



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

**CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS
LABORATORIO DE INTERACCIÓN BACTERIA-PLANTA**

Estudio del gen *hkhC* en *Azospirillum baldaniorum* Sp245

**Tesis que para obtener el grado de:
Licenciado en Biomedicina**

PRESENTA:

C. CHRISTOPHER NAVARRO MARTÍNEZ

ASESOR (ES) TESIS

D.C. Alberto Ramírez Mata

Asesor experto

D.C. Sandra Reyes Carmona

Asesor metodológico

PUEBLA, PUE 2022

Agradecimientos.

A mis padres Joel y Concepción por tanto apoyo, confianza y amor que me han dado que no puedo explicar lo afortunado que soy por tenerlos, por ellos soy lo que soy, a donde he llegado agradezco el haberme brindado toda mi educación académica, moral y social en mi vida, por apoyarme en los momentos difíciles que alguna vez pasé en esta travesía estudiantil, por estar al pendiente de mí desde el momento en que nací, por todas las dificultades que tuvieron que pasar, años de ir al hospital, desveladas. Sobre todo, por ser los mejores ejemplos a seguir, por su esfuerzo, constancia y dedicación. A mi hermano Samuel, por su apoyo, y amor por ser además de mi hermano, ser un amigo y confidente para mí, por los consejos, y todos los momentos compartidos a través de los años, en deporte, política, con amigos y familiares.

Agradezco a mis familiares, a mis abuelos José y Teresa de parte de mi mamá, a mis abuelos Francisca y Joel de parte de mi papá, de ellos agradezco principalmente a mi abuelo José quien fue con quien más compartí momentos divertidos y consejos, le envío un saludo a donde quiera que esté. También agradezco a mis demás familiares que más me han marcado mis tías Josefina, Georgina, Malena Navarro, mi tío Héctor, mi primo José Alberto que es como un hermano para mí. Agradezco a mis amigos que he conocido a través de los años en todas las etapas de mi vida, a mis amigos de la secundaria Luis Eduardo, Gustavo, mis amigos del bachiller Martín, Brisa, Norma, Dylan, Kariana, Jazmín, mis amigos que conocí en mi breve instancia en la UATx Edgardo, Eduardo, mis amigos de la BUAP tanto en el eje básico como formativo Iñaki, Diana, Nayeli, Bernardo, Alan, Eduardo Minto, Roberto Berra, Brenda, Josué, incluyendo los amigos que hice en el laboratorio donde elaboré esta tesis Ibelith, Francisco, Daniel, mis amigos Manuel Martínez, Alejandro Rodríguez, Arturo, Hernán, Mario, Geovanni, Alejandro Cruz, Cesar Díaz, Alejandro Olivares, Jhonatan y los que me haya faltado por mencionar, a todo ellos amigos les agradezco porque de ellos he aprendido muchas cosas a lo largo de mi vida.

Por último, agradecer a aquellos profesores que han marcado cada etapa de mi trayectoria y formación académica y social. A la química Xiqui, a la Doctora Beatriz Baca, a mi co-asesora la Doctora Sandra Raquel y a mi asesor el Doctor Alberto Ramírez, por

la confianza y el apoyo para poder realizar y concluir este proyecto de manera satisfactoria.

Dedicatoria

Este trabajo está dedicado a mis padres, mi hermano, y mis abuelos, todo el esfuerzo hecho en todos mis años como estudiante en todos los niveles, básico, medio superior y superior. De igual manera este trabajo, está dedicado a la ciencia la cual es la base fundamental de nuestro entendimiento a todo lo que nos rodea. A los investigadores que se van forjando año con año y vislumbrando con sus hallazgos la naturaleza del conocimiento.

ÍNDICE

1. Resumen	1
2. Introducción	2
2.1. Biotecnología y producción agrícola	2
2.2. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal y su asociación con la rizosfera	2
2.3. Género <i>Azospirillum</i>	4
2.4. <i>Azospirillum baldaniorum</i>	4
2.5. Asociación de <i>Azospirillum</i> con la planta	4
2.6. Movilidad y quimiotaxis	6
2.6.1. Sistemas de quimiotaxis en <i>Azospirillum</i>	7
2.7. Formación de biopelícula	7
2.8. Los Sistemas de Transducción de señales	8
2.9. Sistemas de Doble Componente (SDC)	9
2.10. Cinasa histidínica (CH)	10
2.10.1. Los dominios DHp (HiskA), CA (HATPasa) y el proceso de autofosforilación	11
2.11. Regulador de respuesta (RR)	14
2.12. Fosforelevo	14
2.13. Evolución de los SDC.....	16
2.14. Filogenia molecular.....	17
2.15. Análisis <i>in silico</i> de acoplamiento molecular y modelado.....	20
3. Antecedentes	21
3.1. Antecedentes generales	21
3.1.1 SDC en <i>Azospirillum</i>	21
3.2 Antecedentes específicos	23
4. Planteamiento del problema	26
5. Justificación	27
6. Objetivos	27
6.1. Objetivo General	27
6.2. Objetivos Específicos	27
7. Material y métodos en el análisis <i>in silico</i>	28
7.1 Selección del gen <i>hkhC</i>	28:
7.2 Análisis de promotores.....	28
7.3 Análisis filogenéticos.....	28
7.4 Análisis <i>in silico</i> de la proteína HkhC	29
7.5 Análisis <i>in silico</i> y modelado de los dominios de detección de estímulos fisicoquímicos y moléculas pequeñas de la proteína HkhC.....	29
7.6 Análisis <i>in silico</i> del modelado de los dominios característicos de cinasa histidínica de la proteína HkhC.....	30
7.7 Análisis del sitio de unión a ATP y de acoplamiento molecular del dominio CA de HkhC.....	30
7.8 Análisis <i>in silico</i> del modelado de los dominios receptores de la proteína HkhC.....	31
8. Materiales y métodos del análisis experimental.....	31
8.1 Material biológico.....	31
8.2 Condiciones de cultivo celular.....	33
8.3 Diseño de iniciadores.....	33
8.4 Extracción de ADN.....	35
8.5 Condiciones de amplificación de los fragmentos A y B por PCR	35

8.6 Clonación de los fragmentos A y B a los vectores de mantenimiento pGEM-T-easy y pBSK.....	35
8.7 Transformación de las construcciones pGHKHA y pBSK-HKHCB en <i>E. coli</i>	35
8.8 Subclonación y construcción del plásmido mutagénico pJMS-HKHCB	36
8.9 Amplificación de los fragmentos A y B en el fondo genético de las cepas <i>A. baldaniorum</i> Sp245 y <i>E. coli</i> S17.1 que contiene el plásmido suicida pJMS-HKHCB.....	36
8.10 Obtención de las mutantes <i>A. baldaniorum</i> $\Delta hkhC::kanR$ y <i>A. baldaniorum</i> $\Delta hkhC::kanR, \Delta hkhB$..	36
9. Resultados <i>In silico</i>	37
9.1 Análisis <i>in silico</i> del gen <i>hkhC</i>	41
9.3 Análisis filogenético del gen <i>hkhC</i>	42
9.4 Análisis <i>in silico</i> de la proteína HkhC.....	48
9.5 Análisis <i>in silico</i> y modelado de los dominios de detección de estímulos fisicoquímicos y moléculas pequeñas de la proteína HkhC.....	49
9.6 Análisis <i>in silico</i> del modelado de los dominios característicos de cinasa histidínica de la proteína HkhC.....	53
9.7 Análisis del sitio de unión a ATP y de acoplamiento molecular del dominio CA de HkhC.....	58
9.8 Análisis <i>in silico</i> del modelado de los dominios receptores de la proteína HkhC.....	65
10 Resultados experimentales.....	69
10.1 Diseño de iniciadores.....	69
10.2 Amplificación de la región intergénica 16S de la especie <i>baldaniorum</i> en las cepas <i>A. baldaniorum</i> Sp245 y <i>A. baldaniorum</i> C5.56 ($\Delta hkhB$).....	69
10.3 Amplificación de los fragmentos A y B flanqueantes al gen <i>hkhC</i>	70
10.4 Construcción de plásmidos.....	71
10.4.1 Construcción del plásmido de mantenimiento pGEM-HKHCA.....	71
10.4.2 Construcción del plásmido de mantenimiento pBSK-HKHCB.....	72
10.4.3 Construcción del plásmido suicida pJMS-HKHCB.....	72
10.5 Amplificación de los fragmentos A y B en el fondo genético de las cepas <i>A. baldaniorum</i> Sp245 y <i>E. coli</i> S17.1 que contiene el plásmido suicida pJMS-HKHCB.....	74
10.6 Análisis <i>in silico</i> previo de la comparación de los contextos genéticos que se obtendrían al eliminar el gen <i>hkhC</i> en el fondo genético de la cepa silvestre <i>A. baldaniorum</i> Sp245 y la cepa mutante <i>A. baldaniorum</i> C5.56 ($\Delta hkhB$).....	74
10.7 Obtención de las mutantes <i>A. baldaniorum</i> $\Delta hkhC::kanR$ y <i>A. baldaniorum</i> $\Delta hkhB, \Delta hkhC::kanR$...	75
10.8 Amplificación de las regiones flanqueantes al gen <i>hkhB</i>	77
11. Discusión	78
12. Conclusiones	87
13. Perspectivas	88
14. Anexos	89
15. Bibliografía	90

1. RESUMEN

Se calcula que el 80% de las necesidades dietéticas de los humanos provienen de las fuentes vegetales. Se estima que para el año 2050 la población mundial alcance aproximadamente los 10 mil millones de personas, por lo tanto, es necesario un aumento sin precedentes en la producción agrícola. El proceso de desarrollo de cultivos es usualmente controlado por señales internas y externas que dependen de un suministro adecuado de nutrientes del suelo hacia las raíces de las plantas; en la actualidad existen bacterias denominadas como rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (RPCV) con la capacidad de favorecer estos procesos. *Azospirillum baldaniorum* Sp245 es una RPCV ampliamente estudiada y descrita en la actualidad, con la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico, formar biopelícula, sintetizar fitohormonas, y quimiotaxis entre otros. Estos mecanismos son claves durante la interacción bacteria-planta en el proceso de colonización generando efectos benéficos. Por lo tanto, en este trabajo se aborda el estudio del análisis bioinformático del gen *hkhC* incluyendo las relaciones filogenéticas con base en la predicción de filogramas moleculares y el análisis de su producto proteico por medio de búsqueda de motivos, modelado y acoplamiento molecular de los dominios, y por último el estudio experimental mutagénico del gen a través de la obtención de las mutantes *A. baldaniorum* $\Delta hkhC::kanR$ y *A. baldaniorum* $\Delta hkhB, \Delta hkhC::kanR$. Además del posible papel que tendría *hkhC* en la formación de un sistema de múltiples componentes (SMC) con posibles funciones en la regulación del crecimiento bacteriano, estrés osmótico, movilidad y formación de biopelícula.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Biotecnología y producción agrícola

El papel que desarrolla la microbiología, la agricultura y la biotecnología ha ganado mucha importancia en la producción de cultivos, debido a que las fuentes vegetales satisfacen alrededor del 80% de las necesidades dietéticas de los humanos. Se estima que para el año 2050 la población mundial alcance aproximadamente los 10 mil millones de personas, por lo tanto, es necesario un aumento sin precedentes en la producción agrícola con ayuda de las tecnologías aplicadas a la microbiología (FAO, 2017; Sessitsch et al., 2018; Steinbu, 2010).

El proceso de desarrollo de plantas es controlado por señales internas y externas, que dependen de un suministro adecuado de nutrientes y minerales provenientes del suelo hacia las raíces (Dotaniya & Meena, 2015).

2.2 Bacterias promotoras del crecimiento vegetal y su asociación con la rizosfera

Desde hace años se ha observado la presencia en el suelo de una gran variedad de microorganismos alrededor de las raíces de las plantas, a este ambiente se le ha denominado rizosfera (Hartmann & Baldani, 2006). Actualmente, la rizosfera es definida como el volumen de suelo que está bajo la influencia de las raíces de las plantas donde tienen lugar importantes interacciones microorganismo-planta (Steinbu, 2010). Los organismos presentes en la microbiota de la rizosfera pueden tener efectos profundos en el crecimiento, la nutrición y la salud de las plantas en los agroecosistemas (Figura 1) (Philippot et al., 2013).

La rizosfera está compuesta por tres zonas que se definen en función de su proximidad e influencia a la raíz. La endorrizosfera incluye porciones de la corteza y la endodermis donde los microorganismos y los cationes pueden ocupar el espacio apoplásico. El rizoplano es la zona medial directamente adyacente a la raíz que incluye la epidermis de la raíz y el mucílago. La zona más externa es la ectorrizosfera que se extiende desde el rizoplano hacia la mayor parte del suelo (McNear ~~Jf~~, 2013).

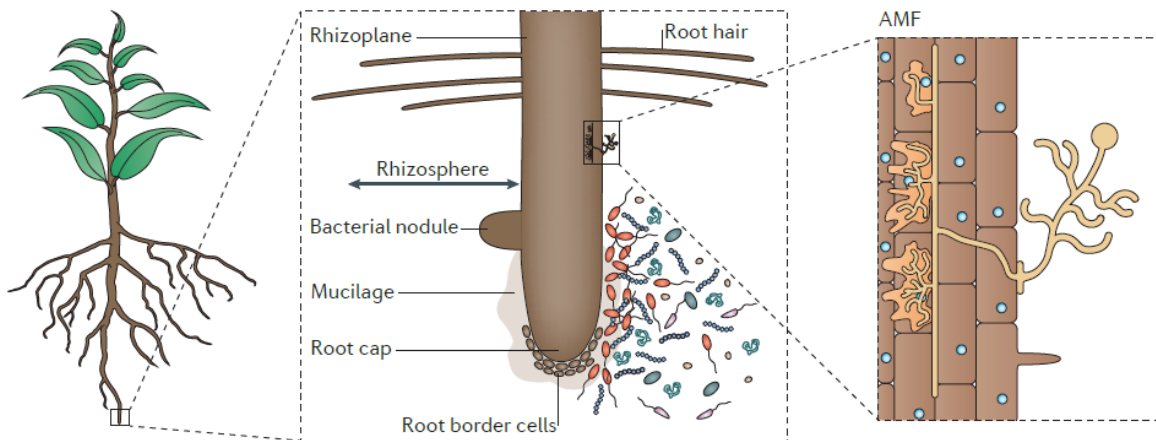


Figura 1. **La rizosfera.** La rizosfera es una zona estrecha de suelo que rodea e influye en las raíces de las plantas. El esquema muestra imágenes ampliadas de la rizosfera, que contienen bacterias y hongos (Philippot et al., 2013).

En los procesos de germinación, crecimiento y nutrición de las raíces de las plantas a través del suelo, las interacciones entre los nutrientes, la pérdida de materia orgánica y los exudados radiculares, potencian el desarrollo de actividad microbiana inherente a la raíz, modificando el microclima de la rizosfera, a este proceso se le conoce como “*el efecto rizosférico*” (Lynch & Whipps, 1990; Shukla et al., 2013).

Durante el desarrollo y nutrición de la planta existen bacterias específicas que muestran la capacidad de favorecer algunos procesos biológicos como la obtención de nitrógeno (fijadores de nitrógeno de vida libre y simbióticas), así como la producción de fitohormonas (Dotaniya & Meena, 2015; Egamberdieva et al., 2017). Las bacterias que cohabitan este microambiente (rizosfera) son denominadas rizobacterias, las cuales ejercen efectos benéficos en el desarrollo de la planta, clasificándolas como Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal o RPCV los géneros bacterianos pertenecientes a este grupo son los siguientes: *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Arthobacter*, *Azotobacter*, *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Bradyrhizobium*, *Enterobacter*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Rhizobium*, *Frankia*, *Serratia*, *Thiobacillus*, *Klebsiella*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, y *Bacillus* (Goswami et al., 2016).

2.3 Género *Azospirillum*

Uno de los géneros más estudiados de las RPCV es *Azospirillum*. Las bacterias del género *Azospirillum* pertenecen a la subclase de las alfa proteobacterias que de igual manera constituye un subgrupo dentro de la familia *Rhodospirillaceae*. Son bacterias Gram negativas, no formadoras de esporas ampliamente distribuidas por todo el mundo, pero localizadas principalmente en regiones tropicales, subtropicales y templadas; la mayoría de ellas se describieron a partir de raíces de plantas y muestras de suelo. Algunas especies de este género tienen una importancia agrícola significativa, especialmente como especies fijadoras aeróbicas, con una gran capacidad para promover el crecimiento de las plantas. Hasta la fecha se conocen 22 especies bacterianas, de las cuales *Azospirillum brasilense*, *Azospirillum baldaniorum* y *Azospirillum lipoferum* son las más estudiadas y mejor descritas a nivel fisiológico, bioquímico, molecular y agroecológico (Pedraza et al., 2020).

2.4 *Azospirillum baldaniorum*

A. baldaniorum es una especie bacteriana recientemente reclasificada que se caracteriza por tener forma de bacilo, con una longitud aproximada de 2 a 4 μm , presenta flagelación mixta (un flagelo polar y flagelos laterales), microaerofílica, sintetizadora de auxinas (ácido 3-indol-acético, ácido 3-indol butírico), carotenoides, óxido nítrico (NO), producción de biopelícula, y una amplia gama de componentes de la superficie celular, entre otros (Cassán et al., 2015). Estas características hacen que *A. baldaniorum* sea una importante promotora del crecimiento de las plantas debido a sus efectos benéficos como la estimulación de la densidad y longitud de pelos radiculares, y provisión de nutrientes durante su íntima interacción (Ribaudó et al., 2006).

2.5 Asociación de *Azospirillum* con la planta

Las rizobacterias producen una gran cantidad de señales químicas indispensables para los procesos de comunicación e interacción con otros organismos y microorganismos. La liberación de estas señales químicas al entorno (exudados radiculares) puede inducir procesos fisiológicos específicos en bacterias, hongos, y plantas presentes en la rizosfera a través de una comunicación directa,

promoviendo una respuesta quimiotáctica para colonizar los diferentes nichos ecológicos. *Azospirillum* presenta dos estados fundamentales para buscar nuevos nichos ecológicos. Un estado planctónico (móvil) y un estado sésil (adherido a las raíces de la planta) (Figura 2), la transición entre estos es necesaria para un proceso de colonización exitoso, que culminará en la producción de expolisacáridos (EPS) y formación de biopelícula. Un ejemplo particular es el proceso de adherencia de *A. baldaniorum* Sp245 a las raíces del trigo el cual ocurre en dos etapas; la primera etapa es relativamente rápida, débil y reversible mediada por adhesinas como el flagelo polar, por otra parte, la segunda etapa ocurre un anclaje irreversible mediado por EPS (Keshav et al., 2013; Leuven & Croylaan, 1995). Un mecanismo por el cual las bacterias pueden controlar esta transición de estados, se debe en parte, a la fluctuación de los niveles intracelulares del segundo mensajero Diguanosil Monofosfato Cíclico (diGMPc), los niveles de este segundo mensajero son regulados por enzimas específicas nombradas como diguanilato ciclasas (DGCs) con dominios GG(D/E)EF denominados de esta manera debido a su motivo conservado, y fosfodiesterasas (PDEs) con dominios EAL y HD-GYP, las cuales catalizan su síntesis y degradación, respectivamente (Ramírez-Mata et al., 2016).

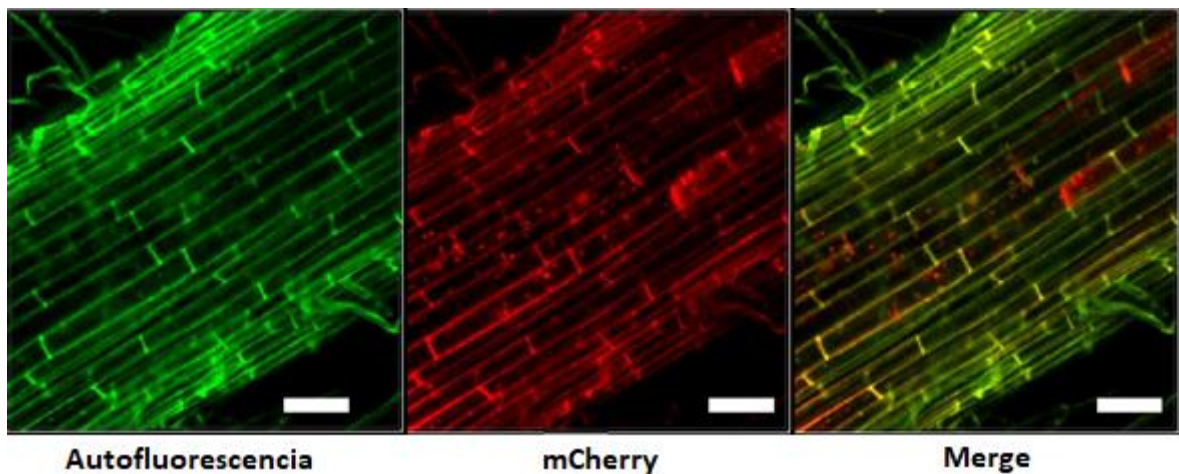


Figura 2. **Microscopia de fluorescencia de *Azospirillum baldaniorum* colonizando las raíces del trigo.** En la imagen se muestra *A. baldaniorum* Sp245 colonizando las raíces de *Triticum aestivum* var. Nana la cual está marcada fluorescentemente con la proteína mCherry (Ramírez-Mata et al., 2018).

2.6 Movilidad y quimiotaxis

La capacidad de las bacterias para movilizarse en gradientes fisicoquímicos diferentes es definida como taxis; esta respuesta de movilidad celular se origina por múltiples señales ambientales como la luz (fototaxis), el oxígeno (aerotaxis), el pH (pH taxis), la temperatura (termotaxis), el potencial de reducción (redox taxis), la osmolaridad (osmotaxis), los campos magnéticos (magnetotaxis) y los compuestos químicos (quimiotaxis). La quimiotaxis bacteriana puede responder a estímulos quimio atrayentes o quimio repelentes por medio de variados sistemas quimiotácticos a través de procesos de detección, transducción y regulación de señales que afectan directamente al motor flagelar para una consecuente movilización favorable para el crecimiento y la supervivencia bacteriana, siendo esta última característica esencial en ambientes competitivos como la rizosfera (Scharf et al., 2016).

A. baldaniorum y *A. brasilense* tienen la capacidad de quimiotaxis hacia moléculas como ácidos orgánicos, azúcares, alcoholes de azúcar y en menor medida aminoácidos. Los ácidos orgánicos que son conocidos por ser intermediarios del ciclo de Krebs, como el malato y el succinato, son atrayentes muy fuertes para ambas especies. El piruvato, el citrato, el oxalato y el fumarato también presentan buena atracción. Entre los azúcares, la fructosa es uno de los atrayentes más fuertes, pero la ribosa, arabinosa y galactosa también son buenos. Los aminoácidos como el glutamato, aspartato, alanina, glutamina y asparagina son atrayentes débiles para estas especies (Cassán et al., 2015). Actualmente, se conocen diferentes modelos de sistemas quimiotácticos, uno de los mejores descritos es el sistema Che en *Escherichia coli* relacionado a vías de señalización de múltiples componentes agrupados (Porter et al., 2011). Esta vía de señalización empieza a través de la detección de cambios en la concentración de moléculas quimioefectoras por parte de un quimiorreceptor transmembranal con capacidad de aceptar grupos metilos en su parte interna (MCP). La proteína CheW es el puente de unión físico entre la cinasa histidínica CheA y el MCP. En respuesta a la disminución de la concentración de quimio-atrayente, los quimiorreceptores activan la vía de autofosforilación de CheA, una vez fosforilada (CheA-P) tiene la capacidad

de fosforilar a cualquiera de sus dos reguladores de respuesta afines (CheB y CheY). Cuando el regulador CheY está fosforilado, se une de manera específica al motor flagelar promoviendo un cambio en la dirección de rotación de izquierda a derecha. Por otra parte, CheB-P es una metilesterasa que trabaja en conjunto con la metiltransferasa CheR, ambas proteínas actúan regulando a la MCP de manera positiva (CheR) y negativa (CheB) respondiendo a señales quimioatrayentes y quimiorepelentes. La última proteína del sistema es CheZ, una fosfatasa específica que desfosforila a CheY-P permitiendo una rápida terminación de la vía de señalización (Porter et al., 2011).

2.6.1 Sistemas de quimiotaxis en *Azospirillum*

En el genoma de *A. brasilense* Sp7 existen cuatro operones que codifican a los sistemas quimiotácticos Che1, Che2, Che3 y Che4. En estos sistemas se han descrito funciones específicas (a excepción de Che3 y Che2), cómo la adhesión de superficie celular, regulación de la velocidad de nado, reversión de nado, síntesis de flagelo, control de la composición de EPS, procesos de agregación y floculación, siendo estas últimas esenciales para la formación de biopelícula (Bible et al., 2012; Lutz, 2017; Mukherjee et al., 2016).

2.7 Formación de biopelícula

Algunas bacterias tienen la capacidad de vivir en ambientes rodeados por matrices de sustancias poliméricas extracelulares producidas por ellos mismos denominadas como biopelículas. Estas sustancias están constituidas principalmente por polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos y lípidos, proporcionando estabilidad mecánica, capacidad de adhesión a superficies y la formación de una red polimérica cohesiva y tridimensional que interconecta e inmoviliza transitoriamente a las bacterias. La matriz de la biopelícula puede actuar como un sistema digestivo externo manteniendo a las enzimas extracelulares cerca de las células, lo cual permite metabolizar biopolímeros sólidos, coloidales y disueltos. Además, la biopelícula confiere protección a la comunidad bacteriana contra agentes externos (Flemming & Wingender, 2010; Singh et al., 2017).

El proceso necesario para la formación de biopelícula es la adhesión que es el contacto inicial y depende de una motilidad activa. En *Azospirillum*, esta primera etapa es rápida y reversible por otra parte la segunda es lenta, de anclaje e irreversible (Keshav et al., 2013). Ya adheridas las bacterias estas interactúan con los tejidos vegetales a través de adhesinas que incluyen polisacáridos y proteínas de superficie (Danhorn & Fuqua, 2007).

Las bacterias han desarrollado una serie de mecanismos de transducción de señales que son capaces de detectar y responder a una amplia gama de señales ambientales y moleculares. Ejemplo algunos de ellos son los sistemas de regulación transcripcional, los sistemas de dos componentes (SDC) y las vías quimio-sensoriales que son activados por la unión de una molécula señal al dominio de unión a ligando (LBD), sistemas que en su conjunto se han clasificado como sistemas de transducción de señales (Martín-Mora et al., 2018).

2.8 Los sistemas de transducción de señales

Los sistemas de transducción de señales (STS) permiten a las bacterias detectar y adaptarse a estímulos ambientales, llevando a cabo respuestas celulares específicas. Existen tres principales STS conocidos, el más simple constituye una sola proteína capaz de percibir una señal y directamente efectuar una respuesta celular; estas proteínas denominadas como sistemas de un componente, tienen dos tipos de dominios proteicos, uno de entrada (detector) y otro de salida (regulador). Por otra parte, los sistemas de transducción de señales más complejos, involucran al menos dos tipos de proteínas funcionales: una detectora y otra reguladora de respuesta, conformando sistemas de doble componente; en este caso el componente detector es una proteína con actividad cinasa que contiene un dominio de entrada, un dominio transmisor, y un dominio de salida, esta señal de salida culminará en una proteína receptora que regulará la respuesta final de salida. El tercer sistema de transducción de señales consiste en un sistema con más dominios proteicos y/o proteínas asociadas muchas veces nombrado como sistema de múltiples componentes (SMC) (Wager, 2011).

2.10 Cinasas histidínicas

Las cinasas histidínicas detectoras (CHs) son unas de las principales proteínas involucradas en la señalización bacteriana. Con ellas se han podido construir modelados de proteínas estudiado las estructuras extracelulares e intracelulares, además de la predicción de interacción con sus RR, todo ello con análisis bioinformáticos (Bhate et al., 2015). Las CHs son proteínas multidominio bifuncionales, esto significa que pueden actuar como cinasas auto fosforilándose, o como fosfatasas desfosforilando a un RR o a ellas mismas. La mayoría de las CHs incluyen al menos un dominio transmembranal, aunque también se pueden encontrar libres en el citoplasma (figura 4), un dominio de dimerización y fosfotransferencia de histidina abreviado como DHp o HiskA, un dominio de catálisis y unión a ATP abreviado como (CA) o HATPasa, y dominios de detección asociados que le permitirán percibir señales extracelulares o citoplasmáticas. Algunos ejemplos de dominios de detección de estímulos externos son los dominios PDC/PAS, α -helicoidales, Proteínas de unión a sustrato periplásmica (PBP), entre otros. Una vez recibida la señal ésta se transmite hacia los dominios efectores (DHp y CA). Hay casos, donde las señales que provienen del citoplasma son detectadas por otra clase de CHs presentes en el citoplasma y asociadas a dominios detectores HAMP, STAC, PAS y GAF (Zschiedrich et al., 2016). Las CHs se clasifican de igual manera con base en sus dominios asociados en CHs clásicas e híbridas. Las CHs clásicas se caracterizan por tener un dominio de detección, un dominio DHp y un dominio CA, a diferencia de las CHs híbridas las cuales pueden tener mayor cantidad de dominios asociados como el dominio receptor (REC) o incluso un dominio de fosfotransferencia (Hpt) como se muestra en la figura 5 (Cheung & Hendrickson, 2010).

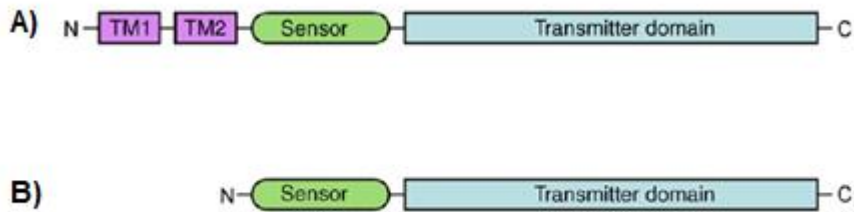


Figura. 4 **Clasificación de CH de acuerdo a su localización.** Las cinasas histidínicas detectoras pueden clasificarse de acuerdo con su localización A) CH anclada a la membrana B) CH citoplasmática. Dominios TM (morado), dominios detectores (verde) y dominios de transmisión (azul) (Cheung & Hendrickson, 2010).

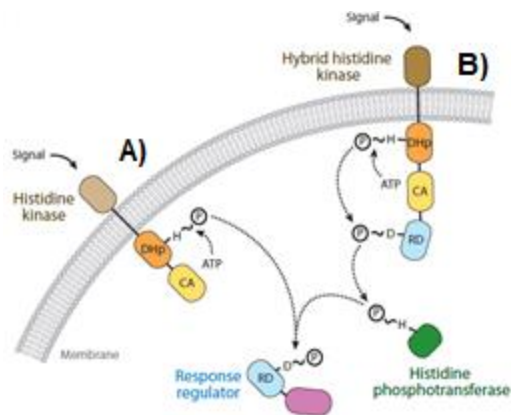


Figura 5. **Clasificación de CH de acuerdo a sus dominios de fosforilación.** Estructura proteica A) cinasa histidínica clásica, B) cinasa histidínica híbrida (Capra & Laub, 2012).

2.10.1 Los dominios DHp (HiskA), CA (HATPasa) y el proceso de autofosforilación

Los análisis estructurales revelan una arquitectura modular en las CHs, con variaciones puntuales en la organización de los dominios principales, clasificándolas en dos clases: la clase I y clase II. En ambas clases está presente el dominio CA el cual se une al ATP en un cavidad (pocket) cubierto por medio de un bucle (loop) flexible y variable nombrado como tapa para el ATP. Este dominio muestra un pliegue de sándwich α/β similar a los dominios ATPasa de la superfamilia ATPasa GHKL. El dominio CA interactúa físicamente con el dominio de dimerización y de fosfotransferencia (DHp) que contiene el residuo conservado de histidina (H) que se fosforila. En las CH de clase I, el dominio DHp precede inmediatamente al dominio

CA mediando su dimerización. Este dominio está formado por dos hélices largas ($\alpha 1$ y $\alpha 2$), donde la $\alpha 1$ contiene el residuo de H, mientras que en las CHs de clase II no participa el dominio CA en la dimerización, y no hay presencia del dominio DHp, sin embargo, varios dominios adicionales como los dominios Hpt-S intervienen en el proceso de fosfotransferencia junto con el dominio CA como se muestra en la figura 6. Y por último la clase III es un tipo de CH con evolución intermedia entre la clase II y la clase I. Además de que estas CHs solo encuentran en genomas con genes relacionados a la formación del pili tipo IV y sistema de quimiotaxis (Adebali et al., 2017).

La clasificación basada en secuencia de los diferentes dominios es útil para los análisis estructurales y funcionales. De acuerdo a los dominios DHp, las CHs se han agrupado en cuatro familias de acuerdo a la plataforma Pfam: mientras que el 85% de ellas puede asignarse al grupo HisKA (PF00512), el 10% corresponde a las cinasas histidínicas pertenecientes a la familia HisKA_3 (PF007730), y el otro 5% restante pertenece a las familias HisKA_2 (PF07568), y HWE_HK (PF07536). En las CH ortodoxas, los dominios DHp y CA están conectados por un bucle flexible y corto (5-10 residuos). Los HCs funcionan como dímeros y la dimerización tiene lugar mediante la interacción de las hélices DHp para formar un paquete de cuatro hélices (Casino et al., 2014; Trajtenberg et al., 2010).

Con respecto al mecanismo de autofosforilación, este evento ocurre cuando el γ -fosfato es separado del ATP con ayuda del dominio CA, y a su vez el dominio CA fosforila al residuo conservado de H del dominio DHp. Actualmente se han descrito dos vías principales de autofosforilación dentro de las cinasas histidínicas diméricas: la vía de autofosforilación *trans* y la vía de autofosforilación *cis*. La reacción de autofosforilación en *cis* ocurre por medio de una vía denominada intrasubunitaria donde el ATP que se encuentra unido al dominio CA de una de las subunidades fosforila a la H del dominio DHp presente en la misma subunidad. Por el contrario, una reacción *trans* implica una vía de autofosforilación intersubunitaria, lo que significa que un monómero fosforila al residuo de H del otro. Los datos bioquímicos

han confirmado la existencia de mecanismos *cis* y *trans* en diferentes CH (Casino et al., 2014).

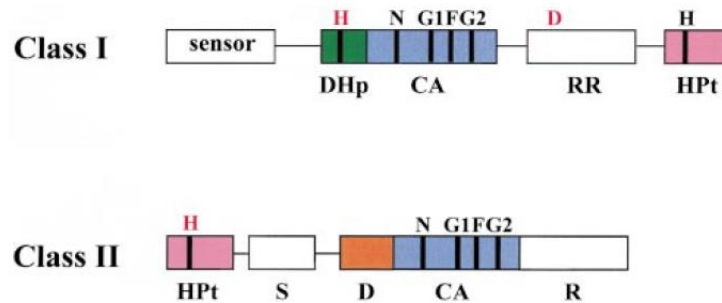


Figura 6. **Diagrama esquemático de las CHs de clase I y II.** Esta clasificación se basa en la posición de la His conservada con respecto al dominio CA (el cual contiene las cajas conservadas N, G1, F y G2) en la secuencia primaria. En las CH de clase I, el residuo H conservado se encuentra en la caja H del dominio DHp considerado el sitio de autofosforilación primario, que posteriormente llevará a cabo su proceso de fosforelevo. Por otra parte, en las cinasa histidínica de clase II, el residuo H conservado está en la caja H del dominio Hpt-S (Dutta et al., 1999).

