nutrientes hacia los microorganismos. Esta molécula es sintetizada por la proteína RelA, la cual se encarga de adicionar un grupo pirofosfato, proveniente del ATP, a una molécula de GTP o GDP; mientras que por el contrario, su degradación es efectuada por la enzima SpoT, produciendo GDP y pirofosfato (Ooga et al., 2009; Sanyal et al., 2020). Diversos reportes señalan que la acumulación intracelular de esta alarmona conlleva a un cambio global en la fisiología de la célula, debido a que esta molécula puede interactuar con múltiples proteínas, alterando así el perfil transcriptómico, metabólico y proteómico de la bacteria. Un ejemplo de lo

anterior es lo reportado en *E. coli*, donde mediante la reprogramación transcripcional, el (p)ppGpp altera la expresión de entre 500-1400 genes (Jin Yang et al., 2020; Zhang et al., 2018).

Recientemente se han descrito enzimas de tipo NUDIX que cuentan con la capacidad de hidrolizar al (p)ppGpp. Ndx8, un hidrolasa tipo NUDIX presente en *Thermus thermophilus* HB8, está involucrada en el descenso de la concentración intracelular del ppGpp bajo condiciones nutricionales específicas, por lo que esta enzima es importante en la regulación del crecimiento de dicha bacteria en respuesta a dichas condiciones (Ooga et al., 2009). Por otra parte, se ha descrito en *E. coli* que proteínas NUDIX previamente caracterizadas como MutT y NudG presentan afinidad hacia el ppGpp y pppGpp, degrándolos en moléculas más pequeñas, lo cual se evidenció en ensayos de cromatografía en capa fina (Zhang et al., 2018). Finalmente, dentro del género *Bacillus* también se han reportado enzimas NUDIX con afinidad hacia el (p)ppGpp, como la proteína NahA, presente en *Bacillus subtilis* y *Bacillus anthracis*, la cual se ha demostrado que degrada a esta alarmona en pGpp de manera *in vitro* e *in vivo* (Jin Yang et al., 2020); sin embargo, y a diferencia de NudX, NahA presenta una caja NUDIX completamente conservada, lo cual plantea aún más dudas con respecto a la actividad que pudiese efectuar la proteína en estudio.

A pesar de los resultados pocos alentadores generados en este primer acercamiento hacia la enzima NudX, no podemos descartar la actividad enzimática de la misma, por lo que se sugiere un análisis experimental *in vitro* con la finalidad de confirmar o descartar la actividad catalítica de ésta, así como las moléculas que pudiesen ser sustrato de NudX.

Finalmente, resulta sumamente interesante el contexto genético donde se encuentra el gen *nudX*, ya que río arriba de él se ubica una secuencia codificante para una proteína diguanilato ciclasa, CdgC, debido a lo cual valdría la pena elucidar la probable regulación mediada por las proteínas NudX y CdgC, dado que ambas se encuentran involucradas en el metabolismo de moléculas fosfatadas. Por este motivo habría que considerar el escenario que ocurre en *C. crescentus*, donde la proteína SmbA cuenta con la capacidad de interactuar y unir tanto al di-GMPc como al (p)ppGpp; por lo que este complejo, SmbA/di-GMPc o SmbA/(p)ppGpp, es capaz de alterar la transición en el ciclo de vida de esta bacteria (Shyp et al., 2021).

9. Conclusiones

Se demostró que la proteína CdgC de *A. baldaniorum* Sp245 presenta los dominios característicos, así como los motivos conservados necesarios para clasificarla como una enzima con actividad de diguanilato ciclasa.

Los ensayos fenotípicos llevados a cabo empleando una cepa mutante del gen *cdgC* confirmaron la función de DGC de la proteína.

La proteína CdgC está involucrada en la producción de algún tipo de exopolisacárido con afinidad hacia el calcoflúor y además de desempeñar un papel importante en la colonización endofítica de la bacteria modelo hacia las raíces de trigo.

Con base en un análisis *in silico*, se concluyó que la proteína NudX presenta degeneraciones en el motivo NUDIX.

Finalmente, no se lograron determinar los sustratos hacia los cuales la proteína NudX pudiese tener afinidad.

10. Perspectivas

- Dado que la cepa mutante del gen *cdgC* presentó una alteración en su comportamiento endofítico, se propone evaluar si dicha alteración es mediada por la expresión de las celulasas codificadas en el genoma de la bacteria en estudio mediante la realización de un qRT-PCR.
- Debido a la probable especialización de la proteína CdgC, se recomienda realizar mutaciones en los genes que codifican para las proteínas homólogas a CdgC codificadas en el genoma de *A. baldaniorum* Sp245 y caracterizar la función de cada una de ellas en relación con la fuente de nitrógeno presente en el medio.
- Con respecto a lo anterior y con base en lo observado en otras especies bacterianas, se sugiere la generación de dobles o triples mutantes.
- Relacionado con la proteína NudX, se plantea realizar la mutación y sobreexpresión del gen que codifica dicha enzima con la finalidad de evaluar las probables alteraciones fenotípicas que presenten las cepas generadas.
- Expresar a la proteína NudX y emplearla para llevar a cabo ensayos de interacción con moléculas fosfatadas que pudiesen ser utilizadas como su sustrato.

11. Material Complementario

Tabla C1. Composición del medio LB

	Volumen (mL)
Componente	1000
Peptona de caseína	10.0 g
Extracto de levadura	5.0 g
NaCl	10.0 g
Agar bacteriológico	15.0 g
Ajustar pH a 7.0 y esterilizar a 15 lb por 20 min	

Tabla C2. Composición del medio LB*

	Volumen (mL)
Componente	1000
Peptona de caseína	10.0 g
Extracto de levadura	5.0 g
NaCl	5.0 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.367 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.616 g
Agar bacteriológico	15.0 g
Ajustar pH a 7.0 y esterilizar a 15 lb por 20 min	

Tabla C3. Composición del medio rojo Congo

	Volumen (mL)
Componente	1000
K ₂ HPO ₄	0.5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2 g
NaCl	0.1 g
Extracto de levadura	0.5 g
Ácido málico	5.0 g
KOH	4.0 g
FeCl ₃ [1 %]	1.4 mL
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O [0.1 %]	2.0 mL
Rojo Congo [0.25 %]	15 mL
Agar bacteriológico	15.0 g
Ajustar pH a 6.8 y esterilizar a 15 lb por 20 min	

12. Referencias

- Ahmad, I., Nygren, E., Khalid, F., Myint, S. L., & Uhlin, B. E. (2020). A Cyclic-di-GMP signalling network regulates biofilm formation and surface associated motility of *Acinetobacter baumannii* 17978. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58522-5>
- Aldridge, P., Paul, R., Goymer, P., Rainey, P., & Jenal, U. (2003). Role of the GGDEF regulator PleD in polar development of *Caulobacter crescentus*. *Molecular Microbiology*, 47(6), 1695–1708. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03401.x>
- 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. <https://doi.org/10.1128/JB.182.21.6042-6048.2000>
- Alexandre, Gladys. (2017). *Azospirillum brasilense*, a beneficial soil bacterium: Isolation and cultivation. *Current Protocols in Microbiology*, 2017. <https://doi.org/10.1002/cpmc.40>
- Andersen, J. B., Hultqvist, L. D., Jansen, C. U., Jakobsen, T. H., Nilsson, M., Rybtke, M., Uhd, J., Fritz, B. G., Seifert, R., Berthelsen, J., Nielsen, T. E., Qvortrup, K., Givskov, M., & Tolker-Nielsen, T. (2021). Identification of small molecules that interfere with c-di-GMP signaling and induce dispersal of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Npj Biofilms and Microbiomes*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41522-021-00225-4>
- Arruebarrena Di Palma, A., M. Pereyra, C., Moreno Ramirez, L., Xiqui Vázquez, M. L., Baca, B. E., Pereyra, M. A., Lamattina, L., & Creus, C. M. (2013). Denitrification-derived nitric oxide modulates biofilm formation in *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiology Letters*, 338(1), 77–85. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12030>
- Awile, O., Krisko, A., Sbalzarini, I. F., & Zagrovic, B. (2010). Intrinsically disordered regions may lower the hydration free energy in proteins: A case study of nudix hydrolase in the bacterium *Deinococcus radiodurans*. *PLoS Computational Biology*, 6(7), 12. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000854>
- Baldani, V. L. D., Baldani, J. I., & Döbereiner, J. (1987). Inoculation of field-grown wheat (*Triticum aestivum*) with *Azospirillum* spp. in Brazil. *Biology and Fertility of Soils*, 4(1–2), 37–40. <https://doi.org/10.1007/BF00280348>
- Been, K. W., Yoon, H. J., Jeon, S. T., & Lee, H. H. (2019). Structural characterization of a putative diguanylate cyclase conserved in hyperthermophiles. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 518(1), 114–119. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.08.017>
- Bessman, M. J. (2019). A cryptic activity in the Nudix hydrolase superfamily. *Protein Science*, 28(8), 1494–1500. <https://doi.org/10.1002/pro.3666>
- Bhasme, P., Wei, Q., Xu, A., Naqvi, S. T. A., Wang, D., & Ma, L. Z. (2020). Evaluation and characterization of the predicted diguanylate cyclase-encoding genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *MicrobiologyOpen*, 9(3), 1–12. <https://doi.org/10.1002/mbo3.975>
- Bible, A. N., Khalsa-Moyers, G. K., Mukherjee, T., Green, C. S., Mishra, P., Purcell, A., Aksenova, A., Hurst, G. B., & Alexandre, G. (2015). Metabolic adaptations of *Azospirillum brasilense* to oxygen stress by cell-to-cell clumping and flocculation. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(24), 8346–8357. <https://doi.org/10.1128/AEM.02782-15>
- Blatny, J. M., Brautaset, T., Winther-Larsen, H. C., Haugan, K., & Valla, S. (1997). Construction and use of a versatile set of broad-host-range cloning and expression vectors based on the RK2 replicon. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(2), 370–379. <https://doi.org/10.1128/aem.63.2.370-379.1997>
- Borland, S., Oudart, A., Prigent-Combaret, C., Brochier-Armanet, C., & Wisniewski-Dyé, F. (2015). Genome-wide survey of two-component signal transduction systems in the plant growth-promoting bacterium

