



**UNIVERSIDAD MICHOACANA
DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO**



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO-BIOLÓGICAS

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA
EXPERIMENTAL**

TÍTULO:

**“Caracterización del sistema de reguladores LuxR solos de *Arthrobacter* sp.
UMCV2 como moduladores de la respuesta de la bacteria a su compuesto
N, N-dimetilhexadecilamina”**

TESIS QUE PRESENTA:

M.C. MARTHA PATRICIA CHÁVEZ MOCTEZUMA

PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

DIRECTOR DE TESIS:

D.C. EDUARDO VALENCIA CANTERO

CO-DIRECTOR:

D.C. GUSTAVO SANTOYO PIZANO

MORELIA, MICHOACÁN, SEPTIEMBRE DE 2023

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN LOS LABORATORIOS DE ECOLOGÍA MICROBIANA Y DE DIVERSIDAD GENÓMICA DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO-BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO, BAJO LA DIRECCIÓN DEL D.C. EDUARDO VALENCIA CANTERO Y LA CO-DIRECCIÓN DEL D.C. GUSTAVO SANTOYO PIZANO.

ESTE TRABAJO CONTÓ CON EL APOYO ECONÓMICO DE LA COORDINACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA (CIC) DE LA UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO (UMSNH).

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH) por el permiso otorgado para realizar mis estudios de doctorado

A mi asesor, D.C. Eduardo Valencia Cantero:

Por permitirme formar parte de su grupo de trabajo, por su paciencia, por todo el apoyo brindado y guía

A mi co-asesor, D.C. Gustavo Santoyo Pizano

Por todo el apoyo brindado y su valiosa colaboración para la realización de este trabajo

A mi Comité Tutorial los D.C., Ernesto García Pineda, Joel Edmundo López Meza (CMEB) y César Díaz Pérez (Universidad de Guanajuato)

Por sus consejos y enseñanzas que contribuyeron a mi formación y enriquecieron este trabajo

A mis compañeros del laboratorio de Ecología Microbiana

Un agradecimiento especial por su apoyo a Idolina, Vicente, Paulina, Tiffany y Kimberly

A mis compañeros del laboratorio de Diversidad Genómica

Por su apoyo a la Dra. Paulina Guzmán, a mi compañera de generación *Rachel*, Blanca Rojas, Fernanda y Salvador

A toda la comunidad de IIQB

DEDICATORIA

A mis padres, Guillermina Moctezuma de Chávez[†] y Federico Chávez Arenas[†]

Aunque no están físicamente conmigo, sus enseñanzas y su amor me acompañan siempre

A mis hijos, Andrea y Gerardo

El amor de mi vida, mi bendición más grande, mi motor

A mis hermanos, Jesús Alejandro[†], Isabel, y Víctor

Por todos los momentos compartidos

A mis sobrinos, Erick, Yuyo, Paulina, Dany, Omar y Fernando

A mis cuñadas, Anita[†] y Myrna

Con cariño

ÍNDICE	Pag
ÍNDICE DE FIGURAS.....	7
ÍNDICE DE FIGURAS DEL <i>Capítulo 2</i>	7
RESUMEN.....	8
ABSTRACT.....	9
I. INTRODUCCIÓN.....	10
1.1.- Comunicación celular.....	10
1.2.- Percepción de quorum.....	10
1.3.- Percepción de quorum en bacterias Gram-negativas.....	11
1.4.- Proteínas reguladoras de la familia LuxI.....	13
1.5.- Proteínas reguladoras de la familia LuxR.....	16
1.6.- Proteínas reguladoras LuxR solos.....	16
1.7.- Percepción de quorum en bacterias Gram-positivas.....	18
1.7.1.- Oligopéptidos autoinductores de QS en bacterias Gram-positivas.....	19
1.7.2.- Percepción de quorum en <i>Staphylococcus aureus</i>	20
1.7.3.- El sistema Agr de percepción de quorum en <i>Staphylococcus aureus</i>	22
1.8.- Clasificación de los sistemas de percepción de quorum.....	25
1.8.1.- Sistemas de percepción de quorum con un autoinductor.....	25
1.8.2.- Sistemas de percepción de quorum con dos o más autoinductores.....	25
1.9.- Compuestos Orgánicos Volátiles (COVs).....	27
II. ANTECEDENTES.....	28
III. JUSTIFICACIÓN.....	30
IV. HIPÓTESIS.....	31
V. OBJETIVOS.....	32
VI. RESULTADOS.....	33
<i>Capítulo 1</i>	34
<i>Capítulo 2</i>	50
Transformación genética por electroporación de <i>Arthrobacter</i> sp. UMCV2 con los vectores pART2 y pART3.....	50
RESUMEN.....	51
ABSTRACT.....	52

I.	INTRODUCCIÓN.....	53
II.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	56
2.1.-	Reactivos y medios de cultivo.....	56
2.2.-	Cepas empleadas.....	56
2.3.-	Vectores.....	56
2.4.-	Análisis de plásmidos.....	57
2.4.1.-	Aislamiento de DNA plasmídico.....	57
2.4.2.-	Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) en colonia.....	58
2.5.-	Electroforesis en geles de agarosa.....	59
2.6.-	Restricción con endonucleasas.....	59
2.7.-	Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	59
2.8.-	Transformación por electroporación.....	60
2.8.1.-	Preparación de células electrocompetentes de <i>E. coli</i> JM101.....	60
2.8.2.-	Preparación de células electrocompetentes de <i>Arthrobacter</i> sp. UMCV2.....	60
2.8.3.-	Transformación por electroporación de <i>E. coli</i> JM101.....	60
2.8.4.-	Transformación por electroporación de <i>Arthrobacter</i> sp. UMCV2.....	61
III.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	62
3.1.-	Transformación de <i>E. coli</i> JM101.....	62
3.2.-	Transformación de <i>Arthrobacter</i> sp. UMCV2.....	63
3.3.-	Confirmación de la transformación por restricción de los vectores.....	64
3.4.-	Confirmación de la transformación por PCR en colonia.....	65
IV.	CONCLUSIÓN.....	66
V.	REFERENCIAS.....	70
VI.	DISCUSIÓN GENERAL.....	75
VII.	CONCLUSIONES GENERALES.....	86
VIII.	REFERENCIAS.....	87

ÍNDICE DE FIGURAS

Pag

Figura 1. Percepción de quorum	11
Figura 2. Estructura general de las acil-homoserina lactonas (AHLs).....	12
Figura 3. Regulación de la bioluminiscencia por percepción de quorum en la bacteria <i>Aliivibrio fischeri</i>	14
Figura 4. Biosíntesis de autoinductores de AHLs dirigida por LuxI.....	15
Figura 5. Mecanismo regulador por proteínas LuxR solo	18
Figura 6. Estructura de oligopéptidos autoinductores en bacterias Gram-positivas	19
Figura 7. Sistemas principales de percepción de quorum en bacterias Gram-positivas	21
Figura 8. Organización molecular del sistema <i>agr</i> de percepción de quorum de <i>Staphylococcus aureus</i>	24
Figura 9. Clasificación de los sistemas de percepción de quorum.....	26
Figura 10. Efecto de la dimetilhexadecilamina (DMHDA) sobre el crecimiento y viabilidad celular de <i>Arthrobacter</i> sp. UMCV2.....	29

ÍNDICE DE FIGURAS DEL Capítulo 2

Pag

Figura 1. Mapas de DNA de los plásmidos pART2 y pART3	57
Figura 2. Cepas transformadas de <i>E. coli</i> JM101 y <i>Arthrobacter</i> sp. UMCV2.....	67
Figura 3. Confirmación de las transformantes por restricción de los vectores	68
Figura 4. Confirmación de las transformantes de <i>Arthrobacter</i> sp. UMCV2 por PCR en colonia.....	69

RESUMEN

El quorum sensing (QS) o percepción de quorum, es un sistema bacteriano de comunicación célula-célula el cual regula genéticamente mecanismos dependientes de la densidad celular. Los sistemas canónicos QS en bacterias Gram-negativas poseen una sintasa autoinductor (familia LuxI) y un regulador transcripcional (familia LuxR) que responde a una molécula autoinductora. En bacterias Gram-positivas, los reguladores transcripcionales LuxR solos (que no están asociados con un homólogo LuxI) pueden desempeñar funciones clave en la comunicación intercelular. *Arthrobacter* sp. UMCV2 es una actinobacteria que promueve el crecimiento vegetal por la emisión del compuesto orgánico volátil *N, N*-dimetilhexadecilamina (DMHDA). Este compuesto estimula la adquisición de hierro, respuestas de defensa en plantas, y motilidad *swarming* en *Arthrobacter* sp. UMCV2. En este estudio, el borrador del genoma de esta bacteria fue ensamblado y comparado con los genomas de cepas tipo del género *Arthrobacter*, encontrando que no pertenece a ninguna de las especies descritas anteriormente. Exploraciones del genoma también revelaron la presencia de 16 genes relacionados a *luxR*, pero no se descubrieron homólogos *luxI*. Once de estas secuencias poseen el dominio de unión a DNA característico LuxR con un motivo hélice-giro-hélice y fueron designados como reguladores relacionados con autoinductores (AirR). Cuatro secuencias poseían dominios análogos LuxR y fueron designados como reguladores análogos a autoinductores (AiaR). Cuando la motilidad *swarming* fue inducida con DMHDA, ocho genes *airR* y dos genes *aiaR* aumentaron su expresión. Estos resultados indican que la expresión de múltiples genes relacionados con *luxR* se induce en actinobacterias, tales como *Arthrobacter* sp. UMCV2, por la acción del biocompuesto bacteriano DMHDA cuando se produce el comportamiento QS.

Palabras Clave

Actinobacteria, LuxR solos, DMHDA, genes *airR*, genes *aiaR*, motilidad *swarming*

ABSTRACT

Quorum sensing (QS) is a bacterial cell-cell communication system with genetically regulated mechanisms dependent on cell density. Canonical QS systems in Gram-negative bacteria possess an autoinducer synthase (LuxI family) and a transcriptional regulator (LuxR family) that respond to an autoinducer molecule. In Gram-positive bacteria, the LuxR transcriptional regulators solos (not associated with a LuxI homolog) may play key roles in intracellular communication. *Arthrobacter* sp. UMCV2 is an actinobacterium that promotes plant growth by emitting the volatile organic compound *N*, *N*-dimethylhexadecylamine (DMHDA). This compound induces iron deficiency, plant defense responses, and *Arthrobacter* sp. UMCV2 swarming motility. In this study, the draft genome of this bacterium was assembled and compared with the genomes of type strains of the *Arthrobacter* genus, finding that it does not belong to any previously described species. Genome explorations also revealed the presence of 16 *luxR*-related genes, but no *luxI* homologs were discovered. Eleven of these sequences possessed the LuxR characteristic DNA-binding domain with a helix-turn-helix motif and were designated as auto-inducer-related regulators (AirR). Four sequences possessed LuxR analogous domains and were designated as auto-inducer analogous regulators (AiaR). When *swarming* motility was induced with DMHDA, eight *airR* genes and two *aiaR* genes were upregulated. These results indicate that the expression of multiple *luxR*-related genes is induced in actinobacteria, such as *Arthrobacter* sp. UMCV2, by the action of the bacterial biocompound DMHDA when QS behavior is produced.

Keywords

Actinobacteria, LuxR solos, DMHDA, *airR* genes, *aiaR* genes, *swarming* motility

I. INTRODUCCIÓN

1.1. Comunicación celular

El fenómeno de comunicación se ha desarrollado en diversos organismos, alcanzando la forma más sofisticada en organismos sociales, particularmente en seres humanos. Para que una verdadera comunicación ocurra, se necesitan dos sucesos fundamentales. Primero, uno o más individuos deben producir una señal que sea percibida por otros (receptores) y segundo, los receptores deben alterar su comportamiento en respuesta a la señal (Keller y Surette, 2006).

Organismos superiores y multicelulares, en los que cada una de las células debe cumplir con sus actividades y funcionar como un todo, requiere que las células posean un sistema de generación, transmisión, recepción y respuesta de diversas señales que las comuniquen e interrelacionen funcionalmente entre sí. Este mecanismo se conoce como comunicación celular (Sifri, 2008).

Hasta hace algunas décadas, se creía que los organismos unicelulares procariotes como las bacterias, vivían en forma independiente respondiendo sólo a estímulos físicos y químicos de origen ambiental. Hoy se sabe que las bacterias se comunican con otras mediante moléculas orgánicas, que actúan de manera similar a como lo hacen las hormonas en organismos superiores. La producción y posterior percepción de estas moléculas permite a las bacterias comunicarse y coordinar su comportamiento, para así funcionar como un microorganismo multicelular (Mukherjee y Bassler, 2019).

1.2. Percepción de quorum

La percepción de quorum (QS) es un sistema de comunicación célula-célula, que se basa en la producción liberación y detección de señales químicas llamadas autoinductores (AI), para regular la expresión de genes en respuesta a cambios en la densidad de la población bacteriana, originando un comportamiento coordinado colectivo de respuesta a las condiciones del medio ambiente (Fuqua et al., 1994; Waters y Bassler, 2005). Entre las funciones celulares reguladas por estos sistemas se encuentran, la bioluminiscencia, síntesis de antibióticos, producción de factores de virulencia, formación de biopelículas, motilidad “*swarming*”, competencia genética y esporulación, entre otros (Polkade et al., 2016). Estos comportamientos celulares son improductivos cuando se

llevan a cabo por una bacteria, pero se vuelven efectivos por la acción simultánea de grupos de células bacterianas (**Figura 1**) (Bassler, 2002). Los sistemas QS se han identificado tanto en bacterias Gram-negativas como Gram-positivas (Hawver et al., 2016).

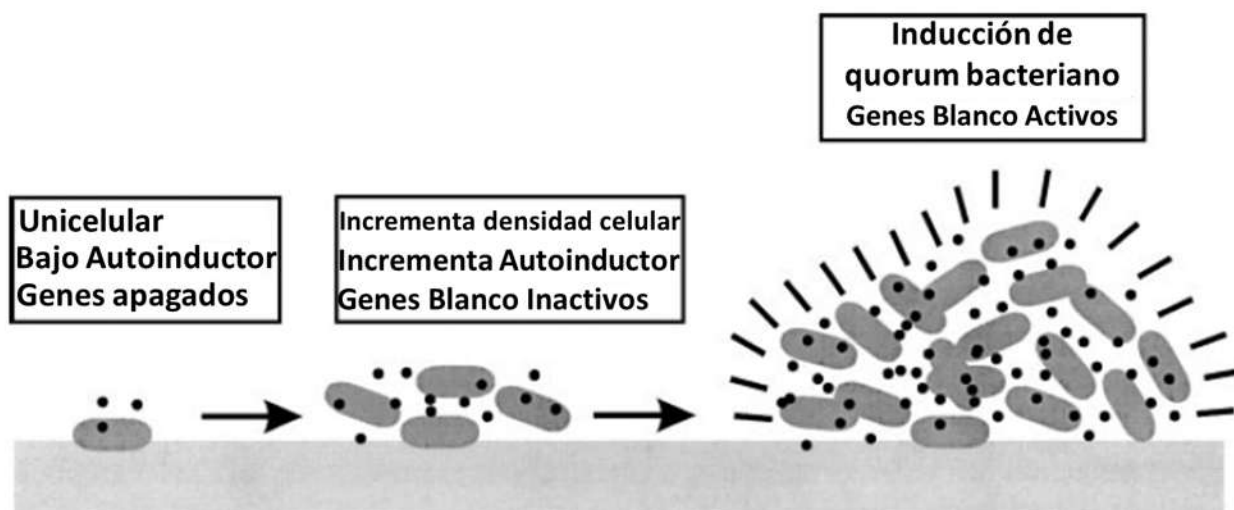


Figura 1. Percepción de quorum. Regulación de genes dependiente de la densidad celular. Una población de microorganismos se acumula sobre una superficie. El aumento en el número de células puede deberse al crecimiento o reclutamiento. Los círculos cerrados representan señales intercelulares (autoinductores) de percepción de quorum (Modificada de Fuqua et al., 2001).

1.3. Percepción de quorum en bacterias Gram-negativas

El primer sistema biológico estudiado, regulado por percepción de quorum fue la bioluminiscencia en la bacteria *Vibrio fischeri* (*Aliivibrio fischeri*), que es un simbiote facultativo de peces marinos y calamares (Hastings y Nealson, 1977). El sistema de percepción de quorum de esta bacteria es el más sencillo descrito y cuenta con un único autoinductor, una acil-homoserina lactona (AHL) (**Figura 2**) (Fuqua et al., 2001). La bacteria habita en los órganos de luz de estos animales marinos y es responsable de la producción de luminiscencia, lo cual se cree que ayuda a los animales a escapar de depredadores y en la comunicación. Interesantemente, la bioluminiscencia solo se presenta cuando existe la interacción simbiótica entre la bacteria y el órgano del pez y no cuando está en el estado de vida libre (Hastings y Nealson, 1977).

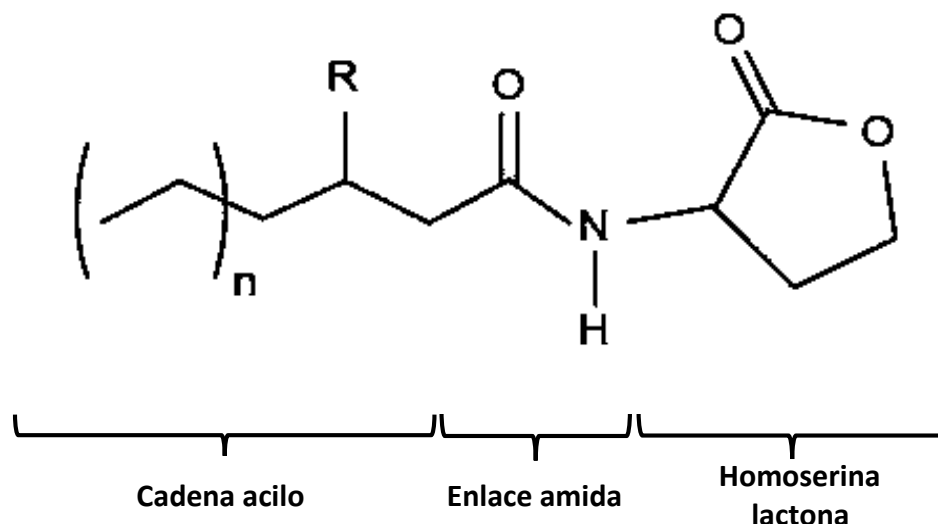


Figura 2. Estructura general de las acil-homoserina lactonas (AHLs), la molécula autoinductora característica de bacterias Gram-negativas. Están compuestas por una cadena acilo de 4 a 18 átomos de carbono unida por un enlace amida a un anillo de homoserina lactona. Además de la longitud, pueden variar en su estructura por el nivel de saturación y por la presencia de un grupo ceto o hidroxilo en el carbono 3 de la cadena acilo (Modificada de Fuqua et al., 2001).

A nivel molecular, el operón *lux* es el responsable para la producción de esta bioluminiscencia, consiste en ocho genes repartidos en dos operones denominados *luxICDABEG* y *luxR*, con una región promotora común, transcritos bidireccionalmente (Engebrecht et al., 1983; Swartzman, 1990). Consta de seis genes estructurales (*luxA-E*) y (*luxG*). Los genes, *luxA* y *luxB* codifican para las subunidades de la enzima heterodimérica luciferasa. Esta enzima cataliza en bacterias, la oxidación por oxígeno molecular de un aldehído (RCHO) y un flavin mononucleótido reducido (FMNH₂). La liberación simultánea de exceso de energía libre, evidente como luz azul-verde resulta en el fenotipo asociado con bioluminiscencia en microorganismos (Dunn et al., 1973; Hastings y Nealson, 1977; Nealson y Hastings, 1979). Los genes (*luxC-E*) codifican proteínas que forman un complejo multienzimático responsable de la síntesis del sustrato (luciferina) utilizado por la luciferasa (Boylan et al., 1985; Boylan et al., 1989), *luxG* codifica una probable flavin reductasa (Zenno y Saigo, 1994), y los dos genes

reguladores, *luxI* y *luxR*, que codifican para proteínas del mismo nombre, para la producción (LuxI) y la percepción (LuxR) de las moléculas señal por los microorganismos (**Figura 3A**) (Fuqua et al., 1994; Miller y Bassler, 2001).

La regulación de la bioluminiscencia está mediada por el sistema LuxI-LuxR que consta de una sintasa (familia LuxI) y de un regulador transcripcional (familia LuxR) (Fuqua et al., 1994). Los sistemas QS más estudiados son los regulados por un miembro de la familia de las N-acil-homoserina lactonas (AHLs) en bacterias Gram-negativas (Swift et al., 1994), dichos compuestos, actúan como una molécula señal difusible, la síntesis de la cual, es controlada por miembros de la familia de la sintasa LuxI. La regulación de este sistema comienza cuando la proteína LuxI, sintetiza en el citoplasma la señal química (autoinductor), una acil-homoserina lactona (AHL) de seis carbonos, la N-3-oxo-hexanoil-L-homoserina lactona (3-oxo-C6-AHL), la cual difunde a través de la membrana plasmática hacia el medio circundante y, a medida que la molécula señal se acumula en el exterior, esta aumenta su concentración, por el incremento en la densidad celular bacteriana, lo que lleva a la unión y activación de un miembro de la familia de reguladores transcripcionales LuxR (Fuqua et al., 1996). El complejo estable LuxR-AHL actúa como factor transcripcional, de manera que se une entonces a secuencias reguladoras palindrómicas específicas en la región del promotor, llamadas cajas *lux*, favoreciendo el reclutamiento de la RNA polimerasa, para activar o reprimir la transcripción de sus genes blanco en el DNA (**Figura 3B**) (Fuqua et al., 2001; González y Keshavan, 2006; Ng y Bassler, 2009).

1.4. Proteínas reguladoras de la familia LuxI

Todas las proteínas de la familia LuxI identificadas a la fecha en bacterias Gram-negativas, se parecen a LuxI de *Aliivibrio fischeri*, y catalizan la misma reacción de síntesis del autoinductor (González y Marketon, 2003). La proteína LuxI es una acil sintasa con un tamaño promedio de entre 190 y 219 aminoácidos aproximadamente (Rajput y Kumar, 2017), que utiliza como sustrato a la proteína acarreadora de grupos acilo para añadir el grupo N-acil a la L-homoserina lactona derivada de la S-adenosilmetionina para producir AHLs (Hanzelka et al., 1999).

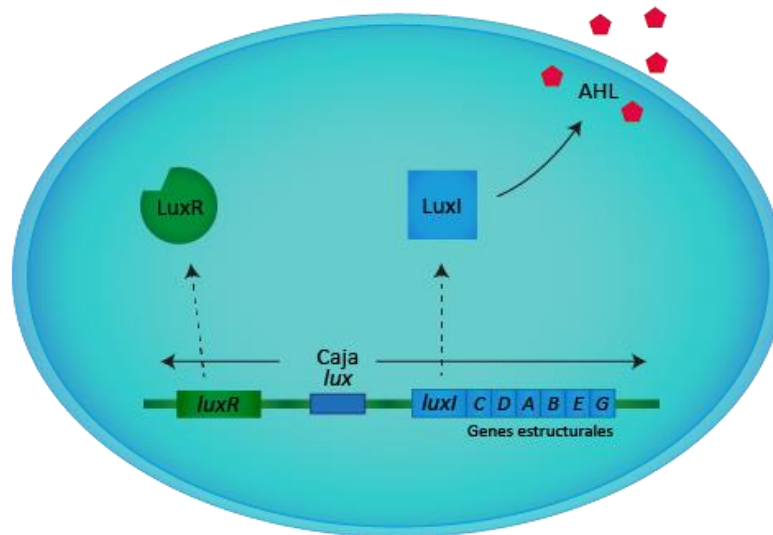
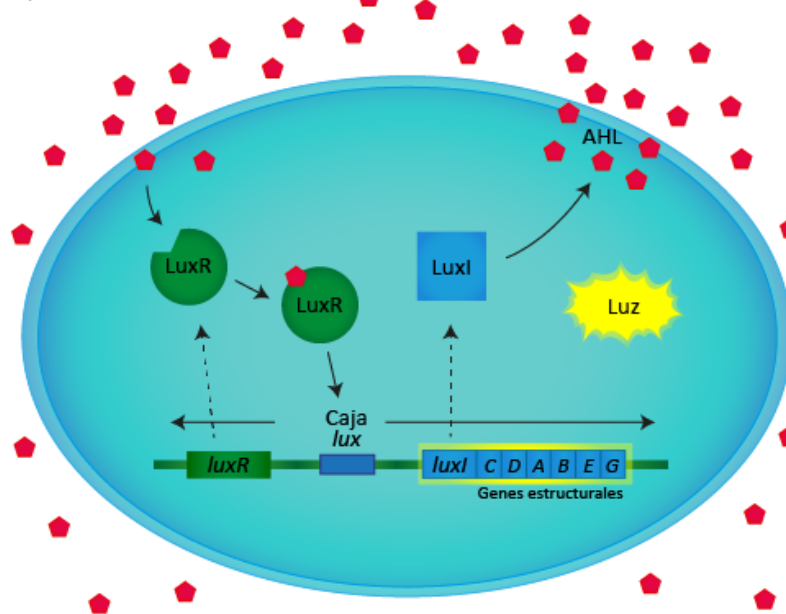
A) Baja densidad celular**B) Alta densidad celular**

Figura 3. Regulación de la bioluminiscencia por percepción de quorum en la bacteria *Aliivibrio fischeri*. **A)** Cuando la densidad celular es baja, la concentración de la molécula autoinductora, producto de la actividad sintasa de LuxI, es baja y los genes estructurales del operón *lux* no son transcritos. **B)** La existencia de una alta densidad celular supone una mayor producción del autoinductor. Cuando la concentración alcanza un umbral, la molécula autoinductora se une a su receptor intracelular (LuxR). El receptor activado se une al promotor (caja *lux*) y se activa la transcripción de los genes del operón *lux*, originándose la producción de luz o bioluminiscencia (Modificada de Whitehead et al., 2001).

En otras bacterias, los homólogos a LuxI añaden diferentes grupos *N*-acil a *L*-homoserina lactonas para producir diferentes AHLs (**Figura 4**) (Fuqua et al., 1994; Zavilgelsky y Manukhov, 2001). Esto provee variación y especificidad a la comunicación por percepción de quorum, ya que determinadas bacterias solo pueden producir ciertos tipos de AHLs (Verbeke et al., 2017; González y Keshavan, 2006).

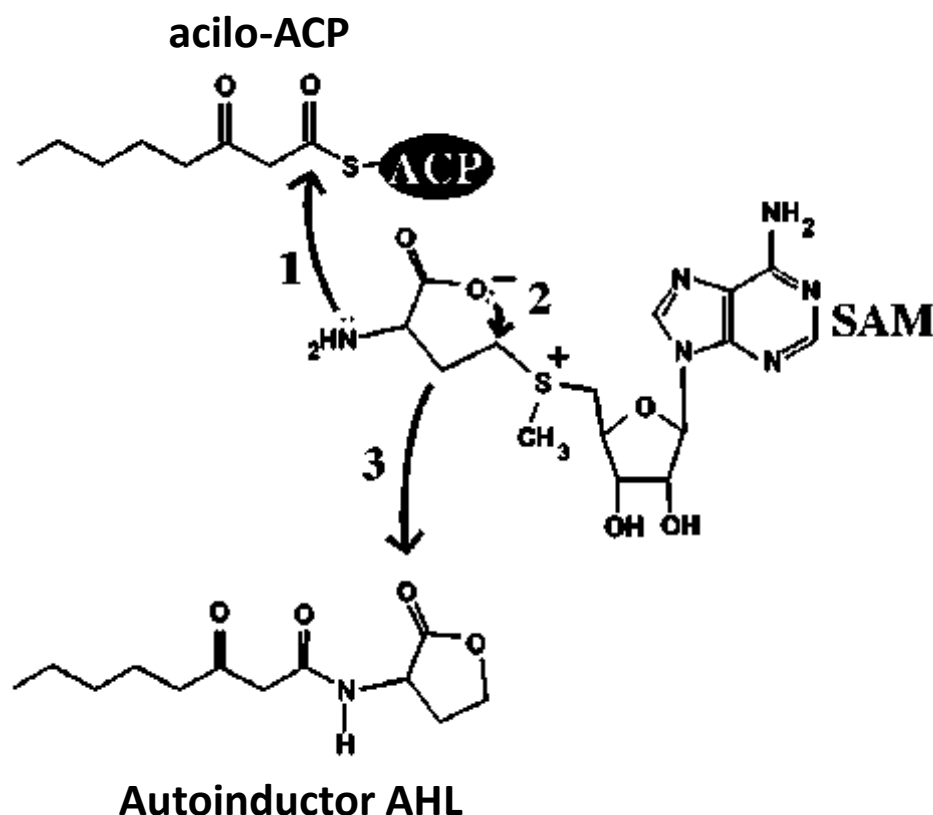


Figura 4. Biosíntesis de autoinductores de AHLs dirigida por LuxI. La familia de proteínas LuxI, utiliza a la S-adenosilmetionona (SAM) y a la proteína específica transportadora de grupos acilo (acilo-ACP) como sustratos para la biosíntesis del autoinductor. Las proteínas de la familia LuxI dirigen la formación de un enlace amida entre la SAM y el residuo acilo de la proteína acilo-ACP (flecha 1). Posteriormente ocurre una lactonización del ligando intermediario con la liberación simultánea de metiltioadenosina (flecha 2). Este paso resulta en la formación de la homoserina lactona acetilada (flecha 3). En la figura se muestra la AHL autoinductora de ocho carbonos, la *N*-(3-oxooctanoil)-homoserina lactona, la cual es sintetizada por la proteína homóloga Tral de *Agrobacterium tumefaciens* (Modificada de Miller y Bassler, 2001).

1.5. Proteínas reguladoras de la familia LuxR

Los reguladores transcripcionales de la familia LuxR en bacterias Gram-negativas detectan y responden a AHLs, estos presentan un tamaño promedio de entre 200 y 300 aminoácidos aproximadamente (Rajput y Kumar, 2017; Whitehead et al., 2001) y comparten dos regiones estructurales conservadas (González y Marketon, 2003), un dominio de unión al autoinductor (ABD) en la región N-terminal (Shadel et al., 1990; Slock et al., 1990), y un dominio de unión a DNA con un motivo hélice-giro-hélice (HTH), en la región C-terminal (Choi y Greenberg, 1991, 1992; Fuqua et al., 1994). El modelo actual muestra que LuxR actúa como una proteína dimérica (De Silva et al., 2007; Kim et al., 2010).

La unión de una AHL afín al dominio de unión al autoinductor (ABD) en las proteínas LuxR, resulta en un cambio conformacional que modifica su capacidad para unirse al DNA en la región del promotor en secuencias conservadas llamadas cajas *lux*, (Devine, et al., 1989; Stevens y Greenberg, 1997), que contienen secuencias invertidas repetidas de 18 a 22 pares de base (pb) (Fuqua et al., 1996). La unión de LuxR a la caja *lux* favorece el reclutamiento de la RNA polimerasa, para activar o reprimir la transcripción de sus genes blanco en el DNA (Fuqua et al., 2001; González y Keshavan, 2006; Ng y Bassler, 2009)

Las proteínas LuxR comparten nueve residuos de aminoácidos altamente conservados (Whitehead et al., 2001; Zhang et al., 2002), seis son hidrofóbicos o aromáticos y forman parte de la cavidad del dominio de unión al autoinductor y los tres residuos restantes están en el dominio de unión a DNA en el motivo hélice-giro-hélice (HTH) (Zhang et al., 2002). La familia de proteínas LuxR son una fuente de adaptabilidad y flexibilidad en los sistemas de percepción de quorum debido a que pueden responder a diferentes tipos de AHLs o de moléculas señal. En particular, la especificidad de la señal puede ser alterada por cambios específicos en algunos residuos de aminoácidos de los receptores LuxR (Lintz et al., 2011).

1.6. Proteínas reguladoras LuxR solos

El análisis de diferentes genomas de proteobacteria, ha descubierto la amplia presencia de reguladores LuxR que se encuentran sin el homólogo correspondiente LuxI,

estos se conocen como LuxR huérfanos o solos (Fuqua, 2006; Case et al., 2008; Patankar y González, 2009). Estos reguladores transcripcionales, presentan la misma organización de dominios y estructura modular como la de las proteínas canónicas LuxR (Bez et al., 2021). *Stenotrophomonas maltophilia* codifica el regulador transcripcional SmoR, un homólogo LuxR no asociado a LuxI que une una molécula de oxo-C8-homoserina lactona producida por *Pseudomonas aeruginosa*. SmoR regula la transcripción de su operón y promueve la motilidad *swarming* en *S. maltophilia* (Martínez et al., 2015).

Las proteínas LuxR solos se han implicado en la señalización inter-reinos, respondiendo a las señales producidas por eucariotes (Venturi y Fuqua, 2013; Kan et al., 2017). Una subfamilia de estas proteínas, se encuentra presente exclusivamente en bacterias asociadas a plantas (PAB), y responde a compuestos de bajo peso molecular de origen vegetal (González et al., 2013; González y Venturi, 2013; Venturi y Fuqua, 2013). Estructuralmente, los miembros de esta subfamilia son muy similares a las proteínas canónicas LuxR, pero difieren en uno o dos, de los seis residuos de aminoácidos aromáticos o hidrofóbicos altamente conservados en el dominio de unión al autoinductor, que se han reportado como importantes para la unión de la molécula señal (González y Venturi, 2013). Las proteínas LuxR-PAB están presentes en bacterias fitopatógenas como XccR de *Xanthomonas campestris* (Zhang et al., 2007), u OryR de *Xanthomonas oryzae* (Ferluga y Venturi, 2009) y, en bacterias benéficas de plantas, tales como, PipR de *Pseudomonas* sp. GM79 (Coutinho et al., 2018) y PsrR de *Kosakonia* sp. KO348 (Mosquito et al., 2020).