Por otra parte, también existe otro sistema de clasificación de HCs, generada a partir de un estudio hecho con 336 HCs, en donde se clasifica a las HCs en 5 tipos diferentes, con base a la posición de residuos conservados de la caja H del dominio DHp. Las HCs de tipo I se encuentran predominantemente en bacterias, mientras que las HCs de tipo II no fueron prevalentes en bacterias, pero constituyeron el tipo principal en Archeas. Las HCs de tipo III fueron generalmente más frecuentes en bacterias grampositivas. Las HCs de tipo IV están presentes en menor medida que en bacterias. Por último, las HCs de tipo V están compuestas por una HC quimio-detectora o una cinasa tipo CheA. Las HCs de tipo I y II poseen dominios cinasa ortodoxos con los motivos consenso N, G1, F y G2. Las HCs de tipo III y IV poseen los denominados dominios de cinasa poco ortodoxos donde el N1 del motivo N-box es un residuo de glicina (Cinasa tipo III) o prolina (Cinasa tipo IV), la caja F está ausente y el motivo G2 está truncado. El residuo de glicina conservado en el dominio C terminal del motivo G2 está presente en casi todos los dominios cinasa y usualmente se le denomina como sitio G3. La caja H de la HC de tipo I contiene el motivo consenso HEhRTPh, donde “H” indica el residuo invariante que define la

posición 1 del motivo y “h” significa los residuos hidrófobos conservados que podrían presentarse (I, L, V, M). El motivo de la caja H de las HCs de tipo II posee un residuo conservado de asparagina en la posición 5 y carecen de un residuo cargado positivamente y una prolina entre las posiciones 4 y 6, respectivamente. Estas HCs carecen de la presencia de una estructura de hélice-bucle-hélice. El motivo de la caja H de las HCs de tipo III se caracteriza por una secuencia R-E-L en el lado N terminal del sitio de fosforilación de histidina y además carecen de los residuos conservados de prolina y los residuos cargados positivamente. En estas HCs se predicen una estructura de hélice-bucle-hélice. El motivo de la caja H de las HCs de tipo IV contiene un residuo de prolina en el lado N-terminal y la secuencia conservada FLFNAL en el lado C-terminal del sitio de fosforilación de histidina. Finalmente, el dominio P1 de CheA contiene el motivo consenso HSIKG (Kim & Forst, 2001).

2.11 Reguladores de Respuesta

Los reguladores de respuesta (RR) es el término acuñado en 1977 por Daniel Koshland, para referirse a un conjunto de proteínas las cuales están caracterizadas por tener un dominio receptor (REC) descrito por primera vez en proteínas de quimiotaxis CheY. Los dominios REC son el modo de regulación más común de los RR, estos dominios sufren cambios conformacionales por medio de la fosforilación de un residuo conservado de ácido aspártico (D), en otras palabras, son dominios con la capacidad de recibir un grupo fosfato (fosfoaceptores) en la porción N-terminal del dominio, formando dímeros para propagar una amplia variedad de señales ambientales y extracelulares.

La fosfotransferencia de una CH a un RR puede conllevar a un cambio conformacional en la región C-terminal, la cual está frecuentemente asociada a dominios de salida con funciones en la unión a ARN, ADN, proteínas (con actividad enzimática) regulando procesos transcripcionales, post-transcripcionales y post-traduccionales (Galperin, 2010).

2.12 Fosforelevo

La regulación de los SDC es un proceso complejo debido a que durante el mecanismo de transmisión del grupo fosfato los dominios de dos o más

componentes, se unirán a los residuos conservados H y D de manera alternada. Este mecanismo de trasladar un grupo fosfato de un residuo a otro sucesivamente es denominado como fosforelevo. Los mecanismos de fosforelevo juegan un papel muy importante en la regulación de la expresión de genes, movilidad y actividad enzimática entre otras funciones en las bacterias. El mecanismo de acción por el cual se da el fosforelevo puede ser de dos tipos: el fosforelevo mediado por una CH clásica y el fosforelevo mediado por una CH híbrida. En ambos mecanismos, el dominio DHp se auto fosforila con gasto de ATP en el residuo de histidina (H1), para continuar con la fosforilación del residuo de aspartato (D1) del dominio REC y posteriormente fosforilar a un segundo residuo de histidina (H2) perteneciente a un dominio de fosfotransferencia (Hpt), para que finalmente se transmita la señal a un segundo residuo conservado de aspartato (D2) en el dominio REC de un RR, este mecanismo es representado en la figura 7 y 8 (Kim & Cho, 2006; Majdalani & Gottesman, 2005). Gracias a que las estructuras de estas proteínas se encuentran disponibles en las bases de datos actuales se ha podido predecir y elucidar de mejor manera sus mecanismos de acción implicados con ayuda de análisis bioquímicos, bioinformáticos, genéticos, y evolutivos.

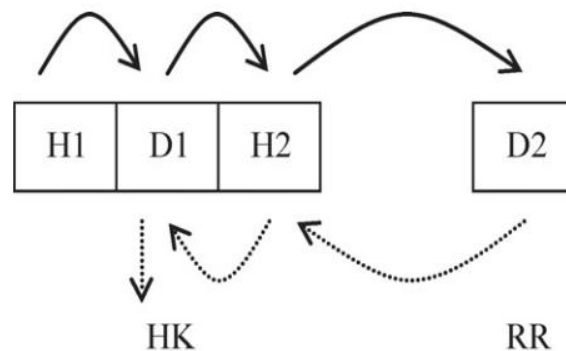


Figura 7. **Esquema del mecanismo de fosforilación y desfosforilación de residuos aminoacídicos de un SDC.** En letras mayúsculas y números se representan los residuos de histidinas (H) y ácidos aspárticos (D) implicados en el mecanismo de fosforilación y desfosforilación de un SDC (J. R. Kim & Cho, 2006).

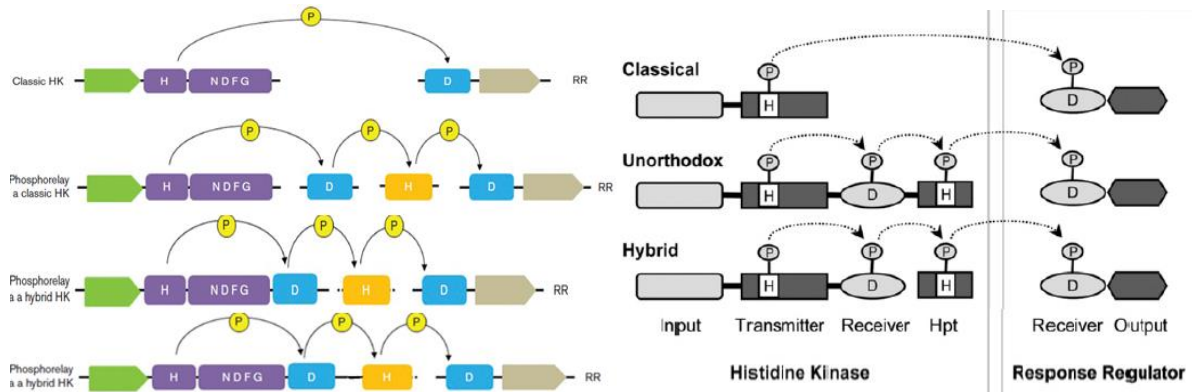


Figura 8. **Mecanismo de fosforelevo en SDC.** Figuras modificadas de la representación esquemática de los diferentes mecanismos de fosforelevo, en CH clásicas e híbridas hacia sus RR afines (Sevilla et al., 2013; Borland et al., 2016).

2.13 Evolución de los SDC

Los SDC se encuentran ampliamente distribuidos en los 3 grandes dominios taxonómicos existentes: Archea, Bacteria y Eucaria. Con el número creciente de genomas y metagenomas secuenciados en las bases de datos, la cantidad de SDC ha ido aumentando desmesuradamente. Los análisis bioinformáticos y de comparación de genomas han proporcionado información esencial sobre procesos evolutivos de los SDC, procesos como la duplicación, la pérdida o ganancia de genes, etc.

Los análisis filogenéticos han permitido mostrar la existencia de relaciones coevolutivas entre CH y RR. Se ha descrito gran cantidad de antiguos SDC basados en análisis filogenómicos de estructuras proteicas (Galperin et al., 2018). Se sabe que los genomas evolucionan por la acumulación gradual de mutaciones, por lo tanto, la diferencia en la cantidad de modificaciones de secuencias de nucleótidos entre genomas debería indicar qué tan recientemente esos genomas compartieron un ancestro común. Se esperaría que aquellos genomas que hayan divergido recientemente en el pasado tuvieran menos diferencias que genomas cuyo ancestro común es más antiguo. Esto significa que al comparar varios genomas debería ser posible determinar las relaciones evolutivas entre ellos, siendo esto un pilar fundamental de la filogenia molecular (Ungewitter et al., 2015).

2.14 Filogenia molecular

Actualmente se conoce que con solo tener las secuencias proteicas se puede predecir la presencia o ausencia de dominios específicos de una proteína, sus conformaciones tridimensionales, su evolución filogenética y hasta sus posibles funciones. Sin embargo, el ADN se ha convertido hoy en día y por mucho, en la molécula predominante en cuanto a la precisión de evolución filogenética se refiere. Esto se debe principalmente a que las secuencias nucleotídicas brindan mayor información filogenética que las secuencias proteicas, en pocas palabras las secuencias de nucleótidos de un par de genes homólogos tienen aún más contenido de información que las secuencias de aminoácidos de esos mismos genes homólogos, esto se explica ya que las mutaciones en el ADN pueden dar lugar a cambios no sinónimos, lo que significa que una mutación podría modificar un codón específico codificando a un aminoácido muy diferente, a diferencia de utilizar las secuencias proteicas ya que esos pequeños cambios serían imperceptibles en aminoácidos sinónimos. El objetivo de la mayoría de los estudios filogenéticos es reconstruir un patrón evolutivo en forma de árbol que describa las relaciones filogenéticas entre los organismos que se estudian con ayuda de alineamientos múltiples de secuencias. La topología clásica de un árbol de ancestros y descendientes comprende los siguientes elementos: nodos internos, nodos externos, las longitudes de ramas (distancias evolutivas) que muestran el grado de diferencias entre las secuencias de los genes o proteínas comparadas, siendo estas mismas clasificadas como ramas internas, externas y terminales, las Unidades Taxonómicas Operacionales (OTUs, por sus siglas en inglés) las cuales indican la comparación y relación entre secuencias y la raíz la cual puede estar presente o ausente, mostrando el ancestro en común más antiguo o divergente. Además, en estos análisis cada árbol filogenético debe contener al menos un grupo externo, el cual se describe como una secuencia homóloga perteneciente a un organismo o a un grupo de organismos más distantes que sirven como grupo de referencia determinando las relaciones evolutivas de los grupos internos. El grupo externo permite facilitar la localización de la raíz de un árbol e identificar la vía evolutiva correcta (Ungewitter et al., 2015).

Se han desarrollado múltiples métodos para inferir filogenias y construir árboles, mientras algunos de ellos solo utilizan las formas más simples de la evolución, otros emplean aspectos más específicos en el proceso evolutivo. Los métodos basados en distancias calculan las distancias genéticas por medio de pares de secuencias en un conjunto de datos, los árboles filogenéticos se construyen a partir de matrices de distancia utilizando un algoritmo de agrupamiento, con base en los datos arrojados, un árbol puede ser obtenido mediante los siguientes métodos: la agrupación de pares no ponderados con media aritmética (UPGMA), mínimos cuadrados o mínima evolución (LS), y unión de vecinos (NJ). Pese a la gran utilidad de estos métodos basados en distancias, se tiende a omitir y perder información evolutiva esencial englobada en el proceso de cálculo de distancias evolutivas por pares. Por otra parte, los métodos basados en caracteres utilizan directamente las secuencias de nucleótidos y aminoácidos alineados aprovechando toda la información disponible en cada secuencia homóloga. Actualmente, los métodos basados en caracteres más utilizados son los métodos de máxima parsimonia (MP) y máxima verosimilitud (ML). En tanto que el método de MP es un modelo de evolución simple donde todas las posibles sustituciones de nucleótidos tienen la misma probabilidad, el método de ML es puramente probabilístico lo cual permite utilizar los diferentes modelos evolutivos de sustitución como Jukes-Cantor, Kimura-2-parámetros, Tamura-3-parámetros, Hasegama-Kishino-Yano, Tamura-Nei y tiempo general reversible. A diferencia de los métodos de búsqueda exhaustivos, que evalúan todos los árboles filogenéticos posibles, los métodos de búsqueda de árboles exactos, reducen el número de árboles a evaluar y el tiempo empleado ya que favorece al hallazgo del mejor árbol con el método de ramificación y ligadura (Branch and bound method), sin embargo este tipo de métodos son muy lentos con cantidades considerables de secuencias a evaluar, por esta razón los métodos idóneos a emplear son los de aproximación de búsqueda de árboles que en su mayoría de veces encontrarán el árbol con la mayor probabilidad. Desde otro punto de vista, los métodos de búsqueda de árboles aproximados son los comúnmente utilizados, entre estos métodos se encuentran el intercambio de vecino más cercano (NNI) y la poda e injerto de subárboles (SPR) que implican el

reordenamiento y modificación de la ramificación, lo cual potenciará la predicción de árboles con probabilidades cercanas al máximo (Semagn, 2014).

En cuanto a los análisis filogenéticos que se han realizado en el género *Azospirillum*, los primeros indicios datan de 1984, donde Wosen y colaboradores analizaron una subdivisión de eubacterias específicamente el grupo de alfaprotobacterias donde se encuentra el género *Azospirillum*, especialmente las especies *A. brasilense* y *A. baldaniorum* en el análisis. En este estudio se describe la subestructura filogenética del grupo Alfa, por medio de la importancia evolutiva de fenotipos bioquímicos (Woese et al., 1984).

Los estudios filogenéticos en *Azospirillum* han aumentado considerablemente a través del tiempo en sus diferentes especies, estos estudios han contribuido en la comprensión de procesos como la fijación de nitrógeno (Fani et al., 1989), los patrones de restricción (Giovannetti et al., 1992), el análisis de ADN 16S ribosomal (Xia et al., 1994), la identificación de operones relacionados a vías de señalización de quimiotaxis (Hauwaerts et al., 2002), la transición evolutiva a través de miles de millones de años desde medios acuáticos a terrestres (Wisniewski-Dyé et al., 2011), la transferencia horizontal de genes (Acosta-Cruz et al., 2012), la distribución de sistemas de doble componente en el genoma (Borland et al., 2015), el empleo de genes codificantes ampliamente conservados como marcadores filogenéticos (Jijón-Moreno et al., 2015; Maroniche et al., 2017), y finalmente la reclasificación de especies (Ferreira et al., 2020) resaltando la importancia que los análisis filogenéticos pueden tener, en la comprensión de sistemas como los sistemas de traducción de señales: sistemas quimiotácticos y de doble componente, etc. Por otra parte, también existen otras maneras de poder seguir estudiando y comprendiendo estos sistemas de transducción de señales complejos, sin la necesidad de experimentar físicamente con ellos, una de ellas es el empleo de secuencias proteicas con ordenador prediciendo modelos e interacciones biológicas como el acoplamiento y modelado molecular.

2.15 Análisis *in silico* de acoplamiento y modelado molecular

Se le ha denominado análisis *in silico* al proceso de recrear estructuras complejas por medio de computadoras haciendo alusión el término “*Silico*”, a la estructura interna de la computadora que está hecha de 90% de sílice. Estos métodos se han desarrollado y especializado a través de los años intentando reproducir fenómenos naturales de alta complejidad o bien que contengan un elevado número de variables y datos, los cuales tomaría demasiado tiempo analizarlos manualmente (Scior et al., 2007).

El acoplamiento molecular o molecular docking como se le conoce en inglés, es un método computacional utilizado para predecir la interacción de dos moléculas generando un modelo de unión tridimensional, el acoplamiento se puede recrear utilizando una molécula pequeña y una grande (macromolécula), un ejemplo de ello es el acoplamiento proteína-ligando, pero también el acoplamiento puede ser entre moléculas grandes de tamaños equivalentes como el acoplamiento proteína-proteína, entre otros. En la actualidad, el proceso de acoplamiento molecular es llevado a cabo por medio de servidores en línea y softwares específicos. Estos servidores utilizan parámetros experimentales como lo son cargas, ángulos geométricos y de torsión, para reducir la diferencia entre los datos experimentales y las predicciones de la mecánica molecular simulada por computadora, empleando modelos y ecuaciones matemáticas. Aunque cada servidor y programa puede emplear diferentes configuraciones para que el acoplamiento molecular sea generado, incluyendo de manera estándar a los siguientes ejemplos: los campos de fuerza (AMBER, GROMOS, MMFF94, CHARMM y UFF) y algoritmos (algoritmo genético lamarckiano, coincidencia de formas, optimización local y evolutiva), el cálculo de posturas y refinamiento de interacciones receptor-ligando abordadas por métodos flexibles y rígidos (Prieto-Martínez et al., 2018). Debido a que el acoplamiento molecular solamente puede predecir interacciones de manera simulada, se debe tomar con precaución y cautela este tipo de análisis y ser complementados con métodos experimentales.

Los detalles estructurales funcionales de las CHs no se conocían en años pasados, debido a la ausencia de datos. Hoy en día, se han hecho estudios bioinformáticos y

de simulación de dinámica molecular combinados con entrecruzamiento y mutagénesis para deducir conformaciones proteicas. Un enfoque bioinformático denominado análisis de acoplamiento directo (DCA, por sus siglas en inglés) se es capaz de identificar pares de residuos de contacto coevolutivo conjuntamente entre proteínas que interactúan y dominios de proteínas alineadas con sus secuencias. Mediante análisis en dominios DHP se han podido identificar residuos de contacto de estructuras de cinasas en estado incompetente y residuos de cinasas en estado competente putativo, donde el ATP y la cinasa podrían estar simultáneamente en una distancia de fosfotransferencia adecuada. Con ayuda de estos datos de residuos provenientes de las secuencias, se ha podido realizar dinámicas moleculares para modelar conformaciones activas de CHs, con base en ello, se ha logrado reestablecer el funcionamiento de una CH híbrida DHP-CA no funcional. (Zschiedrich et al., 2016). Con esto se destaca la importancia de los análisis de acoplamiento molecular para la deducción de funciones y actividad enzimática en los SDC.

3. ANTECEDENTES

3.1 Antecedentes generales

3.1.1 Sistemas de dos componentes en *Azospirillum*

Azospirillum tiene la capacidad de percibir y responder a diferentes estímulos ambientales provenientes de la rizosfera, esto es debido a la presencia de una amplia gama de sistemas proteicos interrelacionados como los sistemas de doble componente (SDC), que detectan estímulos y responden de manera específica. En la actualidad hay pocos estudios que describan funciones de SDC en *A. brasilense*, recientemente algunas cepas de *A. brasilense* fueron reclasificadas en una nueva especie denominada *A. baldaniorum* donde se destaca principalmente la cepa *A. baldaniorum* Sp245 (dos Santos Ferreira et al., 2020). Los estudios existentes de SDC en este género bacteriano abordan; la expresión de vías catabólicas de carbohidratos (Chattopadhyay et al., 1994), la regulación y asimilación de nitrato (Ishida et al., 2002), procesos de quimiotaxis (Cui et al., 2011) y recientemente con el surgimiento de la nueva era de la secuenciación genómica ha permitido un manejo masivo de datos debido al aumentado en la cantidad de genomas

secuenciados de *Azospirillum*, permitiendo su uso para diferentes fines como son el estudio y evolución de sistemas de señalización celular.

En 2015 Borland y colaboradores realizaron un análisis *in silico* comparativo de cuatro cepas del género *Azospirillum*; *A. brasilense* Sp245 (*A. baldaniorum* Sp245), *A. brasilense* CBG 497, *A. lipoferum* 4B y *Azospirillum* SpB510, describiendo la cantidad de SDC presentes en sus genomas y su distribución. En el análisis *in silico* se encontró que el 3.3% de los genes totales (259 genes) de *A. baldaniorum* Sp245 codifican para SDC, de los cuales 133 genes codifican para CHs (74 para CHs clásicas y 59 para CHs híbridas) 124 genes codifican para RRs y 2 genes para Hpt, con una distribución generalizada tanto en cromosoma como en plásmidos, como se observa en la tabla 1 (Borland et al., 2015). Estos resultados indican la basta distribución que tienen los SDC en *A. baldaniorum* Sp245, otorgándole gran flexibilidad regulatoria en procesos importantes como la síntesis de nitratos, la movilidad, quimiotaxis, formación de biopelículas, entre otros; por lo cual estos descubrimientos resaltan el papel fundamental de los estudios de SDC en genomas y la adaptación a entornos fluctuantes.

Strains and feature	TCS type	Chromosome	p1	p2	p3	p4	p5 ^a	p6	Total ^b
<i>A. brasilense</i> Sp245									
Sensing HK	Classic HK	31	22	8	5	7	1	-	74
	HyHK	19	13	6	9	7	1	-	55
	CheA	1	2	1	-	-	-	-	4
Output response	RR	47	37	19	9	11	1	-	124
Phosphotransfer	HisKA	-	-	-	-	-	-	-	0
	Hpt	1	1	-	-	-	-	-	2
Total		99	75	34	23	25	3	-	259
ORF		3309	1812	922	824	691	163	125	7846
Size (Mpb)		3.02	1.77	0.91	0.78	0.69	0.19	0.17	7.53

Tabla 1 **Diversidad de SDC presentes en el genoma de *A. brasilense* Sp245 imagen modificada.** Análisis *in silico* de SDC en *A. brasilense* Sp245, se indica la cantidad, el tipo y la ubicación en cromosoma y plásmidos (Borland et al., 2015).

3.2 Antecedentes específicos

Con el objetivo de estudiar proteínas con dominios GGDEF implicadas en la síntesis del segundo mensajero di-GMPc en el modelo de *A. baldaniorum* Sp245, Gamboa en 2014 en el laboratorio interacción bacteria-planta realizó una mutación por inserción en el gen AZOBR_p310007 (anteriormente nombrado AZOBR_RS26145) presente en el plásmido tres el cual codifica para un regulador de respuesta con función de DGC putativa que denominaron como diguanilato ciclasa E (CdgE), dicha mutación fue por medio de la inserción de un casete de resistencia a kanamicina y un gen reportero que codifica a la enzima beta glucoronidasa (*gusA-Km^R*), para posteriormente realizar ensayos fenotípicos por medio de curvas de crecimiento comparando a la cepa silvestre (*A. baldaniorum* Sp245) con la mutante obtenida 5A (*A. baldaniorum* 5A *cdgE::uidA-Km^R*), midiendo la cantidad de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) con respecto a la densidad óptica (D.O.) a través del tiempo (horas) en medio mínimo K-malato. Los resultados arrojaron un incremento significativo en el tiempo de generación de la cepa mutante con respecto a la cepa silvestre. Además, también realizó ensayos de sensibilidad al estrés osmótico con NaCl entre ambas cepas, observando que la cepa mutante era más sensible al estrés osmótico a comparación de la cepa silvestre como se muestra en las curvas de crecimiento de la figura 9 (Gamboa-Pérez, 2014).

A partir de los resultados anteriores, Avalos en 2015 realizó una mutación por eliminación del gen *cdgE* generando la mutante *A. baldaniorum* Δ *cdgE* 7U-3. Evaluando a la mutante con los siguientes ensayos fenotípicos; crecimiento bacteriano, resistencia a estrés osmótico y formación de biopelícula comparándola con la cepa silvestre, sin embargo, no observó que existiera una diferencia significativa entre la mutante *A. baldaniorum* 7U-3 (Δ *cdgE*) con respecto a la cepa silvestre en tiempo de generación bacteriana (Figura 10), como lo había reportado Gamboa en 2014. Posteriormente analizando el contexto genético del gen *cdgE* y por medio de RT-PCR, se comprobó que al menos los genes *cdgE* y *hkhB*, constituían un posible operón (Figura 11). Esto concuerda con reportes donde mencionan que una fracción significativa de cinasas histidínicas están codificadas en operones conservados en conjunto con sus reguladores de respuesta afines (Nussinov et al, 2017). Concluyéndose que la mutante 5A (*cdgE::uidA-Km^R*)

reportada por Gamboa había provocado un corrimiento del marco de lectura abierto generando una mutación polar, y afectando directamente al gen próximo río abajo *hkhB* (Ávalos-Rangel, 2015).

De acuerdo a los resultados obtenidos por Avalos, se atribuyó el efecto de la alteración en el crecimiento, y sensibilidad a estrés osmótico y formación de biopelícula a la mutación polar del gen *cdgE* que posiblemente había afectado al gen *hkhB*, por esta razón Cordero en 2017 realizó una mutación por eliminación del gen *hkhB* en la cual observó que la cepa mutante C5.56 (*A. baldaniorum* Δ *hkhB*), no presentaba variación alguna en el tiempo de generación y sensibilidad a estrés osmótico con respecto a la cepa silvestre, pero si una disminución en la movilidad como se había reportado en los ensayos de movilidad de las mutantes generadas por Gamboa en 2014 y Avalos en 2015, figura 12 (Cordero-Rivera, 2016).

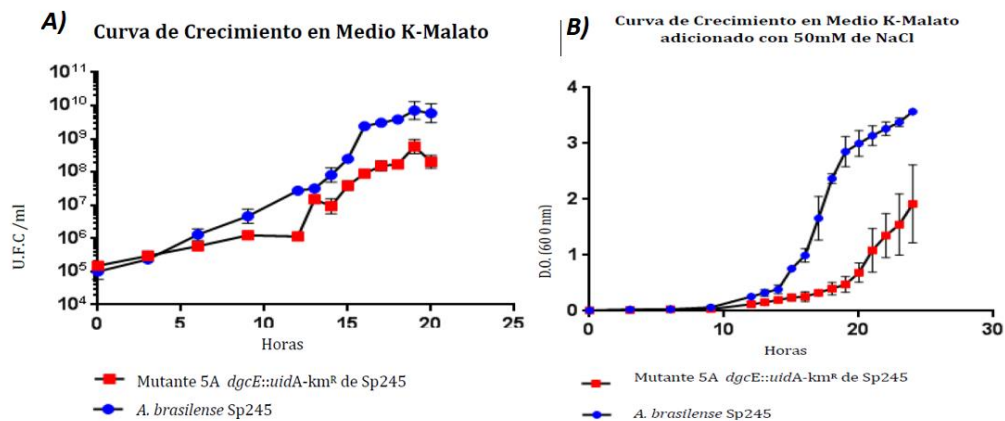


Figura 9. Curvas de crecimiento de la cepa silvestre *A. baldaniorum* Sp245, y la cepa mutante *A. baldaniorum* 5-A (*cdgE::uidA-Km^R*). Curvas de crecimiento bacterianas obtenidas en mínimo K-malato. A) Se observa la diferencia en el tiempo de generación de ambas cepas en 20 horas. B) Se observa la diferencia en el tiempo de generación de ambas cepas en condiciones de hiperosmolaridad en 24 horas.

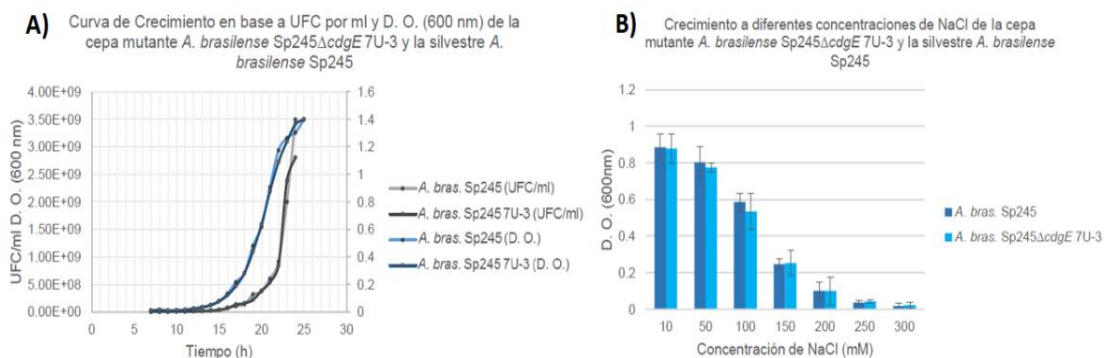


Figura 10. **Gráficas de crecimiento de las cepas *A. baldaniorum* Sp245 y *A. baldaniorum* 7U-3 en condiciones isoosmóticas e hiperosmóticas.** A) Se muestra la curva de crecimiento de las cepas *A. baldaniorum* Sp245Δ*cdgE* 7U-3 y *A. baldaniorum* Sp245 durante 24 horas. **B)** Crecimiento de 20 horas a diferentes concentraciones de NaCl, de las cepas *A. baldaniorum* Sp245Δ*cdgE* 7U-3 y *A. baldaniorum* Sp245 (Ávalos-Rangel, 2015).

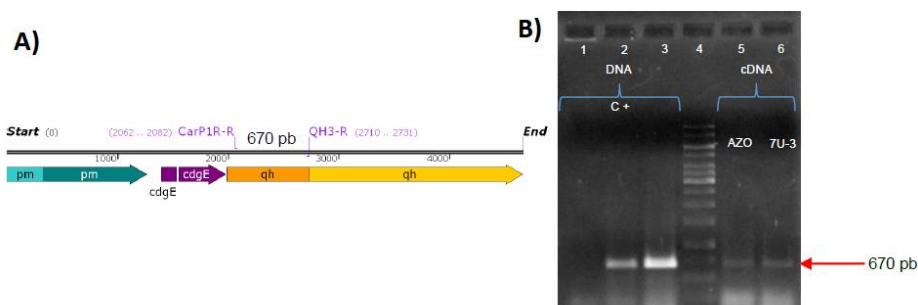


Figura 11. **Esquemas de los análisis de amplificación de la reacción de retrotranscripción en cadena de la polimerasa de los genes *dgce* y *hkhB*.** A) Representación de los iniciadores utilizados para el ensayo de RT-PCR que comprueba ausencia de la mutación polar en la mutante *A. baldaniorum* Sp245Δ*cdgE* 7U-3. **B)** Electroforetograma de RT-PCR de *A. baldaniorum* Sp245 (Carril 5) y *A. baldaniorum* Sp245Δ*cdgE* 7U-3 (carril 6). Control positivo ADN de *A. baldaniorum* Sp245, *A. baldaniorum* Sp245Δ*cdgE* 7U-3 y pK18mobsacB/PM-Δ*cdgE*-QH (Carriles 1-3 respectivamente), MPM 1 Kb carril 4 (Ávalos-Rangel, 2015).

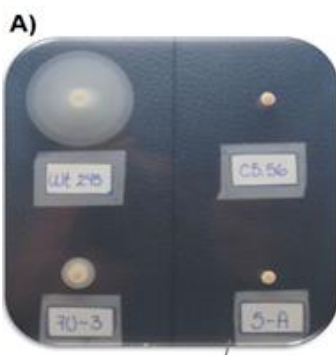


Figura 12. **Ensayos de movilidad en las cepas mutantes y silvestre.** A) Se muestra halos de crecimiento por medio de ensayos de movilidad de *Azospirillum baldaniorum* Sp245, 5-A (mutante *cdgE::uidA-Km^R*), 7U-3 (mutante $\Delta cdgE$) y C5.56 (mutante $\Delta hkhB$). (Cordero-Rivera, 2016).

En análisis previos de nuestro laboratorio, se ha identificado un operón putativo involucrado en procesos como crecimiento, tolerancia a estrés osmótico, movilidad y formación de biopelícula que conformarían cinco genes que codifican presuntivamente a dos proteínas cinasas histidínicas híbridas (HkhB y HkhC) y tres reguladores de respuesta (CdgE, CheY-Like y LuxO-Like) en *A. baldaniorum* Sp245. En este estudio se aborda la participación y análisis del gen *hkhC*.

4. Planteamiento del problema

En la actualidad el aumento en la poblacional mundial se estima alcanzará los diez mil millones de personas en las próximas tres décadas que causará el inevitable incremento sin precedentes en la producción agrícola para saciar la demanda mundial. Debidos a estas condiciones es apremiante la necesidad de apoyarnos con nuevas alternativas biotecnológicas y de manipulación genética microbiológica para poder comprender y elucidar la compleja interacción que existe entre las plantas y las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) como lo es *A. baldaniorum* a través de sistemas proteicos implicados en la colonización de las raíces. Estos sistemas proteicos que participarían en procesos biológicos esenciales, como crecimiento, tolerancia al estrés osmótico, movilidad, quimiotaxis, y formación de biopelícula, primordiales para una colonización exitosa de la bacteria hacia la planta.

5. Justificación

Los sistemas de traducción de señales y principalmente los sistemas de doble componente son fundamentales para que *A. baldaniorum* pueda competir y percibir señales ambientales en un entorno tan complejo como lo es la rizosfera. De acuerdo a lo observado en los trabajos de Gamboa (2014), Avalos (2015), Cordero (2017) y Cosme (2019), los genes *cdgE*, *hkhB*, *CheY-Like*, *LuxO* y *hkhC* podrían estar formando un operón el cual regularía procesos fundamentales como lo son el crecimiento, la tolerancia a estrés osmótico, la movilidad y formación de biopelícula

en *A. baldaniorum* Sp245, funciones biológicas importantes para una supervivencia y colonización exitosa de las raíces. Por lo cual es fundamental el estudio del gen *hkhC* el cual podría estar funcionando como una posible CH híbrida soluble.

6. Objetivo general:

Estudiar el gen *hkhC* que codifica a una cinasa histidínica híbrida de *A. baldaniorum* Sp245

6.1 Objetivos específicos

- 1) Generar la mutación por eliminación del gen *hkhC*, e inserción de un casete de resistencia a kanamicina como marcador de selección en *A. baldaniorum* Sp245.
- 2) Generar una doble mutante $\Delta hkhB$, $\Delta hkhC::kanR$ a partir del fondo genético de la mutante *A. baldaniorum* $\Delta hkhB$.
- 3) Analizar filogenéticamente el gen *hkhC*.
- 4) Realizar un análisis bioinformático de la proteína HkhC de *A. baldaniorum* Sp245.

7. Materiales y Métodos

ANÁLISIS *IN SILICO*

7.1 Selección del gen *hkhC*:

Se realizó una búsqueda *in silico* del gen *hkhC* con ayuda de la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI por sus siglas en inglés), dentro de la secuencia del genoma completo de *A. baldaniorum* Sp245 con código de bioproyecto [PRJEA70627](#), depositado por el Instituto Tecnológico de Georgia en 2011. La secuencia del gen *hkhC* se encuentra depositada con el número de referencia AZOBR_p310003.

7.2 Análisis de promotores

Para el análisis de la región promotora del gen se utilizaron 240 pb río arriba del ORF, empleando las siguientes plataformas bioinformáticas: SAPPHIRE, PromoterHunter, Promoter Prediction by Neural Network, PePPER, Deep Learning Recognition using Convolutional Neural Networks (Softberry), FIMO - MEME Suite, iPro70-PseZNC, iPro54-PseKNC, BPROM (Softberry), BacPP, Virtual Footprint.

7.3 Análisis filogenéticos

Se seleccionaron secuencias homólogas por medio de alineamientos locales de proteínas con ayuda de las plataformas BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del NCBI, además de la plataforma Simple Modular Architecture Research Tool (SMART) para la predicción de dominios proteicos. Las secuencias encontradas fueron sometidas a los siguientes criterios de inclusión: Una identidad de $\geq 25\%$, una cobertura $\geq 50\%$, un E value de $\leq 1 \times 10^{-5}$.

Las historias evolutivas se infirieron utilizando el método de máxima verosimilitud (ML) construidas con el modelo de sustitución tiempo general reversible (TGR) sugerido por el programa MEGA 7, para la realización de árboles filogenéticos originales. La base de secuencias involucradas para la realización de los dos primeros árboles fue de 67 secuencias de nucleótidos pertenecientes a 14 géneros distintos, y para el tercer árbol fue de 33 secuencias de nucleótidos pertenecientes exclusivamente al género *Azospirillum* más sus 2 grupos externos (Kumar et al., 2002). Los árboles fueron inferidos a partir de 1000 repeticiones (1000 Bootstrap) que se utilizaron para representar la historia evolutiva de los taxones analizados (Felsenstein 1985). Se utilizó el árbol con mayor probabilidad logarítmica. Los árboles iniciales para la búsqueda heurística se obtuvieron automáticamente aplicando los algoritmos Neighbor-Join y BioNJ a una matriz de distancias por pares estimada, usando el enfoque de máxima probabilidad compuesta (MCL), y después seleccionando la topología con un valor de probabilidad de registro superior. Se utilizó una distribución gamma discreta para modelar las diferencias de tasa de evolución entre los sitios (+ G), para los tres árboles originales. Además, para el árbol de los 14 géneros se utilizó el modelo de variación de la tasa permitiendo que

algunos sitios fueran evolutivamente invariables (+ I), estos parámetros fueron delimitados con ayuda de la opción “hallar el mejor modelo para el método de máxima verosimilitud” que está presente en el mismo Software. Se eliminaron todas las posiciones que contenían lagunas y datos faltantes en los tres árboles con un total de 1314 posiciones en los árboles multigénero y 2202 posiciones para el árbol exclusivo del género *Azospirillum* en el conjunto de datos finales. Todos estos análisis evolutivos se realizaron con ayuda del software MEGA 7 (Kumar et al., 2016).

7.4 Análisis *in silico* de la proteína HkhC

Para el análisis de la secuencia de HkhC se utilizó las siguientes plataformas para la predicción de dominios proteicos SMART, CDD (Conserved Domains Database del NCBI), Interpro, Pfam y TIGRFAMs tomando en cuenta E-values $\leq 1 \times 10^{-4}$.

