



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**

**INSTITUTO DE CIENCIAS  
CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS**

**POSGRADO EN MICROBIOLOGÍA**

**PARTICIPACIÓN DE LA DIGUANILATO CICLASA DE *A. brasilense* EN CRECIMIENTO Y ESTRÉS**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA)**

**CON OPCIÓN EN: BIOQUÍMICA Y GENÉTICA MICROBIANA**

**PRESENTA:**

IBT Miguel Angel Avalos Rangel

**ASESOR DE TESIS:**

D. C. Beatriz Eugenia Baca

**PUEBLA, PUE.**

**Noviembre, 2015**

## **Agradecimientos**

Primero agradecer muy especialmente a mi asesora Dra. Beatriz Eugenia Baca por sus valiosas enseñanzas y apoyo durante el transcurso del posgrado. A todos los que integran el laboratorio de interacción bacteria-planta. Agradezco ampliamente al comité revisor; Dr. Alberto Ramírez Mata, Dra. Rebeca Martínez Contreras, Dra. Lucía Soto Urzúa y Dr. Luis Javier Martínez Morales, además del recurso humano que conforma el posgrado en microbiología. Agradecer muy merecidamente al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca para el estudio de posgrado, que sin ella difícilmente hubiera sido posible mantenerse durante el transcurso del posgrado, además de su apoyo para generar esta investigación.

## **Dedicatoria**

Este trabajo es dedicado a mi familia. Mis padres Teresa y Guillermo y mis hermanos Alejandro, Elizabeth, Osvaldo, Paola y Monse, pero también a la persona que es parte de mi familia, Elena.

# Índice

Resumen .....	v
1 Introducción .....	1
2 Marco teórico .....	2
2.1 La rizosfera y las PGPRs .....	2
2.2 <i>Azospirillum</i> .....	2
2.2.1 Características .....	3
2.2.2 Comportamiento en plantas .....	3
2.2.3 Tactismos .....	3
2.2.4 Formación de biopelícula .....	4
2.3 Transducción de señales y detección de estímulos ambientales .....	5
2.4 El di-GMPc .....	6
3 Antecedentes .....	8
3.1 Antecedentes directos .....	10
4 Justificación .....	12
5 Hipótesis .....	12
6 Objetivos .....	13
6.1 Objetivo general .....	13
6.2 Objetivos específicos .....	13
7 Materiales y Métodos .....	13
7.1 Diseño de iniciadores .....	13
7.2 PCR para el amplificado de los fragmentos PM y QH .....	13
7.3 Construcción del plásmido pSUP-KmMCS/PM-QH .....	15
7.4 Secuenciación del fragmento PM-Km-QH del plásmido pSUP-KmMCS/PM-QH .....	15
7.5 Obtención de la mutante <i>A. brasilense</i> Sp245 $\Delta$ cdgE::Km .....	15
7.6 Obtención de la mutante <i>A. brasilense</i> Sp245 $\Delta$ cdgE, al utilizar como vector pSUP- $\Delta$ Km-MCS/PM- $\Delta$ cdgE-QH .....	16
7.7 Construcción del plásmido pK18mobsacB/PM- $\Delta$ cdgE-QH .....	16
7.8 Secuenciación del fragmento PM- $\Delta$ cdgE-QH del plásmido pK18mobsacB/PM- $\Delta$ cdgE-QH .....	17
7.9 Obtención de la mutante <i>A. brasilense</i> Sp245 $\Delta$ cdgE, al utilizar como vector pK18mobsacB/PM- $\Delta$ cdgE-QH .....	17
7.10 Hibridación en colonia .....	17

<b>7.11 Verificación de pertenencia al género <i>Azospirillum</i> en la mutante <i>A. brasilense</i> Sp245<math>\Delta</math><i>cdgE</i>.....</b>	<b>18</b>
<b>7.12 RT-PCR.....</b>	<b>18</b>
<b>7.13 Evaluación del fenotipo de la cepa mutante.....</b>	<b>18</b>
<b>7.13.1 Crecimiento .....</b>	<b>18</b>
<b>7.13.2 Estrés salino.....</b>	<b>19</b>
<b>7.13.3 Formación de biopelícula.....</b>	<b>19</b>
<b>8 Resultados.....</b>	<b>19</b>
<b>8.1 Diseño de iniciadores .....</b>	<b>19</b>
<b>8.2 Construcción del plásmido pSUP-KmMCS/PM-QH .....</b>	<b>20</b>
<b>8.2.1 Amplificado de los fragmentos PM y QH.....</b>	<b>20</b>
<b>8.2.2 Clonación de los fragmentos PM y QH en el vector suicida pSUP-KmMCS.....</b>	<b>21</b>
8.2.2.1 Clonación del fragmento PM.....	22
8.2.2.2 Clonación del fragmento QH.....	23
<b>8.2.3 Secuenciación del fragmento PM-Km-QH de pSUP-KmMCS/PM-QH .....</b>	<b>24</b>
<b>8.3 Obtención de la mutante <i>A. brasilense</i> Sp245<math>\Delta</math><i>cdgE</i>::Km.....</b>	<b>24</b>
<b>8.3.1 Comprobación de la mutante <i>A. brasilense</i> Sp245<math>\Delta</math><i>cdgE</i>::Km .....</b>	<b>25</b>
<b>8.4 Construcción del plásmido pSUP-<math>\Delta</math>Km-MCS/PM-<math>\Delta</math><i>cdgE</i>-QH .....</b>	<b>26</b>
<b>8.5 Obtención de la mutante <i>A. brasilense</i> Sp245<math>\Delta</math><i>cdgE</i>, utilizando el plásmido pSUP-<math>\Delta</math>Km-MCS/PM-<math>\Delta</math><i>cdgE</i>-QH .....</b>	<b>27</b>
<b>8.6 Construcción del plásmido pK18mobsacB/PM-<math>\Delta</math><i>cdgE</i>-QH .....</b>	<b>27</b>
<b>8.6.1 Secuenciación del fragmento PM-<math>\Delta</math><i>cdgE</i>-QH del plásmido pK18mobsacB/PM-<math>\Delta</math><i>cdgE</i>-QH .....</b>	<b>29</b>
8.6.1.1 Construcción de pGEM/PM- $\Delta$ <i>cdgE</i> -QH.....	29
8.6.1.2 Análisis de secuencia .....	30
<b>8.7 Obtención de la mutante <i>A. brasilense</i> Sp245<math>\Delta</math><i>cdgE</i>, al utilizar como vector pK18mobsacB/PM-<math>\Delta</math><i>cdgE</i>-QH .....</b>	<b>30</b>
<b>8.8 Comprobación de la mutante <i>A. brasilense</i> Sp245<math>\Delta</math><i>cdgE</i>.....</b>	<b>31</b>
<b>8.8.1 PCR para el amplificado de la región afectada del gen <i>cdgE</i>.....</b>	<b>31</b>
<b>8.8.2 PCR de confirmación de la ausencia del plasmido pK18mobsacB/PM-<math>\Delta</math><i>cdgE</i>-QH .....</b>	<b>32</b>
<b>8.8.3 Hibridación en colonia de confirmación de la ausencia del plásmido pK18mobsacB/PM-<math>\Delta</math><i>cdgE</i>-QH .....</b>	<b>33</b>
<b>8.8.4 PCR para el amplificado de la región intergenica conservada DNAr23S-DNAr16S de <i>Azospirillum</i>.....</b>	<b>33</b>

<b>8.8.5 RT-PCR de confirmación de la mutante <i>A. brasilense</i> Sp245<math>\Delta</math><i>cdgE</i> 7U-3</b> .....	34
<b>8.8.6 RT-PCR para la confirmación de ausencia de mutación polar en la mutante <i>A. brasilense</i> Sp245<math>\Delta</math><i>cdgE</i> 7U-3</b> .....	35
<b>8.9 Análisis de Fenotipo</b> .....	36
<b>8.9.1 Crecimiento</b> .....	36
<b>8.9.2 Estrés salino</b> .....	36
<b>8.9.3 Formación de biopelícula</b> .....	37
8.9.3.1 Determinación cuantitativa.....	38
8.9.3.2 Determinación por microscopia de fluorescencia .....	39
<b>9 Discusión</b> .....	40
<b>10 Conclusión</b> .....	43
<b>11 Perspectivas</b> .....	43
<b>12 Bibliografía</b> .....	44
<b>ANEXOS</b> .....	49

## Resumen

*Azospirillum* es una PGPR que mejora el crecimiento de plantas de importancia agronómica y económica, contribuyendo con estrategias de impacto ecológico y sustentable, lo cual es logrado mediante procesos que involucran la fijación de nitrógeno, reducción de nitrato, producción de óxido nítrico (NO), captación de hierro, solubilización y movilización de fosfato, y principalmente la producción de fitohormonas que ocasionan un incremento en la cantidad de raíces de la planta, propiciando una mayor captación de agua y minerales; sin embargo, para ello es necesario llevar a cabo una exitosa colonización, en la que la bacteria lleva a cabo una diferenciación celular que le permite pasar de un estado plantónico a sésil, proceso donde está involucrado un importante sistema de transducción de señales modulado por el segundo mensajero di-GMPc, que es sintetizado por diguanilato ciclasas (DGCs) y degradado por fosfodiesterasas (PDEs), regulando la producción de EPS y adhesinas, diferentes formas de movilidad, formación de biopelícula, etc., además podría regular otras funciones como el crecimiento; y la adaptabilidad al estrés salino, dada su participación en la producción de EPS, por lo que en este trabajo se evalúa la participación de la DGC E, en funciones de crecimiento y estrés salino, dado además un antecedente de Gamboa (2013), en el que se obtuvo una mutante por inserción de un casete de resistencia a Km en el gen *cdgE*, resultando fenotipos afectados en crecimiento y estrés salino con NaCl, pudiendo ser resultado de una mutación polar ocasionada por la inserción, dado el contexto genético y la posible presencia de un operón. Por tanto, en el presente trabajo fue indispensable llevar a cabo una mutación por delección del gen *cdgE* para evitar el efecto polar, siendo necesarias una serie de conjugaciones para generar el doble entrecruzamiento generador de la delección; sin embargo, por el momento no están claras las causas de la baja frecuencia en la conjugación, así como de recombinación al utilizar el plásmido pK18mobsacB/PM- $\Delta$ *cdgE*-QH en *A. brasilense* Sp245, vector suicida con el origen de replicación *oriE*, mismo que tiene el plásmido pSUP202 empleado ampliamente para la obtención de mutantes por inserción en *A. brasilense*. El obtener mutantes por delección es de gran ayuda para el estudio de varios genes, tal como el *cdgE*, por lo que es necesario seguir buscando los parámetros fisiológicos adecuados para aumentar la frecuencia de conjugación-recombinación en *A. brasilense* Sp245. A través de varios ensayos fue indispensable confirmar la mutante *A. brasilense* Sp245 $\Delta$ *cdgE*, posteriormente los fenotipos crecimiento, estrés salino con NaCl y formación de biopelícula fueron evaluados, resultando sin afectación al compararlos con *A. brasilense* Sp245, siendo estos confrontados con los reportados por Gamboa en el 2013.

# 1 Introducción

En la rizosfera se localizan diferentes bacterias benéficas, llamadas rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPRs, por sus siglas en Inglés) (Bashan *et al.* 2007), entre las que se encuentra *Azospirillum brasilense*, una de las especies más estudiada del género *Azospirillum*, que promueve el crecimiento de varias plantas, hortalizas, pastos forrajeros y cereales. Esta especie empleada en inoculantes reviste una importancia relevante a nivel ecológico y agrícola, esta cualidad se atribuye principalmente a que produce sustancias que regulan el crecimiento vegetal o fitohormonas, mejorando así; el crecimiento de la raíz, la absorción de agua y minerales. En algunos países *Azospirillum* se utiliza como inoculante, solo, o en asociación con otras bacterias promotoras de crecimiento de la planta (Bashan *et al.* 2007).

*Azospirillum* posee un solo flagelo polar y múltiples flagelos laterales, el flagelo polar es responsable del movimiento natatorio en medio líquido, mientras los flagelos laterales son responsables del movimiento en la superficie, conocido como "swarming". (Hall y Krieg 1983; Moens *et al.* 1995). *A. brasilense* presenta diversas taxis: quimiotaxis hacia una variedad de sustratos oxidables incluyendo azúcares, aminoácidos, y ácidos orgánicos; aerotaxis hacia el oxígeno y redox-taxis hacia moléculas redox (Alexandre *et al.* 2000). *Azospirillum* mejora el crecimiento de plantas inoculadas mediante la fijación de nitrógeno, reducción de nitrato, producción de óxido nítrico (NO), captación de fierro, solubilización y movilización de fosfato y principalmente la producción de fitohormonas, que ocasionan un incremento en la cantidad de raíces de la planta, propiciando a su vez una mayor captación de agua y minerales (Tortora *et al.* 2011; Romero. 2012), por lo tanto *Azospirillum* ha despertado interés en diferentes áreas de estudio, acerca de su ecología, fisiología y genética (Romero. 2012). Sin embargo, el mejoramiento en el rendimiento de plantas inoculadas con *Azospirillum*, depende de un exitoso mecanismo de colonización, puesto que su capacidad de adherencia a las raíces vegetales permite a la bacteria establecer una asociación permanente con la planta (de Bashan *et al.* 2007), tal mecanismo, es regulado por un sistema de transducción de señales en el que está involucrado el segundo mensajero di-GMPc, el cual entre otras funciones, regula la biosíntesis de la matriz, en las que participan: adhesinas de naturaleza proteica, pilis y exopolisacáridos (EPS) en la formación de biopelícula e inhibe varias formas de movilidad, controlando la transición entre el estilo de vida plantónico (natatorio) y sedentario, cuya diferenciación en la célula natatoria podría estar estrechamente acoplada con el inicio del ciclo celular, donde el di-GMPc, tal como *Caulobacter crescentus*, podría participar en el proceso de degradación de un regulador del

ciclo celular (Römling *et al.* 2013; Hengge. 2009; Duerig *et al.* 2009). Aunque no existen reportes directos acerca del papel del di-GMPc en respuesta al estrés salino, es sabido que éste está involucrado en el proceso de biosíntesis de EPS, los cuales podrían permitir la adaptación a esta condición (Jofré *et al.* 2009).

La concentración del segundo mensajero di-GMPc es controlada por las actividades opuestas de las diguanilato ciclasas (DGCs) y las fosfodiesterasas (PDEs), las cuales poseen actividades de síntesis y degradación respectivamente; niveles elevados de di-GMPc típicamente favorecen el estado sésil, resultando en una adherencia incrementada y la formación de biopelícula, contrario a que a niveles más bajos de di-GMPc favorecen la movilidad, estado planctónico y la baja regulación de la adherencia (Feirer *et al.* 2015). En el presente trabajo se obtuvo la mutante *A. brasilense* Sp245 $\Delta$ cdgE, cuyo gen mutado codifica para una proteína que presenta homología con la diguanilato ciclasa, que podría participar en funciones como tolerancia al estrés salino, crecimiento y formación de biopelícula.

## **2 Marco teórico**

### **2.1 La rizosfera y las PGPRs**

Para las PGPRs puedan llevar a cabo la interacción con la planta y promover su beneficio, es necesaria una exitosa colonización, lo cual se logra por la presencia de humedad y nutrientes a partir de los exudados radiculares que son secretados por las raíces de las plantas hacia la rizosfera, definida como el volumen que se encuentra entre las raíces de las plantas y el conjunto de suelo (Wild *et al.* 1992; Rodríguez *et al.* 2007; Arruebarrena *et al.* 2012).

### **2.2 *Azospirillum***

El género *Azospirillum* es una  $\alpha$ -proteobacteria, en la que se han identificado al menos 18 especies, pero en términos de fisiología y genética las más estudiadas son *A. brasilense* y *A. lipoferum* (Massena *et al.* 2011). Esta bacteria es capaz de utilizar como fuente de carbono varios azúcares y ácidos di y tricarboxílicos, tiene un óptimo crecimiento a 30 ° C y pH de 6-7 (Bashan y De Bashan, 2010), se aísla a partir de la rizosfera o de las raíces de muchas especies de plantas mono o dicotiledóneas en diferentes regiones del mundo, que incluyen climas templados y tropicales (Bashan y de Bashan, 2010; Pedraza *et al.* 2011).



### 2.2.1 Características

*Azospirillum* presenta varias características según Pedraza y colaboradores (2010):

- Vibroide
- Gram (-)
- Pleomórfica
- Movilidad en espiral.
- Heterótrofo
- Fija nitrógeno bajo condiciones microaerobias.
- Almacena carbono en forma de gránulos de poli- $\beta$ -hidroxibutirato (PHB), representando hasta 50% de su peso seco, esto le permite tener una mayor resistencia a la desecación, luz ultravioleta y el choque osmótico.
- Presenta forma ovoide y paredes gruesas similares a quistes, conocida como forma C.
- Al crecer en medio rojo Congo las colonias adquieren una coloración rojo escarlata
- Producen bacteriocinas y sideróforos.

### 2.2.2 Comportamiento en plantas

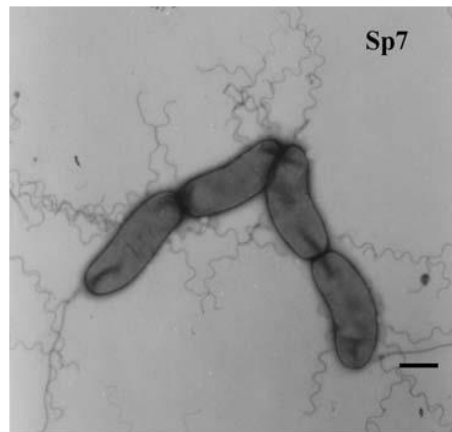
*Azospirillum* promueve el rendimiento y crecimiento de varias gramíneas y cereales (Bashan y de Bashan, 2010), coloniza principalmente la superficie de la raíz, aunque algunas cepas son capaces de colonizar tejidos internos de las plantas, tal como las bacterias endofíticas que invaden tejidos de plantas, pero no muestra señales externas de infección o efectos negativos en el hospedero. Estudios de la localización de *Azospirillum* en la superficie de raíces revelan que se concentra en la zona de elongación, en el extremo de la raíz, la base de pelos radiculares y en algunos casos en el extremo de estos (Guerrero *et al.* 2011).

### 2.2.3 Tactismos

La movilidad bacteriana en la rizosfera responde a la quimiotaxis hacia varios componentes de los exudados radiculares, incluyendo azúcares, aminoácidos, y ácidos orgánicos, tal función no solo le permite responder a impulsos de sustancias atrayentes, sino también a repelentes, además la competencia exitosa con otros microorganismos también depende de esta función (Pedraza *et al.* 2011). *A. brasilense* posee un flagelo polar en todas las condiciones de cultivo y sintetiza flagelos laterales cuando crece en medio semisólido (Fig. 1), estos organelos son de los más complejos y extremadamente efectivos, propulsando a

las bacterias a través de líquidos (movimiento natatorio) y a través de ambientes viscosos o sobre superficies (“swarming”), ellos juegan un papel importante en la adhesión a sustratos y formación de biopelícula, contribuyendo a la interacción con la planta (Pedraza *et al.* 2011).

En cuanto a otro tipo de taxis, *A. brasilense* utiliza aerotaxis para dirigirse hacia las concentraciones óptimas de oxígeno que permiten llevar a cabo la respiración, pero no inhibir la enzima nitrogenasa responsable de la fijación de nitrógeno; y redox-taxis hacia moléculas redox (Danhorn y Fuqua. 2007; Alexandre *et al.* 2000).



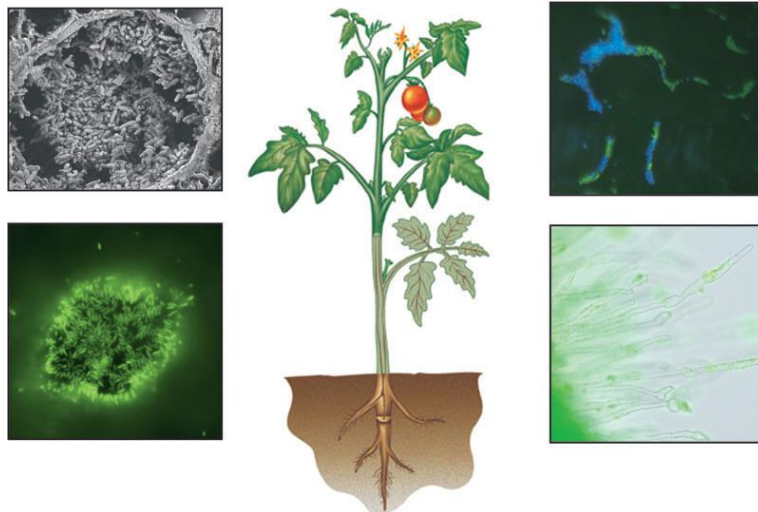
**Fig. 1.** Microscopía electrónica de transmisión, mostrando los flagelos laterales y flagelo polar de *Azospirillum brasilense* Sp7 (Carreño *et al.* 2009).

#### **2.2.4 Formación de biopelícula**

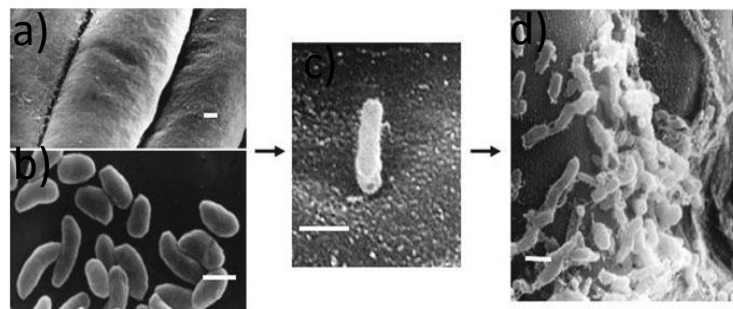
La biopelícula (Fig. 2) consiste en comunidades bacterianas inmersas en una matriz de diferentes compuestos extracelulares, que pueden ser proteínas, ácidos nucleicos y exopolisacáridos (Martínez *et al.* 2013), permitiendo su adherencia a superficies húmedas en ambientes naturales, donde existe un suministro de nutrientes.

Durante el proceso de colonización de *Azospirillum*, especialmente en *A. brasilense*, varios autores mencionan que están involucrados dos pasos en la adherencia de *Azospirillum* a la raíz. El primer paso es una rápida y reversible adsorción bacteriana sobre la raíz (dependiente del flagelo polar), seguido de un anclaje irreversible a la superficie de la raíz (asociado a la síntesis de polisacáridos). El flagelo lateral no es esencial durante la fase de adsorción para el proceso de colonización, aunque no se descarta que durante la colonización participe en el desplazamiento sobre la raíz. La figura 3 muestra el modelo bifásico de la colonización propuesta por Steenhoudt y Vanderleyden (2000) (Massena *et al.* 2011; Jofre *et al.* 2009).