Otras proteínas LuxR solos, responden a moléculas autoinductoras endógenas, diferentes de AHLs, como PluR presente en *Photorhabdus luminescens*, que responde a α -pironas producidas por su síntasa PpyS, mientras que, PauR del patógeno de humanos *Photorhabdus asymbiotica* percibe diacilresorcinoles y ciclohexanedionas producidas por la bacteria (Brachmann et al., 2013; Brameyer et al., 2014, 2015).

Se sugieren dos mecanismos reguladores para la percepción de quorum por proteínas LuxR solos. En un caso (**Figura 5A**), la proteína LuxR solo responde a AHLs que pueden ser producidas por un circuito de percepción de quorum (LuxI/LuxR) dentro de la misma célula o del exterior, de bacterias a su alrededor, para la regulación transcripcional de sus

genes blanco. En otro caso (**Figura 5B**), la proteína LuxR solo responde a una señal externa, la cual, no necesariamente es una molécula tipo AHL (Hudaiberdiev et al., 2015).

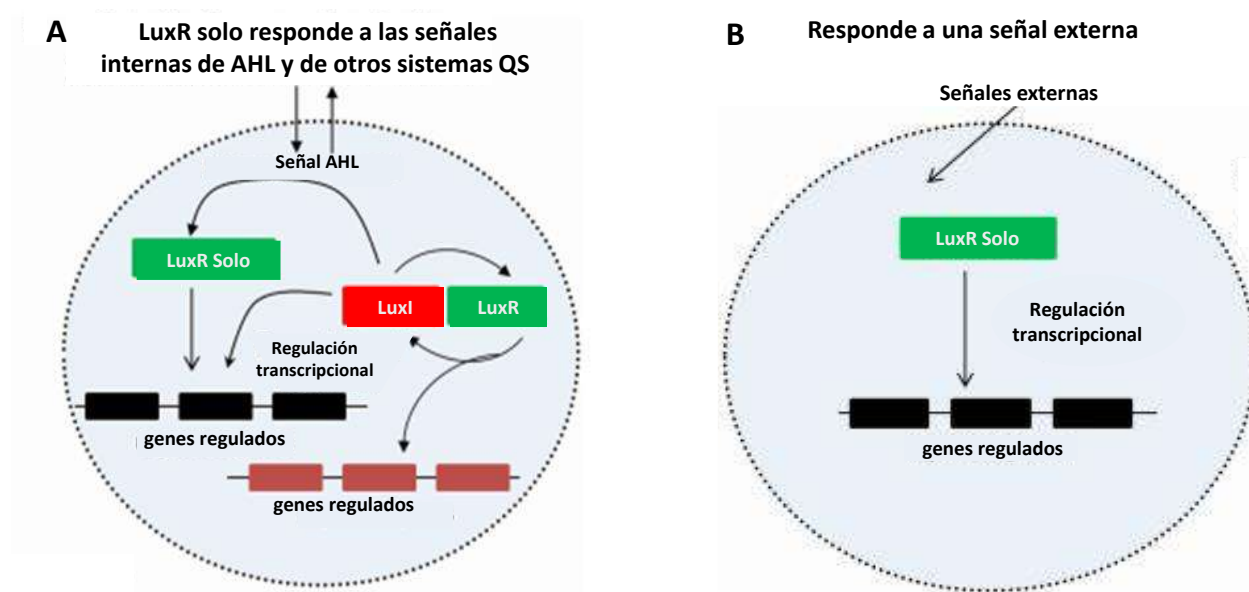


Figura 5. Mecanismo regulador por proteínas LuxR solo. **A)** LuxR solo responde a las señales producidas (AHLs) por sintasas LuxI internas o de bacterias vecinas. **B)** LuxR solo responde a una señal externa (Modificada de Hudaiberdiev et al., 2015).

Aunque los sistemas LuxI/LuxR están mínimamente presentes en bacterias Gram-positivas, los genes *luxR* solos son frecuentemente encontrados en este grupo de bacterias (Rajput y Kumar, 2017).

1.7. Percepción de quorum en bacterias Gram-positivas

Las bacterias Gram-positivas utilizan principalmente oligopéptidos modificados como autoinductores para la regulación de genes por QS. Los oligopéptidos no difunden a través de la membrana plasmática, por lo que, para su liberación requieren de transportadores especializados donde, generalmente, el proceso de transporte está asociado a escisiones o modificaciones como la ciclización del péptido (Rutherford y Bassler, 2012; Monnet y Gardan, 2015; Hawver et al., 2016; Aframian y Eldar, 2020).

1.7.1. Oligopéptidos autoinductores de QS en bacterias Gram-positivas

Existen cuatro clases de péptidos autoinductores llamados PapR en el género *Bacillus* (**Figura 6A**), los cuales presentan variaciones principalmente en los primeros y últimos residuos de heptapéptidos, dando lugar a la especificidad de los ligandos (Slamti y Lereclus, 2002, 2005). Por otro lado, se conocen cuatro diferentes clases de estructuras de péptidos autoinductores (AIP) en *Staphylococcus aureus*. Su longitud varía de entre 7 aminoácidos (AgrD-III) y ocho aminoácidos (AgrD-I y AgrD-IV), a 9 aminoácidos (AgrD-II), y contienen un anillo tiolactona de 5 miembros, entre el extremo C-terminal y un residuo de cisteína (Cys) conservado (**Figura 6B**) (Novick, 2003; Thoendel et al., 2011; Jarraud et al., 2000).

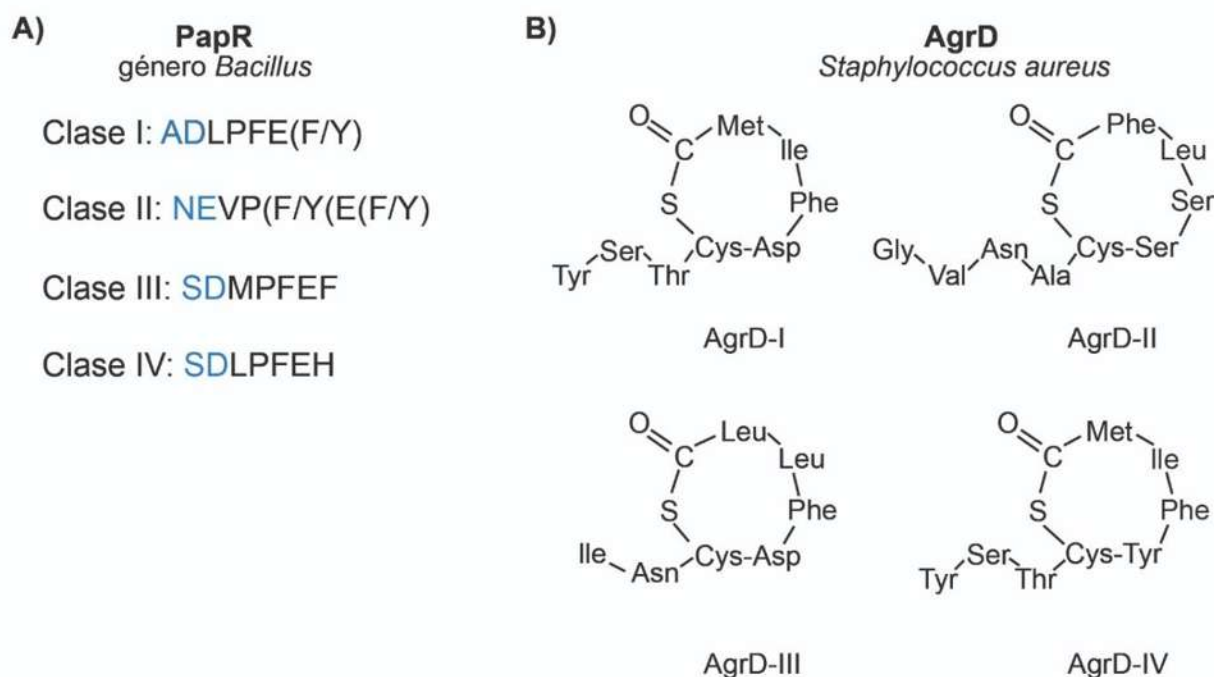


Figura 6. Estructura de oligopéptidos autoinductores en bacterias Gram-positivas. A) Pequeños péptidos autoinductores llamados PapR producidos por el género *Bacillus*. La región predicha, fisiológicamente importante de los heptapéptidos, se indica mediante residuos adicionales en azul. **B)** Cuatro variantes de los oligopéptidos AgrD producidos por *Staphylococcus aureus* (Modificada de Hawver et al., 2016).

Se producen y detectan oligopéptidos cortos, pero en la mayoría de los casos, la molécula señal se sintetiza como un péptido precursor más largo, el cual posteriormente, es modificado y liberado por un transportador específico al ambiente extracelular, donde la señal se acumula por un incremento en la población bacteriana y entonces son detectados por un receptor transmembrana. La detección del autoinductor dispara una cascada de señalización, a través de la fosforilación/defosforilación sucesiva de la proteína sensora transmembrana (histidina cinasa) y una proteína que actúa como regulador transcripcional, de un sistema de dos componentes, que interactúa con el DNA regulando la expresión de genes y controlando la respuesta QS (**Figura 7A y 7B**) (Lyon y Novick, 2004; Dufour y Lévesque, 2013; Monnet et al., 2014).

Algunos ejemplos de sistemas QS en bacterias Gram-positivas que se basan en la percepción de oligopéptidos autoinductores son, ComD/ComE de *Streptococcus pneumoniae* que controla el desarrollo de la competencia celular (Pestova et al., 1996). ComP/ComA de *B. subtilis* que participan en la inducción de competencia celular y en el desarrollo de los mecanismos para la formación de esporas de resistencia (Magnuson et al., 1994), y AgrC/AgrA de *S. aureus* que controla la patogénesis (Ji et al., 1995). Además, el QS controla la producción de factores de virulencia en diferentes patógenos Gram-positivos de humanos incluyendo, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis* y *Clostridium perfringens* (Autret et al., 2003; Podbielski y Kreikemeyer 2004; Ohtani et al., 2009; Riedel et al., 2009; Thoendel et al., 2011). El sistema mejor estudiado en este grupo de patógenos es el Agr de *S. aureus*, que se ha establecido como el paradigma para la comprensión de la traducción de señales en sistemas de percepción de quorum inducidos por oligopéptidos (Ng y Bassler, 2009).

1.7.2. Percepción de quorum en *Staphylococcus aureus*

S. aureus es un patógeno oportunista que ha desarrollado una compleja red regulatoria para controlar su virulencia, por lo que, su capacidad para causar una enfermedad depende de la expresión de un conjunto de moléculas, incluidas adhesinas de la superficie celular, toxinas y enzimas extracelulares (Jenul y Horswill, 2018). Sus principales sitios de colonización son la piel y las mucosas y, aproximadamente el 30%

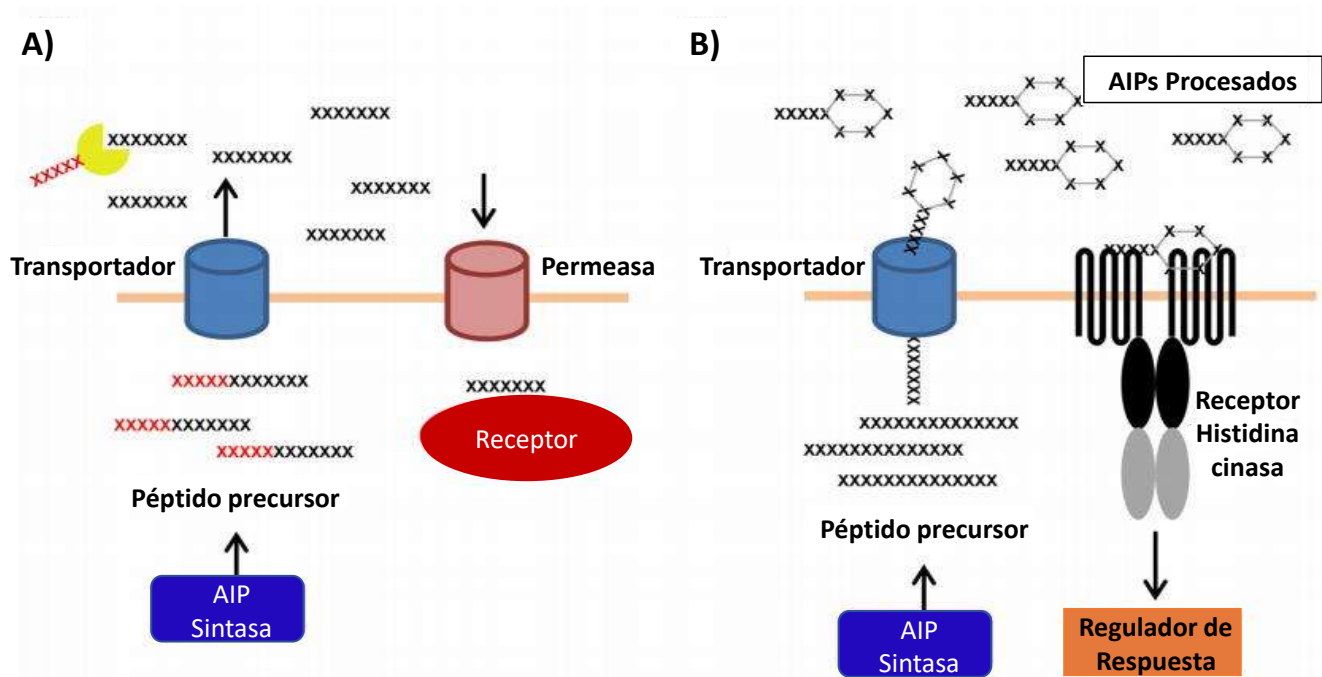


Figura 7. Sistemas principales de percepción de quorum en bacterias Gram-positivas. A)

Sistema QS de un componente. Los péptidos autoinductores (AIP) son producidos por la sintasa AIP y entonces liberados en el ambiente extracelular a través de un transportador, donde se lleva a cabo proteólisis de los autoinductores y son entonces transportados de nuevo al citoplasma a través de una permeasa. En el citoplasma, los péptidos autoinductores modificados son detectados por un receptor de QS que actúa como un regulador transcripcional. **B)** Sistema QS de dos componentes. Los péptidos autoinductores (AIP) son producidos por la sintasa AIP y liberados en el ambiente extracelular a través de un transportador, donde estos sufren modificaciones post-traduccionales y son entonces detectados por un receptor transmembrana. La detección del autoinductor dispara una cascada de fosforilación que controla la respuesta QS (Modificada de Hawver et al., 2016).

de la población adulta sana está colonizada por *S. aureus* (Wertheim et al., 2005), y aunque es principalmente un microorganismo comensal benigno humano, tiene el potencial de causar una amplia variedad de enfermedades, convirtiéndose en patógeno mortal al penetrar los tejidos del hospedero (Tenover y Gaynes, 2000).

La percepción de quorum regula la expresión de genes que codifican los factores de virulencia en esta bacteria (Rutherford y Bassler, 2012), la cual presenta una estrategia bifásica para causar la enfermedad (Waters y Bassler, 2005). Cuando se encuentra a baja densidad celular, la bacteria expresa factores proteicos que le permiten adherirse y colonizar superficies, mientras que, a alta densidad celular, la síntesis de estos factores se reprime e inicia la producción de toxinas y proteasas que son probablemente requeridos para la diseminación (Lyon y Novick, 2004).

1.7.3. El sistema Agr de percepción de quorum en *Staphylococcus aureus*

El control en la expresión de genes a diferente densidad celular en *S. aureus*, está regulado por un sistema accesorio de dos componentes, Agr (**A**ccesory **g**ene **r**egulator), como circuito de QS principal (Waters y Bassler, 2005; Jenul y Horswill, 2018), que la bacteria utiliza para adaptarse a las condiciones ambientales cambiantes durante el crecimiento y para regular su virulencia (Recsei et al., 1986; Dunman et al., 2001; Thoendel et al., 2011). Este sistema Agr está conservado entre estafilococos (Hawver, 2016).

El sistema *agr* consiste en dos transcritos adyacentes llamados, RNAII y RNAPIII, cuya expresión es dirigida por los promotores P2 y P3, respectivamente (Peng et al., 1988). El RNAII es transcrito de un operón de cuatro genes, *agrBDCA*, que codifica la maquinaria del sistema de percepción de quorum, y el transcrito RNAPIII, es el efector principal, que regula la expresión de la mayoría de los genes blanco dependientes de *agr* y también del gen de la delta-hemolisina o toxina delta (*hld*) (Novick et al., 1993). Como se muestra en la **Figura 8**, AgrD es el péptido precursor ribosomal del péptido autoinductor (AIP) (Ji et al., 1995), y es proteolíticamente procesado por AgrB, una peptidasa integral de membrana (Thoendel y Horswill, 2009; 2013). La escisión de AgrD mediada por AgrB da como resultado la formación de un intermediario tiolactona (Thoendel and Horswill, 2009; 2010; 2013), y a través de un mecanismo que no es claro todavía, esta estructura se

transporta a través de la membrana. La peptidasa señal tipo I SpsB, realiza el paso de procesamiento final para liberar el péptido autoinductor (AIP) en el ambiente extracelular (Kavanaugh et al., 2007). Una vez fuera de la célula, AIP es detectado entonces por AgrC, la proteína sensora histidina cinasa unida a la membrana de un sistema de dos componentes. La unión de AIP al receptor AgrC conduce a su autofosforilación en un residuo de histidina (Lina et al., 1998), y esta señal se transmite a un residuo de aspartato en la proteína reguladora de respuesta AgrA (Novick et al., 1995). AgrA fosforilado puede entonces unirse a los promotores P2 y P3, para llevar a cabo la expresión del RNAII y RNAPIII, respectivamente (**Figura 8**) (Koenig et al., 2004).

La expresión del RNAPIII, que codifica para todos los componentes del sistema *agr*, conduce a un ciclo de retroalimentación positiva. Esta regulación autocatalítica es una característica de los sistemas de percepción de quorum y permite que cuando *S. aureus* se encuentra a bajas concentraciones, exprese factores proteicos que le permiten adherirse y colonizar superficies, sin embargo, a elevadas concentraciones celulares la síntesis de estos factores se reprime y comienza a secretar factores de virulencia, aunque el crecimiento disminuya (Novick et al., 1995).

Por otro lado, se descubrió que AgrA también regula la expresión de los genes de las Modulinas Solubles en Fenol (PSMs: *Phenol Soluble Modulins*), un grupo nuevo de toxinas, que han recibido atención considerable en los últimos años por su participación en la virulencia de *S. aureus* (**Figura 8**) (Wang et al., 2007; Peschel y Otto, 2013; Cheung et al., 2014).

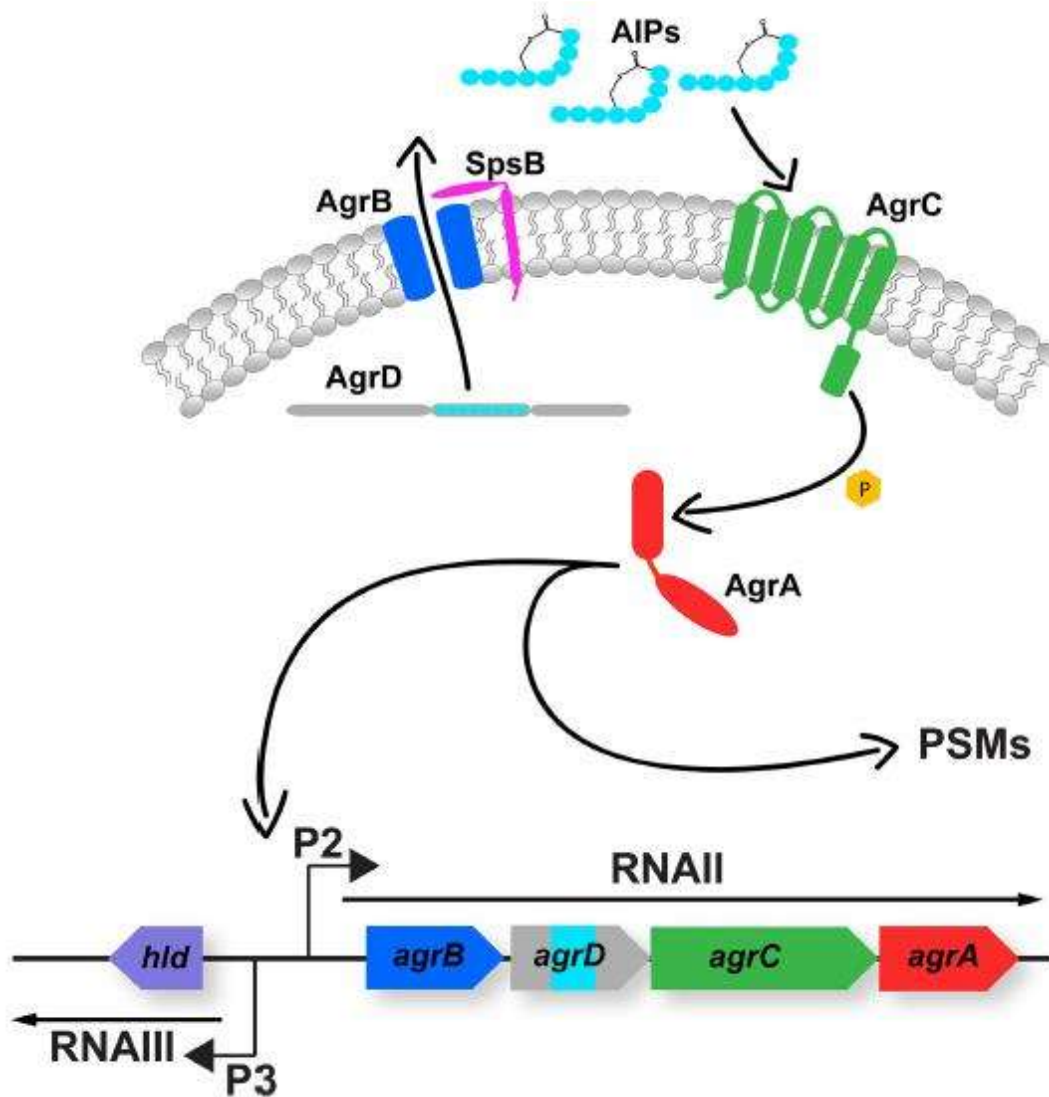


Figura 8. Organización molecular del sistema *agr* de percepción de quorum de *Staphylococcus aureus*. La señal del péptido autoinductor (AIP) (en azul) está codificada dentro de AgrD, el cual, es procesado y transportado al medio ambiente por AgrB, con la ayuda de la peptidasa señal SpsB. Cuando la concentración extracelular del AIP alcanza una concentración umbral, la histidina cinasa AgrC detecta la señal, y se autofosforila. Luego, el fosfato se transmite a AgrA, que entonces puede unirse a los promotores P2 y P3, permitiendo la transcripción de los ARNII y RNAlII, respectivamente. La transcripción de ARNII contiene el operón *agrBDCA*, que codifica la maquinaria primaria de percepción de quorum para la biosíntesis y detección del AIP. El RNAlII es la molécula efectora principal del sistema *agr* y permite la expresión río abajo de sus genes blanco. AgrA fosforilado también regula la expresión de los genes de las modulinas solubles en fenol (PSMs) (Modificada de Jenul y Horswill, 2018).

1.8. Clasificación de los sistemas de percepción de quorum

Utilizando como base las diferentes moléculas autoinductoras, se puede establecer una clasificación de los distintos sistemas bacterianos de percepción de quorum. Esta clasificación tiene en cuenta tanto la composición química, como el número y las posibles interacciones que se establezcan entre las distintas moléculas autoinductoras (Waters y Bassler, 2005; Díaz y de la Sen, 2010; Hawver, 2016).

Así, esta clasificación permite diferenciar entre sistemas sencillos, regulados por una única molécula autoinductora y sistemas complejos donde existe más de un autoinductor, con una composición química que puede ser heterogénea (**Figura 9**). De la misma forma, los autoinductores de los sistemas complejos pueden tener efectos sinérgicos o antagónicos sobre la ruta que regulan (Waters y Bassler, 2005; Marquina y Santos, 2010; Hawver, 2016).

1.8.1. Sistemas de percepción de quorum con un autoinductor

Son los sistemas más sencillos y los primeros que se empezaron a estudiar. Dentro de estos, los más representativos son los modelos descritos para la bacteria Gram negativa, *Aliivibrio fischeri* y para la bacteria Gram-positiva, *Staphylococcus aureus* (Díaz y de la Sen, 2010).

1.8.2. Sistemas de percepción de quorum con dos o más autoinductores

En general, los sistemas bacterianos regulados por QS son mucho más complejos que los anteriormente descritos, y tienen dos o más moléculas autoinductoras. Así, dentro de estos sistemas podemos encontrar dos tipos, en función de la forma en que actúan los autoinductores: **sistemas cooperativos y sistemas competitivos**. Dentro de los **sistemas cooperativos** se encuentran los **circuitos en paralelo**, son aquellos en los que las moléculas autoinductoras se producen a la vez y tienen un efecto positivo sinérgico sobre el sistema que regulan (**Figura 9**). Ejemplo de estos, es el del sistema que regula la bioluminiscencia en *V. harveyi* (Díaz y de la Sen, 2010).

Mientras que, los **circuitos en serie** son aquellos en los que las moléculas autoinductoras se producen secuencialmente ejerciendo un efecto beneficioso sobre el

sistema que regulan. Un ejemplo es el de la regulación de la inducción de la patogenicidad en *P. aeruginosa* (Díaz y de la Sen, 2010).

Los **sistemas competitivos o jerárquicos**, son aquellos en los que la acción de las moléculas autoinductoras tiene efectos antagónicos sobre el proceso en el que actúan. Generalmente, estos sistemas regulan rutas alternativas en los microorganismos, es decir, el desarrollo de una vía implica la inhibición de la otra (**Figura 9**). Es el caso de la regulación del ciclo de esporulación/competencia celular en *B. subtilis* (Díaz y de la Sen, 2010).

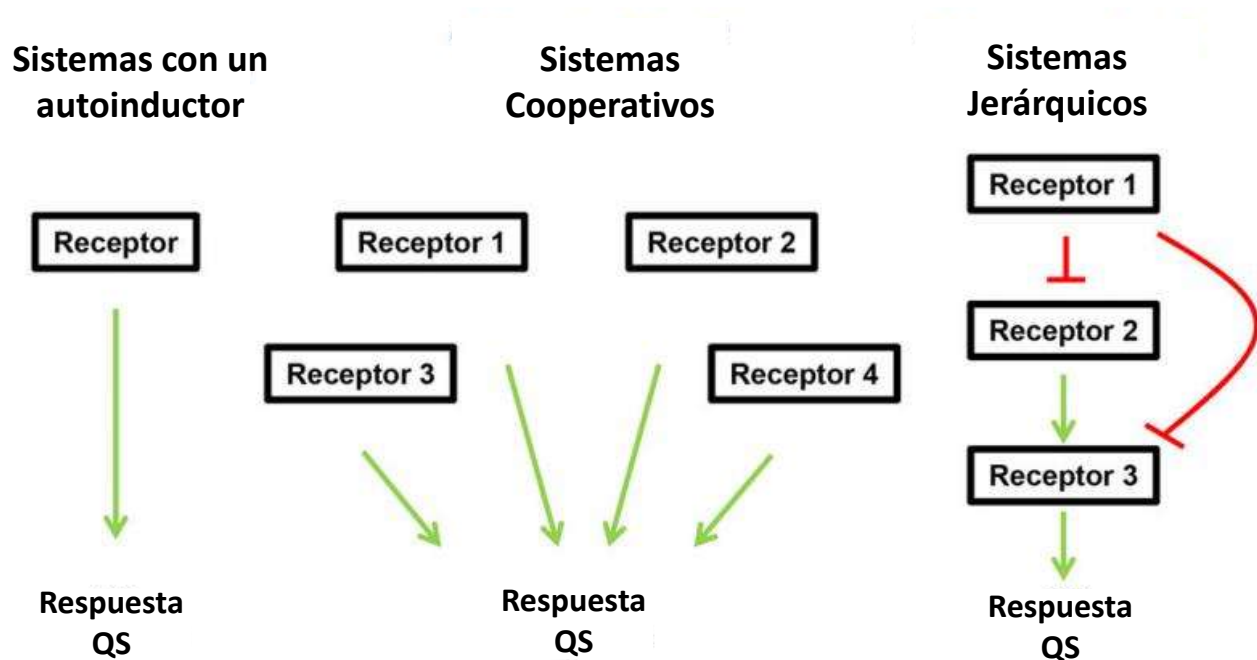


Figura 9. Clasificación de los sistemas de percepción de quorum. En los sistemas con un autoinductor, un solo receptor controla la respuesta completa de QS. En un circuito paralelo, la información contenida en múltiples autoinductores se integra junta para controlar la respuesta QS. En un sistema jerárquico, varios receptores de QS están conectados en una cascada de señalización en la cual, la actividad de un receptor río abajo es controlada por un receptor río arriba. Las flechas y las barras-T, denotan patrones hipotéticos de activación y represión, respectivamente (Modificada de Hawver, 2016).

1.9. Compuestos orgánicos volátiles (COVs)

Se ha reportado que muchos metabolitos secundarios están involucrados en interacciones microbianas. Un grupo de metabolitos secundarios producidos por microorganismos del suelo y asociados a plantas, son los compuestos orgánicos volátiles o VOCs (Volatile Organic Compounds). Son típicamente compuestos que contienen carbono, poseen baja masa molecular (<300 Da), alta presión de vapor, bajo punto de ebullición y una fracción lipofílica (Schulz-Bohm et al., 2017). Estas propiedades facilitan la evaporación y la difusión a temperatura ambiente de los COVs, a través de los poros con gas y agua del suelo y ambientes rizosféricos (Vespermann et al., 2007; Insam y Seewald, 2010; Effmert et al., 2012).

Los compuestos orgánicos volátiles microbianos (COVm) pertenecen a diferentes clases químicas, incluidos alquenos, alcoholes, cetonas, bencenoides, pirazinas, sulfuros y terpenos (Schulz y Dickschat, 2007; Lemfack et al., 2014, 2017; Kanchiswamy et al., 2015; Schmidt et al., 2015). La producción de estos volátiles en suelo está influenciada por varios factores, incluyendo la etapa de crecimiento de los microorganismos, la disponibilidad de nutrientes, la temperatura, la disponibilidad de oxígeno, el pH y el contenido de humedad en el suelo (Wheatley, 2002; Insam y Seewald, 2010). Estudios recientes han reportado que la producción de ciertos COVm pueden ser inducidos o suprimidos durante interacciones microbianas inter-específicas (Garbeva et al., 2014a; Schulz-Bohm et al., 2015; Tyc et al., 2015; Piechulla et al., 2017).

Las funciones ecológicas de los volátiles bacterianos no son comprendidas en detalle, pero se han sugerido diversas funciones como comunicación, defensa y la promoción del crecimiento de las plantas (Kai et al., 2009).

Dentro de estos, los compuestos orgánicos volátiles producidos por bacterias, pueden actuar como moléculas señal, participando en procesos que son frecuentemente regulados por QS (Schulz-Bohm et al., 2017; Xie et al., 2018). La resistencia a antibióticos, virulencia y motilidad son ejemplos de comportamientos regulados por VOCs bacterianos. El mecanismo involucrado en la comunicación mediada por VOCs y la regulación de estos comportamientos son en gran parte desconocidos (Kim et al., 2013; Enkataraman et al., 2014; Mansurova et al., 2018). La participación de reguladores transcripcionales LuxR no está descartada.

II. ANTECEDENTES

Arthrobacter sp. UMCV2, es una Actinobacteria y, por lo tanto, un organismo Gram-positivo, el cual fue aislado de la rizósfera de maíz (*Zea mays* L.) (Valencia-Cantero et al., 2007). Esta cepa de *Arthrobacter* promueve el crecimiento vegetal a través de la emisión de compuestos orgánicos volátiles (COVs), predominantemente *N*, *N*-dimetilhexadecilamina (DMHDA) (Velázquez-Becerra et al., 2011). La DMHDA emitida por *Arthrobacter* sp. UMCV2, se acumula en el medio extracelular y modula su propio crecimiento y motilidad en enjambre o *swarming* (tipo de desplazamiento coordinado bacteriano sobre una superficie semi-sólida, impulsado por flagelo), así como el de otras bacterias (Velázquez-Becerra et al., 2013; Martínez-Cámara et al., 2020)

Martínez-Cámara et al., en el 2020 estudió el efecto del compuesto orgánico volátil DMHDA producido por la Actinobacteria, sobre su propio crecimiento, encontrando que el compuesto afectó de una manera dependiente de la concentración el crecimiento de UMCV2, que va desde la estimulación a bajas concentraciones (1.5 μ M) hasta casi la total inhibición del 92 y 99 % a altas concentraciones (6 y 12 μ M), donde aún, una considerable proporción de células permanecieron viables (40%) (**Figura 10 A y B**). El ensayo para determinar la viabilidad celular se basa en la reducción metabólica del compuesto MTT (sal de tetrazolio) para formar el compuesto formazán, por la enzima succinato deshidrogenasa de cadena respiratoria, midiendo la absorbencia a 570 nm. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad del compuesto reducido (Vázquez-Rivera et al., 2015).

El genoma de *Arthrobacter* se ha secuenciado y muestra la presencia de genes con secuencias homólogas a genes *luxR* solos, que podrían codificar para probables moduladores de la respuesta de la bacteria a moléculas de QS para su adaptación al medio ambiente.