Azospirillum. *BMC Genomics*, 16(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1962-x>

- Bourret, R. B. (2010). Receiver domain structure and function in response regulator proteins. *Current Opinion in Microbiology*, 13(2), 142–149. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.01.015>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2). [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Brettin, T., Davis, J. J., Disz, T., Edwards, R. A., Gerdes, S., Olsen, G. J., Olson, R., Overbeek, R., Parrello, B., Pusch, G. D., Shukla, M., Thomason, J. A., Stevens, R., Vonstein, V., Wattam, A. R., & Xia, F. (2015). RASTtk: A modular and extensible implementation of the RAST algorithm for building custom annotation pipelines and annotating batches of genomes. *Scientific Reports*, 5. <https://doi.org/10.1038/srep08365>
- Buchko, G. W., Litvinova, O., Robinson, H., Yakunin, A. F., & Kennedy, M. A. (2008). Functional and structural characterization of DR_0079 from *Deinococcus radiodurans*, a novel nudix hydrolase with a preference for cytosine (deoxy)ribonucleoside 5'-di- and triphosphates. *Biochemistry*, 47(25). <https://doi.org/10.1021/bi800099d>
- Burdman, S., Jurkevitch, E., Soria-Díaz, M. E., Serrano, A. M. G., & Okon, Y. (2000). Extracellular polysaccharide composition of *Azospirillum brasilense* and its relation with cell aggregation. *FEMS Microbiology Letters*, 189(2), 259–264. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(00\)00294-9](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(00)00294-9)
- Carreras-Puigvert, J., Zitnik, M., Jemth, A. S., Carter, M., Unterlass, J. E., Hallström, B., Loseva, O., Karem, Z., Calderón-Montanõ, J. M., Lindskog, C., Edqvist, P. H., Matuszewski, D. J., Ait Blal, H., Berntsson, R. P. A., Häggblad, M., Martens, U., Studham, M., Lundgren, B., Wählby, C., ... Helleday, T. (2017). A comprehensive structural, biochemical and biological profiling of the human NUDIX hydrolase family. *Nature Communications*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01642-w>
- Cesari, A. B., Paulucci, N. S., Yslas, E. I., & Dardanelli, M. S. (2020). Immobilization of *Bradyrhizobium* and *Azospirillum* in alginate matrix for long time of storage maintains cell viability and interaction with peanut. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(23), 10145–10164. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10910-7>
- Chan, C., Paul, R., Samoray, D., Amiot, N. C., Giese, B., Jenal, U., & Schirmer, T. (2004). Structural basis of activity and allosteric control of diguanylate cyclase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(49), 17084–17089. <https://doi.org/10.1073/pnas.0406134101>
- Chen, G., Zhou, J., Zuo, Y., Huo, W., Peng, J., Li, M., Zhang, Y., Wang, T., Zhang, L., Zhang, L., & Liang, H. (2021). Structural basis for diguanylate cyclase activation by its binding partner in *Pseudomonas aeruginosa*. *ELife*, 10, 1–21. <https://doi.org/10.7554/elife.67289>
- Chouhan, O. P., Roske, Y., Heinemann, U., & Biswas, S. (2020). Structure of the active GGEEF domain of a diguanylate cyclase from *Vibrio cholerae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 523(2), 287–292. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.11.179>
- Chua, S. L., Liu, Y., Li, Y., Ting, H. J., Kohli, G. S., Cai, Z., Suwanchaikasem, P., Goh, K. K. K., Ng, S. P., Tolker-Nielsen, T., Yang, L., & Givskov, M. (2017). Reduced intracellular c-di-GMP content increases expression of quorum sensing-regulated genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7(OCT), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00451>
- Cortés-Patiño, S., Vargas, C., Álvarez-Flórez, F., Bonilla, R., & Estrada-Bonilla, G. (2021). Potential of *Herbaspirillum* and *Azospirillum* consortium to promote growth of perennial ryegrass under water deficit. *Microorganisms*, 9(1), 1–16. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010091>
- Crooks, G. E., Hon, G., Chandonia, J. M., & Brenner, S. E. (2004). WebLogo: A sequence logo generator. *Genome Research*, 14(6), 1188–1190. <https://doi.org/10.1101/gr.849004>
- Cruz-Pérez, J. F., Lara-Oueilhe, R., Marcos-Jiménez, C., Cuatlayotl-Olarte, R., Xiqui-Vázquez, M. L., Reyes-