7.5 Análisis *in silico* y modelado de los dominios de detección de estímulos fisicoquímicos y moléculas pequeñas de la proteína HkhC.

Para la realización del análisis del modelado por homología de los dominios GAF y PAS-PAC de HkhC se utilizó la secuencia aminoacídica de la proteína HkhC presente en la base de datos del NCBI con el código de referencia AWJ93132.1 utilizando como referencia los cristales presentes en la plataforma del Banco de Datos de Proteínas que se seleccionaron de acuerdo al porcentaje de identidad mínimo del 25%, un porcentaje de cobertura mayor al 90%, y una resolución del cristal que se encontrara en el rango de 1 Å a 3 Å, generando el modelo por homología en la plataforma SWISS MODEL en formato PDB. Este modelo fue validado con la plataforma MolProbity de la Universidad de Duke tomando como referencia el porcentaje de rotámeros favorecidos, el porcentaje de índice de Ramachandra favorecido y el porcentaje de valores atípicos de Ramachandra. Además, se realizó distribución de estructuras secundarias (alfas hélices y betas plegadas) y la sobreposición con el cristal por medio de Chimera.

7.6 Análisis *in silico* del modelado de los dominios característicos de cinasa histidínica de la proteína HkhC.

Se realizó un modelado por homología de los dominios de cinasa histidínica DHp y CA de HkhC con SWISS-MODEL utilizando los cristales 4MT8 y 4U7O estos modelos fueron validados con la plataforma MolProbity tomando como referencia el porcentaje de rotámeros favorecidos, el porcentaje de índice de Ramachandra favorecido y el porcentaje de valores atípicos de Ramachandra. Además, también se analizó la distribución de estructuras secundarias (alfas hélices y betas plegadas) y la sobreposición de estas con los cristales de referencia, análisis de motivos funcionales con la plataforma WebLogo, la visualización de imágenes modeladas se hizo por medio de Chimera.

7.7 Análisis del sitio de unión a ATP y de acoplamiento molecular del dominio CA de HkhC

Se hizo una búsqueda de la conservación del motivo de unión a ATP con la plataforma Conserved Domain Search del NCBI, esta plataforma se basa en motivos ya reportados de proteínas específicas y comparándola con la secuencia de interés. Con respecto al análisis de las estructuras generadas del acoplamiento molecular del dominio CA con el ligando ATP, dichas estructuras fueron energéticamente minimizadas con el software USFC Chimera (dominio CA) y el software Avogadro (ligando ATP). Se emplearon los softwares de simulación de modelaje molecular AutoDock Tools y Autodock Vina del Centro de Investigación Scripps, y PyMOL comercializado por Delano Scientific LLC, para la realización del acoplamiento molecular receptor-ligando, y el modelado de acuerdo a protocolos ya estandarizados (Rizvi et al., 2013), los residuos de interacción del acoplamiento molecular se analizaron de igual manera con los Softwares LigPlot y PyMOL (Wallace et al., 1995)

7.8 Análisis *in silico* del modelado de los dominios receptores de la proteína HkhC.

Con los dominios receptores de la proteína HkhC se hizo un análisis de la predicción de secuencias proteicas, ya que HkhC contiene dos dominios REC, a diferencia de los análisis preliminares con la plataforma SMART que predecía un dominio REC único, se realizó el modelado por homología de ambos dominios

(REC1 y REC2) con SWISS-MODEL utilizando los cristales 6QRJ y 7C1J estos modelos son validados con la plataforma MolProbity tomando como referencia el porcentaje de rotámeros favorecidos, el porcentaje de índice de Ramachandra favorecido y el porcentaje de valores atípicos de Ramachandra. Además, también se analiza la distribución de estructuras secundarias (alfas hélices y betas plegadas) y la sobreposición de estas con los cristales de referencia, análisis de motivos funcionales con la plataforma WebLogo, la visualización de imágenes modeladas se hizo por medio de Chimera

8. MATERIAL Y MÉTODOS ANÁLISIS EXPERIMENTAL

8.1 Material biológico

Las cepas bacterianas y los plásmidos utilizados en este trabajo se enlistan en la tabla 2.

Cepas	Genotipo	Referencias
<i>E. coli</i> S17.1	Ec294:: [RP4-2(Tc::Mu)(Km::Tn7)] Tpr , Smr , tra+ recA, pro, res	(Simon <i>et al.</i> , 1983)
<i>E. coli</i> DH5 α	F- Φ 80lacZ Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (<i>rk-</i> , <i>mk</i> +) <i>phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1</i> λ -	(Hanahan, 1983)
<i>A. baldaniorum</i> Sp245	Cepa silvestre asilada de Brasil.	(Baldani, <i>et al.</i> , 1986)
<i>A. baldaniorum</i> C5.56	Cepa mutante Δ <i>hkhB amp^R</i> derivada de <i>A. baldaniorum</i> Sp245	(Cordero, 2017)
Vectores	Descripción	Referencias
pGEM [®] -T Easy Vector	Vector de clonación estándar <i>amp^R</i> , <i>lacZ</i>	PROMEGA [®]
pBlueScript II SK (pBSK)	Vector de clonación estándar (fagémido escindido de lambda ZAP). <i>Ap^R</i> , <i>lacZ</i>	Addgene [®]
pJMS-Km	Vector suicida derivado de pSUP202 MCS, <i>amp^R</i> , <i>Km^R</i>	(Ramírez-Mata <i>et al.</i> , 2016)
Construcciones	Descripción	Referencias
pGHKCA	Plásmido derivado de pGEM T Easy con un fragmento homólogo de <i>A. baldaniorum</i> Sp245 de 954 pb. <i>amp^R</i>	Este estudio
pBSK-HKHCB	Plásmido derivado de pBSK con un fragmento homólogo de <i>A. baldaniorum</i> Sp245 de 974 pb. <i>amp^R</i>	Este estudio
pJMS-HKHCAB	Plásmido mutagénico derivado del vector suicida pJMS-Km, <i>km^R</i> , <i>amp^R</i> , <i>Tc^R</i>	Este estudio
Mutantes/Clonas	Descripción	Referencias

<i>E. coli</i> DH5α (clona 3)	Cepa <i>E. coli</i> DH5α con la construcción pGHKCA	Este estudio
<i>E. coli</i> DH5α (clona 65)	Cepa <i>E. coli</i> DH5α con la construcción pBSK-HKHCB	Este estudio
<i>E. coli</i> DH5α (clona 9)	Cepa <i>E. coli</i> DH5α con la construcción pJMS-HKHCB	Este estudio
<i>E. coli</i> S17.1 (clona 9.9)	Cepa <i>E. coli</i> S17.1 con la construcción pJMS-HKHCB	Este estudio
<i>A. baldaniorum</i> CCN-52	Cepa mutante $\Delta hkhC::Km$ derivada de <i>A. baldaniorum</i> Sp245	Este estudio
<i>A. baldaniorum</i> BCCN-28	Cepa doble mutante $\Delta hkhC::Km, \Delta hkhB$ derivada de <i>A. baldaniorum</i> C5.56	Este estudio

Tabla 2. **Materiales biológicos.** Tabla donde se enlistan los materiales biológicos empleados en este proyecto entre los cuales están: Cepas, mutantes, vectores y construcciones.

El presente trabajo partió de verificar la pertenencia a la especie *baldaniorum* de las cepas *A. baldaniorum* Sp245 y *A. baldaniorum* C5.56 ($\Delta hkhB$). Para ello se realizaron ensayos de PCR para amplificar las regiones intergénicas del gen 16S de ambas cepas empleado los oligonucleótidos AZO-F y AZO-R (descritos en la sección de diseño de oligonucleótidos). Una vez verificadas se procedió a realizar los ensayos moleculares.

8.2 Condiciones de cultivo celular:

El cultivo de cepas de *E. coli* se hizo en medio LB (Luria Bertani) suplementado con Ampicilina (Ap) [10 µg/mL]; Tetraciclina (Tc) [30 µg/ml]; y Kanamicina (Km) [20 µg/mL]; según los requerimientos de selección. Los cultivos fueron incubados a 37 ° C en condiciones de agitación constante (120 rpm) durante 16 horas. Para cultivos sólidos, se empleó el mismo medio adicionado con agar Bacto (Bioxon, México) a una concentración de 1.5%. Las cepas de *A. baldaniorum* Sp245 fueron crecidas en los siguientes medios: Medio Difco (MD), empleado para la preservación de las cepas en glicerol; medio Rojo Congo (RC) para la identificación morfológica de las colonias obtenidas; Medio mínimo K-malato (MM-KM) y Medio mínimo K-lactato (MM-KL) para el crecimiento y mantenimiento de las cepas (Jijón-Moreno et al., 2019).

8.3 Diseño de iniciadores:

Con el objetivo de obtener la mutación $\Delta hkhC::kanR$ por recombinación homóloga en el fondo genético de las cepas *A. baldaniorum* Sp245 y *A. baldaniorum* $\Delta hkhB$ (C5.56), se realizó el diseño de dos pares de iniciadores para el amplificado de productos homólogos de aproximadamente 1Kb de longitud, los cuales se encuentran flanqueando al gen *hkhC*. Los fragmentos homólogos fueron denominados como: fragmento A el cual abarca la región C-terminal y partes del gen próximo río abajo, y el fragmento B que abarca de la región N-terminal y parte del gen *luxO* (Figura 13).



Figura 13. **Mapa del contexto genético cepa silvestre.** Se observan a los fragmentos homólogos A y B localizados en las regiones flanqueantes del gen *hkhC*.

Para el diseño de los iniciadores se tomaron en cuenta las siguientes especificaciones: a) evitar cualquier afectación del marco de lectura abierto de los genes aledaños, b) incorporar sitios de restricción para la construcción del plásmido mutagénico c) evitar diferencias mayores de 5°C entre las T_m de cada uno de los cebadores, d) eliminar completamente la región codificante del gen *hkhC*.

Oligonucleótidos	Secuencia de ADN (5' → 3')	Características
SacI_HKHCB_F	CGATGAGCTCCCTTTGTGACCCTGAACTGC	Sitio de restricción <i>SacI</i> , amplifica el frag. B
StuI_HKHCB_R	CGTAGGCCTGATACGGTAGGCTTTGAGCAC	Sitio de restricción <i>StuI</i> , amplifica el frag. B
SnaBI_HKHCA_F	GCCTACGTAAGGGAGGGTGTGGACTG	Sitio de restricción <i>SnaBI</i> , amplifica el frag. A

KpnI_HKHCA_R	TCGGTACCTGGTATCGCTGATGGGAG	Sitio de restricción <i>KpnI</i> , aplica el frag. A
KmR	GTCCCCAGTCATAGCCGAATA	Amplifica gen de Km
KmF	AGCGCATCGCCTTCTATCGCCTT	Amplifica gen de Km
AZO-F	GGCGCATCCCTTCTCACGG	Amplifica las regiones intergénicas del gen 16S en <i>A. baldaniorum</i> Sp245
AZO-R	GCTTGCGCCACGCGCAGG	Amplifica las regiones intergénicas del gen 16S en <i>A. baldaniorum</i> Sp245

Para el diseño y análisis de oligonucleótidos, se emplearon los programas Primer3plus, SnapGene® y OligoAnalyzer™ Tool de IDT (Integrated DNA Technology) la cual nos permite evaluar la formación de homo y heterodímeros, y horquillas.

Tabla 3. Oligonucleótidos realizados y utilizados en este trabajo (en rojo se muestran los sitios de restricción adicionados).

En la tabla siguiente se muestran los oligonucleótidos realizados y utilizados en este trabajo, así como sus características (en rojo se muestran los sitios de restricción).

8.4 Extracción de ADN:

La extracción de ADN genómico se realizó por el método de Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB), mientras que la extracción de ADN plasmídico se realizó con la técnica modificada de mini preparación de Gilles Morelle (Jijón-Moreno, 2017).

8.5 Condiciones de amplificación de los fragmentos A y B por PCR:

La amplificación de los fragmentos A y B por medio de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) fue realizada usando los oligonucleótidos *Sna*BI_HKHCA_F y *Kpn*I_HKHCA_R para el fragmento A y *Sac*I_HKHCB_F y *Stu*I_HKHCB_R para el fragmento B. Las condiciones de PCR se detallan en el anexo 1.

8.6 Clonación de los fragmentos A y B a los vectores de mantenimiento pGEM-T-easy y pBSK.

El producto de PCR del fragmento A se clonó en el vector de mantenimiento pGEM-T-Easy generando la construcción pGHKHCA. El fragmento B fue clonado en el vector de mantenimiento pBSK (el cual fue previamente linealizado con la enzima *Eco*RV) obteniendo la construcción pBSK-HKHCB. El proceso de ligación en ambas clonaciones se realizó por medio de la enzima ligasa T4 (Promega®) de acuerdo a las especificaciones del proveedor y protocolos estandarizados (Ponchon et al., 2009; Promega Corporation, 2018).

8.7 Transformación de las construcciones pGHKHCA y pBSK-HKHCB en *E. coli*

Las construcciones pGHKHCA y pBSK-HKHCB se transformaron en células quimio-competentes *E. coli* DH5α de manera independiente apegados a protocolos ya estandarizados en el laboratorio (Jijón-Moreno, 2017). Las bacterias transformantes fueron seleccionadas a través de su color blanco al crecer en placas de LB adicionadas con amp [100 µg/mL] y X-Gal [20 mg/mL]. Posteriormente, se les realizó extracción de ADN plasmídico y sometidos a restricción enzimática con la

finalidad de liberar ambos fragmentos. Los ensayos se realizaron en condiciones de protocolo ya establecidas (Sambrook & Fritsch, 1989) (Anexos 1 y 2).

8.8 Subclonación y construcción del plásmido mutagénico pJMS-HKHCB:

Empleando las endonucleasas *SnaBI* y *KpnI* (Thermo Fisher Scientific®) para el fragmento A y *SacI* y *StuI* (Thermo Fisher Scientific®) para el fragmento B, ambos fragmentos se subclonaron en el vector suicida pJMS-Km (Ramírez-Mata et al., 2016), obteniendo la construcción pJMS-HKHCB. Para corroborar la subclonación de cada uno de los fragmentos al vector suicida se realizaron ensayos de restricción enzimática y PCR. De igual manera, para seleccionar a las bacterias transformantes que hayan sido capaces de adquirir el plásmido pJMS-HKHCB se utilizaron placas de medio LB (20 µg/ml de Km y 10 µg/ml de Tc). La comprobación de la construcción final fue por medio de PCR utilizando los oligonucleótidos *SacI_HKHCB_F* y *KpnI_HKHCA_R* y ensayos de restricción con las enzimas *SacI* y *KpnI* (Jijón-Moreno, 2017; Sambrook & Fritsch, 1989).

8.9 Amplificación de los fragmentos A y B en el fondo genético de las cepas *A. baldaniorum* Sp245 y *E. coli* S17.1 que contiene el plásmido suicida pJMS-HKHCB

Se realizó la comparación y estandarización de los amplificadores de ambos fragmentos en el fondo genético de la cepa silvestre *A. baldaniorum* Sp245 y la cepa conjugativa *E. coli* S17.1 por medio de PCR con los oligonucleótidos *SacI_HKHCB_F* y *KpnI_HKHCA_R* previo al proceso de generación de las mutantes comparando tamaños de amplificadores al comprobar la obtención de las mutantes.

8.10 Obtención de las mutantes *A. baldaniorum* $\Delta hkhC::kanR$ y *A. baldaniorum* $\Delta hkhC::kanR, \Delta hkhB$

El vector se transformó en células quimio-competentes de la cepa conjugativa donadora *E. coli* S17.1. El plásmido mutagénico pMS-HKHCB se transfirió de la cepa donadora a las cepas receptoras *A. baldaniorum* Sp245 y *A. baldaniorum* C5.56 ($\Delta hkhB$) por medio de conjugación biparental (Jijón-Moreno, 2017). Las

transconjugantes resultantes se seleccionaron en placas de medio mínimo K-malato (50 µg/ml de Km) de manera positiva (crecimiento), y se contra seleccionaron de manera negativa (sin crecimiento) con placas de medio mínimo K-malato (15 µg/ml de Tc). El plásmido mutagénico no replicativo, favoreció al proceso de recombinación homóloga para la eliminación del gen *hkhC* e inserción del gen *kanR* (Fig. 14). Las posibles mutantes obtenidas *A. baldaniorum* $\Delta hkhC::kanR$ y *A. baldaniorum* $\Delta hkhB$, $\Delta hkhC::kanR$ se confirmaron por medio de PCR utilizando los oligonucleótidos SacI_HKHCB_F y KpnI_HKHCA_R, además se ocupó como control negativo una reacción de PCR sin ADN.

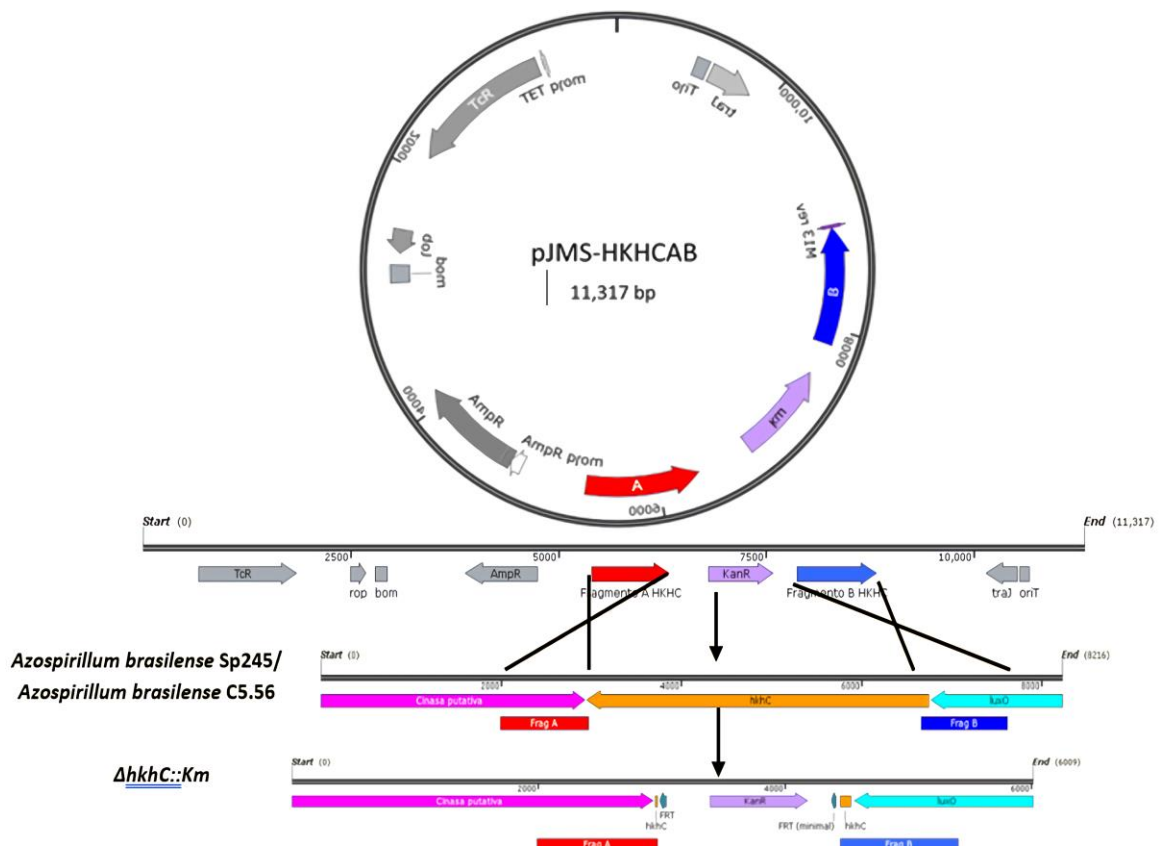


Figura 14. Mapa del proceso de recombinación homóloga entre el plásmido mutagénico pJMS-HKHCB y las cepas *A. baldaniorum* Sp245 y *A. baldaniorum* C5.56. Representación del doble entrecruzamiento por recombinación homóloga de la construcción final pJMS-HKHCB en el fondo genético de la cepa silvestre (*A. baldaniorum* Sp245) y la cepa mutante (*A. baldaniorum* C5.56) para la eliminación del gen *hkhC* e inserción del gen *kanR*.

9. RESULTADOS DEL ANÁLISIS *IN SÍLICO*

9.1 Análisis *in silico* del gen *hkhC*.

El gen *hkhC* con número de referencia HE577330.1 (3,004..6,798) en la plataforma de NCBI, es un gen de 3,975 pb de longitud codificado en el plásmido 3 del genoma de *A. baldaniorum* Sp245. Forma parte de un presunto operón, (Figura 15), el gen *hkhC* está precedido por genes que codifican para una proteína tipo Lux-O, una proteína quimiotáctica tipo CheY, una cinasa histidínica híbrida putativa, una diguanilato ciclase y al menos tres genes que codifican para proteínas de función desconocida, entre otros (Figura 15). Mientras que río abajo se encuentra otra presunta cinasa histidínica, transcrita en sentido opuesto.

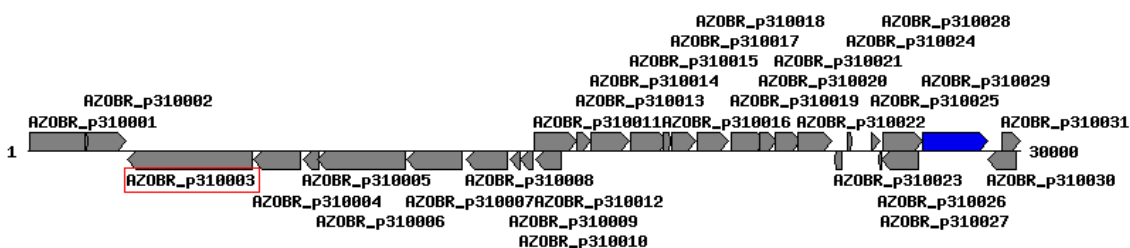


Figura 15. Representación esquemática del contexto genético del gen *hkhC*. Se muestra al gen AZOBR_p310003 en un recuadro rojo y en el mismo sentido de la transcripción al menos 9 genes más.

9.2 Análisis *in silico* de presuntos promotores del gen *hkhC*

Para la búsqueda de la región promotora de *hkhC* se analizó una región de 240 nucleótidos río arriba al codón de inicio del gen utilizando plataformas bioinformáticas. Los resultados obtenidos con las plataformas BPPROM y BacPP, arrojaron, la presencia de secuencias consenso para las cajas -10 y -35 dependientes de un probable factor sigma 70 en las posiciones -63 y -91 respecto al codón de inicio (Figura 16). Las secuencias mostraron los puntajes de 17 y 60 evaluados por BPPROM y un porcentaje de fiabilidad de 71 de acuerdo con BacPP. Sin embargo, se encuentran más distantes al codón de inicio de como se ha reportado en la literatura (Paget & Helmann, 2003). Con respecto a los resultados

obtenidos con las plataformas BacPP y iPro54-PseKNC se obtuvo una región de 138 pb con un puntaje 0.952397 en iPro54-PseKNC (puntaje significativo para la plataforma a partir de 0.7), además de un porcentaje de 71% de probabilidad con la plataforma BacPP, dentro de esa región nucleotídica y con ayuda del programa FIMO solo se encontró una región conservada de la caja -24 posición -168, y una secuencia consenso CTGGCACNNNNNTTGCA para la unión de NtrA (Factor sigma-54 de la ARN polimerasa) (Vieille & Elmerich, 1990) ver figura 17, fuera de la región señalada en amarillo se encontró otra secuencia consenso de la caja -24 en la posición -6, sin embargo no se encontraron regiones consenso de la caja -12 a 5 nucleótidos río abajo de las cajas -24 encontradas como se reporta en la literatura (Barrios et al., 1999) (Figura 17). Por otra parte, se buscaron sitios de unión para activadores y/o represores transcripcionales en la probable región promotora del gen *hkhC* (región de 240 nucleótidos), con la plataforma Virtual Footprint obteniendo los siguientes resultados. (Figura 18).

```

LOCUS hkhC región promotora sigma 70 240 pb río arriba del codón de inicio
-241 GGAACGAGGG CGCGGCGCTA CGGGAATCGG TGTCCGAGAT GGATCGCGAC GATGGCCTGC
-181 GTCCCCTCTG GCAAGTGGAG AAGGATCTGA TCCTGCGCGC CTTGGCGCTT TATGACAAACG
-121 ACGTGCCGAA GCGGCGCCACC CGTC TTGAAA TCAGCCCGTC GACCATCTT CGCAAGCT CC
          -35                                -10
-61 AGATTTGGAA GACGGAAATG CCTGTGGCTT GAAGAGCGAC GACGTGGAAA GGCAAGCCGC

1 ATG ATC GAA CCT CCT GCG CAA TCC GTG GCT CCG CTG CCG AGG GAG GAG TTG
  M  I  E  P  P  A  Q  S  V  A  P  L  P  R  E  E  L
+1
52 GCG CGC CTC GAG GTG CTC AAA GCC TAC CGT ATC CTC GAC ACC GAC CCG GAA
  A  R  L  E  V  L  K  A  Y  R  I  L  D  T  D  P  E

```

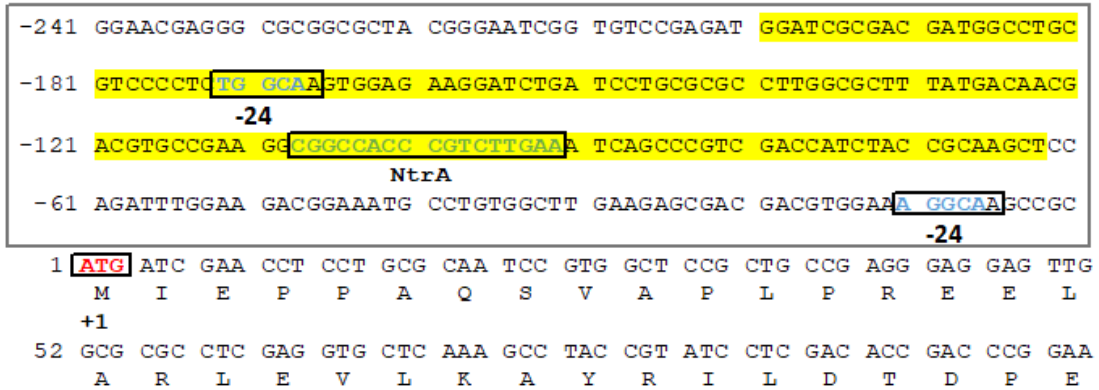
Caja -35: **TTGAAA** Puntaje 60

Caja -10: **CGCAAGCT** Puntaje 17

Figura 16. **Búsqueda *in silico* de regiones promotoras de unión al factor sigma 70 del gen *hkhC*.** Esta imagen representa los resultados obtenidos tras la búsqueda de regiones promotoras de unión al factor sigma 70 con las plataformas BPROM (softberry) y BacPP. La imagen muestra secuencias nucleotídicas en formato GenBank, la región nucleotídica de 240 pb marcada con un recuadro negro corresponde a la sección río arriba del gen *hkhC*, la otra fracción corresponde a una sección de la región codificante del gen *hkhC* de 80 aa, resaltando la metionina de inicio en color

rojo. En color azul se resalta la caja -35 encontrada y en color verde la caja -10, secuencias de unión al factor sigma 70.

LOCUS *hkhC* región promotora sigma 54 240 pb río arriba del codón de inicio

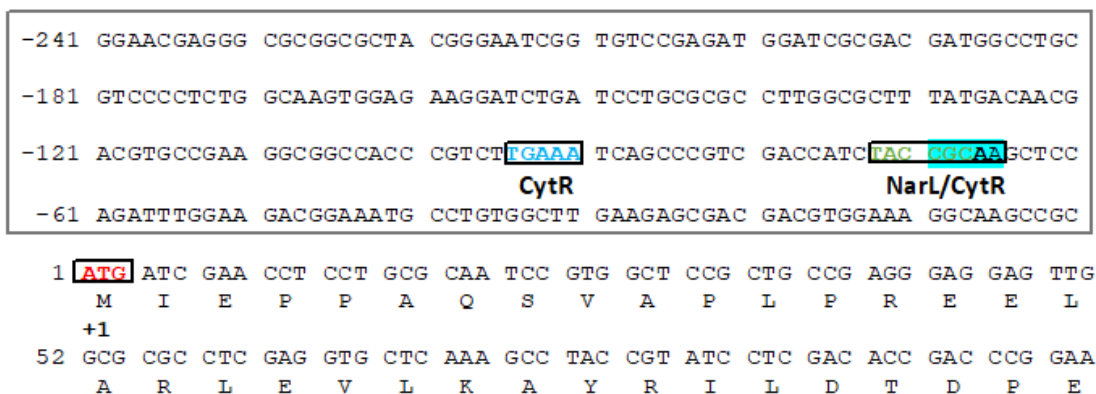


Caja -24: ACGCAA/TCGCAA.

Secuencia consenso NtrA: CGGCCACCGTCTTGAA E-value 8.91×10^{-05}

Figura 17. **Búsqueda *in silico* de regiones promotoras de unión a sigma 54 del gen *hkhC*.** Esta imagen representa los resultados obtenidos tras la búsqueda de regiones promotoras de unión al factor sigma 54 con las plataformas. FIMO MEME Suite, iPro54-PseKNC y BacPP. La imagen muestra secuencias nucleotídicas en formato GenBank, la región nucleotídica de 240 pb marcada con un recuadro negro corresponde a la sección río arriba del gen *hkhC*, la fracción marcada en color amarillo corresponde a una región sugerida para la unión de sigma 54 por ambas plataformas con un puntaje de 0.952397 en iPro54-PseKNC y un porcentaje de probabilidad de 71% con la plataforma BacPP. La otra fracción corresponde a la región codificante del gene *hkhC* de 80 aa, resaltando la metionina de inicio en color rojo. En color azul se resaltan dos secuencias de la caja -24 encontradas para la unión al factor sigma 54. En color verde la secuencia consenso CTGGCACNNNNNTTGCA de unión a sigma 54 encontrada por FIMO MEME Suite con un E-value de 8.91×10^{-05} .

LOCUS *hkhC* región río abajo 240 pb junto con una fracción de aminoácidos de HkhC



Secuencia de unión a NarL: **TACCGCA** puntaje 3.89

Secuencias de unión a CytR: **TGAAA** puntaje 3.84, **CGCAA** puntaje 3.35

Figura 18. **Búsqueda *in silico* de regiones unión a factores activadores y/o represores de la transcripción en la posible región promotora del gen *hkhC*.** Esta imagen representa los resultados obtenidos tras la búsqueda de regiones de unión a factores activadores y represores de la transcripción con la plataforma Virtual Footprint. La imagen muestra secuencias nucleotídicas en formato GenBank, la región nucleotídica de 240 pb marcada con un recuadro negro corresponde a la sección río arriba del gen *hkhC*, la otra fracción corresponde a 80 aa del HkhC, resaltando la metionina de inicio en color rojo. En color verde se resalta la secuencia consenso parcial (último nucleótido no conservado en color negro) y las dos secuencias consenso completamente conservados al sitio de unión al factor represor transcripcional CytR.

9.3 Análisis filogenético del gen *hkhC*

Para conocer la historia evolutiva del gen *hkhC*, se realizaron búsquedas de secuencias homólogas al gen *hkhC* con la ayuda de la plataforma BLAST del NCBI, obteniendo 67 secuencias con un porcentaje de identidad $\geq 25\%$ y $\geq 50\%$ de cobertura, estas secuencias pertenecen a 14 géneros, de las cuales 31 corresponden únicamente al género *Azospirillum*. A partir de los genes homólogos a *hkhC* identificados, se hizo un análisis de su contexto genético para observar la presencia o ausencia del clúster de genes homólogos que se presume formarían parte del operón putativo. Con base en ello, y en la predicción de dominios proteicos generados con las plataformas SMART, NCBI Conserved Domain Search e InterPro

tomando en cuenta E-values $\leq 1 \times 10^{-4}$, se realizó la construcción de tres árboles filogenéticos.

El primer filograma fue generado con las 67 secuencias homólogas a *hkhC* se dividió conforme a contextos y a las relaciones taxonómicas entre las secuencias figura 19 inciso A. En el inciso B de la figura se muestra los contextos genéticos y como están distribuidos en las secuencias homólogas a *hkhC* donde se halló el operón completo, las secuencias donde solamente se encuentra un gen similar a *luxO-Like* río abajo del gen homólogo a *hkhC* y por último las secuencias homólogas a *hkhC* que indica que en el contexto genético no se halló ningún gen homólogo al operón solamente la secuencia homóloga a *hkhC*.

Con base en las relaciones taxonómicas de las secuencias, se destaca lo siguiente, dos grupos externos pertenecientes al filo Bacteroidetes, una secuencia perteneciente a la clase de las Gammaproteobacterias, 7 secuencias pertenecientes al orden Hyphomicrobiales, 10 secuencias pertenecientes al orden Rhodobacterales y una a Alphaproteobacteria no clasificada. Finalmente, 43 de las 46 secuencias pertenecen al orden Rhodospirillales (orden donde se encuentra el género *Azospirillum*) y 3 secuencias de una Alphaproteobacteria no clasificada. En la sección C de la figura se muestra un esquema de la distribución y separación taxonómica en filos, clases y ordenes acorde a la figura 19.