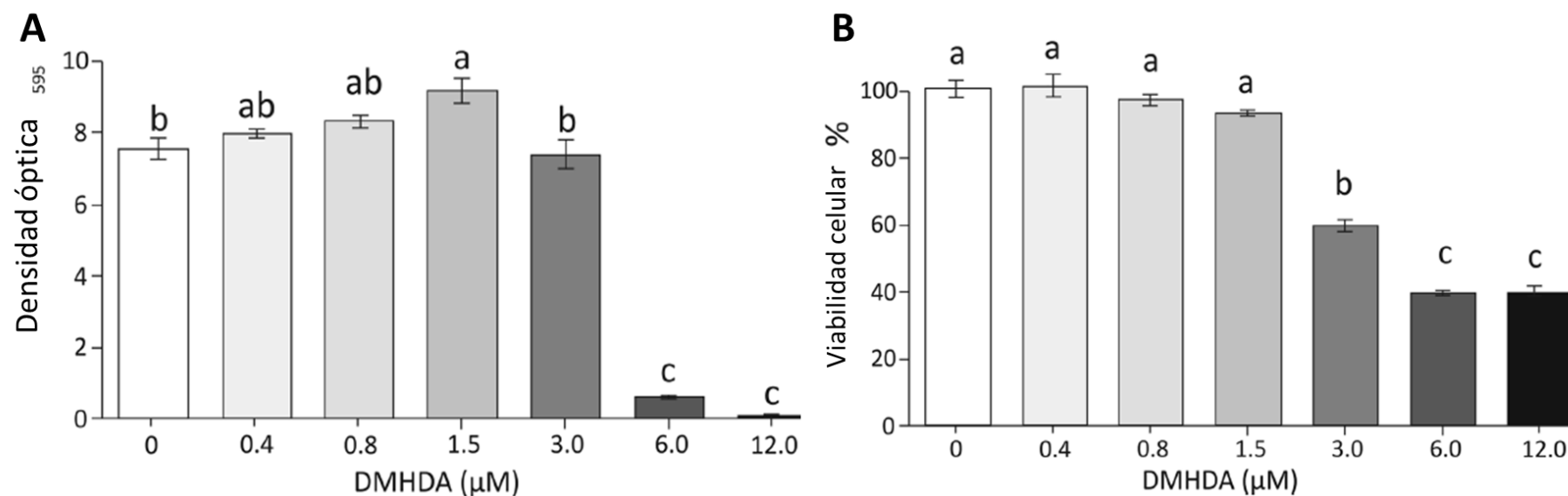


Figura 10. Efecto de la dimetilhexadecilamina (DMHDA) sobre el crecimiento y viabilidad celular de *Arthrobacter* sp. UMCV2.

A Placas de Agar Nutritivo se prepararon con concentraciones crecientes de DMHDA y se inocularon con la bacteria. Después de 72 h de cultivo, la bacteria se colectó cuidadosamente, se diluyó en 5 ml de agua desionizada y se determinó la absorbencia a 595 nm.

B Las bacterias fueron cultivadas por 72 h en caldo nutritivo preparado con las mismas concentraciones de DMHDA. Las células fueron entonces colectadas y se determinó la viabilidad usando el método de MTT. Barras y las barras de error representan la media $\pm$ y valores de error estándar, respectivamente, para tres réplicas biológicas. Las letras indican las medias que difieren significativamente, siguiendo una prueba de rango múltiple de Duncan ($p < 0.05$).

III. JUSTIFICACIÓN

La percepción de quorum (QS) es un mecanismo de regulación genética, dependiente de la densidad celular para la comunicación célula-célula en bacterias. Los reguladores transcripcionales LuxR solos, (que no están asociados a un homólogo LuxI) son moléculas clave de señalización química para la comunicación intercelular. *Arthrobacter* sp. UMCV2 es una Actinobacteria rizosférica, promotora del crecimiento vegetal, cuyo genoma se ha secuenciado y muestra la presencia de secuencias homólogas a genes *luxR* solos. Analizar el funcionamiento de los genes de tipo *luxR* de *Arthrobacter* sp. UMCV2, permitirá también mejorar el entendimiento de las capacidades de las actinobacterias rizosféricas para percibir y responder a moléculas de comunicación célula-célula como mecanismos de adaptación a su medio ambiente.

IV. HIPÓTESIS

Arthrobacter sp. UMCV2 posee un sistema de reguladores transcripcionales relacionados a LuxR solos que son inducidos por su compuesto *N*, *N*-dimetilhexadecilamina (DMHDA).

V. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la funcionalidad del sistema de reguladores transcripcionales LuxR solos de *Arthrobacter* sp. UMCV2 como moduladores de la respuesta de la bacteria a su compuesto *N*, *N*-dimetilhexadecilamina (DMHDA).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Identificar, analizar y clasificar los genes *luxR* solos presentes en el genoma de *Arthrobacter* sp. UMCV2.
- 2.- Demostrar la expresión de los genes relacionados a *luxR* solos de *Arthrobacter* sp. UMCV2 en presencia de su compuesto DMHDA.
- 3.- Determinar la capacidad de los reguladores transcripcionales LuxR solos de *Arthrobacter* sp. UMCV2 para modular la respuesta a quorum de la bacteria.

VI. RESULTADOS

Los resultados obtenidos durante el presente trabajo se encuentran divididos en dos capítulos.

El capítulo 1 corresponde a un artículo publicado recientemente en la revista *Frontiers in Microbiology*, (<https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1040932>), titulado “Comparative genomic and functional analysis of *Arthrobacter* sp. UMCV2 reveals the presence of *luxR*-related genes inducible by the biocompound *N*, *N*-dimethylhexadecylamine”, donde participo como primer autor. En este estudio, se realizó un análisis bioinformático del genoma de *Arthrobacter*, y se identificaron 16 genes relacionados a *luxR*, pero no se descubrieron homólogos *luxI*. Once de estas secuencias poseen dominios de unión a DNA característicos de reguladores transcripcionales LuxR, y fueron designados como reguladores relacionados con autoinductores (AirR). Cuatro secuencias poseían dominios análogos LuxR y fueron designados como reguladores análogos con autoinductores (AiaR). Cuando la motilidad *swarming* fue inducida con DMHDA, ocho genes *airR* y dos genes *aiaR* incrementaron su expresión, indicando que los genes relacionados con *luxR* de *Arthrobacter* sp. UMCV2, son inducidos por la acción del biocompuesto bacteriano DMHDA cuando se produce el comportamiento QS.

En el capítulo 2, se presenta el trabajo inicial realizado para la obtención de la transformación genética por el método de electroporación de *Arthrobacter* sp. UMCV2 utilizando los plásmidos pART2 y pART3, por ser un requisito previo para la realización de estudios genéticos, como es la generación de cepas mutantes que permitirán determinar la regulación de los genes relacionados a *luxR* solos, para modular la respuesta a quorum de la bacteria.

Capítulo 1.



OPEN ACCESS

EDITED BY

Manoj Kumar Solanki,
University of Silesia in Katowice,
Poland

REVIEWED BY

Biprakash Kumar Tiwary,
North Bengal St. Xavier's College, India
Anton Hartmann,
Ludwig Maximilian University
of Munich, Germany

*CORRESPONDENCE

Eduardo Valencia-Cantero
eduardo.cantero@umich.mx

SPECIALTY SECTION

This article was submitted to
Microbe and Virus Interactions with
Plants,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

RECEIVED 09 September 2022

ACCEPTED 10 October 2022

PUBLISHED 31 October 2022

CITATION

Chávez-Moctezuma MP,
Martínez-Cámara R,
Hernández-Salmerón J,
Moreno-Hagelsieb G, Santoyo G and
Valencia-Cantero E (2022)
Comparative genomic and functional
analysis of *Arthrobacter* sp. UMCV2
reveals the presence of *luxR*-related
genes inducible by the biocompound
N, *N*-dimethylhexadecylamine.
Front. Microbiol. 13:1040932.
doi: 10.3389/fmicb.2022.1040932

COPYRIGHT

© 2022 Chávez-Moctezuma,
Martínez-Cámara,
Hernández-Salmerón,
Moreno-Hagelsieb, Santoyo and
Valencia-Cantero. This is an
open-access article distributed under
the terms of the [Creative Commons
Attribution License \(CC BY\)](#). The use,
distribution or reproduction in other
forums is permitted, provided the
original author(s) and the copyright
owner(s) are credited and that the
original publication in this journal is
cited, in accordance with accepted
academic practice. No use, distribution
or reproduction is permitted which
does not comply with these terms.

Comparative genomic and functional analysis of *Arthrobacter* sp. UMCV2 reveals the presence of *luxR*-related genes inducible by the biocompound *N*, *N*-dimethylhexadecylamine

Martha Patricia Chávez-Moctezuma¹,
Ramiro Martínez-Cámara^{1,2}, Julie Hernández-Salmerón³,
Gabriel Moreno-Hagelsieb³, Gustavo Santoyo¹ and
Eduardo Valencia-Cantero^{1*}

¹Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, Mexico, ²Tecnológico Nacional de México, Morelia, Michoacán, Mexico, ³Department of Biology, Wilfrid Laurier University, Waterloo, ON, Canada

Quorum sensing (QS) is a bacterial cell-cell communication system with genetically regulated mechanisms dependent on cell density. Canonical QS systems in gram-negative bacteria possess an autoinducer synthase (LuxI family) and a transcriptional regulator (LuxR family) that respond to an autoinducer molecule. In Gram-positive bacteria, the LuxR transcriptional regulators "solo" (not associated with a LuxI homolog) may play key roles in intracellular communication. *Arthrobacter* sp. UMCV2 is an actinobacterium that promotes plant growth by emitting the volatile organic compound *N*, *N*-dimethylhexadecylamine (DMHDA). This compound induces iron deficiency, defense responses in plants, and swarming motility in *Arthrobacter* sp. UMCV2. In this study, the draft genome of this bacterium was assembled and compared with the genomes of type strains of the *Arthrobacter* genus, finding that it does not belong to any previously described species. Genome explorations also revealed the presence of 16 *luxR*-related genes, but no *luxI* homologs were discovered. Eleven of these sequences possess the LuxR characteristic DNA-binding domain with a helix-turn-helix motif and were designated as auto-inducer-related regulators (AirR). Four sequences possessed LuxR analogous domains and were designated as auto-inducer analogous regulators (AiaR). When swarming motility was induced with DMHDA, eight *airR* genes and two *aiaR* genes were upregulated. These results

indicate that the expression of multiple *luxR*-related genes is induced in actinobacteria, such as *Arthrobacter* sp. UMCV2, by the action of the bacterial biocompound DMHDA when QS behavior is produced.

KEYWORDS

actinobacteria, LuxR solos, domain approach, *airR* genes, *aiaR* genes, swarming motility

Introduction

Quorum sensing (QS) is a bacterial cell-cell communication system based on the production, release, and detection of signal molecules called autoinducers (AI). QS regulates gene expression in response to changes in bacterial population density and produces coordinated behavior, based on environmental conditions (Fuqua et al., 1994; Waters and Bassler, 2005; Papenfort and Bassler, 2016). Cellular functions regulated by QS include bioluminescence, antibiotic synthesis, virulence factor production, biofilm induction, sporulation, and swarming motility (Polkade et al., 2016; Bramhachari et al., 2018).

The *lux* operon, responsible for bioluminescence in the model organism *Vibrio fischeri* (*Aliivibrio fischeri*), is composed of six structural genes (*luxA-E* and *luxG*) and the regulatory genes *luxI* and *luxR* that encode homonym proteins (Fuqua et al., 1996; Miller and Bassler, 2001). *LuxI* is an acyl-synthase of approximately 190 amino acids that uses the acyl carrier protein as a substrate to add the *N*-acyl group to *L*-homoserine lactone derived from *S*-adenosylmethionine and produce acyl-homoserine lactones (AHLs), the main autoinducers in Gram-negative bacteria. In other bacteria, *LuxI* homologs add different *N*-acyl groups to *L*-homoserine lactones to produce different AHLs (Fuqua et al., 1994; Zavilgelsky and Manukhov, 2001). *LuxR* is a transcriptional regulator of approximately 250 amino acids with characteristic modular architecture consisting of an autoinducer binding domain in the N-terminal region (Shadel et al., 1990; Slock et al., 1990) and a DNA-binding domain with a helix-turn-helix (HTH) motif in the C-terminal region (Choi and Greenberg, 1991; Fuqua et al., 1994).

Quorum sensing systems were identified in both Gram-negative and Gram-positive bacteria (Hawver et al., 2016). In Gram-negative bacteria, the more studied QS systems are regulated by members of the AHL family (Swift et al., 1994) which act as diffusible signal molecules, whose synthesis is performed by members of the *LuxI* family. Above a threshold concentration, these molecules bind to members of the transcriptional regulator *LuxR* family (Fuqua et al., 1996). The stable *LuxR*-AHL complex subsequently binds to the *lux box*, a specific regulatory sequence in the promoter region, to activate or suppress the transcription of its target genes (Fuqua et al., 2001).

The analysis of different proteobacterial genomes has revealed the wide presence of homologs of the transcriptional regulator *luxR* without the presence of their corresponding homolog *LuxI*, thus referred to as *luxR* orphans or “solos” (Fuqua, 2006; Case et al., 2008; Patankar and González, 2009). These transcriptional regulators possess the same structural organization as canonical *LuxR* (Bez et al., 2021). *Stenotrophomonas maltophilia* encodes the transcriptional regulator *SmoR*, a non-*LuxI*-associated *LuxR* homolog that binds to oxo-C8-homoserine lactone produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *SmoR* regulates its operon transcription and promotes swarming motility in *S. maltophilia* (Martínez et al., 2015). *LuxR* solo proteins are involved in inter-kingdom signaling, responding to the signals produced by eukaryotes (Venturi and Fuqua, 2013; Kan et al., 2017). A subfamily of *luxR* is present exclusively in plant-associated bacterial (PAB) responses to plant low-molecular weight compounds (González et al., 2013; González and Venturi, 2013; Venturi and Fuqua, 2013). Structurally, PAB-*LuxR* is very similar to canonical *LuxR* but differs in one or two of the aromatic or hydrophobic amino acids normally conserved in the auto-inducer binding domain of canonical *LuxR* proteins (González and Venturi, 2013). PAB-*LuxR* proteins are present in phytopathogenic bacteria as *XccR* of *Xanthomonas campestris* (Zhang et al., 2007), or *OryR* of *Xanthomonas oryzae* (Ferluga and Venturi, 2009) and in plant beneficial bacteria, such as *Pseudomonas* sp. GM79 (Coutinho et al., 2018) and *PsrR* of *Kosakonia* sp. KO348 (Mosquito et al., 2020). Other *LuxR* proteins respond to endogenous molecules other than AHLs and are therefore not associated with *LuxI* synthases. *PluR*, present in *Phototrhobdus luminescens*, responds to α -pyrones produced by the ketosynthase *PpyS*, whereas *PauR* of the human pathogen *Phototrhobdus asymbiotica* senses dialkylresorcinols and cyclohexanediones produced by the bacteria (Brachmann et al., 2013; Brameyer et al., 2014, 2015).

Other molecules, such as volatile organic compounds (VOCs) produced by bacteria, act as signaling molecules regulating processes that are frequently regulated by QS (Schulz-Bohm et al., 2017; Xie et al., 2018). Resistance against antibiotics, virulence, and motility are examples of behaviors regulated by bacterial VOCs. The mechanisms involved in the communication mediated by VOCs and the regulation

of these behaviors are primarily unknown (Kim et al., 2013; Enkataraman et al., 2014; Mansurova et al., 2018). The participation of luxR transcriptional regulators is not discarded.

In gram-positive bacteria, QS systems are usually regulated by auto-inducing peptides (Monnet and Gardan, 2015; Hawver et al., 2016; Aframian and Eldar, 2020), released by specific transporters into the extracellular media, where they are detected by a transmembrane receptor. Autoinducer detection triggers a signaling pathway through the successive phosphorylation/dephosphorylation of a sensing transmembrane histidine kinase and a transcriptional regulator that interacts with DNA and controls the QS response (Lyon and Novick, 2004; Dufour and Lévesque, 2013; Monnet et al., 2014). Although LuxR-LuxI systems are marginally present in Gram-positive bacteria, luxR solo genes are frequently found in that group of bacteria (Rajput and Kumar, 2017).

Arthrobacter sp. UMCV2 is an actinobacterium (Gram-positive) isolated from the *Zea mays* rhizosphere (Valencia-Cantero et al., 2007). This *Arthrobacter* strain promotes plant growth through the emission of VOCs, predominantly *N*, *N*-dimethylhexadecylamine (dimethylhexadecylamine, DMHDA) (Velázquez-Becerra et al., 2011). DMHDA emitted by *Arthrobacter* sp. UMCV2 accumulates in the extracellular medium and modulates the growth and swarming motility of *Arthrobacter* sp. UMCV2 and other bacteria (Velázquez-Becerra et al., 2013; Martínez-Cámara et al., 2020). In this study, we analyzed the *Arthrobacter* sp. UMCV2 genome, identified and classified the *Arthrobacter* sp. UMCV2 luxR-related genes, and demonstrated the upregulation of luxR-related genes by DMHDA when motility-associated genes are induced.

Materials and methods

Biological material

The strain used in this study was *Arthrobacter* sp. UMCV2 (Valencia-Cantero et al., 2007), deposited at the Microorganism Collection of the National Center of Genetic Resources (Boulevard de la Biodiversidad 400, Rancho las Cruces, 47600 Tepatlán de Morelos, Jalisco, México) having accession number CM-CNRG-691. The bacterial strain was routinely cultured on nutrient agar (NA) or nutrient broth (NB) at 22°C.

Chemicals

The chemical compound *N*, *N*-dimethylhexadecylamine (DMHDA) was purchased from Sigma Aldrich (St Louis MO USA, catalog 40460) and dissolved in ethanol. Equal volumes of solvent were used in all the treatments.

Genomic DNA extraction

From a single colony culture, *Arthrobacter* sp. UMCV2 was inoculated into 50 ml of NB at 22°C with agitation at 180 rpm for 2 days. Genomic DNA was extracted from 20 ml of liquid culture using the Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA, catalog A1120), according to the manufacturer's instructions. The quality and quantity of genomic DNA were assessed by agarose gel electrophoresis using a NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA).

Genome sequencing, assembly, annotation, and phylogenetic analysis

The genome of *Arthrobacter* sp. UMCV2 was sequenced at the genomic sequencing facilities of LANGE BIO, Cinvestav-IPN (Irapuato-México), using an Illumina MiSeq platform generating three paired-end libraries, with coverage of 57x, the original data were assembled into 461 contigs or scaffolds using Newbler v2.9 software. To order the contigs, *A. chlorophenolicus* A6 was used as the reference genome. A summary of the project information is presented in [Supplementary Table 1](#). The genome sequence was submitted to the RAST web service (MG-RAST 4.0.3)¹ for automated annotation (Aziz et al., 2008). The sequence was deposited in the GenBank database of the National Center for Technology Information (NCBI)² with accession number (CP024915.1).

A genomic-based phylogenetic tree, a 16S-based phylogenetic tree and digital DNA-DNA hybridization (dDDH) were performed with the assembled genome using the Type Strain Genome Server (TYGS) pipeline (Meier-Kolthoff and Göker, 2019; Meier-Kolthoff et al., 2022).³ Trees were inferred using FastME 2.1.6.1 from Genome BLAST Distance Phylogeny (GBDP), distance formula d5 (Farris, 1972; Meier-Kolthoff et al., 2013; Lefort et al., 2015), comparing the genomes of *Arthrobacter* sp. UMCV2, with type strains deposited in the DSMZ database.

In silico analysis of *Arthrobacter* sp. UMCV2 luxR-related genes

In addition to NCBI gene notation, a complementary search for luxR and corresponding LuxI homologous genes was performed with RAST MG-RAST 4.0.3 (see above) and

1 <https://www.mg-rast.org>

2 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>

3 <https://tygs.dsmz.de/>

PATRIC 3.6.12 (Brettin et al., 2015).⁴ Putative *luxR* homologs were analyzed using InterPro v62.0 (Blum et al., 2021).⁵

Phylogenetic and molecular evolutionary analyses were conducted using MEGA version X (Kumar et al., 2018) using the maximum likelihood method and the Jones-Taylor-Thornton (JTT) matrix-based model (Jones et al., 1992). The bootstrap consensus tree inferred from 1,000 replicates was used to represent the evolutionary history of the taxa analyzed (Felsenstein, 1985). Initial trees for the heuristic search were obtained automatically by applying the Neighbor-Join and BioNJ algorithms to a matrix of pairwise distances estimated using the JTT model followed by selecting the topology with a superior log-likelihood value. The analysis involved 44 amino acid sequences. There were 1,098 positions in the final dataset.

Bacterial motility assay

The effect of DMHDA on bacterial motility was tested on NA plates with DMHDA at concentrations of 0, 0.1, 0.2, 3.0, 4.0, 5.0, and 6.0 μ M. Subsequently, 5 μ l of bacterial suspension ($OD_{595} = 1$) was added to each plate center. The swarming motility was assessed following the protocols described by Martínez-Cámara et al. (2020) with a few modifications, such as petri dishes prepared with NB plus 0.5% agar and incubated for 120 h at 23°C. The motility diameter was measured using a digital Vernier caliper (Mitutoyo Corporation, Tokyo Japan, catalog 500-196-30) and the results were reported in centimeters of bacterial extension on the media. Three independent assays, each with four replicates, were performed.

Gene expression analysis

RNA extraction was performed for three biological replicates of *Arthrobacter* sp. UMCV2 from swarming motility, as previously described (Martínez-Cámara et al., 2020). RNA was extracted using TRI reagent (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA, catalog T9424) and treated with DNase I to remove the remaining genomic DNA. The integrity of the RNA was assessed by visualization on 1.2% agarose gel. The final concentration was estimated using NanoDrop (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). cDNA synthesis was performed using 500 ng RNA template and SuperScript First-Strand Synthesis System (Life Technologies/Gibco-BRL CA, USA). Reverse transcription quantitative real-time PCRs (RT-qPCR) were performed on an ABI StepOne™ System thermocycler (Applied Biosystems; Foster City, CA, USA). Oligonucleotides were designed (using the NCBI for Biotechnology Information primer design tool) to amplify *airR1-12* and *aiaR1-4* (Supplementary Table 2).

Oligonucleotides to amplify *fliC*, *flgL*, *fliM*, *motA*, and *recA* have been previously reported (Martínez-Cámara et al., 2020), *recA* was used as the normalizer gene. RT-qPCR analysis was performed using the SYBR-Green kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA, catalog 4385612) and the following protocol: 5 μ l SYBR Green, 1 μ l direct and inverse oligo, 2 μ l cDNA, and 1 μ l water. Samples were run using the following protocol: 95°C for 5 min, 40 cycles of 95°C for 15 s, and 60°C for 1 min. To prepare the melting curve, samples were run at 95°C for 15 s and 60°C for 1 min, and the temperature was subsequently raised to 95°C at a rate of 0.3°C/s. Gene expression was evaluated using the comparative $\Delta\Delta C_t$ method according to Livak and Schmittgen (2001).

Statistical analysis

The results were analyzed using Student's *t*-test or analysis of variance and Duncan's multiple range test for multiple ($p \leq 0.05$).

Results

Genome properties

The *Arthrobacter* sp. UMCV2 assembled genome sequence consists of a single circular chromosome of 3,435,243 bp with a 69.3% of GC content (Figure 1). Automatic gene functional annotation predicted 3,114 genes, consisting of 3,067 protein-coding and 47 RNA genes (Table 1). The gene distribution had representatives of 23 “Clusters of Orthologous Groups” (COGs) functional categories (Supplementary Table 3). The genome size of *Arthrobacter* sp. UMCV2 is similar to the genome size of closed-related type strains of *Arthrobacter* species deposited in the DSMZ database (Supplementary Table 4) that range between 3.17 Gb of *A. echini* and 4.42 Gb of *A. sedimenti*. Genomic-based and 16S-based phylogenetic trees were generated using the complete genome sequences. 16S genes of the closed-related bacterial type strain deposited in the DSMZ database were detected using the pipeline of the SYGS server (Meier-Kolthoff and Göker, 2019). Both phylogenetic trees presented a clear affiliation of the UMCV2 strain with the *Arthrobacter* genus. However, further genomic (Figure 2A) or 16S (Figure 2B) phylogenetic trees did not conclusively supported a taxonomic position at the species level. The 16S-based phylogenetic tree showed clustering of the *Arthrobacter* sp. UMCV2 strain with the bacterial species *A. echini*, *A. bussei*, *A. agilis*, *A. cheniae*, *A. ruber*, and *A. sedimenti*. The genomic-based phylogenetic tree retains the same type of clustering and clearly shows a divergence of the UMCV2 branch from the other *Arthrobacter* species.

⁴ <https://www.patricbrc.org>

⁵ <https://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence>

***Arthrobacter* sp. UMCV2**
3,435,243 bp

69.3% GC content

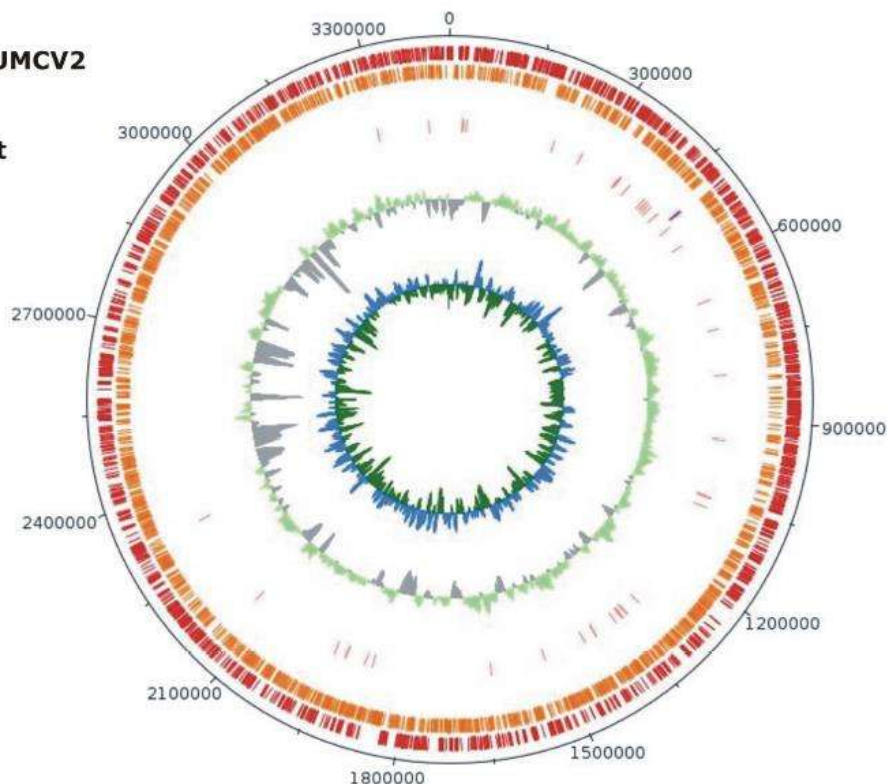


FIGURE 1

Graphical map of the *Arthrobacter* sp. UMCV2. From outside to the center: genes on the forward strand (red), genes on the reverse strand (orange), RNA genes (pink tRNAs, purple rRNAs), the guanine-cytosine (GC) ratio is in light green and gray. The inner circle shows the GC skew in blue and green. Gaps between individual contigs are not presented. The order of the contigs was assumed to correspond to a reference genome. Contigs not matching the reference genome were ordered from the largest to the smallest. Ordered contigs were joined with 50 bp of "N." This figure was drawn with the DNA plotter software.

Relatednesses between the genomes of *Arthrobacter* sp. UMCV2 and closed-related type strains of *Arthrobacter* species were calculated as dDDH percentages. Concordantly with the phylogenetic tree topologies, the highest dDDH values of *Arthrobacter* sp. UMCV2 were produced with cluster members of type strains such as *A. bussei*, *A. agilis*, *A. cheniae*, *A. ruber*, and *A. sedimenti*, ranging from 40.3% (with *A. ruber*) to 36.2%

(with *A. bussei*). Similar dDDH values were produced among type strains of the same cluster ranging from 47% (*A. agilis* to *A. bussei*) to 31.4% (*A. agilis* to *A. sedimenti*) (Table 2). These results strongly suggest that *Arthrobacter* sp. UMCV2 belongs to a species not yet described within the genus *Arthrobacter*.

Identification of characteristic LuxR domains

Analysis of the *Arthrobacter* sp. UMCV2 genome was performed with the MG-RAST and PATRIC servers and 18 putative *luxR* homolog sequences, but no *LuxI* putative homologs were identified. Protein sequences corresponding to the putative *luxR* homologs were examined to identify LuxR-characteristic domains using the InterPro server. *Aliivibrio fischeri* LuxR (Fuqua et al., 1994) and *Pseudomonas* sp. GM79 PipR (Coutinho et al., 2018) were included in the analysis as references for canonical experimentally characterized LuxR proteins, *Streptomyces purpurogeneiscleroticus* NRRL B-2952 LuxR (Rajput and Kumar, 2017) as a canonical

TABLE 1 *Arthrobacter* sp. UMCV2 genome statistics.

Attribute	Value	% of total
Genome size (bp)	3,435,243	100
DNA coding region (bp)	2,735,154	79.62
DNA G + C content (bp)	1,902,572	69.3
DNA scaffolds	461	100
Total genes	3,114	100
Protein coding genes	3,067	98.49
RNA genes	47	1.51
Genes assigned to COGs	1,884	60.50
Genes with Pfam domains	1,930	61.95

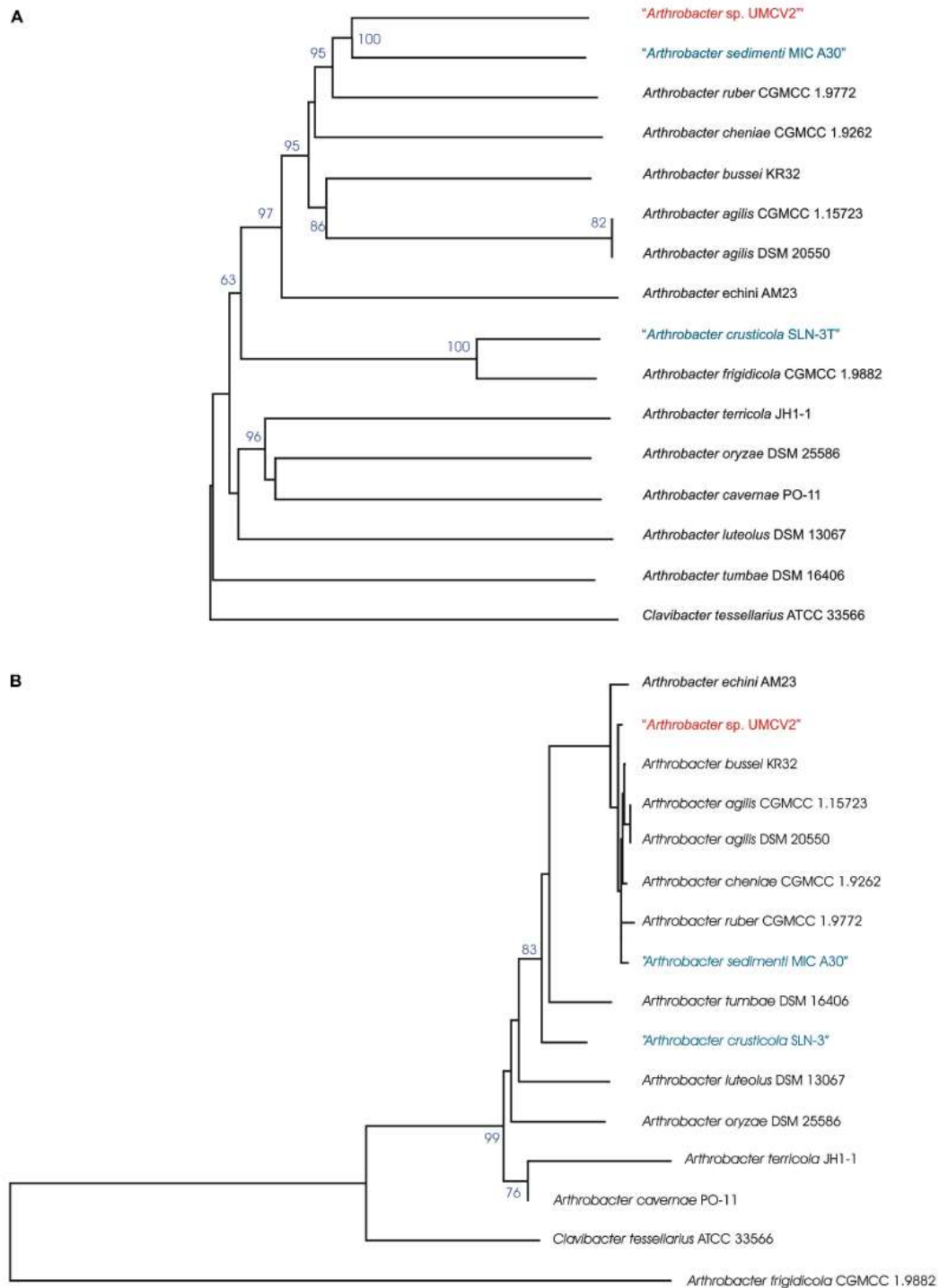


FIGURE 2

Arthrobacter sp. UMCV2 phylogenetic tree based on the genomic (A) and (B) 16S rRNA gene sequences. The trees were inferred from genome BLAST distance phylogeny (GBDP) distances. The branch lengths were scaled in terms of GBDP distance formula d5. The numbers above branches are GBDP pseudo-bootstrap support values >60% from 100 replications, with average branch support of 77.4% for genomic tree and 57.2% for 16S rRNA gene sequences tree. The trees were rooted at the midpoint. Species in blue were mentioned as not validly published by the DSMZ server <https://lpsn.dsmz.de/> at the time of writing.