- Carmona, S. R., Baca, B. E., & Ramírez-Mata, A. (2021). Expression and function of the *cdgD* gene, encoding a CHASE–PAS–DGC–EAL domain protein, in *Azospirillum brasilense*. *Scientific Reports*, *11*(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80125-3>
- Davey, M. E., & O’toole, G. A. (2000). Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *64*(4). <https://doi.org/10.1128/mmbr.64.4.847-867.2000>
- de Almeida, J. R., Bonatelli, M. L., Batista, B. D., Teixeira-Silva, N. S., Mondin, M., dos Santos, R. C., Bento, J. M. S., de Almeida Hayashibara, C. A., Azevedo, J. L., & Quecine, M. C. (2021). *Bacillus thuringiensis* RZ2MS9, a tropical plant growth-promoting rhizobacterium, colonizes maize endophytically and alters the plant’s production of volatile organic compounds during co-inoculation with *Azospirillum brasilense* Ab-V5. *Environmental Microbiology Reports*, *00*. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.13004>
- De La Peña, A. H., Suarez, A., Duong-Ly, K. C., Schoeffield, A. J., Pizarro-Dupuy, M. A., Zarr, M., Pineiro, S. A., Amzel, L. M., & Gabelli, S. B. (2015). Structural and enzymatic characterization of a nucleoside diphosphate sugar hydrolase from *Bdellovibrio bacteriovorus*. *PLoS ONE*, *10*(11), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141716>
- De, N., Pirruccello, M., Krasteva, P. V., Bae, N., Raghavan, R. V., & Sondermann, H. (2008). Phosphorylation-independent regulation of the diguanylate cyclase WspR. *PLoS Biology*, *6*(3), 0601–0617. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060067>
- Deepthi, A., Liew, C. W., Liang, Z. X., Swaminathan, K., & Lescar, J. (2014). Structure of a diguanylate cyclase from *Thermotoga maritima*: Insights into activation, feedback inhibition and thermostability. *PLoS ONE*, *9*(10), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110912>
- Del Gallo, M., Negi, M., & Neyra, C. A. (1989). Calcofluor- and lectin-binding exocellular polysaccharides of *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*. *Journal of Bacteriology*, *171*(6), 3504–3510. <https://doi.org/10.1128/jb.171.6.3504-3510.1989>
- Dong, S., & Wang, Y. (2016). Nudix Effectors: A Common Weapon in the Arsenal of Plant Pathogens. *PLoS Pathogens*, *12*(8), 7–12. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005704>
- Drabinska, J., Ziecina, M., Modzelan, M., Jagura-Burdzy, G., & Kraszewska, E. (2020). Individual Nudix hydrolases affect diverse features of *Pseudomonas aeruginosa*. *MicrobiologyOpen*, *9*(8), 1–18. <https://doi.org/10.1002/mbo3.1052>
- Duan, X., Pan, Y., Cai, Z., Liu, Y., Zhang, Y., Liu, M., Liu, Y., Wang, K., Zhang, L., & Yang, L. (2021). *rpoS*-mutation variants are selected in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms under imipenem pressure. *Cell and Bioscience*, *11*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13578-021-00655-9>
- Duong-Ly, K. C., Gabelli, S. B., Xu, W. L., Dunn, C. A., Schoeffield, A. J., Bessman, M. J., & Amzel, L. M. (2011). The Nudix hydrolase CDP-chase, a CDP-choline pyrophosphatase, is an asymmetric dimer with two distinct enzymatic activities. *Journal of Bacteriology*, *193*(13), 3175–3185. <https://doi.org/10.1128/JB.00089-11>
- Duong-Ly, K. C., Woo, H. N., Dunn, C. A., Xu, W. L., Babič, A., Bessman, M. J., Amzel, L. M., & Gabelli, S. B. (2013). A UDP-X Diphosphatase from *Streptococcus pneumoniae* Hydrolyzes Precursors of Peptidoglycan Biosynthesis. *PLoS ONE*, *8*(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064241>
- Egorenkova, I. V., Konnova, S. A., Fedonenko, Y. P., Dykman, L. A., & Ignatov, V. V. (2001). Role of the polysaccharide components of *Azospirillum brasilense* capsules in bacterial adsorption on wheat seedling roots. *Microbiology*, *70*(1), 36–40. <https://doi.org/10.1023/A:1004836619691>
- El-Gebali, S., Mistry, J., Bateman, A., Eddy, S. R., Luciani, A., Potter, S. C., Qureshi, M., Richardson, L. J., Salazar, G. A., Smart, A., Sonnhammer, E. L. L., Hirsh, L., Paladin, L., Piovesan, D., Tosatto, S. C. E., & Finn, R. D. (2019). The Pfam protein families database in 2019. *Nucleic Acids Research*, *47*(D1), D427–D432. <https://doi.org/10.1093/nar/gky995>
- Feng, Q., Ahator, S. Dela, Zhou, T., Liu, Z., Lin, Q., Liu, Y., Huang, J., Zhou, J., & Zhang, L. H. (2020).

Regulation of Exopolysaccharide Production by ProE, a Cyclic-Di-GMP Phosphodiesterase in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Frontiers in Microbiology*, 11(June), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01226>

- Fernández-Llamas, H., Díaz, E., & Carmona, M. (2021). Motility, adhesion and c-di-gmp influence the endophytic colonization of rice by *Azoarcus* sp. cib. *Microorganisms*, 9(3), 1–17. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9030554>
- Fernandez, N., & Waters, C. M. (2019b). Analyzing Diguanylate Cyclase Activity In Vivo using a Heterologous *Escherichia coli* Host. *Current Protocols in Microbiology*, 52(1), 1–12. <https://doi.org/10.1002/cpmc.74>
- Ferreira, N. D. S., Sant' Anna, F. H., Reis, V. M., Ambrosini, A., Volpiano, C. G., Rothballer, M., Schwab, S., Baura, V. A., Balsanelli, E., Pedrosa, F. de O., Passaglia, L. M. P., de Souza, E. M., Hartmann, A., Cassan, F., & Zilli, J. E. (2020). Genome-based reclassification of *Azospirillum brasilense* Sp245 as the type strain of *Azospirillum baldaniorum* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(12), 6203–6212. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004517>
- Fisher, D. I., Cartwright, J. L., Harashima, H., Kamiya, H., & McLennan, A. G. (2004). Characterization of a Nudix hydrolase from *Deinococcus radiodurans* with a marked specificity for (deoxy)ribonucleoside 5'-diphosphates. *BMC Biochemistry*, 5, 1–24. <https://doi.org/10.1186/1471-2091-5-7>
- Flemming, H. C., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8(9), 623–633. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>
- Foley, P. L., Hsieh, P. K., Luciano, D. J., & Belasco, J. G. (2015). Specificity and evolutionary conservation of the *Escherichia coli* RNA pyrophosphohydrolase RppH. *Journal of Biological Chemistry*, 290(15), 9478–9486. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.634659>
- Francis, V. I., Stevenson, E. C., & Porter, S. L. (2017). Two-component systems required for virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiology Letters*, 364(11), 1–22. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnx104>
- Fukami, J., Abrantes, J. L. F., del Cerro, P., Nogueira, M. A., Ollero, F. J., Megías, M., & Hungria, M. (2018). Revealing strategies of quorum sensing in *Azospirillum brasilense* strains Ab-V5 and Ab-V6. *Archives of Microbiology*, 200(1), 47–56. <https://doi.org/10.1007/s00203-017-1422-x>
- Gabelli, S. B., Bianchet, M. A., Azurmendi, H. F., Xia, Z., Sarawat, V., Mildvan, A. S., & Amzel, L. M. (2004). Structure and mechanism of GDP-mannose glycosyl hydrolase, a nudix enzyme that cleaves at carbon instead of phosphorus. *Structure*, 12(6). <https://doi.org/10.1016/j.str.2004.03.028>
- Gabelli, S. B., Bianchet, M. A., Bessman, M. J., & Amzel, L. M. (2001). The structure of adp-ribose pyrophosphatase reveals the structural basis for the versatility of the nudix family. *Nature Structural Biology*, 8(5), 467–472. <https://doi.org/10.1038/87647>
- Ganesh, P. S., & Rai, V. R. (2018). Alternative strategies to regulate quorum sensing and biofilm formation of pathogenic *Pseudomonas* by quorum sensing inhibitors of diverse origins. In *Biotechnological Applications of Quorum Sensing Inhibitors* (pp. 33–61). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-9026-4_3
- Gao, A., Vasilyev, N., Kaushik, A., Duan, W., & Serganov, A. (2021). Principles of RNA and nucleotide discrimination by the RNA processing enzyme RppH. *Nucleic Acids Research*, 48(7), 3776–3788. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAA024>
- Gao, A., Vasilyev, N., Luciano, D. J., Levenson-Palmer, R., Richards, J., Marsiglia, W. M., Traaseth, N. J., Belasco, J. G., & Serganov, A. (2018). Structural and kinetic insights into stimulation of RppH-dependent RNA degradation by the metabolic enzyme DapF. *Nucleic Acids Research*, 46(13), 6841–6856. <https://doi.org/10.1093/nar/gky327>
- Gao, S., Romdhane, S. Ben, Beullens, S., Kaefer, V., Lambrichts, I., Fauvart, M., & Michiels, J. (2014). Genomic analysis of cyclic-di-GMP-related genes in rhizobial type strains and functional analysis in