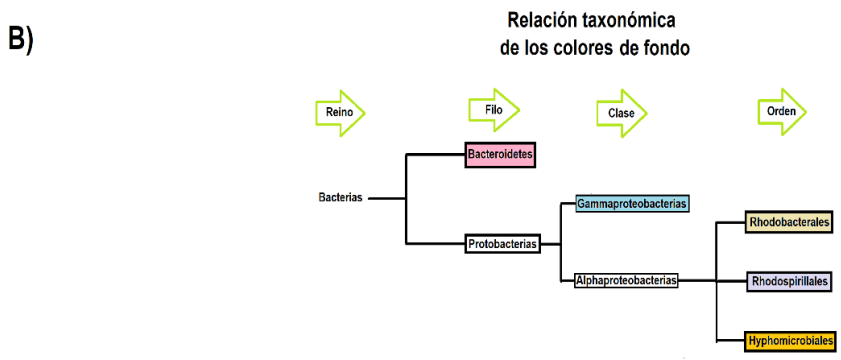
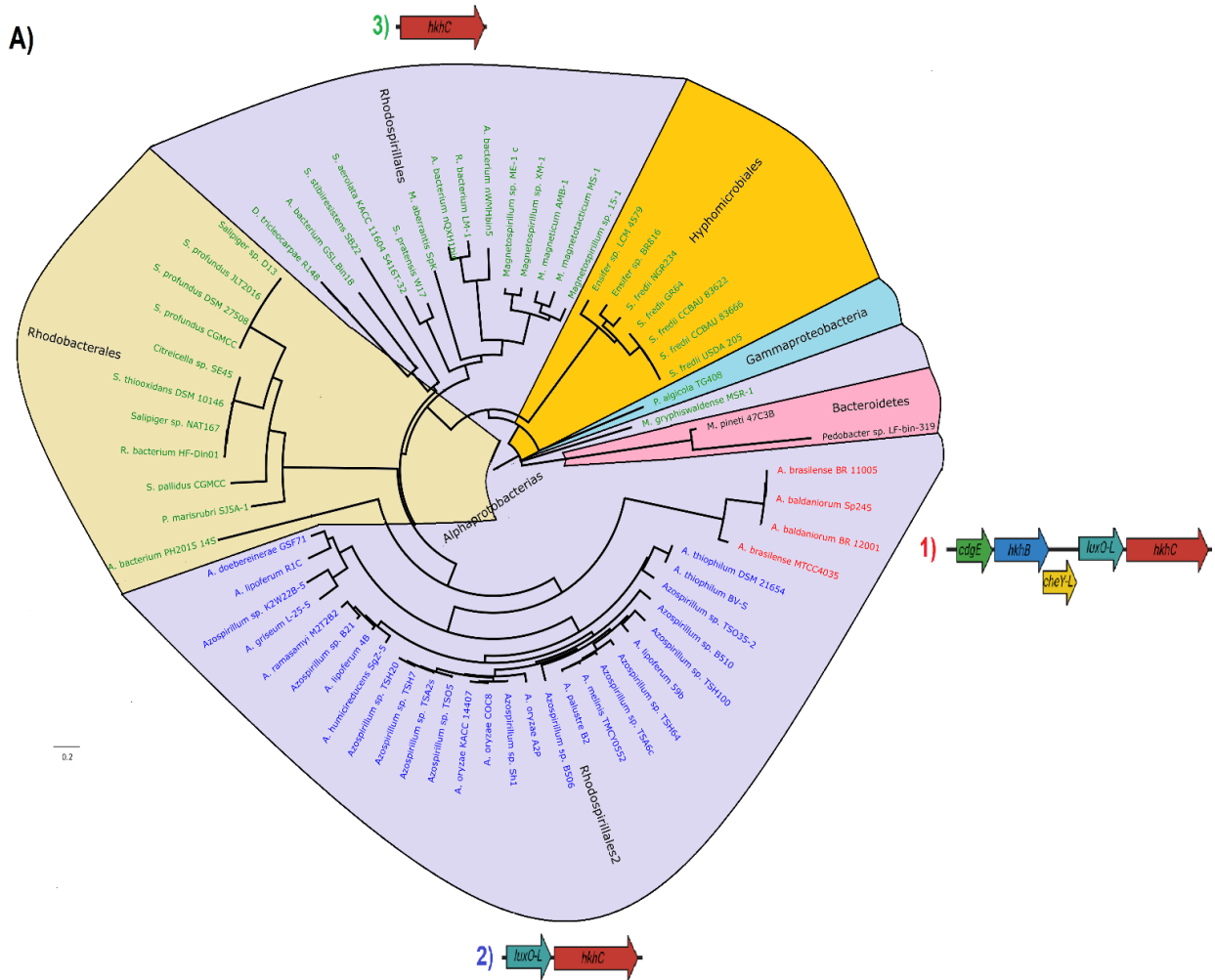


Figura 19. Filograma métrico hecho por el método de máxima verosimilitud donde se representan la variación de los contextos genéticos y la distribución taxonómica de las secuencias homólogas del gen *hkhC*. A) Filograma métrico dividido por patrones de colores de la letra y del fondo de imagen. El color de letra rojo indica las especies bacterianas de los genes homólogos a *hkhC* cuyos contextos genéticos tienen presente al operón completo. La letra de color

azul indica las secuencias homólogas que tienen en su contexto genético a un gen del operón (*luxO-Like*). La letra de color verde representa la ausencia de genes homólogos al operón. La letra de color negro representa los géneros *Mucilaginibacter* y *Pedobacter*. El color de fondo del filograma indica las relaciones taxonómicas de las secuencias. En color rosado se destacan las 2 secuencias de los grupos externos pertenecientes al filo Bacteroidetes, en azul claro muestra una única secuencia perteneciente a la clase de las Gammaproteobacterias, en naranja se muestra 7 secuencias pertenecientes al orden Hyphomicrobiales, en color beige se muestran 11 secuencias de las cuales 10 pertenecen al orden Rhodobacterales y la secuencia restante a una Alphaproteobacteria no clasificada, finalmente en color violeta se muestran 46 secuencias de las cuales 43 pertenecen al orden Rhodospirillales y las 3 secuencias restante a una Alphaproteobacteria no calificada. También se muestran los contextos genéticos conforme a color de la letra, el número uno color rojo indica la esquematización del contexto genético completo de las especies, el número dos en color azul indica la visualización del contexto genético de las secuencias homólogas a *hkhC* donde se halló solamente un gen similar a *luxO-Like* río abajo del gen homólogo a *hkhC* y el número tres en color verde indica que en el contexto genético de las secuencias homóloga a *hkhC* no se halló ningún gen homólogo al operón solamente una secuencia homóloga a *hkhC*. **B)** Se muestra un esquema de la distribución y separación taxonómica en filos, clases y ordenes acorde a los patrones de color de fondo mostrados previamente.

Estos resultados indican que la región de señalización se encontraría conservada completamente solo en las cepas *A. baldaniorum* Sp245, *A. baldaniorum* BR 12001, *A. brasilense* MTC4035 (cepa muy probablemente reclasificada en el futuro dentro de la especie *baldaniorum*) y *A. brasilense* BR 11005. Sin embargo, los genes homólogos a *hkhC* y *luxO-like* se encuentran de manera común en otras especies y cepas del género *Azospirillum* con el mismo orden genético al del operón putativo (figura 19 inciso B número dos) lo cual podría sugerir que estos dos genes (*luxO-like* y *hkhC*) son inherentes al género *Azospirillum*.

En la figura 20 se muestra un cladograma realizado con las 67 secuencias homólogas al gen *hkhC*, incluyendo a *hkhC* de *A. baldaniorum* Sp245, utilizando las secuencias codificantes se realizó la predicción de dominios de las 67 secuencias homólogas, con base en ello fue dividido el cladograma mostrando la diferencia en la cantidad y tipos de dominios predichos por las plataformas SMART, NCBI Conserved Domain Search e InterPro incluyendo E-values $\leq 1 \times 10^{-4}$. Los resultados mostraron que las 67 predicciones proteicas presentan en común los dominios PAS, HK y REC en diferentes cantidades, además de la presencia o ausencia de los dominios GAF, PAC y HPT en algunas de las predicciones. La división del cladograma fue por medio de agrupación de especies y tipos de dominios presentes como se muestra en la figura 20. Los resultados indican que todas las secuencias

siguiente cantidad GAF, 3PAS, 2PAC, HK, 2REC y HPT. En color amarillo y número dos, se muestran los dominios GAF, 3PAS, PAC, HKH, 2REC y HPT. En color naranja y número tres, los dominios GAF, 2PAS, 2PAC, HK, REC y HPT. En color rojo y número cuatro, los dominios GAF, 2PAS, PAC, HK, 2REC y HPT. En color gris los dominios PAS, PAC, HK y REC. Finalmente en colores oscuros se muestran los dominios GAF, PAS, HK, REC y HPT, descritos a continuación. En azul y número uno, se muestran los dominios GAF, 3PAS, HK, 2REC y HPT. En color violeta y número dos, los dominios GAF, 2PAS, HK, 2REC y HPT. Por último, en color gris y número tres, los dominios GAF, PAS, HK, 2REC y HPT. Cada especie está etiquetada con un número y color específico.

9.4 Análisis *in silico* de la proteína HkhC

El gen *hkhC* codifica presuntivamente para una proteína cinasa histidínica híbrida citoplasmática de 1,264 a.a. de longitud. Esta proteína putativa presenta 10 dominios proteicos de acuerdo con las predicciones realizadas por las plataformas SMART, CDD (Conserved Domains Database del NCBI), Interpro, Pfam y TIGRFAMs tomando en cuenta E-values $\leq 1 \times 10^{-4}$.

Los resultados del análisis con estas plataformas indicaron que la proteína HkhC, contiene en la región N-terminal un dominio GAF (por sus siglas en inglés **c**GMP-specific phosphodiesterase, **A**denylyl cyclases and **F**hlA) con un rango de E-value de 1×10^{-5} hasta 1×10^{-12} , tres dominios PAS (**P**er-**A**rn-**S**im) con un rango de E-value de 1×10^{-7} hasta 1×10^{-24} y un dominio PAC (Por las siglas **P**roline-rich proteins, **A**rabinogalactan proteins and **C**ysteine residues) con un E-value de 1.7×10^{-4} . Que en conjunto estos tres tipos de dominios se clasifican como dominios de detección de señales o moléculas. En la parte media, contiene los dominios catalíticos propios de una cinasa histidínica, el dominio de dimerización (DHp) con un rango de E-value de 1×10^{16} hasta 1×10^{-22} y el dominio de unión a ATP (CA) con un rango de E-value de 1×10^{-21} hasta 1×10^{-47} . Finalmente, en la región carboxilo terminal, se encuentran los dos dominios de receptores REC (**R**eceptor) con un rango de E-value de 1×10^{-11} hasta 1×10^{-48} y un dominio de fosfotrasferencia HPT (**H**istidine **P**hosphotransfer) con un rango de E-value de 1×10^{-7} hasta 1×10^{-9} (Figura 22).

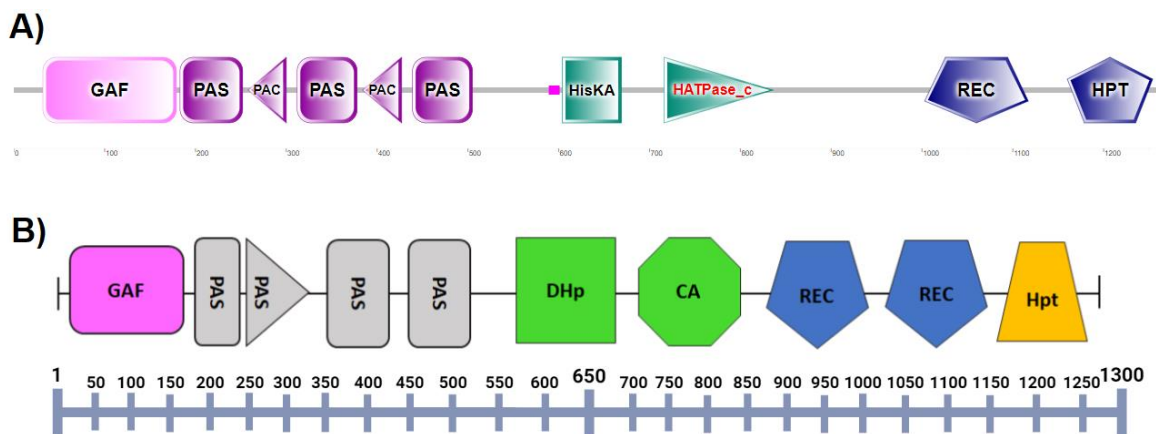


Figura 22. **Comparación de las representaciones esquemáticas de los dominios proteicos de HkhC predichos por SMART y analizados de manera independiente conforme a E-value.** **A)** Esquema obtenido por medio de la plataforma SMART donde se predicen 10 dominios proteicos para HkhC. En color rosado y morado están representados los dominios de detección de estímulos fisicoquímicos y moléculas pequeñas. En color verde están representados los dominios característicos de una cinasa histidínica. Finalmente, en color azul están representados los dominios receptores y de fosfotransferencia que clasifican a HkhC en una cinasa histidínica híbrida **B)** Dibujo representativo de los 10 dominios proteicos de HkhC evaluados conforme E-values $\geq 1 \times 10^{-4}$ comparando la presencia de un dominio REC más y un dominio PAC menos. En color rosado y gris están representados los dominios de detección de estímulos fisicoquímicos y moléculas pequeñas. En color verde están representados los dominios característicos de una cinasa histidínica. Finalmente, en color azul y naranja están representados los dominios receptores y de fosfotransferencia que clasifican a HkhC en una cinasa histidínica híbrida.

9.5 Análisis *in silico* y modelado de los dominios de detección de estímulos fisicoquímicos y moléculas pequeñas de la proteína HkhC.

Se realizó un modelado por homología de los dominios GAF y PAS-PAC de HkhC con la plataforma SWISS-MODEL utilizando como referencia los cristales 4ZMU y 3MR0 depositados en el Banco de Datos de Proteínas, obteniendo los siguientes resultados; 50.70% de identidad y 95% de cobertura del dominio GAF de HkhC comparado con el dominio GAF del cristal 4ZMU, 31.65% de identidad y 91% de cobertura de los dominios PAS-PAC en comparación con los dominios PAS-PAC del cristal 3MR0, de acuerdo a la literatura el porcentaje mínimo de identidad requerido es de $\geq 25\%$ (Haddad et al., 2020), por lo cual los porcentajes de identidad obtenidos fueron satisfactorios. El siguiente parámetro descrito es la evaluación de la resolución de los cristales que miden la calidad de los datos publicados en la plataforma RSCB del banco de datos de proteínas, las estructuras de alta resolución tienen valores de resolución de aproximadamente 1 Å, y las estructuras de menor

resolución tiene valores de 3 Å o superiores (Berman et al., 2000), los valores seleccionados en el análisis de los 2 cristales oscilaron entre 1.49 Å (3MR0) y 2.50 Å (4ZMU), siendo estos valores satisfactorios y aceptables. Además, los métodos predeterminados para la evaluación de estructuras generadas por SWISS-MODEL; GMQE y QMEANDisCo que combinan la estimación de la precisión de la estructura terciaria del modelo resultante, los potenciales estadísticos y términos de concordancia con una puntuación de restricciones de distancia (DisCo), cuyos valores ideales esperados oscilan entre 0.7 a 1. Con respecto a los valores de GMQE y QMEANDisCo de los dominios modelados que arroja la plataforma se obtuvieron los siguientes resultados GMQE de 0.81 y QMEANDisCo de 0.83 para el dominio GA, y GMQE de 0.68 y QMEANDisCo de 0.64 para los dominios PAS-PAC

Los PDBs generados por el modelado por homología fueron validados con la plataforma MolProbity tras la minimización de energía de la estructura, obteniendo los siguientes porcentajes en los parámetros de rotámeros favorecidos, Índice de Ramachandra favorecido y valores atípicos de Ramachandra. Para el dominio GAF, el porcentaje de rotámeros favorecidos fue de 95.69% (con un valor ideal >98%), un porcentaje de índice de Ramachandra favorecido 97.76% (con un valor ideal de >98%) y un porcentaje de valores atípicos de Ramachandra de 0.75% (con un valor ideal de < 0.05%), por otra parte para los dominios PAS-PAC, el porcentaje de rotámeros favorecidos fue de 88.54%, de índice de Ramachandra favorecido de 95.97%, y de valores atípicos de Ramachandra de 0.00%, todos los valores de los resultados de los modelos PDB están resumidos en la tabla 4. Por otra parte, de igual manera se muestran representaciones esquemáticas en 2D y 3D de la topología proteica de la estructura terciaria de los dominios modelados, asimismo la figura 3D de la sobreposición de estructuras por medio de alineamiento por pares de los 3 dominios proteicos con sus respectivos cristales homólogos (4ZMU y 3MR0) todas las visualizaciones 3D se hicieron con el software Chimera. La sobreposición denota la fiabilidad y distribución de estructuras con la que se realizó el modelado por homología de los dominios de detección de señales fisicoquímicas

y moléculas pequeñas comparándolas con sus plantillas moldes en una representación tridimensional figuras 23 y 24.

Dominios comparados	Cristal y resolución	Porcentajes identidad/cobertura	GMQE/QMEAN DisCo	Rotámeros favorecidos/índice de Ramachandra/valores atípicos (MolProbit)
GAF	4ZMU/2.50 Å	50.70%/95.00%	0.81/0.83	95.69%/97.76%/0.75%
PAS-PAC	3MR0/1.35 Å	31.65%/91.00%	0.68/0.64	88.54%/95.97%/0.00%

Tabla 4. Resumen de los valores evaluados tras la obtención de los modelados por homología con SWISS-MODEL de los dominios GAF y PAS-PAC. Se muestra los dominios comparados, el cristal utilizado con el valor de resolución, y el porcentaje de identidad y cobertura, los valores de referencia característicos de SWISS-MODEL GMQE y QMEANDisCo y los parámetros de validación evaluados por la plataforma MolProbit.

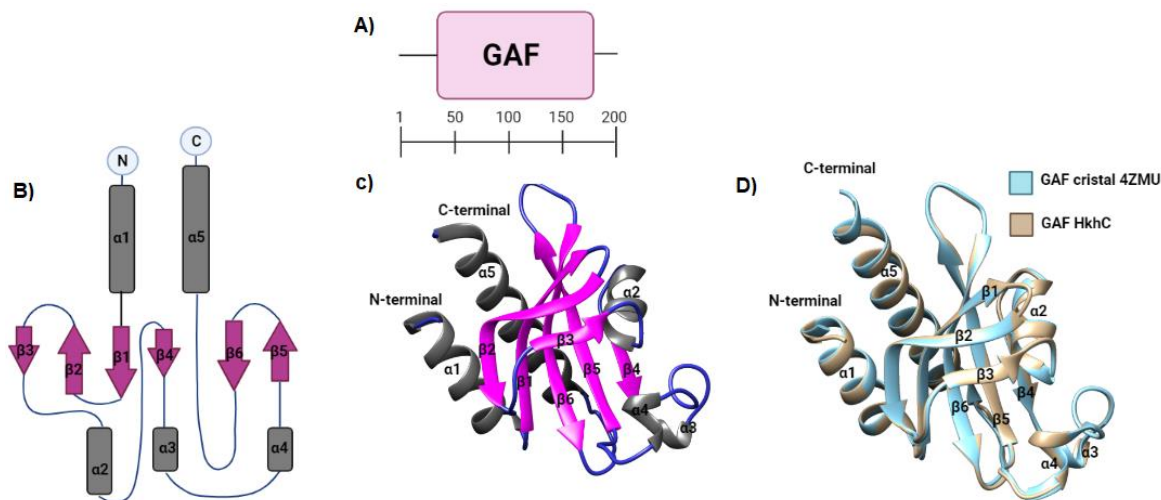


Figura 23. Representación esquemática de la topología del dominio GAF de la proteína HkhC.

A) Se muestra la representación del dominio GAF referido a su longitud. **B)** Esquematización de las estructuras secundarias que forman al dominio GAF, los círculos azul claro simbolizan las regiones amino-terminales (N) y carboxilo-terminal (C), las barras de color gris representan las 4 alfa hélices de la estructura y las flechas de color rosa representan las 5 láminas beta-plagadas. **C)** Esquematización tridimensional de la estructura terciaria del dominio GAF obtenida por medio del software Chimera, donde se representan las regiones amino y carboxilo terminal, las alfa hélices (gris) y láminas beta-plagadas (rosa) de la estructura. **D)** Representación tridimensional de la sobreposición de estructuras, en color azul se representa el dominio GAF del cristal 4ZMU y de color beige el dominio GAF de HkhC, generado con el software Chimera.

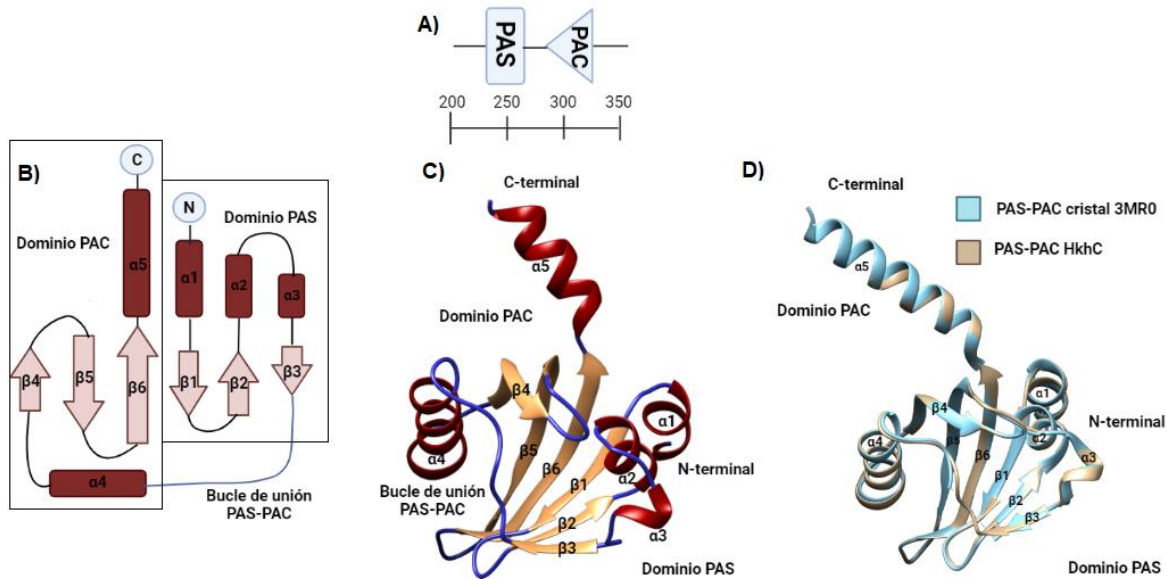


Figura 24. **Representación esquemática de los dominios PAS-PAC de HkhC.** **A)** Se muestra una caricatura del dominio PAS-PAC. **B)** Esquemática de las estructuras secundarias que forma parte de los dominios PAS-PAC ambos dominios unidos por un bucle, los círculos azul claro simbolizan las regiones amino-terminal (N) y carboxilo-terminal (C), las barras de color rojo representan las 4 alfa hélices de ambos dominios y las flechas de color melón representan las 6 láminas beta-plagadas, el esquema se encuentra dividido en dos regiones, la región del dominio PAS y la región del dominio PAC. **C)** Esquemática tridimensional de la estructura terciaria de los dominios PAS-PAC obtenida por medio del software Chimera, donde se representan las regiones amino y carboxilo terminal, la distribución de las alfa hélices (rojo) y láminas beta-plagadas (melón) de la estructura, y la división entre dominios. **D)** Representación tridimensional de la sobreposición de estructuras utilizando alineamiento por pares, en color azul se representa los dominios PAS-PAC del cristal 3MR0 y de color beige los dominios PAS-PAC de HkhC comparando la distribución de estructuras secundarias (alfa hélices y laminas beta-plegadas).

Podemos concluir que el modelado por homología se aproximó adecuadamente a la posible distribución y topología espacial de los dominios GAF y PAS-PAC, además de la correcta sobreposición de estructuras con los cristales 4ZMU perteneciente a una diguanilato ciclase en *Pseudomonas aeruginosa*, con dominio GAF que tiene la capacidad de inhibir la degradación de di-GMPc uniendo su loop protector al sitio de inhibición del dominio GG(D/E)EF (Chen et al., 2016a) y el cristal 3MR0 de una cinasa histidínica detectora en *Burkholderia thailandensis* sin reporte experimental.

9.6 Análisis *in silico* del modelado de los dominios característicos de cinasa histidínica de la proteína HkhC.

De la misma manera que en los dominios de detección de señales, se realizó un modelado por homología de los dominios de cinasa histidínica DHp y CA de HkhC con SWISS-MODEL utilizando los cristales 4MT8 y 4U7O, obteniendo los siguientes resultados del modelado y validación del PDB, la sobreposición y distribución de estructuras. Porcentajes 48.48% de identidad y 100% de cobertura del dominio DHp de HkhC comparado con el cristal 4MT8, 35.90% de identidad y 96% de cobertura del dominio CA comparado con el cristal 4U7O, por lo cual los porcentajes de identidad obtenidos fueron satisfactorios. los valores de resolución de los cristales seleccionados fueron los siguientes 1.90 Å para 4MT8 y 2.40 Å para 4U7O. Los valores de GMQE y QMEANDisCo arrojados en los modelos fueron los siguientes; GMQE de 0.75 y QMEANDisCo de 0.75 para el dominio DHp, y GMQE de 0.67 y QMEANDisCo de 0.65 para el dominio CA. Los resultados de la validación de los modelos después de minimizar la energía fueron los siguientes: para el dominio DHp, el porcentaje de rotámeros favorecidos fue de 92.45%, un porcentaje de índice de Ramachandra favorecido 96.77% y un porcentaje de valores atípicos de Ramachandra de 0.00%, con respecto al dominio CA, el porcentaje de rotámeros favorecidos fue de 97.03%, de índice de Ramachandran favorecido de 94.92%, y de valores atípicos de 0.00%, los valores de los dos modelos PDB están resumidos en la tabla 6.

Dominios comparados	Cristal y resolución	Porcentajes identidad/cobertura	GMQE/QMEAN DisCo	Rotámeros favorecidos/índice de Ramachandra/valores atípicos (MolProbit)
DHp	4MT8/1.90 Å	48.48%/100.00%	0.75/0.75	92.45%/96.77%/0.00%
CA	4U7O/2.40 Å	35.90%/96.00%	0.67/0.65	97.03%/94.92%/0.00%

Tabla 6. **Resumen de los valores evaluados tras la obtención de los modelados por homología con SWISS-MODEL de los dominios DHp y CA.** Se muestra los dominios comparados, el cristal utilizado con el valor de resolución, y el porcentaje de identidad y cobertura, los valores de referencia característicos de SWISS-MODEL GMQE y QMEANDisCo y los parámetros de validación evaluados por la plataforma MolProbit.

También, se muestran representaciones esquemáticas en 2D y 3D (con ayuda del software Chimera) de la topología proteica de los dominios, asimismo las figuras 3D denotan la sobreposición de estructuras por medio de alineamiento por pares de los 2 dominios con sus respectivos cristales, la visualización y alineamiento de los motivos conservados de la caja H del dominio DHp, y de las cajas N, D/G1, F, G2 y G3 del dominio CA, con Chimera y la plataforma WebLogo. Los resultados se describen a continuación, la sobreposición mostró la fiabilidad y la correcta distribución de estructuras comparándolas con sus plantillas moldes. Con respecto al análisis de cajas y motivos de HkhC, primero se hizo el análisis del dominio DHp, para ello se basó en la clasificación de las cinasas histidínicas conforme al tipo de motivo conservado en la caja H como se reporta en la literatura. Las cinasas histidínicas de tipo I, se caracterizan por tener el motivo conservado HEhRTPH dentro de la caja a diferencia de los otros tipos de cinasas, donde los motivos conservados de la caja H varían. Dentro de este motivo se encuentra el residuo de histidina (H) autofosforilable característico, además de tener los aminoácidos E, R, T, y P, la letra “h” del motivo significa residuos hidrófobos, en nuestro análisis comparativo de motivos hecho con las cinasas HkhC, HkhB de *A. baldaniorum*, ERS1 de *Arabidopsis thaliana* (nombre de la proteína del dominio cristalizado 4MT8 con el que se modeló DHp de HkhC), y BaeS de *E. coli* (proteína ya clasificada en la literatura como CH de tipo I), se observó que tanto la proteína HkhC como HkhB presentan el motivo HEhRTPH conservado dentro de la caja H, clasificándolas como CH de tipo I, además se hicieron los alineamientos y visualizaciones 3D de los motivos HEhRTPH con WebLogo y Chimera de manera individual (únicamente el dominio DHp de HkhC) y sobrepuesta (DHp de HkhC y DHp del cristal 4MT.8) figura 25.

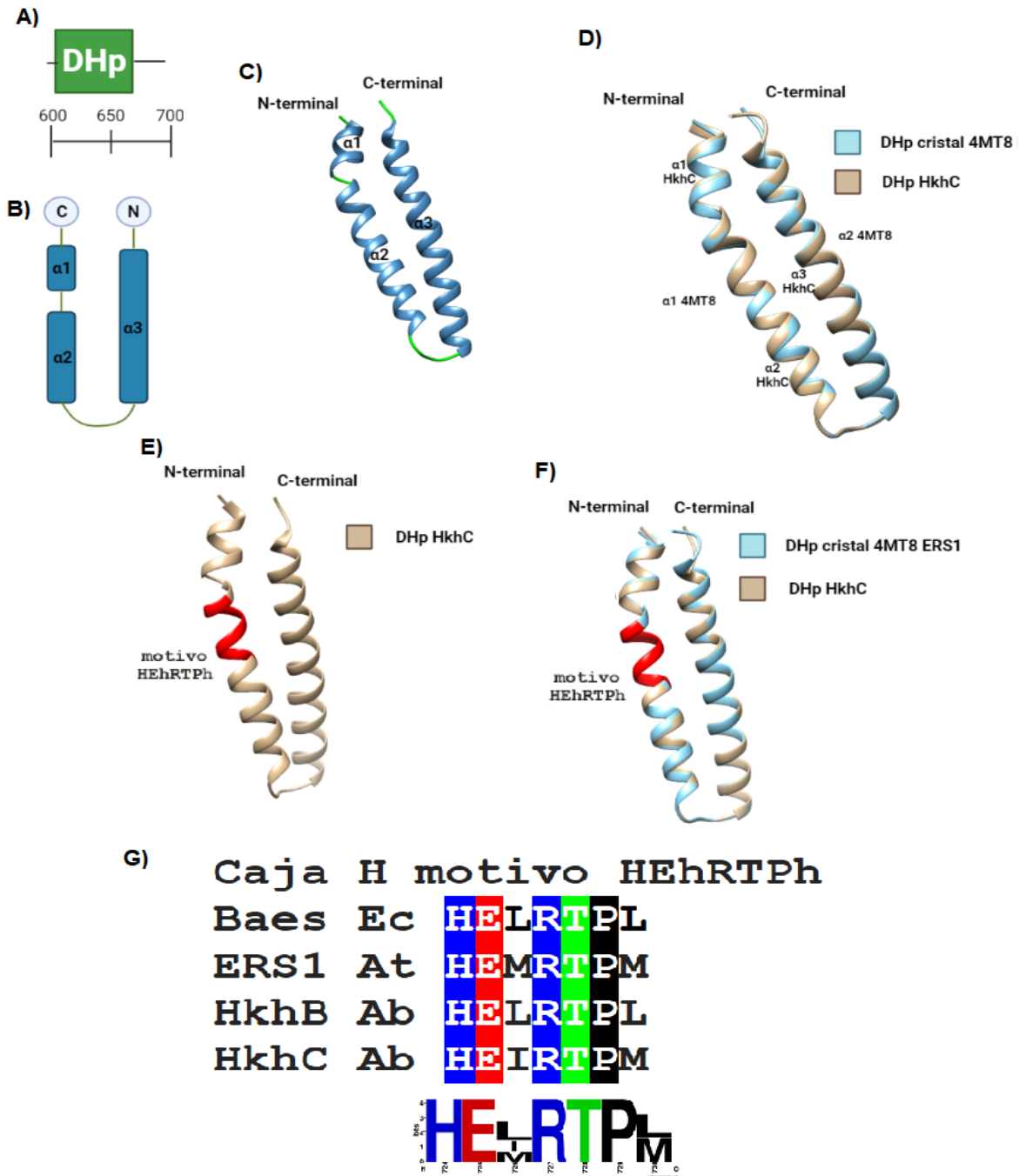
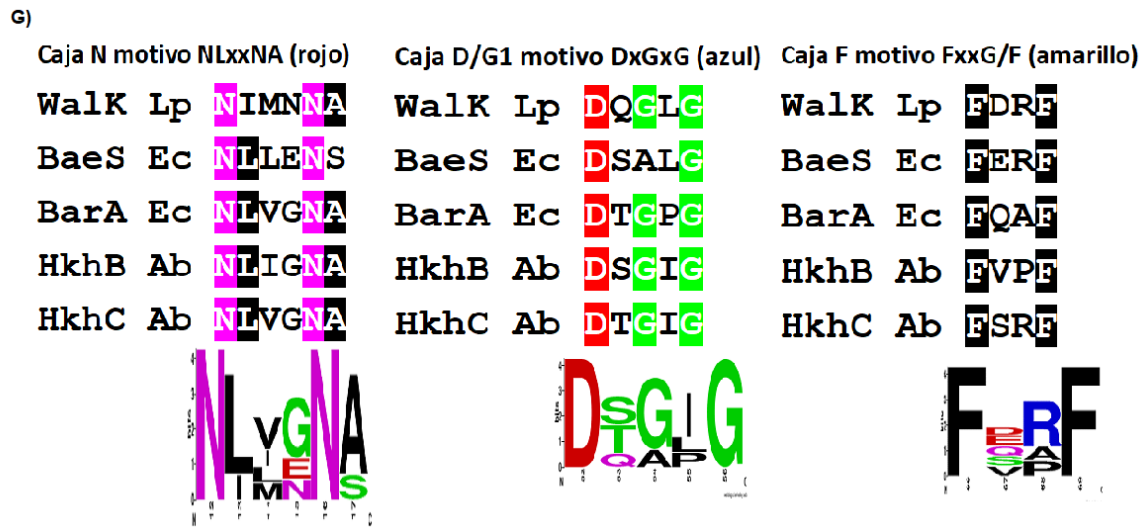
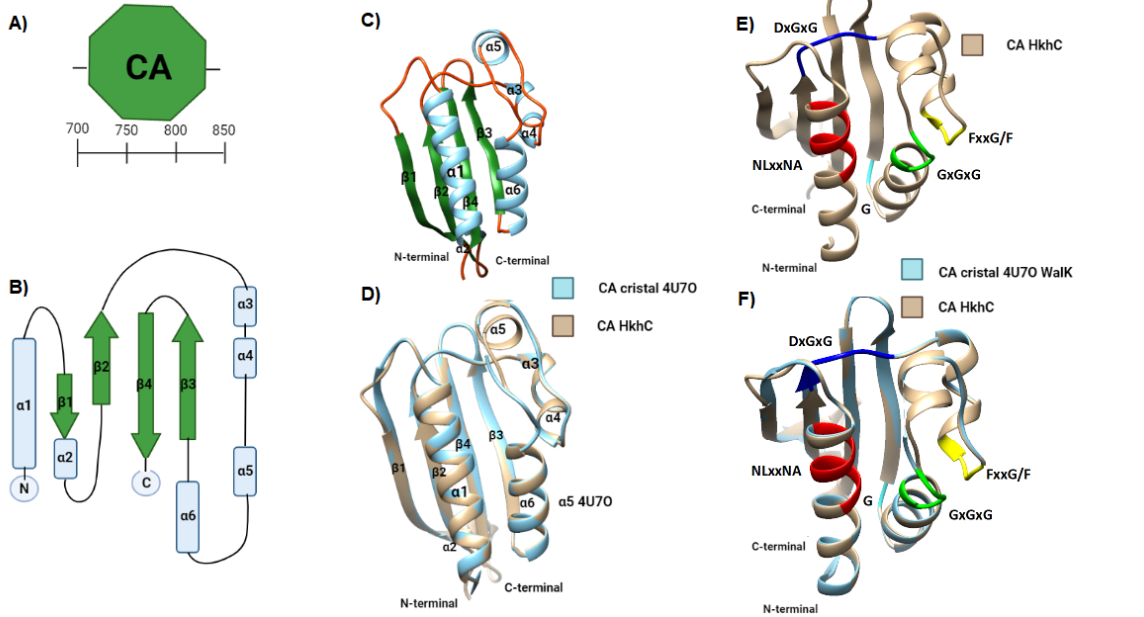


Figura 25. Representación esquemática en 2D y 3D de la topología proteica y análisis de motivos de la caja H del dominio de Dimerización y Fosfotransferencia de Histidina (DHp) de HkhC. **A)** Se muestra la representación de la longitud del dominio DHp. **B)** Esquemización bidimensional de la estructura terciaria del dominio DHp, se muestran las regiones amino-terminal y carboxilo-terminal, las barras de color azul marino representan las 3 alfa hélices de la estructura. **C)** Esquemización tridimensional de la estructura terciaria del dominio DHp obtenida por medio del software Chimera, representando las regiones amino y carboxilo terminal, la distribución de las 3 alfa hélices (azul marino). **D)** Representación tridimensional de la superposición de estructuras utilizando alineamiento por pares, en color azul se representa el dominio DHp del cristal 4MT8 con 2 alfa hélices

y de color beige el dominio DHp de HkhC con 3 alfa hélices comparando la distribución de estructuras secundarias. **E)** Localización del motivo HEhRTPH de la caja H en color rojo, ubicado en la $\alpha 2$ del dominio DHp de HkhC. **F)** Localización del motivo HEhRTPH en color rojo de la sobreposición de estructuras de los dominios DHp de HkhC y del cristal 4MT8. **G)** WebLogo de la caja H, comparando los motivos conservados HEhRTPH de las cinasas histidínicas HkhC y HkhB de *A. baldaniorum* (Ab), ERS1 cinasa histidínica del cristal 4MT8 de *A. thaliana* (At) y BaeS CH ya clasificada como de tipo I de *E. coli* (Ec).

Por otro lado, con respecto a los resultados obtenidos por medio del análisis de motivos de las cajas N (motivo NLxxNA), D/G1 (motivo DxGxG), F (motivo FxxG/F), G2 (motivo GxGxG) y G3 (motivo G) de las proteínas HkhC, HkhB de *A. baldaniorum*, Walk de *L. plantarum* (nombre de la proteína del dominio cristalizado 4U7O con el que se modeló CA de HkhC), BarA (proteína donde ya está caracterizado el motivo de unión a ATP) y BaeS (proteína ya clasificada en la literatura como CH de tipo I) ambas de *E. coli* con WebLogo y la visualización del modelado del dominio CA y la sobreposición de estructuras con el cristal generados con Chimera. En los resultados se observó la conservación de los motivos de todas las cajas N, D/G1, F, G2 y G3, y su ubicación tridimensional en el dominio CA de manera individual y sobrepuesta con el cristal 4U7O, además de la correcta distribución y fiabilidad de la sobreposición de estructuras visualizadas con Chimera (Figura 26).