La formación de biopelícula confiere varias ventajas, tales como resistencia a ciertas tenciones ambientales, tolerancia a antimicrobianos, protección de protozoarios, transferencia horizontal, además de mantener la población celular por tiempos suficientes para iniciar interacciones beneficiosas con la planta (Rodríguez *et al.* 2007; Danhorn y Fuqua. 2007).



**Fig. 2.** Biopelícula microbiana en raíz de plantas terrestres (Danhorn y Fuqua. 2007).



**Fig. 3.** Proceso de fijación bifásico de *A. brasilense* a la superficie de la raíz. (a) superficie de la raíz sin inoculación; (b) cultivo puro de *A. brasilense*; (c) primer paso, *Azospirillum* como una célula individual unida a la superficie radicular; (d) segundo paso, células bacterianas en conjunto e impregnadas entre la matriz fibrilar (Massena *et al.* 2011).

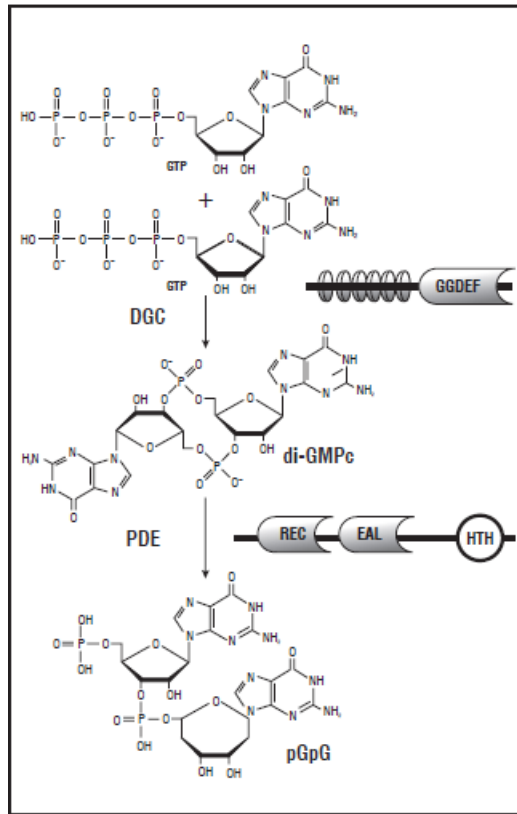
### 2.3 Transducción de señales y detección de estímulos ambientales

La manera en que los microorganismos responden a las condiciones del entorno es llevada a cabo por mecanismos de transducción de señales, que se consideran como redes que consisten de proteínas con múltiples dominios, que al detectar cambios ambientales o intracelulares, transfieren la señal detectada al dominio de salida de la proteína, generando respuestas en la expresión de los genes, niveles de segundos mensajeros y modificación de proteínas. Estos mecanismos constan de proteínas que contienen dominios

transmembrana (TM) denominados de entrada, los cuales son módulos sensoriales que responden a cambios del entorno mediante la generación de una respuesta intracelular, uno de estos mecanismos encontrados en bacterias, es el sistema de doble componente (SDC), constituido por una proteína integral de membrana llamada cinasa histidinica (QH), que tiene un residuo de histidina que es fosforilado a partir de ATP al detectar una señal específica, siendo transferido este grupo fosfato a un residuo de aspartato de un regulador de respuesta (RR) (Krell *et al.* 2010; Méndez y Membrillo. 2005). La mayoría de los RR son reguladores transcripcionales con dominios de unión a DNA o RNA, otros tienen dominios efectores como en el caso de las enzimas, tal es el caso de la DGC que en su forma activada sintetiza di-GMPc.

## **2.4 El di-GMPc**

Un importante segundo mensajero presente en bacterias es el bis-(3'-5')- monofosfato de guanosina cíclico (di-GMPc), que es sintetizado a partir de dos GTPs por acción de la enzima diguanilato ciclasa (DGC) que posee un dominio GGDEF, e hidrolizado por la enzima fosfodiesterasa (PDE) que presenta un dominio EAL (Méndez y Membrillo. 2005) (Fig. 4).



**Fig. 4.** Esquema de la estructura del di-GMPc, enzimas que lo sintetizan y degradan: con actividad de diguanilato ciclasa DGC, incluyendo los dominios GGDEF y transmembranales TM (gris), y de fosfodiesterasa PDE, incluyendo los dominios EAL y el receptor REC, el cual es fosforilado. Modificado de Karatan y Watnick, 2009.

El di-GMPc se encuentra en bacterias de vida libre, como en las que se asocian a animales y plantas. Esta molécula está involucrada en varias funciones: la inhibición de la movilidad, biosíntesis de moléculas de adhesinas y exopolisacáridos involucrados en la formación de biopelícula, regulación de la progresión del ciclo celular, producción de antibióticos y funciones de virulencia (Römling et al. 2013) (Fig. 5).

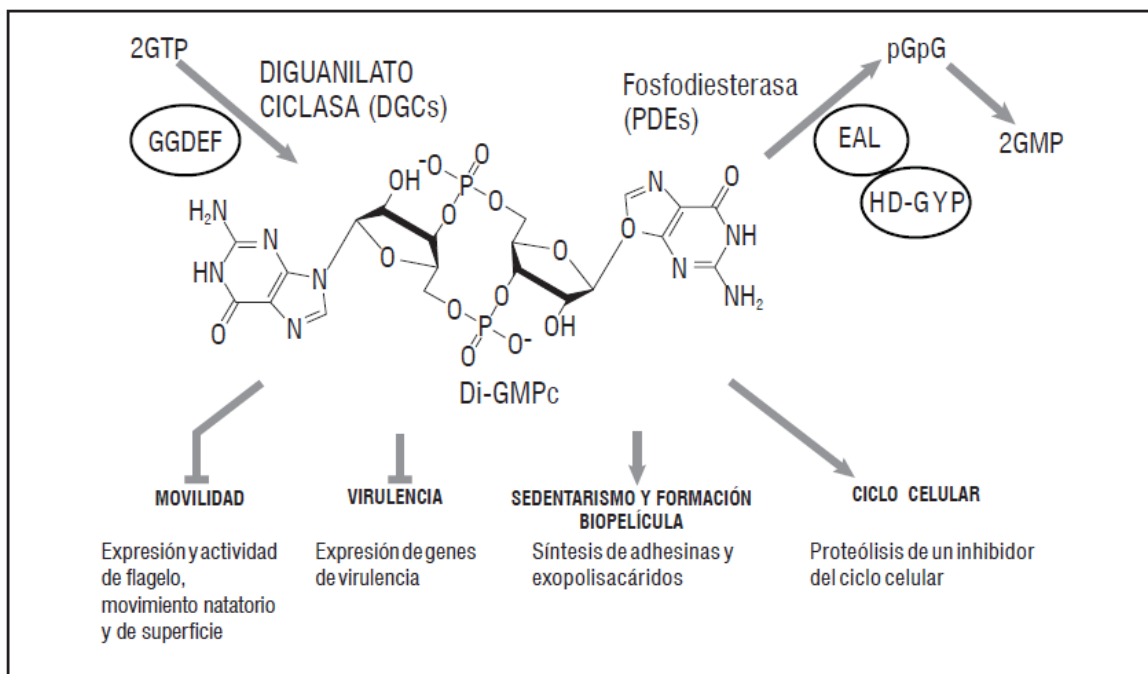


Fig. 5. Funciones reguladas por el di-GMPc. Modificado de Hengge 2009.

### 3 Antecedentes

Aunque por varios años ha aumentado la evidencia acerca de cómo es que los polisacáridos y proteínas están involucrados en la agregación celular y el proceso de adhesión a la raíz, así como la adaptación a condiciones de estrés osmótico, la precisión en estos mecanismos permanece incompleta, puesto que intervienen varios componentes de superficie celular y las rutas biosintéticas en la producción de EPS de *A. brasilense* continúan sin conocerse. Sin embargo, en un intento de determinar los genes que están involucrados en la biosíntesis y regulación de EPS, Jofre *et al* en el 2009 obtuvieron una colección de cepas mutantes (*A. brasilense* Cd Tn5), mostrando un fenotipo fluorescente aumentado, utilizando un medio conteniendo calcofluor (colorante que une polisacáridos). Al analizar los cambios en la producción de EPS de una mutante, se registró una sobreproducción de estos, además de presentar cambios en la morfología celular, debido al incremento de sensibilidad a condiciones salinas y detergentes. En la caracterización de la mutante se identificó el conjunto de genes *ddlB*, *ftsQ*, *ftsA*, y *ftsZ*, cuyo primer gen es homólogo a una ligasa D-alanina-D-alanina, que cataliza la formación del dipéptido D-alanina-D-alanina que es subsecuentemente ligado al tripéptido UDP-N-acilmurámico durante el segundo paso de la biosíntesis de peptidoglicano, y en el caso de los genes restantes, estos son responsables de la formación del septo en diferentes géneros de bacterias, con lo que se

sugirió que la integridad de la envoltura bacteriana es requerida para la adaptación a ambientes salinos (Jofré *et al.* 2009).

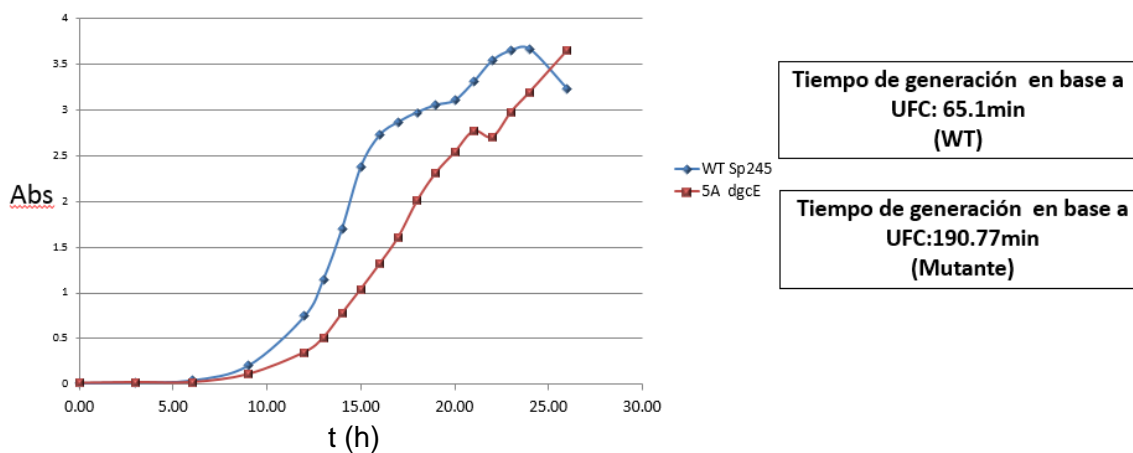
Por otro lado, en cuanto al papel de la DGC en crecimiento, se describe el proceso de degradación proteica que juega un importante papel en el control de la progresión del ciclo celular en la  $\alpha$ -proteobacteria Gram negativa *C. crescentus*:

Las células de *C. crescentus* se dividen asimétricamente para producir dos células hijas distintas, una célula natatoria más pequeña y una adherente (“stalked”) más grande que se adhiere a la superficie. Mientras la célula adherente permanece anclada, la célula natatoria siempre explora nuevos nichos ecológicos (Duerig *et al.* 2008). Aunque la célula natatoria posee flagelo polar y pilus adhesivo en uno de los polos de la célula, una estructura adhesiva (“holdfast – stalk”) es posteriormente desarrollada en el mismo polo para promover la adhesión a la superficie, esta transformación morfológica o diferenciación a célula adherente está estrechamente acoplada con el inicio del ciclo celular. Cuando la célula adherente es diferenciada es capaz de reiniciar la replicación del cromosoma, para posteriormente desencadenar una división celular que permita la generación posterior de la célula natatoria (Römling *et al.* 2013; Duerig *et al.* 2008).

Se propone que el segundo mensajero di-GMPc contribuye al control temporal y espacial de degradación del regulador maestro del ciclo celular CtrA durante el ciclo de *C. crescentus*. Un estudio reciente mostró que la morfogénesis del polo celular en *C. crescentus* durante la transición de célula natatoria a adhesiva está controlada por la DGC PleD, la cual por otro lado es activada por fosforilación (Duerig *et al.* 2008). La proteína denominada PopA de *C. crescentus*, paróloga de PleD, no requiere ser fosforilada, pero es activada a través de su unión al di-GMPc en el sitio conservado I del dominio GGDEF. Basado en los datos obtenidos en este estudio, se postula que tal unión ocasiona el secuestro de la proteína al polo de la célula adherente durante la transición de la fase G1-S, cooperando para reclutar la maquinaria responsable para la degradación del regulador maestro del ciclo celular CtrA. Este mecanismo establece al dominio GGDEF como un auténtico modulo efector del di-GMPc y se descubre un nuevo papel para el di-GMPc en la interferencia con la maquinaria central que conduce a la proliferación celular (Duerig *et al.* 2008).

### 3.1 Antecedentes directos

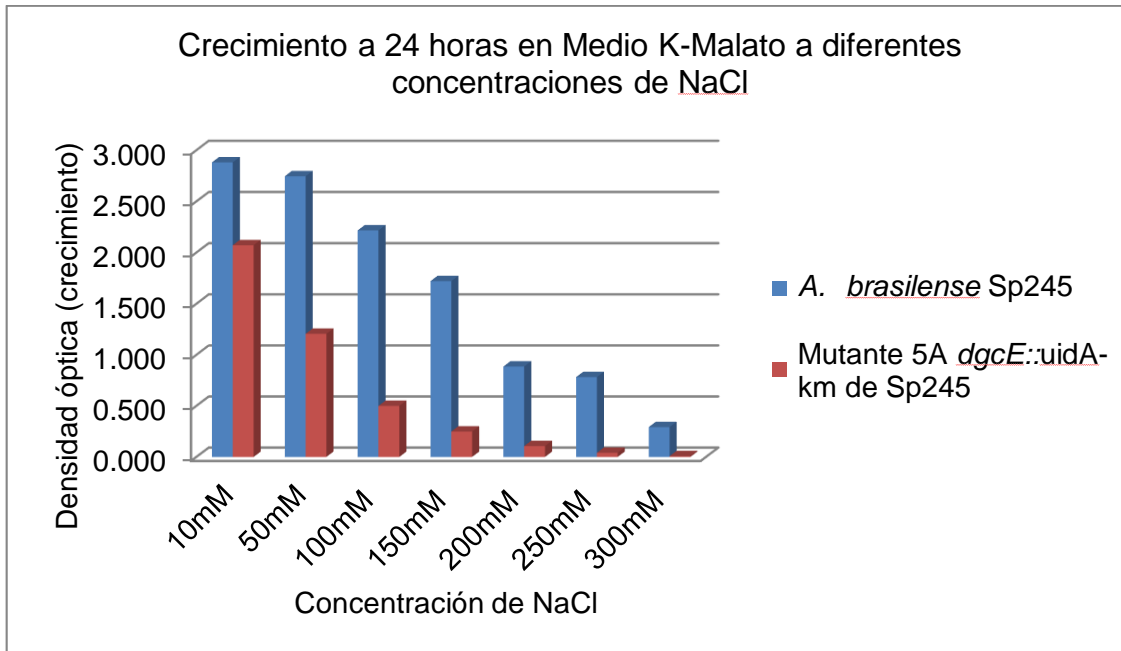
Con el fin de analizar la participación de las proteínas con dominios GGDEF de *A. brasilense* Sp245 implicadas en la síntesis del segundo mensajero di-GMPc en funciones como el crecimiento y estrés, Gamboa en el 2013, realizó una mutación por inserción en el gen de la diguanilato ciclasa E, mediante un casete de resistencia a kanamicina-beta glucuronidasa (*gusA-Km<sup>R</sup>*). El análisis fenotípico en cuanto a crecimiento de esta cepa mutante *A. brasilense* Sp245 5 A *cdgE::uidA-Km<sup>R</sup>*, fue realizado mediante la curva de crecimiento en base a las unidades formadoras de colonia (UFC) utilizando medio mínimo K-Malato. En cuanto al estrés, el crecimiento fue evaluado determinando densidad óptica, tras un periodo de incubación de 24 h, sometiendo a la bacteria a diferentes concentraciones de NaCl utilizando medio mínimo K-Malato. La cepa mutante *A. brasilense* 5 A registro una notable disminución del crecimiento, cuyo tiempo de generación de 190.77 minutos fue aproximadamente 3 veces mayor con respecto al tiempo de 65.1 minutos de la cepa silvestre *A. brasilense* Sp245, siendo posible observar directamente sobre la curva tal disminución a lo largo de las fases de crecimiento (Fig. 6).



**Fig. 6.** Curva de crecimiento de la mutante *A. brasilense* Sp245 5 A *cdgE::uidA-Km<sup>R</sup>* (Rojo) respecto a la cepa silvestre *A. brasilense* Sp245 (Azul) en medio mínimo K-Malato, registrando (derecha) el tiempo de generación en base a las unidades formadoras de colonia (UFC) (Gamboa. 2013).

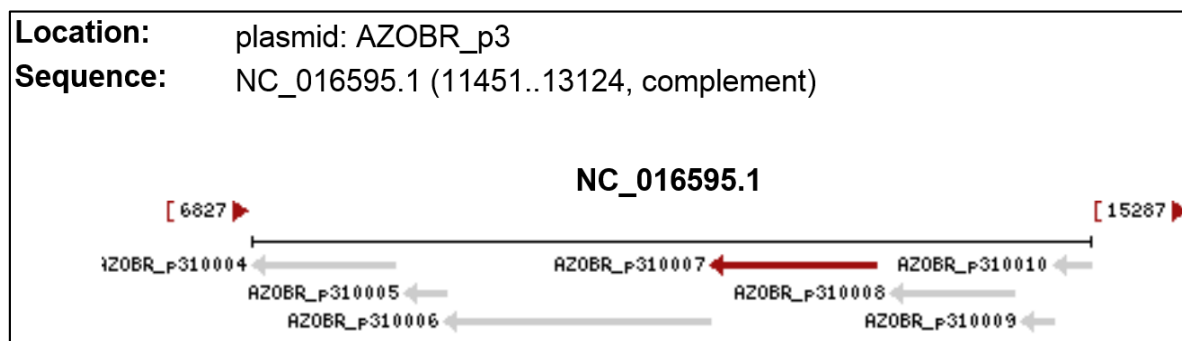
En relación a los datos obtenidos en condiciones de estrés osmótico, ambas cepas presentaron afección a la condición salina, siendo esta más marcada entre mayor concentración de NaCl, además los datos presentados sugieren que la cepa mutante exhibió una significativa disminución del crecimiento en comparación con la cepa silvestre (Fig. 7).





**Fig. 7.** Gráfico del crecimiento de la mutante *A. brasilense* Sp245 5A *cdgE::uidA-Km<sup>R</sup>* (Rojo) y *A. brasilense* Sp245 (Azul) en medio mínimo K-Malato, a diferentes concentraciones de NaCl tras 24 horas (Gamboa. 2013).

Sin embargo, el fenotipo observado probablemente sea generado por una mutación polar, por la inserción del casete  $Km^R$ -GusA en el gen *cdgE*, ocasionando la afectación de genes río abajo, tal como se observa en el contexto genético, donde se predice la posible presencia de un operón (Fig. 8). Por tanto lo que se pretende en el presente trabajo es evitar el efecto polar mediante la mutación por delección del gen de la diguanilato ciclasa E de *A. brasilense* Sp245.



**Fig. 8** Contexto genético del gen *cdgE* AZOBR\_p310007 (Rojo): AZOBR\_p310004 (Regulador de respuesta de doble componente (similar a LuxO)). AZOBR\_p310005 (Proteína receptora reguladora de respuesta). AZOBR\_p310006 (Quinasa histidinica putativa). AZOBR\_p310008 (Proteína de membrana conservada de función desconocida). AZOBR\_p3100 [09 / 10] (Proteína hipotética).

## 4 Justificación

Dada la importancia de promover un aumento en el rendimiento de cultivos de importancia económica, como en el caso de algunos de los principales cultivos producidos en Puebla, entre los que destacan el maíz y la alfalfa, que según la SAGARPA en su último año de registro, se obtuvo una producción de 1,028,567 y 1,386,008 toneladas en la primavera-verano del 2010, respectivamente, es de gran importancia el estudio de microorganismos potenciales que permiten llevar a cabo prácticas agrícolas “amigables con el ambiente”, además de sostenibles. Por tanto no sólo es relevante el aspecto económico que podría tener el uso de *A. brasilense*, puesto que es ampliamente reconocido el impacto favorable en bien del medio ambiente, ya que es deseable eliminar o por lo menos reducir el uso de fertilizantes de origen químico, que debido a la agricultura intensiva actual ocasionan la contaminación de suelo y agua, incluso la afectación de la salud, dada la acumulación de nitratos.

Sabiendo el beneficio en el rendimiento de plantas, es vital entender los aspectos moleculares que permitirían una óptima interacción bacteria-planta, como son los procesos tanto de colonización así como de supervivencia, dadas las diferentes condiciones en el suelo de los cultivos sobre los cuales puedan ser inoculadas estas bacterias benéficas.

El uso de bacterias benéficas como *Azospirillum*, permite llevar a cabo una exitosa biofertilización sin comprometer el medio ambiente y la salud. Y aunque actualmente los beneficios de utilizar este tipo de microorganismos son conocidos, no se conoce como es que responderán a las diferentes condiciones del suelo, como es la salinidad. Por lo que al estudiar los mecanismos moleculares llevados a cabo en la interacción de la bacteria con la planta, aunado al conocimiento de aquellos mecanismos que involucran adaptación y estrés, como es el salino, se podrán diseñar mejores estrategias de fertilización.

## 5 Hipótesis

El gen *cdgE*, está involucrado en diversas funciones, tal como la progresión del ciclo celular, estrés salino, así como la producción de biopelícula.

## 6 Objetivos

### 6.1 Objetivo general

Determinar la participación de la diguanilato ciclasa E (DGC E) de *A. brasilense* Sp245 en crecimiento y estrés.

### 6.2 Objetivos específicos

- Generar la mutante por delección de un fragmento del gen de la diguanilato ciclasa E (*cdgE*).
- Análisis del genotipo y fenotipo de la mutante.

## 7 Materiales y Métodos

### 7.1 Diseño de iniciadores

Previo a la construcción del plásmido necesario para llevar a cabo un doble entrecruzamiento por recombinación homóloga con el genoma de *A. brasilense* Sp245, que permita la obtención de la mutante *A. brasilense* Sp245 $\Delta$ *cdgE*, se realizó el diseño de iniciadores para el amplificado de productos homólogos, flanqueantes al fragmento del gen *cdgE* a eliminar, los cuales fueron nombrados de acuerdo a los genes *pm* y *qh*, referentes a una proteína de membrana río arriba y a una cinasa histidinica río abajo del gen *cdgE*, respectivamente (Fig. 8). Para el diseño de los iniciadores, se tomó en cuenta lo siguiente:

1. Evitar afectar el marco de lectura.
2. Diseño de sitio de corte para el direccionamiento de la clonación.
3. Afectación total de dominios del gen a mutar.