TABLE 2 Genomic relatedness matrix of *Arthrobacter* sp. UMCV2 and closed-related type strains calculated as digital DNA–DNA hybridization (dDDH) percentages^a.

Bacterial strain ^b	<i>Arthrobacter</i> sp. UMCV2	<i>Arthrobacter sedimenti</i> MIC A30 ^T	<i>Arthrobacter ruber</i> CGMCC 1.9772 ^T	<i>Arthrobacter cheniae</i> CGMCC 1.9262 ^T	<i>Arthrobacter bussei</i> KR32 ^T	<i>Arthrobacter agilis</i> CGMCC 1.15723	<i>Arthrobacter agilis</i> DSM20550 ^T	<i>Arthrobacter echini</i> AM23 ^T	<i>Arthrobacter frigidicola</i> CGMCC 1.9882 ^T	<i>Arthrobacter crusticola</i> SLN-3 ^T	<i>Arthrobacter cavernae</i> PO-11 ^T	<i>Arthrobacter oryzae</i> DSM 25586 ^T
<i>Arthrobacter</i> sp. UMCV2	—											
<i>Arthrobacter sedimenti</i> MIC A30 ^T	36.7	—										
<i>Arthrobacter ruber</i> CGMCC 1.9772 ^T	40.3	35.8	—									
<i>Arthrobacter cheniae</i> CGMCC 1.9262 ^T	34.5	34.9	38.6	—								
<i>Arthrobacter bussei</i> KR32 ^T	36.2	32.4	38.1	37.6	—							
<i>Arthrobacter agilis</i> CGMCC 1.15723	37.3	31.4	38.7	36.5	46.9	—						
<i>Arthrobacter agilis</i> DSM20550 ^T	37.3	31.4	38.6	36.4	47.0	100	—					
<i>Arthrobacter echini</i> AM23 ^T	23.7	23.3	26.9	22.0	24.7	25.2	25.2	—				
<i>Arthrobacter frigidicola</i> CGMCC 1.9882 ^T	18.4	18.6	20.2	18.4	18.7	19.0	19.0	17.0	—			
<i>Arthrobacter crusticola</i> SLN-3 ^T	19.1	19.2	20.6	18.7	19.2	19.2	19.2	17.4	70.8	—		
<i>Arthrobacter cavernae</i> PO-11 ^T	14.4	14.6	14.7	14	14.3	14.1	14.5	13.9	14.5	14.5	—	
<i>Arthrobacter oryzae</i> DSM 25586 ^T	14.3	14.6	14.6	13.9	14.4	14.3	14.3	13.8	14.5	14.4	20.8	—
<i>Arthrobacter luteolus</i> DSM 13067 ^T	14.2	14.2	14.4	13.7	14.3	14.2	14.2	14.1	14.5	14.8	14.5	14.3

^adDDH values were calculated according to the formula one of the type strain genome server (TYGs) pipeline as described by [Meier-Kolthoff and Göker \(2019\)](#).^bType bacterial strains are marked with ^T.

in silico characterized LuxR protein from actinobacteria, and *Streptomyces* SN-593 RevU (Panthee et al., 2020) as an experimentally characterized LuxR-related protein from actinobacteria. All four reference proteins presented a characteristic DNA-binding domain at the C-terminal end (IPR000792). The canonical LuxR proteins displayed an autoinducer binding domain (IPR005143) at the N-terminal end, whereas RevU (LAL-LuxR protein) *Streptomyces* SN-593 exhibited an alternative ATPase domain (IPR041664) (Figure 3). Interestingly, the length of the RevU protein was significantly longer (923 a.a.) than the canonical LuxR (250 a.a.).

Further, we analyzed 18 *Arthrobacter* sp. UMCV2 putative LuxR proteins for conserved domains (Figure 3). Eleven sequences showed the characteristic DNA-binding domain IPR000792 at the C-terminal end (designated as *airR* sequences), four showed the IPR001867 domain described as a DNA-binding domain type OmpR/PhoB (designated as *aiaR* sequences), one sequence contained the IPR005561 domain described as transcription antitermination regulator, and two sequences did not show conserved C-terminal domains (Figure 2). At the N-terminal end, 10 sequences matched the IPR001789 domain, described as a signal transduction response regulator receiver domain, three sequences matched the ATPase domains (IPR041664 or IPR003593), and three sequences did not show conserved domains at the N-terminal end. The putative LuxR homologs in *Arthrobacter* sp. UMCV2 did not contain the canonical LuxR autoinducer-binding domain IPR005143. Only one sequence earlier recognized as a putative LuxR homolog sequence showed the unrelated domain IPR011051 (RmlC-like cupin domain superfamily). Similar to RevU from *Streptomyces* SN-593, five sequences were significantly longer (489–926 a.a.) than canonical LuxR sequences. Sequences CVO76_16125 and CVO76_05180 with the domains IPR011051 and IPR005561, respectively, were discarded as LuxR-related since their domains are discordant with LuxR proteins (Figure 3).

Evolutionary relationships of LuxR-related sequences

LuxR-related sequences were used to construct a phylogenetic tree to observe their association with previously experimentally or *in silico* characterized LuxR-related sequences (Figure 4 and Supplementary Table 6). All Actinobacteria LuxR-related proteins clustered together with the 16 putative LuxR homologs from *Arthrobacter* sp. UMCV2 (*AirR* and *AiaR* sequences), three LuxR or LuxR-related sequences from *Streptomyces* and *Streptosporangium*, and three luxR or luxR-related sequences from *A. terricola* or *Arthrobacter* species. Whereas all the other analyzed luxR-related sequences from Proteobacteria clustered together with LuxR of *A. fischeri*

(Figure 4). Among the LuxR-related sequences of *Arthrobacter* sp. UMCV2, three principal clusters were observed. Cluster I grouped proteins of approximately 218–439 a.a. with the concurrence of the domains IPR001789 and IPR000792 (six proteins) or the IPR000792 domain alone (two proteins). LuxR from *Arthrobacter terricola* (previously characterized *in silico*) belonged to this cluster (Figure 4). Cluster II grouped proteins with the domain IPR001867 (the four *AiaR* proteins) and Cluster III grouped larger proteins (507–916 a.a.) with the LuxR-related proteins of *Streptomyces*, *Streptosporangium*, and *Arthrobacter* multispecies (Figures 3, 4). We included sequences of LuxR associated with LuxI and LuxR solos, although no preferential clustering between *luxR* solo genes was observed. These results indicate that the 16 analyzed sequences from *Arthrobacter* sp. UMCV2 belongs to the Actinobacteria group of LuxR-related sequences separate from the canonical LuxR from Proteobacteria, suggesting early divergence between these transcriptional regulators in both phyla.

N, N,-dimethylhexadecylamine modulates *Arthrobacter* sp. UMCV2 swarming motility

Arthrobacter sp. UMCV2 was placed in NB plates supplemented with DMHDA 1.0–6.0 μ M to observe the bacterial swarming motility. After 72 h, *Arthrobacter* sp. UMCV2 showed an enhancement of 66, 61, and 59% in swarming motility on plates at 1.0, 2.0, and 3.0 μ M DMHDA, respectively, compared with controls although, a drastic motility decrease was observed on plates with 4.0 and 5.0 μ M DMHDA (Figure 5). These results show that DMHDA modulates swarming motility, a behavior usually associated with quorum sensing signaling that involves the bacterial flagellar apparatus.

N, N,-dimethylhexadecylamine modulates the expression of auto-inducer related regulators and auto-inducer analog regulator genes

The expression of *airR* and *aiaR* genes, together with the flagellar genes *flgL*, *fliC*, and *motA*, were quantified in bacterial growth with 1.0 μ M DMHDA and compared with the respective controls (0.0 μ M). Eighth of the *airR* and two of the *aiaR* genes exhibited statistically significant induction. The overexpression of *airR5* was 55-fold, followed by *airR3* and *airR7*, over expressing by 25-fold. The overexpression of *airR1*, *airR2*, *airR6*, and *aiaR3* ranged between 14- and 6-fold. The overexpression of *airR11*, *aiaR2*, and *aiaR3* ranged between 4- and 1.6-fold (Figure 6A). With the increase in swarming motility, the expression of flagellar genes *flgL*, *fliC*, and *motA*

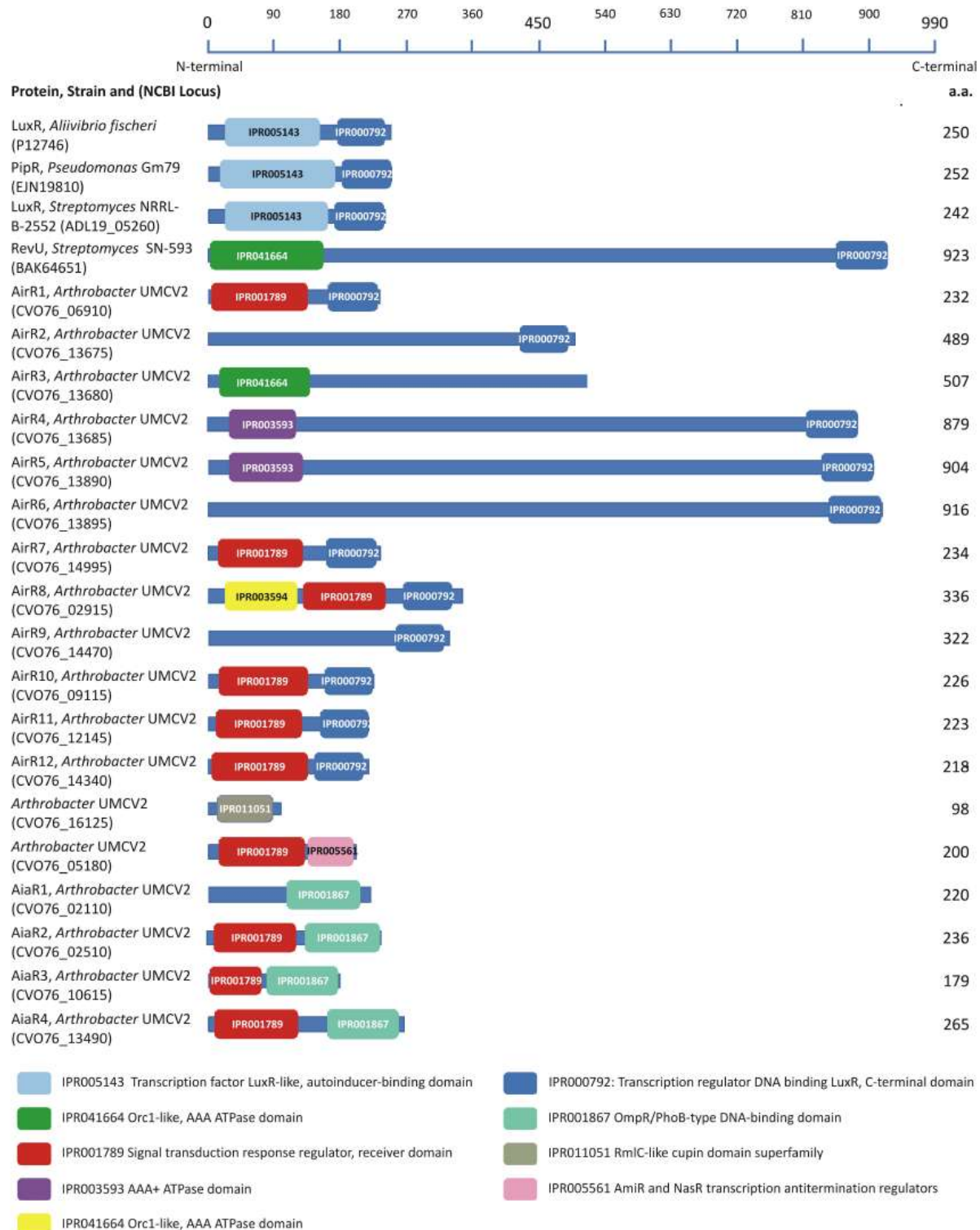
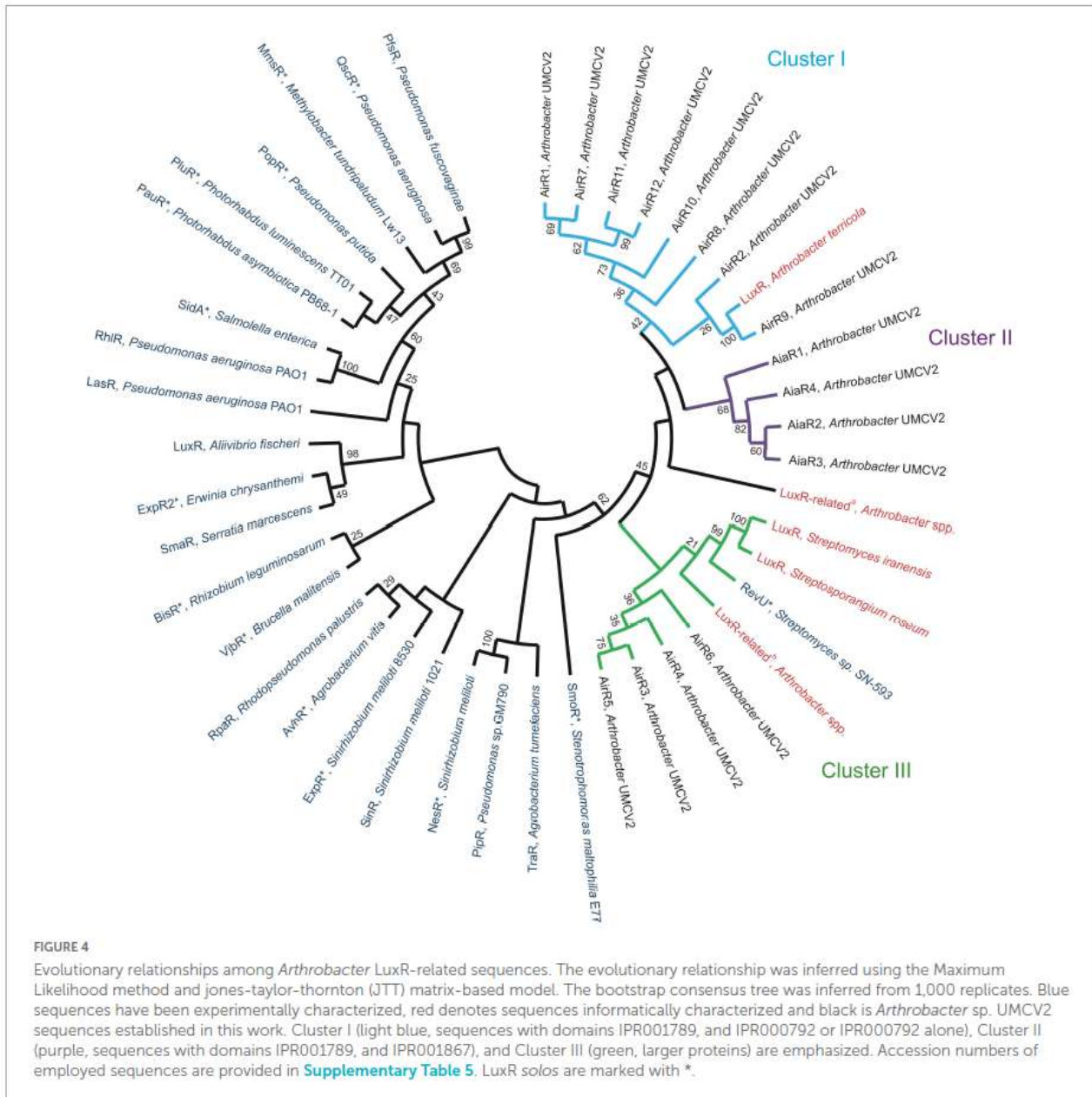


FIGURE 3

Conserved domains found in the model LuxR proteins and LuxR-related sequences from *Arthrobacter* sp. UMCV2. LuxR-related sequences were localized to the genome of *Arthrobacter* sp. UMCV2 employing the informatic tools MG-RAST 4.0.3 and PATRIC 3.6.12. Domains were localized in the protein sequences employing the informatics tool InterPro v62.0. Proteins are represented with a blue line and their lengths are compared with the upper scale. Conserved domains are localized in the proteins with colored boxes. Protein names, the strain of origin, and national center for technology information (NCBI) locus are indicated in the left column.

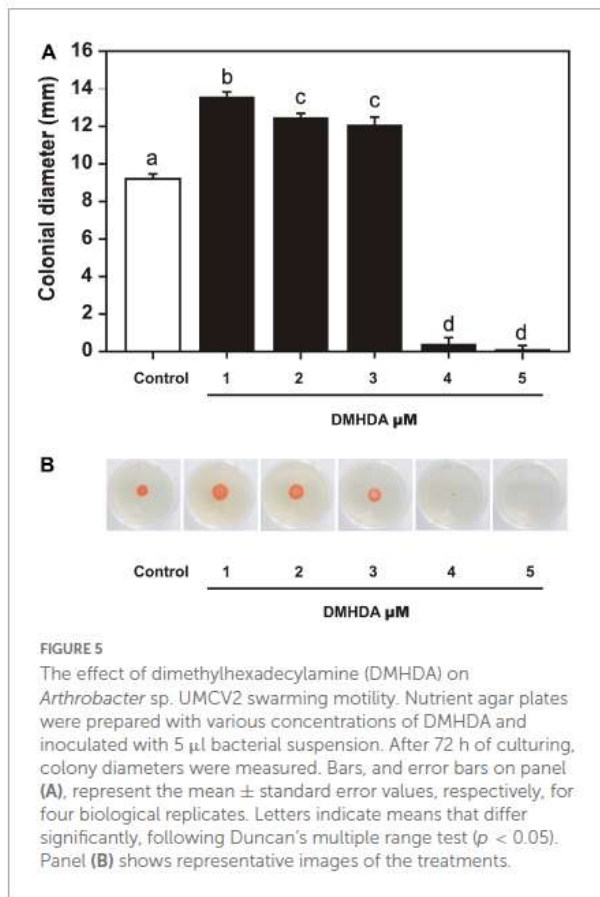


also increased, showing an overexpression ranging from 8- to 4-fold (**Figure 6B**). These results showed that DMHDA modulates the expression of different *airR* and *aiaR* genes at different magnitudes, simultaneous with flagellar genes.

Discussion

Arthrobacter sp. UMCV2 is a plant growth-promoting rhizobacterium that was isolated while screening for iron-reducing bacteria, capable of supplying ferrous iron to plants in alkaline soils where this metal is limited to plant growth

and development (Valencia-Cantero et al., 2007). This beneficial bacterium also promotes plant growth through the emission of the volatile organic compound DMHDA (Velázquez-Becerra et al., 2011). DMHDA acts as an inter-kingdom signaling molecule interacting with the plant cytokinin signaling pathway involving the AHK2 receptor (Vázquez-Chimalhua et al., 2021a) and producing in this way, a cross-talk with the jasmonic-acid pathway (Vázquez-Chimalhua et al., 2019). Plant organogenesis and growth are modulated by DMHDA through modifying the balance between stem cell niche and Jasmonic acid-dependent gene expression (Vázquez-Chimalhua et al., 2021b). DMHDA also induces expression of genes involved in plant systemic



defense mechanisms and Fe-acquisition strategies, which are suggested to enhance photosynthesis and biomass production (Orozco-Mosqueda et al., 2013; Castulo-Rubio et al., 2015; Montejano-Ramírez et al., 2020). Previous results showed that *Arthrobacter* sp. UMCV2 adopts an endophytic lifecycle and colonizes plant tissues, providing benefits to host plants (Montejano-Ramírez et al., 2018; Hernández-Soberano et al., 2020).

Arthrobacter sp. UMCV2 genome and taxonomy

Arthrobacter sp. UMCV2 was initially identified as *Arthrobacter agilis* since its 16S rRNA sequences showed a percent identity above 99.5% (Valencia-Cantero et al., 2007). However, the 16S rRNA sequences of *A. echini* (Lee et al., 2016), *A. ruber* (Liu et al., 2018), *A. bussei* (Flegler et al., 2020), *A. sedimenti* (Lin et al., 2020), and *A. cheniae* (Yang et al., 2021) also share a percent identity above 99.5% with the 16S rRNA gene of *Arthrobacter* sp. UMCV2. In this study, the TYGS pipeline was employed to produce phylogenetic trees of the type strains of the species most closely related to *Arthrobacter* sp. UMCV2 on 16S rRNA and genomic terms

(Figure 2), to determine the specific taxonomic position of *Arthrobacter* sp. UMCV2. Although our results place UMCV2 in the *Arthrobacter* genus, *Arthrobacter* sp. UMCV2 is not included in the *A. agilis* branch or in branches together with other type strains. Then, we used a dDDH approach to calculate the relatedness between the genomes of *Arthrobacter* sp. UMCV2 and type strains of closely related species. dDDH is a recognized standard procedure for genome sequence-based species delimitation (Meier-Kolthoff et al., 2013). Thus, we found that the higher dDDH values were shared between *Arthrobacter* sp. UMCV2 and a cluster of type strains including *A. bussei*, *A. agilis*, *A. cheniae*, *A. ruber*, and *A. sedimenti*, ranging from 40.3 to 36.2%, which are clearly below the 70%, which is generally accepted as the species boundary (Chun et al., 2018); concordantly, dDDH values detected among type strains were similarly low (Table 2). Therefore, we conclude that *Arthrobacter* sp. UMCV2 might be a new species that can eventually be described.

The *Arthrobacter* sp. UMCV2 genome has a typical size for the *Arthrobacter* genus. The genes involved in survival and colonization, such as *SOD*, showed aptitudes for colonization of roots (Kim et al., 2000; Alquéres et al., 2013), in addition to the operon *ars*, which confers resistance to arsenic and arsenate, a toxic metalloid (Wang et al., 2009). The presence of *fhuDCB* genes can be important in siderophore piracy (Koster, 1991; Galet et al., 2015), which is important for competition in soil.

Arthrobacter sp. UMCV2 possesses *luxR*-related genes

The presence of *luxR* annotated genes was particularly interesting since *luxR* genes are involved in the QS process. Previously, we found that DMHDA induces swarming motility in *Arthrobacter* sp. UMCV2, frequently recognized as a behavior regulated by QS (Martínez-Cámara et al., 2020). The canonical *luxI-luxR* system is typically the central component of QS in Gram-negative bacteria (Whiteley et al., 2017), but is exceptionally present in Gram-positive bacteria (Rajput and Kumar, 2017). Additionally, *luxI* homologs in the *Arthrobacter* sp. UMCV2 genome were not found. In contrast, 18 predicted protein sequences homologous to *luxR* were localized.

We used a domain-based approach to analyze putative *luxR*-related proteins and compared them with four well-characterized LuxR proteins. We included the first protein described as LuxR, originally found in *A. fischeri* (Fuqua et al., 1994), as a reference protein. PipR from *Pseudomonas* sp. GM79 was included as a reference LuxR since it is a well-experimentally characterized protein belonging to the LuxR protein family that responds to the plant derivative compound *N*-(2-hydroxyethyl)-2-(2-hydroxyethylamino) acetamide through a periplasmic binding protein. PipR has been included in the subfamily PAB that integrates LuxR proteins that respond to low-weight

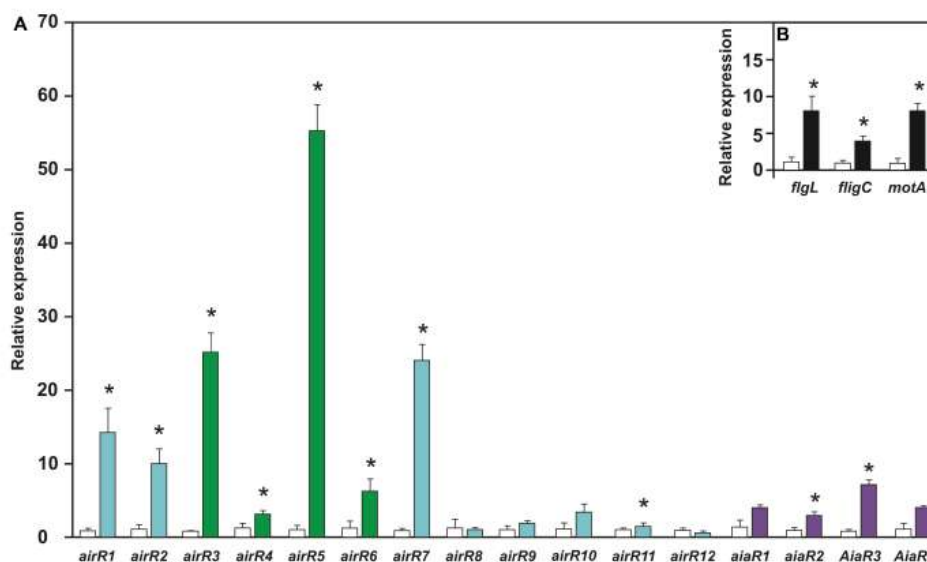


FIGURE 6

The relative expression of auto-inducer-related regulators (*airR*), auto-inducer analog regulator (*aiaR*), and motility-involved genes in *Arthrobacter* sp. UMCV2 induced with DMHDA. *Arthrobacter* sp. UMCV2 was induced with dimethylhexadecylamine (DMHDA). After 72 h, relative expression of *airR*, *aiaR* genes panel (A), and motility-involved genes panel (B) were determined. Values represent mean $\pm$ standard errors of relative expression of three biological replicates in reference to control (with bars). Asterisks indicate significant differences between treatments calculated using Student's *t*-test ($p < 0.05$). Genes belonging to Cluster I, II, and III of Figure 4 are colored in light blue, purple, and green, respectively.

plant molecules (Mosquito et al., 2020; Xu, 2020). The LuxR protein from *Streptomyces purpurogeneiscleroticus* NRRL B-2952 (Rajput and Kumar, 2017) was also included as a reference since it is part of a canonical QS LuxI-LuxR system present in actinobacteria characterized *in silico*. Additionally, RevU was included as a non-canonical LuxR protein from actinobacteria (Panthee et al., 2020) since this protein binds the biomediator BR-1, a β -carboline compound, to regulate the synthesis of reveromycin in *Streptomyces* SN-593. RevU belongs to the LAL-LuxR subfamily (large ATP-binding regulators of the LuxR family), which is characterized by its large size (over 900 a.a. residues) and an ATP-binding domain in the N-terminus. Although it is present in gram-negative bacteria, it is more frequently found in actinobacteria (De Schrijver and De Mot, 1999; Panthee et al., 2020). Canonical LuxR from *A. fischeri* and *S. purpurogeneiscleroticus*, as well as PipR, displayed the same architecture composed of the autoinducer binding domain IPR005143 at the N-terminal end and the DNA-binding domain IPR000792 at the C-terminal. Unsurprisingly, in the LAL-LuxR subfamily member RevU protein, the autoinducer binding domain was replaced by an ATPase domain in addition to the large size of the protein (Figure 3).

None of the *Arthrobacter* sp. UMCV2 sequences showed architectures present in the model luxR sequences, although 11 sequences exhibited the DNA-binding domain IPR000792 (Figure 3). This is a HTH domain that was previously used as a criterion to include proteins in the luxR protein family

(De Schrijver and De Mot, 1999; Lopes-Santos et al., 2012; Rajput and Kumar, 2017). We conclude that these 11 proteins belong to the LuxR transcription regulator family and are designated as Auto-inducer-related Regulators (AirR). Among these proteins, eight were grouped in cluster I (Figure 4) and six of them possessed a signal transduction response regulator receiver domain (IPR001789) that substitutes the autoinducer binding domain of canonical LuxR. In other proteins with HTH domains, the autoinducer binding domain is substituted either by an ATPase domain (as happens in RevU) or no amino-terminal domain was identified. Three of these sequences clustered with RevU from *Streptomyces* and LuxR or LuxR related to *Streptomyces iranensis*, *Streptosporangium roseum* *A. terricola*, and *Arthrobacter* spp., supporting the involvement of these proteins in the LuxR family. A separate group (cluster II of Figure 4) was found in which the canonical DNA-binding HTH domain was substituted with an OmpR/PhoB-type DNA-binding domain together with the same signal transduction response regulator receiver domain present in most of the cluster I AirR sequences (Figures 3, 4). We designated the auto-inducer analog regulator (AiaR) to this group because they form a sister cluster to AirR sequences deep inside the actinobacteria LuxR protein group but do not pose the HTH domain that defines LuxR protein, in addition to the analogous function of both domains with those present in canonical LuxR. Because no Lux-I homologous proteins were found in *Arthrobacter* sp.

UMCV2, all AirR constitute “solo” proteins inside the luxR family.

Arthrobacter sp. UMCV2's compound *N, N*-dimethylhexadecylamine induces auto-inducer-related regulators

LuxR solos have been extensively studied in Gram-negative bacteria. Some LuxR solos bind AHL from other bacterial species, probably as a strategy to expand their regulatory network by utilizing the existing components of the resident quorum-sensing systems (Martínez et al., 2015; Mosquito et al., 2020). Also, other LuxR solos have evolved to respond to different molecules including signals from plants (Patel et al., 2013). Although the functions of these proteins are understudied in Gram-positive bacteria, especially in actinobacteria other than *Streptomyces*, the phylum has been phylogenetically explored by Lopes-Santos et al. (2012) and revised by Polkade et al. (2016). In *A. aureus* and *A. chlorophenolicus*, multiple sequences of luxR homologs have been reported (16 and 17 sequences, respectively). However, no experimental work has been conducted (Lopes-Santos et al., 2012).

Because AirR proteins do not show the canonical LuxR autoinducer-binding domain, AHL is not expected to be the signal molecule for AirR proteins. However, a previous study revealed that DMHDA induced swarming motility in *Arthrobacter* sp. UMCV2 and simultaneously upregulates the expression of marker genes of the flagellar apparatus (Martínez-Cámara et al., 2020). Since swarming motility is frequently regulated by QS (Krishnan et al., 2012; Nickzad et al., 2015), in this study, swarming motility induction by DMHDA was reproduced and the expression of the *airR* genes was determined. It was found that 10 of the 16 luxR-related genes were statistically upregulated (Figure 6), but *airR3* and *airR5* (rich proteins clustered with RevU), and *airR1*, *airR2*, and *airR7* were induced over 10-fold. Multiple inductions of *airR* genes suggest the existence of a hierarchical network of *airR* gene induction. In *P. aeruginosa* PAO1, four individual QS circuits have been described. Individual circuits are highly interconnected and involve auto-induction. The induction of an individual circuit by its auto-inductor results in the induction (or repression) of one or more of the other three (Papenfert and Bassler, 2016). Similarly, it is possible that DMHDA induction of an *airR* gene directly or indirectly upregulates other *airR* genes via unknown mechanisms. Therefore, additional studies are required to elucidate the function and regulation of *airR* genes.

In this study, the genomic analysis indicated that *Arthrobacter* sp. UMCV2 forms a separate branch within the genus *Arthrobacter*, potentially constituting a new species. Genomic analysis also identified a group of 16 genes designed as *airR*, 10 of which were induced by *Arthrobacter* sp. UMCV2

compound DMHDA, which simultaneously induces QS behavior. To the best of our knowledge, this is the first report about the induction of the luxR gene family in the *Arthrobacter* genus by a bacterial self-compound.

Data availability statement

The datasets presented in this study can be found in online repositories. The names of the repository/repositories and accession number(s) can be found below: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>, CP024915.1.

Author contributions

EV-C and GS: conceptualization. GM-H, EV-C, and JH-S: methodology. GS and GM-H: validation. MC-M, RM-C, and JH-S: formal analysis. MC-M, RM-C, and EV-C: investigation and writing – original draft preparation. EV-C: resources, supervision, project administration. EV-C, GS, and GM-H: writing – review and editing. All authors have read and agreed to the published.

Funding

We gratefully acknowledge the Valencia-Macías Foundation (México, Grant 8.1) and the Coordinación de la Investigación Científica-UMSNH (México, Grant 2.22) for financial support.