Caja G2 motivo GxGxG (verde)

Walk Lp GTGLG
BaeS Ec GSGLG
BarA Ec GTGLG
HkhB Ab GTGLG
HkhC Ab GTGLG



Caja G3 motivo G (cian)

Walk Lp GER
BaeS Ec HGR
BarA Ec GGD
HkhB Ab HGS
HkhC Ab QER

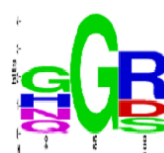


Figura 26. **Representación esquemática en 2D y 3D de la topología proteica y análisis de motivos de la caja H del dominio de Unión a ATP (CA) de HkhC.** **A)** Se muestra la representación de la longitud del dominio CA. **B)** Esquematación bidimensional de la estructura terciaria de CA, se muestran las regiones amino-terminal y carboxilo-terminal, las barras de color azul claro representan las 6 alfa hélices de la estructura y las flechas color verde bosque representan las 4 láminas beta-plegadas. **C)** Esquematación tridimensional de la estructura terciaria del dominio CA obtenida por Chimera, representando las regiones amino y carboxilo terminal, la distribución de las 6 alfa hélices y 4 beta plegadas. **D)** Representación tridimensional de la sobreposición de estructuras utilizando alineamiento por pares, en color azul se representa el dominio CA del cristal 4U7O con 5 alfa hélices y 4 beta-plegadas, de color beige el dominio CA de HkhC con 6 alfa hélices y 4 beta-plegadas comparando estructuras secundarias. **E)** Localización de los motivos conservados de las cajas N motivo NLxxNA color rojo, D/G1 motivo DxGxG color azul, F motivo FxxG/F color amarillo, G2 motivo GxGxG color verde y G3 residuo G color cian del dominio CA de HkhC. **F)** Localización de los motivos de las cajas N, D/G1, F, G2 y G3 en la sobreposición de estructuras de los dominios CA de HkhC y del cristal 4U7O. **G)** WebLogo de cada una de las cajas, comparando los motivos conservados de las cinasas histidínicas HkhC y HkhB de *A. baldaniorum* (Ab), Walk cinasa histidínica del cristal 4U7O de *L. plantarum* (Lp), BarA con el sitio de unión característico a ATP y BaeS ya clasificada como de tipo I, ambas CH de *E. coli* (Ec).

9.7 Análisis del sitio de unión a ATP y de acoplamiento molecular del dominio CA de HkhC.

Previamente al análisis de acoplamiento molecular del dominio CA con ATP, se realizó un alineamiento múltiple de secuencias de las proteínas HkhC, HkhB, Walk, BaeS y BarA donde ya está reportado el motivo de unión a ATP, este análisis se realizó con ayuda de la plataforma Conserved Domain Search del NCBI obteniendo los siguientes resultados: HkhC y HkhB tienen el sitio de unión de ATP conservado de manera similar a la CH BarA de *E.coli*, además del sitio de unión a Mg^{+2} indispensable para la unión del ATP (Figura 27). Con base en los resultados se concluye que HkhC presenta los residuos conservados para la unión a ATP, de igual manera Walk cuyo dominio CA cristalizado es 4U7O se usó de plantilla para el modelado por homología del dominio CA de HkhC, esta proteína es una cinasa histidínica activa unida con ATP (Cai et al., 2017) que efectivamente con los resultados arrojados en el alinamiento múltiple también presenta el sitio de unión a ATP y Mg^{+2} conservado, por lo cual con el modelo PDB generado con el cristal 4U7O se realizó el análisis de acoplamiento molecular proteína-ligando entre CA y ATP.

la gráfica el valor negativo más grande y con mayor número de posiciones (Figura 28 C). Estos mismos resultados fueron analizados por medio de los softwares LigPlot, PyMol y Chimera para dar más fiabilidad a los residuos que posiblemente estén interaccionando con el ligando. Los resultados arrojados por el software LigPlot mostraron 18 residuos, de los cuales 11 son compartidos por ambos programas (Autodock tools y LigPlot) letra color rojo, 7 fueron hallados exclusivamente por LigPlot (letras color negro) y 5 residuos que no fueron detectados por LigPlot pero si por Autodock tools (residuos nos mostrados) figura 29. Finalmente, los resultados del acoplamiento fueron simulados en el software PyMol y Chimera para una mejor visualización figura 30.

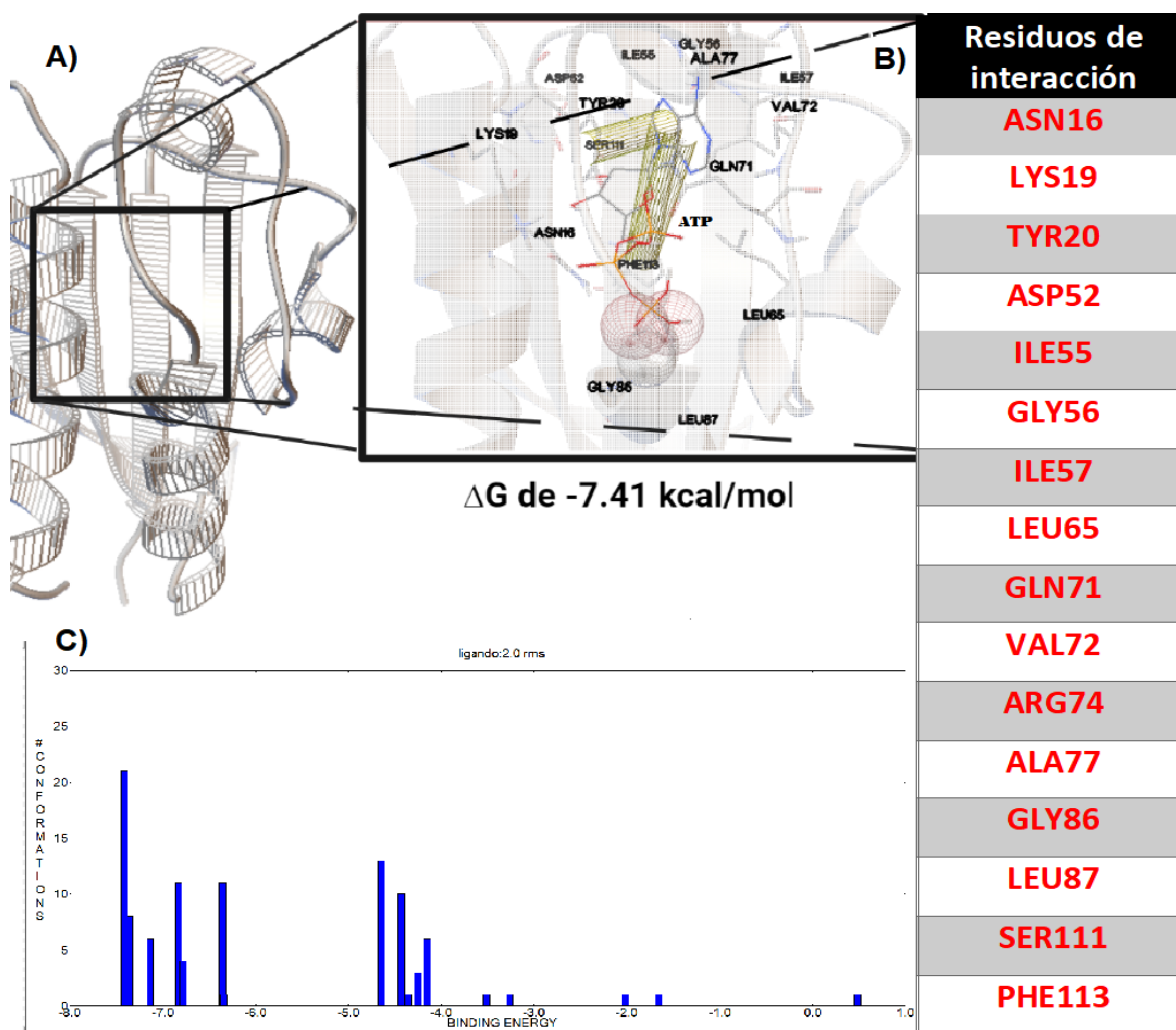


Figura 28. **Resultados del acoplamiento molecular entre el dominio CA de la proteína HkhC y el ligando ATP hecho con los softwares Autodock Tools y Autodock Vina.** **A)** Visualización de la Interacción entre el dominio CA y el ligando ATP mostrando interacciones proteína-ligando como puentes de hidrogeno en esferas y pi-pi en cilindros. **B)** Tabla del listado de los 16 residuos aminoacídicos que interaccionan de manera directa con el ATP. **C)** Gráfica de barras donde se muestran las distribuciones de las energías libres de Gibbs obtenidas de las 100 conformaciones predichas en el acoplamiento molecular.

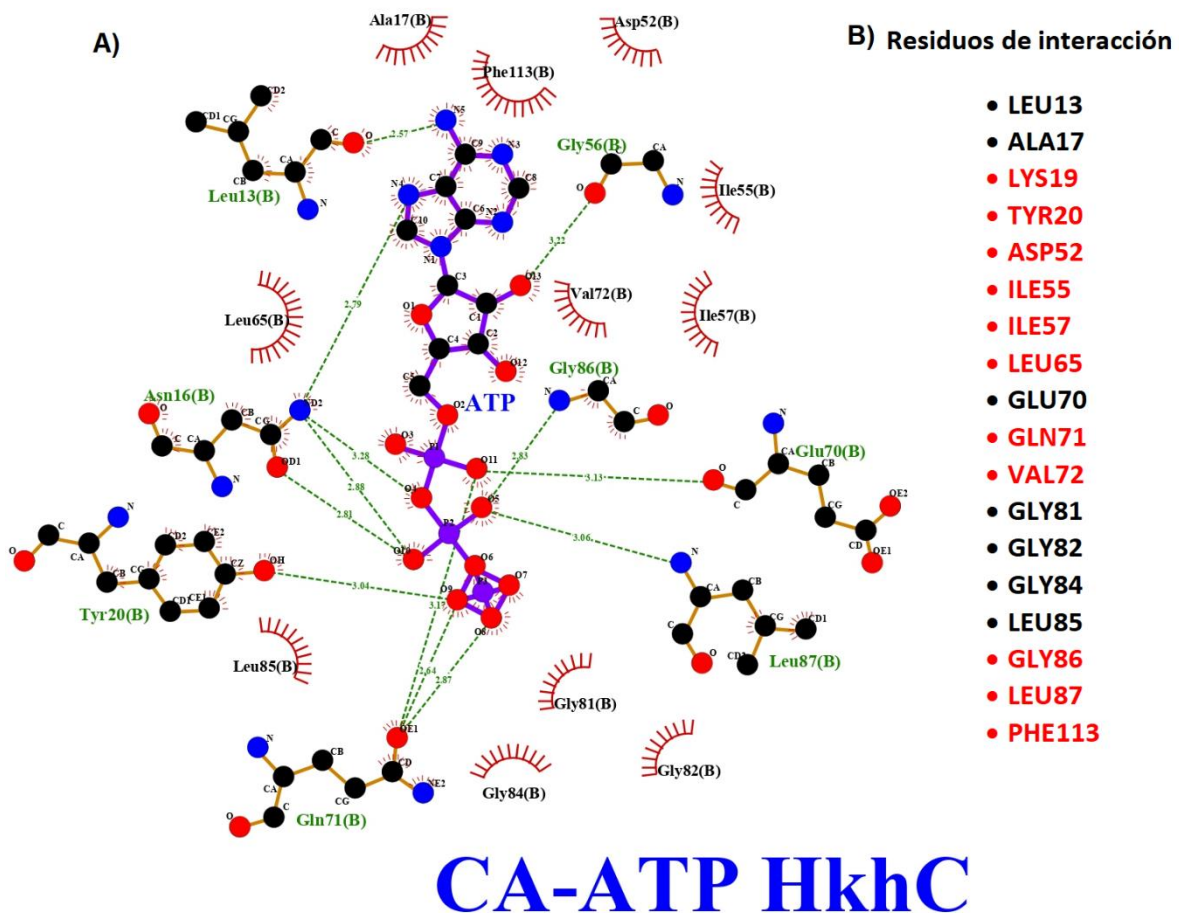


Figura 29. **Residuos de interacción del acoplamiento molecular entre el dominio CA de la proteína HkhC y el ligando ATP hecho por medio del software LigPlot.** **A)** Visualización de las Interacciones entre los residuos aminoacídicos y el ligando ATP, mostrando interacciones hidrofóbicas en 11 residuos marcados con símbolos radiales rojos y letra negra, 7 residuos (letra color verde) que forman 13 puentes de hidrógenos (líneas punteadas color verde), cuyos valores ideales de distancia son ≤ 3.00 Å. **B)** Tabla del listado de 18 residuos aminoacídicos que interaccionan directamente con el ATP, en letra color rojo se muestran los residuos hallados tanto en Autodocktools como en LigPlot y en color negro los residuos hallados únicamente en LigPlot, y que no se fueron detectados por el programa autodock tools.

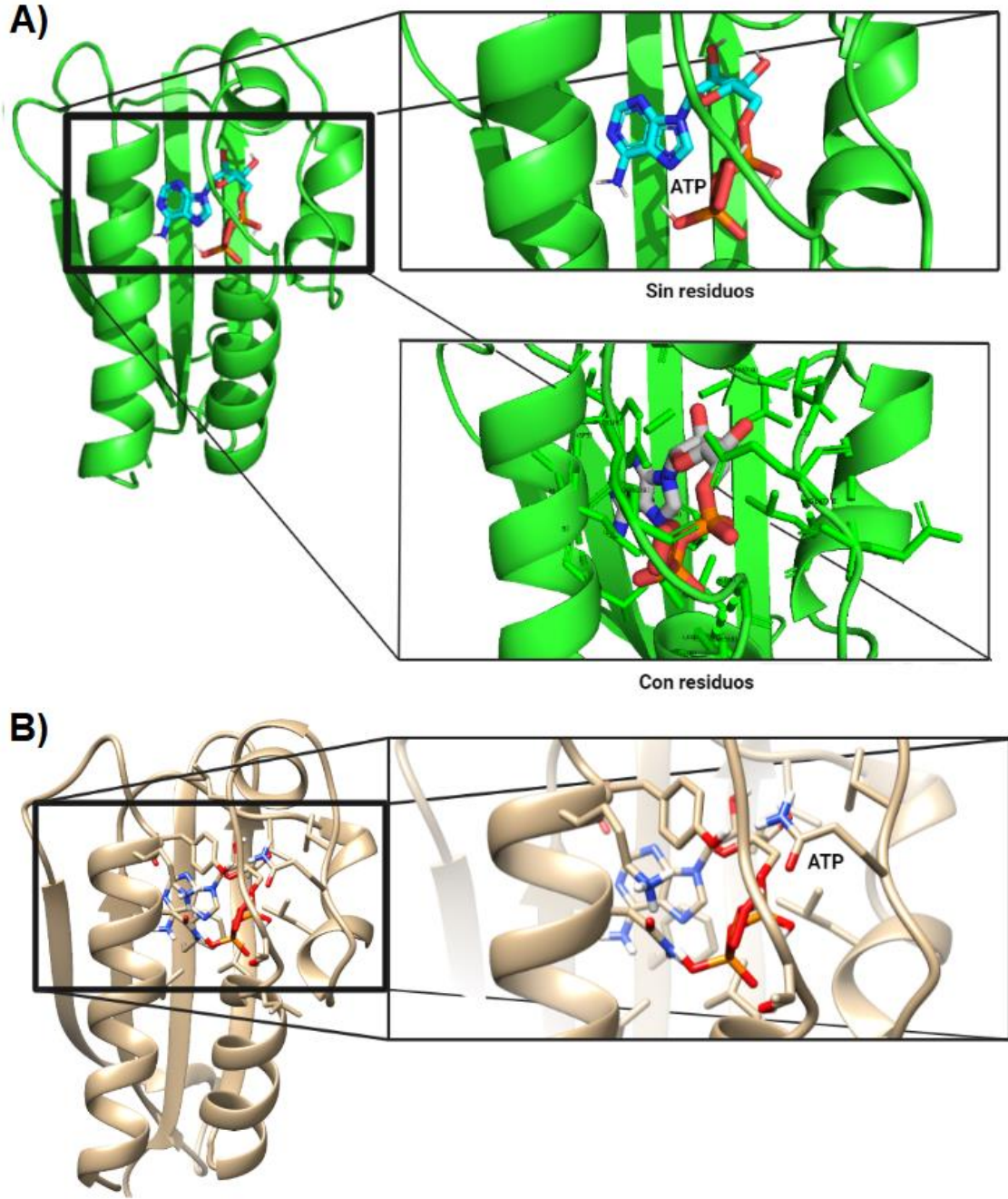


Figura 30. **Interacción del acoplamiento molecular entre el dominio CA y ATP visualizado mediante los softwares PyMOL y Chimera.** Visualización de las Interacciones entre los 18 residuos aminoacídicos y el ligando ATP. **A)** Visualización del acoplamiento CA-ATP con PyMol donde se observan dos perspectivas, una sin residuos solo mostrando el ligando y el dominio (arriba), y la otra mostrando los residuos que interaccionan con el dominio (abajo). **B)** Visualización del acoplamiento CA-ATP con Chimera mostrando los residuos que interaccionan con el dominio.

Por último, en la comparación del análisis del sitio de unión a ATP mostrado previamente en el alineamiento múltiple de secuencias (figura 27) y los resultados obtenidos de los residuos predichos por los programas Autodock tools y LigPlot del acoplamiento molecular en los cuales solo los residuos Asn12, Gly54, Val103, Ser105 y Gly110 no fueron predichos por el acoplamiento pero si se encuentran conservados en el sitio de unión a ATP hallado con la plataforma CDD, los otros 11 residuos coincidieron perfectamente con los resultados de nuestro acoplamiento molecular (figura 31).

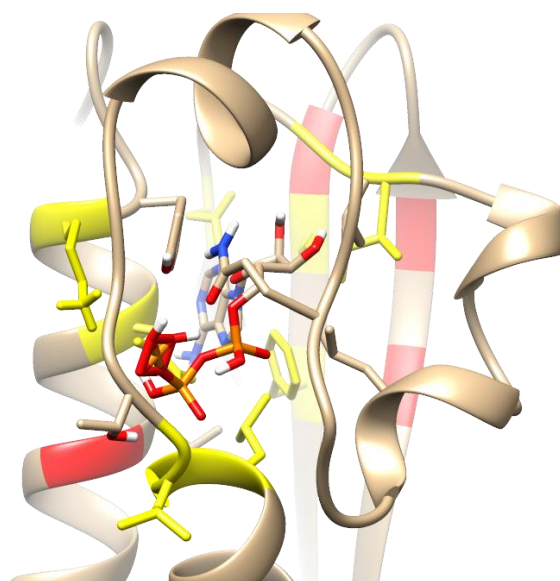


Figura 31. **Comparación de los residuos de unión a ATP en el dominio CA visualizado mediante el software Chimera.** Se hizo una comparación de los residuos de unión a ATP ya reportados hallados en el alineamiento múltiple de secuencias y los residuos predichos por los softwares Audock tools y LigPlot del acoplamiento molecular. La imagen muestra al dominio CA de HkhC unido al ATP, de color amarillo se muestran los residuos aminoacídicos que predicho por el análisis de acoplamiento molecular y que coincidieron con el análisis del sitio de unión a ATP hecho en la figura tal, de color rojo se muestran los residuos que no predijo el acoplamiento molecular pero que pertenecen al sitio de unión a ATP y de color beige los residuos que predijo el acoplamiento molecular pero no estaban en el análisis del alineamiento múltiple del sitio de unión a ATP.

9.8 Análisis *in silico* del modelado de los dominios receptores de la proteína HkhC.

En el análisis de la proteína HkhC se halló que posee dos dominios REC, a diferencia de los análisis preliminares con la plataforma SMART que predecía un solo dominio REC, con tales datos se realizó el modelado por homología de ambos dominios (REC1 y REC2) con SWISS-MODEL utilizando los cristales 6QRJ y 7C1J,

obteniendo los siguientes resultados. Porcentajes 54.44% de identidad y 100% de cobertura del dominio REC1 de HkhC comparado con el cristal 6QRJ, 47.27% de identidad y 95% de cobertura del dominio REC2 comparado con el cristal 7C1J, los porcentajes de identidad obtenidos fueron satisfactorios. los valores de resolución de los cristales seleccionados fueron los siguientes 2.65 Å para 6QRJ y 1.35 Å para 7C1J. Los valores de GMQE y QMEANDisCo arrojados por los modelos fueron los siguientes; GMQE de 0.73 y QMEANDisCo de 0.79 para REC1, y GMQE de 0.76 y QMEANDisCo de 0.74 para REC2. Los resultados de la validación de los modelos después de minimizar la energía de la estructura proteica fueron los siguientes. Para el dominio REC1, el porcentaje de rotámeros favorecidos fue de 94.37%, un porcentaje de índice de Ramachandran favorecido 98.84% y un porcentaje de valores atípicos de Ramachandran de 0.00%, con respecto al dominio REC2, el porcentaje de rotámeros favorecidos fue de 96.77%, de índice de Ramachandran favorecido de 95.54%, y de valores atípicos de 0.89%, los valores de los dos modelos PDB están resumidos en la tabla 7.

Dominios comparados	Cristal y resolución	Porcentajes identidad/cobertura	GMQE/QMEAN DisCo	Rotámeros favorecidos/índice de Ramachandra/valores atípicos (MolProbity)
REC1	6QRJ/2.65 Å	54.44%/100.00%	0.73/0.79	94.37%/98.84%/0.00%
REC2	7C1J/1.35 Å	47.27%/95.00%	0.76/0.74	96.77%/95.54%/0.89%

Tabla 7. Resumen de los valores evaluados tras la obtención de los modelados por homología con SWISS-MODEL de los dominios REC1 y REC2. Se muestra los dominios comparados, el cristal utilizado con el valor de resolución, y el porcentaje de identidad y cobertura, los valores de referencia característicos de SWISS-MODEL GMQE y QMEANDisCo y los parámetros de validación evaluados por la plataforma MolProbity.

También, se muestran representaciones esquemáticas en 2D y 3D de la topología y la sobreposición de estructuras por medio de alineamiento por pares de los 2 dominios con sus respectivos cristales, la visualización y alineamiento de los sitios de unión a metal y el residuo de aspartato fosforilable de ambos dominios, con Chimera y WebLogo. Los resultados se describen a continuación se hizo el análisis de ambos dominios REC, buscando el residuo de aspartato receptor del grupo fosfato conservado y el sitio de unión a metal. Los resultados del análisis comparativo del dominio REC1 fue hecho con las proteínas HkhC, HkhB de *A. baldaniorum*, ShkA de *Caulobacter vibrioides* (Del cristal 6QRJ), y RCSC de *E. coli* (proteína de referencia con el residuo de aspartato y sitio de unión a metal conservados), se observó que tanto la proteína HkhC como HkhB el sitio de unión y el residuo de aspartato se encuentran conservados. Con respecto al dominio REC2 las proteínas empleadas fueron las siguientes HkhC, HkhB de *A. baldaniorum*, PA1611 de *P. aeruginosa* (cristal 7C1J), y RCSC de *Escherichia coli* donde ya se han descrito esos residuos. HkhC y HkhB presentan el sitio de unión y el residuo de aspartato conservados, además se hicieron los alineamientos y visualizaciones 3D con WebLogo y Chimera de manera individual y sobrepuesta con los cristales en ambos dominios REC1 (figura 32) y REC2 (figura 33)

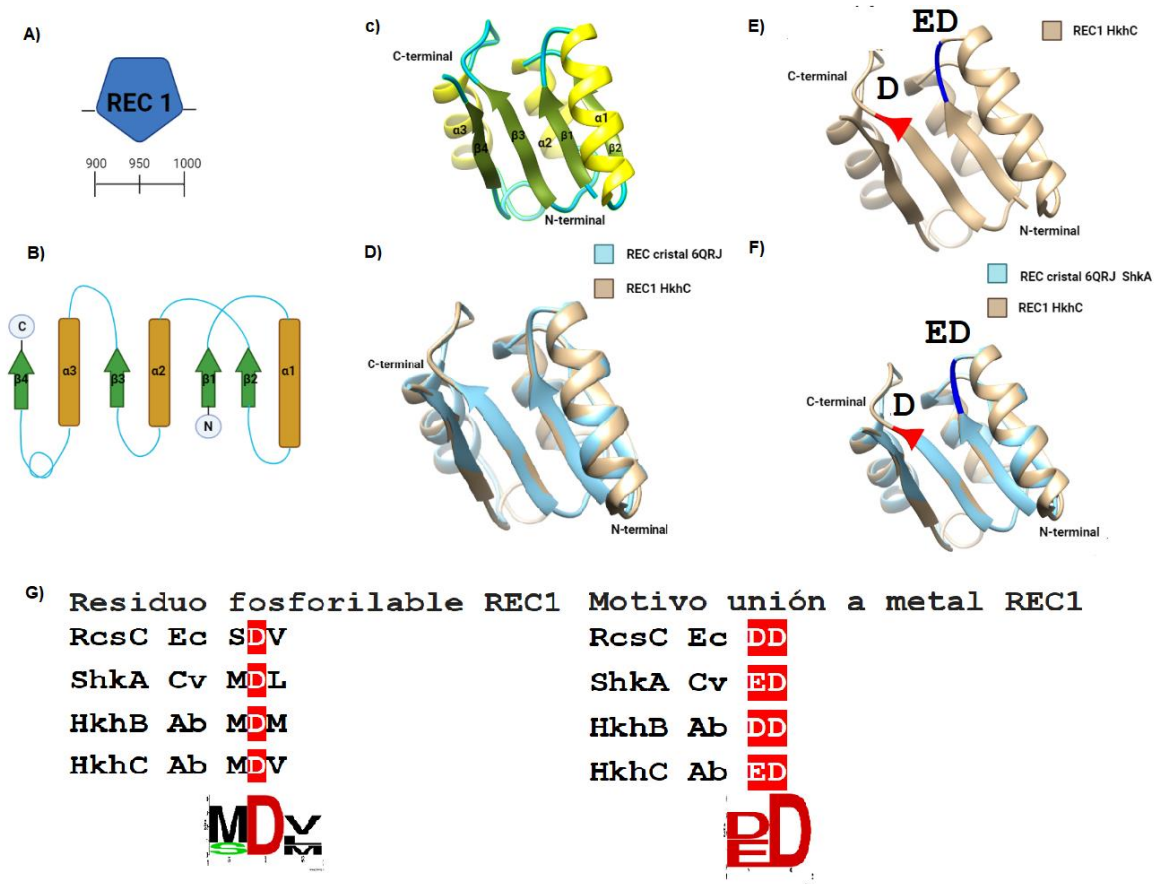


Figura 32. Representación esquemática en 2D y 3D de la topología proteica y análisis del sitio de unión a metal y el aspartato fosforilable del dominio receptor 1 (REC1) de HkhC. **A)** Se muestra la representación de la longitud del dominio REC1. **B)** Esquematización bidimensional de la estructura terciaria de REC1, se muestran las regiones amino-terminal y carboxilo-terminal, las barras de color dorado representan las 3 alfa hélices de la estructura y las flechas color verde bosque representan las 4 láminas beta-plegadas. **C)** Esquematización tridimensional de la estructura terciaria del dominio REC1 obtenida por Chimera, representando las regiones amino y carboxilo terminal, la distribución de las 3 alfa hélices y 4 beta plegadas. **D)** Representación tridimensional de la sobreposición de estructuras utilizando alineamiento por pares, en color azul se representa el dominio REC1 del cristal 6QRJ y de color beige el dominio REC1 de HkhC ambos con 3 alfa hélices y 4 beta-plegadas comparando estructuras secundarias. **E)** Localización del residuo de aspartato (D) fosforilable (color rojo) y sitio de unión a metal (color azul marino). **F)** Localización del residuo de aspartato (D) fosforilable (color rojo) y sitio de unión a metal (color azul marino) en la sobreposición de estructuras de los dominios REC1 de HkhC y del cristal 6QRJ de ShkA. **G)** WebLogo del residuo de aspartato (D) fosforilable y el sitio de unión a metal de las cinasas histidínicas HkhC y HkhB de *A. baldaniorum* (Ab), ShkA cinasa histidínica del cristal 6QRJ de *C. vibrioides* (Cv), RSCS de *E. coli* (Ec) como proteína de referencia donde ya se han identificado estos residuos.

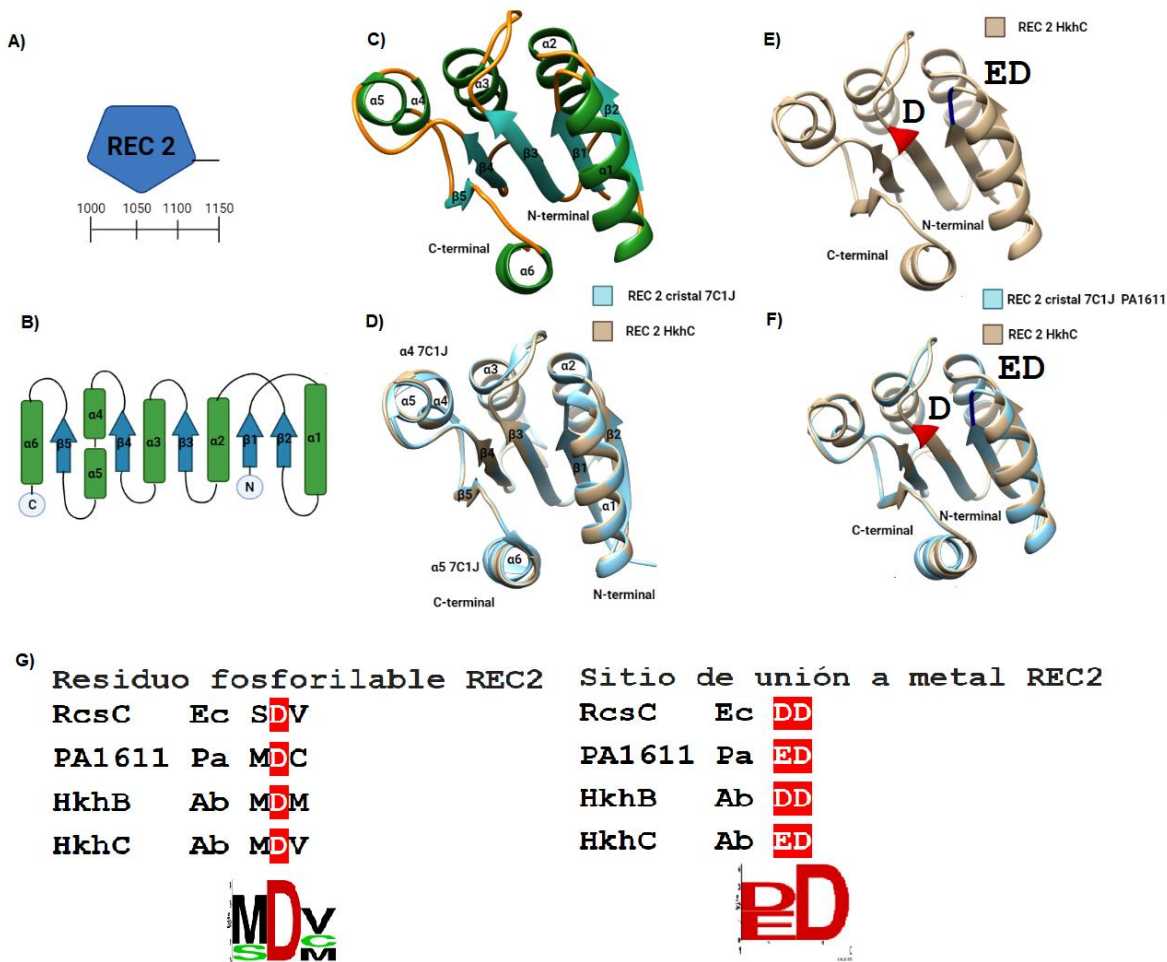


Figura 33. Representación esquemática en 2D y 3D de la topología proteica y análisis del sitio de unión a metal y el aspartato fosforilable del dominio receptor 2 (REC2) de HkhC. **A)** Se muestra la representación de la longitud del dominio REC2. **B)** Esquematización bidimensional de la estructura terciaria de REC2, se muestran las regiones amino-terminal y carboxilo-terminal, las barras de color verde bosque representan las 6 alfa hélices de la estructura y las flechas color azul representan las 5 láminas beta-plegadas. **C)** Esquematización tridimensional de la estructura terciaria del dominio REC2 obtenida por Chimera, representando las regiones amino y carboxilo terminal, la distribución de las 6 alfa hélices y 5 beta plegadas. **D)** Representación tridimensional de la sobreposición de estructuras utilizando alineamiento por pares, en color azul se representa el dominio REC2 del cristal 7C1J con 5 alfa hélices y 5 beta-plegadas y de color beige el dominio REC2 de HkhC con 6 alfa hélices y 5 beta-plegadas comparando estructuras secundarias. **E)** Localización del residuo de aspartato (D) fosforilable (color rojo) y el sitio de unión a metal (color azul marino). **F)** Localización del residuo de aspartato (D) fosforilable (color rojo) y sitio de unión a metal (color azul marino) en la sobreposición de estructuras de los dominios REC1 de HkhC y del cristal 6QRJ de ShkA. **G)** WebLogo del residuo de aspartato (D) fosforilable y sitio de unión a metal de las cinasas histidínicas HkhC y HkhB de *A. baldaniorum* (Ab), PA1611 cinasa histidínica del cristal 7C1J de *P. aeruginosa* (Pa), RSCS de *E. coli* (Ec) como proteína de referencia donde ya se han identificado estos residuos.

10. RESULTADOS DEL ANÁLISIS EXPERIMENTAL

Generación de mutantes por eliminación del gen *hkhC*

10.1 Diseño de iniciadores

De manera inicial, para la generación de la mutante se diseñaron dos pares de oligonucleótidos en la plataforma Primer3Plus que corresponden a la amplificación de un fragmento denominado A y otro denominado B que flanquean al gen *hkhC* (Figura 34). Estos fueron analizados con la plataforma OligoAnalyzer-IDT, quedando de la siguiente manera: un rango de longitud de 26 a 30 pares de bases adicionados con los sitios de restricción *SacI*, *StuI*, *SnaBI* y *KpnI*, un rango de porcentaje de GC de 53.6 a 57.7, un rango de temperatura de fusión (T_m) de 62.3 a 65.3, con presencia mínima de 2 hairpins y una máxima de 7, y un rango de valor ΔG negativo de autodímeros y heterodímeros de -3.61 a -7.81.

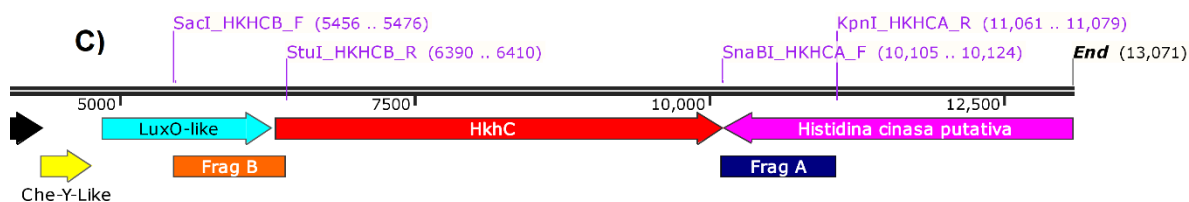


Figura 34. Representación en el fondo genético de la cepa *A. baldaniorum* Sp245 de los oligos diseñados para la amplificación de los fragmentos A y B. Para el fragmento A se emplearon los oligonucleótidos: *SnaBI*_HKHCA_F y *KpnI*_HKHCA_y para la amplificación del fragmento B se emplearon los oligonucleótidos: *SacI*_HKHCB_F y *StuI*_HKHCB_R

10.2 Amplificación de la región intergénica 16S de la especie *baldaniorum* en las cepas *A. baldaniorum* Sp245 y *A. baldaniorum* C5.56 ($\Delta hkhB$)

Para verificar la pertenencia de las cepas *A. baldaniorum* Sp245 y la mutante *A. baldaniorum* C5.56 (mutante $\Delta hkhB$), con las cuales se realizaron los trabajos experimentales de este proyecto, se llevó a cabo una amplificación de las regiones intergénicas del gen 16S como se muestra en la figura 35.

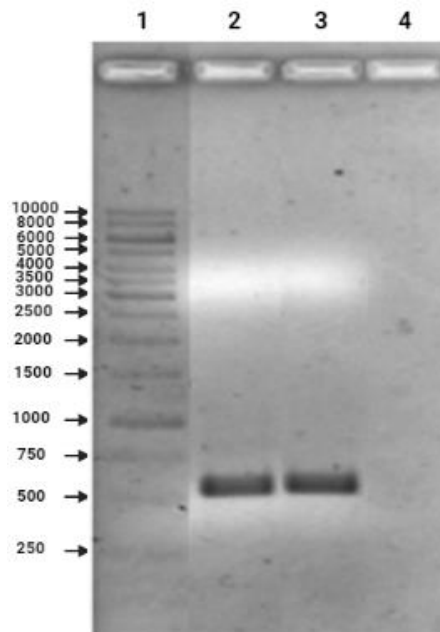


Figura 35. **Electroforetograma de amplificaciones por medio de PCR de las regiones intergénicas del gen 16S de la cepa silvestre y la mutante C5.56.** Carriles: 1) MPM, 2) región intergénica 16S cepa mutante (*A. baldaniorum* $\Delta hkhB$), 3) región intergénica 16S cepa silvestre, 4) control negativo.