También fue realizado un análisis de posibles promotores putativos, utilizando los programas SOFTBERRY Prediction of bacterial promoters, PRODORIC RELEASE 8.9 y PEPPER PROMOTER, para evitar afectar el posible promotor regulador del gen o genes río abajo de *cdgE* al momento de realizar la delección, dada la presunción de un operón.

El programa DNA Star fue utilizado para el análisis de dímeros, (hairpins) y la determinación de la temperatura de alineamiento.

### 7.2 PCR para el amplificado de los fragmentos PM y QH

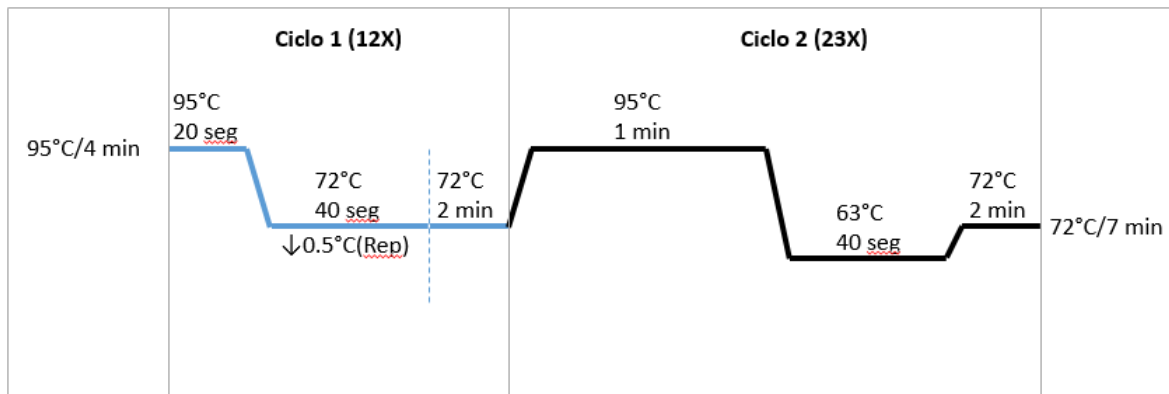
Se partió de una mezcla de reacción de acuerdo a la tabla 1, variando de acuerdo al tipo de enzima, utilizando las de alta fidelidad con fines de clonación y la recombinante para comprobación.

**Tabla 1.** Mezclas de reacción para las PCRs realizadas en este trabajo.

	DNA Polimerasa		DNA polimerasa de Alta Fidelidad
	Taq Recombinante	Platinum® Pfx	Phusion®
Agua	6.45	7.65	11.3
DMSO	1.2	0.5	1
Buffer 10X	2	2	4 (Buffer 5X)
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1.2	1.2	-
dNTPs (125 mM)	2	2	2
Iniciador delantero (10 mM)	0.5	0.5	0.5
Iniciador reverso (10 mM)	0.5	0.5	0.5
DNA Polimerasa	0.15	0.15	0.2
DNA	1 (~50 ng)	1 (~50 ng)	0.5 (~1pg-10ng)
Total (µl)	15	15	20

Las condiciones de amplificado utilizadas para la obtención de los fragmentos PM y QH fueron realizadas utilizando la técnica de PCR (touchdown), descrita por Korbie y Mattick (2008), utilizando una alta temperatura de alineamiento (72°C) en el primer ciclo y una teórica en el segundo (63°C) (Fig. 9), recurriendo a un tiempo de extensión de 2 minutos para ambos fragmentos, esperando fragmentos de 1201 y 1178 pb, respectivamente.

La extracción de DNA genómico fue realizada por métodos convencionales, con fenol-cloroformo (modificado de Sambrook *et al.* 1989)



**Fig. 9.** Condiciones de amplificado por PCR touch-down para la obtención de los productos homólogos, flanqueantes al fragmento del gen *cdgE* a deletar, nombrados de acuerdo a los genes *pm* y *qh*, río arriba y río abajo, respectivamente.

### 7.3 Construcción del plásmido pSUP-KmMCS/PM-QH

Los productos de PCR PM y QH fueron clonados en el vector pGEM-T Easy, para posteriormente ser liberados por restricción enzimática utilizando las enzimas *KpnI-XhoI* para el producto PM y *StuI-SpeI* para QH, y ser clonados en la dirección adecuada en el vector pSUP-KmMCS, flanqueando un casete de resistencia a kanamicina como antibiótico de selección de las mutantes que se obtuvieron por doble entrecruzamiento.

Ambas clonaciones se transformaron en la cepa quimiocompetente *E. coli* DH5- $\alpha$ , seleccionando a las transformantes en placas de LB (100  $\mu$ g/ml de Ap) en caso de los plásmidos construidos en pGEM-T Easy, o bien en placas de LB (20  $\mu$ g/ml de Km y 10  $\mu$ g/ml de Tc) (ver anexo) en el caso de pSUP-KmMCS, de acuerdo a Sambrook *et al.* (1989). Las restricciones enzimáticas y ligaciones fueron realizadas de acuerdo a las instrucciones del fabricante (ver anexo). La extracción de DNA, purificación del vector e inserto, previo a la ligación, se realizó y análisis según los métodos convencionales (Sambrook *et al.* 1989). La comprobación de las construcciones fue realizada mediante PCR (*Taq* DNA polimerasa), utilizando los mismos iniciadores diseñados para el amplificado de PM y QH, además de los iniciadores universales M13 y un perfil de restricción enzimático en el caso de la construcción final de pSUP-KmMCS/PM-QH.

### 7.4 Secuenciación del fragmento PM-Km-QH del plásmido pSUP-KmMCS/PM-QH

Esta fue realizada en la unidad de síntesis y secuenciación de DNA del Instituto de biotecnología de la UNAM. Para lo cual fueron utilizados los iniciadores universales M13F/M13R y los de kanamicina KmR-F7/KmR-R (Anexo).

### 7.5 Obtención de la mutante *A. brasilense* Sp245 $\Delta$ *cdgE*::Km

El plásmido pSUP-KmMCS/PM-QH fue incorporado en células quimiocompetentes de *E. coli* S17.1 mediante transformación (Sambrook *et al.* 1989), cepa utilizada como donadora, en la conjugación biparental con la cepa receptora *A. brasilense* Sp245. Las transconjugantes resistentes a Km fueron seleccionadas en placas de medio mínimo K-malato/Km 50  $\mu$ g/ml (ver anexo). Como contra-selección fue utilizado el antibiótico Tc, siendo posibles candidatas las clonas sensibles a Tc pero resistentes a Km. Como ensayo comprobatorio de las posibles mutantes *A. brasilense* Sp245 $\Delta$ *cdgE*::Km, se realizó un amplificado por PCR de la región afectada, utilizando los iniciadores PM3-F/QH3-R, con un tiempo de extensión de 4 min. También fue realizada una PCR de comprobación de la inserción del casete de

resistencia a Km, utilizando la combinación de iniciadores PM3-F/KmR-R y KmR-F7/QH3-R (Anexo). Se utilizó como control positivo DNA de *E. coli* S17.1 pSUP-KmMCS/PM-QH y como negativo DNA de *A. brasilense* Sp245.

### **7.6 Obtención de la mutante *A. brasilense* Sp245 $\Delta$ cdgE, al utilizar como vector pSUP- $\Delta$ Km-MCS/PM- $\Delta$ cdgE-QH**

Para la eliminación del casete de resistencia a Km de la mutante *A. brasilense* Sp245 $\Delta$ cdgE::Km, fue utilizado el vector pSUP- $\Delta$ Km-MCS/PM- $\Delta$ cdgE-QH, el cual fue obtenido a partir del plásmido pSUP-KmMCS/PM-QH tras la eliminación del gen de resistencia a Km, mediante restricción enzimática con *Xma*I y su posterior religación. pSUP- $\Delta$ Km-MCS/PM- $\Delta$ cdgE-QH fue incorporado en *E. coli* S17.1 (Sambrook *et al.* 1989). Se realizó la conjugación biparental entre la cepa donadora *E. coli* S17.1 pSUP- $\Delta$ Km-MCS/PM- $\Delta$ cdgE-QH y la receptora *A. brasilense* Sp245 $\Delta$ cdgE::Km. La selección de transconjugantes con entrecruzamiento simple fue realizada en placas de medio mínimo K-malato/Tc (10  $\mu$ g/ml) (ver anexo), posteriormente estas fueron crecidas en medio mínimo K-malato/sin antibiótico, esperando seleccionar el doble entrecruzamiento. La comprobación de la mutante fue realizada por pérdida de la resistencia a Km y PCR con los iniciadores PM3-F/QH3-R (Anexo) utilizando como control positivo el DNA de *E. coli* S17.1 pSUP- $\Delta$ Km-MCS/PM- $\Delta$ cdgE-QH, y como negativo DNA de *A. brasilense* Sp245 y de la mutante *A. brasilense* Sp245 $\Delta$ cdgE::Km.

### **7.7 Construcción del plásmido pK18mobsacB/PM- $\Delta$ cdgE-QH**

Dado los resultados nulos en la obtención de la mutante *A. brasilense* Sp245 $\Delta$ cdgE al utilizar como vector pSUP- $\Delta$ Km-MCS/PM- $\Delta$ cdgE-QH, se construyó el vector pK18mobsacB/PM- $\Delta$ cdgE-QH, el cual fue construido mediante la clonación del fragmento PM- $\Delta$ cdgE-QH proveniente de pSUP- $\Delta$ Km-MCS/PM-QH en el vector linealizado pK18mobsacB por restricción con la enzima *Sma*I, siendo previamente amplificado PM- $\Delta$ cdgE-QH por PCR de alta fidelidad (DNA polimerasa Phusion<sup>®</sup>) utilizando los iniciadores PM3-F/QH3-R, y como DNA templado el plásmido pSUP- $\Delta$ Km-MCS/PM- $\Delta$ cdgE-QH. Tras la ligación vector-inserto, se realizó la transformación correspondiente en células quimiocompetentes *E. coli* DH5- $\alpha$ , seleccionando a las transformantes en placas de LB (20  $\mu$ g/ml de Km) (Sambrook *et al.* 1989).

La comprobación de la construcción fue realizada mediante PCR convencional, utilizando los iniciadores PM3-F/QH3-R (Anexo). La restricción enzimática con *KpnI* sirvió para determinar la dirección de la clonación.

## **7.8 Secuenciación del fragmento PM- $\Delta$ cdgE-QH del plásmido**

### **pK18mobsacB/PM- $\Delta$ cdgE-QH**

El fragmento PM- $\Delta$ cdgE-QH fue amplificado con la enzima de alta fidelidad Fusion y clonado en un vector pGEM, a partir del cual se realizó la secuenciación nucleotídica de PM- $\Delta$ cdgE-QH, siendo utilizados los iniciadores M13-R/PM3-R Y M13-F/QH3-F (Anexo). La comprobación del vector construido pGEM/PM- $\Delta$ cdgE-QH fue realizada por PCR utilizando los iniciadores PM3-F/QH3-R (Anexo) y mediante restricciones enzimáticas con *PvuII*, *SacII* y *BamHI*. Se envió a secuenciar a la unidad de síntesis y secuenciación de DNA del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

## **7.9 Obtención de la mutante *A. brasilense* Sp245 $\Delta$ cdgE, al utilizar como**

### **vector pK18mobsacB/PM- $\Delta$ cdgE-QH**

La transferencia de la construcción pK18mobsacB/PM- $\Delta$ cdgE-QH fue realizada por conjugación biparental entre la cepa donadora *E. coli* S17.1 pK18mobsacB/PM- $\Delta$ cdgE-QH y la receptora *A. brasilense* Sp245. Las trasconjugantes con el entrecruzamiento simple, fueron seleccionadas en placas de medio mínimo K-malato/Km (50  $\mu$ g/ml-Ap 200  $\mu$ g/ml) (ver anexo) y posteriormente éstas fueron crecidas en placas de medio mínimo K-malato/sin antibiótico con diferentes concentraciones de sacarosa. Las colonias crecidas fueron sembradas en placas de medio mínimo K-malato/Km (50  $\mu$ g/ml) y las posibles mutantes que fueron sensibles a Km se comprobaron por PCR utilizando los iniciadores PM3-F/QH3-R (Anexo); como control positivo y negativo se utilizó DNA de *E. coli* S17.1 pK18mobsacB/PM- $\Delta$ cdgE-QH y de *A. brasilense* Sp245, respectivamente. Para comprobar la eliminación del plásmido pK18mobsacB/PM- $\Delta$ cdgE-QH fue realizada una PCR utilizando los iniciadores PM3-R/KmR-R (Anexo) y mismos controles.

## **7.10 Hibridación en colonia**

Tras realizarse el doble entrecruzamiento deseado, se corroboró la eliminación del plásmido pK18mobsacB/PM- $\Delta$ cdgE-QH en la mutante *A. brasilense* Sp245 $\Delta$ cdgE por el estuche de detección de híbridos por inmunoensayo, utilizando como sonda un fragmento del vector. Para lo cual, previamente se realizó la selección de colonias individuales, las cuales fueron

lisadas, y el DNA liberado fijado por calor a una membrana de Nylon (Roche <sup>®</sup>DIG DNA Labeling and Detection; Sambrook *et al.* 1989). Como control positivo se utilizó el DNA de *E. coli* S17.1 pK18mobsacB/PM- $\Delta$ cdgE-QH y como negativo el DNA de *A. brasilense* Sp245.

### **7.11 Verificación de pertenencia al género *Azospirillum* en la mutante *A. brasilense* Sp245 $\Delta$ cdgE**

Esta se realizó utilizando los iniciadores AZO-F/AZO-R (Anexo) que amplifican para una región intergenica conservada en *Azospirillum*, correspondiente al DNAr 23S-DNAr 16S.

### **7.12 RT-PCR**

Fue realizada la extracción de RNA total de acuerdo a métodos convencionales con fenol-cloroformo. Cualquier contaminación de DNA y cationes divalentes fue removida, utilizando el estuche de Life Technologies <sup>®</sup>Turbo DNA-Free, comprobando la ausencia de DNA mediante PCR utilizando iniciadores DNAr 16 S. La síntesis de cDNA fue realizada utilizando el estuche de Thermo Scientific <sup>®</sup>Maxima First Strand cDNA Synthesis.

A partir del cDNA obtenido fue comprobada la mutación y se determinó la ausencia de mutación polar, mediante PCR utilizando los iniciadores dgcE-F/QH4-R y CarP1R-R/QH3-R (Anexo), respectivamente, y un tiempo de extensión de 1 min. Como control positivo en ambos ensayos, se utilizó DNA de *E. coli* S17.1 pK18mobsacB/PM- $\Delta$ cdgE-QH, y en el caso de la determinación de la ausencia de mutación polar también se utilizó DNA de *A. brasilense* Sp245. Para la comprobación de la mutante, se utilizó como control negativo DNA de *A. brasilense* Sp245.

### **7.13 Evaluación del fenotipo de la cepa mutante**

#### **7.13.1 Crecimiento**

El crecimiento fue evaluado realizando curva de crecimiento a 24 h, en matraces de 150 ml conteniendo 50 ml de medio mínimo K-malato (ver anexo), siendo inoculada una cantidad de aproximadamente  $8.0 \times 10^6$  UFC, tanto de la cepa mutante *A. brasilense* Sp245 $\Delta$ cdgE, así como de la silvestre *A. brasilense* Sp245, registrando a tiempos determinados las UFC mediante el método modificado de Miles y Misra (1938) y la D. O. 600 nm, cuya técnica de UFC consistió en realizar diluciones seriadas  $10^{-3}$  a  $10^{-7}$ , siendo estas cultivadas en placa por triplicado, tras un periodo de incubación de 48 h/30°C las colonias fueron sumadas y



promediadas, cuyo valor fue utilizado para obtener las UFC/ml utilizando la siguiente formula:

$$\frac{(\text{No. de Colonias})(1000)(\text{Factor de Dilución})}{10} = \text{No. de UFC/ml}$$

### 7.13.2 Estrés salino

La afectación debido al estrés salino en ambas cepas, mutante *A. brasilense* Sp245 $\Delta$ cdgE y silvestre *A. brasilense* Sp245, fue determinada mediante la evaluación del crecimiento después de 20h por D. O. 600 nm, con diferentes concentraciones de NaCl: 10, 50, 100, 150, 200, 250 y 300 mM, en medio K-malato inoculado con aproximadamente 4.0x10<sup>6</sup> UFC. Tal ensayo fue realizado en seis experimentos independientes.

### 7.13.3 Formación de biopelícula

Este fenotipo fue evaluado por microscopia de fluorescencia mediante la tinción de DNA con los colorantes yoduro de propidio y TOTO<sup>®</sup>-1 como contraste, y la determinación cuantitativa por el método de cristal violeta (CV) (Arruebarrena *et al.* 2013). Para ambos métodos se utilizaron placas de cultivo celular de 24 pocillos conteniendo 2 ml de medio NFB (ver anexo) previamente inoculado mediante dilución 1:100 (1980  $\mu$ l de NFB+20  $\mu$ l de cultivo), partiendo de un cultivo de D. O. 600 nm de aproximadamente 1, el cual fue concentrado a D. O. de 2 por centrifugado y re-suspensión. Se realizó una previa colocación de cubre-objetos en el caso del ensayo por microscopia, permitiendo la formación de biopelícula sobre éste para su posterior análisis.

En la cuantificación de la biopelícula, fueron agregados 500  $\mu$ l de CV al 0.5% por cada pocillo, transcurrida media hora, se eliminó el CV, se enjuagaron muy cuidadosamente los pocillos con 2 ml de agua tridestilada y la placa fue secada sobre papel, para posteriormente agregar una solución al 33% de ácido acético y disolver el CV, el cual se cuantificó a 595 nm. Los datos fueron normalizados dividiendo cuantificación D. O. 595 nm/cantidad de células D. O. 600 nm.

## 8 Resultados

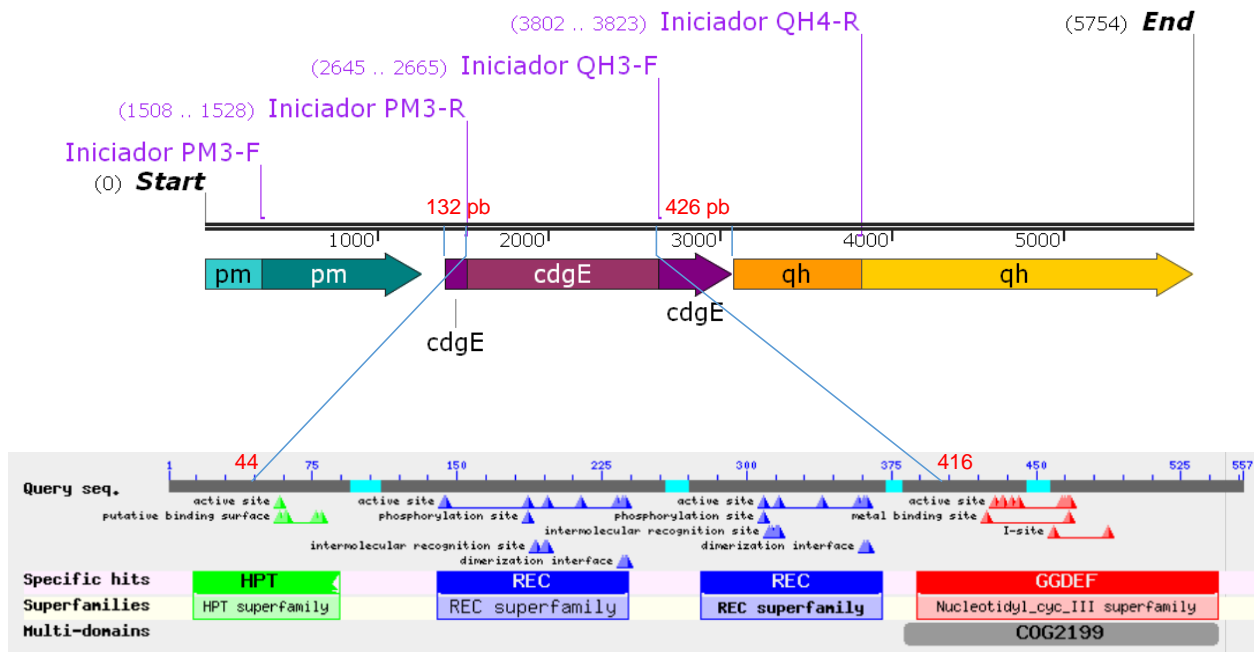
### 8.1 Diseño de iniciadores

Los iniciadores que se utilizaron para construir la delección sin generar efecto polar son representados en la tabla 2. A pesar de no obtener resultados definitivos en el caso del

análisis de promotores putativos, fueron tomados en cuenta todos aquellos de mayor “score”, evitando de esta manera afectar posibles promotores. En la figura 10 se muestra la región de 426 pb considerada con promotores putativos y los 1116 pb eliminados del gen *cdgE* que afectan en su totalidad los dominios de la proteína.

**Tabla 2** Iniciadores utilizados en la amplificación de los fragmentos PM y QH.

Iniciador	Secuencia	Sitio de corte
PM3-F	TGTA <b>GGTACC</b> CTTCTTGC GTTCCCGATCTCG	<i>KpnI</i>
PM3-R	TGAT <b>CTCGAG</b> GTGGGCAGTTGCGCTGTTCTC	<i>XhoI</i>
QH3-F	TCAT <b>AGGCCT</b> CCGTTGGCTTTGCGACTGGTG	<i>StuI</i>
QH3-R	TGTA <b>ACTAGT</b> CCGGGCCAAAAGCGTCGTTGGC	<i>SpeI</i>



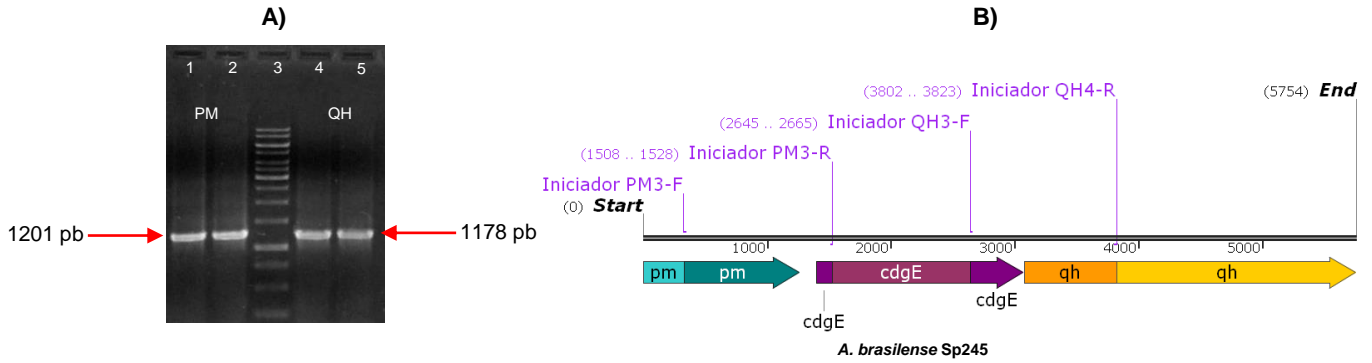
**Fig. 10.** Contexto genético de *cdgE*, mostrando la región eliminada de 1116 pb (morado claro) y los dominios afectados, además de la región conteniendo promotores putativos (región de 426 pb) y los iniciadores utilizados en el presente trabajo para la generación del intercambio alélico.