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2022.1040932/full#supplementary-material>

References

- Aframian, N., and Eldar, A. (2020). A bacterial tower of babel: Quorum-sensing signaling diversity and its evolution. *Annu. Rev. Microbiol.* 74, 587–606. doi: 10.1146/annurev-micro-012220-063740
- Alquéres, S., Meneses, C., Rouws, L., Rothballer, M., Baldani, I., Schmid, M., et al. (2013). The bacterial superoxide dismutase and glutathione reductase are crucial for endophytic colonization of rice roots by *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5. *Mol. Plant Microbe Interact.* 26, 937–945. doi: 10.1094/MPMI-12-12-0286-R
- Aziz, R. K., Bartels, D., Best, A. A., DeJongh, M., Disz, T., Edwards, R. A., et al. (2008). The rast server: Rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genom.* 9:75. doi: 10.1186/1471-2164-9-75
- Bez, C., Covaceuzach, S., Bertani, I., Choudhary, K. S., and Venturi, V. (2021). LuxR solos from environmental fluorescent pseudomonads. *mSphere* 6, e1322–e1320. doi: 10.1128/mSphere.01322-20
- Blum, M., Chang, H. Y., Chuguransky, S., Grego, T., Kandasamy, S., Mitchell, A., et al. (2021). The interPro protein families and domains database: 20 years on. *Nucleic Acids Res.* 49, D344–D354. doi: 10.1093/nar/gkaa977
- Brachmann, A. O., Brameyer, S., Kresovic, D., Hitkova, I., Kopp, Y., Manske, C., et al. (2013). Pyrones as bacterial signaling molecules. *Nat. Chem. Biol.* 9, 573–578. doi: 10.1038/nchembio.1295
- Brameyer, S., Kresovic, D., Bode, H. B., and Heermann, R. (2014). LuxR solos in *Photobacterium* species. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 4:166. doi: 10.3389/fcimb.2014.00166
- Brameyer, S., Kresovic, D., Bode, H. B., and Heermann, R. (2015). Dialkylresorcinols as bacterial signaling molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 572–577. doi: 10.1073/pnas.1417685112
- Bramhachari, P. V., Yugandhar, N. M., Prathyusha, A. M. V. N., Mohana Sheela, G., Naravula, J., and Venkateswarlu, N. (2018). "Quorum sensing regulated swarming motility and migratory behavior in Bacteria," in *Implication of Quorum Sensing System in Biofilm Formation and Virulence*, ed. V. B. Pallaval (Singapore: Springer), 49–66. doi: 10.1007/978-981-13-2429-1_5
- Brettin, T., Davis, J. J., Disz, T., Edwards, R. A., Gerdes, S., Olsen, G. J., et al. (2015). RASTtk: A modular and extensible implementation of the RAST algorithm for building custom annotation pipelines and annotating batches of genomes. *Sci. Rep.* 5:8365. doi: 10.1038/srep08365
- Case, R. J., Labbate, M., and Kjelleberg, S. (2008). AHL-driven quorum-sensing circuits: Their frequency and function among the *Proteobacteria*. *ISME J.* 2, 345–349. doi: 10.1038/ismej.2008.13
- Castulo-Rubio, D. Y., Alejandro-Ramírez, N. A., Orozco-Mosqueda, M. C., Santoyo, G., Macías-Rodríguez, L. I., and Valencia-Cantero, E. (2015). Volatile organic compounds produced by the rhizobacterium *Arthrobacter agilis* UMCV2 modulate *Sorghum bicolor* (strategy II plant) morphogenesis and SbFRO1 transcription in vitro. *J. Plant Growth Regul.* 34, 611–623. doi: 10.1007/s00344-015-9495-8
- Choi, S., and Greenberg, E. P. (1991). The C-terminal region of the *Vibrio fischeri* LuxR protein contains an inducer-independent lux gene activating domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 11115–11119. doi: 10.1073/pnas.88.24.11115
- Chun, J., Oren, A., Ventosa, A., Christensen, H., Arahal, D. R., da Costa, M. S., et al. (2018). Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 68, 461–466. doi: 10.1099/ijsem.0.002516
- Coutinho, B. G., Mevers, E., Schaefer, A. L., Pelletier, D. A., Harwood, C. S., Clardy, J., et al. (2018). A plant-responsive bacterial-signaling system senses an ethanolamine derivative. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115, 9785–9790. doi: 10.1073/pnas.1809611115
- De Schrijver, A., and De Mot, R. (1999). A subfamily of MalT-related ATP-dependent regulators in the LuxR family. *Microbiology* 145, 1287–1288. doi: 10.1099/13500872-145-6-1287
- Dufour, D., and Lévesque, C. M. (2013). Bacterial behaviors associated with the quorum-sensing peptide pheromone ('alarmone') in streptococci. *Future Microbiol.* 8, 593–605. doi: 10.2217/fmb.13.23
- Enkataraman, A., Rosenbaum, M. A., Werner, J. J., Winans, S. C., and Angenent, L. T. (2014). Metabolite transfer with the fermentation product 2, 3-butanediol enhances virulence by *Pseudomonas aeruginosa*. *ISME J.* 8, 1210–1220. doi: 10.1038/ismej.2013.232
- Farris, J. S. (1972). Estimating phylogenetic trees from distance matrices. *Am. Nat.* 106, 645–667. doi: 10.1086/282802
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783–791. doi: 10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x
- Ferluga, S., and Venturi, V. (2009). OryR is a LuxR-family protein involved in interkingdom signaling between pathogenic *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and rice. *J. Bacteriol.* 191, 890–897. doi: 10.1128/JB.01507-08
- Flegler, A., Runzheimer, K., Kombeitz, V., Mänz, A. T., von Heilborn, D. H., Etzbach, L., et al. (2020). *Arthrobacter bussei* sp. nov., a pink-coloured organism isolated from cheese made of cow's milk. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 70, 3027–3036. doi: 10.1099/ijsem.0.004125
- Fuqua, C. (2006). The QscR quorum-sensing regulon of *Pseudomonas aeruginosa*: An orphan claims its identity. *J. Bacteriol.* 188, 3169–3171. doi: 10.1128/JB.188.9.3169-3171.2006
- Fuqua, C., Parsek, M. R., and Greenberg, E. P. (2001). Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing. *Annu. Rev. Genet.* 35, 439–468. doi: 10.1146/annurev.genet.35.102401.090913
- Fuqua, C., Winans, S. C., and Greenberg, E. P. (1996). Census and consensus in bacterial ecosystems: The LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators. *Annu. Rev. Microbiol.* 50, 727–751. doi: 10.1146/annurev.micro.50.1.727
- Fuqua, W. C., Winans, S. C., and Greenberg, E. P. (1994). Quorum sensing in bacteria: The LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J. Bacteriol.* 176, 269–275. doi: 10.1128/jb.176.2.269-275.1994
- Galet, J., Deveau, A., Hôtel, L., Frey-Klett, P., Leblond, P., and Aigle, B. (2015). *Pseudomonas fluorescens* pirates both ferrioxamine and ferrioxalchelin siderophores from *Streptomyces ambofaciens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 3132–3141. doi: 10.1128/AEM.03520-14
- González, J. F., and Venturi, V. (2013). A novel widespread interkingdom signaling circuit. *Trends Plant Sci.* 18, 167–174. doi: 10.1016/j.tplants.2012.09.007
- González, J. F., Myers, M. P., and Venturi, V. (2013). The inter-kingdom solo OryR regulator of *Xanthomonas oryzae* is important for motility. *Mol. Plant Pathol.* 14, 211–221. doi: 10.1111/j.1364-3703.2012.00843.x
- Hawver, L. A., Jung, S. A., and Ng, W. L. (2016). Specificity and complexity in bacterial quorum-sensing systems. *FEMS Microbiol. Rev.* 40, 738–752. doi: 10.1093/femsre/fuw014
- Hernández-Soberano, C., Ruiz-Herrera, L. F., and Valencia-Cantero, E. (2020). Endophytic bacteria *Arthrobacter agilis* UMCV2 and *Bacillus methylotrophicus* M4-96 stimulate achene germination, in vitro growth, and greenhouse yield of strawberry (*Fragaria × ananassa*). *Sci. Hortic.* 261:109005. doi: 10.1016/j.scienta.2019.109005
- Jones, D. T., Taylor, W. R., and Thornton, J. M. (1992). The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Bioinformatics* 8, 275–282. doi: 10.1093/bioinformatics/8
- Kan, J., Fang, R., and Jia, Y. (2017). Interkingdom signaling in plant-microbe interactions. *Sci. China Life Sci.* 60, 785–796. doi: 10.1007/s11427-017-9092-3
- Kim, K. S., Lee, S., and Ryu, C. (2013). Interspecific bacterial sensing through airborne signal modulates locomotion and drug resistance. *Nat. Commun.* 4:1809. doi: 10.1038/ncomms2789
- Kim, Y. C., Miller, C. D., and Anderson, A. J. (2000). Superoxide dismutase activity in *Pseudomonas putida* affect utilization of sugars and growth on root surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1460–1467. doi: 10.1128/AEM.66.4.1460-1467.2000
- Koster, W. (1991). Iron (III) hydroxamate transport across the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Biol. Met.* 4, 23–32. doi: 10.1007/BF01135553
- Krishnan, T., Yin, W. F., and Chan, K. G. (2012). Inhibition of quorum sensing-controlled virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 by ayurveda spice clove (*Syzygium Aromaticum*) bud extract. *Sensors* 12, 4016–4030. doi: 10.3390/s120404016
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., and Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35, 1547–1549. doi: 10.1093/molbev/msy096
- Lee, J. Y., Hyun, D. W., Kim, P. S., Kim, H. S., Shin, N. R., Yun, J. H., et al. (2016). *Arthrobacter echini* sp. nov., isolated from the gut of a purple sea urchin, *Heliocidaris crassispina*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66, 1887–1893. doi: 10.1099/ijsem.0.000965

- Lefort, V., Desper, R., and Gascuel, O. (2015). FastME 2.0: A comprehensive, accurate, and fast distance-based phylogeny inference program. *Mol. Biol. Evol.* 32, 2798–2800. doi: 10.1093/molbev/msv150
- Lin, P., Yan, Z. F., and Li, C. T. (2020). *Arthrobacter sedimenti* sp. nov., isolated from river sediment in Yuantouzhu park, China. *Arch. Microbiol.* 202, 2551–2556. doi: 10.1007/s00203-020-01968-y
- Liu, Q., Xin, Y. H., Chen, X. L., Liu, H. C., Zhou, Y. G., and Chen, W. X. (2018). *Arthrobacter ruber* sp. nov., isolated from glacier ice. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 68, 1616–1621. doi: 10.1099/ijsem.0.002719
- Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 25, 402–408. doi: 10.1006/meth.2001.1262
- Lopes-Santos, C., Correia-Neves, M., Moradas-Ferreira, P., and Mendes, M. V. (2012). A walk into the LuxR regulators of actinobacteria: Phylogenomic distribution and functional diversity. *PLoS One* 7:e46758. doi: 10.1371/journal.pone.004675
- Lyon, G. J., and Novick, R. P. (2004). Peptide signaling in *Staphylococcus aureus* and other Gram-positive bacteria. *Peptides* 25, 1389–1403. doi: 10.1016/j.peptides.2003.11.026
- Mansurova, M., Ebert, B. E., Blank, L. M., and Ibañez, A. J. (2018). A breath of information: The volatilome. *Curr. Genet.* 64, 959–964. doi: 10.1007/s00294-017-0800-x
- Martínez, P., Huedo, P., Martínez-Servat, S., Planell, R., Ferrer-Navarro, M., Daura, X., et al. (2015). *Stenotrophomonas maltophilia* responds to exogenous AHL signals through the LuxR solo SmoR (Smlt1839). *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 5:41. doi: 10.3389/fcimb.2015.00041
- Martínez-Cámara, R., Montejano-Ramírez, V., Moreno-Hagelsieb, G., Santoyo, G., and Valencia-Cantero, E. (2020). The volatile organic compound dimethylhexadecylamine affects bacterial growth and swarming motility of bacteria. *Folia Microbiol.* 65, 523–532. doi: 10.1007/s12223-019-00756-6
- Meier-Kolthoff, J. P., and Göker, M. (2019). TYGS is an automated high-throughput platform for state-of-the-art genome-based taxonomy. *Nat. Commun.* 10:2182. doi: 10.1038/s41467-019-10210-3
- Meier-Kolthoff, J. P., Auch, A. F., Klenk, H.-P., and Göker, M. (2013). Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. *BMC Bioinform.* 14:60. doi: 10.1186/1471-2105-14-60
- Meier-Kolthoff, J. P., Sarda Carbasse, J., Peinado-Olarte, R. L., and Göker, M. (2022). TYGS and LPSN: A database tandem for fast and reliable genome-based classification and nomenclature of prokaryotes. *Nucleic Acid Res.* 50, D801–D807. doi: 10.1093/nar/gkab902
- Miller, M. B., and Bassler, B. L. (2001). Quorum sensing in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 55, 165–199. doi: 10.1146/annurev.micro.55.1.165
- Monnet, V., and Gardan, R. (2015). Quorum-sensing regulators in gram-positive bacteria 'cherchez le peptide'. *Mol. Microbiol.* 97, 181–184. doi: 10.1111/mmi.13060
- Monnet, V., Juillard, V., and Gardan, R. (2014). Peptide conversations in gram-positive bacteria. *Crit. Rev. Microbiol.* 42, 339–351. doi: 10.3109/1040841X.2014.948804
- Montejano-Ramírez, V., García-Pineda, E., and Valencia-Cantero, E. (2020). Bacterial compound N, N-dimethylhexadecylamine modulates expression of iron deficiency and defense response genes in *Medicago truncatula* independently of the jasmonic acid pathway. *Plants* 9:624. doi: 10.3390/plants9050624
- Montejano-Ramírez, V., Martínez-Cámara, R., García-Pineda, E., and Valencia-Cantero, E. (2018). Rhizobacterium *Arthrobacter agilis* UMCV2 increases organ-specific expression of FRO genes in conjunction with genes associated with the systemic resistance pathways of *Medicago truncatula*. *Acta Physiol. Plant.* 40:138. doi: 10.1007/s11738-018-2712-x
- Mosquito, S., Meng, X., Devescovi, G., Bertani, I., Geller, A. M., Levy, A., et al. (2020). LuxR solos in the plant endophyte *Kosakonia* sp. strain KO348. *Appl. Environ. Microbiol.* 86, e622–e620. doi: 10.1128/AEM.00622-20
- Nickzad, A., Lépine, F., and Déziel, E. (2015). Quorum sensing controls swarming motility of *Burkholderia glumae* through regulation of rhamnolipids. *PLoS One* 10:e0128509. doi: 10.1371/journal.pone.0128509
- Orozco-Mosqueda, M. C., Velázquez-Becerra, C., Macías-Rodríguez, L. I., Santoyo, G., Flores-Cortez, I., Alfaro-Cuevas, A., et al. (2013). *Arthrobacter agilis* UMCV2 induces iron acquisition in *Medicago truncatula* (Strategy I Plant) in vitro via dimethylhexadecylamine Emission. *Plant Soil* 362, 51–66. doi: 10.1007/s11104-012-1263-y
- Panthee, S., Kito, N., Hayashi, T., Shimizu, T., Ishikawa, J., Hamamoto, H., et al. (2020). β -carboline chemical signals induce reveromycin production through a LuxR family regulator in *Streptomyces* sp. SN-593. *Sci. Rep.* 10:10230. doi: 10.1038/s41598-020-66974-y
- Papenfort, K., and Bassler, B. L. (2016). Quorum sensing signal-response systems in gram-negative bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 14, 576–588. doi: 10.1038/nrmicro.2016.89
- Patankar, A. V., and González, J. E. (2009). Orphan LuxR regulators of quorum sensing. *FEMS Microbiol. Rev.* 33, 739–756. doi: 10.1111/j.1574-6976.2009.00163.x
- Patel, H. K., Suárez-Moreno, Z. R., Degraess, G., Subramoni, S., González, J. F., and Venturi, V. (2013). Bacterial LuxR solos have evolved to respond to different molecules including signals from plants. *Front. Plant Sci.* 4:447. doi: 10.3389/fpls.2013.00447
- Polkade, A. V., Mantri, S. S., Patwekar, U. J., and Jangid, K. (2016). Quorum Sensing: An under-explored phenomenon in the Phylum Actinobacteria. *Front. Microbiol.* 7:131. doi: 10.3389/fmicb.2016.00131
- Rajput, A., and Kumar, M. (2017). In silico analyses of conserved, functional and phylogenetic distribution of the LuxI and LuxR homologs in gram-positive bacteria. *Sci. Rep.* 7:6969. doi: 10.1038/s41598-017-07241-5
- Schulz-Bohm, K., Martin-Sanchez, L., and Garbeva, P. (2017). Microbial volatiles: Small molecules with an important role in intra- and interkindom interactions. *Front. Microbiol.* 8:2484. doi: 10.3389/fmicb.2017.02484
- Shadel, G. S., Young, R., and Baldwin, T. O. (1990). Use of regulated cell lysis in a lethal genetic selection in *Escherichia coli*: Identification of the autoinducer-binding region of the LuxR protein from *Vibrio fischeri* ATCC7744. *J. Bacteriol.* 172, 3980–3987. doi: 10.1128/jb.172.7.3980-3987.1990
- Slock, J., VanRiet, D., Kolibachuk, D., and Greenberg, E. P. (1990). Critical regions of the *Vibrio fischeri* LuxR protein defined by mutational analysis. *J. Bacteriol.* 172, 3974–3979. doi: 10.1128/jb.172.7.3974-3979.1990
- Swift, S., Bainton, N. J., and Winson, M. K. (1994). Gram-negative bacterial communication by N-acyl homoserine lactones: A universal language? *Trends Microbiol.* 2, 193–198. doi: 10.1016/0966-842X(94)90110-q
- Valencia-Cantero, E., Hernández-Calderón, E., Velázquez-Becerra, C., López-Meza, J. E., Alfaro-Cuevas, R., and López-Bucio, J. (2007). Role of dissimilatory fermentative iron-reducing bacteria in Fe uptake by common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants grown in alkaline soil. *Plant Soil* 291, 263–273. doi: 10.1007/s11104-007-9191-y
- Vázquez-Chimalhua, E., Barrera-Ortiz, S., Valencia-Cantero, E., López-Bucio, J., and Ruiz-Herrera, L. F. (2021a). The bacterial volatile N,N-dimethylhexadecylamine promotes *Arabidopsis* primary root elongation through cytokinin signaling and the AHK2 receptor. *Plant Signal. Behav.* 16:1879542. doi: 10.1080/15592324.2021.1879542
- Vázquez-Chimalhua, E., Ruiz-Herrera, L. F., Barrera-Ortiz, S., Valencia-Cantero, E., and López-Bucio, J. (2019). The bacterial volatile dimethylhexa-decylamine reveals an antagonistic interaction between jasmonic acid and cytokinin in controlling primary root growth of *Arabidopsis* seedlings. *Protoplasma* 256, 643–654. doi: 10.1007/s00709-018-1327-9
- Vázquez-Chimalhua, E., Valencia-Cantero, E., López-Bucio, J., and Ruiz-Herrera, L. F. (2021b). N, N, dimethyl-hexadecylamine modulates *Arabidopsis* root growth through modifying the balance between stem cell niche and jasmonic acid-dependent gene expression. *Gene Expr. Patterns* 41:119201. doi: 10.1016/j.gexp.2021.119201
- Velázquez-Becerra, C., Macías-Rodríguez, L. I., López-Bucio, J., Altamirano-Hernández, J., Flores-Cortez, I., and Valencia-Cantero, E. (2011). A volatile organic compound analysis from *Arthrobacter agilis* identifies dimethylhexadecylamine, an amino-containing lipid modulating bacterial growth and *Medicago sativa* morphogenesis in vitro. *Plant Soil* 339, 329–340. doi: 10.1007/s11104-010-0583-z
- Velázquez-Becerra, C., Macías-Rodríguez, L. I., López-Bucio, J., Flores-Cortez, I., Santoyo, G., Hernández-Soberano, C., et al. (2013). The rhizobacterium *Arthrobacter agilis* produces dimethylhexadecylamine, a compound that inhibits growth of phytopathogenic fungi in vitro. *Protoplasma* 250, 1251–1262. doi: 10.1007/s00709-013-0506-y
- Venturi, V., and Fuqua, C. (2013). Chemical signaling between plants and plant pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 51, 17–37. doi: 10.1146/annurev-phyto-082712-102239
- Wang, L., Jeon, B., Sahin, O., and Zhang, Q. (2009). Identification of an arsenic resistance and arsenic-sensing system in *Campylobacter jejuni*. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 5064–5073. doi: 10.1128/AEM.0149-09
- Waters, C. M., and Bassler, B. L. (2005). Quorum sensing: Cell-to-cell communication in bacteria. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21, 319–346. doi: 10.1146/annurev.cellbio.21.012704.131001
- Whiteley, M., Diggle, S. P., and Greenberg, E. P. (2017). Progress in and promise of bacterial quorum sensing research. *Nature* 551, 313–320. doi: 10.1038/nature24624

- Xie, S., Zang, M., Wu, H., Rajer, F. U., and Gao, X. (2018). Antibacterial effects of volatiles produced by *Bacillus* strain D13 against *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae*. *Mol. Plant Pathol.* 19, 49–58. doi: 10.1111/mpp.12494
- Xu, G. (2020). Evolution of LuxR solos in bacterial communication: Receptors and signals. *Biotechnol. Lett.* 42, 181–186. doi: 10.1007/s10529-019-02763-6
- Yang, L. L., Liu, H. C., Liu, Q., and Xin, Y. H. (2021). *Arthrobacter cheniae* and *Arthrobacter frigidicola* sp. nov., isolated from a glacier. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 71:5177. doi: 10.1099/ijsem.0.005177
- Zavilgelsky, G. B., and Manukhov, I. V. (2001). Quorum sensing, or how bacteria “talk” to each other. *Mol. Biol.* 35, 224–232. doi: 10.1023/A:1010439501530
- Zhang, L., Jia, Y., Wang, L., and Fang, R. (2007). A proline iminopeptidase gene upregulated in planta by a LuxR homologue is essential for pathogenicity of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Mol. Microbiol.* 65, 121–136. doi: 10.1111/j.1365-2958.2007.05775.x

Capítulo 2

Transformación genética por electroporación de *Arthrobacter* sp. UMCV2 con los vectores pART2 y pART3

Martha Patricia Chávez-Moctezuma¹, Gustavo Santoyo², Eduardo Valencia-Cantero³

^{1,2,3}Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, México

RESUMEN

El género *Arthrobacter* comprende un grupo de bacterias Gram-positivas que es conocido por su capacidad para biodegradar compuestos orgánicos naturales y artificiales en el ambiente, además de producir enzimas importantes para la industria. La cepa *Arthrobacter* sp. UMCV2, es una rizobacteria, promotora del crecimiento vegetal a través de la emisión del compuesto orgánico volátil *N*, *N*-dimetilhexadecilamina (DMHDA), cuyo genoma se ha secuenciado y muestra la presencia de genes con secuencias homólogas a genes *luxR* solos, que podrían codificar para probables moduladores de la respuesta de la bacteria a moléculas de percepción de quorum para su adaptación al medio ambiente. Estos genes se han designado como auto-inducer-related Regulator (*airR*), e inducen motilidad *swarming* y la expresión de dichos genes, cuando la cepa es expuesta al compuesto DMHDA, producido por la propia bacteria. Sin embargo, debido a la escasez de herramientas para la manipulación genética de *Arthrobacter*, solo pocas especies se han investigado a nivel molecular. En este estudio, se establecieron las condiciones para la transformación genética por electroporación de *Arthrobacter* sp. UMCV2, haciendo modificaciones al procedimiento, como la adición de penicilina a las células durante la fase temprana de crecimiento, además de adicionar sorbitol 0.5 M en la solución de glicerol al 10% para la preparación de las células competentes, y en el medio de recuperación de las células, incubando durante 8 h. La tasa de transformación varió dependiendo de los parámetros eléctricos y de la concentración de DNA. Usando estas condiciones de electroporación se alcanzó una eficiencia de 2.8×10^4 transformantes/ μg del plásmido pART2 y 1.5×10^4 transformantes/ μg del plásmido pART3. Este constituye el primer reporte sobre la transformación genética por electroporación de la cepa *Arthrobacter* sp. UMCV2

Palabras Clave: *Arthrobacter*, transformación genética, plásmidos pART2 y pART3

ABSTRACT

The *Arthrobacter* genus encompasses a group of Gram-positive bacteria known for their ability to biodegrade natural and artificial organic compounds in the environment and to produce important enzymes used in the industry. The *Arthrobacter* sp. UMCV2 strain is a rhizobacteria that promotes plant growth through the emission of the volatile organic compound *N*, *N*-dimethylhexadecylamine (DMHDA), whose genome has been sequenced and shows the presence of genes with sequences homologous to *luxR* solos genes. Such genes could codify for probable modulators of the bacterium's response to *quorum sensing* molecules, fostering its environmental adaptation. These genes have been designated as auto-inducer-related Regulators (*airR*) as, when the strain is exposed to the self-produced DMHDA compound, they induce *swarming* motility and their own self-expression. However, due to the scarcity of tools for the genetic manipulation of *Arthrobacter*, only a few species have been investigated at the molecular level. This study establishes the requirements for the genetic transformation by electroporation of *Arthrobacter* sp. UMCV2. Our proposed modifications to the standard procedure include: the addition of penicillin to the cells during the early growth phase, the addition of sorbitol 0.5 M in the 10% glycerol preparation solution for the competent cells, as well as its addition to the cell recovery medium, with an 8 h incubation time. The transformation rate also varied depending on the electrical parameters and the DNA concentration. Using these electroporation conditions, we achieved an efficiency of 2.8×10^4 transformants/ μg for the pART2 plasmid and 1.5×10^4 transformants/ μg for the pART3 plasmid. This is the first report on the genetic transformation by electroporation of the *Arthrobacter* sp. UMCV2 strain.

Keywords: *Arthrobacter*, genetic transformation, pART2 and pART3 plasmids

I. INTRODUCCIÓN

Los miembros del género *Arthrobacter* son bacterias Gram-positivas, con forma de bastón en su fase exponencial de crecimiento y forma de coco en su fase estacionaria; son capaces de crecer tanto en condiciones aerobias como anaerobias y pertenecen al Phylum Actinobacteria. Diferentes especies de *Arthrobacter* producen enzimas importantes para la industria y para la estimulación del crecimiento vegetal, denotando su importancia para la agricultura y la biotecnología (Singh et al., 2016). Por ejemplo, *Arthrobacter* sp. CGMCC 3584 es capaz de producir altos rendimientos de adenosín monofosfato cíclico, por lo que esta cepa es utilizada a nivel industrial para la producción de AMPc. (Niu, et al., 2020).

En plantas que crecen en suelos salinos, en sequía, contaminados y con bajo contenido de nutrientes, especies de *Arthrobacter* ejercen efectos benéficos al proteger del estrés abiótico y mejorar la nutrición, la salud y el rendimiento de estas (Krishnan et al., 2016). Por ejemplo, se ha evaluado la tolerancia a la salinidad en plantas de guisantes mediante la reducción de los niveles de etileno a través de la inoculación de cepas de *Arthrobacter protophormiae*; estas bacterias también promueven el crecimiento de las plantas mejorando su colonización por otras bacterias benéficas como *Rhizobium leguminosarum*, la colonización tripartita actúa sinérgicamente para inducir un mecanismo contra el estrés salino (Barnawal et al., 2014).

Este grupo de bacterias es conocido también por su capacidad para degradar compuestos orgánicos naturales y artificiales en el ambiente. Miembros del género existen ubicuamente tanto en suelos comunes como en ambientes extremos, incluyendo hielo marino antártico, áreas contaminadas con metales, sitios contaminados con productos químicos y entornos radiactivos (Mongodin et al., 2006; Nordin et al., 2005; Fredrickson et al., 2004; Strong et al., 2002; Fong et al., 2001).

La prevalencia ambiental de *Arthrobacter* y sus potenciales aplicaciones industriales resultan de interés para el diseño de métodos de manipulación genética y mejora de estas cepas (Zhang et al., 2011).

La transformación genética de microorganismos en el laboratorio, es una técnica rutinaria de enorme utilidad para estudios de genética básica y aplicada. La electroporación, en la cual un pulso de alta intensidad produce poros transitorios en la

membrana celular y, por lo tanto, facilita la captación de ADN exógeno, es un rápido y ampliamente utilizado método de transformación (Zhang et al., 2011). A la fecha, existen solo pocos reportes de electroporación de cepas de *Arthrobacter*. Morikawa (1994), reportó el primer ejemplo de transformación genética por electroporación de la cepa de *Arthrobacter* sp. MIS38, con una eficiencia de transformación de 3.0×10^5 transformantes/ μg de DNA de plásmido, el cual ha servido como punto de partida para realizar trabajos subsecuentes de ingeniería genética en esta actinobacteria. A partir de este primer reporte, se han descrito varios métodos para introducir ADN en esta bacteria, estos incluyen el método de electroporación para *Arthrobacter* sp. A3, optimizando la concentración de DNA, el tiempo de recuperación de las células y los parámetros eléctricos, entre otros factores, con lo que se alcanzó una eficiencia de 6.8×10^7 transformantes/ μg de DNA de plásmido, además se incluyó a *A. globiformis*, *A. nicotinovorans*, *A. aurescens* y *A. crystallopojetes* (Zhang et al., 2011). También se ha reportado la transformación por electroporación para *Arthrobacter simplex* CPCC 140451, con resultado de 3.76×10^4 transformantes/ μg de DNA, examinando factores que afectan la eficiencia de transformación como, la fase celular de crecimiento del microorganismo, condiciones de tratamiento con compuestos debilitadores de la pared celular, cantidad de DNA de plásmido, entre los parámetros principales de electroporación (Luo, et al., 2018), pero ninguna de estas cepas en el clado al que pertenece *Arthrobacter* sp. UMCV2.

Las bacterias se comunican entre sí para su adaptación y sobrevivencia en el medio ambiente (Mukherjee y Bassler, 2019). El sistema representativo de comunicación bacteriana es la percepción de quorum (QS), que se basa en la producción de moléculas que actúan como señales químicas llamadas autoinductores, para regular la expresión de genes en respuesta a cambios en la densidad de la población bacteriana (Fuqua et al., 1994). El sistema canónico *luxI-luxR* es típicamente el componente central de QS en bacterias Gram-negativas (Whiteley et al., 2017), pero raramente está presente en bacterias Gram-positivas, los reguladores transcripcionales LuxR *solo* (que no están asociados a un homólogo LuxI), son moléculas clave para la comunicación intercelular, que pueden permitir a estas bacterias percibir señales químicas (Rajput y Kumar, 2017).

Arthrobacter sp. UMCV2 es una actinobacteria (Gram-positiva), aislada de la rizósfera de plantas de maíz (Valencia-Cantero et al., 2007), cuyo genoma se ha secuenciado y muestra la presencia de genes con secuencias homólogas a genes *luxR*, que podrían codificar para probables moduladores de la respuesta de la bacteria a moléculas de QS para su adaptación al medio ambiente. Esta cepa de *Arthrobacter* promueve el crecimiento vegetal a través de la emisión de compuestos orgánicos volátiles (COVs), principalmente *N, N*-dimetilhexadecilamina (DMHDA) (Velázquez-Becerra et al., 2011). La DMHDA emitida por *Arthrobacter* sp. UMCV2 se acumula en el medio extracelular y modula el crecimiento y motilidad *swarming* de *Arthrobacter* sp. UMCV2 y otras bacterias (Velázquez-Becerra et al., 2013; Martínez-Cámara et al., 2020).

El presente estudio tiene como objetivo la transformación genética de *Arthrobacter* sp. UMCV2 por ser un requisito previo para la obtención de cepas mutantes en los genes relacionados a *luxR* solos, que han sido designados como auto-inducer-related Regulator (*airR*), e inducen motilidad *swarming* y la expresión de dichos genes, cuando la cepa es expuesta al compuesto DMHDA, producido por la propia bacteria, para determinar la capacidad de los reguladores transcripcionales AirR para modular la respuesta a quorum de la bacteria. La manipulación genética de esta ha resultado compleja, debido a que un protocolo adecuado de transformación para *Arthrobacter* sp. UMCV2 no se había reportado.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Reactivos y medios de cultivo

Los medios de cultivo utilizados o sus componentes se adquirieron de los laboratorios Bioxon de México S.A., o Sigma Chemical Corporation, estos fueron:

Caldo nutritivo (CN): Peptona de caseína 5.0 g, extracto de carne 3.0 g y agua destilada cbp 1 L. Se utilizó para el crecimiento de bacterias.

Agar nutritivo (AN): La misma preparación del caldo y se le agregaron 15 g/L de agar bacteriológico. Se utilizó para el crecimiento de *Arthrobacter* sp. UMCV2 y *Escherichia coli* JM101.

Caldo Luria Bertani (CL): NaCl 1%, peptona de caseína 1% y extracto de levadura 0.5%. Se empleó para crecimiento de bacterias para el aislamiento de DNA.

Agar Luria Bertani (AL): Al caldo Luria se le agregó 1.5% de agar bacteriológico. Se utilizó para crecer las bacterias luego de la transformación y para la resiembra de las mismas.

A los medios de cultivo se agregó el antibiótico Kanamicina (Km) para la selección de bacterias que portaran los plásmidos recombinantes, a concentración final de 140 µg/mL en el caso de *Arthrobacter* sp. UMCV2 y 20 µg/mL para *E. coli* JM101.

2.2. Cepas empleadas

Arthrobacter sp. UMCV2 (Valencia-Cantero et al., 2007), dicha cepa se depositó en la Colección de Microorganismos del Centro Nacional de Recursos Genéticos (Boulevard de la Biodiversidad 400, Rancho las Cruces, 47600 Tepatitlán de Morelos, Jalisco, México), y fue cultivada rutinariamente a 22 °C.

E. coli JM101 (Yanisch-Perron et al., 1985). Cepa que se empleó como control positivo de transformación y para la preparación de plásmidos. Fue cultivada rutinariamente a 37 °C.

2.3. Vectores

Los vectores pART2 y pART3, utilizados en este estudio, fueron amablemente proporcionados por el D.C. Marius Mihasan (Universidad Alexandru Ioan Cuza, Iași,

Rumania). pART2 es un vector para expresión constitutiva de genes, mientras que, pART3 además contiene el gen *hnoR* y es un vector para expresión inducible de genes.

Estos tienen un tamaño de 4.6 y 5.4 Kb, respectivamente, y contienen un gen de resistencia a kanamicina y orígenes de replicación para *Corynebacterium glutamicum* (para la actinobacteria) (pCG100) y *E. coli* (ColE1) (**Figura 1**) (Sandu et al., 2005).