10.3 Amplificación de los fragmentos A y B flanqueantes al gen *hkhC*

Se obtuvieron los productos de amplificación por PCR de los fragmentos flanqueantes A y B, utilizando como templado el ADN genómico de la cepa *A. baldaniorum* Sp245. Para la amplificación del fragmento A se emplearon los oligonucleótidos *Sna*BI_HKHCA_F y *Kpn*I_HKHCA_R obteniendo un amplificado de 991pb. Por otra parte, para la amplificación del fragmento B se emplearon *Sac*I_HKHCB_F y *Stu*I_HKHCB_R obteniendo un amplificado de 973pb, ambos productos de PCR se muestran en la figura 36.

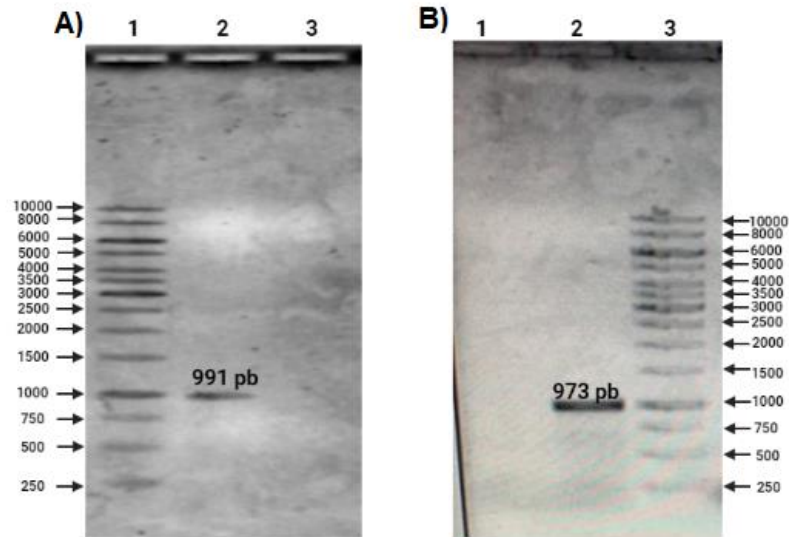


Figura 36. **Electroforetogramas de la amplificación de los fragmentos A y B.** **A)** Amplificación por PCR del fragmento A. Carriles: 1) MPM (Marcador de Peso Molecular), 2) Fragmento A, 3) Control negativo. **B)** amplificación por PCR del fragmento B. Carriles: 1) Control negativo, 2) Fragmento B, 3) MPM.

10.4 Construcción de plásmidos

10.4.1 Construcción del plásmido de mantenimiento pGEM-HKHCA

El fragmento A se clonó en el vector de mantenimiento pGEM T-Easy como se detalló en la sección de material y métodos. La clonación se confirmó por medio de ensayos enzimáticos de restricción y PCR, los cuales coincidieron correctamente con los resultados esperados, como se observa en la figura 37.

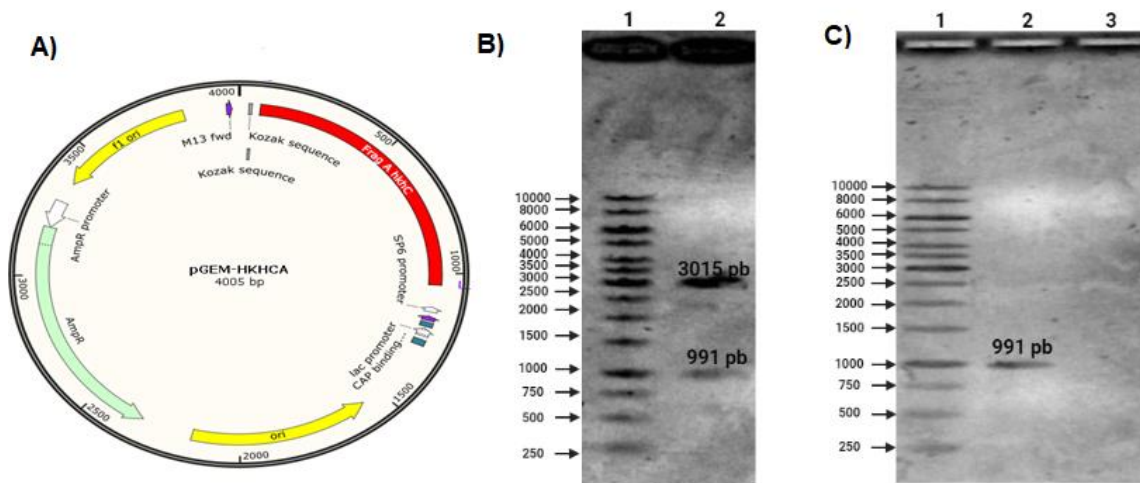


Figura 37. **Representación gráfica y esquemática de la clonación del fragmento A en el vector de mantenimiento pGEM-T-Easy.** **A)** Mapa vectorial pGEM-HKHCA obtenido por el software SnapGene. **B)** Electroforetograma de la confirmación de la construcción del plásmido pGEM-HKHCA mediante ensayo de restricción de doble digestión con las enzimas *KpnI* y *SnaBI*. Carriles: 1) MPM, 2) vector (pGEM) + inserto (fragmento A). **C)** Electroforetograma de la confirmación de la construcción del plásmido pGEM-HKHCA mediante PCR con un producto de amplificación de 991 pb. Carriles: 1) MPM, 2) fragmento A, control positivo.

10.4.2 Construcción del plásmido de mantenimiento pBSK-HKHCB

El fragmento B se clonó en el vector de mantenimiento pBSK como se detalló en la sección de material y métodos. La clonación se confirmó por medio de ensayos enzimáticos de restricción y PCR, los cuales coincidieron correctamente con los resultados esperados, como se observa en la figura 38.

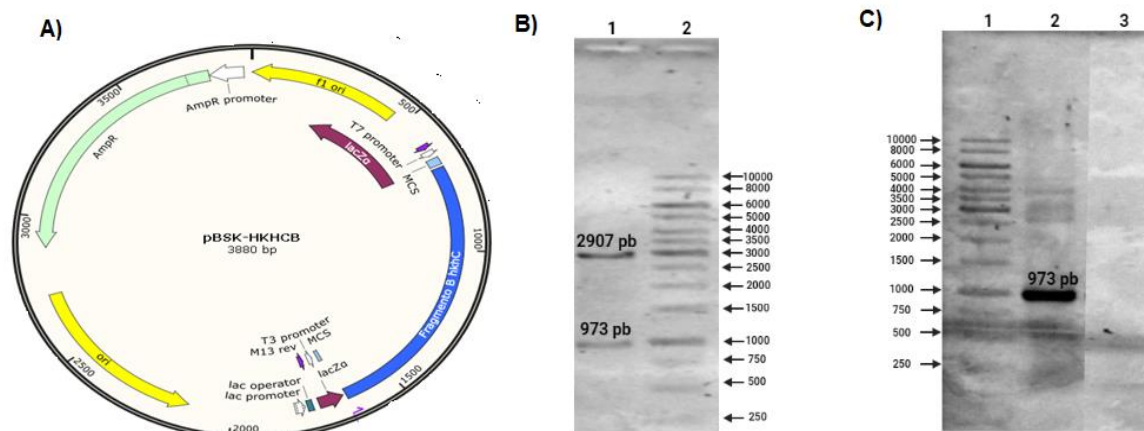


Figura 38. **Representación gráfica y esquemática de la clonación del fragmento B en el vector de mantenimiento pBSK.** **A)** Mapa vectorial pBSK-HKHCB obtenido por el software SnapGene. **B)** Electroforetograma de la confirmación de la construcción del plásmido pBSK-HKHCB mediante ensayo de restricción de doble digestión con las enzimas *SacI* y *StuI*. Carriles: 1) vector (pBSK) + inserto (fragmento B), 2) MPM. **C)** Electroforetograma de la confirmación de la construcción del plásmido pBSK-HKHCB mediante PCR con un producto de amplificación de 973pb. Carriles: 1) MPM, 2) fragmento B y 3) Control negativo.

10.4.3 Construcción del plásmido suicida pJMS-HKHCB.

Ambos fragmentos A y B se subclonaron en el vector suicida pJMS-Km para producir la construcción final pJMS-HKHCB, la cual fue confirmada por ensayos de restricción enzimática, liberando un fragmento de ADN de 7,865 pb correspondiente al vector y un inserto de 3,432 pb que corresponde a los fragmentos A, B, y al ORF del gen *kanR* como se observa en la figura 39. Además, de la amplificación de ambos fragmentos por separado utilizando como templado ADN de la construcción final, los resultados de la amplificación coincidieron correctamente con los controles positivos, un amplificado de 991 pb para el fragmento A, y uno de 973 pb para el fragmento B, estos resultados se pueden visualizar en la imagen tal.

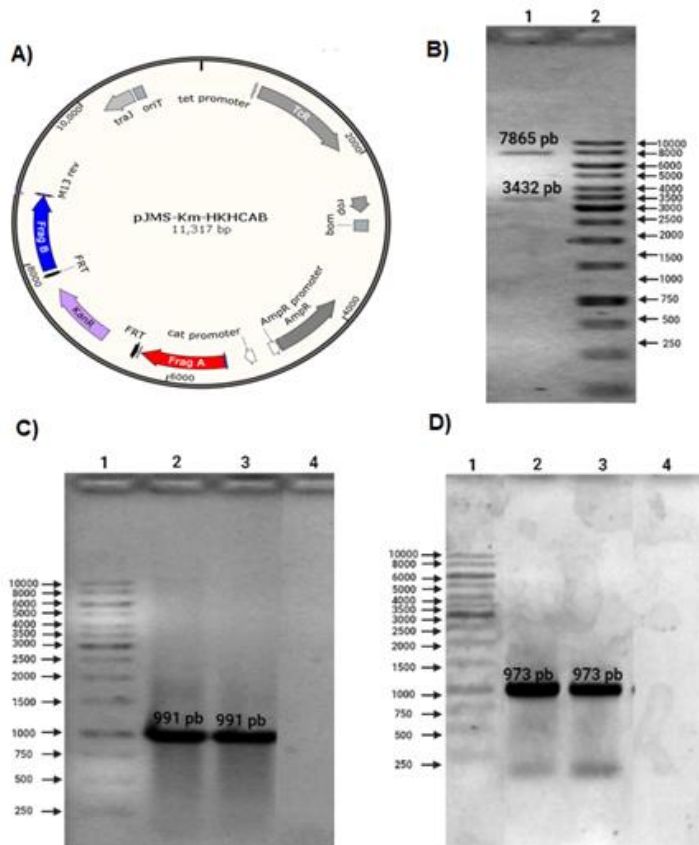


Figura 39. **Representación gráfica y esquemática de la subclonación de los fragmentos A y B en el vector suicida pJMS por medio de ensayos de restricción enzimática y PCR.** **A)** Mapa del vector suicida pJMS-HKHCB obtenido por el software SnapGene. **B)** Electroforetograma del patrón de doble digestión con las enzimas *SacI* y *KpnI* que confirma la correcta subclonación de los fragmentos. Carriles: 1) Vector (pJMS) + inserto (fragmento A-*kanR*-fragmento B), 2) MPM. **C)** Electroforetograma del fragmento A en el plásmido pJMS-HKHCB mediante PCR. Carriles: 1) MPM, 2) fragmento A, 3) Control positivo pBSK-HKHCB, y 4) Control negativo. **D)** Electroforetograma del fragmento B en el plásmido pJMS-HKHCB mediante PCR. Carriles: 1) MPM, 2) Fragmento B, 3) Control positivo pGEM-HKHCA, y 4) control negativo.

10.5 Amplificación de los fragmentos A y B en el fondo genético de las cepas *A. baldaniorum* Sp245 y *E. coli* S17.1 que contiene el plásmido suicida pJMS-HKHCB

A partir de la cepa silvestre de *A. baldaniorum* se realizó una amplificación por PCR del fragmento A, el ORF del gen *hkhC* y el fragmento B generando un amplificado de 5.6Kbs. Por otro lado, el amplificado generado en la cepa conjugativa *E. coli* S17.1 es de 3.4Kbs abarcando a los fragmentos A, B, y el ORF del gen *kanR* del plásmido mutagénico pJMS-HKHCB como se observa en la figura 40.

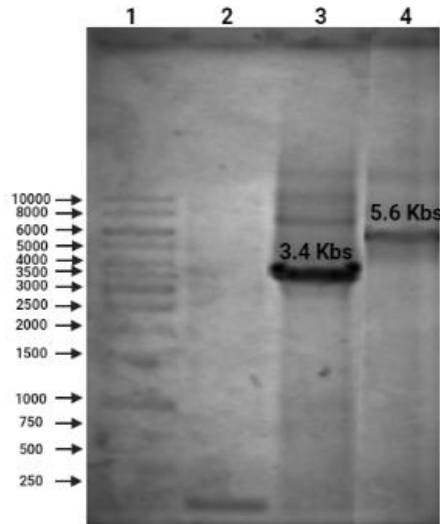


Figura 40. **Electroforetograma de amplificación por medio de PCR de ambos fragmentos en el plásmido mutagénico pJMS-HKHCAB y la cepa silvestre.** Carriles: 1) MPM, 2) Control negativo, 3) Producto de 3.4Kbs (fragmento A, B y *kanR*) 4) Producto de 5.6 Kbs (fragmento A, B y el gen *hkhC*).

10.6 Análisis *in silico* previo de la comparación de los contextos genéticos que se obtendrían al eliminar el gen *hkhC* en el fondo genético de la cepa silvestre *A. baldaniorum* Sp245 y la cepa mutante *A. baldaniorum* C5.56 ($\Delta hkhB$)

Se realizó un análisis *in silico* con el programa SnapGene de los fondos genéticos que se generarían tras la eliminación del gen *hkhC* con respecto a los demás genes del operón putativo, en la figura 41 A se muestra el contexto genético de la cepa silvestre comprándolo con los contextos genéticos esperados tras realizar la mutación por eliminación de *hkhC* e inserción de *kanR* ($\Delta hkhC::kanR$) lo cual generaría las cepas mutantes *A. baldaniorum* $\Delta hkhC::kanR$ y *A. baldaniorum* $\Delta hkhB$, $\Delta hkhC::kanR$ figura 41 B y C, respectivamente. Con el análisis se resaltan en color rosado los pares de oligonucleótidos empleados en este estudio, la dirección de las flechas muestran cada uno de los genes del presunto operón, los rectángulos muestran la posición que abarca los fragmentos A y B que se emplearon para la generación de la mutante *A. baldaniorum* $\Delta hkhB$ por Cordero en 2017 y los

que se emplean en este trabajo para la generación de las mutantes sencilla $\Delta hkhC::kanR$ y doble $\Delta hkhB, \Delta hkhC::kanR$.

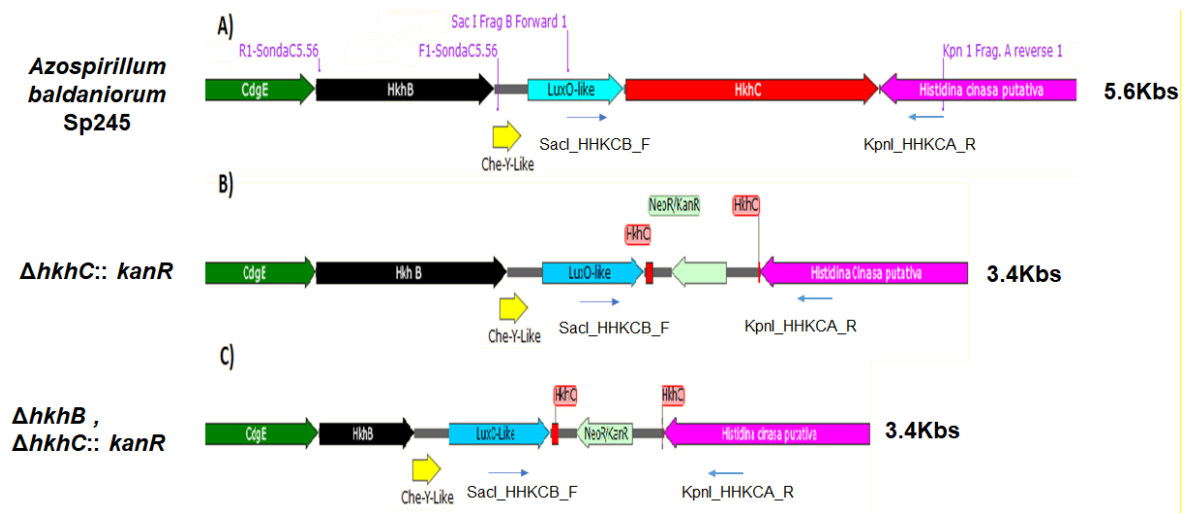


Figura 41. Mapas de los contextos genéticos de la cepa silvestre y las cepas mutantes **A. baldaniorum $\Delta hkhC::kanR$** y **A. baldaniorum $\Delta hkhB, \Delta hkhC::kanR$** . Contextos genéticos y los oligonucleótidos empleados: A) Cepa silvestre donde se resaltan los homólogos A y B que se emplearon para la eliminación de los genes *hkhB* y *hkhC* por medio de doble recombinación homóloga. B) Cepa mutante *A. baldaniorum $\Delta hkhC::kanR$* donde se eliminaron 3,695 pb del gen *hkhC*. C) Cepa doble mutante *A. baldaniorum $\Delta hkhB-\Delta hkhC::kanR$* donde se eliminaron 3,695 pb del gen *hkhC* y los 1309 pb eliminados por Cordero del gen *hkhB*.

10.7 Obtención de las mutantes *A. baldaniorum $\Delta hkhC::kanR$* y *A. baldaniorum $\Delta hkhB, \Delta hkhC::kanR$*

Se realizaron ensayos de conjugación de acuerdo con los protocolos mencionado en materiales y métodos, a través de los cuales se seleccionaron y contra seleccionaron transconjugantes con los fenotipos kanamicina (Km) y tetraciclina (Tc) resistentes en medio mínimo K-lactato líquido y semisólido (agar). Resultando las clonas 52 como candidata para la mutante sencilla $\Delta hkhC::kanR$ y la clona 28 para la mutante doble $\Delta hkhB-\Delta hkhC::kanR$ figura 42 A. Con base en los fenotipos, la selección de colonias se hizo de acuerdo con los reportes ya descritos previamente del fenómeno de doble entrecruzamiento por recombinación homóloga. Las posibles mutantes seleccionadas fueron confirmadas por PCR obteniendo un producto de amplificado de 3.4 Kbs que corresponden a la eliminación completa de *hkhC*, e inserción del gen *KanR* en comparación con la cepa silvestre *A. baldaniorum* Sp245, cuyo producto de amplificación es de 5.6Kbs

como se muestra en la figura 42 B. La clonas seleccionadas para confirmar la mutación fueron la número 52 para la mutación $\Delta hkhC::kanR$ (mutante denominada como CCN-52) y la clona 28 para la mutación $\Delta hkhB-\Delta hkhC::kanR$, (mutante denominada como BCCN-28) en ambas obteniendo un amplificado de 3.4 kbs, a comparación de la cepa silvestre con 5.6 Kbs, demostrando la disminución del amplificado como se esperaba de acuerdo al análisis *in silico* con SnapGene.

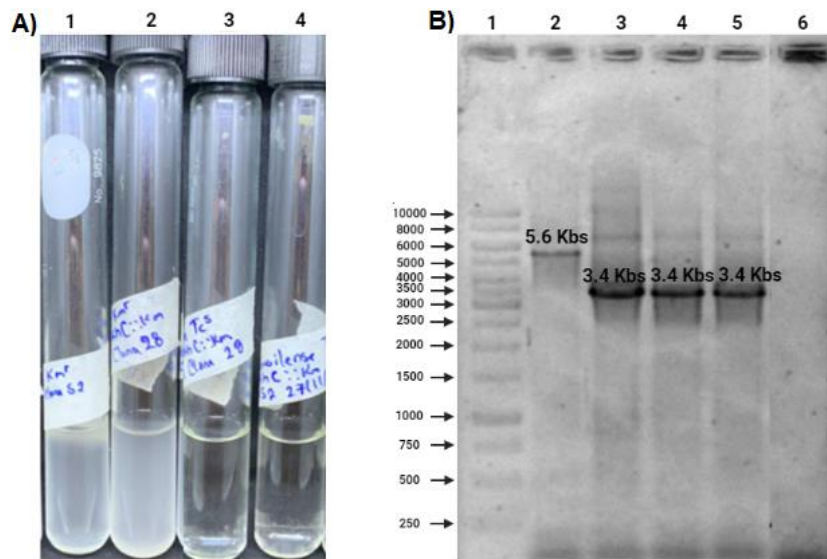


Figura 42. **Confirmación de las mutantes BCCN-28 y CCN-52 por medio de PCR.** **A)** La selección de mutantes por marcador de resistencia en medio mínimo K-Lactato. Carriles 1) Mutante CCN-52 Km resistente, 2) Mutante BCCN-28 Km resistente, 3) Mutante BCCN-28 Tc sensible, 4) CCN-52 Km Tc sensible. **B)** Electroforetograma Carriles 1) MPM, 2) Amplicón cepa silvestre *A. baldaniorum* Sp245, 3) Amplicón construcción final del plásmido mutagénico pJMS-HKHCAB como control positivo, 4) Amplicón mutante CCN-52 (*A. baldaniorum* $\Delta hkhC::kanR$), 5) Amplicón BCCN-28 (*A. baldaniorum* $\Delta hkhB, \Delta hkhC::kanR$), 6) Control negativo.

10.8 Amplificación de las regiones flanqueantes al gen *hkhB*

Se realizó una PCR amplificando las regiones que se encuentran flanqueando al gen *hkhB* obteniendo un producto de amplificación de 1.4 Kbs en el fondo genético de la mutante BCCN-28 (*A. baldaniorum* $\Delta hkhB, \Delta hkhC::kanR$) con respecto a las cepas *A. baldaniorum* Sp245 y la mutante CCN-52 (*A. baldaniorum* $\Delta hkhC::kanR$) cuyos productos de amplificación fueron 2.6 Kbs, debido que tienen el gen *hkhB* presente en su genoma, y así demostrando la ausencia del mismo (*hkhB*) en la

doble mutante BCCN-28 debido a la mutación por eliminación reportada por Cordero en 2017, los resultados se pueden observar en la figura 43.

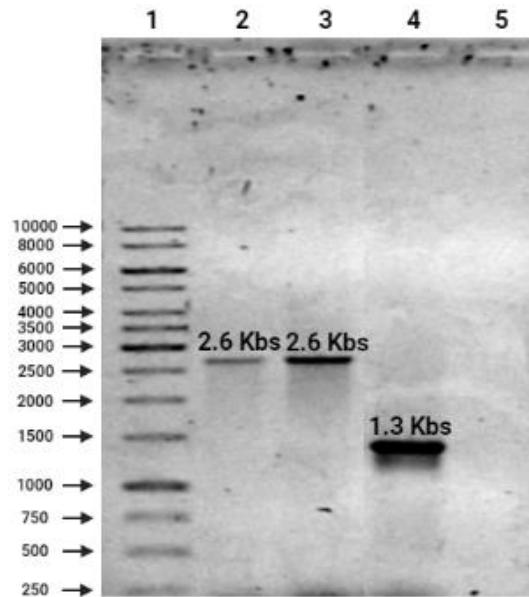


Figura 43. **Electroforetograma de las amplificaciones por medio de PCR de las regiones flanqueantes al gen *hkhB* y el gen *hkhC* en el fondo genético de las cepas mutantes generadas en este trabajo y la cepa silvestre.** Carriles 1) MPM, 2) Cepa silvestre *A. baldaniorum* Sp245, 3) Mutante CCN-52 (*A. baldaniorum* $\Delta hkhC::kanR$), 4) Mutante BCCN-28 (*A. baldaniorum* $\Delta hkhB, \Delta hkhC::kanR$), 5) Control negativo.

11.- DISCUSIÓN

Los sistemas de traducción de señales y principalmente los sistemas de doble componente son fundamentales para que *A. baldaniorum* pueda competir y percibir señales ambientales en un entorno tan complejo como lo es la rizosfera. De acuerdo con los antecedentes que encaminaron este trabajo, y como se mencionó en el marco teórico los sistemas de doble componente (SDC) están constituidos por una cinasa histidínica que transmite su señal energética a un regulador de respuesta desencadenando funciones específicas. El gen *hkhC* que es la base de este estudio, tiene el mismo sentido de la transcripción del clúster de genes mencionados al inicio del trabajo, es un gen perteneciente a la especie *A. baldaniorum* Sp245, ubicado en el plasmido número 3 (figura 15), codifica presuntamente a una cinasa histidínica híbrida citoplasmática, clasificándola de esta manera ya que no presenta dominios transmembranales, esta CH presenta dominios de detección como el GAF (figura

22 y 23) descrito en funciones como la regulación de la inhibición de diguanilato ciclasas (Chen et al., 2016a), la participación en la dimerización del dominio GGDEF para la síntesis de di-GMPc (Chen et al., 2018), la unión de segundos mensajeros como GMPc, AMPc (Zhang et al., 2008; Kanacher et al., 2002) y oxígeno (Cho et al., 2009). Ya se han reportado cinasas histidínicas con dominio GAF en otros modelos de estudios, una de ellas es DevS que en conjunto con DevR es uno de los sistemas de doble componente mejor caracterizados en *Mycobacterium tuberculosis*, la cinasa DevS puede ser activada en respuesta a oxígeno con ayuda de su dominio GAF además de presentar una función dual de cinasa/fosfatasa sobre el Regulador de Respuesta DevR (Kaur et al., 2016), otra cinasa histidínica es PdtA de *Mycobacterium smegmatis* que se une al di-GMPc por medio de su dominio GAF, la mutante de PdtA Hariharan y colaboradores demostraron que se compromete en gran medida el crecimiento en medios deficientes en aminoácidos y exhibe una desregulación transcripcional global (Hariharan et al., 2021). HkhC también presenta dominios de detección tipo PAS-PAC que tienen la capacidad de detectar diferentes estímulos y compuestos como: oxígeno, estado redox, intermediarios del ciclo de Krebs, ácidos grasos, iones, luz y además de ser mediadores fundamentales de la interacción proteína-proteína, la transferencia de señales, y la localización subcelular (Borland et al., 2015; Henry & Crosson, 2011). Por otra parte, presenta dominios de fosfotransferencia REC y HPT indispensables para el proceso de fosforelevo His-Asp-His. En conjunto, el producto proteico del gen *hkhC* tiene los motivos y residuos fosforilables conservados y probablemente funcionales de los dominios catalíticos y de fosfotransferencia. De igual manera, con base en la clasificación por tipos de cinasas histidínicas, HkhC pertenece a la clase I debido a que presenta los dominios DHp y CA asociados y el dominio Hpt en el extremo carboxilo terminal (Adebali et al., 2017; Dutta et al., 1999).

Con respecto al contexto genético *hkhC* presenta una distancia intergénica con el gen próximo río arriba *luxO* de apenas 28 pb de longitud, lo que la hace una distancia relativamente corta como usualmente se encuentran cuando se forma parte de un operón (Salgado et al., 2000). Sin embargo, en este estudio se realizó un análisis bioinformático con plataformas de acceso libre para localizar una

probable región promotora de *hkhC* tomando en cuenta 240 pb río arriba del gen que abarcan parte del ORF del gen *luxO*, como se observó en los resultados de este análisis se hallaron las cajas -10 y -35 características para la unión del factor sigma 70, también se ubicó la caja -24 para la unión del factor sigma 54 y por último se hallaron las regiones casi completamente conservadas para la unión de los factores NarL y CytR que regulan la transcripción de operones relacionados al metabolismo de nitratos, nitritos, proteínas transportadoras y poros proteicos, específicamente NarL regula funciones íntimamente relacionadas con promotores dependientes a sigma 54 como lo es el metabolismo del nitrógeno. Estos datos sugieren una regulación transcripcional compleja que tendrá que verificarse de manera experimental en próximas investigaciones.

Adicionalmente, llevamos a cabo un estudio de las relaciones filogenéticas del gen *hkhC* con secuencias homólogas de distintos géneros y especies bacterianas. En filogenia, los procesos evolutivos de las proteínas siempre han dependido de la variabilidad y diversificación de los genes que conocemos hoy en día. Estas historias evolutivas nos indican sus orígenes mediante dos vías evolutivas, la primera es la variación evolutiva de un mismo gen a través de los años (un origen común o ancestral) y la segunda es la obtención del material genético por medio de mecanismos moleculares o también llamado transferencia horizontal de genes (THG). *Azospirillum* es una bacteria terrestre cuyos ancestros más cercanos vivían en ambientes acuáticos hace miles de millones de años, lo cual indica que la evolución de esta bacteria se cursó mediante una transición de acuática a terrestre, esto se explica que la mayoría de los genes constitutivos de *Azospirillum* (house-keeping) son los que proporcionan funciones de mantenimiento necesarias para un organismo vivo, ya que los genes ortólogos a estos solo se relacionan con bacterias acuáticas. Sin embargo, existen datos que sugieren que casi la mitad de los genes presentes en el genoma de *Azospirillum* provienen de organismos terrestres, y gran parte de estos genes que están implicados en procesos de asociación con las plantas han sido obtenidos de manera horizontal (Wisniewski-Dyé et al., 2011). Como se abordó en el marco teórico de este trabajo, una función importante de los análisis filogenéticos es la reconstrucción de patrones evolutivos en forma de

árboles que describe las relaciones entre los organismos que se estudian, y la predicción de un ancestro en común. En nuestros análisis, se encontró la presencia de 67 secuencias homólogas al gen *hkhC*, pertenecientes a 14 géneros distintos, de las cuales 31 secuencias son exclusivas del género *Azospirillum*, sin embargo, solamente 5 secuencias homólogas tienen en su contexto genético al operón putativo, estas secuencias se encuentran en las especies *A. brasilense* y *A. baldaniorum*, esto nos indicaría que el operón se encuentra aislado en un grupo exclusivo de bacterias, estas dos especies hasta hace poco se encontraban muy relacionadas y pertenecían a la misma especie (dos Santos Ferreira et al., 2020), con base en esto podemos hipotetizar que algunos genes de esta región de señalización podrían ser resultado de algún mecanismo de transferencia horizontal de genes (THG) proveniente de alguna bacteria que aún no haya sido identificada en la base de datos de genomas existentes, ya que los resultados de las predicciones de la cantidad de dominios proteicos codificados en los 31 genes homólogos a *hkhC* del género *Azospirillum* no varían de manera significativa (figura 21) dado que es común encontrar proteínas con el mismo tipo y aproximadamente la misma cantidad de dominios comparadas con *HkhC*, pero estas no se encuentran asociadas a la región de señalización completa sino solamente a los genes homólogos de *luxO* en su contexto genético (resultados no publicados). Ya se han reportado la transferencia de operones completos por medio de mecanismos de transferencia horizontal, un ejemplo de ello es el operón *luxCDABEG* en los géneros *Aliivibrio*, *Photobacterium*, y *Vibrio* (Urbanczyk et al., 2008), asimismo se han reportado varios ejemplos de fusión de genes codificantes para la vía de síntesis metabólica del triptófano en bacterias dónde un grupo de científicos investigaron los orígenes ancestrales del operón de triptófano y la dinámica de cambios evolutivos, este estudio propone las siguientes explicaciones que posiblemente ocurren en el proceso de fusión de genes y el porqué de las diferencias existentes entre el filograma del operón *trp* de los genes fusionados y el filograma de las secuencias 16S de estas bacterias. Las explicaciones posibles que se plantean son 1) THG, 2) una fusión ancestral inicial (de ocurrencia rara) seguida de numerosos eventos de pérdida de genes en diferentes linajes, o 3) la ocurrencia

frecuente de muchas fusiones de genes como eventos independientes de innovación evolutiva (resultados analizados por Xie & Jensen en varios grupos de Bacterias y Archeas; Xie et al., 2003) (Mukherjee et al., 2016) que permite proponer las siguientes hipótesis respecto a la presencia de la región de señalización de este estudio que cluye a los genes *cdgE*, *hkhB*, *cheY*, *luxO* y *hkhC*: 1) la conjunción de dos operones putativos independientes, 2) que el clúster de los genes *cdgE*, *hkhB* y *cheY* se haya adquirido posiblemente de manera horizontal a un ancestro en común cercano de las cepas *A. brasilense* y *A. baldaniorum* y el clúster de los otros dos genes (*luxO* y *hkhC*) aparentemente se encuentra inherentes al fondo genético de las 31 cepas del género *Azospirillum* abordadas en este estudio como se observó en el filograma de relación de contexto genético figura 19 A, número 2.

Por otra parte, en este estudio se llevó a cabo un análisis bioinformático de la proteína HkhC por medio del modelado por homología, análisis de la conservación de motivos con WebLogo y la posible funcionalidad de los dominios GAF, PAS-PAC, DHp, CA, REC y REC2, además del acoplamiento molecular del ligando adenosín trifosfato (ATP) con el dominio CA, que nos ayuda a sugerir que HkhC podría ser una proteína funcional siendo esta una alternativa de predicción. De acuerdo con nuestros resultados, HkhC presenta los motivos conservados de las cajas H (H), N, D/G1, F, G2 y G3 y el residuo conservado de histidina característicos de una cinasa histidínica funcional tipo I. Además de tener los residuos de fosforilación conservados D y H dentro de los dominios REC1, REC2 y HPT (los datos del dominio HPT no se mostraron en este estudio) que proponen a HkhC como una CH híbrida. De igual forma se hicieron los modelados por homología de los dominios GAF, PAS-PAC, CA, DHp, REC1 y REC2. Los modelos de los siete dominios fueron hechos de manera independiente con seis cristales distintos.

Con respecto al modelado del dominio CA con el cristal 4U7O de Walk, que es una cinasa histidínica detectora con dominios transmembranales y HAMP y que por medio de la unión de ATP/ADP puede modular la dinámica del dominio CA en *Lactiplantibacillus plantarum* JDM1. El dominio DHp fue modelado con el cristal 4MT8 que corresponde al receptor de etileno 1 que es una cinasa histidínica anclada

a membrana con dominios GAF y REC de *Arabidopsis thaliana*. El dominio REC1 modelado con el cristal 6QRJ perteneciente a una cinasa histidínica con dos dominios REC implicada en la transición del ciclo celular (de G1-S) regulado por el aumento en los niveles del di-GMPc, además ShkA presenta un pseudo dominio receptor Rec1 con capacidad de unir di-GMPc, al ser activado Rec1 este participa en la liberación del dominio Rec2 canónico de su posición central donde obstruye los movimientos a gran escala necesarios para la catálisis en el modelo *Caulobacter crescentus* CB15 (Dubey et al., 2020), con respecto al dominio REC2 el cual fue modelado utilizando el cristal 7C1J perteneciente a la cinasa histidínica PA1611, esta cinasa tiene un dominio de función desconocida (DUF), un dominio HAMP₇ y un dominio REC en *P. aeruginosa* PAO1, esta proteína está involucrada en el proceso del control de la expresión de genes asociados a infecciones crónicas y formación de biopelícula (Chen et al., 2020). Con respecto al modelado del dominio GAF, el cristal utilizado fue 4ZMU perteneciente a la proteína Dcsbis, una diguanilato ciclasa (DGC) que coordina la motilidad celular sin afectar significativamente la formación de biopelícula, lo característico de esta DGC es la presencia de un bucle peptídico protector que se extiende desde el dominio GAF ocupando el sitio I (sitio inhibidor) conservado del dominio GGDEF evitando la formación de di-GMPc. Los autores de esta investigación proponen que en el bolsillo hidrofóbico del dominio GAF se puede unir una molécula desconocida río arriba moviendo el bucle protector del sitio I y desactivando así la actividad enzimática (Chen et al., 2016b), aunque el bucle protector no está conservado en el dominio GAF de HkhC, se sugiere que podría existir un mecanismo similar en esta proteína. Por último, están los dominios PAS-PAC modelados con el cristal 3MR0 de una cinasa histidínica detectora con dominios REC y PAS-PAC en *Burkholderia thailandensis* E264 (Kim, Y., Tesar, C., Buck, K., Joachimiak, A., 2010).