## 8.2 Construcción del plásmido pSUP-KmMCS/PM-QH

### 8.2.1 Amplificado de los fragmentos PM y QH

En la figura 11 se muestra el amplificado del fragmento PM y QH, utilizando los iniciadores PM3-F/PM3-R y QH3-F/QH3-R, cuyos tamaños son de 1201 y 1178 pb, respectivamente, correspondientes a las regiones que flanquean al sitio de delección de *A. brasilense* Sp245

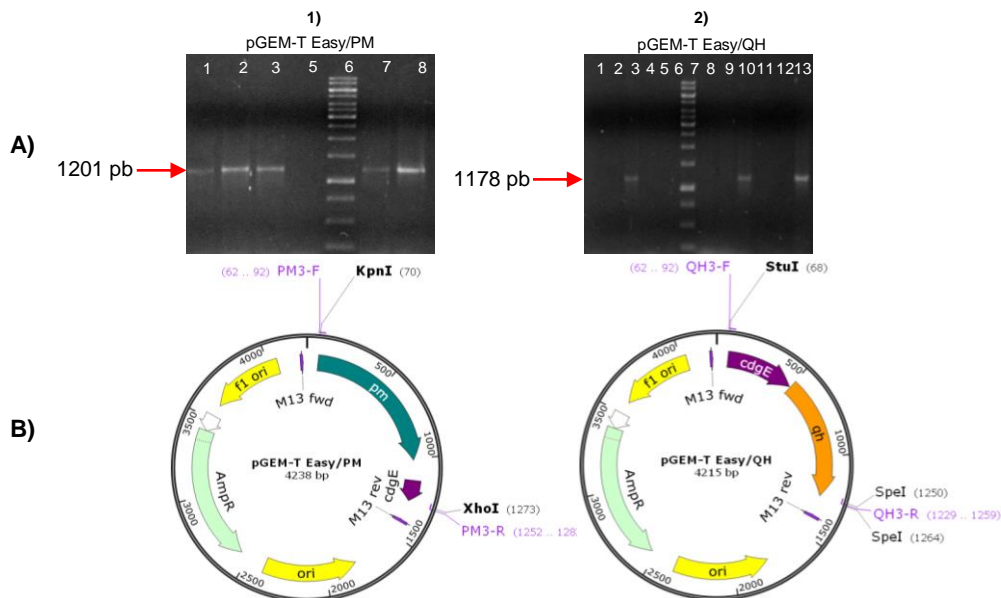
que se requieren para el doble entrecruzamiento, incluyen parte del gen *cdgE* y de los genes ubicados río arriba y río abajo, los cuales codifican para una proteína de membrana de función desconocida (PM) y para una cinasa histidínica (QH), respectivamente (Ver Fig. 8).



**Fig. 11. A)** Electroforetograma del producto de PCR de los fragmentos PM (carril 1 y 2) y QH (carril 4 y 5), MPM 1 kb carril 3. **B)** Esquema del contexto genético donde se muestra el gen *cdgE* (morado) y los iniciadores para el amplificado de los fragmentos PM y QH.

### 8.2.2 Clonación de los fragmentos PM y QH en el vector suicida pSUP-KmMCS

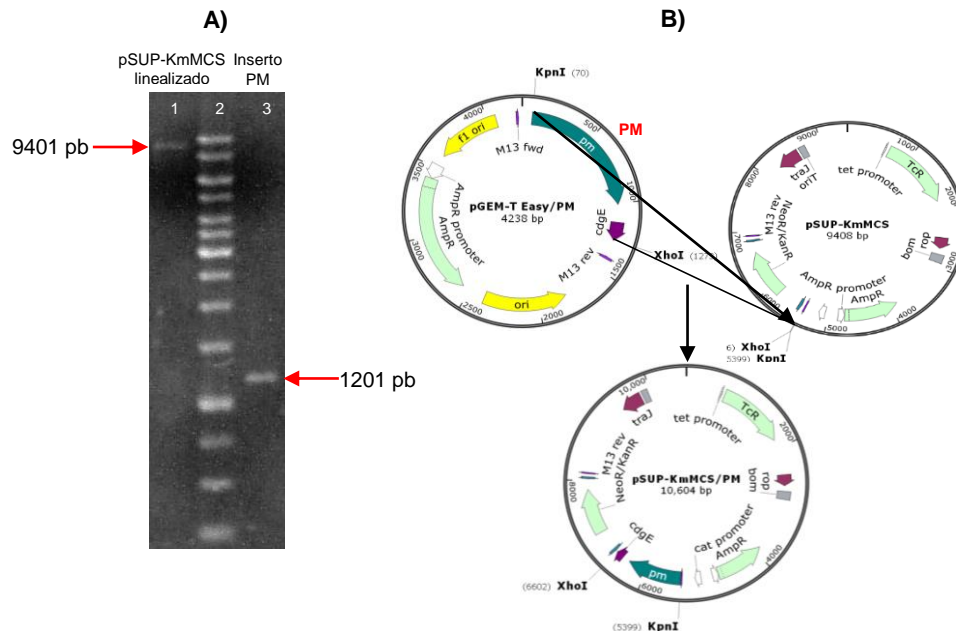
La clonación de los fragmentos PM y QH en el vector pGEM-T Easy, previo a la subclonación en pSUP-KmMCS, se demostró mediante el amplificado por PCR en colonia, (Fig. 12).



**Fig. 12. A)** Electroforetogramas del escrutinio por PCR en colonia, de las clonas obtenidas con los plásmidos pGEM-T Easy/PM (1. Carriles 1-3, 7 y 8) y pGEM-T Easy/QH (2. Carriles 3, 10 y 13), MPM 1 kb carril 6 y 7 respectivamente. **B)** Esquema del mapa de ambos plásmidos, mostrando los iniciadores utilizados para la confirmación de la clonación.

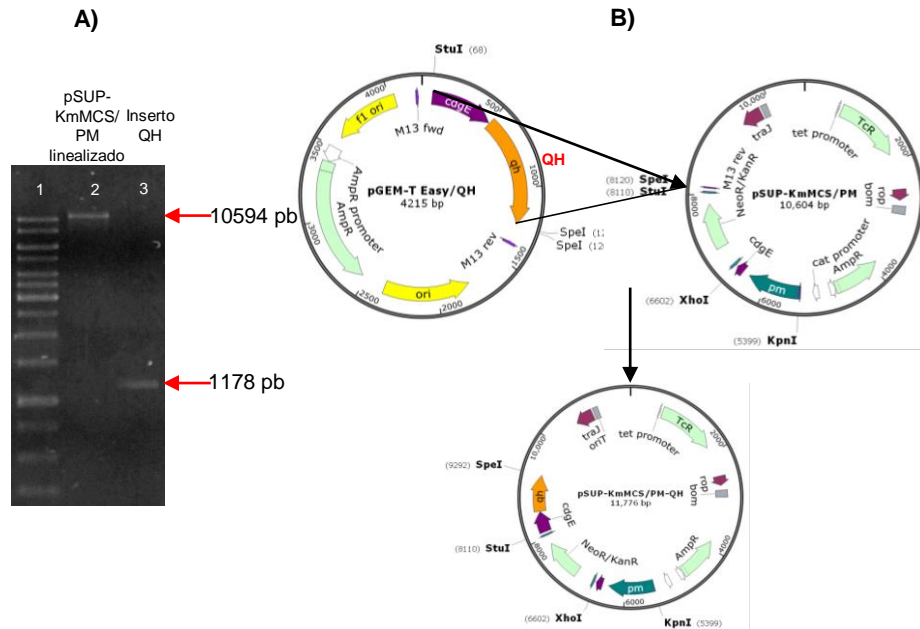
### 8.2.2.1 Clonación del fragmento PM:

Primeramente se realizó la clonación del fragmento PM (procedente de pGEM-T Easy/PM) rio arriba del casete de Km en pSUP-KmMCS tras la restricción enzimática con *KpnI* y *XhoI* en ambos vectores de acuerdo a la sección de Materiales y métodos, con lo cual se generó el plásmido pSUP-KmMCS/PM (Fig. 13).

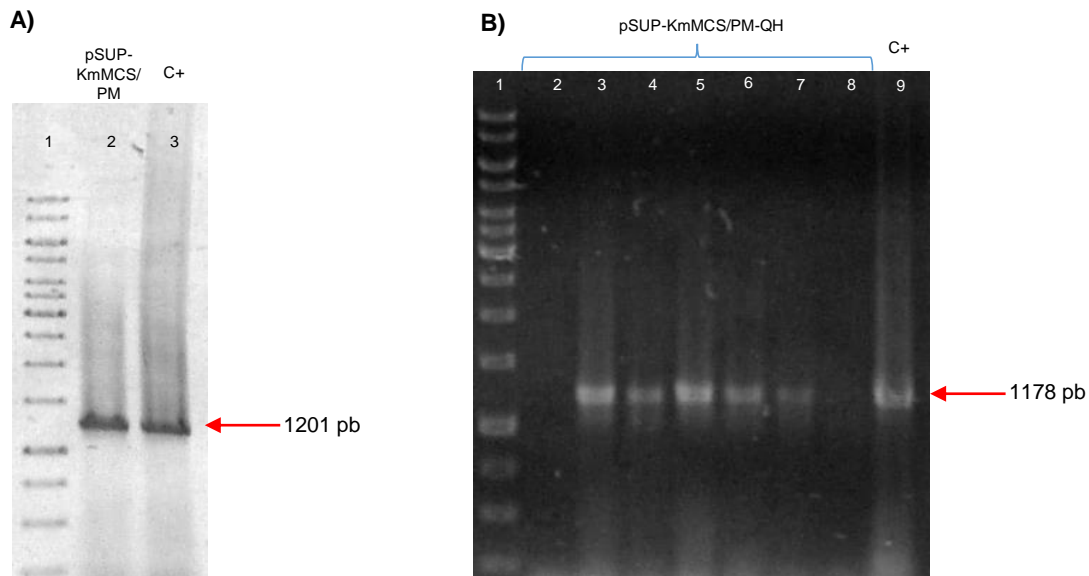


**Fig. 13. A)** Electroforesograma del vector linealizado pSUP-KmMCS (carril 1) e inserto PM (carril 3) purificados, obtenidos por digestión con *KpnI* y *XhoI*, MPM 1 kb carril 2. **B)** Representación de la construcción del plásmido pSUP-KmMCS/PM.

### 8.2.2.2 Clonación del fragmento QH, (Fig. 14).

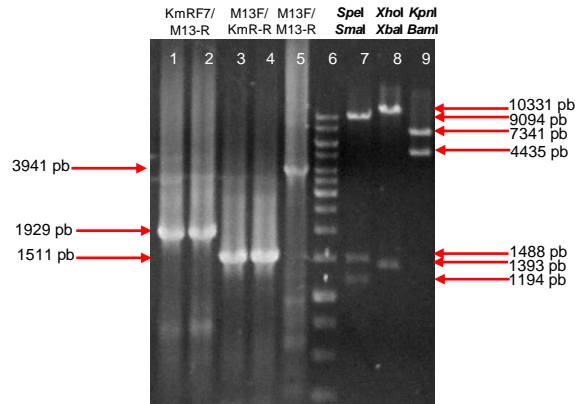


**Fig. 14.** **A)** Electroforetograma del vector linealizado pSUP-KmMCS/PM (carril 2) e inserto QH (carril 3) purificados, obtenidos por digestión con *SpeI* y *StuI*, MPM 1 kb carril 1. **B)** Representación de la construcción del plásmido pSUP-KmMCS/PM-QH.



**Fig. 15.** Electroforetogramas del escrutinio por PCR en colonia. **A)** Clonas de pSUP-KmMCS/PM (Carril 2) **B)** Clonas de pSUP-KmMCS/PM-QH (Carril 3-7). MPM 1 kb carril 1. Se utilizó como control positivo pGEM-T Easy/PM y pGEM-T Easy/PM-QH, respectivamente.

La Figura 16 muestra la comprobación de pSUP-KmMCS/PM-QH, mediante amplificadores de PCR y dobles restricciones enzimáticas, obteniendo el peso molecular correspondiente.



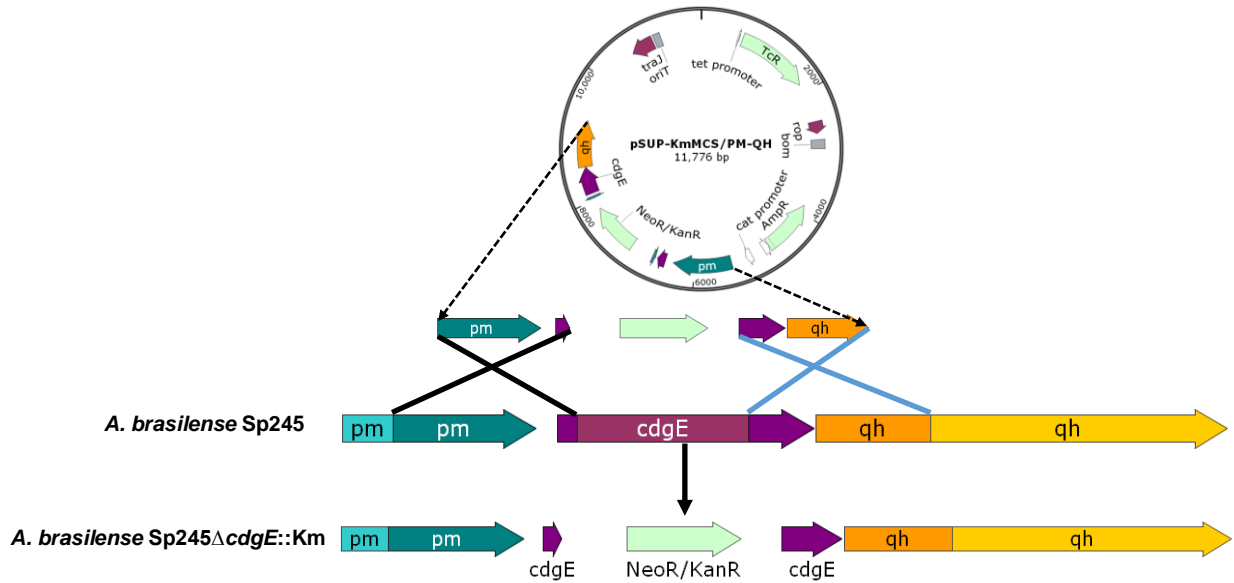
**Fig. 16.** Electroforetograma del escrutinio por PCR (carril 1-5) y doble restricción enzimática (carril 7-9) de pSUP-KmMCS/PM-QH, MPM 1kb carril 6.

### 8.2.3 Secuenciación del fragmento PM-Km-QH de pSUP-KmMCS/PM-QH

Se obtuvo aproximadamente el total de la secuencia de nucleótidos correspondiente al fragmento QH, con un porcentaje de similitud de 99.23 en los datos obtenidos de la comparación con la secuencia de *A. brasilense* Sp245 mediante el programa Clustal 2.1, en cuanto al fragmento PM solo se obtuvo aproximadamente el 40% de la secuencia nucleotídica correspondiente a este, con un porcentaje de similitud de 98.84 con *A. brasilense* Sp245, considerando suficiente para determinar la veracidad de los fragmentos clonados.

### 8.3 Obtención de la mutante *A. brasilense* Sp245 $\Delta$ cdgE::Km

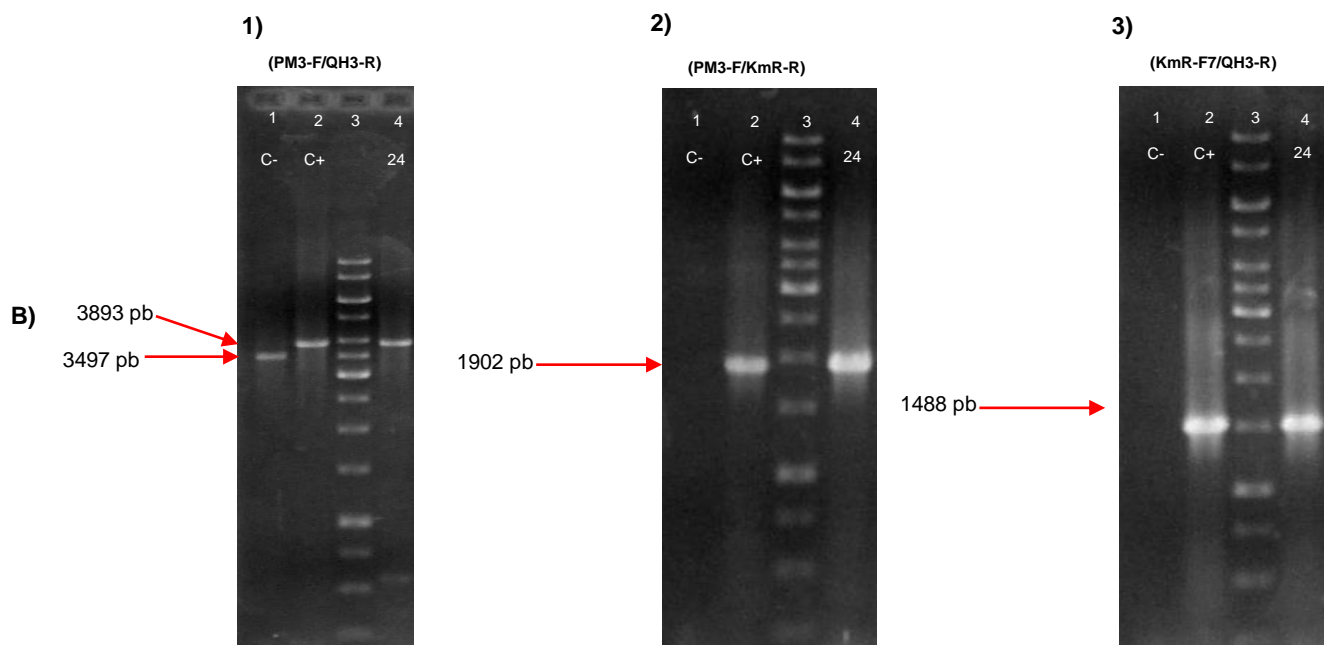
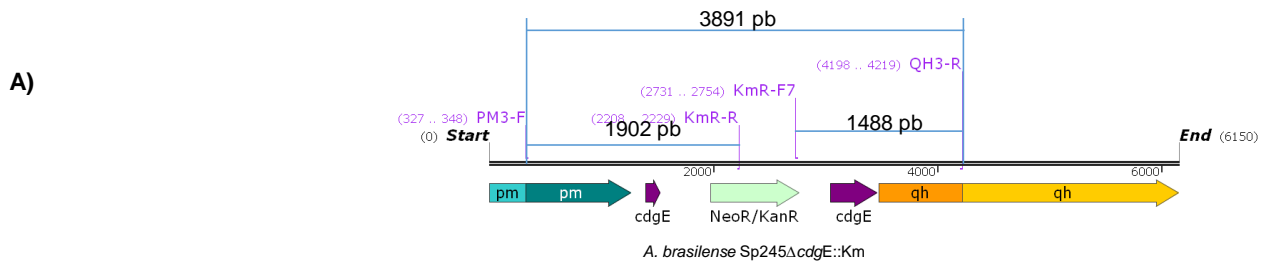
Como se esquematiza en la figura 17, fue posible realizar el doble entrecruzamiento por recombinación homóloga, entre los fragmento PM y QH del plásmido construido pSUP-KmMCS/PM-QH y sus respectivas secuencias homólogas en el genoma de *A. brasilense* Sp245, necesario para eliminar el fragmento del gen *cdgE*, a la vez que se insertó la resistencia a Km, resultando en la obtención de la mutante *A. brasilense* Sp245 $\Delta$ cdgE::Km.



**Fig. 17.** Representación del doble entrecruzamiento generado por recombinación homóloga plásmido (pSUP-KmMCS/PM-QH)-genoma (*A. brasilense* Sp245) para la obtención de la mutante *A. brasilense* Sp245 $\Delta$ cdgE::Km.

### 8.3.1 Comprobación de la mutante *A. brasilense* Sp245 $\Delta$ cdgE::Km

La selección de las transconjugantes obtenidas, entre ellas la número 24, mediante la resistencia a Km y la contraselección con la sensibilidad a la Tc sugirió la obtención del reemplazo alélico, mismo que se corroboró por PCR. Los resultados indicaron que de acuerdo a los tamaños de los amplificadores correspondientes y a los controles positivo y negativo (Fig. 18-A y 18-B 1), se verificó la mutación por deleción-inserción. Otros controles de la inserción-deleción también resultaron con los amplificadores esperados: 1902 y 1488 pb, al utilizar la combinación de iniciadores PM3-F/KmR-R y KmR-F7/QH3-R, indicando que el casete se insertó correctamente (Fig.18-A y 18-B 2-3).

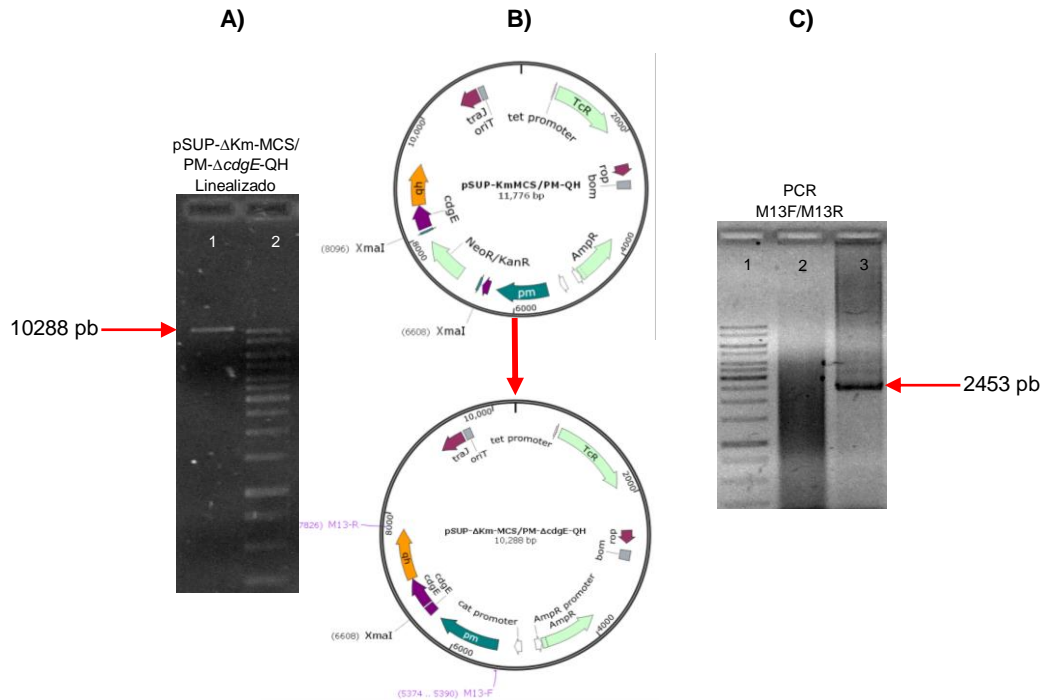


**Fig. 18. A)** Representación de la mutante *A. brasilense* Sp245Δ*cdgE*::Km 24, mostrando los iniciadores utilizados para su comprobación. **B)** Electroforetograma de PCRs de comprobación de la mutante (carril 4) con los iniciadores 1. PM3-F/QH3-R, 2. PM3-F/KmR-R y 3. KmR-F7/QH3-R; Control negativo DNA de *A. brasilense* Sp245 (carril 1) y como positivo DNA de pSUP-KmMCS/PM-QH (carril 2), MPM 1kb carril 3.