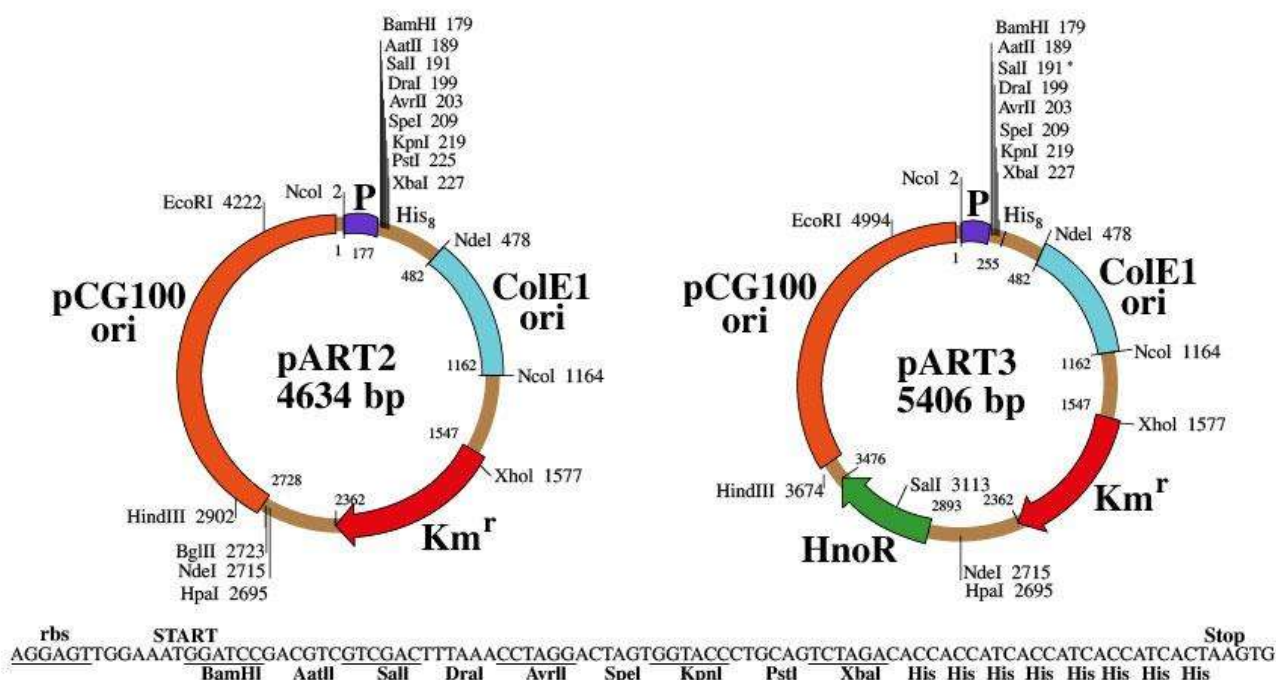


Figura 1. Mapas de DNA de los plásmidos pART2 y pART3. Las características de los plásmidos son las siguientes: pCG100 y ColE1, orígenes de replicación; Kan^r , gen de resistencia a kanamicina; P, promotor/operator; MCS, sitio de clonación múltiple; His_8 , secuencia que codifica una etiqueta de ocho histidinas; y tamaño del plásmido en pares de bases (pb). Se presentan los sitios de restricción importantes, incluidos los sitios de restricción únicos y su localización. pART3, además contiene el gen represor *hdnO* de (*hnoR*). La secuencia inferior muestra las características siguientes: rbs, sitio de unión al ribosoma; ATG, codón de inicio de la traducción; MCS con nueve sitios de restricción única; secuencia codificante para la etiqueta His_8 ; y TAA, codón de paro de la traducción (Modificada de Sandu et al., 2005).

2.4. Análisis de plásmidos

2.4.1. Aislamiento de DNA plasmídico

El aislamiento del DNA plasmídico se realizó mediante el método de lisis alcalina (adaptado Birnboim y Doly, 1979), con base al protocolo siguiente:

Se creció un cultivo bacteriano en CL durante 18 h con agitación constante a 220 rpm, se distribuyó en tubos Eppendorf de 1.5 mL y se centrifugó durante 2 min a 12,000 rpm a temperatura ambiente. Enseguida se decantó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 100 µL de solución STE (Sacarosa 50 mM; Tris-HCl 25 mM, pH 8.0 y EDTA 10 mM, pH 8.0). Inmediatamente se le adicionaron 20 µL de una solución de lisozima (20 mg/mL), se mezcló ligeramente y se incubó a 37 °C durante 5 min. Posteriormente se le agregaron 300 µL de la solución de lisis recién preparada con hidróxido de sodio (NaOH) 0.2 N y dodecil sulfato de sodio (SDS) 1%, se agitó suavemente y se colocó en hielo durante 5 min. Luego se adicionaron 200 µL de una solución de acetato de potasio 5 M, ajustada a pH 4.8 con ácido acético glacial, se mezcló ligeramente y se colocó en hielo durante 10 min. Se centrifugó durante 5 min a 12,000 rpm a temperatura ambiente. Posteriormente con un palillo estéril se retiraron los restos celulares. Al sobrenadante se le adicionaron 500 µL de una mezcla de fenol/cloroformo (1:1), se mezcló moderadamente y se centrifugó durante 10 min a 12,000 rpm. Se recuperó la fase acuosa superior a la que se le adicionó 1 mL de etanol absoluto frío y se mantuvo durante 20 min a -80 °C. Se centrifugó durante 15 min a 12,000 rpm. Se desechó el sobrenadante y el sedimento se lavó dos veces con 500 µL de etanol al 70%, centrifugando durante 1 min entre cada lavado. Se secó la pastilla a 65 °C y se resuspendió en 50 µL de agua desionizada estéril. Se agregó 1 µL de RNAsa (Invitrogen) y se incubó a temperatura ambiente durante 15 min. Las muestras obtenidas se almacenaron a -20 °C o fueron sometidas a corrimiento electroforético en geles de agarosa al 1% (peso/volumen).

2.4.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en colonia

Se amplificó por PCR el gen de resistencia kanamicina de los plásmidos pART2 y pART3, utilizando los oligonucleótidos directo 5'-ATGAGCCATATTCAACGGGAAACG-3' y reverso 5'-TTAGAAAACTCATCGAGCATC-3', respectivamente, para originar un producto de amplificación de 816 pb (Zhang et al., 2011). Se tomó una sola colonia crecida sobre una placa de AL con Km, se resuspendió en 50 µL de agua desionizada estéril y se hirvió por 15 min. Un microlitro de esta muestra se utilizó como DNA molde

para una reacción de PCR. Alícuotas de 5 µL de los productos de PCR se sometieron a corrimiento electroforético en gel de agarosa al 1% (peso/volumen). El DNA de los plásmidos pART2 y pART3 y el de *Arthrobacter* sp. UMCV2, se emplearon como los controles positivo y negativo, respectivamente.

2.5. Electroforesis en geles de agarosa

La separación del DNA plasmídico y de los productos de PCR se realizó en geles de agarosa (Sigma) al 1% (p/v), empleando como amortiguador TAE (Tris-acetato 0.04 M y EDTA 1 mM). El gel se depositó en una cámara de electroforesis horizontal, que contenía el mismo amortiguador. Una muestra de 4 µL de DNA plasmídico se mezcló con 2 µL de amortiguador de carga (Promega), [Blue/Orange Loading Dye, 6X, conteniendo naranja G 0.4%, azul de bromofenol 0.03%, xileno cianol FF 0.03%, Ficol® 400 al 15%, Tris-HCl (pH 7.5) 10 mM y EDTA (pH 8.0) 50 mM] y se colocaron en los orificios del gel. La cámara se sometió a un voltaje constante de 95 voltios por un periodo de 45 min. Posteriormente las bandas teñidas con Bromuro de etidio (añadido previamente a la agarosa, a concentración de 1 µg/mL) se observaron en un transiluminador de luz UV de onda corta (BioRad). Como marcador de tamaño molecular se utilizó el marcador de 1Kb (Promega).

2.6. Restricción con endonucleasas

El DNA de los plásmidos se digirió utilizando una unidad de endonucleasa de restricción (Promega) por cada µg de DNA y se incubó a 37 °C durante toda la noche. Posteriormente se realizó el corrimiento electroforético de las mezclas de restricción en geles de agarosa al 1% para determinar el tamaño de los plásmidos.

2.7. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

El procedimiento de amplificación del gen de Kanamicina de los plásmidos se llevó a cabo utilizando 1 µL de DNA, 7.5 µL de mezcla de reacción Go Taq® G2 Green Master Mix (Promega), que contiene la enzima Taq polimerasa suministrada en amortiguador 2X (pH 8.5), dNTPs 400 µM y MgCl₂ 3 mM, 1 µL de cada oligonucleótido en sentido y reverso y H₂O libre de nucleasas para un volumen final de 15 µL.

2.8. Transformación por electroporación

2.8.1. Preparación de células electrocompetentes de *E. coli* JM101

Para la preparación de las células electrocompetentes a emplear, se realizó el protocolo siguiente: un inóculo del 0.1% de un pre-cultivo en fase estacionaria de *E. coli* crecido en CL fue inoculado en medio fresco y cultivado a 37 °C con agitación constante, hasta obtener una absorbencia de 0.6 a 590 nm. Posteriormente, el cultivo fue rápidamente colocado en baño de hielo-agua durante 20 min y las células fueron cosechadas por centrifugación a 6,000 rpm por 10 min a 4 °C. Seguido de tres lavados con glicerol al 10% frío, y concentrando las células 100 veces en el último lavado. Finalmente, la suspensión celular se distribuyó en alícuotas de 100 µL y fueron almacenadas a -80 °C.

2.8.2. Preparación de células electrocompetentes de *Arthrobacter* sp. UMCV2

Se prepararon células electrocompetentes siguiendo el protocolo descrito por Zhang et al., (2011) con algunas modificaciones. Un inóculo del 1% de un pre-cultivo en fase estacionaria de *Arthrobacter* sp. UMCV2 en CN, fue inoculado en medio fresco y cultivado a 22 °C, con agitación constante. Cuando la densidad óptica (D.O.) alcanzó entre 0.3-0.5 a 600 nm, se añadió penicilina G a una concentración final de 30 µg/mL y se continuó el cultivo durante una hora adicional. Después, el cultivo fue rápidamente colocado en baño de hielo-agua por al menos 10 min y las células fueron cosechadas por centrifugación a 5,000 rpm, por 15 min a 4 °C. Seguido de tres lavados en buffer de electroporación (glicerol al 10% adicionado con 0.5 M de sorbitol) frío, y concentrando las células 100 veces en el último lavado. Finalmente, la suspensión celular se distribuyó en alícuotas de 50 µL y fueron almacenadas a -80 °C.

2.8.3. Transformación por electroporación de *E. coli* JM 101

La transformación con DNA de plásmido se realizó mediante el método de electroporación, que se describe a continuación: se descongelaron las células electrocompetentes en hielo, se mezclaron 100 µL de las células con 100 ng de DNA de los plásmidos pART2 y pART3, respectivamente, y cada una de estas mezclas se transfirió a una celda de electroporación (0.1 cm, Eppendorf) fría. Se ajustó el micropulso

a 18 kV/cm, la celda se colocó en la cámara deslizable de un electroporador Eppendorf y se dio un pulso de 4-5 milisegundos. Inmediatamente después del pulso eléctrico, cada suspensión de células fue transferida a un tubo Eppendorf con 800 μ L de CL y se incubó a 37 °C por 1 h con agitación constante a 120 rpm. Para la selección de las células transformantes, se tomaron 100 μ L de cada una de las mezclas previamente concentradas por centrifugación a 12,000 rpm y se distribuyeron en cajas de AL con Kanamicina.

2.8.4. Transformación por electroporación de *Arthrobacter* sp. UMCV2

El protocolo de electroporación que se utilizó fue el siguiente: después de descongelar las células electrocompetentes en hielo, se mezclaron 50 μ L de las células con 100 ng de DNA de los plásmidos pART2 y pART3, respectivamente, y cada una de estas mezclas se transfirió a una celda de electroporación (0.1 cm, Eppendorf) fría, a la que se dio un solo pulso de 4-5 milisegundos utilizando un electroporador Eppendorf, ajustado a 15 kV/cm. Inmediatamente después del pulso eléctrico, cada suspensión de células fue transferida a un tubo Eppendorf con 800 μ L de medio de recuperación (CL conteniendo 0.5 M de sorbitol) y se incubó a 22 °C por 8 h con agitación constante a 120 rpm. Para la selección de las células transformantes, se tomaron 100 μ L de cada una de las mezclas previamente concentradas por centrifugación a 12,000 rpm, y se distribuyeron en cajas de AL con Kanamicina. Con cada experimento, se realizó el control negativo omitiendo la adición de DNA de plásmido. La eficiencia de transformación se definió como el número de colonias obtenidas por microgramo de DNA utilizado.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Transformación de *E. coli* JM101

La transformación genética es un proceso mediante el cual una célula puede captar moléculas de DNA libre y las mantiene en su interior como un replicón extracromosómico o las incorpora a su genoma por recombinación homóloga. Pocas bacterias pueden incorporar activamente DNA exógeno mediante una capacidad genéticamente programada denominada competencia natural (Sinha y Redfield, 2012). Sin embargo, se han desarrollado algunos procedimientos *in vitro* que hacen posible introducir DNA en organismos no relacionados genéticamente. La electroporación es un método de transformación artificial que utiliza un pulso eléctrico para crear poros transitorios en la membrana citoplasmática (estado de competencia), para facilitar la captación de DNA (Dower et al., 1988). Por otra parte, la introducción de un vector plasmídico en una célula bacteriana constituye la primera etapa para la manipulación genética de esta y la bacteria Gram-negativa *E. coli*, es ampliamente utilizada en este tipo de estudios por tener la capacidad de duplicarse cada 20 minutos, y porque las herramientas disponibles para esta son de fácil manipulación, ya que no posee requerimientos costosos asociados a medios de cultivo o equipamiento.

Por ello, con el propósito de establecer las condiciones de electroporación, utilizando los vectores pART2 y pART3, se realizó primero la transformación en *E. coli* JM101, que se empleó como control positivo del procedimiento, utilizando las condiciones estándar del método ya reportado (Green y Sambrook, 2020). Además, estos plásmidos poseen un gen que codifica resistencia al antibiótico Kanamicina, que permitió seleccionar las colonias transformantes, ya que la replicación y la expresión de la resistencia a antibióticos son requerimientos evidentes para una transformación exitosa de plásmidos, en muchos casos los sistemas de modificación-restricción pueden representar barreras para la transformación (Miller, 1994). Con estos plásmidos se obtuvo una eficiencia de transformación de 3.8×10^6 transformantes/ μg de DNA con el plásmido pART2 y de 3.0×10^6 transformantes/ μg de DNA con el plásmido pART3. En la **Figura 2A**, se observa el crecimiento de la cepa transformada con pART2 y pART3, respectivamente, en placas de AL. Con la obtención de las cepas transformantes de *E. coli* se guardó la información

genética de los vectores en una célula bacteriana, la cual puede almacenarse por largo periodo de tiempo.

3.2. Transformación de *Arthrobacter* sp UMCV2

Arthrobacter sp. UMCV2, es una bacteria Gram-positiva, y su pared celular intacta se considera una fuerte barrera para la entrada de DNA (Dunny et al., 1991). El tratamiento de la célula con agentes debilitadores de la pared celular, como glicina, treonina, lisozima o penicilina, es uno de los métodos más efectivos para mejorar la eficiencia de electroporación (Sunairi et al., 1996).

Para establecer las condiciones de transformación de *Arthrobacter* sp. UMCV2, se realizaron modificaciones al método de electroporación con base al protocolo reportado por Zhang et al., (2011). Estas consistieron en agregar penicilina G a una concentración final de 30 µg/mL, como agente debilitador de la pared celular bacteriana, además de la adición de sorbitol 0.5 M en la solución de glicerol al 10%, para la preparación de las células competentes. Igualmente, se utilizó CL adicionado con 0.5 M de sorbitol para la recuperación de las células después de la electroporación, utilizando un periodo de recuperación de las células más largo, incubando por 8 h. Por otro lado, también fue reportado por Zhang et al., 2011, que la concentración de DNA es otro factor clave para incrementar la eficiencia de transformación, obteniendo un aumento en el número de transformantes incrementando la cantidad de DNA, sin embargo, concentraciones por arriba de 1000 ng, condujeron a una significativa disminución de la eficiencia de transformación. Por lo que, en el presente estudio, con base a lo reportado, se utilizaron 100 ng de DNA para la transformación de *Arthrobacter* sp. UMCV2, concentración que fue suficiente para la obtención de las transformantes.

Para las células sin tratamiento no se obtuvieron colonias transformantes, sin embargo, se obtuvo una eficiencia de transformación de 2.8×10^4 transformantes/µg de DNA del plásmido pART2, y de 1.5×10^4 transformantes/µg de DNA del plásmido pART3, utilizando las modificaciones mencionadas. En la **Figura 2B**, se observa el crecimiento de la actinobacteria transformada con los vectores pART2 y pART3, respectivamente, sobre placas de AL. Con estos resultados, se determinó que estos vectores son

funcionales en *Arthrobacter* sp. UMCV2 y se establecieron las condiciones para la manipulación genética de este microorganismo.

3.3. Confirmación de la transformación por restricción de los vectores

La mayoría de los vectores proceden de plásmidos, que son moléculas de DNA extracromosómico que se encuentran de manera natural en las bacterias.

Los vectores cumplen con ciertas propiedades que los hacen ideales para almacenar y replicar la información genética : 1) Poseen un pequeño tamaño que oscila entre 3,000 y 10,000 pares de bases (pb), que permite que su DNA sea manipulado con facilidad; 2) tienen un origen de replicación autónomo, de manera que su replicación en la célula ocurre de manera independiente del control directo del cromosoma; 3) generalmente, tienen alto número de copias (de 500 a 700 copias por célula), lo que genera DNA en gran cantidad; 4) contienen sitios únicos para el corte con enzimas de restricción diferentes, que se usan para insertar en esta región (sitio de clonación múltiple) un gen o secuencias de DNA de interés o para determinar el tamaño del plásmido y 5) cuentan con genes que permiten identificar las células que hayan incorporado el vector, siendo los más utilizados los genes que confieren resistencia a los antibióticos (Chávez-Moctezuma, 2017).

Por otro lado, conociendo el mapa de DNA de los vectores pART2 y pART3 (**Figura 1**), fue posible cortar en sitios específicos estas moléculas con enzimas de restricción, ya que en este se localizan las posiciones de corte para cada una de las distintas enzimas. Después, los fragmentos de DNA producto de la restricción pudieron separarse por electroforesis en gel de agarosa, el cual se calibró utilizando como marcadores moléculas de DNA de tamaño conocido y de esta manera fue posible determinar el tamaño de los vectores.

De colonias obtenidas de la transformación de células competentes de *E. coli* y de *Arthrobacter* sp. UMCV2, se hizo el aislamiento de DNA de plásmido como se describe en materiales y métodos. La presencia y el tamaño de los plásmidos pART2 y pART3 fueron verificados por digestión con las enzimas de restricción *Hind*III, *Bam*HI y *Eco*RI, con las cuales se observó la presencia de estos de aproximadamente 4.6 y 5.4 kb, respectivamente (**Figuras 3A y 3B**). Confirmando la transformación de las cepas

bacterianas por el aislamiento de los vectores de colonias crecidas en medio de cultivo adicionado con el antibiótico Km como marcador de selección.

3.4. Confirmación de la transformación por PCR en colonia

El PCR en colonia es un método simple y rápido para distinguir a través de un número potencialmente grande de colonias transformantes, cuales contienen realmente el plásmido de nuestro interés. Esta técnica aprovecha la alta sensibilidad de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), ya que se requiere una muy pequeña cantidad de DNA molde obtenida de células crudas, para visualizar una banda en un gel de agarosa después de la amplificación (Bergkessel y Guthrie, 2013). En algunos casos, esta es una alternativa a la estrategia de crecer pequeños cultivos de varias colonias para obtener microgramos de DNA de cada uno para realizar análisis de restricción de los plásmidos, sin embargo, puede también complementar esta técnica, ya que el DNA aislado de diferentes colonias puede ser utilizado para transformaciones o clonaciones posteriores.

Para validar la autenticidad de la transformación de *Arthrobacter* sp. UMCV2, se seleccionaron al azar colonias obtenidas de la transformación por electroporación, para realizar de estas, amplificación por PCR en colonia, como se describe en materiales y métodos. Como se muestra en la **Figuras 4A y 4B**, en todas las colonias transformantes examinadas se obtuvo la amplificación del fragmento de 816 pb correspondiente al gen de kanamicina de los plásmidos pART2 y pART3. Estos resultados permitieron verificar definitivamente la transformación por electroporación de esta cepa de *Arthrobacter*.

Con este trabajo, se establecieron las condiciones iniciales óptimas para la transformación por electroporación de *Arthrobacter* sp. UMCV2, constituyendo el primer reporte de manipulación genética de esta actinobacteria. Además, se sentaron las bases experimentales para realizar estudios sobre la capacidad de los reguladores AirR para modular la respuesta a quorum de esta bacteria, teniendo como perspectiva, la obtención de cepas mutantes en los genes relacionados a *luxR* (*airR*) que permitirán dilucidar su función ecológica.

IV. CONCLUSIÓN

Se establecieron las condiciones para la transformación por electroporación de *Arthrobacter* sp. UMCV2, constituyendo el primer reporte sobre la manipulación genética de esta actinobacteria.

A)*Escherichia coli*

pART2



pART3

B)*Arthrobacter* sp. UMCV2

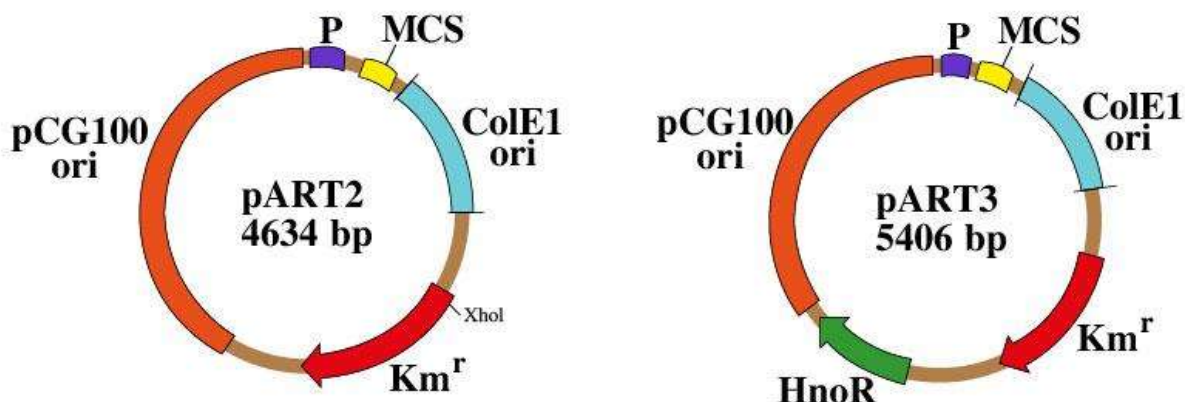
pART2



pART3

Figura 2. Cepas transformadas de *E. coli* JM101 y *Arthrobacter* sp. UMCV2. A) Fotografías de *E. coli* JM101 transformada con los plásmidos pART2 y pART3, respectivamente, en placas de AL con 20 µg/mL de Km, con incubación a 37 °C por 20 h. **B)** Fotografías de *Arthrobacter* sp. UMCV2 transformada con los mismos plásmidos, en placas de AL con 140 µg/mL de Km, con incubación a 22 °C por 72 h.

A)



B)

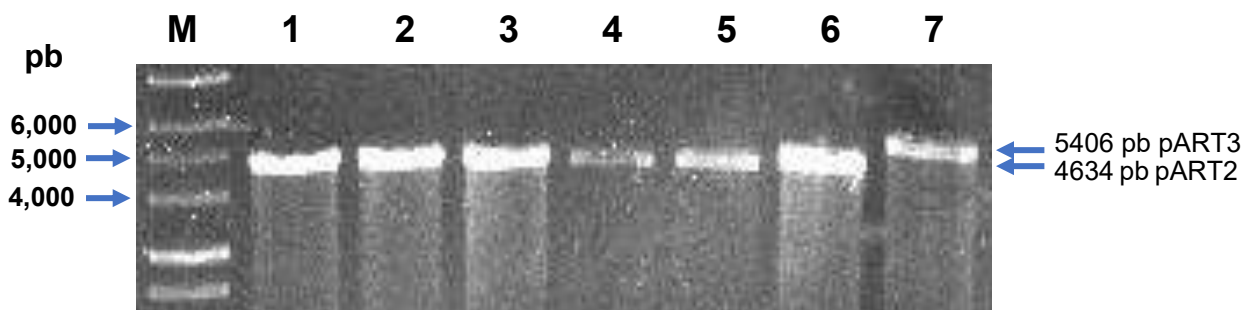


Figura 3. Confirmación de las transformantes por restricción de los vectores. A) Esquema que representa el tamaño de los plásmidos pART2 y pART3 (pb). B) Fotografía del gel de agarosa que muestra el análisis de restricción de los plásmidos. **M**, marcador de tamaño molecular (1 kb); carriles **1**, **2**, y **3**, restricción pART2 en *E. coli* JM101 con enzimas *Hind*III, *Bam*HI y *Eco*RI; carriles **4** y **5**, restricción pART2 en *Arthrobacter* sp. UMCV2 con enzimas *Hind*III y *Bam*HI; carriles **6** y **7**, restricción pART3 en *Arthrobacter* sp. UMCV2 con enzimas *Hind*III y *Bam*HI. A la izquierda se indican los tamaños de las bandas del marcador utilizadas como referencia y a la derecha se indica el tamaño de los plásmidos.

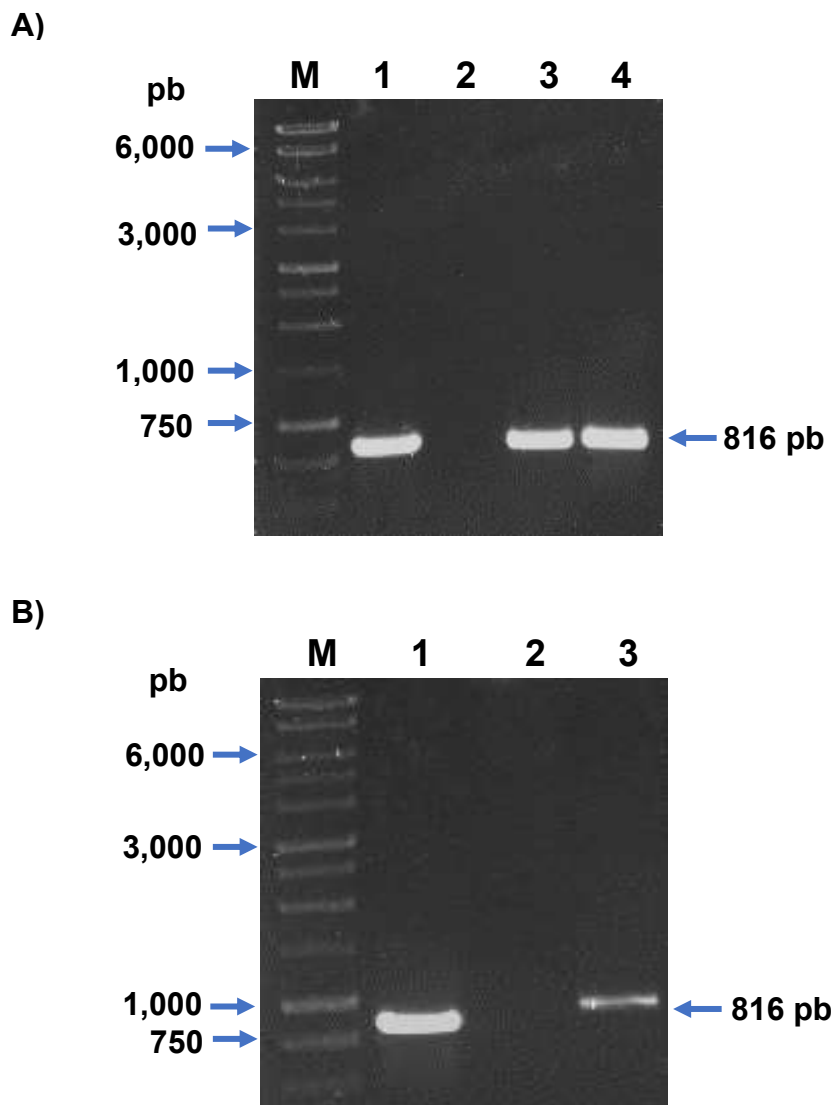


Figura 4. Confirmación de las transformantes de *Arthrobacter* sp. UMCV2 por PCR en colonia. A) Fotografía del gel de agarosa que muestra la amplificación del gen de kanamicina de pART2. **M**, marcador de tamaño molecular (1 kb); carril **1**, amplificación del gen de Km del plásmido, control (+); carril **2**, amplificación del gen de Km en *Arthrobacter* sp. UMCV2, control (-); carriles **3** y **4**, amplificación del gen de Km de pART2 en *Arthrobacter* sp. UMCV2. **B)** Fotografía del gel de agarosa de la amplificación del gen de kanamicina de pART3. **M**, marcador de tamaño molecular (1 kb); carril **1**, amplificación del gen de Km del plásmido, control (+); carril **2**, amplificación del gen de Km de *Arthrobacter* sp. UMCV2, control (-); carril **3**, amplificación del gen de Km de pART3 en *Arthrobacter* sp. UMCV2. En ambos casos, a la izquierda se indica los tamaños de las bandas del marcador utilizadas como referencia y a la derecha se indica el tamaño de la amplificación.

V. REFERENCIAS

Barnawal, D., Bharti, N., Maji, D., Chanotiya, C. S., and Kalra, A. (2014). ACC deaminase-containing *Arthrobacter protophormiae* induces NaCl stress tolerance through reduced ACC oxidase activity and ethylene production resulting in improved nodulation and mycorrhization in *Pisum sativum*. *J. Plant Physiol.* 171, 884-894. doi: 10.1016/j.jplph.2014.03.007

Bergkessel, M., and Guthrie, C. (2013). Colony PCR. *Methods in Enzymology*. 529, 299-309. doi.org/10.1016/B978-0-12-418687-3.00025-2

Birnboim, H. C., and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7, 1513–1523. doi: 10.1093/nar/7.6.1513

Chávez-Moctezuma, M. P. (2017). Tijeras y vectores moleculares: clonación de genes. *Saber Más*. 28: 28-31. <https://www.sabermas.umich.mx/archivo/articulos/243.tijeras-y-vectores-moleculares-clonacion-de-genes.html>

Dower, W. J., Miller, J. F., and Ragsdale, C. W. (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* 16, 6127–45. doi: 10.1093/nar/16.136127

Dunny, G. M., Lee, L. N., and LeBlanc, D. J. (1991). Improved electroporation and cloning vector system for gram-positive bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 1194–1201. doi: 10.1128/aem.57.4.1194-1201.1991

Fong, N. J., Burgess, M. L., Barrow, K. D., and Glenn, D. R. (2001). Carotenoid accumulation in the psychrotrophic bacterium *Arthrobacter agilis* in response to thermal and salt stress. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56, 750–756. doi: 10.1007/s002530100739

Fredrickson, J. K., Zachara, J. M., Balkwill, D. L., Kennedy, D., Li, S-m. W., Kostandarithes, H. M., Daly, M. J., Romine, M. F., Brockman, F. J. (2004).