En este estudio también se realizó el acoplamiento molecular entre el dominio CA modelado con el cristal 4U7O y el ligando ATP para la predicción de la unión característica proteína-ligando el cual dio un valor termodinámicamente favorecido. Con base en los resultados de ambos análisis del acoplamiento molecular, la búsqueda de motivos conservado de los dominios CA y DHP, y el análisis

comparativo del sitio de unión a ATP de dominio CA predicho por la plataforma Conserved Domain Database (CDD) del NCBI, hipotetizamos que la proteína HkhC sería una posible cinasa histidínica funcional, como se mencionó en la sección de resultados con la comparación del análisis del sitio de unión a ATP mostrado en el alineamiento múltiple de secuencias (figura 27) y los resultados obtenidos de los residuos predichos por los programas Autodock tools y LigPlot del acoplamiento molecular en los cuales solo los residuos Asn12, Gly54, Val103, Ser105 y Gly110 no fueron predichos por el acoplamiento, pero si se encuentran conservados en el sitio de unión a ATP encontrado con la plataforma CDD, los otros 11 residuos coincidieron perfectamente con los resultados del acoplamiento molecular (figura 28), lo cual concluimos con base a lo reportado en la literatura, y la conservación del sitio de unión a ATP del alineamiento múltiple, además de coincidir con los reportado en la cristalización de la proteína Walk como una cinasa histidínica activa que se une a ATP (4U7O), indica que posiblemente el dominio CA de HkhC es un dominio funcional que tiene el sitio de unión a ATP y Mg conservado además de las cajas N, D/G1, F, G2 y G3 necesarias para llevar a cabo el proceso de fosforelevio, sin embargo, sería necesario comprobar esta hipótesis con métodos experimentales bajo condiciones de laboratorio.

Con respecto a los resultados experimentales de este trabajo se realizó la generación de dos mutantes por eliminación del gen *hkhC* una en el fondo genético de la cepa silvestre *A. baldaniorum* Sp245 (mutante simple) y la otra en el fondo genético de la cepa mutante *A. baldaniorum* C5.56 (mutante doble) como se confirmó en las figuras 42 y 43, no obstante, aún falta someter las mutantes denominadas como CCN-52 y BCCN-28 a experimentos fenotípicos de crecimiento, sensibilidad a estrés osmótico, movilidad y formación de biopelícula para sugerir la función y papel que tendría HkhC de manera individual y en conjunto con HkhB. Ya se ha descrito un estudio similar donde se generaron dos mutantes dobles de dos cinasas histidínicas híbridas, EspC (cinasa histidínica híbrida huérfana) y EspA (cinasa histidínica híbrida) que en conjunto con dos proteínas cinasas serina/treonina y una proteína de transporte forman el sistema Esp en *Myxococcus xanthus*. De acuerdo con los resultados del estudio arrojados con las mutantes

$\Delta espA$, $\Delta espC$ y $\Delta espC$, $\Delta espA$ los investigadores proponen que EspA y EspC participan en un nuevo mecanismo de señalización de proteínas cinasas histidinas híbridas que involucra la fosfotransferencia inter e intra proteica. Este sistema regula el recambio proteolítico de MrpC que es un importante regulador para la progresión del desarrollo multicelular en *M. xanthus* (Schramm et al., 2012). Otro estudio relevante es el descrito en el SDC PdeK/PdeR donde PdeR es un RR con actividad fosfodiesterasa involucrada en el recambio intracelular de di-GMPc y la regulación positiva de la virulencia en *Xanthomonas oryzae pv. oryzae*, PdeR tiene la capacidad de interactuar con el regulador transcripcional TirP promoviendo la actividad fosfodiesterasa de PdeR para la degradación de di-GMPc en presencia de PdeK (Li et al., 2019). Se ha reportado que TirP está implicado en la producción de exopolisacáridos (EPS) y regulación de la virulencia. En este estudio los autores generaron una doble mutante $\Delta tirP$, $\Delta pdeR$ que produjo menos cantidad EPS que la mutante simple $\Delta triP$, sugiriendo que TriP es un regulador epistático de PdeR implicado en el control positivo de la expresión de virulencia en *X. oryzae pv. oryzae* (Li et al., 2019) Con estos estudios se resalta la importancia de las dobles mutantes en la asignación de funciones en SDC.

Hoy en día existen 3 vías principales para la percepción de estímulos en la traducción de señales de HCs bacterianas, el primero es la detección de estímulos por medio de dominios periplásmicos, el segundo la detección de estímulo por medio de dominios y regiones transmembrana, y el tercero es la detección de estímulos citoplasmáticos por medio de HCs solubles y/o ancladas a membrana. Debido a que existen un gran número de HCs detectoras solubles que pueden estar asociadas de manera permanente o transitoria con proteínas detectoras unidas a la membrana funcionando como la ruta principal de entrada de estímulos específicos (Mascher et al., 2006), y de igual manera la presencia de procesos de interacción como el “cross-talk”, nos da indicios para poder sugerir las posibles vías de interacción para la transducción de señales en este operón putativo de Sistema de Múltiples Componentes (SMC) con probables funciones previamente mencionadas. El modo de interacción específica entre los componentes de este SMC putativo, solo se podrá predecir de manera exacta con experimentación, sin embargo, con

base en los ejemplos mencionados hasta este momento se sugerirán algunas interacciones en este sistema enfocándonos especialmente en el papel que desempeñaría la proteína HkhC.

Con base en la predicción de dominios proteicos, la proteína HkhC es soluble lo cual sugiere que podría tener la capacidad de ser fosforilada por medio del dominio REC de otra cinasa histidínica híbrida o de un RR. La señal de activación primaria de HkhC podría provenir de HkhB puesto que sería la cinasa inicial del proceso de cascada de señalización debido a su localización transmembranal, otra alternativa sería la activación de CdgE a través de HkhB dado que ya se comprobó que sus genes codificantes forman parte del operón. Al ser fosforilado el RR CdgE activaría su capacidad de producir di-GMPc. De acuerdo con lo visto anteriormente existen cinasas histidínicas que pueden unirse al di-GMPc. Además, se han reportado funciones del dominio GAF en la regulación de la inhibición de la actividad diguanilato ciclasa y/o la dimerización del dominio GGDEF para la síntesis de di-GMPc, lo cual nos podría insinuar una tentativa regulación entre los componentes HkhB/HkhC/DgcE parecido a lo observado en el sistema RavA/RavR/RavS de *X. campestris* que regulaba la patogénesis mediante la unión de di-GMPc y la supresión de la natación bacteriana (Cheng et al., 2019; Tao et al., 2014).

Con base en los fenotipos de las mutantes revisadas en este trabajo, se tienen 4 funciones de regulación posibles en este SMC; sensibilidad a estrés osmótico, crecimiento bacteriano, movilidad y formación de biopelícula. Con respecto a la regulación de la resistencia a estrés osmótico en SDC, QseC es una HC con capacidad de mediar la resistencia a estrés osmóticos y la formación de biopelícula en *Haemophilus parasuis* (He et al., 2018), también se ha descrito el papel del regulador de respuesta OmpR, generando una mutación por eliminación del gen *ompR*, la mutante resultante mostró sensibilidad al cloruro de sodio y reducción de la movilidad en *Acinetobacter baumannii* (Tipton & Rather, 2017). Esto nos permite sugerir la probable explicación del fenotipo de sensibilidad a cloruro de sodio mostrado por la mutante polar 5A (*dgcE:gusA:kmR*), donde este fenotipo podría deberse a la alteración de alguna de las dos cinasas histidínicas por la alteración

del marco de lectura abierto, alguna de la cinasas podría funcionar de manera similar a QseC en *H. parasuis*. Otra alternativa que explicaría el fenotipo de sensibilidad a cloruro de sodio sería el regulador LuxO ya que este presenta el dominio HTH el cual tiene la capacidad de unir a ADN similar a lo descrito con la proteína OmpR en *A. baumannii*, donde OmpR tiene la capacidad de unir a ADN y regular la expresión de genes involucrados en la resistencia a estrés osmótico. En cuanto al fenotipo de retardo en el crecimiento en medio mínimo presentado por las mutantes 5A y YH57 la causa podría deber a *luxO*, ya que la mutante por interrupción del gen *cdgE* (5A) difirió en fenotipos con la mutante por eliminación del mismo gen (mutante 7U-3) fenotipos como el retardo en el crecimiento y la sensibilidad a cloruro de sodio, por lo cual se plantea que el fenotipo de sensibilidad a estrés osmótico y el retardo en el crecimiento podría ser causados por la alteración de la expresión del gen *luxO*. En concordancia con esto se han descrito RR implicados en la regulación del crecimiento bacteriano un ejemplo de ello es YycF de *Bacillus subtilis* (Okajima et al., 2008). En conclusión, la regulación e interacción de esta región de señalización que se propone tiene al menos cinco componentes que supondrían un proceso altamente complejo, que necesitaría aún una mayor cantidad de investigaciones para poder entender y descifrar su compleja vía de señalización.

Finalmente, los análisis bioinformáticos sugieren que HkhC es una proteína funcional con motivos catalíticos conservados, y que podría estar asociada conjuntamente en la regulación del di-GMPc por medio de sus dominios GAF, REC, o simplemente por fosfotransferencia, a algún RR. Algunas funciones que se sugieren podrían estar afectadas en las mutantes generadas en este trabajo serían la capacidad de movilidad y formación de biopelícula, que en conjunto si se comprueba la existencia de estos genes como una sola unidad transcripcional formando parte de un sistema de dos componentes o inclusive de múltiples componentes originado por la unión de operones, uno de ellos conservado en el genoma y el otro adquirido por mecanismos de transferencia horizontal de genes, además *hkhC* se encuentra relacionado filogenéticamente con los filos Proteobacterias y Bacteroidetes, además de encontrar genes homólogos al operón

sugerido de manera parcial (exclusivamente *luxo*) o total (los 5 genes homólogos al región de señalización) dentro del género *Azospirillum* como se observó en la figura 19 de los resultados, en conjunto *hkhC* y este clúster de genes podrían estar involucrados en la regulación de procesos como el crecimiento, la sensibilidad a estrés osmótico, movilidad y formación de biopelícula, funciones importantes para una colonización y supervivencia exitosa, que le permitan a *A. baldaniorum* Sp245 competir y percibir señales ambientales en su complejo entorno. No obstante, aún es indispensable más investigaciones experimentales que confirmen los postulados de este trabajo para poder comprender y elucidar el importante papel de *hkhC* y su posible participación en este sistema de múltiples componentes putativo.

12.- CONCLUSIONES

- La región de señalización completa se encuentra exclusivamente relacionado con 4 cepas de las especies *A. brasilense* y *A. baldaniorum*.
- Se sugiere que HkhC es una proteína funcional como cinasa histidínica y con capacidad de fosforelevo.

13.- PERSPECTIVAS

- Realización de curvas de crecimiento a las mutantes *A. baldaniorum* Sp245 $\Delta hkhC::kanR$ y *A. baldaniorum* Sp245 $\Delta hkhB, \Delta hkhC::kanR$.
- Realización de ensayos de movilidad por el método de agar suave a las mutantes *A. baldaniorum* Sp245 $\Delta hkhC::kanR$ y *A. baldaniorum* Sp245 $\Delta hkhB, \Delta hkhC::kanR$.
- Realización de ensayos de formación de biopelícula por el método cristal violeta a las mutantes *A. baldaniorum* Sp245 $\Delta hkhC::kanR$ y *A. baldaniorum* Sp245 $\Delta hkhB, \Delta hkhC::kanR$.

- Realización de ensayos de estrés osmótico con cloruro de sodio a las mutantes *A. baldaniorum* Sp245 $\Delta hkhC::kanR$ y *A. baldaniorum* Sp245 $\Delta hkhB, \Delta hkhC::kanR$.
- Complementación génica de las mutantes *A. baldaniorum* Sp245 $\Delta hkhC::kanR$ y *A. baldaniorum* Sp245 $\Delta hkhB, \Delta hkhC::kanR$ con el gen *hkhC*.
- Realización de análisis de acoplamiento molecular a HkhB.
- Realización de ensayos de fosforilación de los motivos fosforilables conservados de los dominios DHp, REC1, REC2 y HPT de HkhC.
- Estudios de colonización de plantas de las mutantes *A. baldaniorum* Sp245 $\Delta hkhC::kanR$ y *A. baldaniorum* Sp245 $\Delta hkhB, \Delta hkhC::kanR$
- Determinación del gen *hkhC* como parte una misma unidad transcripcional con otros genes.

14.- ANEXOS

Primer 1: Kpn I Frag. A reverse 1 (1 binding site) / $T_m = 57^\circ\text{C}$
 5' **tcggtac**cttggtatcgctgatggag 3'
 5' Phosphorylated Reverse Complement

Primer 2: SnaB I Frag. A forward 1 (1 binding site) / $T_m = 56^\circ\text{C}$
 5' **gacctac**gtaaaaggaggggtgtttgactg 3'
 5' Phosphorylated Reverse Complement

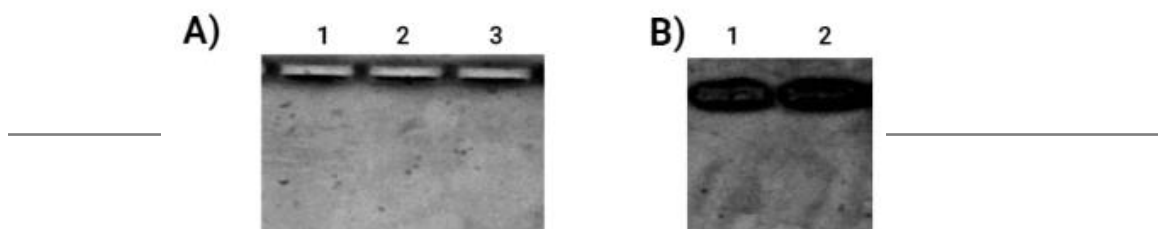
Primer 1: Sac I Frag B Forward 1 (1 binding site) / $T_m = 59^\circ\text{C}$
 5' **cgatgac**tccctttgtgaccctgaactgc 3'
 5' Phosphorylated Reverse Complement

Primer 2: Stu I Frag B Reverse 1 (1 binding site) / $T_m = 57^\circ\text{C}$
 5' **cgtagg**cctgatacggtaggctttgagcac 3'
 5' Phosphorylated Reverse Complement

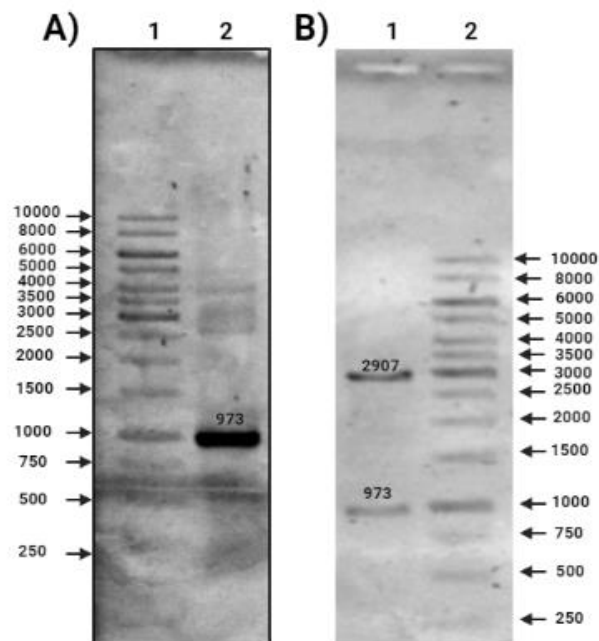
Product Name: Fragmento A HkhC.dna
 Ready for PCR Product: 990 bp
 PCR Cancel

Product Name: Fragmento B HkhC.dna
 Ready for PCR Product: 973 bp
 PCR Cancel

Anexo 1. **Simulación de amplificación por PCR con el software SnapGene.** Se obtuvo como resultados dos productos nucleotídicos, uno de 990pb (Fragmento A) y otro de 973pb (fragmento B), con esto se resalta el correcto sentido de amplificación del diseño de los oligonucleótidos.



Anexo 2. **Representación gráfica y esquemática de amplificación por PCR y ensayos de restricción del fragmento A en el vector de mantenimiento pGEM-HKHCA tras ser transformado en *E. coli*.** **A)** Electroforetograma de la confirmación de la construcción del plásmido pBSK-HKHCB mediante PCR con un producto de amplificación de 991pb. Carriles: 1) MPM, 2) fragmento B, 3) Control negativo. **B)** Electroforetograma de la confirmación de la construcción del plásmido pGEM-HKHCA mediante ensayo de restricción de doble digestión con las enzimas *Sna*I y *Kpn*I. Carriles: 1) MPM, 2) vector (pGEM) + inserto (fragmento A).



Anexo 3. **Representación gráfica y esquemática de amplificación por PCR y ensayos de restricción del fragmento B en el vector de mantenimiento pBSK-HKHCB tras ser transformado en *E. coli*.** **A)** Electroforetograma de la confirmación de la construcción del plásmido pBSK-HKHCB mediante PCR con un producto de amplificación de 973pb. Carriles: 1) MPM, 2) fragmento B. **B)** Electroforetograma de la confirmación de la construcción del plásmido pBSK-HKHCB mediante ensayo de restricción de doble digestión con las enzimas *SacI* y *StuI*. Carriles: 1) vector (pBSK) + inserto (fragmento B), 2) MPM.

15.- BIBLIOGRAFÍA

- Acosta-Cruz, E., Wisniewski-Dyé, F., Rouy, Z., Barbe, V., Valdés, M., & Mavingui, P. (2012). Insights into the 1.59-Mbp largest plasmid of azospirillum brasilense CBG497. *Archives of Microbiology*, 194(9), 725–736. <https://doi.org/10.1007/s00203-012-0805-2>
- Adebali, O., Petukh, M. G., Reznik, A. O., Tishkov, A. V., Upadhyay, A. A., & Zhulin, I. B. (2017). Class III histidine kinases: A recently accessorized kinase domain in putative modulators of type IV pilus-based motility. *Journal of Bacteriology*, 199(18), 1–12. <https://doi.org/10.1128/JB.00218-17>
- Ávalos-Rangel, M. Á. (2015). PARTICIPACIÓN DE LA DIGUANILATO CICLASA DE A .
- Baldani, J. I., Baldani, V. L. D., Seldin, L., & Dobereiner, A. N. D. J. (1986). *a Root- Associated Nitrogen-Fixing Bacterium*. 86–93.
- Barrios, H., Valderrama, B., & Morett, E. (1999). Compilation and analysis of σ_{54} -dependent promoter sequences. *Nucleic Acids Research*, 27(22), 4305–4313. <https://doi.org/10.1093/nar/27.22.4305>
- Berg, D. E. B. & C. M. (1983). © 19 8 3 Nature Publishing Group <http://www.nature.com/naturebiotechnology>. *Nature*, 1(1), 417–435.
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N., & Bourne, P. E. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 235–242. <https://doi.org/10.1093/NAR/28.1.235>
- Bhate, M. A. P., Molnar, K. A. S., Goulian, M., & Degrado, W. F. (2015). Signal Transduction in Histidine Kinases: Insights from New Structures. *Structure*, 23(6), 981–996. <https://doi.org/10.1016/j.str.2015.04.002>
- Bible, A., Russell, M. H., & Alexandre, G. (2012). The Azospirillum brasilense Che1 chemotaxis pathway controls swimming velocity, which affects transient cell-to-cell clumping. *Journal of Bacteriology*, 194(13), 3343–3355. <https://doi.org/10.1128/JB.00310-12>
- 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>
- Cai, Y., Su, M., Ahmad, A., Hu, X., Sang, J., Kong, L., Chen, X., Wang, C., Shuai, J., & Han, A. (2017). Conformational dynamics of the essential sensor histidine kinase WalK. *Acta Crystallographica Section D: Structural Biology*, 73(10), 793–803. <https://doi.org/10.1107/S2059798317013043>
- Capra, E. J., & Laub, M. T. (2012). Evolution of Two-Component Signal Transduction Systems. *Annual Review of Microbiology*, 66(1), 325–347. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092611-150039>

- Casino, P., Miguel-Romero, L., & Marina, A. (2014). Visualizing autophosphorylation in histidine kinases. *Nature Communications*, 5, 1–11. <https://doi.org/10.1038/ncomms4258>
- Cassán, F. D., Okon, Y., & Creus, C. M. (2015). *Handbook for Azospirillum Technical issues and protocols*. Springer US. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-06542-7>
- Chattopadhyay, S., Mukherjee, A., & Ghosh, S. (1994). Molecular cloning and sequencing of an operon, carRS of *Azospirillum brasilense*, that codes for a novel two-component regulatory system: Demonstration of a positive regulatory role of carR for global control of carbohydrate catabolism. *Journal of Bacteriology*, 176(24), 7484–7490. <https://doi.org/10.1128/jb.176.24.7484-7490.1994>
- Chen, H. J., Li, N., Luo, Y., Jiang, Y. L., Zhou, C. Z., Chen, Y., & Li, Q. (2018). The GDP-switched GAF domain of DcpA modulates the concerted synthesis/hydrolysis of c-di-GMP in *Mycobacterium smegmatis*. In *Biochemical Journal* (Vol. 475, Issue 7). <https://doi.org/10.1042/BCJ20180079>
- Chen, S. K., Guan, H. H., Wu, P. H., Lin, L. T., Wu, M. C., Chang, H. Y., Chen, N. C., Lin, C. C., Chuankhayan, P., Huang, Y. C., Lin, P. J., & Chen, C. J. (2020). Structural insights into the histidine-containing phosphotransfer protein and receiver domain of sensor histidine kinase suggest a complex model in the two-component regulatory system in *Pseudomonas aeruginosa*. *IUCrJ*, 7, 934–948. <https://doi.org/10.1107/S2052252520009665>
- Chen, Y., Liu, S., Liu, C., Huang, Y., Chi, K., Su, T., Zhu, D., Peng, J., Xia, Z., He, J., Xu, S., Hu, W., & Gu, L. (2016a). Dcsbis (PA2771) from *Pseudomonas aeruginosa* is a highly active diguanylate cyclase with unique activity regulation. *Scientific Reports*, 6(June), 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep29499>
- Chen, Y., Liu, S., Liu, C., Huang, Y., Chi, K., Su, T., Zhu, D., Peng, J., Xia, Z., He, J., Xu, S., Hu, W., & Gu, L. (2016b). Dcsbis (PA2771) from *Pseudomonas aeruginosa* is a highly active diguanylate cyclase with unique activity regulation. *Scientific Reports*, 6(June), 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep29499>
- Cheng, S. T., Wang, F. F., & Qian, W. (2019). Cyclic-di-GMP binds to histidine kinase RavS to control RavS-RavR phosphotransfer and regulates the bacterial lifestyle transition between virulence and swimming. *PLoS Pathogens*, 15(8), 1–30. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007952>
- Cheung, J., & Hendrickson, W. A. (2010). Sensor domains of two-component regulatory systems. *Current Opinion in Microbiology*, 13(2), 116–123. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.01.016>
- Cho, H. Y., Cho, H. J., Kim, Y. M., Oh, J. II, & Kang, B. S. (2009). Structural insight into the Heme-based redox sensing by DosS from *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Biological Chemistry*, 284(19), 13057–13067. <https://doi.org/10.1074/jbc.M808905200>
- Cordero-Rivera, C. D. (2016). *OBTENCIÓN DE LA MUTACIÓN DEL GEN Hsk B de Azospirillum brasilense*.
- Cui, Y., Tu, R., Wu, L., Hong, Y., & Chen, S. (2011). A hybrid two-component system protein from *Azospirillum brasilense* Sp7 was involved in chemotaxis. *Microbiological Research*, 166(6), 458–467. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2010.08.006>
- Danhorn, T., & Fuqua, C. (2007). Biofilm formation by plant-associated bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 61, 401–422. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.61.080706.093316>
- dos Santos Ferreira, N., Hayashi Sant' Anna, F., Massena Reis, V., Ambrosini, A., Gazolla Volpiano, C., Rothballer, M., Schwab, S., Baura, V. A., Balsanelli, E., Pedrosa, F. de O., Pereira Passaglia, L. M., Maltempi de Souza, E., 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>

- Dotaniya, M. L., & Meena, V. D. (2015). Rhizosphere Effect on Nutrient Availability in Soil and Its Uptake by Plants: A Review. *Proceedings of the National Academy of Sciences India Section B - Biological Sciences*, 85(1), 1–12. <https://doi.org/10.1007/s40011-013-0297-0>
- Dubey, B. N., Agustoni, E., Böhm, R., Kaczmarczyk, A., Mangia, F., von Arx, C., Jenal, U., Hiller, S., Plaza-Menacho, I., & Schirmer, T. (2020). Hybrid histidine kinase activation by cyclic di-GMP-mediated domain liberation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(2), 1000–1008. <https://doi.org/10.1073/pnas.1911427117>
- Dutta, R., Qin, L., & Inouye, M. (1999). Histidine kinases: Diversity of domain organization. *Molecular Microbiology*, 34(4), 633–640. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01646.x>
- Egamberdieva, D., Wirth, S. J., Alqarawi, A. A., Abd-Allah, E. F., & Hashem, A. (2017). Phytohormones and beneficial microbes: Essential components for plants to balance stress and fitness. *Frontiers in Microbiology*, 8(OCT), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02104>
- Ephanie Borland, S., Prigent-Combaret, C., & Wisniewski-Dy, F. (2016). *Bacterial hybrid histidine kinases in plant-bacteria interactions*. 162, 1715–1734. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000370>
- Eugenia, C. B. (2016). *Benemérita Universidad Autónoma de Puebla Facultad de Medicina Licenciatura en Biomedicina Instituto de Investigación en Ciencias Microbiológicas Laboratorio de Interacción Bacteria-Planta “OBTENCIÓN DE LA MUTACIÓN DEL GEN Hsk B de Azospirillum brasilens*.
- Fani, R., Allotta, G., Bazzicalupo, M., Ricci, F., Schipani, C., & Polsinelli, M. (1989). Nucleotide sequence of the gene encoding the nitrogenase iron protein (nifH) of *Azospirillum brasilense* and identification of a region controlling nifH transcription. *MGG Molecular & General Genetics*, 220(1), 81–87. <https://doi.org/10.1007/BF00260860>
- FAO. (2017). The future of food and agriculture: Trends and challenges. In *United Nations*. [https://doi.org/ISBN 978-92-5-109551-5](https://doi.org/ISBN%20978-92-5-109551-5)
- 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>
- Flemming, H. C., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8(9), 623–633. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>
- Foster, J. E., Sheng, Q., McClain, J. R., Bures, M., Nicas, T. I., Henry, K., Winkler, M. E., & Gilmour, R. (2004). Kinetic and mechanistic analyses of new classes of inhibitors of two-component signal transduction systems using a coupled assay containing HpkA-DrrA from *Thermotoga maritima*. *Microbiology*, 150(4), 885–896. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26824-0>
- Galperin, M. Y. (2010). Diversity of structure and function of response regulator output domains. *Current Opinion in Microbiology*, 13(2), 150–159. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.01.005>
- Galperin, M. Y., Makarova, K. S., Wolf, Y. I., & Koonin, E. V. (2018). Phyletic distribution and lineage-specific domain architectures of archaeal two-component signal transduction systems. *Journal of Bacteriology*, 200(7), 1–16. <https://doi.org/10.1128/JB.00681-17>
- Gamboa-Pérez, A. (2014). *DOMINIOS GGDEF EN CRECIMIENTO DE Azospirillum brasilense PRESENTA :*
- Giovannetti, L., Fedi, S., Gori, A., Montaini, P., & Ventura, S. (1992). Identification of *Azospirillum* Strains at the Genome Level with Total DNA Restriction Pattern Analysis. *Systematic and*

Applied Microbiology, 15(1), 37–41. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(11\)80135-9](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(11)80135-9)

- Goswami, D., Thakker, J. N., & Dhandhukia, P. C. (2016). Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. *Cogent Food & Agriculture*, 2(1), 1–19. <https://doi.org/10.1080/23311932.2015.1127500>
- Haddad, Y., Adam, V., & Heger, Z. (2020). Ten quick tips for homology modeling of high-resolution protein 3D structures. *PLoS Computational Biology*, 16(4). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PCBI.1007449>
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, 166(4), 557–580. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(83\)80284-8](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(83)80284-8)
- Hariharan, V. N., Yadav, R., Thakur, C., Singh, A., Gopinathan, R., Singh, D. P., Sankhe, G., Malhotra, V., Chandra, N., Bhatt, A., & Saini, D. K. (2021). Cyclic di-GMP sensing histidine kinase PdtA controls mycobacterial adaptation to carbon sources. *The FASEB Journal*, 35(4), e21475. <https://doi.org/10.1096/FJ.202002537RR>
- Hartmann, A., & Baldani, J. I. (2006). The Genus *Azospirillum*. *The Prokaryotes*, 5, 115–140. https://doi.org/10.1007/0-387-30745-1_6
- Hauwaerts, D., Alexandre, G., Das, S. K., Vanderleyden, J., & Zhulin, I. B. (2002). A major chemotaxis gene cluster in *Azospirillum brasilense* and relationships between chemotaxis operons in α -proteobacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 208(1), 61–67. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(01\)00578-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(01)00578-X)
- He, L., Dai, K., Wen, X., Ding, L., Cao, S., Huang, X., Wu, R., Zhao, Q., Huang, Y., Yan, Q., Ma, X., Han, X., & Wen, Y. (2018). QseC mediates osmotic stress resistance and biofilm formation in *Haemophilus parasuis*. *Frontiers in Microbiology*, 9(FEB), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00212>
- Henry, J. T., & Crosson, S. (2011). Ligand-binding PAS domains in a genomic, cellular, and structural context. *Annual Review of Microbiology*, 65, 261–286. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-121809-151631>
- Ishida, M. L., Assumpção, M. C., Machado, H. B., Benelli, E. M., Souza, E. M., & Pedrosa, F. O. (2002). Identification and characterization of the two-component NtrY/NtrX regulatory system in *Azospirillum brasilense*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 35(6), 651–661. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2002000600004>
- J, F. (1985). Confidence Limits on Phylogenies : An Approach Using the Bootstrap Author (s) : Joseph Felsenstein Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/2408678> . *Evolution*, 39(4), 783–791.
- Jijón-Moreno, S. (2017). *Protocolos de biología molecular bacteriana*. 1–75.
- 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>
- Jijón-Moreno, S., Marcos-Jiménez, C., Pedraza, R. O., Ramírez-Mata, A., de Salamone, I. G., Fernández-Scavino, A., Vásquez-Hernández, C. A., Soto-Urzúa, L., & Baca, B. E. (2015). The *ipdC*, *hisC1* and *hisC2* genes involved in indole-3-acetic production used as alternative phylogenetic markers in *Azospirillum brasilense*. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 107(6), 1501–1517. <https://doi.org/10.1007/s10482-015-0444-0>
- Kanacher, T., Schultz, A., Linder, J. U., & Schultz, J. E. (2002). A GAF-domain-regulated adenylyl cyclase from *Anabaena* is a self-activating cAMP switch. *EMBO Journal*, 21(14), 3672–3680.

<https://doi.org/10.1093/emboj/cdf375>

- Kaur, K., Kumari, P., Sharma, S., Sehgal, S., & Tyagi, J. S. (2016). DevS/DosS sensor is bifunctional and its phosphatase activity precludes aerobic DevR/DosR regulon expression in *Mycobacterium tuberculosis*. *The FEBS Journal*, *283*(15), 2949–2962. <https://doi.org/10.1111/FEBS.13787>
- Keshav, P. S., Shivesh, S., N, Kumar, S., Vasudha, S., Kirti, T., & Sphoorti, S. (2013). Nature and role of root exudates: Efficacy in bioremediation. *African Journal of Biotechnology*, *10*(48), 9717–9724. <https://doi.org/10.5897/AJB10.2552>
- Kim, Y., Tesar, C., Buck, K., Joachimiak, A., M. C. for S. G. (MCSG). (2010). *Crystal Structure of Sensory Box Histidine Kinase/Response Regulator from Burkholderia thailandensis E264*. <https://www.rcsb.org/structure/3MR0>
- Kim, D. J., & Forst, S. (2001). Genomic analysis of the histidine kinase family in bacteria and archaea. *Microbiology*, *147*(5), 1197–1212. <https://doi.org/10.1099/00221287-147-5-1197>
- Kim, J. R., & Cho, K. H. (2006). The multi-step phosphorelay mechanism of unorthodox two-component systems in *E. coli* realizes ultrasensitivity to stimuli while maintaining robustness to noises. *Computational Biology and Chemistry*, *30*(6), 438–444. <https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2006.09.004>
- Krell, T., Lacal, J., Busch, A., Silva-Jiménez, H., Guazzaroni, M.-E., & Ramos, J. L. (2010). Bacterial Sensor Kinases: Diversity in the Recognition of Environmental Signals. *Annual Review of Microbiology*, *64*(1), 539–559. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.112408.134054>
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, *33*(7), 1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- Kumar, S., Tamura, K., Jakobsen, I. B., & Nei, M. (2002). MEGA2: Molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics*, *17*(12), 1244–1245. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/17.12.1244>
- Leuven, K. U., & Croylaan, W. De. (1995). *Q-JJ*. *21*, 1–18.
- Li, H., Xue, D., Tian, F., Yuan, X., Yang, F., Chen, H., Hutchins, W., Yang, C.-H., & He, C. (2019). *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* Response Regulator TriP Regulates Virulence and Exopolysaccharide Production Via Interacting With c-di-GMP Phosphodiesterase PdeR. *32*(6), 729–739. <https://doi.org/10.1094/MPMI-09-18-0260-R>
- Lin, H., Deng, E. Z., Ding, H., Chen, W., & Chou, K. C. (2014). IPro54-PseKNC: A sequence-based predictor for identifying sigma-54 promoters in prokaryote with pseudo k-tuple nucleotide composition. *Nucleic Acids Research*, *42*(21), 12961–12972. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1019>
- Lutz, E. (2017). *CHARACTERIZATION OF THE CHEA2 CHEMOTAXIS OPERON IN AZOSPIRILLUM BRASILENSE*.
- Lynch, J. M., & Whipps, J. M. (1990). Substrate flow in the rhizosphere. *Plant and Soil*, *129*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1007/BF00011685>
- Majdalani, N., & Gottesman, S. (2005). THE RCS PHOSPHORELAY: A Complex Signal Transduction System. *Annual Review of Microbiology*, *59*(1), 379–405. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.59.050405.101230>
- Maroniche, G. A., García, J. E., Salcedo, F., & Creus, C. M. (2017). Molecular identification of *Azospirillum* spp.: Limitations of 16S rRNA and qualities of rpoD as genetic markers. *Microbiological Research*, *195*, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.11.009>

- Martín-Mora, D., Fernández, M., Velando, F., Ortega, Á., Gavira, J. A., Matilla, M. A., & Krell, T. (2018). Functional annotation of bacterial signal transduction systems: Progress and challenges. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(12), 1–22. <https://doi.org/10.3390/ijms19123755>
- Mascher, T., Helmann, J. D., & Uden, G. (2006). Stimulus Perception in Bacterial Signal-Transducing Histidine Kinases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *70*(4), 910–938. <https://doi.org/10.1128/mubr.00020-06>
- McNear Jr, D. H. (2013). *The Rhizosphere - Roots, Soil and Everything In Between*. Nature Education Knowledge. <https://www.nature.com/scitable/knowledge/library/the-rhizosphere-roots-soil-and-67500617/>
- Mukherjee, T., Kumar, D., Burriss, N., Xie, Z., & Alexandre, G. (2016). Azospirillum brasilense chemotaxis depends on two signaling pathways regulating distinct motility parameters. *Journal of Bacteriology*, *198*(12), 1764–1772. <https://doi.org/10.1128/JB.00020-16>
- Nussinov et al. (2017). 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. *Physiology & Behavior*, *176*(10), 139–148. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(06\)22003-2](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(06)22003-2). Identification
- Okajima, T., Doi, A., Okada, A., Gotoh, Y., Tanizawa, K., & Utsumi, R. (2008). Response regulator YycF essential for bacterial growth: X-ray crystal structure of the DNA-binding domain and its PhoB-like DNA recognition motif. *FEBS Letters*, *582*(23–24), 3434–3438. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.09.007>
- Paget, S. M., & Helmann, J. D. (2003). The $\sigma 70$ family of sigma factors. *Protein Family Review*, *4*(1), 203. [https://doi.org/10.1016/0022-3115\(86\)90027-9](https://doi.org/10.1016/0022-3115(86)90027-9)
- Pedraza, R. O., Filippone, M. P., Fontana, C., Salazar, S. M., Ramírez-Mata, A., Sierra-Cacho, D., & Baca, B. E. (2020). Azospirillum. In *Beneficial Microbes in Agro-Ecology*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-823414-3.00006-x>
- Philippot, L., Raaijmakers, J. M., Lemanceau, P., & Van Der Putten, W. H. (2013). Going back to the roots: The microbial ecology of the rhizosphere. *Nature Reviews Microbiology*, *11*(11), 789–799. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3109>
- Ponchon, L., Beauvais, G., Nonin-Lecomte, S., & Dardel, F. (2009). A generic protocol for the expression and purification of recombinant RNA in Escherichia coli using a tRNA scaffold. *Nature Protocols*, *4*(6), 947–959. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.67>
- Porter, S. L., Wadhams, G. H., & Armitage, J. P. (2011). Signal processing in complex chemotaxis pathways. *Nature Reviews Microbiology*, *9*(3), 153–165. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2505>
- Prieto-Martínez, F. D., Arciniega, M., & Medina-Franco, J. L. (2018). Acoplamiento Molecular: Avances Recientes y Retos. *TIP Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, *21*, 65–87. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2018.0.143>
- Promega Corporation. (2018). pGEM(R)-T and pGEM(R)-T Easy Vector Systems Technical Manual. *Instructions for the Use of Products*, 1–29. https://www.promega.co.uk/~media/files/resources/protocols/technical_manuals/0/pgem-t_and_pgem-t_easy_vector_systems_protocol.pdf
- 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), 190–201. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2015.12.004>
- 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>