#### 8.4 Construcción del plásmido pSUP-ΔKm-MCS/PM-Δ*cdgE*-QH

En la figura 19 se representa la construcción del plásmido pSUP-ΔKm-MCS/PM-Δ*cdgE*-QH, así como la comprobación por medio de PCR.





**Fig. 19. A)** Electroforetograma del fragmento de 10288 correspondiente al plásmido pSUP- $\Delta$ Km-MCS/PM- $\Delta$ cdgE-QH linealizado (carril 1), MPM 1kb carril 2. **B)** Representación de la construcción del plásmido pSUP- $\Delta$ Km-MCS/PM- $\Delta$ cdgE-QH, a partir de la restricción enzimática de pSUP-KmMCS/PM-QH con *Xma*I y religación. **C)** Electroforetograma de comprobación utilizando los iniciadores M13 (carril 3), MPM 1 kb carril 1.

### 8.5 Obtención de la mutante *A. brasilense* Sp245 $\Delta$ cdgE, utilizando el plásmido pSUP- $\Delta$ Km-MCS/PM- $\Delta$ cdgE-QH

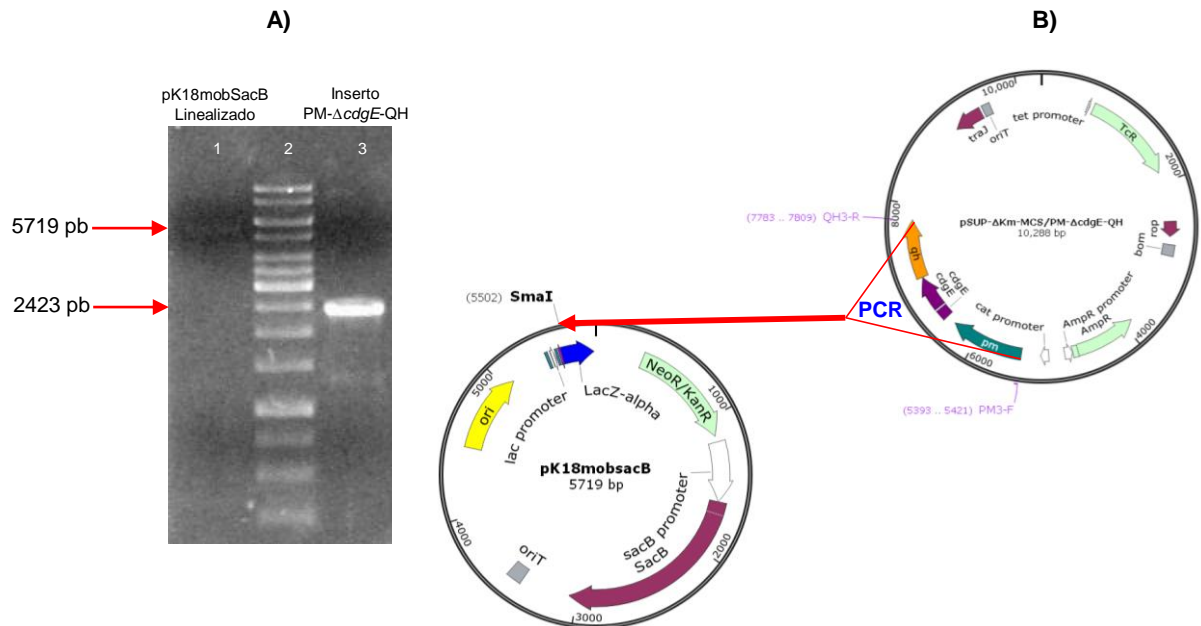
Tras diferentes intentos, no fue posible seleccionar la mutante *A. brasilense* Sp245 $\Delta$ cdgE utilizando pSUP- $\Delta$ Km-MCS/PM- $\Delta$ cdgE-QH, probablemente por la falta de la condición de selección que permitiera detectar la eliminación del casete de resistencia a Km de la mutante *A. brasilense* Sp245 $\Delta$ cdgE::Km a través del doble entrecruzamiento por recombinación homóloga y generar así la mutación, incluso se intentó obtener la mutante partiendo de la cepa silvestre.

Ya que no se tenía un marcador de selección se procedió a realizar el crecimiento de las posibles transconjugantes por pases consecutivos en medio K-malato, sin embargo no se obtuvieron clones de *A. brasilense* Sp245 $\Delta$ cdgE, por lo que fue necesario realizar una nueva estrategia de selección negativa utilizando el vector pK18mobsacB.

### 8.6 Construcción del plásmido pK18mobsacB/PM- $\Delta$ cdgE-QH

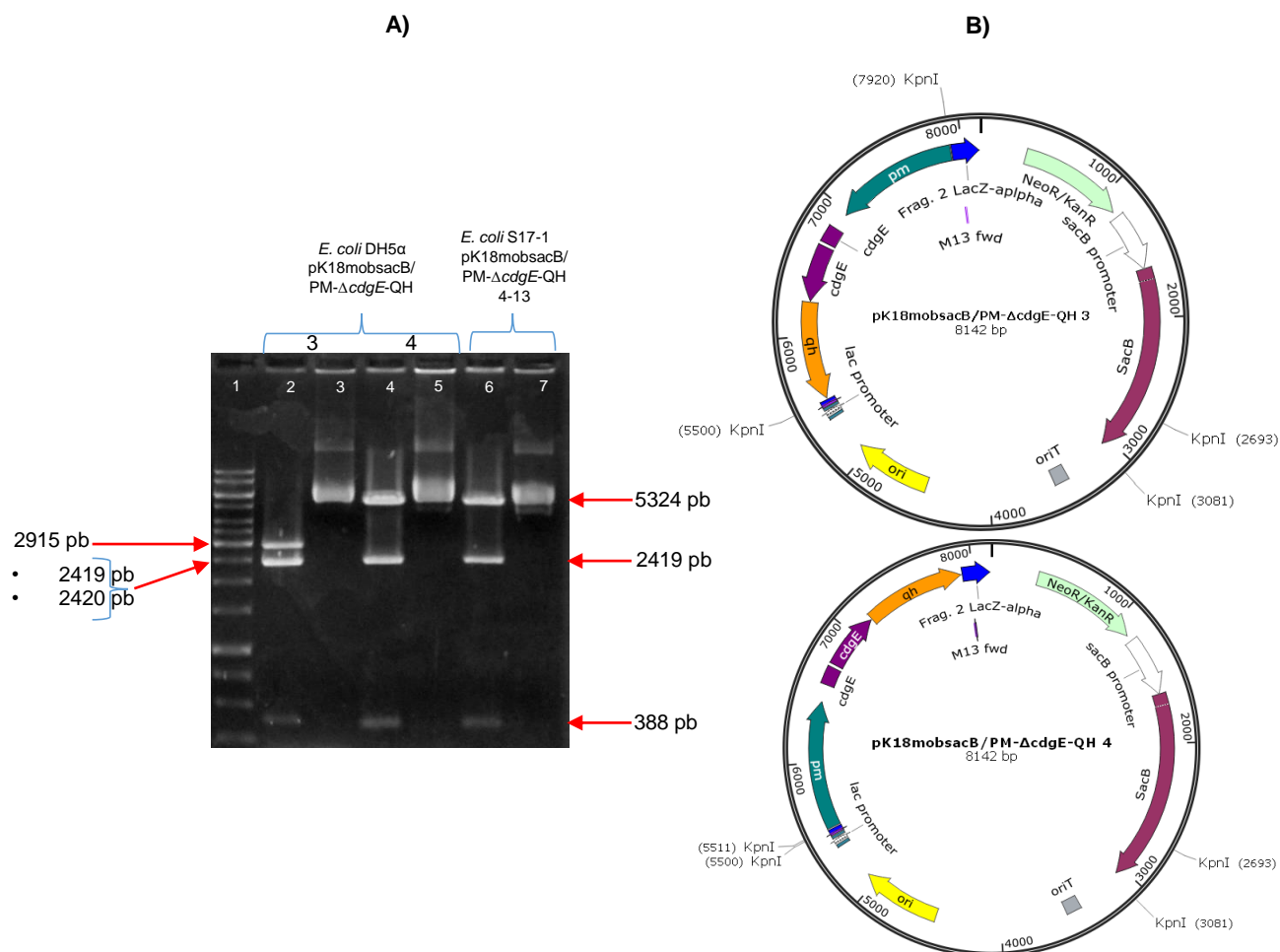
El DNA purificado del vector pK18mobsacB que fue linealizado por restricción con *Sma*I, cuyo tamaño es de 5719 pb; y el inserto PM- $\Delta$ cdgE-QH de 2423 pb son mostrados en la

imagen de electroforesis de la figura 20-A. En la figura 20-B se representa el proceso de construcción del plásmido pK18mobsacB/PM- $\Delta$ cdgE-QH partiendo del vector linealizado pK18mobsacB y el inserto PM- $\Delta$ cdgE-QH.



**Fig. 20. A)** Electroforetograma del vector pK18mobsacB linealizado por restricción enzimática con *Sma*I (carril 1), y el inserto PM- $\Delta$ cdgE-QH a clonar obtenido por PCR (carril 3), MPM 1 kb carril 2. **B)** Representación de la construcción del plásmido pK18mobsacB/PM- $\Delta$ cdgE-QH.

Al comprobar la dirección de clonación en las transformantes obtenidas *E. coli* DH5- $\alpha$  pK18mobsacB/PM- $\Delta$ cdgE-QH, se seleccionaron clonas con ambas direcciones del inserto, de acuerdo a los fragmentos generados tras restricción con *Kpn*I: 11, 388, 2419 y 5324 pb en el caso de clonación en sentido contrario a la transcripción (pK18mobsacB/PM- $\Delta$ cdgE-QH 4); 388, 2419, 2420 y 2915 en sentido de la transcripción (pK18mobsacB/PM- $\Delta$ cdgE-QH 3) (Fig. 21).



**Fig. 21. A)** Electroforetograma de la restricción enzimática con *KpnI* del plásmido pK18mobsacB/PM- $\Delta$ cdgE-QH 3 (carril 2) y pK18mobsacB/PM- $\Delta$ cdgE-QH 4 (carril 4 y 6), plásmido sin digerir (carril 3,6 y 7), MPM 1 kb carril 1. **B)** Esquema del mapa de ambos plásmidos, mostrando las restricciones enzimáticas.

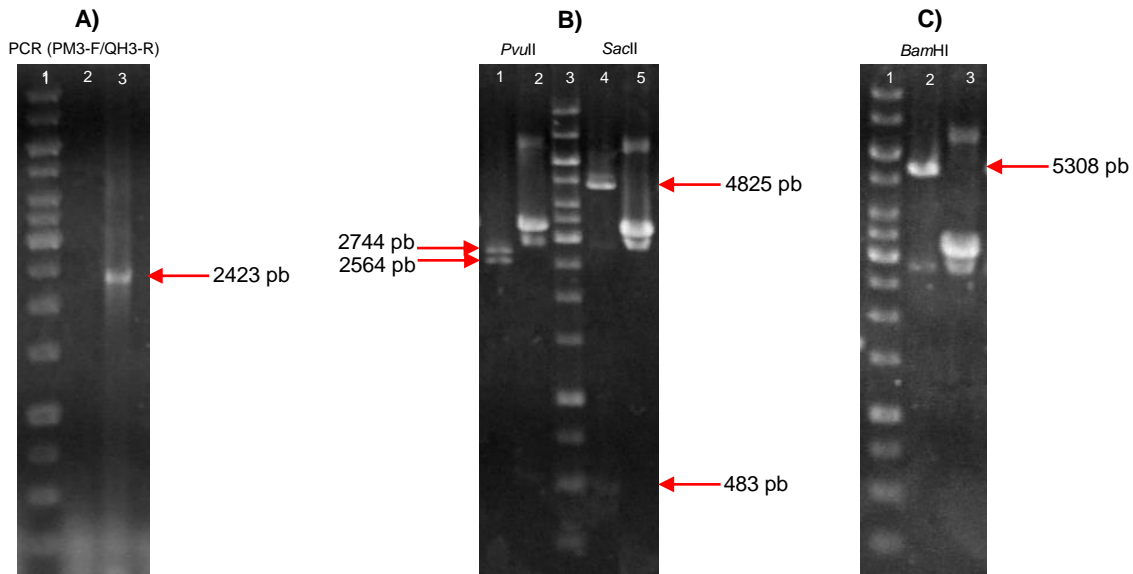
### 8.6.1 Secuenciación del fragmento PM- $\Delta$ cdgE-QH del plásmido pK18mobsacB/PM- $\Delta$ cdgE-QH

#### 8.6.1.1 Construcción de pGEM/PM- $\Delta$ cdgE-QH:

Con el fin de verificar la secuencia PM- $\Delta$ cdgE-QH en la construcción pK18mobsacB/PM- $\Delta$ cdgE-QH, se clono este fragmento de 2.744 kb en un plásmido pGEM previamente digerido con *PvuII*, generando el plásmido pGEM/PM- $\Delta$ cdgE-QH.

La comprobación del vector construido es mostrada en la figura 22. En el panel A se muestra el amplificado por PCR de 2423 pb, cuyo tamaño es el correspondiente al fragmento PM- $\Delta$ cdgE-QH clonado. Los tamaños correspondientes a las restricciones enzimáticas realizadas con *PvuII* son mostradas en la figura 22-B, las cuales generaron fragmentos de 2744 y 2564 pb. En cuanto a la restricción con *SacII*, fragmentos de 4825 y

483 pb fueron generados (Fig 22-B). En el caso de la restricción con *Bam*HI, el plásmido solo fue linealizado a un fragmento de 5308 pb (Fig. 22-C).



**Fig. 22.** Electroforetogramas para la comprobación del plásmido pGEM/PM- $\Delta$ *cdgE*-QH. **A)** PCR con iniciadores PM3-F/QH3-R (carril 3). **B)** Restricciones enzimáticas con *Pvu*II (carril 1) y *Sac*I (carril 4), con el vector sin digerir como control (carril 2 y 5). **C)** Restricción enzimática con *Bam*HI (carril 2), vector sin digerir (carril 3). MPM 1 kb carril 1, 3 y 1, respectivamente.

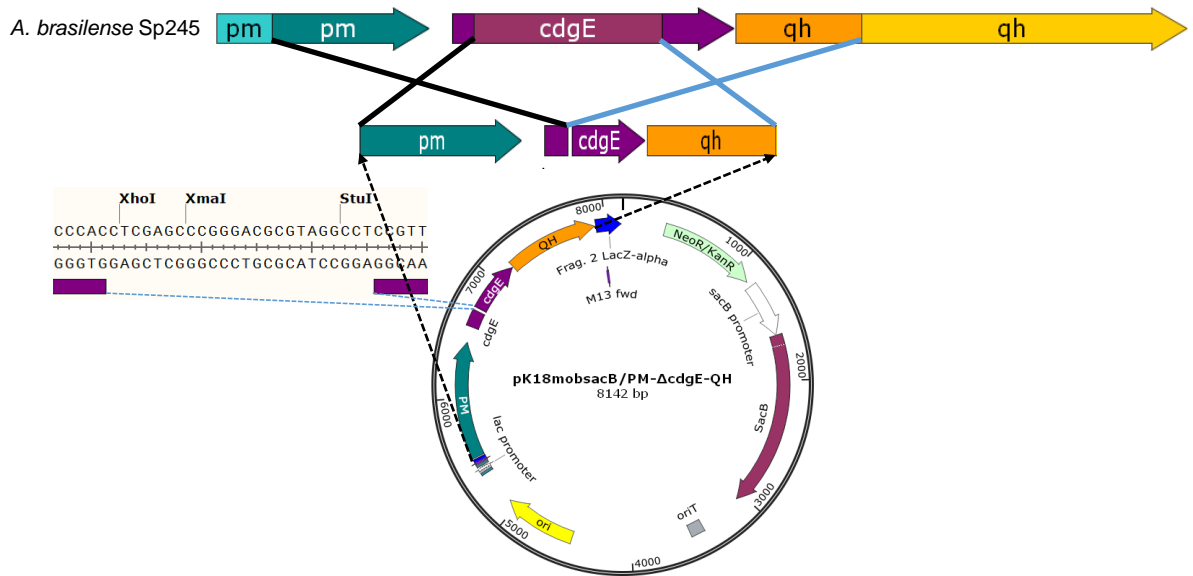
#### 8.6.1.2 Análisis de secuencia

El fragmento PM- $\Delta$ *cdgE*-QH fue secuenciado en su totalidad, registrando un porcentaje de similitud desde 99.47 hasta el 100% en los datos obtenidos de la comparación con la secuencia de *A. brasilense* Sp245 mediante el programa Clustal 2.1, siendo subrayados en rojo algunos cambios obtenidos en la secuencia (Anexo D), tal evidencia demuestra la presencia de las secuencias homologas en el plasmido pK18mobsacB/PM- $\Delta$ *cdgE*-QH, necesarias para el doble entrecruzamiento.

### 8.7 Obtención de la mutante *A. brasilense* Sp245 $\Delta$ *cdgE*, al utilizar como vector pK18mobsacB/PM- $\Delta$ *cdgE*-QH

En un principio se registraron los mismos resultados al utilizar el plasmido pSUP- $\Delta$ Km-MCS/PM- $\Delta$ *cdgE*-QH. Sin embargo, el empleo de la construcción contenida en el vector pK18mobsacB/PM- $\Delta$ *cdgE*-QH permitió obtener la mutante por delección a una baja frecuencia de recombinación, seleccionando un primer entrecruzamiento en medio mínimo + Km y posteriormente una segunda selección en medio K-malato adicionado con 30% de

sacarosa. En la figura 23 se esquematiza el doble entrecruzamiento que permite la delección deseada.

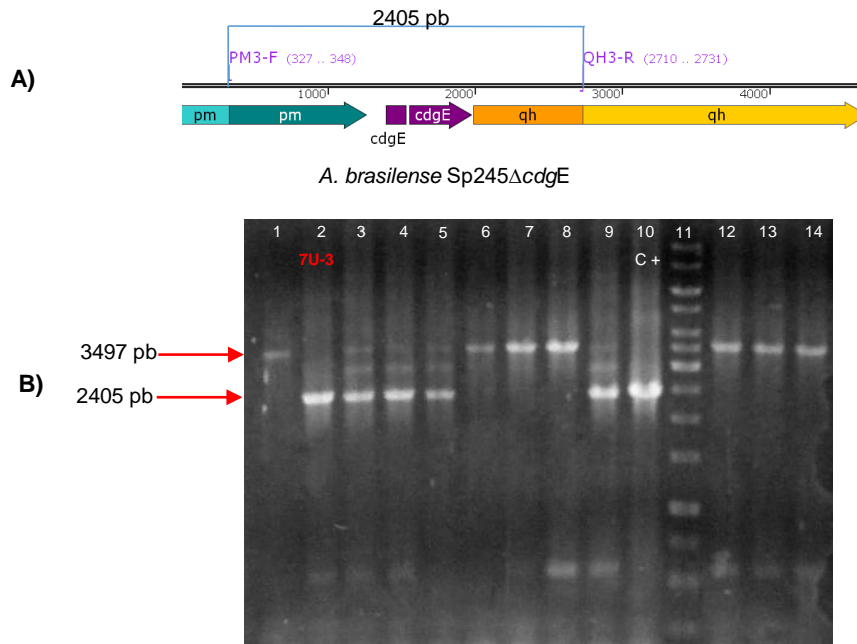


**Fig. 23.** Representación del doble entrecruzamiento generado por recombinación homologa entre el plásmido pK18mobsacB/PM- $\Delta$ cdgE-QH y las regiones flanqueantes al gen *cdgE* a deletar en *A. brasilense* Sp245.

## 8.8 Comprobación de la mutante *A. brasilense* Sp245 $\Delta$ cdgE

### 8.8.1 PCR para el amplificado de la región afectada del gen *cdgE*

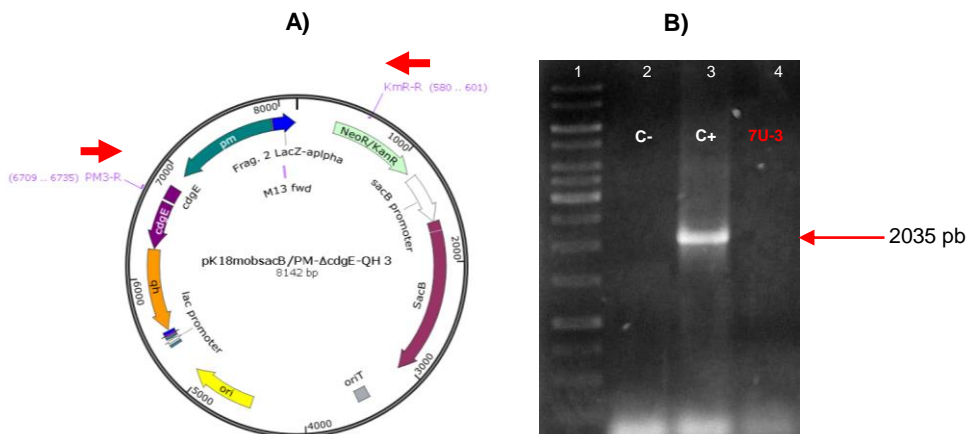
Las transconjugantes sensibles a Km se analizaron por PCR para explorar la posibilidad de haber generado la mutación, esperando un tamaño de 2405 pb en el caso de la cepa mutante *A. brasilense* Sp245 $\Delta$ cdgE y 3497 pb en el caso de la cepa *A. brasilense* Sp245 (Fig. 24). La mayoría de clonas mostraron el amplificado silvestre (Fig. 24 carriles 1, 6-8 y 12-14), algunas otras con ambos, mutante y silvestre, evidenciando aun la presencia del plásmido pK18mobsacB/PM-*cdgE*-QH (Fig. 24 carriles 3-5 y 9), y sólo una clona presentó el patrón correspondiente, siendo nombrada *A. brasilense* Sp245 $\Delta$ cdgE 7U-3 (Carril 2 Fig 24).



**Fig. 24. A)** Representación de la región afectada de la mutante *A. brasilense* Sp245 $\Delta$ cdgE, mostrando los iniciadores utilizados para su comprobación. **B)** Electroforetograma del producto de PCR de las posibles mutantes; clonas con amplificado silvestre (Carriles 1, 6-8 y 12-14), clonas con amplificado mutante (Carril 2), clonas con amplificado silvestre y mutante (Carriles 3-5 y 9). Se utilizó como control positivo DNA de pK18mobsacB/PM- $\Delta$ cdgE-QH (Carril 10), MPM 1 kb carril 11.