Geomicrobiology of high-level nuclear waste-contaminated vadose sediments at the Hanford site, Washington state. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 4230-41. doi: 10.1128/AEM.70.7.4230-4241.2004

Fuqua, W. C., Winans, S. C., and Greenberg, E. P. (1994). Quorum sensing in bacteria: The LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J. Bacteriol.* 176, 269–275. doi: 10.1128/jb.176.2.269-275.1994

Green, M. R., and Sambrook, J. (2020). Transformation of *Escherichia coli* by electroporation. *Cold Spring Harb. Protoc.* 6, 101220. doi: 10.1101/pdb.prot101220

Krishnan, R., Menon, R. R., Tanaka, N., Busse, H-J., Krishnamurthi, S., Rameshkumar, N. (2016). *Arthrobacter pokalii* sp nov, a novel plant associated actinobacterium with plant beneficial properties, isolated from saline tolerant pokkali rice, Kerala, India. *PLoS One.* 11(3): e0150322. doi: 10.1371/journal.pone.0150322

Luo, J., Xue, H., Zhao, S., Liu, X., Chen, X., Liu, J., Shen, Y., and Wang, M. (2018). Optimization of electroporation conditions for *Arthrobacter simplex*. *Adv. Appl. Biotechnol.* 393-402. doi: 10.1007/978-981-10-4801-2_40

Martínez-Cámara, R., Montejano-Ramírez, V., Moreno-Hagelsieb, G., Santoyo, G., and Valencia-Cantero, E. (2020). The volatile organic compound dimethylhexadecylamine affects bacterial growth and swarming motility of bacteria. *Folia Microbiol.* 65, 523–532. doi: 10.1007/s12223-019-00756-6

Miller, J. F. (1994). Bacterial transformation by electroporation. *Methods Enzymol.* 235, 375-385. doi: 10.1016/0076-6879(94)35156-2

Mongodin, E. F., Shapir, N., Daugherty, S. C., DeBoy, R. T., Emerson, J. B., Shvartzbeyn, A., Radune, D., Vamathevan, J., Riggs, F., Grinberg, V., Khouri, H., Wackett, L. P., Nelson, K. E., Sadowsky, M. J. (2006). Secrets of soil survival revealed by the genome

sequence of *Arthrobacter aurescens* TC1. *PLoS Genet.* 2(12): e214. doi: 10.1371/journal.pgen.0020214

Morikawa, M., Daido, H., Pongpobpibool, S., and Imanaka, T. (1994). Construction of a new host-vector system in *Arthrobacter* sp. and cloning of the lipase gene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 42, 300–303. doi: 10.1007/BF00902732

Mukherjee, S., and Bassler, B. L. (2019). Bacterial quorum sensing in complex and dynamically changing environments. *Nat. Rev. Microbiol.* 17, 371-382. doi: 10.1038/s41579-019-0186-5

Niu, H., Sun, X., Song, J., Zhu, Ch., Chen, Y., Gao, N., Qu, X., Ying, H., and Liu, D. (2020). Knockout of *pde* gene in *Arthrobacter* sp. CGMCC 3584 and transcriptomic análisis of its effects on cAMP production. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 43, 839-850. doi: 10.1007/s00449-019-02280-w

Nordin, K., Unell, M., and Jansson, J. K. (2005). Novel 4-chlorophenol degradation gene cluster and degradation route via hydroxyquinol in *Arthrobacter chlorophenolicus* A6. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 6538-6544. doi: 10.1128/AEM.71.11.6538-6544.2005

Rajput, A., and Kumar, M. (2017). *In silico* analyses of conservational, functional and phylogenetic distribution of the LuxI and LuxR homologs in gram-positive bacteria. *Sci. Rep.* 7: 6969. doi: 10.1038/s41598-017-07241-5

Sandu, C., Bogdan-Calin, C., Sachelaru, P., and Brandsch, R. (2005). Plasmids for nicotine-dependent and-independent gene expresión in *Arthrobacter nicotinovorans* and other *Arthrobacter* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 8920-8924. doi: 10.1128/AEM.71.8920-8924.2005

Sinha, S., and Redfield, R. J. (2012). Natural DNA uptake by *Escherichia coli*. *PLoS One.* 7, e35620. doi: 10.1371/journal.pone.0035620

Singh, R. M., Gaba, S. Yadav, A. N., Gaur, P., Gulati, S., Kaushik, R., Saxena, A. K., (2016). First high quality draft genome sequence of a plant growth promoting and cold active enzyme producing psychrotrophic *Arthrobacter agilis* strain L77. *Stand. Genomic Sci.* 11, 54. doi: 10.1186/s40793-016-0176-4

Strong, L. C., Rosendahl, C., Johnson, G., Sadowsky, M. J., Wackett, L. P. (2002). *Arthrobacter aureescens* TC1 metabolizes diverse s-triazine ring compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 5973–5980. doi: 10.1128/AEM.68.12.5973-5980.2002

Sunairi, M., Iwabuchi, N., Murakami, K., Watanabe, F., Ogawa, Y., Murooka, H., and Nakajima M. (1996). Effect of penicillin G on the electroporation of *Rhodococcus rhodochrous* CF222. *Lett. Appl. Microbiol.* 22, 66–69. doi: 10.1111/j.1472-765x.1996.tb01110.x

Valencia-Cantero, E., Hernández-Calderón, E., Velázquez-Becerra, C., López-Meza, J. E., Alfaro-Cuevas, R., and López-Bucio, J. (2007). Role of dissimilatory fermentative iron-reducing bacteria in Fe uptake by common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants grown in alkaline soil. *Plant Soil.* 291, 263–273. doi: 10.1007/s11104-007-9191-y

Velázquez-Becerra, C., Macías-Rodríguez, L. I., Lopez-Bucio, J., Altamirano-Hernandez, J., Flores-Cortez, I., and Valencia-Cantero, E. (2011). A volatile organic compound analysis from *Arthrobacter agilis* identifies dimethylhexadecylamine, an amino-containing lipid modulating bacterial growth and *Medicago sativa* morphogenesis in vitro. *Plant Soil.* 339, 329–340. doi: 10.1007/s11104-010-0583-z

Velázquez-Becerra, C., Macías-Rodríguez, L. I., Lopez-Bucio, J., Flores-Cortez, I., Santoyo, G., Hernandez-Soberano, C., et al. (2013). The rhizobacterium *Arthrobacter agilis* produces dimethylhexadecylamine, a compound that inhibits growth of phytopathogenic fungi in vitro. *Protoplasma.* 250, 1251–1262. doi: 10.1007/s00709-013-0506-y

Whiteley, M., Diggle, S. P., and Greenberg, E. P. (2017). Progress in and promise of bacterial quorum sensing research. *Nature* 551, 313–320. doi: 10.1038/nature24624

Yanisch-Perron, C., Vieira, J., and Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*. 33, 103-119. doi: 10.1016/0378-1119(85)90120-9

Zhang, H., Li, Y., Chen, X., Sheng, H., and An, L. (2011). Optimization of electroporation conditions for *Arthrobacter* with plasmid pART2. *J. Microbiol. Methods*. 84, 114-120. doi: 10.1016/j.mimet.2010.11.002

VII. DISCUSIÓN GENERAL

La siguiente discusión de resultados se referirá a los capítulos 1 y 2, y el número de figuras a las que hace referencia corresponden al número de figura asignado al artículo en el capítulo 1 y a las figuras en el capítulo 2.

Arthrobacter sp. UMCV2 es una rizobacteria promotora del crecimiento vegetal que se aisló durante la búsqueda de bacterias reductoras de hierro, capaces de suministrar hierro ferroso a las plantas en suelos alcalinos donde este metal es limitado para el crecimiento y desarrollo de las plantas (Valencia-Cantero et al., 2007). Esta bacteria benéfica también promueve el crecimiento vegetal a través de la emisión del compuesto orgánico volátil DMHDA (Velázquez-Becerra et al., 2011). La DMHDA actúa como una molécula señal inter-reino interactuando con la vía de señalización de la citoquinina vegetal que involucra al receptor AHK2 (Vázquez-Chimalhua et al., 2021a) y produciendo de esta manera, una señalización cruzada con la ruta del ácido jasmónico en el control del crecimiento de la raíz (Vázquez-Chimalhua et al., 2019). La organogénesis y el crecimiento vegetal son modulados por la DMHDA, a través de la modificación del equilibrio entre el nicho de células madre y la expresión génica dependiente del ácido jasmónico (Vázquez-Chimalhua et al., 2021b). La DMHDA también induce la expresión de genes involucrados en los mecanismos de defensa sistémicos de las plantas y las estrategias de adquisición de Fe, que se han sugerido para mejorar la fotosíntesis y la producción de biomasa (Orozco-Mosqueda et al., 2013; Castulo-Rubio et al., 2015; Montejano-Ramírez et al., 2020). Resultados previos mostraron que *Arthrobacter* sp. UMCV2 adopta un ciclo de vida endofítico y coloniza tejidos vegetales, proporcionando beneficios a las plantas hospederas (Montejano-Ramírez et al., 2018; Hernández-Soberano et al., 2020).

El genoma de *Arthrobacter* sp. UMCV2 tiene un tamaño típico para el género (**Figura 1**) con 3, 435, 243 pares de bases (bp). Los genes implicados en la supervivencia y colonización, como *SOD*, posibilitan la colonización de las raíces por parte de la bacteria (Kim et al., 2000; Alquéres et al., 2013), además del operón *ars*, que confiere resistencia al arsénico, un metaloide tóxico (Wang et al., 2009). La presencia de los genes *fhuDCB* puede ser importante para la captación de hierro por los sideróforos, para facilitar el

transporte de este ion (Koster, 1991; Galet et al., 2015), lo que es relevante para la competencia en el suelo por los microorganismos.

Los genes del RNA ribosomal se consideran la herramienta idónea para la clasificación taxonómica ya que son altamente conservados y evolutivamente estables, pero que contienen regiones variables. La secuenciación de dichas regiones ha generado grandes bases de datos que ayudan a la clasificación taxonómica (D'Amore et al., 2016). Los ribosomas de bacterias constan de dos subunidades, la subunidad pequeña que contiene un solo tipo de RNA (16S) y una subunidad grande que contiene dos tipos de RNA (5S y 23S) (Patwardhan et al., 2014). El tamaño relativamente largo de los RNA ribosomales 16S (alrededor de 1500 nucleótidos) minimiza las fluctuaciones estadísticas, y la conservación de su estructura secundaria favorece el alineamiento preciso durante la comparación de secuencias (Rodicio y Mendoza, 2004)

Arthrobacter sp. UMCV2 se identificó inicialmente como *Arthrobacter agilis* debido a que las secuencias de sus RNAr 16S mostraron un porcentaje de identidad por arriba de 99.5% (Valencia-Cantero et al., 2007). Sin embargo, las secuencias del RNAr 16S de *A. echini* (Lee et al., 2016), *A. ruber* (Liu et al., 2018), *A. bussei* (Flegler et al., 2020), *A. sedimenti* (Lin et al., 2020), y *A. cheniae* (Yang et al., 2021), todas ellas especies descritas posteriormente, también comparten un porcentaje de identidad superior al 99.5% con el RNAr 16S de *Arthrobacter* sp. UMCV2. En este estudio se utilizó TYGS, un servidor para la taxonomía de procariotas basada en el genoma, y se empleó para producir árboles filogenéticos de las cepas tipo de las especies más estrechamente relacionadas con *Arthrobacter* sp. UMCV2 en el gen de RNAr 16S y términos genómicos (**Figura 2**), para determinar la posición taxonómica específica de *Arthrobacter* sp. UMCV2. Aunque los resultados situaron a UMCV2 dentro del género *Arthrobacter*, dicha cepa no está incluida en la rama de *A. agilis* o en ramas junto con otras cepas tipo. Entonces, se utilizó el enfoque dDDH, para calcular la relación entre los genomas de *Arthrobacter* sp. UMCV2 y las cepas tipo de especies estrechamente relacionadas. La dDDH es un procedimiento estándar reconocido para la delimitación de especies basada en la secuenciación del genoma (Meier-Kolthoff et al., 2013). De este modo, se encontró que los valores más altos de dDDH fueron compartidos entre *Arthrobacter* sp UMCV2 y un grupo de cepas tipo que incluyen *A. bussei*, *A. agilis*, *A. cheniae*, *A. ruber*, y *A. sedimenti*, oscilando entre

el 40.3 y el 36.2%, claramente por debajo del 70%, que es generalmente el valor mínimo aceptado para considerar dos organismos dentro de la misma especie (Chun et al., 2018); en concordancia, los valores de dDDH detectados entre las cepas tipo, fueron igualmente bajos (**Tabla 2**). Por lo tanto, se concluyó que *Arthrobacter* sp. UMCV2 podría ser una nueva especie que puede ser eventualmente descrita.

La presencia de los genes *luxR* anotados en el genoma de *Arthrobacter* fue particularmente interesante ya que estos están involucrados en el proceso de QS. Previamente, se reportó que la DMHDA induce motilidad *swarming* en *Arthrobacter* sp. UMCV2, frecuentemente reconocido como un comportamiento regulado por QS (Martínez-Cámara et al., 2020). Los sistemas canónicos *luxI-luxR* son típicamente el componente principal de QS en bacterias Gram-negativas (Whiteley et al., 2017), sin embargo, excepcionalmente están presentes en bacterias Gram-positivas (Rajput y Kumar, 2017). Por otro lado, no se localizaron homólogos *luxI* en el análisis del genoma de *Arthrobacter* sp. UMCV2. En contraste, se identificaron 18 secuencias de proteínas predichas homólogas a genes *luxR*.

Para examinar las supuestas proteínas relacionadas con *luxR*, se utilizó un enfoque basado en el análisis de dominios y se compararon con cuatro proteínas LuxR bien caracterizadas. Se incluyó como una proteína de referencia, la primera proteína descrita como LuxR, originalmente encontrada en *Aliivibrio fischeri* (Fuqua et al., 1994). También la proteína PipR de *Pseudomonas* sp. GM79 (Coutinho et al., 2018), se incluyó como una referencia, debido a que esta es una proteína bien caracterizada experimentalmente, perteneciente a la familia de proteínas LuxR que responde al compuesto derivado de planta *N*-(2-hidroxietil)-2-(2-hidroxietilamino) acetamida, a través de una proteína de unión periplásmica. PipR se ha incluido también en la subfamilia PAB que está integrada por proteínas LuxR que responden a compuestos de bajo peso molecular de origen vegetal (Mosquito et al., 2020; Xu, 2020). La proteína LuxR de *Streptomyces purpurogeneiscleroticus* NRLL B-2952 (Rajput y Kumar, 2017) también fue incluida como una referencia, debido a que forma parte de un sistema canónico LuxI/LuxR de QS, presente en actinobacteria y caracterizado *in-silico*. Además, RevU se incluyó como una proteína LuxR no canónica de actinobacteria (Panthee et al., 2020) ya que esta proteína une al biomedador BR-1, un compuesto de β -carbolina, que regula la síntesis

de reveromicina en *Streptomyces* sp. SN-593. RevU pertenece a la subfamilia LAL-LuxR (reguladores grandes que unen ATP de la familia LuxR), que se caracterizan por su tamaño grande (más de 900 residuos de a.a.) y un dominio de unión a ATP en el extremo N-terminal. Y aunque están presentes en bacterias gram-negativas, es más frecuente encontrarlas en actinobacterias (De Schrijver y De Mot, 1999; Panthee et al., 2020). Las proteínas canónicas LuxR de *A. fischeri* y de *S. purpurogeneiscleroticus*, así como PipR de *Pseudomonas* sp. GM79, mostraron la misma arquitectura, compuesta del dominio de unión al autoinductor IPR005143 en el extremo N-terminal y el dominio de unión a DNA IPR00792 en el C-terminal. Como era de esperar, para la proteína RevU, miembro de la subfamilia LAL-LuxR, el dominio de unión al autoinductor fue reemplazado por un dominio ATPasa, además del tamaño grande de la proteína (**Figura 3**).

Ninguna de las secuencias de *Arthrobacter* sp. UMCV2 mostraron arquitecturas presentes en las secuencias LuxR modelo, aunque en 11 secuencias se identificaron los dominios de unión a DNA IPR000792 (**Figura 3**). Este dominio contiene un motivo HTH que se ha utilizado previamente como criterio para incluir proteínas dentro de la familia de proteínas LuxR (De Schrijver y De Mot, 1999; Lopes-Santos et al., 2012; Rajput y Kumar, 2017). Se concluyó que estas 11 proteínas pertenecen a la familia de reguladores transcripcionales LuxR y fueron designadas como Reguladores relacionados con autoinductor (AirR). Entre estas proteínas, ocho se colocaron en el grupo I (**Figura 4**) y seis de ellas presentaron un dominio receptor de regulador de respuesta, transductor de señal (IPR001789), que sustituye al dominio de unión al autoinductor de las proteínas canónicas LuxR. En otras proteínas con dominios de unión a DNA que presentan el motivo HTH, el dominio de unión al autoinductor fue substituido por un dominio ATPasa (como sucede en RevU) o no fue identificado dominio amino terminal. Tres de estas secuencias se agruparon con RevU de *Streptomyces* y LuxR o proteínas relacionadas a LuxR de *Streptomyces iranensis*, *Streptosporangium roseum*, *A. terricola*, y *Arthrobacter* spp., apoyando el involucramiento de estas proteínas en la familia LuxR. Se estableció un grupo separado (grupo II de **Figura 4**), en el cual el dominio canónico de unión a DNA con motivo HTH fue substituido con un dominio de unión a DNA tipo OmpR/PhoB junto con el mismo dominio receptor de regulador de respuesta, transductor de señal, presente en la mayoría de las secuencias AirR del grupo I (**Figuras 3 y 4**). Este grupo se designó

como reguladores análogos a autoinductor (AiaR), porque ellos forman un grupo hermano de las secuencias AirR dentro del grupo de proteínas LuxR de actinobacteria, pero no poseen el motivo HTH que define a las proteínas LuxR, además de la función análoga de ambos dominios con los presentes en las LuxR canónicas. Y debido a que no se encontraron proteínas homólogas a LuxI en *Arthrobacter* sp. UMCV2, todas las AirR constituyen proteínas “solo” dentro de la familia LuxR.

Las proteínas LuxR solos se han estudiado ampliamente en bacterias Gram-negativas. Algunos LuxR solos unen AHL de otras especies bacterianas, probablemente como una estrategia para ampliar su red regulatoria, utilizando los componentes existentes de los sistemas de percepción de quorum de bacterias vecinas (Martínez et al., 2015; Mosquito et al., 2020). También, otras LuxR solos han evolucionado para responder a diferentes moléculas incluyendo señales de plantas (Patel et al., 2013). Aunque las funciones de estas proteínas se han estudiado poco en bacterias Gram-positivas, especialmente en actinobacterias distintas de *Streptomyces*, el phylum se ha explorado filogenéticamente por Lopes-Santos et al. (2012) y revisado por Polkade et al. (2016). En *A. aureescens* y *A. chlorophenolicus*, se han reportado múltiples secuencias de homólogos *luxR* (16 y 17 secuencias, respectivamente). Sin embargo, no se ha realizado ningún trabajo experimental (Lopes-Santos et al., 2012).

Debido a que las proteínas AirR no presentan el dominio de unión al autoinductor LuxR canónico, no se espera que las AHL sean la molécula señal para las proteínas AirR. Sin embargo, un estudio previo reveló que la DMHDA indujo motilidad *swarming* en *Arthrobacter* sp. UMCV2 y al mismo tiempo estimuló la expresión de genes marcadores del aparato flagelar (Martínez-Cámara et al., 2020). Debido a que la motilidad *swarming* es frecuentemente regulada por QS (Krishnan et al., 2012; Nickzad et al., 2015), en este estudio, se reprodujo la inducción de motilidad *swarming* por DMHDA (**Figura 5**) y se determinó la expresión de los genes *airR*. Se encontró, que 10 de los 16 genes relacionados a *luxR* incrementaron su expresión de manera estadísticamente significativa (**Figura 6**), entre estos los genes *airR3* y *airR5* (agrupadas con RevU), y *airR1*, *airR2* y *airR7* presentaron un incremento en su expresión de 10 veces. Las inducciones múltiples de los genes *airR* sugiere la existencia de una red jerárquica para regulación de estos

genes. En *P. aeruginosa* PAO1, se han descrito cuatro circuitos QS individuales. Cada uno de estos circuitos individuales están estrechamente interconectados e implican su autoinducción. La inducción de un circuito por su autoinductor, resulta en la inducción (o represión) de uno o más de los otros tres (Papenfort y Bassler, 2016). Similarmente, es posible que la inducción de un gen *airR* por la DMHDA, regule la expresión directa o indirectamente de otros genes *airR* a través de un mecanismo desconocido. Sin embargo, se requieren estudios adicionales para dilucidar la función y regulación de los genes *airR/aiaR*.

Esto podría demostrarse mediante el estudio de cepas mutantes en estos genes relacionados a *luxR*, por lo que con esto mente, en el presente trabajo se buscó desarrollar la metodología necesaria para establecer primeramente un protocolo para la transformación genética de *Arthrobacter* sp. UMCV2, por ser un requisito previo para la manipulación genética de esta actinobacteria.

La transformación bacteriana se lleva a cabo cuando una cepa naturalmente competente realiza la captación activa de DNA de cadena sencilla extracelular, no es degradado por nucleasas en el citoplasma de esta y además lleva a cabo la incorporación hereditaria de la información genética, proporcionándole a la célula nuevas características para adaptarse a las condiciones ambientales cambiantes (Lorenz y Wackernagel, 1994). Para que esto ocurra, es necesario que en su genoma contenga diferentes genes que codifiquen para diferentes proteínas que ayudarán a la bacteria a captar el DNA (competencia celular) y en la mayoría de las bacterias dichos genes solo se expresan bajo condiciones específicas (Johnston et al., 2014), por lo que, en la naturaleza, pocas especies bacterianas tienen la capacidad de captar DNA foráneo de forma habitual mediante transformación. Hasta el 2014, se estimaba que existían alrededor de 82 especies diferentes capaces de transformarse de manera natural dentro de las cuales destacan *Staphylococcus aureus* Mu50 (Morikawa et al., 2012), *Bacillus subtilis* 168, *Haemophilus influenzae* Rd KW20, *Helicobacter pylori* (Lorenz y Wackernagel, 1994), *Bradyrhizobium japonicum* (Johnsborg et al., 2007), entre otras (Johnston et al., 2014). Sin embargo, en el laboratorio la competencia celular se puede inducir de forma artificial, teniendo en cuenta dos parámetros principales que están

implicados en la transformación eficiente de una bacteria, el primero de ellos es el método utilizado para inducir la competencia celular, o permeabilidad de la membrana citoplasmática, necesaria para la adopción de material genético externo y el segundo es la constitución genética de la cepa huésped del organismo que se desea transformar ya que una variedad de genes puede influir en el resultado de los experimentos de transformación (Hanahan et al., 1991). Hacer que las células sean permeables a ácidos nucleicos mediante la exposición a campos eléctricos es una técnica denominada electroporación o electro-transformación (Dower et al., 1988), y la técnica se ha aplicado con éxito a diferentes especies bacterianas, tanto de organismos Gram-negativos como Gram-positivos (Miller, 1994).

La transformación de *E. coli* por electroporación es un método confiable para obtener eficiencias de transformación alrededor de 10^9 ufc/ μ g de DNA (Dower et al., 1988), debido a que, es aproximadamente 10 veces más eficiente que la transformación química, además de tener una producción más rápida y fácil de células competentes (Green y Sambrook, 2020). Por otro lado, diferentes cepas de esta bacteria son las más utilizadas, gracias al vasto conocimiento que se tiene acerca de su genética, bioquímica y biología molecular, siendo generalmente el primer sistema que se escoge para ensayos, como los de transformación genética (Hanahan et al., 1991).

En este estudio, se realizó primero la transformación por electroporación de la cepa de *E. coli* JM101 con los plásmidos pART2 y pART3 (**Figura 1**), los cuales están diseñados para realizar una manipulación genética en cepas de *Arthrobacter*, pero que también contienen origen de replicación para *E. coli*, esto permitió por un lado verificar el adecuado funcionamiento de los vectores, y también obtener el control positivo de transformación. Para lo cual, se utilizaron las condiciones establecidas de electroporación para *E. coli* (Green y Sambrook, 2020), obteniendo eficiencias de transformación del orden de 10^6 transformantes/ μ g de DNA, aunque esta eficiencia no es tan alta como la reportada por Dower et al. (1988), esta fue suficiente y rápida para obtener las transformantes necesarias para verificar que los plásmidos estaban funcionando correctamente en esta cepa.

La replicación y la expresión de la resistencia a antibióticos son requerimientos evidentes para una transformación exitosa de plásmidos, en muchos casos los sistemas

de modificación-restricción pueden representar barreras para la transformación (Miller, 1994). En nuestro caso, los plásmidos para la manipulación genética en *Arthrobacter* fueron proporcionados liofilizados, por lo que además se requería tenerlos en una cepa de *E. coli* para la conservación y replicación del DNA plasmídico para su utilización posterior. En la **Figura 2A** se observa el crecimiento de la cepa de *E. coli* JM101 transformada con los plásmidos pART2 y pART3.

Debido a sus considerables capacidades metabólicas y tolerancia a condiciones de estrés, diferentes especies de *Arthrobacter* han atraído interés ecológico y de potencial aplicación industrial, por lo que, la disponibilidad de herramientas para manipulación genética de esta bacteria es de gran importancia. Sin embargo, pocas moléculas, como plásmidos o vectores, se han reportado a la fecha para este género y la escasez de estos limita fuertemente la investigación en esta actinobacteria (Niu et al., 2020).

En el presente trabajo se establecieron las condiciones de transformación por electroporación para *Arthrobacter* sp. UMCV2, obteniendo una eficiencia de transformación de 3.4×10^4 transformantes/ μ g de DNA del plásmido pART2, y de 1.5×10^4 transformantes/ μ g de DNA del plásmido pART3, modificando factores que afectan la eficiencia de transformación. **En la figura 2B** se muestra el crecimiento de la cepa de *Arthrobacter* sp. UMCV2 transformada con los plásmidos pART2 y pART3.

En bacterias Gram-positivas, la pared celular se considera una fuerte barrera para la entrada de DNA (Dunny et al., 1991), por lo que, el tratamiento con agentes debilitadores de la pared celular como glicina, treonina, lisozima y penicilina, es uno de los métodos más efectivos para aumentar la eficiencia de transformación, haciendo las células más permeables para la captación de DNA (Sunairi et al., 1996). Para *Arthrobacter* sp. UMCV2 se evaluó el efecto de la penicilina G sobre la permeabilidad de la pared celular debido a que de acuerdo a lo reportado por Zhang, 2011, mediante el uso de los otros debilitadores de la pared celular se obtuvieron solo modestos incrementos en la tasa de transformación, mientras que, el más eficiente tratamiento debilitador de la pared se obtuvo suplementando el medio de cultivo con penicilina, ya que como se sabe, esta es un potente inhibidor de la síntesis de peptidoglucano, y ha

mostrado previamente que estimula la electrocompetencia en diferentes bacterias (Sunairi et al., 1996; Park y Stewart, 1990).

Otra aproximación para vencer las paredes celulares rígidas de las bacterias consiste en la aplicación de pulsos de alto voltaje, esto puede ser útil para incrementar la permeabilización de la membrana en cierto grado y facilitar la transferencia eficiente de DNA (Weaver, 1995). Dos parámetros son importantes, la intensidad del campo eléctrico y la duración del pulso, estos deben ser optimizados probando diferentes combinaciones de ambos. Los resultados de este trabajo sugieren que el pulso eléctrico de 15kV/cm por entre 4.0 y 4.7 ms está en concordancia con los pulsos usados para la electroporación en la mayoría de las bacterias Gram-positivas, tales como *Corynebacterium* en estrecha relación filogenética con *Arthrobacter*, por ser ambas actinobacterias (Zhang, et al., 2011).

La fase de crecimiento de la bacteria es otro factor importante para una transformación exitosa. A medida que las células entran en fase estacionaria, se vuelven más sensibles a la muerte causada por la electroporación (Tryfona y Bustard, 2006). Por lo que, las células por lo general se acondicionan cuando el cultivo se encuentra en la mitad de la fase exponencial ya que, en esta etapa, tanto la pared como la membrana de las células aún no están totalmente formadas, lo cual facilita la formación de poros no selectivos al aplicar el pulso eléctrico (Kotnik et al., 2015). En apoyo a esta idea, las células que son colectadas en la fase exponencial temprana producen mayores eficiencias de transformación que aquellas que son colectadas en fase exponencial tardía o estacionaria. Por lo que las células de *Arthrobacter* sp. UMCV2 fueron colectadas en la fase exponencial temprana, midiendo la D.O. a 595 nm en 0.443, lo que ocurrió a las 12 h aproximadamente de incubación. Además, para evitar que la penicilina agregada al cultivo tuviera un efecto sobre el crecimiento de *Arthrobacter*, esta se agregó en la fase exponencial, para maximizar sus efectos sin comprometer el crecimiento bacteriano.

Previamente se ha reportado (Ito y Nagane, 2001), que la adición de agentes osmóticos estabilizadores, tales como manitol o sorbitol, en cada uno de los procesos de crecimiento, electroporación y recuperación de las células, mejoran considerablemente la tasa de transformación de *B. subtilis*, además, también se ha reportado por Zhang et al., 2011, que la adición de sorbitol no solo mejoró la eficiencia de transformación sino

también promovió la reproducibilidad del método. Por lo que para *Arthrobacter* sp. UMCV2 se llevó a cabo la adición de sorbitol 0.5 M a la solución de glicerol al 10%, para la preparación de las células competentes y también se adicionó al CL para la recuperación de las células después de la electroporación, favoreciendo la transformación de la actinobacteria. Esto es probablemente debido a que el sorbitol, proporciona alguna protección de osmolaridad a las células que han sido dañadas por un pulso eléctrico, especialmente aquellas que han sido tratadas con agentes debilitadores de la pared celular, como se ha reportado también para otras especies (Turgeon et al., 2006; Lee et al., 2002; Ito y Nagane, 2001).

Cabe señalar, que el paso de incubación de las células después de su exposición a la descarga eléctrica, es esencial para permitir su recuperación genotípica. Sin embargo, los tiempos de recuperación demasiado largos (>10 h) pueden favorecer la muerte celular por disminución de la replicación celular y, por lo tanto, se produce el envejecimiento del cultivo. Por lo que, para *Arthrobacter* sp. UMCV2, se utilizó un tiempo de recuperación de las células de 8 h, en base también a que las células tienen una velocidad de crecimiento más lenta en medio osmótico (Zhang et al., 2011), con lo que, se obtuvo una buena eficiencia de transformación para *Arthrobacter*, lo que es un reflejo de la sobrevivencia de las células a la electroporación.

La transformación genética de cepas en el laboratorio generalmente se realiza utilizando DNA plasmídico, ya que al ser una doble cadena circular covalentemente cerrada presenta una menor susceptibilidad a ser degradada por las endonucleasas presentes en el citoplasma de las bacterias (Kotnik et al., 2015). Por otro lado, se ha probado que la cantidad de DNA tiene una función importante en la eficiencia de transformación, debido a que se produce un decremento lineal en la eficiencia de transformación con el incremento de la cantidad de DNA de 10 ng a 2000 ng (Zhang et al., 2011). Una posible explicación es que altos niveles de DNA son perjudiciales para la viabilidad celular lo que origina una mayor tasa de mortalidad bacteriana (Tryfona y Bustard, 2006). Los resultados obtenidos, demuestran la viabilidad de la transformación de *Arthrobacter* sp. UMCV2, utilizando una concentración pequeña (100 ng) de DNA de plásmido.

Por otro lado, se seleccionaron cinco colonias transformantes de *Arthrobacter* sp. UMCV2 en medios de selección con antibiótico, para verificar la presencia de los plásmidos pART2 y pART3 (**Figura 3A**). Mediante análisis de restricción se observó el tamaño esperado de 4634 pb para pART2 y de 5406 pb para pART3 (**Figura 3B**).

También se verificó la presencia de los plásmidos pART2 y pART3 mediante PCR en colonia, como se muestra en la **Figura 4A y 4B**, observando una banda esperada de 816 pb correspondiente al gen de kanamicina que se localiza en ambos plásmidos. Aunque, en el caso del plásmido pART3 se observó poca cantidad del amplificado correspondiente al gen de kanamicina, en comparación con el control. Esto puede ser debido a algún problema en el funcionamiento en el origen de replicación para *Corynebacterium glutamicum* del vector, que es el que le permite tener más de una copia de este en la célula hospedadora.

En el presente estudio se establecieron las condiciones experimentales para la transformación genética por electroporación de *Arthrobacter* sp. UMCV2, una actinobacteria rizosférica, promotora del crecimiento vegetal, en cuyo genoma se han localizado secuencias homólogas a genes *luxR* solos, los cuales resultaron de interés debido a que están involucrados en procesos de QS. Si bien no se obtuvieron cepas mutantes en los genes homólogos *luxR*, se desarrollaron las herramientas metodológicas necesarias para la realización de análisis de manipulación genética y así dilucidar la función y regulación de estos genes y entender mejor su relevancia ecológica.

VII. CONCLUSIONES GENERALES

El análisis del genoma de *Arthrobacter* sp. UMCV2 indicó que forma una rama separada dentro del género *Arthrobacter*, constituyendo potencialmente una nueva especie.

Se identificó un grupo de 16 genes designados como *airR* en *Arthrobacter* sp. UMCV2, 10 de los cuales fueron inducidos por el compuesto DMHDA, que simultáneamente indujeron el comportamiento QS.

En nuestro conocimiento, este es el primer reporte sobre la inducción de una familia de genes *luxR* en el género *Arthrobacter* por un compuesto producido por la propia bacteria.