- Ribaudo, C. M., Krumpholz, E. M., Cassán, F. D., Bottini, R., Cantore, M. L., & Curá, J. A. (2006). Azospirillum sp. Promotes root hair development in tomato plants through a mechanism that involves ethylene. *Journal of Plant Growth Regulation*, 25(2), 175–185. <https://doi.org/10.1007/s00344-005-0128-5>
- Rizvi, S. M., Shazi, S., & Mohd., H. (2013). a Simple Click By Click Protocol To Perform Docking : *EXCLI Journal*, 12, 831–857.
- Salgado, H., Moreno-Hagelsieb, G., Smith, T. F., & Collado-Vides, J. (2000). Operons in Escherichia coli: Genomic analyses and predictions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(12), 6652–6657. <https://doi.org/10.1073/pnas.110147297>
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. M. (1989). Protocol 20: Dephosphorylation of Plasmid DNA. In *Molecular Cloning A Laboratory Manual* (pp. 1.93-1.97).
- Scharf, B. E., Hynes, M. F., & Alexandre, G. M. (2016). Chemotaxis signaling systems in model beneficial plant–bacteria associations. *Plant Molecular Biology*, 90(6), 549–559. <https://doi.org/10.1007/s11103-016-0432-4>
- Schramm, A., Lee, B., & Higgs, P. I. (2012). Intra- and interprotein phosphorylation between two-hybrid histidine kinases controls myxococcus xanthus developmental progression. *Journal of Biological Chemistry*, 287(30), 25060–25072. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.387241>
- Scior, T., Martínez Morales, E., & Salinas Stefanón, E. (2007). Los modelos in silico , una herramienta. *Elementos*, 68(January), 45–48.
- Semagn, K. (2014). Leaf Tissue Sampling and DNA Extraction Protocols. In: *Molecular Plant Taxonomy Methods and Protocols*. In *Molecular Plant Taxonomy: Methods and Protocols* (Vol. 1115).
- Sessitsch, A., Brader, G., Pfaffenbichler, N., Gusenbauer, D., & Mitter, B. (2018). The contribution of plant microbiota to economy growth. *Microbial Biotechnology*. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13290>
- Sevilla, E., Silva-Jiménez, H., Duque, E., Krell, T., & Rojo, F. (2013). The Pseudomonas putida HskA hybrid sensor kinase controls the composition of the electron transport chain. *Environmental Microbiology Reports*, 5(2), 291–300. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12017>
- Shukla, M., Patel, R. H., Verma, R., Deewan, P., & Dotaniya, M. L. (2013). Effect of bio-organics and chemical fertilizers on growth and yield of chickpea (Cicer arietinum L.) under middle Gujarat conditions. *Vegetos*, 26(1), 183–187. <https://doi.org/10.5958/j.2229-4473.26.1.026>
- Singh, S., Singh, S. K., Chowdhury, I., & Singh, R. (2017). Understanding the Mechanism of Bacterial Biofilms Resistance to Antimicrobial Agents. *The Open Microbiology Journal*, 11(1), 53–62. <https://doi.org/10.2174/1874285801711010053>
- Steinbu, A. (2010). Microbiology Monographs Series Editor : Alexander Steinbu. In *Molecular Microbiology* (Vol. 20). <https://doi.org/10.1007/978-3-662-45209-7>
- Tao, J., Li, C., Luo, C., & He, C. (2014). RavA/RavR two-component system regulates Xanthomonas campestris pathogenesis and c-di-GMP turnover. *FEMS Microbiology Letters*, 358(1), 81–90. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12529>
- Tipton, K. A., & Rather, P. N. (2017). An ompR-envZ Two-Component System Ortholog Regulates Phase Variation, Osmotic Tolerance, Motility, and Virulence in Acinetobacter baumannii Strain AB5075. *199*(3), 1–16. <https://doi.org/10.1128/JB.00705-16>
- Trajtenberg, F., Graña, M., Ruétalo, N., Botti, H., & Buschiazzo, A. (2010). Structural and enzymatic

- insights into the ATP binding and autophosphorylation mechanism of a sensor histidine kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 285(32), 24892–24903. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.147843>
- Ungewitter, E., Scrable, H., Carter, A. J. R., Nguyen, A. Q., Bash, E., Eslava-Schmalbalch, J., Alzate, J. P., Bosques, C., Lomas, D., Beneficiario, B., Brown, T., Castro, L., Miguel, N., Toro, Á., Austad, S. N., & Watson, J. D. (2015). LA DOBLE HÉLICE James D. Watson. *PhD Proposal*, 12(1), 10–17. <https://eventos.redclara.net/indico/event/224/material/slides/20.pdf%5Cnhttp://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1578155010700346%5Cnhttp://www.biomedcentral.com/1471-2350/12/160>
- Urbanczyk, H., Ast, J. C., Kaeding, A. J., Oliver, J. D., & Dunlap, P. V. (2008). Phylogenetic analysis of the incidence of lux gene horizontal transfer in Vibrionaceae. *Journal of Bacteriology*, 190(10), 3494–3504. <https://doi.org/10.1128/JB.00101-08>
- Vieille, C., & Elmerich, C. (1990). Characterization of two Azospirillum brasilense Sp7 plasmid genes homologous to Rhizobium meliloti nodPQ. In *Molecular plant-microbe interactions: MPMI* (Vol. 3, Issue 6, pp. 389–400). <https://doi.org/10.1094/MPMI-3-389>
- Wager, M. G. T. and J. F. S. (2011). 基因的改变 NIH Public Access. *Bone*, 23(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2009.12.011.Evolution>
- Wallace, A. C., Laskowski, R. A., & Thornton, J. M. (1995). Ligplot: A program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. *Protein Engineering, Design and Selection*, 8(2), 127–134. <https://doi.org/10.1093/protein/8.2.127>
- 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>
- Woese, C. R., Stackebrandt, E., Weisburg, W. G., Paster, B. J., Madigan, M. T., Fowler, V. J., Hahn, C. M., Blanz, P., Gupta, R., Nealson, K. H., & Fox, G. E. (1984). The phylogeny of purple bacteria: The alpha subdivision. *Systematic and Applied Microbiology*, 5(3), 315–326. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(84\)80034-X](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(84)80034-X)
- Xia, Y., Embley, T. M., & O'Donnell, A. G. (1994). Phylogenetic Analysis of Azospirillum by Direct Sequencing of PCR Amplified 16S rDNA. *Systematic and Applied Microbiology*, 17(2), 197–201. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(11\)80007-X](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(11)80007-X)
- Xie, G., Keyhani, N. O., Bonner, C. A., & Jensen, R. A. (2003). Ancient Origin of the Tryptophan Operon and the Dynamics of Evolutionary Change. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(3), 303–342. <https://doi.org/10.1128/mnbr.67.3.303-342.2003>
- Zhang, X. J., Cahill, K. B., Elfenbein, A., Arshavsky, V. Y., & Cote, R. H. (2008). Direct allosteric regulation between the GAF domain and catalytic domain of photoreceptor phosphodiesterase PDE6. *Journal of Biological Chemistry*, 283(44), 29699–29705. <https://doi.org/10.1074/jbc.M803948200>
- Zschiedrich, C. P., Keidel, V., & Szurmant, H. (2016). Molecular Mechanisms of Two-Component Signal Transduction. *Journal of Molecular Biology*, 428(19), 3752–3775. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.08.003>
- Acosta-Cruz, E., Wisniewski-Dyé, F., Rouy, Z., Barbe, V., Valdés, M., & Mavingui, P. (2012). Insights into the 1.59-Mbp largest plasmid of azospirillum brasilense CBG497. *Archives of Microbiology*, 194(9), 725–736. <https://doi.org/10.1007/s00203-012-0805-2>

- Adebali, O., Petukh, M. G., Reznik, A. O., Tishkov, A. V., Upadhyay, A. A., & Zhulin, I. B. (2017). Class III histidine kinases: A recently accessorized kinase domain in putative modulators of type IV pilus-based motility. *Journal of Bacteriology*, *199*(18), 1–12. <https://doi.org/10.1128/JB.00218-17>
- Ávalos-Rangel, M. Á. (2015). PARTICIPACIÓN DE LA DIGUANILATO CICLASA DE A .
- Baldani, J. I., Baldani, V. L. D., Seldin, L., & Dobereiner, A. N. D. J. (1986). *a Root- Associated Nitrogen-Fixing Bacterium*. 86–93.
- Barrios, H., Valderrama, B., & Morett, E. (1999). Compilation and analysis of σ 54-dependent promoter sequences. *Nucleic Acids Research*, *27*(22), 4305–4313. <https://doi.org/10.1093/nar/27.22.4305>
- Berg, D. E. B. & C. M. (1983). © 19 8 3 Nature Publishing Group <http://www.nature.com/naturebiotechnology>. *Nature*, *1*(1), 417–435.
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N., & Bourne, P. E. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*, *28*(1), 235–242. <https://doi.org/10.1093/NAR/28.1.235>
- Bhate, M. A. P., Molnar, K. A. S., Goulian, M., & Degrado, W. F. (2015). Signal Transduction in Histidine Kinases: Insights from New Structures. *Structure*, *23*(6), 981–996. <https://doi.org/10.1016/j.str.2015.04.002>
- Bible, A., Russell, M. H., & Alexandre, G. (2012). The Azospirillum brasilense Che1 chemotaxis pathway controls swimming velocity, which affects transient cell-to-cell clumping. *Journal of Bacteriology*, *194*(13), 3343–3355. <https://doi.org/10.1128/JB.00310-12>
- 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>
- Cai, Y., Su, M., Ahmad, A., Hu, X., Sang, J., Kong, L., Chen, X., Wang, C., Shuai, J., & Han, A. (2017). Conformational dynamics of the essential sensor histidine kinase WalkK. *Acta Crystallographica Section D: Structural Biology*, *73*(10), 793–803. <https://doi.org/10.1107/S2059798317013043>
- Capra, E. J., & Laub, M. T. (2012). Evolution of Two-Component Signal Transduction Systems. *Annual Review of Microbiology*, *66*(1), 325–347. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092611-150039>
- Casino, P., Miguel-Romero, L., & Marina, A. (2014). Visualizing autophosphorylation in histidine kinases. *Nature Communications*, *5*, 1–11. <https://doi.org/10.1038/ncomms4258>
- Cassán, F. D., Okon, Y., & Creus, C. M. (2015). *Handbook for Azospirillum Technical issues and protocols*. Springer US. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-06542-7>
- Chattopadhyay, S., Mukherjee, A., & Ghosh, S. (1994). Molecular cloning and sequencing of an operon, carRS of Azospirillum brasilense, that codes for a novel two-component regulatory system: Demonstration of a positive regulatory role of carR for global control of carbohydrate catabolism. *Journal of Bacteriology*, *176*(24), 7484–7490. <https://doi.org/10.1128/jb.176.24.7484-7490.1994>
- Chen, H. J., Li, N., Luo, Y., Jiang, Y. L., Zhou, C. Z., Chen, Y., & Li, Q. (2018). The GDP-switched GAF domain of DcpA modulates the concerted synthesis/hydrolysis of c-di-GMP in Mycobacterium smegmatis. In *Biochemical Journal* (Vol. 475, Issue 7). <https://doi.org/10.1042/BCJ20180079>
- Chen, S. K., Guan, H. H., Wu, P. H., Lin, L. T., Wu, M. C., Chang, H. Y., Chen, N. C., Lin, C. C.,

- Chuankhayan, P., Huang, Y. C., Lin, P. J., & Chen, C. J. (2020). Structural insights into the histidine-containing phosphotransfer protein and receiver domain of sensor histidine kinase suggest a complex model in the two-component regulatory system in *Pseudomonas aeruginosa*. *IUCrJ*, 7, 934–948. <https://doi.org/10.1107/S2052252520009665>
- Chen, Y., Liu, S., Liu, C., Huang, Y., Chi, K., Su, T., Zhu, D., Peng, J., Xia, Z., He, J., Xu, S., Hu, W., & Gu, L. (2016a). Dcsbis (PA2771) from *Pseudomonas aeruginosa* is a highly active diguanylate cyclase with unique activity regulation. *Scientific Reports*, 6(June), 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep29499>
- Chen, Y., Liu, S., Liu, C., Huang, Y., Chi, K., Su, T., Zhu, D., Peng, J., Xia, Z., He, J., Xu, S., Hu, W., & Gu, L. (2016b). Dcsbis (PA2771) from *Pseudomonas aeruginosa* is a highly active diguanylate cyclase with unique activity regulation. *Scientific Reports*, 6(June), 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep29499>
- Cheng, S. T., Wang, F. F., & Qian, W. (2019). Cyclic-di-GMP binds to histidine kinase RavS to control RavS-RavR phosphotransfer and regulates the bacterial lifestyle transition between virulence and swimming. *PLoS Pathogens*, 15(8), 1–30. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007952>
- Cheung, J., & Hendrickson, W. A. (2010). Sensor domains of two-component regulatory systems. *Current Opinion in Microbiology*, 13(2), 116–123. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.01.016>
- Cho, H. Y., Cho, H. J., Kim, Y. M., Oh, J. II, & Kang, B. S. (2009). Structural insight into the Heme-based redox sensing by DosS from *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Biological Chemistry*, 284(19), 13057–13067. <https://doi.org/10.1074/jbc.M808905200>
- Cordero-Rivera, C. D. (2016). *OBTENCIÓN DE LA MUTACIÓN DEL GEN Hsk B de Azospirillum brasilense*.
- Cui, Y., Tu, R., Wu, L., Hong, Y., & Chen, S. (2011). A hybrid two-component system protein from *Azospirillum brasilense* Sp7 was involved in chemotaxis. *Microbiological Research*, 166(6), 458–467. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2010.08.006>
- Danhorn, T., & Fuqua, C. (2007). Biofilm formation by plant-associated bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 61, 401–422. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.61.080706.093316>
- dos Santos Ferreira, N., Hayashi Sant' Anna, F., Massena Reis, V., Ambrosini, A., Gazolla Volpiano, C., Rothballer, M., Schwab, S., Baura, V. A., Balsanelli, E., Pedrosa, F. de O., Pereira Passaglia, L. M., Maltempi de Souza, E., 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>
- Dotaniya, M. L., & Meena, V. D. (2015). Rhizosphere Effect on Nutrient Availability in Soil and Its Uptake by Plants: A Review. *Proceedings of the National Academy of Sciences India Section B - Biological Sciences*, 85(1), 1–12. <https://doi.org/10.1007/s40011-013-0297-0>
- Dubey, B. N., Agustoni, E., Böhm, R., Kaczmarczyk, A., Mangia, F., von Arx, C., Jenal, U., Hiller, S., Plaza-Menacho, I., & Schirmer, T. (2020). Hybrid histidine kinase activation by cyclic di-GMP-mediated domain liberation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(2), 1000–1008. <https://doi.org/10.1073/pnas.1911427117>
- Dutta, R., Qin, L., & Inouye, M. (1999). Histidine kinases: Diversity of domain organization. *Molecular Microbiology*, 34(4), 633–640. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01646.x>
- Egamberdieva, D., Wirth, S. J., Alqarawi, A. A., Abd-Allah, E. F., & Hashem, A. (2017). Phytohormones and beneficial microbes: Essential components for plants to balance stress and fitness. *Frontiers in Microbiology*, 8(OCT), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02104>

- Ephanie Borland, S., Prigent-Combaret, C., & Wisniewski-Dy, F. (2016). *Bacterial hybrid histidine kinases in plant-bacteria interactions*. 162, 1715–1734. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000370>
- Eugenia, C. B. (2016). *Benemérita Universidad Autónoma de Puebla Facultad de Medicina Licenciatura en Biomedicina Instituto de Investigación en Ciencias Microbiológicas Laboratorio de Interacción Bacteria-Planta “OBTENCIÓN DE LA MUTACIÓN DEL GEN Hsk B de Azospirillum brasilense*.
- Fani, R., Allotta, G., Bazzicalupo, M., Ricci, F., Schipani, C., & Polsinelli, M. (1989). Nucleotide sequence of the gene encoding the nitrogenase iron protein (nifH) of *Azospirillum brasilense* and identification of a region controlling nifH transcription. *MGG Molecular & General Genetics*, 220(1), 81–87. <https://doi.org/10.1007/BF00260860>
- FAO. (2017). The future of food and agriculture: Trends and challenges. In *United Nations*. <https://doi.org/ISBN 978-92-5-109551-5>
- 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>
- Flemming, H. C., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8(9), 623–633. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>
- Foster, J. E., Sheng, Q., McClain, J. R., Bures, M., Nicas, T. I., Henry, K., Winkler, M. E., & Gilmour, R. (2004). Kinetic and mechanistic analyses of new classes of inhibitors of two-component signal transduction systems using a coupled assay containing HpkA-DrrA from *Thermotoga maritima*. *Microbiology*, 150(4), 885–896. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26824-0>
- Galperin, M. Y. (2010). Diversity of structure and function of response regulator output domains. *Current Opinion in Microbiology*, 13(2), 150–159. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.01.005>
- Galperin, M. Y., Makarova, K. S., Wolf, Y. I., & Koonin, E. V. (2018). Phyletic distribution and lineage-specific domain architectures of archaeal two-component signal transduction systems. *Journal of Bacteriology*, 200(7), 1–16. <https://doi.org/10.1128/JB.00681-17>
- Gamboa-Pérez, A. (2014). *DOMINIOS GGDEF EN CRECIMIENTO DE Azospirillum brasilense PRESENTA :*
- Giovannetti, L., Fedi, S., Gori, A., Montaini, P., & Ventura, S. (1992). Identification of *Azospirillum* Strains at the Genome Level with Total DNA Restriction Pattern Analysis. *Systematic and Applied Microbiology*, 15(1), 37–41. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(11\)80135-9](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(11)80135-9)
- Goswami, D., Thakker, J. N., & Dhandhukia, P. C. (2016). Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. *Cogent Food & Agriculture*, 2(1), 1–19. <https://doi.org/10.1080/23311932.2015.1127500>
- Haddad, Y., Adam, V., & Heger, Z. (2020). Ten quick tips for homology modeling of high-resolution protein 3D structures. *PLoS Computational Biology*, 16(4). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PCBI.1007449>
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, 166(4), 557–580. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(83\)80284-8](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(83)80284-8)
- Hariharan, V. N., Yadav, R., Thakur, C., Singh, A., Gopinathan, R., Singh, D. P., Sankhe, G., Malhotra, V., Chandra, N., Bhatt, A., & Saini, D. K. (2021). Cyclic di-GMP sensing histidine kinase PtdaS controls mycobacterial adaptation to carbon sources. *The FASEB Journal*, 35(4), e21475. <https://doi.org/10.1096/FJ.202002537RR>

- Hartmann, A., & Baldani, J. I. (2006). The Genus *Azospirillum*. *The Prokaryotes*, 5, 115–140. https://doi.org/10.1007/0-387-30745-1_6
- Hauwaerts, D., Alexandre, G., Das, S. K., Vanderleyden, J., & Zhulin, I. B. (2002). A major chemotaxis gene cluster in *Azospirillum brasilense* and relationships between chemotaxis operons in α -proteobacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 208(1), 61–67. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(01\)00578-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(01)00578-X)
- He, L., Dai, K., Wen, X., Ding, L., Cao, S., Huang, X., Wu, R., Zhao, Q., Huang, Y., Yan, Q., Ma, X., Han, X., & Wen, Y. (2018). QseC mediates osmotic stress resistance and biofilm formation in *Haemophilus parasuis*. *Frontiers in Microbiology*, 9(FEB), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00212>
- Henry, J. T., & Crosson, S. (2011). Ligand-binding PAS domains in a genomic, cellular, and structural context. *Annual Review of Microbiology*, 65, 261–286. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-121809-151631>
- Ishida, M. L., Assumpção, M. C., Machado, H. B., Benelli, E. M., Souza, E. M., & Pedrosa, F. O. (2002). Identification and characterization of the two-component NtrY/NtrX regulatory system in *Azospirillum brasilense*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 35(6), 651–661. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2002000600004>
- J, F. (1985). Confidence Limits on Phylogenies : An Approach Using the Bootstrap Author (s): Joseph Felsenstein Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/2408678> . *Evolution*, 39(4), 783–791.
- Jijón-Moreno, S. (2017). *Protocolos de biología molecular bacteriana*. 1–75.
- 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>
- Jijón-Moreno, S., Marcos-Jiménez, C., Pedraza, R. O., Ramírez-Mata, A., de Salamone, I. G., Fernández-Scavino, A., Vásquez-Hernández, C. A., Soto-Urzúa, L., & Baca, B. E. (2015). The *ipdC*, *hisC1* and *hisC2* genes involved in indole-3-acetic production used as alternative phylogenetic markers in *Azospirillum brasilense*. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 107(6), 1501–1517. <https://doi.org/10.1007/s10482-015-0444-0>
- Kanacher, T., Schultz, A., Linder, J. U., & Schultz, J. E. (2002). A GAF-domain-regulated adenylyl cyclase from *Anabaena* is a self-activating cAMP switch. *EMBO Journal*, 21(14), 3672–3680. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf375>
- Kaur, K., Kumari, P., Sharma, S., Sehgal, S., & Tyagi, J. S. (2016). DevS/DosS sensor is bifunctional and its phosphatase activity precludes aerobic DevR/DosR regulon expression in *Mycobacterium tuberculosis*. *The FEBS Journal*, 283(15), 2949–2962. <https://doi.org/10.1111/FEBS.13787>
- Keshav, P. S., Shivesh, S., N, Kumar, S., Vasudha, S., Kirti, T., & Sphoorti, S. (2013). Nature and role of root exudates: Efficacy in bioremediation. *African Journal of Biotechnology*, 10(48), 9717–9724. <https://doi.org/10.5897/AJB10.2552>
- Kim, Y., Tesar, C., Buck, K., Joachimiak, A., M. C. for S. G. (MCSG). (2010). *Crystal Structure of Sensory Box Histidine Kinase/Response Regulator from Burkholderia thailandensis E264*. <https://www.rcsb.org/structure/3MR0>
- Kim, D. J., & Forst, S. (2001). Genomic analysis of the histidine kinase family in bacteria and archaea. *Microbiology*, 147(5), 1197–1212. <https://doi.org/10.1099/00221287-147-5-1197>

- Kim, J. R., & Cho, K. H. (2006). The multi-step phosphorelay mechanism of unorthodox two-component systems in *E. coli* realizes ultrasensitivity to stimuli while maintaining robustness to noises. *Computational Biology and Chemistry*, 30(6), 438–444. <https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2006.09.004>
- Krell, T., Lacal, J., Busch, A., Silva-Jiménez, H., Guazzaroni, M.-E., & Ramos, J. L. (2010). Bacterial Sensor Kinases: Diversity in the Recognition of Environmental Signals. *Annual Review of Microbiology*, 64(1), 539–559. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.112408.134054>
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), 1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- Kumar, S., Tamura, K., Jakobsen, I. B., & Nei, M. (2002). MEGA2: Molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics*, 17(12), 1244–1245. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/17.12.1244>
- Leuven, K. U., & Croylaan, W. De. (1995). *Q-JJ*. 21, 1–18.
- Li, H., Xue, D., Tian, F., Yuan, X., Yang, F., Chen, H., Hutchins, W., Yang, C.-H., & He, C. (2019). *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* Response Regulator TriP Regulates Virulence and Exopolysaccharide Production Via Interacting With c-di-GMP Phosphodiesterase PdeR. 32(6), 729–739. <https://doi.org/10.1094/MPMI-09-18-0260-R>
- Lin, H., Deng, E. Z., Ding, H., Chen, W., & Chou, K. C. (2014). IPro54-PseKNC: A sequence-based predictor for identifying sigma-54 promoters in prokaryote with pseudo k-tuple nucleotide composition. *Nucleic Acids Research*, 42(21), 12961–12972. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1019>
- Lutz, E. (2017). *CHARACTERIZATION OF THE CHEA2 CHEMOTAXIS OPERON IN AZOSPIRILLUM BRASILENSE*.
- Lynch, J. M., & Whipps, J. M. (1990). Substrate flow in the rhizosphere. *Plant and Soil*, 129(1), 1–10. <https://doi.org/10.1007/BF00011685>
- Majdalani, N., & Gottesman, S. (2005). THE RCS PHOSPHORELAY: A Complex Signal Transduction System. *Annual Review of Microbiology*, 59(1), 379–405. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.59.050405.101230>
- Maroniche, G. A., García, J. E., Salcedo, F., & Creus, C. M. (2017). Molecular identification of *Azospirillum* spp.: Limitations of 16S rRNA and qualities of rpoD as genetic markers. *Microbiological Research*, 195, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.11.009>
- Martín-Mora, D., Fernández, M., Velando, F., Ortega, Á., Gavira, J. A., Matilla, M. A., & Krell, T. (2018). Functional annotation of bacterial signal transduction systems: Progress and challenges. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(12), 1–22. <https://doi.org/10.3390/ijms19123755>
- Mascher, T., Helmann, J. D., & Udden, G. (2006). Stimulus Perception in Bacterial Signal-Transducing Histidine Kinases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70(4), 910–938. <https://doi.org/10.1128/mubr.00020-06>
- McNear Jr, D. H. (2013). *The Rhizosphere - Roots, Soil and Everything In Between*. Nature Education Knowledge. <https://www.nature.com/scitable/knowledge/library/the-rhizosphere-roots-soil-and-67500617/>
- Mukherjee, T., Kumar, D., Burriss, N., Xie, Z., & Alexandre, G. (2016). *Azospirillum brasilense* chemotaxis depends on two signaling pathways regulating distinct motility parameters. *Journal of Bacteriology*, 198(12), 1764–1772. <https://doi.org/10.1128/JB.00020-16>

- Nussinov et al. (2017). 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. *Physiology & Behavior*, 176(10), 139–148. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(06\)22003-2](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(06)22003-2). Identification
- Okajima, T., Doi, A., Okada, A., Gotoh, Y., Tanizawa, K., & Utsumi, R. (2008). Response regulator YycF essential for bacterial growth: X-ray crystal structure of the DNA-binding domain and its PhoB-like DNA recognition motif. *FEBS Letters*, 582(23–24), 3434–3438. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.09.007>
- Paget, S. M., & Helmann, J. D. (2003). The σ 70 family of sigma factors. *Protein Family Review*, 4(1), 203. [https://doi.org/10.1016/0022-3115\(86\)90027-9](https://doi.org/10.1016/0022-3115(86)90027-9)
- Pedraza, R. O., Filippone, M. P., Fontana, C., Salazar, S. M., Ramírez-Mata, A., Sierra-Cacho, D., & Baca, B. E. (2020). Azospirillum. In *Beneficial Microbes in Agro-Ecology*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-823414-3.00006-x>
- Philippot, L., Raaijmakers, J. M., Lemanceau, P., & Van Der Putten, W. H. (2013). Going back to the roots: The microbial ecology of the rhizosphere. *Nature Reviews Microbiology*, 11(11), 789–799. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3109>
- Ponchon, L., Beauvais, G., Nonin-Lecomte, S., & Dardel, F. (2009). A generic protocol for the expression and purification of recombinant RNA in Escherichia coli using a tRNA scaffold. *Nature Protocols*, 4(6), 947–959. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.67>
- Porter, S. L., Wadhams, G. H., & Armitage, J. P. (2011). Signal processing in complex chemotaxis pathways. *Nature Reviews Microbiology*, 9(3), 153–165. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2505>
- Prieto-Martínez, F. D., Arciniega, M., & Medina-Franco, J. L. (2018). Acoplamiento Molecular: Avances Recientes y Retos. *TIP Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 21, 65–87. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2018.0.143>
- Promega Corporation. (2018). pGEM(R)-T and pGEM(R)-T Easy Vector Systems Technical Manual. *Instructions for the Use of Products*, 1–29. https://www.promega.co.uk/~media/files/resources/protocols/technical_manuals/0/pgem-t_and_pgem-t_easy_vector_systems_protocol.pdf
- 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), 190–201. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2015.12.004>
- Ramírez-Mata, A., Pacheco, M. R., Moreno, S. J., Xiqui-Vázquez, 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>
- Ribaudó, C. M., Krumpholz, E. M., Cassán, F. D., Bottini, R., Cantore, M. L., & Curá, J. A. (2006). Azospirillum sp. Promotes root hair development in tomato plants through a mechanism that involves ethylene. *Journal of Plant Growth Regulation*, 25(2), 175–185. <https://doi.org/10.1007/s00344-005-0128-5>
- Rizvi, S. M., Shazi, S., & Mohd., H. (2013). a Simple Click By Click Protocol To Perform Docking : *EXCLI Journal*, 12, 831–857.
- Salgado, H., Moreno-Hagelsieb, G., Smith, T. F., & Collado-Vides, J. (2000). Operons in Escherichia coli: Genomic analyses and predictions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(12), 6652–6657. <https://doi.org/10.1073/pnas.110147297>
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. M. (1989). Protocol 20: Dephosphorylation of Plasmid DNA. In *Molecular Cloning A Laboratory Manual* (pp. 1.93-1.97).

- Scharf, B. E., Hynes, M. F., & Alexandre, G. M. (2016). Chemotaxis signaling systems in model beneficial plant–bacteria associations. *Plant Molecular Biology*, 90(6), 549–559. <https://doi.org/10.1007/s11103-016-0432-4>
- Schramm, A., Lee, B., & Higgs, P. I. (2012). Intra- and interprotein phosphorylation between two-hybrid histidine kinases controls myxococcus xanthus developmental progression. *Journal of Biological Chemistry*, 287(30), 25060–25072. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.387241>
- Scior, T., Martínez Morales, E., & Salinas Stefanón, E. (2007). Los modelos in silico , una herramienta. *Elementos*, 68(January), 45–48.
- Semagn, K. (2014). Leaf Tissue Sampling and DNA Extraction Protocols. In: Molecular Plant Taxonomy Methods and Protocols. In *Molecular Plant Taxonomy: Methods and Protocols* (Vol. 1115).
- Sessitsch, A., Brader, G., Pfaffenbichler, N., Gusenbauer, D., & Mitter, B. (2018). The contribution of plant microbiota to economy growth. *Microbial Biotechnology*. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13290>
- Sevilla, E., Silva-Jiménez, H., Duque, E., Krell, T., & Rojo, F. (2013). The Pseudomonas putida HskA hybrid sensor kinase controls the composition of the electron transport chain. *Environmental Microbiology Reports*, 5(2), 291–300. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12017>
- Shukla, M., Patel, R. H., Verma, R., Deewan, P., & Dotaniya, M. L. (2013). Effect of bio-organics and chemical fertilizers on growth and yield of chickpea (*Cicer arietinum* L.) under middle Gujarat conditions. *Vegetos*, 26(1), 183–187. <https://doi.org/10.5958/j.2229-4473.26.1.026>
- Singh, S., Singh, S. K., Chowdhury, I., & Singh, R. (2017). Understanding the Mechanism of Bacterial Biofilms Resistance to Antimicrobial Agents. *The Open Microbiology Journal*, 11(1), 53–62. <https://doi.org/10.2174/1874285801711010053>
- Steinbu, A. (2010). Microbiology Monographs Series Editor : Alexander Steinbu. In *Molecular Microbiology* (Vol. 20). <https://doi.org/10.1007/978-3-662-45209-7>
- Tao, J., Li, C., Luo, C., & He, C. (2014). RavA/RavR two-component system regulates *Xanthomonas campestris* pathogenesis and c-di-GMP turnover. *FEMS Microbiology Letters*, 358(1), 81–90. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12529>
- Tipton, K. A., & Rather, P. N. (2017). *An ompR-envZ Two-Component System Ortholog Regulates Phase Variation, Osmotic Tolerance, Motility, and Virulence in Acinetobacter baumannii Strain AB5075*. 199(3), 1–16. <https://doi.org/10.1128/JB.00705-16>
- Trajtenberg, F., Graña, M., Ruétalo, N., Botti, H., & Buschiazzo, A. (2010). Structural and enzymatic insights into the ATP binding and autophosphorylation mechanism of a sensor histidine kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 285(32), 24892–24903. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.147843>
- Ungewitter, E., Scrabble, H., Carter, A. J. R., Nguyen, A. Q., Bash, E., Eslava-Schmalbalch, J., Alzate, J. P., Bosques, C., Lomas, D., Beneficiario, B., Brown, T., Castro, L., Miguel, N., Toro, Á., Austad, S. N., & Watson, J. D. (2015). LA DOBLE HÉLICE James D. Watson. *PhD Proposal*, 12(1), 10–17. <https://eventos.redclara.net/indico/event/224/material/slides/20.pdf%5Cnhttp://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1578155010700346%5Cnhttp://www.biomedcentral.com/1471-2350/12/160>
- Urbanczyk, H., Ast, J. C., Kaeding, A. J., Oliver, J. D., & Dunlap, P. V. (2008). Phylogenetic analysis of the incidence of lux gene horizontal transfer in Vibrionaceae. *Journal of Bacteriology*, 190(10), 3494–3504. <https://doi.org/10.1128/JB.00101-08>
- Vieille, C., & Elmerich, C. (1990). Characterization of two *Azospirillum brasilense* Sp7 plasmid

genes homologous to *Rhizobium meliloti* nodPQ. In *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* (Vol. 3, Issue 6, pp. 389–400). <https://doi.org/10.1094/MPMI-3-389>

- Wager, M. G. T. and J. F. S. (2011). 基因的改变 NIH Public Access. *Bone*, 23(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2009.12.011>. Evolution
- Wallace, A. C., Laskowski, R. A., & Thornton, J. M. (1995). Ligplot: A program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. *Protein Engineering, Design and Selection*, 8(2), 127–134. <https://doi.org/10.1093/protein/8.2.127>
- 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>
- Woese, C. R., Stackebrandt, E., Weisburg, W. G., Paster, B. J., Madigan, M. T., Fowler, V. J., Hahn, C. M., Blanz, P., Gupta, R., Neelson, K. H., & Fox, G. E. (1984). The phylogeny of purple bacteria: The alpha subdivision. *Systematic and Applied Microbiology*, 5(3), 315–326. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(84\)80034-X](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(84)80034-X)
- Xia, Y., Embley, T. M., & O'Donnell, A. G. (1994). Phylogenetic Analysis of *Azospirillum* by Direct Sequencing of PCR Amplified 16S rDNA. *Systematic and Applied Microbiology*, 17(2), 197–201. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(11\)80007-X](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(11)80007-X)
- Xie, G., Keyhani, N. O., Bonner, C. A., & Jensen, R. A. (2003). Ancient Origin of the Tryptophan Operon and the Dynamics of Evolutionary Change. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(3), 303–342. <https://doi.org/10.1128/mubr.67.3.303-342.2003>
- Zhang, X. J., Cahill, K. B., Elfenbein, A., Arshavsky, V. Y., & Cote, R. H. (2008). Direct allosteric regulation between the GAF domain and catalytic domain of photoreceptor phosphodiesterase PDE6. *Journal of Biological Chemistry*, 283(44), 29699–29705. <https://doi.org/10.1074/jbc.M803948200>
- Zschiedrich, C. P., Keidel, V., & Szurmant, H. (2016). Molecular Mechanisms of Two-Component Signal Transduction. *Journal of Molecular Biology*, 428(19), 3752–3775. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.08.003>