- Rhizobium etli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(10), 4589–4602. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5722-7>
- García-Saura, A. G., Zapata-Pérez, R., Martínez-Moñino, A. B., Hidalgo, J. F., Morte, A., Pérez-Gilbert, M., & Sánchez-Ferrer, Á. (2019). The first comprehensive phylogenetic and biochemical analysis of NADH diphosphatases reveals that the enzyme from *Tuber melanosporum* is highly active towards NAD⁺. *Scientific Reports*, 9(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53138-w>
- García, J. E., Labarthe, M. M., Pagnussat, L. A., Amenta, M., Creus, C. M., & Maroniche, G. A. (2020). Signs of a phyllospheric lifestyle in the genome of the stress-tolerant strain *Azospirillum brasilense* Az19. *Systematic and Applied Microbiology*, 43(6). <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2020.126130>
- Gualpa, J., Lopez, G., Nievas, S., Coniglio, A., Halliday, N., Cámara, M., & Cassán, F. (2019). *Azospirillum brasilense* Az39, a model rhizobacterium with AHL quorum-quenching capacity. *Journal of Applied Microbiology*, 126(6), 1850–1860. <https://doi.org/10.1111/jam.14269>
- Güvener, Z. T., & Harwood, C. S. (2007). Subcellular location characteristics of the *Pseudomonas aeruginosa* GGDEF protein, WspR, indicate that it produces cyclic-di-GMP in response to growth on surfaces. *Molecular Microbiology*, 66(6), 1459–1473. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.06008.x>
- Ha, D.-G., & O’Toole, G. A. (2015). c-di-GMP and its Effects on Biofilm Formation and Dispersion: a *Pseudomonas aeruginosa* Review. *Microbiology Spectrum*, 3(2). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.mb-0003-2014>
- Hartmann, R., Singh, P. K., Pearce, P., Mok, R., Song, B., Díaz-Pascual, F., Dunkel, J., & Drescher, K. (2019). Emergence of three-dimensional order and structure in growing biofilms. In *Nature Physics* (Vol. 15, Issue 3). <https://doi.org/10.1038/s41567-018-0356-9>
- He, X., Li, Q., Wang, N., & Chen, S. (2021). Effects of an eps biosynthesis gene cluster on biofilm formation and nitrogen fixation under aerobic conditions of *Paenibacillus* spp. WLY78. *Microorganisms*, 9(2). <https://doi.org/10.3390/microorganisms9020289>
- Hengge, R. (2009). Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 7, Issue 4). <https://doi.org/10.1038/nrmicro2109>
- Hengge, R. (2016). Trigger phosphodiesterases as a novel class of c-di-GMP effector proteins. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 371(1707). <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0498>
- Hickman, J. W., Tifrea, D. F., & Harwood, C. S. (2005). A chemosensory system that regulates biofilm formation through modulation of cyclic diguanylate levels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(40), 14422–14427. <https://doi.org/10.1073/pnas.0507170102>
- Hong, L., Orikasa, Y., Sakamoto, H., & Ohwada, T. (2019). Plant tissue localization and morphological conversion of *Azospirillum brasilense* upon initial interaction with allium cepa L. *Microorganisms*, 7(9). <https://doi.org/10.3390/microorganisms7090275>
- Housh, A. B., Benoit, M., Wilder, S. L., Scott, S., Powell, G., Schueller, M. J., & Ferrieri, R. A. (2021). Plant-growth-promoting bacteria can impact zinc uptake in zea mays: An examination of the mechanisms of action using functional mutants of *Azospirillum brasilense*. *Microorganisms*, 9(5). <https://doi.org/10.3390/microorganisms9051002>
- Jenal, U., Reinders, A., & Lori, C. (2017). Cyclic di-GMP: Second messenger extraordinaire. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 15, Issue 5). <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.190>
- Jijón-Moreno, S., Baca, B. E., Castro-Fernández, D. C., & Ramírez-Mata, A. (2019). TyrR is involved in the transcriptional regulation of biofilm formation and D-alanine catabolism in *Azospirillum brasilense* Sp7. *PLoS ONE*, 14(2), 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211904>
- Jones, P., Binns, D., Chang, H. Y., Fraser, M., Li, W., McAnulla, C., McWilliam, H., Maslen, J., Mitchell, A.,

- Nuka, G., Pesseat, S., Quinn, A. F., Sangrador-Vegas, A., Scheremetjew, M., Yong, S. Y., Lopez, R., & Hunter, S. (2014). InterProScan 5: Genome-scale protein function classification. *Bioinformatics*, *30*(9), 1236–1240. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu031>
- Kalia, D., Merey, G., Nakayama, S., Zheng, Y., Zhou, J., Luo, Y., Guo, M., Roembke, B. T., & Sintim, H. O. (2013). Nucleotide, c-di-GMP, c-di-AMP, cGMP, cAMP, (p)ppGpp signaling in bacteria and implications in pathogenesis. *Chemical Society Reviews*, *42*(1), 305–341. <https://doi.org/10.1039/c2cs35206k>
- Kampf, J., & Stülke, J. (2017). Cyclic-di-GMP signalling meets extracellular polysaccharide synthesis in *Bacillus subtilis*. *Environmental Microbiology Reports*, *9*(3), 182–185. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12530>
- Kang, L. W., Gabelli, S. B., Bianchet, M. A., Xu, W. L., Bessman, M. J., & Amzel, L. M. (2003). Structure of a coenzyme A pyrophosphatase from *Deinococcus radiodurans*: A member of the Nudix family. *Journal of Bacteriology*, *185*(14), 4110–4118. <https://doi.org/10.1128/JB.185.14.4110-4118.2003>
- Kapoor, I., Varada, R., Aroli, S., & Varshney, U. (2019). Nudix hydrolases with coenzyme a (CoA) and acyl-coa pyrophosphatase activities confer growth advantage to *Mycobacterium smegmatis*. *Microbiology (United Kingdom)*, *165*(11), 1219–1232. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000850>
- Kelley, L. A., Mezulis, S., Yates, C. M., Wass, M. N., & Sternberg, M. J. (2016). The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature Protocols*, *10*(6), 845–858. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015-053>
- Kerr, E. W., Shumar, S. A., & Leonardi, R. (2019). Nudt8 is a novel CoA diphosphohydrolase that resides in the mitochondria. *FEBS Letters*, *593*(11), 1133–1143. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13392>
- Kessler, C., Mhatre, E., Cooper, V., & Kim, W. (2021). Evolutionary divergence of the Wsp signal transduction system in Beta- and Gammaproteobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, AEM0130621. <https://doi.org/10.1101/2021.07.02.450980>
- Kimura, Y., Kajimoto, S., Yamamoto, Y., & Tanaka, N. (2020). Enzymatic characteristics of nudix hydrolase 2 (Nud2), an 8-oxo-dgtp hydrolase from *Myxococcus xanthus*. *Journal of General and Applied Microbiology*, *66*(1), 46–50. <https://doi.org/10.2323/jgam.2019.04.002>
- Kimura, Y., Yamamoto, Y., Kajimoto, S., Sakai, A., & Takegawa, K. (2018). Substrate specificity of Nudix hydrolases from *Myxococcus xanthus*. *Journal of General and Applied Microbiology*, *64*(2), 94–98. <https://doi.org/10.2323/jgam.2017.07.001>
- Kolega, S., Miras-Moreno, B., Buffagni, V., Lucini, L., Valentinuzzi, F., Maver, M., Mimmo, T., Trevisan, M., Pii, Y., & Cesco, S. (2020). Nutraceutical Profiles of Two Hydroponically Grown Sweet Basil Cultivars as Affected by the Composition of the Nutrient Solution and the Inoculation With *Azospirillum brasilense*. *Frontiers in Plant Science*, *11*(November), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.596000>
- Koul, V., Srivastava, D., Singh, P. P., & Kochar, M. (2020). Genome-wide identification of *Azospirillum brasilense* Sp245 small RNAs responsive to nitrogen starvation and likely involvement in plant-microbe interactions. *BMC Genomics*, *21*(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-07212-7>
- Kovach, M. E., Phillips, R. W., Elzer, P. H., Roop, R. M., & Peterson, K. M. (1994). pBBR1MCS: A broad-host-range cloning vector. *BioTechniques*, *16*(5).
- Kraszewska, E. (2008). The plant Nudix hydrolase family. *Acta Biochimica Polonica*, *55*(4), 663–671. https://doi.org/10.18388/abp.2008_3025
- Krol, E., Schäper, S., & Becker, A. (2020). Cyclic di-GMP signaling controlling the free-living lifestyle of alpha-proteobacterial rhizobia. *Biological Chemistry*, *401*(12), 1335–1348. <https://doi.org/10.1515/hsz-2020-0232>
- Kukulj, C., Pedrosa, F. O., De Souza, G. A., Sumner, L. W., Lei, Z., Sumner, B., Do Amaral, F. P., Juexin, W., Trupti, J., Huergo, L. F., Monteiro, R. A., Valdameri, G., Stacey, G., & De Souza, E. M. (2020). Proteomic