### 8.8.2 PCR de confirmación de la ausencia del plásmido pK18mobsacB/PM- $\Delta$ cdgE-QH

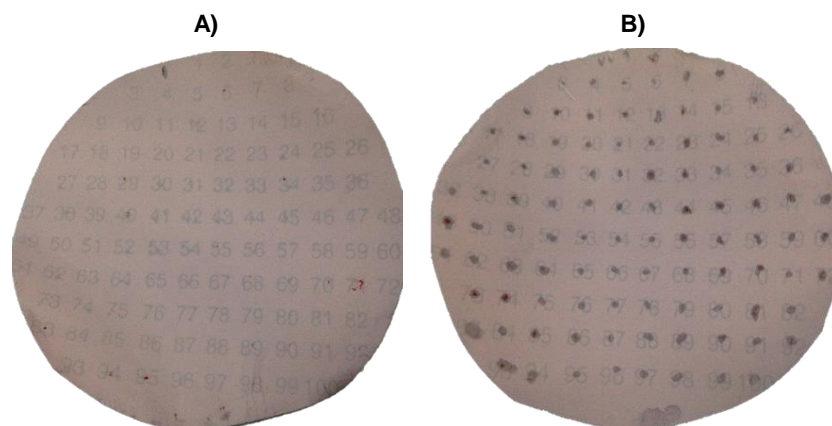
Para comprobar la ausencia del plásmido en la mutante, se realizó PCR para el amplificado de una región específica del plásmido (Fig. 25), lo que indica que se realizó el intercambio alélico y el plásmido fue posteriormente eliminado.



**Fig. 25. A)** Representación de los iniciadores utilizados (flechas rojas) para la comprobación de la ausencia del vector pK18mobsacB/PM- $\Delta$ cdgE-QH. **B)** Electroforetograma del PCR en la cepa mutante *A. brasilense* Sp245 $\Delta$ cdgE 7U-3 (carril 4). Como control negativo se utilizó la cepa silvestre de *A. brasilense* Sp245 (carril 2) y como control positivo, la cepa de *E. coli* S17-1 pK18mobsacB/PM- $\Delta$ cdgE-QH (carril 3), MPM 1 kb carril 1.

### 8.8.3 Hibridación en colonia de confirmación de la ausencia del plásmido pK18mobsacB/PM- $\Delta$ cdgE-QH

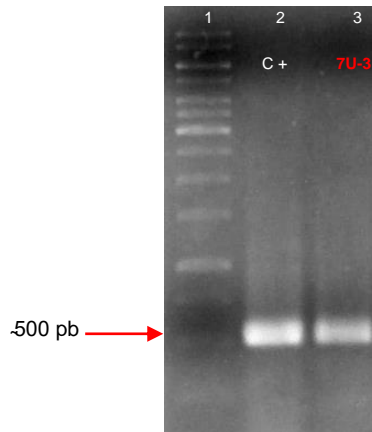
Con el fin de corroborar el resultado anterior (apartado 8.8.2), se realizó hibridación en colonia utilizando como sonda un fragmento de 388 pb del vector, cuya sonda se obtuvo por restricción enzimática con *KpnI*. El resultado indicó la ausencia de hibridación en 100 colonias provenientes de la mutante *A. brasilense* Sp245 $\Delta$ cdgE 7U-3 (Fig. 26-A), por tanto la pérdida del vector, mientras que en el testigo, colonias provenientes de *E. coli* S17.1 pK18mobsacB/PM- $\Delta$ cdgE-QH registraron hibridación como era de esperar (Fig. 26-B).



**Fig. 26.** Resultado del proceso de hibridación en colonia aplicando la tecnología anti-Digoxigenina (Roche®DIG DNA Labeling and Detection). **(A)** Mutante *A. brasilense* Sp245 $\Delta$ cdgE 7U-3. **(B)** *E. coli* S17.1 pK18mobsacB/PM- $\Delta$ cdgE-QH.

### 8.8.4 PCR para el amplificado de la región intergenica conservada DNAr23S-DNAr16S de *Azospirillum*

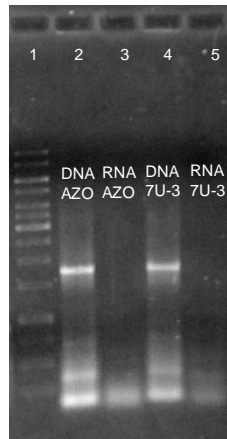
Se realizó PCR de esta región de *Azospirillum*, verificando la pertenencia al género en la mutante *A. brasilense* Sp245  $\Delta$ cdgE (Fig. 27).



**Fig. 27.** Electroforetograma del producto del PCR de *A. brasilense* Sp245 $\Delta$ cdgE 7U-3, utilizando los iniciadores AZO-F/AZO-R (carril 3) para la comprobación de pertenencia al genero *Azospirillum*. Como control positivo fue utilizada la cepa silvestre *A. brasilense* Sp245 (carril 2), MPM 1 kb carril 1.

### 8.8.5 RT-PCR de confirmación de la mutante *A. brasilense* Sp245 $\Delta$ cdgE 7U-3

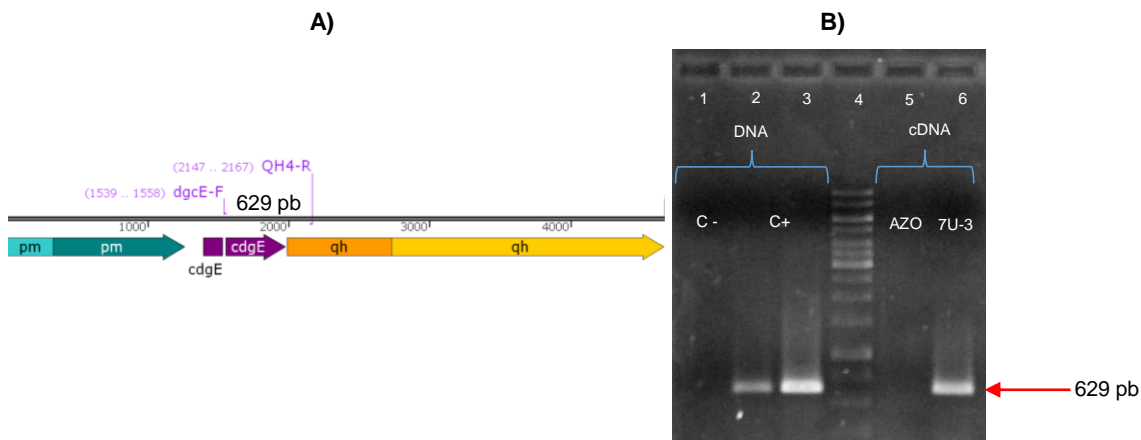
El RNAm se trató con DNAsa para asegurar la eliminación de DNA, siendo esto confirmado mediante la ausencia de amplificado por PCR, utilizando iniciadores DNAr16S (Fig. 28).



**Fig. 28.** Electroforetograma de PCR con RNA de las cepas de *A. brasilense* Sp245 y *A. brasilense* Sp245 $\Delta$ cdgE 7U-3 (carril 3 y 5), realizada con los iniciadores DNAr16S. Control positivo DNA de las mismas cepas (carril 2 y 4), MPM 1 kb carril 1.

Finalmente se realizó RT-PCR *A. brasilense* Sp245 $\Delta$ cdgE 7U-3 , obteniendo un amplificado de 629 pb en la mutante (Fig. 29). Debido a que el iniciador dgcE-F no es complementario en la región silvestre, dado que se diseño para serlo solo en la pequeña región de 24 pb insertada tras la deleción (Fig. 23), la RT-PCR *A. brasilense* Sp245 arrojó un resultado negativo (Fig. 29).

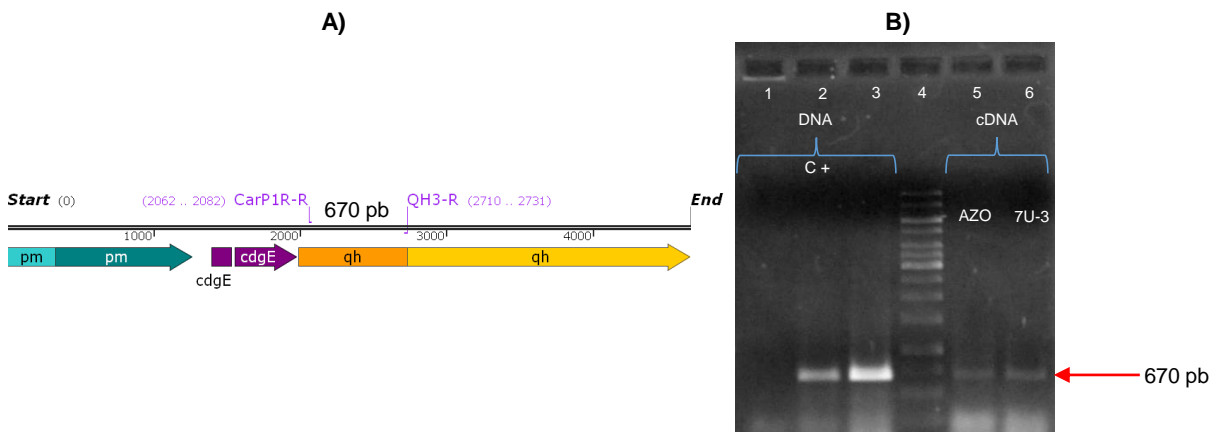




**Fig. 29. A)** Representación de los iniciadores utilizados para la RT-PCR de confirmación de la mutante *A. brasilense* Sp245Δ*cdgE* 7U-3 por RT-PCR. **B)** Electroforetograma de la RT-PCR correspondiente a la cepa silvestre *A. brasilense* Sp245 (carril 5) y la mutante *A. brasilense* Sp245Δ*cdgE* 7U-3 (carril 6). Como control negativo se utilizó DNA y cDNA de *A. brasilense* Sp245 (carril 1 y 5) y como positivo DNA de *A. brasilense* Sp245Δ*cdgE* 7U-3 y de pK18mobsacB/PM-Δ*cdgE*-QH (carril 2 y 3 respectivamente), MPM 1 kb carril 4.

### 8.8.6 RT-PCR para la confirmación de ausencia de mutación polar en la mutante *A. brasilense* Sp245Δ*cdgE* 7U-3

Para demostrar que la mutante *A. brasilense* Sp245Δ*cdgE* 7U-3 no generó mutación polar, se realizó RT-PCR, confirmando la transcripción del gen río abajo, que codifica para una cinasa histidinica (QH), obteniendo el producto correspondiente de 670 pb, tal como el resultado de RT-PCR de *A. brasilense* Sp245 (Fig. 30).



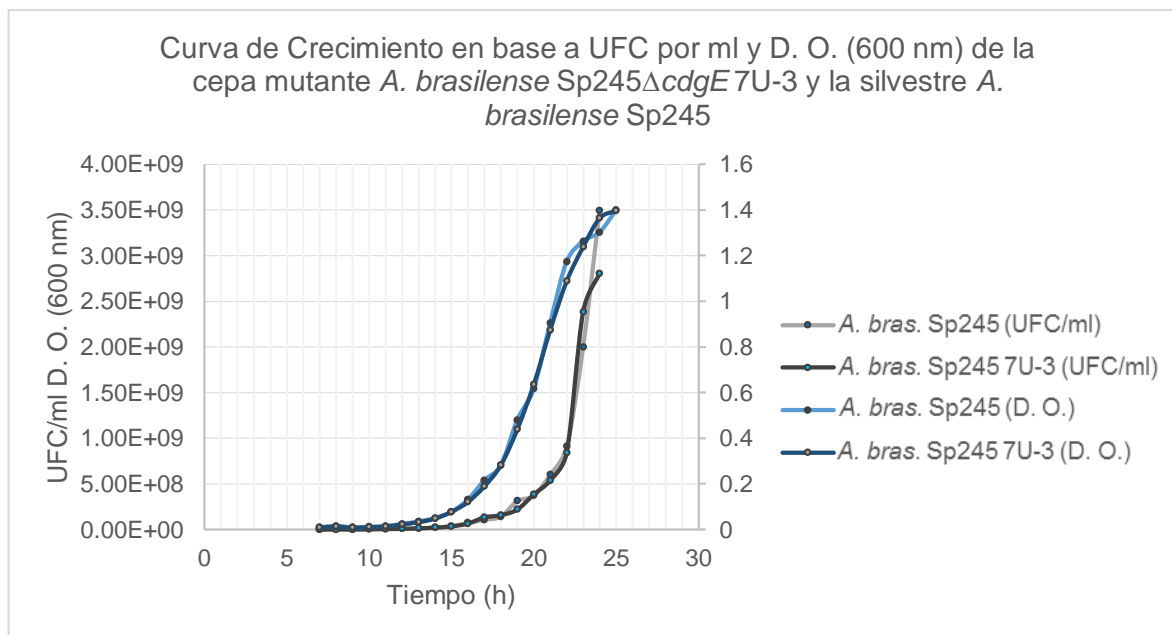
**Fig. 30. A)** Representación de los iniciadores utilizados para la RT-PCR de comprobación de ausencia de mutación polar en la mutante *A. brasilense* Sp245Δ*cdgE* 7U-3. **B)** Electroforetograma de RT-PCR de *A. brasilense* Sp245 (Carril 5) y *A. brasilense* Sp245Δ*cdgE* 7U-3 (carril 6). Control positivo DNA de *A. brasilense* Sp245, *A. brasilense* Sp245Δ*cdgE* 7U-3 y pK18mobsacB/PM-Δ*cdgE*-QH (Carriles 1-3 respectivamente), MPM 1 kb carril 4.

## 8.9 Análisis de Fenotipo

Los resultados asociados a la mutación del gen *cdgE::gusA-Km<sup>R</sup>* obtenidos por Gamboa-Pérez en 2013 sugerían la inconsistencia de los fenotipos estudiados, como consecuencia del posible operón y la polaridad generada por el tipo de mutación construida, por lo cual se procedió a repetir los fenotipos crecimiento y estrés salino, con el fenotipo adicional de formación de biopelícula:

### 8.9.1 Crecimiento

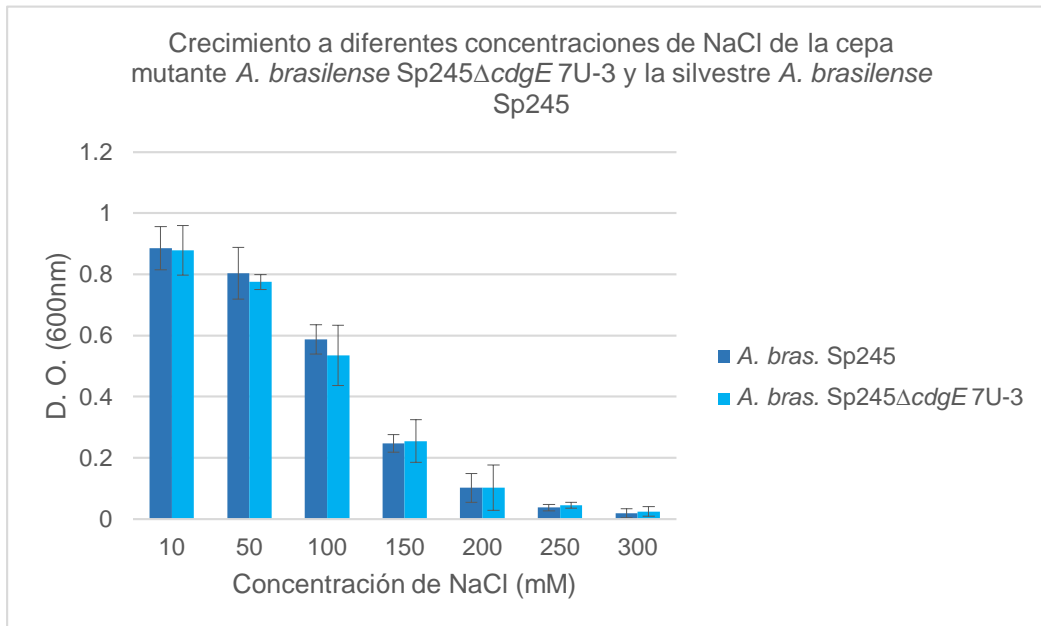
Los resultados mostrados de la determinación de la curva de crecimiento por D. O. 600 nm, así como UFC durante 24 h, indican que la mutante *A. brasilense* Sp245 $\Delta$ *cdgE* 7U-3 no presentó cambios en su crecimiento con respecto *A. brasilense* Sp245 (Fig. 31).



**Fig. 31.** Determinación de la curva de crecimiento de las cepas *A. brasilense* Sp245 $\Delta$ *cdgE* 7U-3 y *A. brasilense* Sp245 mediante D. O. 600 nm y UFC-ml durante 24 h, los datos representan la media del resultado de tres experimentos independientes.

### 8.9.2 Estrés salino

La mutante *A. brasilense* Sp245 $\Delta$ *cdgE* 7U-3 no registró cambios en crecimiento tras 20 h de incubación, con respecto la cepa silvestre *A. brasilense* Sp245, al ser sometidas a estrés osmótico a diferentes concentraciones de NaCl (Fig. 32).

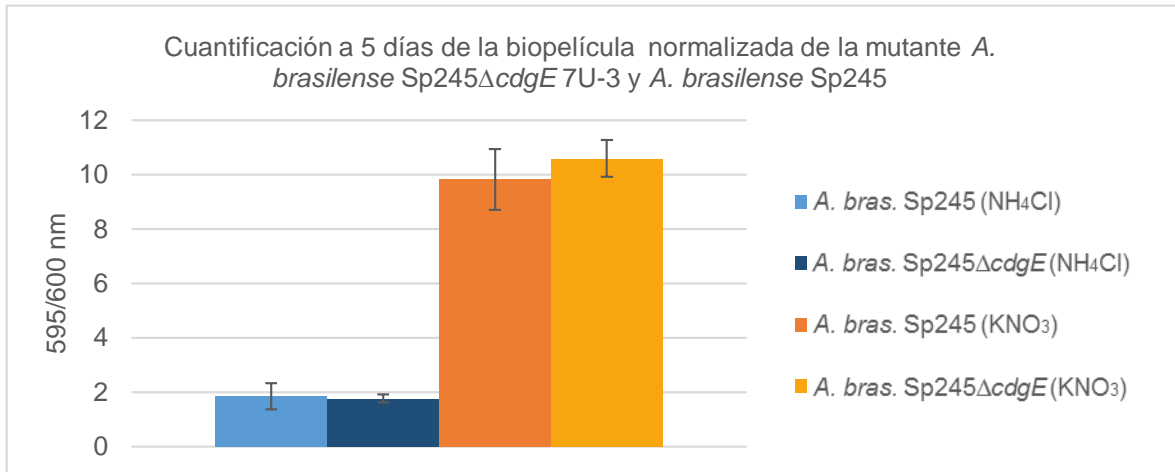


**Fig. 32.** Crecimiento de 20 h a D. O. 600 nm bajo diferentes concentraciones de NaCl, de las cepas *A. brasilense* Sp245ΔcdgE 7U-3 y *A. brasilense* Sp245. Los datos representan la media del resultado de seis experimentos independientes.

### 8.9.3 Formación de biopelícula

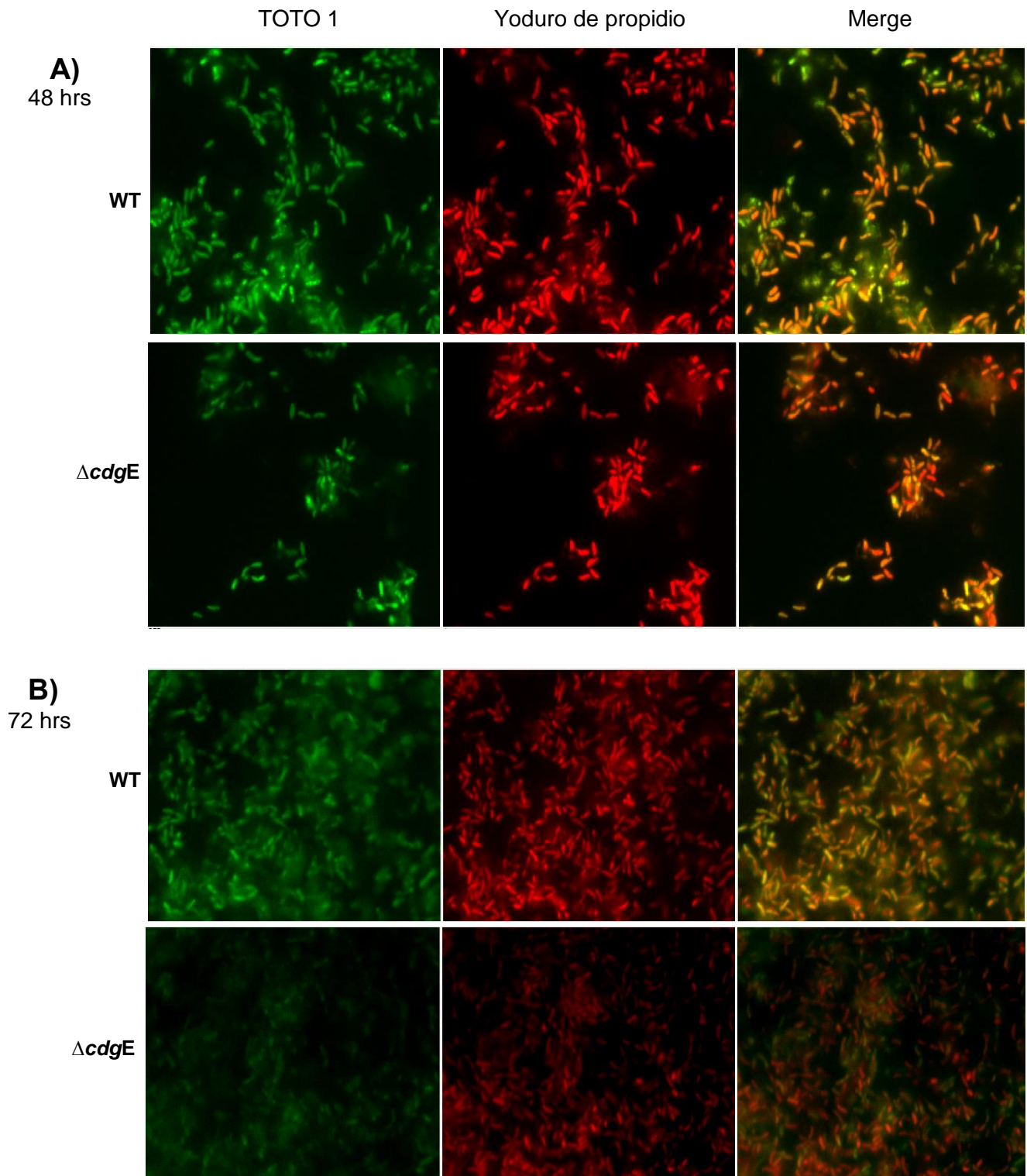
Como experimento adicional, de acuerdo a los fenotipos relacionados con el di-GMPc, se determinó la formación de biopelícula en la cepa mutante *A. brasilense* Sp245ΔcdgE 7U-3, de forma cuantitativa (Fig. 33) y por microscopia de fluorescencia (Fig. 34), no observando alteración con respecto de la silvestre *A. brasilense* Sp245.

