



Estudio de la colonización de arroz por mutantes del sistema de transducción de señal a dos componentes GacS/A en *Pseudomonas stutzeri* A15. Bacteria endófito de arroz.

Omar Ortega Cadena¹, Arturo Martínez Zavala¹, Miguel Castañeda Lucio¹, Claudine Elmerich² y Ricardo Carreño López¹. ¹Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Instituto de Ciencias, B.U.A.P., Puebla, Pue., México. ²Institut des Sciences du végétal CNRS, Gif Sur Yvette, France.

ricardo.lopez@icbuap.buap.mx.

Palabras clave: *gacS*, *gacA*, *Pseudomonas stutzeri*.

Introducción. *Pseudomonas stutzeri* es una bacteria fijadora de nitrógeno, que se encuentra principalmente en suelo y agua, y que muestra una versatilidad metabólica, en las que se incluyen la degradación de contaminantes ambientales. Los miembros de esta especie promueven el desarrollo vegetal (1), gracias al colonizar y desplazarse en un micro hábitat complejo como lo es la rizósfera; empleando sistemas de señalización para adaptarse, sobrevivir, y competir exitosamente en su entorno. Un tipo importante de estos sistemas es el par GacS/GacA, presente en diversas bacterias y el cual dirige la expresión de genes cuyos productos son los encargados de montar una respuesta a las señales del medio, controlando procesos importantes para la interacción, establecimiento y colonización bacteriana, a través de la síntesis de productos extracelulares y metabolitos secundarios, además de funciones como la movilidad y formación de biofilms (2).

El sistema GacS/A está compuesto de dos elementos de transducción de señales, el primero es una proteína que tiene actividad cinasa y que detecta señales fosforilándose ella misma y al segundo componente, llamado regulador de la respuesta, constituido de dos dominios, el primero de fosforilación y el segundo conocido como dominio de salida y que generalmente es un dominio de pegado a DNA. Las mutaciones en ambos componentes del sistema de otras bacterias afectan drásticamente o anulan las capacidades bacterianas de asociación y virulencia.

En *Pseudomonas stutzeri* pensamos que funciones vitales para la colonización de la planta están influenciadas por el sistema GacS/A. Este trabajo esta encaminado a elucidar la participación de los genes *gacS* y *gacA* en la colonización de *P. stutzeri* a raíces de arroz.

Metodología. Se construyó una genoteca de *P. stutzeri* en el cósmido pLA2917. A partir de una sonda de DNA del gen *gacS* de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, se realizó la búsqueda del gen *gacS* de *P. stutzeri* por hibridación colonial en la genoteca. La clona obtenida fue caracterizada físicamente y el gen interrumpido. Por otro lado a partir de oligonucleótidos diseñados de la secuencia reportada del gen *gacA* de *P. aeruginosa* PAO1, cepa filogenéticamente cercana a *P. stutzeri* realizamos la amplificación del gene *gacA*, el cual fue interrumpido con un cassette de resistencia a kanamicina, la construcción fue introducida a la cepa silvestre, para obtener por recombinación una mutante del gene *gacA*. Las mutantes obtenidas fueron evaluadas en

colonización con plántulas de arroz axénicas, además se evaluó la colonización de ambas cepas, silvestre y mutante en estado de competencia, utilizando en gen reportero lacZ.

Resultados y discusión. A partir de la genoteca se pudo obtener una clona que portaba el gen *gacS*, el cual fue secuenciado. A partir del amplificado del gen *gacA* de *P. stutzeri* se pudo obtener una construcción plasmídica en la cual se interrumpió el gen. Se obtuvo una doble recombinante, mutante del gen *gacA*, la mutante fue caracterizada y se realizaron ensayos con plántulas de arroz obteniéndose una colonización semejante a la cepa silvestre en condiciones hidropónicas y a los diez días de haber inoculado. Suponiendo que el sistema GacS/A estuviera influenciando las primeras etapas del proceso de colonización, realizamos ensayos a corto tiempo después de haber inoculado, encontrándose una pequeña diferencia con la cepa silvestre. Diferencias también se encontraron al realizar ensayos de competencia mezclando la cepa silvestre y mutante.

Conclusiones. El sistema de transducción de señal a dos componentes se encuentra presente en *Pseudomonas stutzeri* A15.

Bajo las condiciones de ensayo utilizadas, se encontró que el sistema GacS/A está implicado en las primeras etapas del proceso de colonización y al parecer este sistema ya no es tan importante en etapas posteriores.

Agradecimientos. El trabajo fue financiado por PROMEP/103.5/02/1441. Martínez Zavala A. fue apoyado con beca de maestría por CONACyT.

Bibliografía.

- 1.-Vermeiren, H., Willems A., Schoofs G., De Mot R., Keijers V., Hai W and Vanderleyden J. 1999. The rice inoculant strain *Alcaligenes faecalis* A15 is a nitrogen fixing *Pseudomonas stutzeri*. *System. Appl. Microbiol.* 22: 215-224.
- 2.- Heeb S. and Haas D. 2001. Regulatory roles of the GacS/GacA two component system in plant-associated and other Gram-negative bacteria. *Mol. Plant Microbe Interact.* 14:1351-1363.