- and Metabolomic Analysis of *Azospirillum brasilense ntrC* Mutant under High and Low Nitrogen Conditions. *Journal of Proteome Research*, 19(1), 92–105. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.9b00397>
- Kunz, S., & Graumann, P. L. (2020). Spatial organization enhances versatility and specificity in cyclic di-GMP signaling. *Biological Chemistry*, 401(12), 1323–1334. <https://doi.org/10.1515/hsz-2020-0202>
- Lacanna, E., Bigosch, C., Kaefer, V., Boehm, A., & Becker, A. (2016). Evidence for *Escherichia coli* diguanylate cyclase DgcZ interlinking surface sensing and adhesion via multiple regulatory routes. *Journal of Bacteriology*, 198(18), 2524–2535. <https://doi.org/10.1128/JB.00320-16>
- Lerner, A., Castro-Sowinski, S., Valverde, A., Lerner, H., Dror, R., Okon, Y., & Burdman, S. (2009). The *Azospirillum brasilense* Sp7 *noeJ* and *noeL* genes are involved in extracellular polysaccharide biosynthesis. *Microbiology*, 155(12), 4058–4068. <https://doi.org/10.1099/mic.0.031807-0>
- Letunic, I., & Bork, P. (2018). 20 years of the SMART protein domain annotation resource. *Nucleic Acids Research*, 46(D1), D493–D496. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx922>
- Li, D., Zhang, L., Liang, J., Deng, W., Wei, Q., & Wang, K. (2021). Biofilm Formation by *Pseudomonas aeruginosa* in a Novel Septic Arthritis Model. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11(September), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.724113>
- Lundin, A., Nilsson, C., Gerhard, M., Andersson, D. I., Krabbe, M., & Engstrand, L. (2003). The NudA protein in the gastric pathogen *Helicobacter pylori* is an ubiquitous and constitutively expressed dinucleoside polyphosphate hydrolase. *Journal of Biological Chemistry*, 278(14), 12574–12578. <https://doi.org/10.1074/jbc.M212542200>
- Madeira, F., Park, Y. M., Lee, J., Buso, N., Gur, T., Madhusoodanan, N., Basutkar, P., Tivey, A. R. N., Potter, S. C., Finn, R. D., & Lopez, R. (2019). The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic Acids Research*, 47(W1), W636–W641. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz268>
- Malinich, E. A., & Bauer, C. E. (2018). Transcriptome analysis of *Azospirillum brasilense* vegetative and cyst states reveals large-scale alterations in metabolic and replicative gene expression. *Microbial Genomics*, 4(8). <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000200>
- Malone, J. G., Williams, R., Christen, M., Jenal, U., Spiers, A. J., & Rainey, P. B. (2007). The structure-function relationship of WspR, a *Pseudomonas fluorescens* response regulator with a GGDEF output domain. *Microbiology*, 153(4), 980–994. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2006/002824-0>
- Mariotti, L., Scartazza, A., Curadi, M., Picciarelli, P., & Toffanin, A. (2021). *Azospirillum baldaniorum* Sp245 Induces Physiological Responses to Alleviate the Adverse Effects of Drought Stress in Purple Basil. *Plants*, 10. <https://doi.org/10.3390/plants10061141>
- Martínez-Méndez, R., Camacho-Hernández, D. A., Sulvarán-Guel, E., & Zamorano-Sánchez, D. (2021). A trigger phosphodiesterase modulates the global c-di-gmp pool, motility, and biofilm formation in *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Bacteriology*, 203(13). <https://doi.org/10.1128/JB.00046-21>
- Maunder, E., & Welch, M. (2017). Matrix exopolysaccharides; the sticky side of biofilm formation. *FEMS Microbiology Letters*, 364(13), 1–10. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnx120>
- McDougald, D., Rice, S. A., Barraud, N., Steinberg, P. D., & Kjelleberg, S. (2012). Should we stay or should we go: Mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. *Nature Reviews Microbiology*, 10(1), 39–50. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2695>
- McLennan, A. G. (2006). The Nudix hydrolase superfamily. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63(2), 123–143. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5386-7>
- Méndez-Gómez, M., Barrera-Ortiz, S., Castro-Mercado, E., López-Bucio, J., & García-Pineda, E. (2021). The nature of the interaction *Azospirillum-Arabidopsis* determine the molecular and morphological changes in root and plant growth promotion. *Protoplasma*, 258(1), 179–189. <https://doi.org/10.1007/s00709-020-01552-7>

- Metcalf, W. W., & Wanner, B. L. (1993). Construction of new β -glucuronidase cassettes for making transcriptional fusions and their use with new methods for allele replacement. *Gene*, *129*(1). [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(93\)90691-U](https://doi.org/10.1016/0378-1119(93)90691-U)
- Mildvan, A. S., Xia, Z., Azurmendi, H. F., Saraswat, V., Legler, P. M., Massiah, M. A., Gabelli, S. B., Bianchet, M. A., Kang, L. W., & Amzel, L. M. (2005). Structures and mechanisms of Nudix hydrolases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *433*(1), 129–143. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2004.08.017>
- Mitchell, A. L., Attwood, T. K., Babbitt, P. C., Blum, M., Bork, P., Bridge, A., Brown, S. D., Chang, H. Y., El-Gebali, S., Fraser, M. I., Gough, J., Haft, D. R., Huang, H., Letunic, I., Lopez, R., Luciani, A., Madeira, F., Marchler-Bauer, A., Mi, H., ... Finn, R. D. (2019). InterPro in 2019: Improving coverage, classification and access to protein sequence annotations. *Nucleic Acids Research*, *47*(D1), D351–D360. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1100>
- Nadell, C. D., Drescher, K., & Foster, K. R. (2016). Spatial structure, cooperation and competition in biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, *14*(9), 589–600. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.84>
- Nair, H. A. S., Subramoni, S., Poh, W. H., Hasnuddin, N. T. B., Tay, M., Givskov, M., Tolker-Nielsen, T., Kjelleberg, S., McDougald, D., & Rice, S. A. (2021). Carbon starvation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms selects for dispersal insensitive mutants. *BMC Microbiology*, *21*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12866-021-02318-8>
- Nakamura, T., Meshitsuka, S., Kitagawa, S., Abe, N., Yamada, J., Ishino, T., Nakano, H., Tsuzuki, T., Doi, T., Kobayashi, Y., Fujii, S., Sejiguchi, M., & Yamagata, Y. (2010). Structural and dynamic features of the MutT protein in the recognition of nucleotides with the mutagenic 8-oxoguanine base. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(1), 444–452. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.066373>
- Nguyen, V. N., Park, A., Xu, A., Srouji, J. R., Brenner, S. E., & Kirsch, J. F. (2016). Substrate specificity characterization for eight putative nudix hydrolases. Evaluation of criteria for substrate identification within the Nudix family. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, *84*(12), 1810–1822. <https://doi.org/10.1002/prot.25163>
- Nicastro, G. G., Kaihami, G. H., Pulschen, A. A., Hernandez-Montelongo, J., Boechat, A. L., de Oliveira Pereira, T., Rosa, C. G. T., Stefanello, E., Colepicolo, P., Bordi, C., & Baldini, R. L. (2020). c-di-GMP-related phenotypes are modulated by the interaction between a diguanylate cyclase and a polar hub protein. *Scientific Reports*, *10*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59536-9>
- O’Handley, S. F., Dunn, C. A., & Bessman, M. J. (2001). Orf135 from *Escherichia coli* Is a Nudix Hydrolase Specific for CTP, dCTP, and 5-Methyl-dCTP. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(8), 5421–5426. <https://doi.org/10.1074/jbc.M004100200>
- O’Toole, G. A. (2010). Microtiter dish Biofilm formation assay. *Journal of Visualized Experiments*, *47*, 10–11. <https://doi.org/10.3791/2437>
- Ogawa, T., Yoshimura, K., Miyake, H., Ishikawa, K., Ito, D., Tanabe, N., & Shigeoka, S. (2008). Molecular characterization of organelle-type nudix hydrolases in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, *148*(3), 1412–1424. <https://doi.org/10.1104/pp.108.128413>
- Okuda, K., Hayashi, H., & Nishiyama, Y. (2005). Systematic characterization of the ADP-ribose pyrophosphatase family in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Journal of Bacteriology*, *187*(14), 4984–4991. <https://doi.org/10.1128/JB.187.14.4984-4991.2005>
- Ooga, T., Ohashi, Y., Kuramitsu, S., Koyama, Y., Tomita, M., Soga, T., & Masui, R. (2009). Degradation of ppGpp by nudix pyrophosphatase modulates the transition of growth phase in the bacterium *Thermus thermophilus*. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(23), 15549–15556. <https://doi.org/10.1074/jbc.M900582200>
- Page, B. D. G., Valerie, N. C. K., Wright, R. H. G., Wallner, O., Isaksson, R., Carter, M., Rudd, S. G., Loseva, O., Jemth, A. S., Almlöf, I., Font-Mateu, J., Llona-Mínguez, S., Baranczewski, P., Jeppsson, F., Homan, E., Almqvist, H., Axelsson, H., Regmi, S., Gustavsson, A. L., ... Helleday, T. (2018). Targeted NUDT5