### 8.9.3.1 Determinación cuantitativa:



**Fig. 33.** Gráfico de la cuantificación de biopelícula formada en 5 días, de la cepa silvestre *A. brasilense* Sp245 y la mutante *A. brasilense* Sp245ΔcdgE 7U-3, mediante la técnica de cristal violeta, normalizada por densidad celular, utilizando como fuente de nitrógeno NH<sub>4</sub>Cl y KNO<sub>3</sub> en medio NFB. Los datos representan la media del resultado de tres experimentos independientes.

8.9.3.2 Determinación por microscopía de fluorescencia:



**Fig. 34.** Micrografías de fluorescencia de la biopelecua formada a 48 h y 72 h, de la cepa silvestre *A. brasilense* Sp245 y la mutante *A. brasilense* Sp245 $\Delta cdgE$  7U-3, utilizando los colorantes de contraste TOTO 1 (verde) y yoduro de propidio (rojo).

## 9 Discusión

En el 2013 Gamboa Pérez generó la mutante *A. brasilense* Sp245 5 A *cdgE::uidA-Km<sup>R</sup>*, los datos obtenidos en dicho trabajo como se describió en la sección de antecedente directos (Fig. 6 y 7), mostraron una importante afectación en crecimiento y estrés osmótico. No obstante, de acuerdo al contexto genético del gen *cdgE* (Fig. 8), se sugiere la presencia de un operón, constituido por genes que codifican para la proteína con homología a DGC (anotada como CdgE), una probable proteína del tipo cinasa histidinica, y un probable regulador de respuesta CheY-like, por lo que se consideró prudente generar una mutación por delección en fase que no afectase la transcripción de los genes que se localizan río abajo del gen *cdgE*, tipo de mutación que según reportes hasta el momento no había sido posible obtener en *Azospirillum*. La estrategia considerada en este trabajo fue emplear dos tipos de selecciones, una positiva que nos permitiera seguir el evento inicial de un entrecruzamiento por medio de la resistencia a Km, y su posterior eliminación por entrecruzamiento sin la opción de presión selectiva. Sin embargo, ya que esta primera estrategia no resultó exitosa se procedió a utilizar un plásmido que permitiera seguir el doble entrecruzamiento empleando una selección negativa con una alta concentración de sacarosa; mutación que fue posible obtener mediante el uso del plásmido pK18mobsacB/PM- $\Delta$ *cdgE*-QH (Fig. 23).

El plásmido pK18mobsacB, tiene la característica de codificar para una enzima llamada levansacarasa (SacB), con actividad enzimática de fructosil-transferasa, enzima que a partir de sacarosa sintetiza polímeros de fructosa de alto peso molecular (levanas), lo cual resulta letal para la célula. Aunque las bases moleculares de la toxicidad no son claras, ésta puede ser debido a (i) una acumulación de levanas lo cual puede saturar el periplasma, (ii) o debido a la transferencia de residuos de fructosa a moléculas aceptoras inapropiadas (Pelicic *et al.* 1995; Reytrat *et al.* 1998; Hettwer. 1995). Con ello se logra mediante la presión generada, seleccionar ya sea el doble entrecruzamiento y el reemplazo alélico, en caso contrario la simple eliminación del plásmido sin generar el doble entrecruzamiento deseado.

En la mayoría de bacterias Gram (-), *E. coli*, *Erwinia chrysanthemi*, *Legionella pneumophila*, *Anabaena* sp, *Yersinia* sp, *Rhizobium* sp, *Xanthomonas* sp, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Helicobacter pylori*, y *Agrobacterium tumefaciens*, además de las Gram (+) *Corynebacterium glutamicum* y *Mycobacterium* sp, la expresión del gen *sacB* es letal, siendo localizada la actividad de SacB principalmente en el periplasma en el caso de *E. coli* (Pelicic *et al.* 1995; Reytrat *et al.* 1998).

En este estudio la frecuencia de recombinación resultó muy baja, a pesar de la alta concentración de sacarosa adicionada al medio (30%). Por el momento no está clara la causa de la baja frecuencia en la conjugación, así como de recombinación, al utilizar el plásmido pK18mobsacB/PM- $\Delta$ cdgE-QH en *A. brasilense* Sp245, el cual es un vector suicida con el origen de replicación *oriE*, mismo que tiene el vector pSUP202, que también es un plásmido suicida, empleado ampliamente para la obtención de mutantes de inserción en *A. brasilense* (Carreño-López *et al.* 2009; Castro-Guerrero *et al.* 2012).

Este tipo de mutantes es de gran ayuda para el estudio de varios genes, por lo que es necesario seguir buscando los parámetros fisiológicos adecuados para aumentar la frecuencia de recombinación para la obtención de este tipo de mutantes.

Fue indispensable confirmar la mutante *A. brasilense* Sp245 $\Delta$ cdgE a través de varios ensayos que permitieron de manera concluyente su comprobación. Posteriormente se evaluó el crecimiento, estrés salino y formación de biopelícula, comparando los datos obtenidos con *A. brasilense* Sp245, siendo los datos obtenidos en este trabajo confrontados con los reportados anteriormente por Gamboa-Pérez en 2014. Como se puede constatar de las figuras 6, 7, 31 y 32, los datos obtenidos en ambos trabajos son indiscutiblemente diferentes, puesto que en este estudio no se observó afectación de los fenotipos estudiados. Sin embargo, es importante tomar en consideración que la DGC E, no es la única enzima con dominio GGDEF en *A. brasilense* Sp245, puesto que según análisis *in silico* (The Microbial Signal Transduction database MiST 2.2) existen 32 genes que codifican para posibles proteínas con dominios GGDEF, 22 de las cuales son posibles DGCs y 10 probables proteínas híbridas ya que también contiene un dominio EAL. Lo cual sugiere un alto contenido de genes que codifican para proteínas relacionadas a la posible producción de di-GMPc en *A. brasilense* Sp245.

Es pertinente anotar que según un amplio análisis informático de genomas procariotas, se predice que alrededor del 13% de las proteínas conteniendo dominios GGDEF y EAL no metabolizan di-GMPc. Además, dado que la mayoría de genomas bacterianos poseen varias copias de genes codificantes de estas proteínas conteniendo adicionalmente dominios de señalización, es oportuno inferir ¿cómo es que se dividen las actividades en paralelo en el sistema de señalización del di-GMPc para evitar la transferencia de señales no deseadas? (Seshasayee *et al.* 2010). Lo que se sugiere es que existe un orden jerárquico en la utilización de proteínas GGDEF para la transducción de la señal (Méndez y Membrillo. 2005).

Cabe también destacar de acuerdo a la ausencia de fenotipos alterados en *A. brasilense* Sp245 $\Delta$ *cdgE*, un estudio de *Rhizobium etli* realizado por Shanjun Gao *et al* en 2013, en donde 2 proteínas híbridas GGDEF-EAL, la DGC A y DGC B, fueron evaluadas en cuanto a su función, observando que la mutación individual o doble de los genes *cdgA* y *cdgB* no afecta la colonización en raíz, la capacidad de fijar nitrógeno, formación de biopelícula, movilidad y producción de exopolisacáridos, incluso aunque el gen *cdgB* es expresado significativamente en raíz y en vida libre, y que la expresión heteróloga en *E. coli* del dominio GGDEF de DGC A y DGC B incrementa los niveles de di-GMPc, demostrando su actividad de modulación. Por lo que no es de sorprender que en *Azospirillum*, que también es una PGPR perteneciente a la clase alfa-proteobacteria, como el género *Rhizobium*, se observen resultados similares, o incluso como se propone en este mismo estudio, pudiendo ser que la proteína sea activada por estímulos muy específicos, no explorados bajo condiciones de laboratorio, o bien que otras funciones en las que interviene el di-GMPc no se hayan explorado aún (i. e. quimiotaxis, movilidad, producción de EPS, colonización, morfología celular, floculación, etc.). Además, se ha observado que bacterias con estilos de vida diverso, dependiendo de su entorno, presentan un número mayor de genes relacionados al di-GMPc (Romling *et al.* 2013); tal como es la rizosfera, en donde se presenta importante variación ambiental, así el amplio número de genes responden a diversos estímulos de manera diferente, temporal y espacial (Shanjun Gao *et al.* 2013). Por tanto se requiere de la generación de múltiples mutantes para contar con un mejor conocimiento del papel del di-GMPc en *A. brasilense*.

Al respecto otros casos, como el de *Sinorhizobium meliloti*, que presenta una proteína híbrida GGDEF-EAL no esencial para el proceso de simbiosis (Gibson *et al.* 2007), en cuyo estudio se identificó previamente una cinasa histidinica (CbrA), que es absolutamente requerida para establecer una exitosa simbiosis. Mediante microarreglos compararon el transcriptoma de la mutante *cbrA::Tn5* y la cepa silvestre, encontrando 162 genes diferentemente expresados en la mutante *cbrA::Tn5*, algunos de los cuales estarían involucrados en crecimiento, transporte y síntesis de polisacáridos, síntesis de proteínas extracelulares, “quorum sensing” y movilidad, además de exhibir una disminución en la expresión de un operón que codifica una cinasa histidinica de doble componente SMc00888 y una proteína con dominios GGDEF-EAL SMc00887. Sin embargo, al utilizar una cepa carente de este par de genes, no se observó afectación en la simbiosis.

En *Myxococcus xanthus*, se estudió el gen *mocA*, que codifica para una cinasa histidinica, esta mutación condujo a la drástica afectación del crecimiento en presencia de NaCl



(Kimura *et al.* 2001). Resultados similares son observados con la mutante *A. brasilense* Sp245  $\Delta$  *cdgE::uidA-Km<sup>R</sup>*, cuyo efecto polar afecto genes río abajo, con disminución tanto del crecimiento, así como la resistencia al estrés salino. Por lo que se sugiere que el efecto observado en esta mutante sea debido a la alteración de la cinasa histidínica y no a la CdgE, lo que enfatiza la necesidad de obtener la mutante mediante eliminación del gen *cdgE* en fase.

## 10 Conclusión

- ❖ Se logró obtener la mutante en fase *A. brasilense* Sp245 $\Delta$ *cdgE*.
  
- ❖ Bajo las condiciones estudiadas en el laboratorio, la diguanilato ciclasa E de *A. brasilense* Sp245 no está involucrada en la adaptación al estrés salino con NaCl, formación de biopelícula, ni en crecimiento.
  
- ❖ El análisis bioinformático indica la posible reiteración de proteínas con dominio GGDEF en *A. brasilense* Sp245, y la forma en que estas son expresadas podría depender de un mismo promotor que regule genes río abajo, por tanto es importante contar con una herramienta de mutación por delección para una obtención más eficiente de dobles, triples o más mutantes, que permitan entender a mayor detalle el papel del di-GMPc en *A. brasilense* Sp245.

## 11 Perspectivas

1. El di-GMPc está involucrado en diversas funciones, por tanto se requiere evaluar la participación de la DGC E en otros fenotipos, como es la quimiotaxis, movilidad, producción de EPS, colonización, morfología celular, floculación, etc.
  
2. Es importante no descartar que otras diguanilato ciclasas de *A. brasilense* Sp245 podrían estar involucradas en los fenotipos evaluados. Por tanto sería interesante evaluar la función de otros genes de diguanilato ciclasa que ya se hayan mutado, y ver si en realidad la producción de EPS involucra la protección al estrés salino, o solo sean utilizados para la transición del estado móvil al sésil, mediante la formación de biopelícula, o ambas.

3. Dada la dificultad de generar una mutación por delección, aunado con la importancia de generar múltiples mutantes que permitan un mejor conocimiento del papel del di-GMPc en *A. brasilense*, en primer lugar es crucial establecer una técnica efectiva que permita la obtención de las mutantes deseadas, ya sea con la modificación del plásmido utilizado, y/o mediante la búsqueda de otro mecanismo de toxicidad, a través de los diferentes tipos de marcadores de contraselección, tal como *rpsL(strA)*, *tetAR*, *pheS*, *thyA*, *lacY*, *gata-1* y *ccdB* (Marc et al. 1998), etc.

## 12 Bibliografía

1. **Abdel-Fattah A F, Mahmoud D A, Esawy M A.** (2005). Production of levansucrase from *Bacillus subtilis* NRC 33a and enzymic synthesis of levan and fructo-Oligosaccharides. *Curr Microbiol* 51: pp. 402-407.
2. **Arruebarrena Di Palma A, Pereyra C M, Moreno Ramirez L, Xiqui Vázquez M L, Baca B E, Pereyra M A, Lamattina L, Creus C M.** (2013). Denitrification-derived nitric oxide modulates biofilm formation in *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiol* 338: pp. 77-85. doi: 10.1111/1574-6968.12030.
3. **Barba-Ostria C A.** (2014). Los sistemas de dos componentes: circuitos moleculares versátiles. *TIP Rev.Esp.Cienc.Quím.Biol* 17-1: pp. 62-76.
4. **Carreño R, Sánchez A, Camargo N, Elmerich C, Baca B E.** (2009). Characterization of *chsA*, a new gene controlling the chemotactic response in *Azospirillum brasilense* Sp7. *Arch Microbiol* 191-6: pp. 501-507. doi: 10.1007/s00203-009-0475-x.
5. **Castro J, Romero A, Aguilar J, Xiqui M L, Sandoval J O, Baca B E.** (2012). The *hisC1* gene, encoding aromatic amino acid aminotransferase-1 in *Azospirillum brasilense* Sp7, expressed in wheat. *Plant Soil* 356-1: pp 139-150. DOI 10.1007/S11104-011-1009-2.
6. **Chan C, Paul R, Samoray D, Amiot N C, Giese B, Jenal U, Schirmer T.** (2004). Structural basis of activity and allosteric control of diguanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101-49: pp. 17084-17089. doi: 10.1073/pnas.0406134101.
7. **Chen Y, Yuan M, Mohanty A, Hoong-Yam J K, Liu Y, Chua S L, Nielsen T E, Tolker-Nielsen T, Givskov M, Cao B, Yang L.** (2015). Multiple-diguanylate cyclase-coordinated regulation of pyoverdine synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol Rep* 7-3: pp. 498-507. doi: 10.1111/1758-2229.12278.
8. **Cui Y, Tu R, Wu L, Hong Y, Chen S.** (2010). A hybrid two-component system protein from *Azospirillum brasilense* Sp7 was involved in chemotaxis. *Microbiol Res* 166-6: pp. 458-467. doi: 10.1016/j.micres.2010.08.006.

9. **Danhorn T, Fuqua C.** (2007). Biofilm formation by plant-associated bacteria. *Annu Rev Microbiol* 61: pp. 401- 422. DOI: 10.1146/annurev.micro.61.080706.093316.
10. **de-Bashan, L E, Holguin G, Glick B R, Bashan Y.** (2007). Bacterias promotoras de crecimiento en plantas para propositos agricolas y ambientales. In: *Microbiologia agrícola: hongos, bacterias, micro y macrofauna, control biologico, planta-microorganismo.* (Eds.) Ferrera-Cerrato R, Alarcon A. Chapter 8. Editorial Trillas, Mexico City, Mexico. pp. 170-224.
11. **Duerig A, Abel S, Folcher M, Nicollier M, Schwede T, Amiot N, Giese B, Jenal U.** (2009). Second messenger-mediated spatiotemporal control of protein degradation regulates bacterial cell cycle progression. *Genes Dev* 23: pp. 93-104. doi: 10.1101/gad.502409.
12. **Fazli M, Almblad H, Rybtke M L, Givskov M, Eberl L, Tolker-Nielsen T.** (2014). Regulation of biofilm formation in *Pseudomonas* and *Burkholderia* species. *Environ Microbiol* 16-7: pp. 1961-1981. doi: 10.1111/1462-2920.12448.
13. **Feirer N, Xu J, Allen K D, Koestler B J, Bruger E L, Waters C M, White R H, Fuqua C.** (2015). A pterin-dependent signaling pathway regulates a dual-function diguanylate cyclase-phosphodiesterase controlling surface attachment in *Agrobacterium tumefaciens*. *mBio* 6-4: e00156. doi: 10.1128/mBio.00156-15.
14. **Galperin M Y.** (2004). Bacterial signal transduction network in a genomic perspective. *Environ Microbiol* 6-6: pp. 552–567. doi: 10.1111/j.1462-2920.2004.00633.x.
15. **Gao S, Romdhane S B, Beullens S, Kaefer V, Lambrichts I, Fauvart M, Michiels J.** (2014). Genomic analysis of cyclic-di-GMP-related genes in rhizobial type strains and functional analysis in *Rhizobium etli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 98-10: pp. 4589-4602. doi: 10.1007/s00253-014-5722-7.
16. **Gibson K E, Barnett M J, Toman C J, Long S R, Walker G C.** (2007). The symbiosis regulator CbrA modulates a complex regulatory network affecting the flagellar apparatus and cell envelope proteins. *J Bacteriol* 189-9: pp. 3591-3602. doi: 10.1128/JB.01834-06.
17. **Gjermansen M, Ragas P, Tolker-Nielsen T.** (2006). Proteins with GGDEF and EAL domains regulate *Pseudomonas putida* biofilm formation and dispersal. *FEMS Microbiol Lett* 265-2: pp. 215-224. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00493.x>.
18. **Hengge R.** (2009). Principles of c-di-GMP signaling in bacteria. *Nat Rev Microbiol* 7-4: pp. 263-273. doi: 10.1038/nrmicro2109.

19. **Hettwer U, Gross M, Rudolph K.** (1995). Purification and characterization of an extracellular levansucrase from *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola. *J Bacteriol* 177-10: pp. 2834-2839.
20. **Hickman J W, Tifrea D F, Harwood C S.** (2005). A chemosensory system that regulates biofilm formation through modulation of cyclic diguanylate levels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102-40: pp. 14422-14427. doi: 10.1073/pnas.0507170102.
21. **Hoch J A, Varughese K I.** (2001). Keeping signals straight in phosphorelay signal transduction. *J Bacteriol* 183-17: pp. 4941-4949. doi: 10.1128/JB.183.17.4941-4949.2001.
22. **Ikram-Ansari M, Schiwon K, Malik A, Grohmann E.** (2012). Biofilm formation by environmental bacteria. *Strategies for Sustainability* 11: pp. 341-377. DOI 10.1007/978-94-007-1591-2\_11.
23. **Jofré E, Fischer S, Príncipe A, Castro M, Ferrari W, Lagares A, Mori G.** (2009). Mutation in a D-alanine-D-alanine ligase of *Azospirillum brasilense* Cd results in an overproduction of exopolysaccharides and a decreased tolerance to saline stress. *FEMS Microbiol Lett* 290: pp. 236-246. doi: 10.1111/j.1574-6968.2008.01421.x.
24. **Karatan E, Watnick P.** (2009). Signals, regulatory networks, and, materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiol Mol Biol Rev* 73-2: pp. 310–347. doi: 10.1128/MMBR.00041-08.
25. **Kato M, Mizuno T, Shimizu T, Hakoshima T.** (1997). Insights into multistep phosphorelay from the crystal structure of the C-terminal HPt domain of ArcB. *Cell* 88-5: pp. 717-723. doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81914-5.
26. **Kimura Y, Nakano H, Terasaka H, Takegawa K.** (2001). *Myxococcus xanthus* *mokA* encodes a histidine kinase-response regulator hybrid sensor required for development and osmotic tolerance. *J Bacteriol* 183-4: pp. 1140-1146. doi: 10.1128/JB.183.4.1140-1146.2001.
27. **Kohler C, Lourenço R F, Bernhardt J, Albrecht D, Schüler J, Hecker M, Gomes S L.** (2015). A comprehensive genomic, transcriptomic and proteomic analysis of a hyperosmotic stress sensitive  $\alpha$ -proteobacterium. *BMC Microbiology* 15-71: pp. 1-15. doi:10.1186/s12866-015-0404-x.
28. **Korbie D J, Mattick J S.** (2008). Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nat Protoc* 3-9: pp.1452-1456. doi: 10.1038/nprot.2008.133.
29. **Kulasakara H, Lee V, Brencic A, Liberati N, Urbach J, Miyata S, Lee D G, Neely A N, Hyodo M, Hayakawa Y, Ausubel F M, Lory S.** (2006). Analysis of *Pseudomonas*

*aeruginosa* diguanylate cyclases and phosphodiesterases reveals a role for bis-(3'-5')-cyclic-GMP in virulence. Proc Natl Acad Sci U S A 103-8: pp. 2839-2844. doi: 10.1073/pnas.0511090103.

**30. Lerner A, Castro-Sowinski S, Valverde A, Lerner H, Dror R, Okon Y, Burdman S.** (2009). The *Azospirillum brasilense* Sp7 *noeJ* and *noeL* genes are involved in extracellular polysaccharide biosynthesis. Microbiology 155: pp. 4058-4068. doi: 10.1099/mic.0.031807-0.

**31. Malone J G, Jaeger T, Manfredi P, Dötsch A, Blanka A, Bos R, Cornelis G R, Häussler S, Jenal U.** (2012). The YfiBNR signal transduction mechanism reveals novel targets for the evolution of persistent *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis airways. PLoS Pathog 8-6: e1002760. doi: 10.1371/journal.ppat.1002760.

**32. Martínez M, Miguel Q, Ramos M I, Soriano M I, De Cristóbal R, Espinosa M.** (2013). Interplay between extracellular matrix components of *Pseudomonas putida* biofilms. Res Microbiol 164-5: pp. 382-389. doi: 10.1016/j.resmic.2013.03.021.

**33. Massena V, Dos Santos K R, Pedraza R O.** (2011). What is expected from the genus *Azospirillum* as a plant growth-promoting Bacteria? Bacteria in agrobiology: plant growth responses. pp. 123, 127. DOI: 10.1007/978-3-642-20332-9\_6.

**34. Méndez-Ortiz M M, Membrillo-Hernández J.** (2005). Proteínas con dominios GGDEF y EAL: su función en el metabolismo bacteriano. Rev Latinoam Microbiol 47 (3-4): pp. 130-139.

**35. Merritt J H, Brothers K M, Kuchma S L, O' Toole G A.** (2007). SadC reciprocally influences biofilm formation and swarming motility via modulation of exopolysaccharide production and flagellar function. J Bacteriol 189-22: pp. 8154-8164. doi: 10.1128/JB.00585-07.

**36. Moscoso J A, Jaeger T, Valentini M, Hui K, Jenal U, Filloux A.** (2014). The diguanylate cyclase SadC is a central player in Gac/Rsm-mediated biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol 196-23: pp. 4081-4088. doi: 10.1128/JB.01850-14.

**37. Núñez-Oreza L A, Georgellis D, Álvarez A F.** (2014). ArcB: El sensor del estado redox en bacterias. TIP Rev. Esp. Cienc. Quím. Biol 17-2: pp. 135-146.

**38. Okshevsky M, Meyer R L.** (2014). Evaluation of fluorescent stains for visualizing extracellular DNA in biofilms. J Microbiol Methods 105: pp. 102-104. doi: 10.1016/j.mimet.2014.07.010.

39. **Okshevsky M, Meyer R L.** (2014). Evaluation of fluorescent stains for visualizing extracellular DNA in biofilms. *J Microbiol Methods* 105: pp. 102-104. doi: 10.1016/j.mimet.2014.07.010.
40. **Paul R, Weiser S, Amiot N C, Chan C, Schirmer T, Giese B, Jenal U.** (2004). Cell cycle-dependent dynamic localization of a bacterial response regulator with a novel diguanylate cyclase output domain. *Genes Dev* 18-6: pp.715-727. doi: 10.1101/gad.289504.
41. **Pedraza R, Mentel M, Ragout A, Xiqui M L, Segundo D, Baca B E.** (2011). Plant growth-promoting bacteria: the role of chemotaxis in the association *Azospirillum brasilense*-plant. Nova Science Publishers; pp. 53-83.
42. **Pelicic V, Reyrat J M, Gicquel B.** (1996). Expression of the *Bacillus subtilis sacB* gene confers sucrose sensitivity on Mycobacteria. *J Bacteriol* 178-4: pp. 1197-1199.
43. **Reyrat J M, Pelicic V, Gicquel B, Rappuoli R.** (1998). Counterselectable markers: untapped tools for bacterial genetics and pathogenesis. Fischetti VA, ed. *Infection and Immunity* 66-9: pp. 4011-4017.
44. **Rodríguez D N, Dardanelli M S, Ruíz-Saínz J E.** (2007). Attachment of bacteria to the roots of higher plants. *FEMS Microbiol Lett* 272-2: pp. 127-136. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00761.x>.
45. **Romero A.** (2012). Estudio de la formación de la biopelícula en *Azospirillum brasilense*. Tesis de Maestría. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
46. **Römling U, Galperin M Y, Gomelsky M.** (2013). Cyclic di-GMP: the first 25 years of a universal bacterial second messenger. *Microbiol Mol Biol Rev* 77-1: pp. 1-52. doi: 10.1128/MMBR.00043-12.
47. **Russell E J, Wild A.** (1992). Condiciones del suelo y desarrollo de las plantas según Russell 11° edición. Ed. Mundii prensa. Madrid.
48. **Ryjenkov D A, Tarutina M, Moskvín O V, Gomelsky M.** (2005). Cyclic diguanylate is a ubiquitous signaling molecule in bacteria: insights into biochemistry of the GGDEF protein domain. *J Bacteriol* 187-5: pp. 1792–1798. doi: 10.1128/JB.187.5.1792-1798.
49. **Sambrook J, Russell D W.** *Molecular cloning a laboratory manual*. Third edition. New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001.
50. **Seshasayee A S, Fraser G M, Luscombe N M.** (2010). Comparative genomics of cyclic-di-GMP signaling in bacteria: post-translational regulation and catalytic activity. *Nucleic Acids Res* 38-18: pp. 5970-5981. doi: 10.1093/nar/gkq382.

- 51. Simon R, Priefer U, Pühler A.** (1983). A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram negative bacteria. *Bio/Technology* 1:784-791. doi:10.1038/nbt1183-784.
- 52. Tortora M L, Díaz-Ricci J C, Pedraza R O.** (2011). *Azospirillum brasilense* siderophores with antifungal activity against *Colletotrichum acutatum*. *Arch Microbiol* 193-4: pp. 275-286. doi: 10.1007/s00203-010-0672-7.
- 53. Ulrich L E, Zhulin I B.** (2009). The MiST2 database: a comprehensive genomics resource on microbial signal transduction. *Nucleic Acids Res* 38: pp. 401-407. doi: 10.1093/nar/gkp940.
- 54. Wang Y, Xu J, Chen A, Wang Y, Zhu J, Yu G, Xu L, Luo L.** (2010). GGDEF and EAL proteins play different roles in the control of *Sinorhizobium meliloti* growth, motility, exopolysaccharide production, and competitive nodulation on host alfalfa. *Acta Biochim Biophys Sin* 42-6: pp. 410-417. doi: 10.1093/abbs/gmq034.
- 55. Xiqui M A, Romero A, Terán E, Soto L, Baca B E.** (2010). Nuevo sistema de señalización en bacterias mediado por el (3'5') guanosín-monofosfato-cíclico (di-GMPc). *Elementos* 80: pp. 21-29.

## ANEXOS

### A. MEDIOS DE CULTIVO (gr/1000 ml)

#### A.1 LB

Peptona de caseína	10
Extracto de levadura	5
NaCl	5
Agar	15

#### A.2 LB modificado

Peptona de caseína	10
Extracto de levadura	5
NaCl	5
MgSO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O	0.6
CaCl <sub>2</sub>	0.37
Agar	15

pH 7 con KOH al 10 %

### A.3 Difco

Caldo DIFCO	8
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.25
KCl 4H <sub>2</sub> O	1
MnCl <sub>2</sub>	0.01
Agar	15

pH 7 con KOH al 10%

### A.4 Rojo Congo

D. L. Málico	5
Extracto de levadura	0.5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.2
NaCl	0.1
FeCl <sub>3</sub> 1%	1.4 ml
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O 0.5%	0.4 ml
Rojo Congo (1/400)	15 ml
Agar	15

pH 6.8 con KOH

### A.5 Medio minimo K-malato

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.87
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.67
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.29
NaCl	0.48
D. L. Málico	4.5326
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O 0.7%	10 ml
FeCl <sub>3</sub> 1%	1 ml
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O 0.5%	1 ml
NH <sub>4</sub> Cl 20%	5 ml
Solución de Oligoelementos	1ml
Agar	15

pH a 6.8 con KOH



#### A.5.1 Solución de Oligoelementos:

MnSO <sub>4</sub>	0.025
ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.7
CoSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.014
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.0125
H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>	0.03

#### A.6 Medio NFB

D. L. Málico	3.7
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.2
NaCl	0.1
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	0.02
Fe-EDTA	0.0656
KNO <sub>3</sub> ó NH <sub>4</sub> Cl	1.39 ó 0.738
Solución de micronutrientes	2 ml

pH a 6.5 con KOH

#### A.6.1 Solución de micronutrientes (gr/200 ml):

Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	0.2
MnSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	0.235
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.280
CuSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.008
ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.024

#### B. Enzimas utilizadas

<i>Bam</i> HI	Thermo Scientific Fast Digest
<i>Kpn</i> I	Thermo Scientific Fast Digest
DNA Ligasa T4	Thermo Scientific
<i>Pvu</i> II	New England BioLabs
<i>Sac</i> I	New England BioLabs
<i>Sma</i> I	Thermo Scientific
<i>Spe</i> I	Thermo Scientific

<i>Stu</i> I	Thermo Scientific
<i>Xba</i> I	Invitrogen
<i>Xho</i> I	Invitrogen
<i>Xma</i> I	New England BioLabs

### C. Iniciadores utilizados (5'-3')

Iniciador	Secuencia
PM3-F	TGTA <b>GGTACC</b> CTTCTTGC GTTCCCGATCTCG
PM3-R	TGAT <b>CTCGAG</b> GTGGGCAGTTGCGCTGTTCTC
QH3-F	TCAT <b>AGGCCT</b> CCGTTGGCTTTCGCACTGGTG
QH3-R	TGTA <b>ACTAGT</b> CCGGGCAAAGCGTCGTTGGC
KmR-F7	GCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTG
KmR-R	CAGTGACAACGTCGAGCACAGC
M13-F	GTAAAACGACGGCCAGT
M13-R1	CAGGAAACAGCTATGAC
M13-R2	GTCATAGCTGTTTCCTG
AZO-F	GGCGCATCCCTTCTCACGG
AZO-R	GCTTGCGCCACGCGCAGG
dgcE-F	GGACGCGTAGGCCTCCGTTG
QH4-R	GCGGTGTCAGCATGCCGATAA
CarP1R-R	TGTTGCGCCCTACGTCAACGT

### D. Análisis del alineamiento del fragmento secuenciado PM- $\Delta$ *cdgE*-QH con *A. brasilense* Sp245

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```

pm          TCTTGC GTTCCCGATCTCGTTATCGCGGGAGAACCCCGTCTGGCTTTGATGATCSCTGC 60
AZO        TCTTGC GTTCCCGATCTCGTTATCGCGGGAGAACCCCGTCTGGCTTTGATGATCGCTGC 60
*****

pm          CCTCGCCGTCGTCCATCTGATCTTCCCATAGTCGATGGTGGCCGCTTTCCTGGTCCAGCG 120
AZO        CCTCGCCGTCGTCCATCTGATCTTCCCATAGTCGATGGTGGCCGCTTTCCTGGTCCAGCG 120
*****

pm          GGAAAACCGCATGAAAGTGACCGGCTTGATCGGCGGATTGACCCTGCTGACGGAAAACCT 180
AZO        GGAAAACCGCATGAAAGTGACCGGCTTGATCGGCGGATTGACCCTGCTGACGGAAAACCT 180
*****

pm          GCTGACCGCGGCCCTGGCCCTGGGCGGTTTTGGAATCTGGTCCGTGGTGTGGCCGCGCTT 240
AZO        GCTGACCGCGGCCCTGGCCCTGGGCGGTTTTGGAATCTGGTCCGTGGTGTGGCCGCGCTT 240
*****

pm          CGTCTCGACCATCACCTGGGTGGTGTGCATCGGCGGGCCCGGCCCTGGCGGCCCTCGCC 300
AZO        CGTCTCGACCATCACCTGGGTGGTGTGCATCGGCGGGCCCGGCCCTGGCGGCCCTCGCC 300
*****

pm          CGATTGTGGTTGGCACGGCTGGCGACAGGTGCTCGCTCATGGCGGGCAAGTTCTGGGAAC 360
AZO        CGATTGTGGTTGGCACGGCTGGCGACAGGTGCTCGCTCATGGCGGGCAAGTTCTGGGAAC 360
*****

pm          CGAGGTTCTCAAACCCCTTCGCGTGACGCTGGACAAGCCGTTGATCGGCGCGCTGTTTGG 420
AZO        CGAGGTTCTCAAACCCCTTCGCGTGACGCTGGACAAGCCGTTGATCGGCGCGCTGTTTGG 420
*****

pm          CATGGACGTCCTTGAATGTA CTACTTTGCATT CAGCGCCGGTTGGGGATCTCTCAATC 480
AZO        CATGGACGTCCTTGAATGTA CTACTTTGCATT CAGCGCCGGTTGGGGATCTCTCAATC 480
*****

pm          GTTGCTTTCGCGTGTGTCGACGGTGTGCTCCCGCATTGCGCGACGGCCGCGACAATGG 540
AZO        GTTGCTTTCGCGTGTGTCGACGGTGTGCTCCCGCATTGCGCGACGGCCGCGACAATGG 540
*****

pm          CGGGCAATTTACGCGCACGCCAAGGCCACCCTACGGTCGGTCGGTTTGATCGTTCCGCC 600
AZO        CGGGCAATTTACGCGCACGCCAAGGCCACCCTACGGTCGGTCGGTTTGATCGTTCCGCC 600
*****

pm          CCTGATCCTGACGCAAGCCCTGTTGTGTCCTTATGTGCCATTGATCTTCGGCGAGGC 660
AZO        CCTGATCCTGACGCAAGCCCTGTTGTGTCCTTATGTGCCATTGATCTTCGGCGAGGC 660
*****

pm          GTGGACGCCC GCGGTGCCGGTGGTCTGGTGCTCTGCCTGTCTGCGATTCCGCGTCCGTT 720
AZO        GTGGACGCCC GCGGTGCCGGTGGTCTGGTGCTCTGCCTGTCTGCGATTCCGCGTCCGTT 720
*****

pm          CGCCGATGTCTGTTCAAAATTCGGCGCGCTCTCGGTGCCCCCTGGCGCGGATCTTGCTG 780
AZO        CGCCGATGTCTGTTCAAAATTCAGCGCGCTCTCGGTGCCCCCTGGCGCGGATCTTGCTG 780
*****

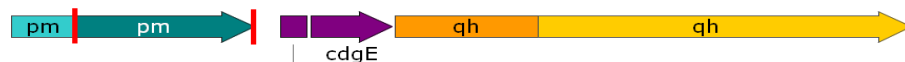
pm          GAACGCCGTGCTCACCGCATCCCTGGCCATTGCGATGGTCCTCGGGGCTCGGTGGGGATT 840
AZO        GAACGCCGTGCTCACCGCATCCCTGGCCATTGCGATGGTCCTCGGGGCTCGGTGGGGATT 840
*****

pm          GATCGGTGCGGCCCTGGGCTGTCTGGCCATCCATCTCATCGCATCGCCCCTCTTCGTTGT 900
AZO        GATCGGTGCGGCCCTGGGCTGTCTGGCCATCCATCTCATCGCATCGCCCCTCTTCGTTGT 900
*****

pm          TTGGACCTCAAGCATGCGGCGCTCCGTCATCGATGA 937
AZO        TTGGACCTCAAGCATGCGGCGCTCCGTCATCGATGA 937
*****

```

SeqA	Name	Length	SeqB	Name	Length	Score
1	PM	937	2	AZO	937	99.47



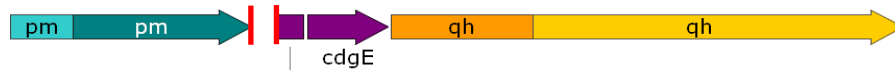
CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```
Int Gen      CGGCAATGCAACCTGGAGAGACATGGCGGCGATTCCGAGAGCGCTGGCACGAGTCTTGCT 60
AZO          CGGCAATGCAACCTGGAGAGACATGGCGGCGATTCCGAGAGCGCTGGCACGAGTCTTGCT 60
*****
```

```
Int Gen      CATGAAAAC TCCATATACGGTTGCTCAGGGTCGAGCCACTCTTCCAGAAGCAGCATCCAC 120
AZO          CATGAAAAC TCCATATACGGTTGCTCAGGGTCGAGCCACTCTTCCAGAAGCAGCATCCAC 120
*****
```

```
Int Gen      GGAGGATGGA 130
AZO          GGAGGATGGA 130
*****
```

SeqA	Name	Length	SeqB	Name	Length	Score
1	Entre	130	2	AZO	130	100.0

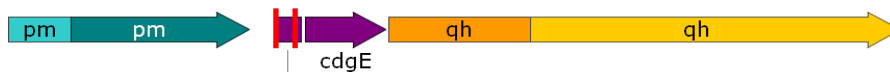


CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```
cdgE1       ATGAATTCGACGATGATCAGCGCGTTGAATGACCTCTCGGATCTGGTGACGGAATATCGT 60
AZO         ATGAATTCGACGATGATCAGCGCGTTGAATGACCTCTCGGATCTGGTGACGGAATATCGT 60
*****
```

```
cdgE1       GTCATGCTGGGCGAGCTGCT-GACGACGTCGCCAAC 95
AZO         GTCATGCTGGGCGAGCTGCTT GACGACGTCGCCAA- 95
*****
```

SeqA	Name	Length	SeqB	Name	Length	Score
1	dgcE1	95	2	AZO	95	98.95



CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```

cdgE2      GCAAGTCA-CGACCGGCAGGGGCATCTGGCGGGAGACCAGGTGATCCGGTCCCTTGCCCG 59
AZO        -CAAGTCAACGACCGGCAGGGGCATCTGGCGGGAGACCAGGTGATCCGGTCCCTTGCCCG 59
*****

cdgE2      CCTGCTGTCCAGCCGCTGCGCCGAACCGACATCGTTGGGCGCTATGGCGGGGAAGAGTT 119
AZO        CCTGCTGTCCAGCCGCTGCGCCGAACCGACATCGTTGGGCGCTATGGCGGGGAAGAGTT 119
*****

cdgE2      CGCGATCGTGTTGCCGGACACCGACCTGACCGAAGCGCGGGCGGTGCTCGACGACGTACG 179
AZO        CGCGATCGTGTTGCCGGACACCGACCTGACCGAAGCGCGGGCGGTGCTCGACGACATACG 179
*****

cdgE2      CAGCACGTTCAAGCGCATAACGCCACCGCAACGACGCGGAGTTCATGTGACGTTGAG 239
AZO        CAGCACGTTCAAGCGCATAACGCCACCGCAACGACGCGGAGTTCATGTGACGTTGAG 239
*****

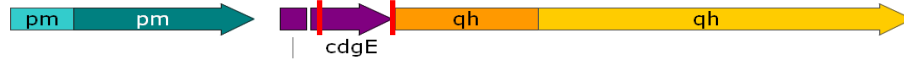
cdgE2      CTGCGGTCTCGCCCTGTTTCGACGCCACGATGCCCGGTGATGGCCAGATCCTGGCAGCGGA 299
AZO        CTGCGGTCTCGCCCTGTTTCGACGCCACGATGCCCGGTGATGGCCAGATCCTGGCAGCGGA 299
*****

cdgE2      TGAAGCCCTGTATCGCGCAAAGGCCACTGGGACGGGATCGGGTGGAAACTGCCGTGCAGAA 359
AZO        TGAAGCCCTGTATCGCGCAAAGGCCACTGGGACGGGATCGGGTGGAAACTGCCGTGCAGAA 359
*****

cdgE2      ATCCGCGCTCGACGAGTCCGCCTTCTAG 387
AZO        ATCCGCGCTCGACGAGTCCGCCTTCTAG 387
*****

```

SeqA	Name	Length	SeqB	Name	Length	Score
1	cdgE2	387	2	AZO	387	99.48



CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```

qh          GAGCCGTCATGACTTTTCTTTCCGATTGGGCGGTCATCGATCTGATTGAGAACGGCTGCG 68
AZO         GAGCCGTCATGACTTTTCTTTCCGATTGGGCGGTCATCGATCTGATTGAGAACGGCTGCG 68
*****

qh          TCTACACCCTGGCGGTGCTCGGCTGTTGCGCCCTACGTCAACGTTTTGCGCACCCAATGC 120
AZO         TCTACACCCTGGCGGTGCTCGGCTGTTGCGCCCTACGTCAACGTTTTGCGCACCCAATGC 120
*****

qh          CGGTATGGGCGGAATGCCTGCTTGGCGCCATGTTGCGCCTGGTCACCATTATCGGCATGC 180
AZO         CGGTATGGGCGGAATGCCTGCTTGGCGCCATGTTGCGCCTGGTCACCATTATCGGCATGC 180
*****

qh          TGACACCGCTCCGGCCCATGGACGGTGTGTTGATCGACGGTCGGGCCATCATGATCGTGC 240
AZO         TGACACCGCTCCGGCCCATGGACGGTGTGTTGATCGACGGTCGGGCCATCATGATCGTGC 240
*****

qh          TGTCCTACCGTTTGGCGGAGCCTGGGCCTGTGCGGTACCACGGCGTTCGCCGCCGTGT 300
AZO         TGTCCTACCGTTTGGCGGAGCCTGGGCCTGTGCGGTACCACGGCGTTCGCCGCCGTGT 300
*****

qh          ACCGGTGGCATGTGGGCGGCATCGGTGCCACGGCCGGCGTGGTGCAAATCGGGCTGGCCG 360
AZO         ACCGGTGGCATGTGGGCGGCATCGGTGCCACGGCCGGCGTGGTGCAAATCGGGCTGGCCG 360
*****

qh          CCGCCTGCGGCGTCGCGGCGACTTGGCTGACCGGTGGAACCTGTCTTCCGCCATCTTG 420
AZO         CCGCCTGCGGCGTCGCGGCGACTTGGCTGACCGGTGGAACCTGTCTTCCGCCATCTTG 420
*****

qh          TGGCTCATGGTTTGCTGGCCGGTATCGTCACGCCATTGCTGGCCTCCTGATTTGACCG 480
AZO         TGGCTCATGGTTTGCTGGCCGGTATCGTCACGCCATTGCTGGCCTCCTGATTTGACCG 480
*****

qh          ATTCATTCGGTTTCATCTACCGATCCGCCGCTTACCCTGTTTCTGATCGATTTTTTCG 540
AZO         ATTCATTCGGTTTCATCTACCGATCCGCCGCTTACCCTGTTTCTGATCGATTTTTTCG 540
*****

qh          GAATTCCTGCTGATCGGCAGCCTGCTGATCCTTGAACACCGTCGGCACGACCTGGAGCGGG 600
AZO         GAATTCCTGCTGATCGGCAGCCTGCTGATCCTTGAACACCGTCGGCACGACCTGGAGCGGG 600
*****

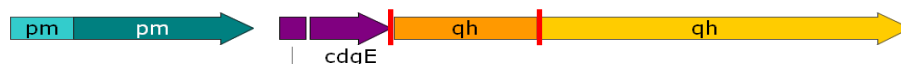
qh          CGTTGCTTGGCAGCTACGACAAGCTCGCGCGCTCCAGTGCCTGCATCCATGAGAGCGAGG 660
AZO         CGTTGCTTGGCAGCTACGACAAGCTCGCGCGCTCCAGTGCCTGCATCCATGAGAGCGAGG 660
*****

qh          CCCGATTCCGCGATCTGATCGAGGGATCGATCCAAGGTGTGTGCGTTACAGSGGGCTTCA 720
AZO         CCCGATTCCGCGATCTGATCGAGGGATCGATCCAAGGTGTGTGCGTTACAGSGGGCTTCA 720
*****

qh          CTCCGCTGTTCCGCAACGACGCTTTTGCCCGG 752
AZO         CTCCGCTGTTCCGCAACGACGCTTTTGCCCGG 752
*****

```

SeqA	Name	Length	SeqB	Name	Length	Score
1	QH	752	2	AZO	752	99.87



## E. Símbolos y Abreviaturas

μl	Microlitros
::	Inserción
Δ	Delección
μg	Microgramos
<i>A. bras.</i>	<i>Azospirillum brasilense</i>
Ap <sup>R</sup>	Resistencia a ampicilina
CV	Crista violeta
D. O.	Densidad óptica
DGC	Diguanilato ciclasa
di-GMPc	bis-(3'-5') guanosín monofosfato cíclico
DMSO	Dimetilsulfóxido
EPS	Exopolisacáridos
Fig.	Figura
gr	Gramos
h	Horas
Km <sup>R</sup>	Resistencia a kanamicina
LPS	Lipopolisacáridos
min	Minutos
ml	Mililitros
mM	Milimolar
MPM	Marcador de peso molecular
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros
NO	Óxido nítrico
No.	Numero
pb	Pares de bases
PDE	Fosfodiesterasa
pg	Picogramos
PGPR	Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal
PHB	poli-β-hidroxibutirato
PM	Proteína de membrana

QH	Cinasa histidinica
RR	Regulador de respuesta
SDC	Sistema de doble componente
Tc <sup>R</sup>	Resistencia a Tetraciclina
TM	Transmembrana
UFC	Unidades formadoras de colonia