- inhibitors block hormone signaling in breast cancer cells. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02293-7>
- Paul, K., Nieto, V., Carlquist, W. C., Blair, D. F., & Rasika, M. (2010). The c-di-GMP Binding Protein YcgR Controls Flagellar Motor Direction and Speed to Affect Chemotaxis by a “Backstop Brake” Mechanism. *Mol Cell*, 38(1), 128–139. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.03.001>.The
- Paul, R., Weiser, S., Amiot, N. C., Chan, C., Schirmer, T., Giese, B., & Jenal, U. (2004). Cell cycle-dependent dynamic localization of a bacterial response regulator with a novel di-guanylate cyclase output domain. *Genes and Development*, 18(6), 715–727. <https://doi.org/10.1101/gad.289504>
- Pérez-Mendoza, D., Aragón, I. M., Prada-Ramírez, H. A., Romero-Jiménez, L., Ramos, C., Gallegos, M. T., & Sanjuán, J. (2014). Responses to elevated c-di-GMP levels in mutualistic and pathogenic plant-interacting bacteria. *PLoS ONE*, 9(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091645>
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., & Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, 25(13), 1605–1612. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>
- Pogorelova, A. Y., Mulyukin, A. L., Antonyuk, L. P., Galchenko, V. F., & El'-Registan, G. I. (2009). Phenotypic variability in *Azospirillum brasilense* strains Sp7 and Sp245: Association with dormancy and characteristics of the variants. *Microbiology*, 78(5), 559–568. <https://doi.org/10.1134/S0026261709050051>
- Poulin, M. B., & Kuperman, L. L. (2021). Regulation of Biofilm Exopolysaccharide Production by Cyclic Di-Guanosine Monophosphate. *Frontiers in Microbiology*, 12(September), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.730980>
- R. Green, M., & Sambrook, J. (2012). Molecular cloning A LABORATORY MANUAL FOURTH EDITION. In *Dong wu xue yan jiu = Zoological research / “Dong wu xue yan jiu” bian ji wei yuan hui bian ji* (Vol. 1, Issue 1).
- Ramírez-Mata, A., López-Lara, L. I., Xiqui-Vázquez, M. L., Jijón-Moreno, S., Romero-Osorio, A., & Baca, B. E. (2016). The cyclic-di-GMP diguanylate cyclase CdgA has a role in biofilm formation and exopolysaccharide production in *Azospirillum brasilense*. *Research in Microbiology*, 167(3). <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2015.12.004>
- Ramírez-Mata, A., Pacheco, C. M., Cruz Pérez, J. F., Sáenz, M. M., & Baca, B. E. (2018). In silico comparative analysis of GGDEF and EAL domain signaling proteins from the *Azospirillum* genomes. *BMC Microbiology*, 18(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1157-0>
- Ramirez-Mata, A., Pacheco, M. R., Moreno, S. J., Xiqui-Vazquez, M. L., & Baca, B. E. (2018). Versatile use of *Azospirillum brasilense* strains tagged with egfp and mCherry genes for the visualization of biofilms associated with wheat roots. *Microbiological Research*, 215(July), 155–163. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.07.007>
- Ravaioli, S., Campoccia, D., Speziale, P., Pietrocola, G., Zatorska, B., Maso, A., Presterl, E., Montanaro, L., & Arciola, C. R. (2020). Various biofilm matrices of the emerging pathogen *Staphylococcus lugdunensis*: exopolysaccharides, proteins, eDNA and their correlation with biofilm mass. *Biofouling*, 36(1). <https://doi.org/10.1080/08927014.2020.1716217>
- Ribbe, J., Baker, A. E., Euler, S., O’Toole, G. A., & Maier, B. (2017). Role of Cyclic Di-GMP and exopolysaccharide in type IV pilus dynamics. *Journal of Bacteriology*, 199(8), 1–10. <https://doi.org/10.1128/JB.00859-16>
- Richter, A. M., Fazli, M., Schmid, N., Shilling, R., Suppiger, A., Givskov, M., Eberl, L., & Tolker-Nielsen, T. (2019). Key players and individualists of Cyclic-di-GMP signaling in *Burkholderia cenocepacia*. *Frontiers in Microbiology*, 10(JAN). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03286>
- Rodriguez Caceres, E. A. (1982). Improved medium for isolation of *Azospirillum* spp. *Applied and*

- Römling, U., Galperin, M. Y., & Gomelsky, M. (2013). Cyclic di-GMP: the First 25 Years of a Universal Bacterial Second Messenger. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 77(1), 1–52. <https://doi.org/10.1128/membr.00043-12>
- Römling, U., Liang, Z. X., & Dow, J. M. (2017). Progress in understanding the molecular basis underlying functional diversification of cyclic dinucleotide turnover proteins. *Journal of Bacteriology*, 199(5). <https://doi.org/10.1128/JB.00790-16>
- Ross, P., Weinhouse, H., Aloni, Y., Michaeli, D., Weinberger-Ohana, P., Mayer, R., Braun, S., De Vroom, E., Van Der Marel, G. A., Van Boom, J. H., & Benziman, M. (1987). Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* by cyclic diguanylic acid. *Nature*, 325(6101). <https://doi.org/10.1038/325279a0>
- Rossi, F. A., Medeot, D. B., Liaudat, J. P., Pistorio, M., & Jofré, E. (2016). In *Azospirillum brasilense*, mutations in flmA or flmB genes affect polar flagellum assembly, surface polysaccharides, and attachment to maize roots. *Microbiological Research*, 190, 55–62. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.05.006>
- Ryjenkov, D. A., Simm, R., Römling, U., & Gomelsky, M. (2006). The PilZ domain is a receptor for the second messenger c-di-GMP: The PilZ domain protein YcgR controls motility in enterobacteria. *Journal of Biological Chemistry*, 281(41), 30310–30314. <https://doi.org/10.1074/jbc.C600179200>
- Sanyal, R., Vimala, A., & Harinarayanan, R. (2020). Studies on the Regulation of (p)ppGpp Metabolism and Its Perturbation Through the Over-Expression of Nudix Hydrolases in *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology*, 11(October), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.562804>
- Schäper, S., Krol, E., Skotnicka, D., Kaefer, V., Hilker, R., Sogaard-Andersen, L., & Becker, A. (2016). Cyclic di-GMP regulates multiple cellular functions in the symbiotic alphaproteobacterium *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology*, 198(3), 521–535. <https://doi.org/10.1128/JB.00795-15>
- Schlöter, M., & Hartmann, A. (1998). Endophytic and surface colonization of wheat roots (*Triticum aestivum*) by different *Azospirillum brasilense* strains studied with strain-specific monoclonal antibodies. *Symbiosis*, 25(1–3).
- Schumacher, M. A., Gallagher, K. A., Holmes, N. A., Chandra, G., Henderson, M., Kysela, D. T., Brennan, R. G., & Buttner, M. J. (2021). Evolution of a σ –(c-di-GMP)–anti- σ switch. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118(30). <https://doi.org/10.1073/pnas.2105447118>
- Seshasayee, A. S. N., Fraser, G. M., & Luscombe, N. M. (2010). Comparative genomics of cyclic-di-GMP signalling in bacteria: Post-translational regulation and catalytic activity. *Nucleic Acids Research*, 38(18), 5970–5981. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq382>
- Sezonov, G., Joseleau-Petit, D., & D’Ari, R. (2007). *Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani broth. *Journal of Bacteriology*, 189(23). <https://doi.org/10.1128/JB.01368-07>
- Shang, L., Yan, Y., Zhan, Y., Ke, X., Shao, Y., Liu, Y., Yang, H., Wang, S., Dai, S., Lu, J., Yan, N., Yang, Z., Lu, W., Liu, Z., Chen, S., Elmerich, C., & Lin, M. (2021). A regulatory network involving Rpo, Gac and Rsm for nitrogen-fixing biofilm formation by *Pseudomonas stutzeri*. *Npj Biofilms Microbiomes*, 7(54). <https://doi.org/10.1038/s41522-021-00230-7>
- Shelud’ko, A. V., Filip’cheva, Y. A., Telesheva, E. M., Yevstigneeva, S. S., Petrova, L. P., & Katsy, E. I. (2019). Polar flagellum of the alphaproteobacterium *Azospirillum brasilense* Sp245 plays a role in biofilm biomass accumulation and in biofilm maintenance under stationary and dynamic conditions. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35(2), 0. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2594-0>
- Sheludko, A. V., Kulibyakina, O. V., Shirokov, A. A., Petrova, L. P., Matora, L. Y., & Katsy, E. I. (2008). The effect of mutations affecting synthesis of lipopolysaccharides and calcofluor-binding polysaccharides on biofilm formation by *Azospirillum brasilense*. *Microbiology*, 77(3), 313–317. <https://doi.org/10.1134/S0026261708030107>
- Shyp, V., Dubey, B. N., Böhm, R., Hartl, J., Nesper, J., Vorholt, J. A., Hiller, S., Schirmer, T., & Jenal, U.

- (2021). Reciprocal growth control by competitive binding of nucleotide second messengers to a metabolic switch in *Caulobacter crescentus*. *Nature Microbiology*, 6(1), 59–72. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-00809-4>
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Söding, J., Thompson, J. D., & Higgins, D. G. (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology*, 7(539). <https://doi.org/10.1038/msb.2011.75>
- Simon, R., Priefer, U., & Pühler, A. (1983). A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: Transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Bio/Technology*, 1(9). <https://doi.org/10.1038/nbt1183-784>
- Sisti, F., Ha, D. G., O'Toole, G. A., Hozbor, D., & Fernández, J. (2013). Cyclic-di-GMP signalling regulates motility and biofilm formation in *Bordetella bronchiseptica*. *Microbiology (United Kingdom)*, 159(PART 5), 869–879. <https://doi.org/10.1099/mic.0.064345-0>
- Skvortsov, I. M., & Ignatov, V. V. (1998). Extracellular polysaccharides and polysaccharide-containing biopolymers from *Azospirillum* species: Properties and the possible role in interaction with plant roots. *FEMS Microbiology Letters*, 165(2), 223–229. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(98\)00273-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(98)00273-0)
- Song, M. G., Bail, S., & Kiledjian, M. (2013). Multiple Nudix family proteins possess mRNA decapping activity. *Rna*, 19(3), 390–399. <https://doi.org/10.1261/rna.037309.112>
- Spiers, A. J., Bohannon, J., Gehrig, S. M., & Rainey, P. B. (2003). Biofilm formation at the air-liquid interface by the *Pseudomonas fluorescens* SBW25 wrinkly spreader requires an acetylated form of cellulose. *Molecular Microbiology*, 50(1), 15–27. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03670.x>
- Srouji, J. R., Xu, A., Park, A., Kirsch, J. F., & Brenner, S. E. (2017). The evolution of function within the Nudix homology clan. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, 85(5), 775–811. <https://doi.org/10.1002/prot.25223>
- Steinchen, W., Zegarra, V., & Bange, G. (2020). (p)ppGpp: Magic Modulators of Bacterial Physiology and Metabolism. *Frontiers in Microbiology*, 11(September). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.02072>
- Tikhonova, E. N., Grouzdev, D. S., & Kravchenko, I. K. (2019). *Azospirillum palustre* sp. Nov., a methylotrophic nitrogen-fixing species isolated from raised bog. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 69(9), 2787–2793. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003560>
- Toffoli, L. M., Martínez-Zamora, M. G., Medrano, N. N., Fontana, C. A., Lovaisa, N. C., Delaporte-Quintana, P., Elias, J. M., Salazar, S. M., & Pedraza, R. O. (2021). Natural occurrence of *Azospirillum brasilense* in petunia with capacity to improve plant growth and flowering. *Journal of Basic Microbiology*, 61(7), 662–673. <https://doi.org/10.1002/jobm.202100064>
- Treffers, H., Spinelli, V., & Belser, N. (1954). A factor (or mutator gene) influencing mutation rates in *Escherichia coli*. *PNAS*, 30(Ii), 297–299.
- Valentini, M., & Filloux, A. (2016a). Biofilms and Cyclic di-GMP (c-di-GMP) signaling: Lessons from *Pseudomonas aeruginosa* and other bacteria. *Journal of Biological Chemistry*, 291(24), 12547–12555. <https://doi.org/10.1074/jbc.R115.711507>
- Valentini, M., & Filloux, A. (2016b). Biofilms and Cyclic di-GMP (c-di-GMP) signaling: Lessons from *Pseudomonas aeruginosa* and other bacteria. *Journal of Biological Chemistry*, 291(24), 12547–12555. <https://doi.org/10.1074/jbc.R115.711507>
- Vasicek, E. M., O'Neal, L., Parsek, M. R., Fitch, J., White, P., & Gunn, J. S. (2021). L-Arabinose Transport and Metabolism in *Salmonella* Influences Biofilm Formation. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11(July), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.698146>
- Viruega-Góngora, V. I., Acatitla-Jácome, I. S., Reyes-Carmona, S. R., Baca, B. E., & Ramírez-Mata, A. (2020). Spatio-temporal formation of biofilms and extracellular matrix analysis in *Azospirillum brasilense*. *FEMS*

- Microbiology Letters*, 367(4), 1–10. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnaa037>
- Vorobiev, S. M., Neely, H., Yu, B., Seetharaman, J., Xiao, R., Acton, T. B., Montelione, G. T., & Hunt, J. F. (2012). Crystal structure of a catalytically active GG(D/E)EF diguanylate cyclase domain from *Marinobacter aquaeolei* with bound c-di-GMP product. *Journal of Structural and Functional Genomics*, 13(3). <https://doi.org/10.1007/s10969-012-9136-4>
- Wan, X., Yang, J., Ahmed, W., Liu, Q., Wang, Y., Wei, L., & Ji, G. (2021). Functional analysis of pde gene and its role in the pathogenesis of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*. *Infection, Genetics and Evolution*, 94(July), 105008. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.105008>
- Wang, D., Xu, A., Elmerich, C., & Ma, L. Z. (2017). Biofilm formation enables free-living nitrogen-fixing rhizobacteria to fix nitrogen under aerobic conditions. *ISME Journal*, 11(7), 1602–1613. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.30>
- Wang, L., & Stegemann, J. P. (2010). Extraction of high quality RNA from polysaccharide matrices using cetyltrimethylammonium bromide. *Biomaterials*, 31(7). <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.11.024>
- Wassmann, P., Chan, C., Paul, R., Beck, A., Heerklotz, H., Jenal, U., & Schirmer, T. (2007). Structure of BeF₃-Modified Response Regulator PleD: Implications for Diguanylate Cyclase Activation, Catalysis, and Feedback Inhibition. *Structure*, 15(8), 915–927. <https://doi.org/10.1016/j.str.2007.06.016>
- Waterhouse, A. M., Procter, J. B., Martin, D. M. A., Clamp, M., & Barton, G. J. (2009). Jalview Version 2-A multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics*, 25(9). <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp033>
- Whiteley, C. G., & Lee, D. J. (2015). Bacterial diguanylate cyclases: Structure, function and mechanism in exopolysaccharide biofilm development. In *Biotechnology Advances* (Vol. 33, Issue 1, pp. 124–141). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.11.010>
- Wisniewski-Dyé, F., Borziak, K., Khalsa-Moyers, G., Alexandre, G., Sukharnikov, L. O., Wuichet, K., Hurst, G. B., McDonald, W. H., Robertson, J. S., Barbe, V., Calteau, A., Rouy, Z., Mangenot, S., Prigent-Combaret, C., Normand, P., Boyer, M., Siguier, P., Dessaux, Y., Elmerich, C., ... Zhulin, I. B. (2011). *Azospirillum* genomes reveal transition of bacteria from aquatic to terrestrial environments. *PLoS Genetics*, 7(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002430>
- Wolff, K. A., de la Peña, A. H., Nguyen, H. T., Pham, T. H., Amzel, L. M., Gabelli, S. B., & Nguyen, L. (2015). A Redox Regulatory System Critical for Mycobacterial Survival in Macrophages and Biofilm Development. *PLoS Pathogens*, 11(4), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004839>
- Yang, Jianyi, Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J., & Zhang, Y. (2014). The I-TASSER suite: Protein structure and function prediction. *Nature Methods*, 12(1), 7–8. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3213>
- Yang, Jin, Anderson, B. W., Turdiev, A., Turdiev, H., Stevenson, D. M., Amador-Noguez, D., Lee, V. T., & Wang, J. D. (2020). The nucleotide pGpp acts as a third alarmone in *Bacillus*, with functions distinct from those of (p) ppGpp. *Nature Communications*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19166-1>
- Yoshimura, K., & Shigeoka, S. (2015). Versatile physiological functions of the Nudix hydrolase family in *Arabidopsis*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 79(3), 354–366. <https://doi.org/10.1080/09168451.2014.987207>
- Yuan, X., Zeng, Q., Xu, J., Severin, G. B., Zhou, X., Waters, C. M., Sundin, G. W., Ibekwe, A. M., Liu, F., & Yang, C. H. (2020). Tricarboxylic acid (TCA) cycle enzymes and intermediates modulate intracellular cyclic di-GMP levels and the production of plant cell wall-degrading enzymes in soft rot Pathogen *Dickeya dadantii*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 33(2), 296–307. <https://doi.org/10.1094/MPMI-07-19-0203-R>
- Zähringer, F., Lacanna, E., Jenal, U., Schirmer, T., & Boehm, A. (2013). Structure and signaling mechanism of a zinc-sensory diguanylate cyclase. *Structure*, 21(7), 1149–1157.

<https://doi.org/10.1016/j.str.2013.04.026>

- Zamorano-Sánchez, D., Xian, W., Lee, C. K., Salinas, M., Thongsomboon, W., Cegelski, L., Wong, G. C. L., & Yildiz, F. H. (2019). Functional Specialization in *Vibrio cholerae* Diguanylate. *MBio*, *10*(2), 1–16.
- Zhang, Y., Rejman, D., & Gerdes, K. (2018). Novel (p)ppGpp binding and metabolizing proteins of *Escherichia coli*. *MBio*. <https://doi.org/10.1128/mBio.02188-17>
- Zhao, Z. L., Ming, H., Ding, C. L., Ji, W. L., Cheng, L. J., Niu, M. M., Zhang, Y. M., Zhang, L. Y., Meng, X. L., & Nie, G. X. (2020). *Azospirillum thermophilum* sp. Nov., isolated from a hot spring. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *70*(1), 550–554. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003788>
- Zhou, H., Zheng, C., Su, J., Chen, B., Fu, Y., Xie, Y., Tang, Q., Chou, S. H., & He, J. (2016). Characterization of a natural triple-tandem c-di-GMP riboswitch and application of the riboswitch-based dual-fluorescence reporter. *Scientific Reports*, *6*(January), 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep20871>



CdgC, a Cyclic-di-GMP Diguanylate Cyclase of *Azospirillum baldaniorum* Is Involved in Internalization to Wheat Roots

Daniel Sierra Cacho¹, David S. Zamorano Sánchez², María Luisa Xiqui-Vázquez¹, Víctor Iván Viruega Góngora¹, Alberto Ramírez-Mata¹ and Beatriz E. Baca^{1*}

OPEN ACCESS

Edited by:

Katharina Pawlowski,
Stockholm University, Sweden

Reviewed by:

Juan Sanjuan,
Estación Experimental de Zaidín,
Consejo Superior de Investigaciones
Científicas (CSIC), Spain
Max Dow,
University College Cork, Ireland
Roshni R. Kharadi,
Michigan State University,
United States

*Correspondence:

Beatriz E. Baca
beatriz.baca@correo.buap.mx;
beatrizebaca@gmail.com

Specialty section:

This article was submitted to
Plant Symbiotic Interactions,
a section of the journal
Frontiers in Plant Science

Received: 27 July 2021

Accepted: 20 September 2021

Published: 20 October 2021

Citation:

Sierra Cacho D,
Zamorano Sánchez DS,
Xiqui-Vázquez ML,
Viruega Góngora VI, Ramírez-Mata A
and Baca BE (2021) CdgC,
a Cyclic-di-GMP Diguanylate Cyclase
of *Azospirillum baldaniorum* Is
Involved in Internalization to Wheat
Roots. *Front. Plant Sci.* 12:748393.
doi: 10.3389/fpls.2021.748393

¹ Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Ciudad Universitaria, Puebla, México, ² Programa de Biología de Sistemas y Biología Sintética, Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, México

Azospirillum baldaniorum is a plant growth-promoting rhizobacterium (PGPR) capable of fixing nitrogen, the synthesis of several phytohormones including indole-acetic acid, and induction of plant defenses against phytopathogens. To establish a successful and prolonged bacteria-plant interaction, *A. baldaniorum* can form biofilms, bacterial communities embedded in a self-made matrix formed by extracellular polymeric substances which provide favorable conditions for survival. A key modulator of biofilm formation is the second messenger bis-(3'-5')-cyclic-dimeric-GMP (c-di-GMP), which is synthesized by diguanylate cyclases (DGC) and degraded by specific phosphodiesterases. In this study, we analyzed the contribution of a previously uncharacterized diguanylate cyclase designated CdgC, to biofilm formation and bacterial-plant interaction dynamics. We showed that CdgC is capable of altering c-di-GMP levels in a heterologous host, strongly supporting its function as a DGC. The deletion of *cdgC* resulted in alterations in the three-dimensional structure of biofilms in a nitrogen-source dependent manner. CdgC was required for optimal colonization of wheat roots. Since we also observed that CdgC played an important role in exopolysaccharide production, we propose that this signaling protein activates a physiological response that results in the strong attachment of bacteria to the roots, ultimately contributing to an optimal bacterium-plant interaction. Our results demonstrate that the ubiquitous second messenger c-di-GMP is a key factor in promoting plant colonization by the PGPR *A. baldaniorum* by allowing proficient internalization in wheat roots. Understanding the molecular basis of PGPR-plant interactions will enable the design of better biotechnological strategies of agro-industrial interest.

Keywords: diguanylate cyclase, extracellular polysaccharides, wheat endophyte colonization, *Azospirillum baldaniorum*, cyclic di-GMP

BENEFICIAL MICROBES IN AGRO-ECOLOGY

BACTERIA AND FUNGI

Edited by

N. AMARESAN

*C.G. Bhakta Institute of Biotechnology, Uka Tarsadia University,
Bardoli, Surat, Gujarat, India*

M. SENTHIL KUMAR

*ICAR-Indian Institute of Pulses Research, Kanpur,
Uttar Pradesh, India*

K. ANNAPURNA

*Division of Microbiology, ICAR-Indian Agricultural Research Institute,
New Delhi, India*

KRISHNA KUMAR

*Pandit Deendayal Upadhyay College of Horticulture & Forestry,
Dr. Rajendra Prasad Central
Agricultural University, Tirhut College Campus,
Dholi, Muzaffarpur, Bihar, India*

A. SANKARANARAYANAN

*C.G. Bhakta Institute of Biotechnology, Uka Tarsadia University,
Bardoli, Surat, Gujarat, India*



ACADEMIC PRESS

An imprint of Elsevier

Azospirillum

Raúl O. Pedraza¹, María P. Filippone¹, Cecilia Fontana²,
Sergio M. Salazar^{1,2}, Alberto Ramírez-Mata³,
Daniel Sierra-Cacho³, Beatriz E. Baca³

¹Facultad de Agronomía y Zootecnia, Universidad Nacional de Tucumán, San Miguel de Tucumán, Tucumán, Argentina; ²INTA EEA Famaillá, Tucumán, Argentina; ³Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Ciudad Universitaria, Puebla Pue, México

Agricultural production has to face to new challenges that go beyond the merely technical ones, which consider social, economic, and especially environmental concerns. Therefore, it is necessary to approach agricultural activities from a new technologic and development focus within a framework of environmental sustainability that allows satisfying the needs of present generations without affecting the natural resources that future generations will need. In this sense, agricultural activities under the principles of agroecology are presented as a viable alternative, as it is more sensitive to the complexity of agricultural systems in diverse social and ecologic contexts and has a multidisciplinary approach that includes concepts of ecologic sustainability, food security and safety, economic viability, conservation of resources, and social equity, as well as an increase in production.

Agroecology is considered both a science and a set of practices (Altieri, 2002). Altieri, Gliessman and other researchers agree that "Agroecology, as a science, integrates traditional knowledge and advances in ecology and agronomy and provides tools to design systems that, based on the interactions of biodiversity, work by themselves, and they sponsor their own fertility, pest regulation, health and productivity, without requiring technologic packages" (Altieri, 2002; Gliessman, 2016; Nicholls et al., 2016). Agroecology is based on the application of basic principles of ecology to the design and management of sustainable agroecosystems. The principles of agroecology include different aspects, generally violated or ignored for conventional agriculture (De-Schutter, 2010); these aspects are very diverse, such as the conservation of natural and agricultural resources (capital, energy, water, soil,