Este trabajo constituye el primer reporte sobre la transformación genética por electroporación de la cepa *Arthrobacter* sp. UMCV2

VIII. REFERENCIAS

- Aframian, N., and Eldar, A. (2020). A bacterial tower of babel: Quorum-sensing signaling diversity and its evolution. *Annu. Rev. Microbiol.* 74, 587-606. doi: 10.1146/annurev-micro-012220-063740
- Alquéres, S., Meneses, C., Rouws, L., Rothballer, M., Baldani, I., Schmid, M., and Hartmann, A. (2013). The bacterial superoxide dismutase and glutathione reductase are crucial for endophytic colonization of rice roots by *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5. *Mol. Plant Microbe Interact.* 26, 937–945. doi: 10.1094/MPMI-12-12-0286-R
- Autret, N., Raynaud, C., Dubail, I., Berche, P., Charbit, A. (2003). Identification of the *agr* locus of *Listeria monocytogenes*: role in bacterial virulence. *Infect. Immun.* 71, 4463-4471. doi: 10.1128/IAI.71.8.4463-4471.2003
- Bassler, B. L. (2002). Small talk: cell-to-cell communication in Bacteria. *Cell.* 109, 421-424. doi: 10.1016/s0092-8674(02)00749-3
- Bez, C., Covaceuzach, S., Bertani, I., Choudhary, K. S., Venturi, V. (2021). LuxR solos from environmental fluorescent pseudomonads. *mSphere* 6, e1322–e1320. doi: 10.1128/mSphere.01322-20
- Boylan, M., Graham, A. F., and Meighen, E. A. (1985). Functional identification of the fatty acid reductase components encoded in the luminescence operon of *Vibrio fischeri*. *J. Bacteriol.* 163, 1186-1190. doi: 10.1128/jb.163.3.1186-1190.1985
- Boylan, M., Miyamoto, C., Wall, L., Graham, A., Meighen, E. (1989). LuxC, D and E genes of the *Vibrio fischeri* luminescence operon code for the reductase, transferase, and synthetase enzymes involved in aldehyde biosynthesis. *Photochem Photobiol.* 49, 681-688. doi: 10.1111/j.1751-1097.1989.tb08441.x

Brachmann, A. O., Brameyer, S., Kresovic, D., Hitkova, I., Kopp, Y., Manske, C., Schubert, K., Bode, H. B., Heermann, R. (2013). Pyrones as bacterial signaling molecules. *Nat. Chem. Biol.* 9, 573–578. doi: 10.1038/nchembio.1295

Brameyer, S., Kresovic, D., Bode, H. B., and Heermann, R. (2014). LuxR solos in *Photorhabdus* species. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 4, 166. doi: 10.3389/fcimb.2014.00166

Brameyer, S., Kresovic, D., Bode, H. B., and Heermann, R. (2015). Dialkylresorcinols as bacterial signaling molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 572–577. doi: 10.1073/pnas.1417685112

Case, R. J., Labbate, M., and Kjelleberg, S. (2008). AHL-driven quorum-sensing circuits: Their frequency and function among the Proteobacteria. *ISME J.* 2, 345–349. doi: 10.1038/ismej.2008.13

Castulo-Rubio, D. Y., Alejandre-Ramírez, N. A., Orozco-Mosqueda, M. C., Santoyo, G., Macías-Rodríguez, L. I., and Valencia-Cantero, E. (2015). Volatile organic compounds produced by the rhizobacterium *Arthrobacter agilis* UMCV2 modulate *Sorghum bicolor* (strategy II plant) morphogenesis and SbFRO1 transcription in vitro. *J. Plant Growth Regul.* 34, 611–623. doi: 10.1007/s00344-015- 9495-8.20

Cheung, G. Y., Joo, H. S., Chatterjee, S. S., and Otto, M. (2014). Phenol-soluble modulins--critical determinants of staphylococcal virulence. *FEMS Microbiol. Rev.* 38, 698-719. doi: 10.1111/1574-6976.12057

Choi, S., and Greenberg, E. P. (1991). The C-terminal region of the *Vibrio fischeri* LuxR protein contains an inducer-independent lux gene activating domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 11115–11119. doi: 10.1073/pnas.88.24.11115

Chun, J., Oren, A., Ventosa, A., Christensen, H., Arahal, D. R., da Costa, M. S., Rooney, A. P., Yi, H., Xu, X. W., De Meyer, S., and Trujillo, M. E. (2018). Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 68, 461–466. doi: 10.1099/ijsem.0.002516

Coutinho, B. G., Mevers, E., Schaefer, A. L., Pelletier, D. A., Harwood, C. S., Clardy, J., Greenberg, E. P. (2018). A plant-responsive bacterial-signaling system senses an ethanalamine derivative. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115, 9785–9790. doi: 10.1073/pnas.1809611115

D’Amore, R., Ijaz, U. Z., Schirmer, M., Kenny, J. G., Gregory, R., Darby, A. C., Shakya, M., Podar, M., Quince, C., and Hall, N. (2016). A comprehensive benchmarking study of protocols and sequencing platforms for 16S rRNA community profiling. *BMC Genomics.* 17: 55. doi: 10.1186/s12864-015-2194-9

De Schrijver, A., and De Mot, R. (1999). A subfamily of MalT-related ATPdependent regulators in the LuxR family. *Microbiology* 145, 1287–1288. doi: 10.1099/13500872-145-6-1287

De Silva, R. S., Kovacicova, G., Lin, W., Taylor, R. K., Skorupski, K., and Kull, F. J. (2007). Crystal structure of the *Vibrio cholerae* quorum-sensing regulatory protein HapR. *J. Bacteriol.* 189, 5683-5691. doi: 10.1128/JB.01807-06

Devine, J. H., Shadel, G. S., and Baldwin, T. O. (1989) Identification of the operator of the *lux* regulon from the *Vibrio fischeri* strain ATCC7744. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 5688-5692. doi: 10.1073/pnas.86.15.5688

Díaz, D. M., and de la Sen, A. S. (2010). Sistemas de quorum sensing en bacterias. Reduca (Biología). Serie Microbiología. 3, 39-55. ISSN:1989-3620

Dower, W. J., Miller, J. F., and Ragsdale, C. W. (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* 16, 6127–45. doi: 10.1093/nar/16.136127

Dufour, D., and Lévesque, C. M. (2013). Bacterial behaviors associated with the quorum-sensing peptide pheromone ('alarmone') in streptococci. *Future Microbiol.* 8, 593–605. doi: 10.2217/fmb.13.23

Dunman, P. M., Murphy, E., Haney, S., Palacios, D., Tucker-Kellogg, G., Wu, S., Brown, E. L., Zagursky, R. J., Shlaes, D., Projan, S. J. (2001). Transcription profiling-based identification of *Staphylococcus aureus* genes regulated by the *agr* and/or *sarA* loci. *J. Bacteriol.* 183, 7341-7353. doi: 10.1128/JB.183.24.7341-7353.2001

Dunn, D. K., Michaliszyn, G. A., Bogacki, I. G., and Meighen, E. A. (1973). Conversion of aldehyde to acid in the bacterial bioluminescent reaction. *Biochemistry.* 12, 4911-4918. doi: 10.1021/bi00748a016

Dunny, G. M., Lee, L. N., and LeBlanc, D. J. (1991). Improved electroporation and cloning vector system for gram-positive bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 1194–1201. doi: 10.1128/aem.57.4.1194-1201.1991

Effmert, U., Kalderás, J., Warnke, R., and Piechulla, B. (2012). Volatile mediated interactions between bacteria and fungi in the soil. *J. Chem. Ecol.* 38, 665-703. doi: 10.1007/s10886-012-0135-5

Engbrecht, J., Nealson, K., and Silverman, M. (1983). Bacterial bioluminescence: isolation and genetic analysis of functions from *Vibrio fischeri*. *Cell.* 32, 773-781. doi: 10.1016/0092-8674(83)90063-6

Enkataraman, A., Rosenbaum, M. A., Werner, J. J., Winans, S. C., and Angenent, L. T. (2014). Metabolite transfer with the fermentation product 2, 3-butanediol enhances

virulence by *Pseudomonas aeruginosa*. *ISME J.* 8, 1210–1220. doi: 10.1038/ismej.2013.232

Ferluga, S., and Venturi, V. (2009). OryR is a LuxR-family protein involved in interkingdom signaling between pathogenic *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and rice. *J. Bacteriol.* 191, 890–897. doi: 10.1128/JB.01507-08

Flegler, A., Runzheimer, K., Kombeitz, V., Mänz, A. T., von Heilborn, D. H., Etzbach, L., Schieber, A., Hölzl, G., Hüttel, B., Woehle, C., and Lipski, A. (2020). *Arthrobacter bussei* sp. nov., a pink-coloured organism isolated from cheese made of cow's milk. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 70, 3027–3036. doi: 10.1099/ijsem.0.004125

Fuqua, C. (2006). The QscR quorum-sensing regulon of *Pseudomonas aeruginosa*: An orphan claims its identity. *J. Bacteriol.* 188, 3169–3171. doi: 10.1128/JB.188.9.3169-3171.2006

Fuqua, C., Parsek, M. R., and Greenberg, E. P. (2001). Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing. *Annu. Rev. Genet.* 35, 439-468. doi: 10.1146/annurev.genet.35.102401.090913

Fuqua, C., Winans, S. C., and Greenberg, E. P. (1996). Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators. *Annu. Rev. Microbiol.* 50, 727–751. doi: 10.1146/annurev.micro.50.1.727

Fuqua, W. C., Winans, S.C., and Greenberg, E. P. (1994). Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J. Bacteriol.* 176, 269–275. doi: 10.1128/jb.176.2.269-275.1994

Galet, J., Deveau, A., Hôtel, L., Frey-Klett, P., Leblond, P., and Aigle, B. (2015). *Pseudomonas Fluorescens* pirates both ferrioxamine and ferricoelichelin siderophores

from *Streptomyces ambofaciens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 3132–3141. doi: 10.1128/AEM.03520-14

Garbeva, P., Hordijk, C., Gerards, S., and de Boer, W. (2014a). Volatile-mediated interactions between phylogenetically different soil bacteria. *Front. Microbiol.* 5:289. doi: 10.3389/fmicb.2014.00289

González, J. E., and Keshavan, N. (2006). Messing with bacterial quorum sensing. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70, 859-875. doi: 10.1128/MMBR.00002-06

González, J. E., and Marketon, M.M. (2003). Quorum sensing in nitrogen-fixing rhizobia. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67, 574-592. doi: 10.1128/MMBR.67.4.574-592.2003

González, J. F., and Venturi, V. (2013). A novel widespread interkingdom signaling circuit. *Trends Plant Sci.* 18, 167–174. doi: 10.1016/j.tplants.2012.09.007

González, J. F., Myers, M. P., and Venturi, V. (2013). The inter-kingdom solo Ory regulator of *Xanthomonas oryzae* is important for motility. *Mol. Plant Pathol.* 14, 211-221. doi: 10.1111/j.1364-3703.2012.00843.x

Green, M. R., and Sambrook, J. (2020). Transformation of *Escherichia coli* by electroporation. *Cold Spring Harb. Protoc.* 6, 101220. doi: 10.1101/pdb.prot101220

Hanahan, D., Jessee, J., and Bloom, F. R. (1991). Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. Elsevier. *Methods Enzymol.* 204: 63-113. doi.org/10.1016/0076-6879(91)04006-A

Hanzelka, B. L., Parsek, M. R., Val, D.L., Dunlap, P.V., Cronan. Jr. J.E., Greenberg, E.P. (1999). Acylhomoserine lactone synthase activity of the *Vibrio fischeri* AinS protein. *J. Bacteriol.* 181, 5766–5770. doi. 10.1128/JB.181.18.5766-5770.1999

Hastings, J. W., and Nealson, K. H. (1977). Bacterial bioluminescence. *Annu. Rev. Microbiol.* 31, 549-595. doi: 10.1146/annurev.mi.31.100177.003001

Hawver, L.A., Jung, S.A., and Ng, W. L. (2016). Specificity and complexity in bacterial quorum-sensing systems. *FEMS Microbiol. Rev.* 40, 738-752. doi: 10.1093/femsre/fuw014

Hernández-Soberano, C., Ruiz-Herrera, L. F., and Valencia-Cantero, E. (2020). Endophytic bacteria *Arthrobacter agilis* UMCV2 and *Bacillus methylotrophicus* M4-96 stimulate achene germination, in vitro growth, and greenhouse yield of strawberry (*Fragaria x ananassa*). *Sci. Hortic.* 261: 109005. doi: 10.1016/j.scienta.2019.109005

Hudaiberdiev, S., Choudhary, K. S., Vera, R., Gelencsér, Z., Ligeti, B., Lamba, D., Pongor, S. (2015). Census of solo LuxR genes in prokaryotic genomes. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 12: 20. doi: 10.3389/fcimb.2015.00020

Insam, H., and Seewald, M. S. A. (2010). Volatile organic compounds (VOCs) in soils. *Biol. Fertil. Soils.* 46, 199-213. doi: 10.1007/s00374-010-0442-3

Ito, M., and Nagane, M. (2001). Improvement of the electro-transformation efficiency of facultatively alkaliphilic *Bacillus pseudofirmus* OF4 by high osmolarity and glycine treatment. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65, 2773–2775. doi: 10.1271/bbb.65.2773

Jacobs, M., Wnendt, S., and Stahl U. (1990). High-efficiency electro-transformation of *Escherichia coli* with DNA from ligation mixtures. *Nucleic Acid Res.* 18, 1653. doi: 10.1093/nar/18.6.1653

Jarraud, S., Lyon, G. J., Figueiredo, A. M., Lina, G., Vandenesch, F., Etienne, J., Muir, T. W., Novick, R. P. (2000). Exfoliatin-producing strains define a fourth *agr* specificity group in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 182, 6517-6522. doi: 10.1128/JB.182.22.6517-6522.2000

Jenul, C., and Horswill, A. R. (2018). Regulation of *Staphylococcus aureus* virulence. *Microbiol. Spectr.* 6, 1-34. doi: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0031-2018

Ji, G., Beavis, R. C., and Novick, R. P. (1995). Cell density control of staphylococcal virulence mediated by an octapeptide pheromone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 12055-12099. doi: 10.1073/pnas.92.26.12055

Johnsborg, O., Eldholm, V., and Håvarstein, L. S. (2007). Natural genetic transformation: prevalence, mechanisms and function. *Res. Microbiol.* 158, 767-778. doi: 10.1016/j.resmic.2007.09.004

Johnstone, C., Martin, B., Fichant, G., Polard, P., and Claverys, J.-P. (2014). Bacterial transformation: distribution, shared mechanisms and divergent control. *Nat. Rev. Microbiol.* 12, 181-196. doi: 10.1038/nrmicro3199

Kai, M., and Piechulla, B. (2009). Plant growth promotion due to rhizobacterial volatiles--an effect of CO₂?. *FEBS Lett.* 583, 3473–3477. doi: 10.1016/j.febslet.2009.09.053

Kan, J., Fang, R., and Jia, Y. (2017). Interkingdom signaling in plantmicrobe interactions. *Sci. China Life Sci.* 60, 785–796. doi: 10.1007/s11427-017-9 092-3

Kanchiswamy, C. N., Mainoy, M., and Maffei, M. E. (2015). Chemical diversity of microbial volatiles and their potential for plant growth and productivity. *Front. Plant Sci.* 6: 151. doi: 10.3389/fpls.2015.00151

Kavanaugh, J. S., Thoendel, M., and Horswill, A. R. (2007). A role for type I signal peptidase in *Staphylococcus aureus* quorum sensing. *Mol. Microbiol.* 65, 780-798. doi: 10.1111/j.1365-2958.2007.05830.x

Keller, L., and Surette, M. G. (2006). Communication in bacteria: an ecological and evolutionary perspective. *Nat. Rev. Microbiol.* 4, 249-258. doi: 10.1038/nrmicro1383

Kim, K. S., Lee, S., and Ryu, C. (2013). Interspecific bacterial sensing through airborne signal modulates locomotion and drug resistance. *Nat. Commun.* 4: 1809. doi: 10.1038/ncomms2789

Kim, Y., Kim, B. S., Park, Y. J., Choi, W. C., Hwang, J., Kang, B. S., Oh, T. K., Choi, S. H., and Kim, M. H. (2010). Crystal structure of SmcR, a quorum-sensing master regulator of *Vibrio vulnificus*, provides insight into its regulation of transcription. *J. Biol. Chem.* 285, 14020-14030. doi: 10.1074/jbc.M109.100248

Kim, Y. C., Miller, C. D., and Anderson, A. J. (2000). Superoxide dismutase activity in *Pseudomonas putida* affect utilization of sugars and growth on root surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1460–1467. doi: 10.1128/AEM.66.4.1460-1467.2000

Koenig, R. L., Ray, J. L., Maleki, S. J., Smeltzer, M. S., Hurlburt, B. K. (2004). *Staphylococcus aureus* AgrA binding to the RNAIII-*agr* regulatory region. *J. Bacteriol.* 186, 7549–7555. doi: 10.1128/JB.186.22.7549-7555.2004

Koster, W. (1991). Iron (III) hydroxamate transport across the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Biol. Met.* 4, 23–32. doi: 10.1007/BF01135553

Kotnik, T., Frey, W., Sack, M., Haberl Meglič, S., Petarka, M., and Miklavčič, D. (2015). Electroporation-based applications in biotechnology. *Trends Biotechnol.* 33, 480-488. doi: 10.1016/j.tibtech.2015.06.002

Krishnan, T., Yin, W. F., and Chan, K. G. (2012). Inhibition of quorum sensing controlled virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 by ayurveda spice clove (*Syzygium Aromaticum*) bud extract. *Sensors* 12, 4016–4030. doi: 10.3390/s120404016

Kumar, M., and Rajput, A. (2018). Phylogenomics and evolutionary perspective of quorum sensing regulators (LuxI/LuxR) in prokaryotes. *Quorum Sensing and its Biotechnological Applications*, 61-70. doi: 10.1007/978-981-13-0848-2_4

Lee, S.-H., Cheung, M., Irani, V., Carroll, J. D., Inamine, J. M., Howe, W. R., and Maslow, J. N. (2002). Optimization of electroporation conditions for *Mycobacterium avium*. *Tuberculosis*. 82, 167–174. doi: 10.1054/tube.2002.0335

Lee, J.-Y., Hyun, D. W., Kim, P. S., Kim, H. S., Shin, N. R., Yun, J. H., Jung, M. J., Kim, M. S., Whon, T. W., and Bae, J. W. (2016). *Arthrobacter echini* sp. nov., isolated from the gut of a purple sea urchin, *Heliocidaris crassispina*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66, 1887–1893. doi: 10.1099/ijsem.0.000965

Lemfack, M. C., Gohlke, B.-O., Toguem, S. M. T., Preissner, S., Piechulla, B., and Preissner, R. (2017). mVOC 2.0: a database of microbial volatiles. *Nucleic Acids Res.* doi: 10.1093/nar/gkx1016

Lemfack, M. C., Nickel, J., Dunkel, M., Preissner, R., and Piechulla, B. (2014). mVOC: a database of microbial volatiles. *Nucleic Acids Res.* 42, D744–D748. doi: 10.1093/nar/gkt1250

Lin, P., Yan, Z. F., and Li, C. T. (2020). *Arthrobacter sedimenti* sp. nov., isolate from river sediment in Yuantouzhu park, China. *Arch. Microbiol.* 202, 2551–2556. doi: 10.1007/s00203-020-01968-y

Lina, G., Jarraud, S., Ji, G., Greenland, T., Pedraza, A., Etienne, J., Novick, R. P., Vandenesch, F. (1998). Transmembrane topology and histidine protein kinase activity of AgrC, the *agr* signal receptor in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* 28, 655–662. doi: 10.1046/j.1365-2958.1998.00830.x

Lintz, M. J., Oinuma, Ken-ichi., Wysoczynski C. L., Greenberg, E. P., Churchill M. E. A. (2011). Crystal structure of QscR, a *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing signal receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 15763–8. doi: 10.1073/pnas.1112398108

Liu, Q., Xin, Y. H., Chen, X. L., Liu, H. C., Zhou, Y. G., and Chen, W. X. (2018). *Arthrobacter ruber* sp. nov., isolated from glacier ice. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 68, 1616–1621. doi: 10.1099/ijsem.0.002719

Lopes-Santos, C., Correia-Neves, M., Moradas-Ferreira, P., and Mendes, M. V. (2012). A walk into the LuxR regulators of actinobacteria: Phylogenomic distribution and functional diversity. *PLoS One* 7: e46758. doi: 10.1371/journal.pone.004675

Lorenz, M. G., and Wackernagel, W. (1994). Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiol. Rev.* 58, 563-602. doi: 10.1128/mr.58.3.563-602.1994

Lyon, G. J., and Novick, R. P. (2004). Peptide signaling in *Staphylococcus aureus* and other Gram-positive bacteria. *Peptides*. 25, 1389–1403. doi: 10.1016/j.peptides.2003.11.026

Magnuson, R., Solomon, J., and Grossman, A. D. (1994). Biochemical and genetic characterization of a competence pheromone from *B. subtilis*. *Cell*. 77, 207-216. doi: 10.1016/0092-8674(94)90313-1

Mansurova, M., Ebert, B. E., Blank, L. M., and Ibañez, A. J. (2018). A breath of information: The volatilome. *Curr. Genet.* 64, 959–964. doi: 10.1007/s00294-017-0800-x

Martínez, P., Huedo, P., Martinez-Servat, S., Planell, R., Ferrer-Navarro, M., Daura, X., Yero, D., Gilbert, I. (2015). *Stenotrophomonas maltophilia* responds to exogenous AHL signals through the LuxR solo SmoR (Smlt1839). *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 5: 41. doi: 10.3389/fcimb.2015.00041

Martínez-Cámara, R., Montejano-Ramírez, V., Moreno-Hagelsieb, G., Santoyo, G., and Valencia-Cantero, E. (2020). The volatile organic compound dimethylhexadecylamine

affects bacterial growth and swarming motility of bacteria. *Folia Microbiol.* 65, 523–532. doi: 10.1007/s12223-019-00756-6

Meier-Kolthoff, J. P., Auch, A. F., Klenk, H.-P., and Göker, M. (2013). Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. *BMC Bioinform.* 14: 60. doi: 10.1186/1471-2105-14-60

Miller, J. F. (1994). Bacterial transformation by electroporation. *Methods Enzymol.* 235, 375–385. doi: 10.1016/0076-6879(94)35156-2

Miller, M. B., and Bassler, B. L. (2001). Quorum sensing in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 55, 165–199. doi: 10.1146/annurev.micro.55.1.165

Monnet, V., and Gardan, R. (2015). Quorum-sensing regulators in gram-positive bacteria 'cherchez le peptide'. *Mol. Microbiol.* 97, 181–184. doi: 10.1111/mmi.13060

Monnet, V., Juillard, V., and Gardan, R. (2014). Peptide conversations in gram-positive bacteria. *Crit. Rev. Microbiol.* 42, 339–351. doi: 10.3109/1040841X.2014.948804

Montejano-Ramírez, V., García-Pineda, E., and Valencia-Cantero, E. (2020). Bacterial compound N, N-dimethylhexadecylamine modulates expression of iron deficiency and defense response genes in *Medicago truncatula* independently of the jasmonic acid pathway. *Plants.* 9:624. doi: 10.3390/plants9050624

Montejano-Ramírez, V., Martínez-Cámara, R., García-Pineda, E., and Valencia-Cantero, E. (2018). Rhizobacterium *Arthrobacter agilis* UMCV2 increases organ-specific expression of FRO genes in conjunction with genes associated with the systemic resistance pathways of *Medicago truncatula*. *Acta Physiol. Plant.* 40:138. doi: 10.1007/s11738-018-2712-x

Morikawa, K., Takemura, A. J., Inose, Y., Tsai, M., Nguyen Thi, Le T., Ohta, T. and Msadek, T. (2012). Expression of a cryptic secondary sigma factor gene unveils natural

competence for DNA transformation in *Staphylococcus aureus*. *PLoS Pathog.* 8: e1003003. doi: 10.1371/journal.ppat.1003003

Mosquito, S., Meng, X., Devescovi, G., Bertani, I., Geller, A. M., Levy, A., Myers, M. P., Bez, C., Covaceuszach, S., Venturi, V. (2020). LuxR solos in the plant endophyte *Kosakonia* sp. strain KO348. *Appl. Environ. Microbiol.* 86, e622–e620. doi: 10.1128/AEM.00622-20

Mukherjee, S, and Bassler, B. L. (2019). Bacterial quorum sensing in complex and dynamically changing environments. *Nat. Rev. Microbiol.* 17, 371-382. doi: 10.1038/s41579-019-0186-5

Nealson, K. H., and Hastings, J. W. (1979). Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. *Microbiol. Rev.* 43, 496-518. doi: 10.1128/mr.43.4.496-518-1979

Ng, W. L., and Bassler, B. L. (2009). Bacterial quorum-sensing network architectures. *Annu. Rev. Genet.* 43, 197-222. doi: 10.1146/annurev-genet-102108-134304

Nickzad, A., Lépine, F., and Déziel, E. (2015). Quorum sensing controls swarming motility of *Burkholderia glumae* through regulation of rhamnolipids. *PLoS One* 10:e0128509. doi: 10.1371/journal.pone.0128509

Niu, H., Sun, X., Song, J., Zhu, Ch., Chen, Y., Gao, N., Qu, X., Ying, H., and Liu, D. (2020). Knockout of *pde* gene in *Arthrobacter* sp. CGMCC 3584 and transcriptomic análisis of its effects on cAMP production. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 43, 839-850. doi: 10.1007/s00449-019-02280-w

Novick, R. (2003). Mobile genetic elements and bacterial toxinoses: the superantigen-encoding pathogenicity islands of *Staphylococcus aureus*. *Plasmid.* 49, 93-105. doi: 10.1016/s0147-619x(02)00157-9

Novick, R. P., Projan, S. J., Kornblum, J., Ross, H. F., Ji, G., Kreiswirth, B., Vandenesch, F., Moghazeh, S. (1995). The *agr* P2 operon: an autocatalytic sensory transduction system in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Gen Genet.* 248, 446-458. doi: 10.1007/BF02191645

Novick, R. P., Ross, H. F., Projan, S. J., Kornblum, J., Kreiswirth, B., Moghazeh, S. (1993). Synthesis of staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule. *EMBO J.* 12, 3967-3975. doi: 10.1002/j.1460-2075.1993.tb06074.x

Ohtani, K., Yuan, Y., Hassan, S., Wang, R., Wang, Y., Shimizu, T. (2009). Virulence gene regulation by the *agr* system in *Clostridium perfringens*. *J. Bacteriol.* 191, 3919-3927. doi: 10.1128/JB.01455-08

Orozco-Mosqueda, M. C., Velázquez-Becerra, C., Macías-Rodríguez, L. I., Santoyo, G., Flores-Cortez, I., Alfaro-Cuevas, R. and Valencia-Cantero, E. (2013). *Arthrobacter agilis* UMCV2 induces iron acquisition in *Medicago truncatula* (Strategy I Plant) in vitro via dimethylhexadecylamine emission. *Plant Soil* 362, 51–66. doi: 10.1007/s11104-012-1263-y

Panthee, S., Kito, N., Hayashi, T., Shimizu, T., Ishikawa, J., Hamamoto, H., Osada, H., and Takahashi, S. (2020). β -carboline chemical signals induce reveromycin production through a LuxR family regulator in *Streptomyces* sp. SN-593. *Sci. Rep.* 10: 10230. doi: 10.1038/s41598-020-66974-y

Papenfort, K., and Bassler, B. L. (2016). Quorum sensing signal-response systems in gram-negative bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 14, 576–588. doi: 10.1038/nrmicro.2016.89

Park, S. F., and Stewart, G. S. (1990). High-efficiency transformation of *Listeria monocytogenes* by electroporation of penicillin-treated cells. *Gene.* 94, 129-132. doi: 10.1016/0378-1119(90)90479-b

Patankar, A. V., and González, J. E. (2009). Orphan LuxR regulators of quorum sensing. *FEMS Microbiol. Rev.* 33, 739–756. doi: 10.1111/j.1574-6976.2009.00163.x

Patel, H. K., Suárez-Moreno, Z. R., Degraasi, G., Subramoni, S., González, J. F., and Venturi, V. (2013). Bacterial LuxR solos have evolved to respond to different molecules including signals from plants. *Front. Plant Sci.* 4:447. doi: 10.3389/fpls.2013.00447

Patwardhan, A., Ray, S., and Roy, A. (2014). Molecular markers in phylogenetic studies-A review. *J. Phylogen Evolution Biol.* 2, 131. doi: 10.4172/2329-9002.1000131

Peng, H. L., Novick, R. P., Kreiswirth, B., Kornblum, J., Schlievert, P. (1988). Cloning, characterization, and sequencing of an accessory gene regulator (*agr*) in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 170, 4365-4372. doi: 10.1128/jb.170.9.4365-4372.1988

Peschel, A., and Otto, M. (2013). Phenol-soluble modulins and staphylococcal infection. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 667-673. doi: 10.1038/nrmicro3110

Pestova, E. V., Havarstein, L. S., and Morrison, D. A. (1996). Regulation of competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae* by an auto-induced peptide pheromone and a two-component regulatory system. *Mol. Microbiol.* 21, 853-862. doi: 10.1046/j.1365-2958.1996.501417.x

Piechulla, B., Lemfack, M. C., and Kai, M. (2017). Effects of discrete bioactive microbial volatiles on plants and fungi. *Plant Cell Environ.* 40, 2042-2067. doi: 10.1111/pce.13011

Podbielski, A., and Kreikemeyer B. (2004). Cell density-dependent regulation: basic principles and effects on the virulence of Gram-positive cocci. *Int. J. Infect. Dis.* 8, 81-95. doi: 10.1016/j.ijid.2003.04.003

Polkade, A. V., Mantri, S. S., Patwekar, U. J., and Jangid, K. (2016). Quorum Sensing: An under-explored phenomenon in the Phylum Actinobacteria. *Front Microbiol.* 7: 131. doi: 10.3389/fmicb.2016.00131

Rajput, A., and Kumar, M. (2017). *In silico* analyses of conservational, functional and phylogenetic distribution of the LuxI and LuxR homologs in gram-positive bacteria. *Sci. Rep.* 7: 6969. doi: 10.1038/s41598-017-07241-5

Recsei, P., Kreiswirth, B., O'Reilly, M., Schlievert, P., Gruss, A., Novick, R.P. (1986). Regulation of exoprotein gene expression in *Staphylococcus aureus* by agar. *Mol. Gen Genet.* 202, 58-61. doi: 10.1007/BF00330517

Riedel, C. U., Monk, I. R., Casey, P. G., Waidmann, M. S., Gahan, C. G., Hill, C. (2009). AgrD-dependent quorum sensing affects biofilm formation, invasion, virulence and global gene expression profiles in *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* 71, 1177-1189. doi: 10.1111/j.1365-2958.2008.06589.x

Rodicio, M. R., and Mendoza, M. C. (2004). Identification of bacteria through 16S rRNA sequencing: principles, methods and applications in clinical microbiology. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 22, 238-245. doi: 10.1157/13059055

Rutherford, S. T., and Bassler, B. L. (2012). Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2, a012427. doi: 10.1101/cshperspect.a012427

Schmidt, R., Cordovez, V., de Boer, W., Raaijmakers, J., and Garbeva, P. (2015). Volatile affairs in microbial interactions. *ISME J.* 9, 2329-2335. doi: 10.1038/ismej.2015.42

Schulz, S., and Dickschat, J. S. (2007). Bacterial volatiles: the smell of small organisms. *Nat. Prod. Rep.* 24, 814-842. doi: 10.1039/b507392h

Schulz-Bohm, K., Martin-Sanchez, L., and Garbeva, P. (2017). Microbial volatiles: Small molecules with an important role in intra- and interkindom interactions. *Front. Microbiol.* 8, 2484. doi: 10.3389/fmicb.2017.02484

Schulz-Bohm, K., Zweers, H., de Boer, W., and Garbeva, P. (2015). A fragrant neighborhood: volatile mediated bacterial interactions in soil. *Front. Microbiol.* 6, 1212. doi: 10.3389/fmicb.2015.01212

Shadel, G. S., Young, R., and Baldwin, T. O. (1990). Use of regulated cell lysis in a lethal genetic selection in *Escherichia coli*: Identification of the autoinducer binding region of the LuxR protein from *Vibrio fischeri* ATCC7744. *J. Bacteriol.* 172, 3980–3987. doi: 10.1128/jb.172.7.3980-3987.1990

Sifri, C. D. (2008). Quorum sensing: bacteria talk sense. *Clin. Infect. Dis.* 47, 1070-1076. doi: 10.1086/592072

Slamti, L., and Lereclus, D. (2002). A cell-cell signaling peptide activates the PlcR virulence regulon in bacteria of the *Bacillus cereus* group. *EMBO J.* 21, 4550-4559. doi: 10.1093/emboj/cdf450

Slamti, L., and Lereclus, D. (2005). Specificity and polymorphism of the PlcR-PapR quorum-sensing system in the *Bacillus cereus* group. *J. Bacteriol.* 187, 1182-1187. doi: 10.1128/JB.187.3.1182-1187.2005

Slock, J., VanRiet, D., Kolibachuk, D., and Greenberg, E. P. (1990). Critical regions of the *Vibrio fischeri* LuxR protein defined by mutational analysis. *J. Bacteriol.* 172, 3974–3979. doi: 10.1128/jb.172.7.3974-3979.1990

Stevens, A. M., and Greenberg, E. P. (1997). Quorum sensing in *Vibrio fischeri*: essential elements for activation of the luminescence genes. *J. Bacteriol.* 179, 557-562. doi: 10.1128/jb.179.2.557.1997

Sunairi, M., Iwabuchi, N., Murakami, K., Watanabe, F., Ogawa, Y., Murooka, H., and Nakajima M. (1996). Effect of penicillin G on the electroporation of *Rhodococcus rhodochrous* CF222. *Lett. Appl. Microbiol.* 22, 66–69. doi: 10.1111/j.1472-765x.1996.tb01110.x

Swartzman, A., Kapoor, S., Graham, A. F., and Meighen, E. A. (1990). A new *Vibrio fischeri* *lux* gene precedes a bidirectional termination site for the *lux* operon. *J. Bacteriol.* 172, 6797-6802. doi: 10.1128/jb.172.12.6797-6802-1990

Swift, S., Bainton, N. J., and Winson, M. K. (1994). Gram-negative bacterial communication by N-acyl homoserine lactones: A universal language? *Trends Microbiol.* 2, 193-198. doi: 10.1016/0966-842x(94)90110-q

Tenover, F. C., and Gaynes R.P. (2000). The epidemiology of *Staphylococcus aureus* infections. In Gram-Positive Pathogens, ed. V. A. Fischetti, R.P. Novick, J.J. Ferretti, D.A. Portnoy, J.I. Rood, pp. 414–421. Washington, D. C. ASM Press

Thoendel, M., and Horswill, A. R. (2013). Random mutagenesis and topology analysis of the autoinducing peptide biosynthesis proteins in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* 87, 318-337. doi: 10.1111/mmi.12100

Thoendel, M., and Horswill, A. R. (2010). Biosynthesis of peptide signals in gram-positive bacteria. *Adv. Appl. Microbiol.* 71, 91-112. doi: 10.1016/S0065-2164(10)71004-2

Thoendel, M., and Horswill, A. R. (2009). Identification of *Staphylococcus aureus* AgrD residues required for autoinducing peptide biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 284, 21828-21838. doi: 10.1074/jbc.M109.031757

Thoendel, M., Kavanaugh, J. S., Flack, C. E., and Horswill, A. R. (2011). Peptide signaling in the staphylococci. *Chem. Rev.* 111, 117-151. doi: 10.1021/cr100370n

Tryfona, T., and Bustard, M. T. (2006). Enhancement of biomolecule transport by electroporation: a review of theory and practical application to transformation of *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnol. Bioeng.* 93, 413–423. doi: 10.1002/bit.20725

Turgeon, N., Laflamme, C., Ho, J., and Duchaine, C. (2006). Elaboration of an electroporation protocol for *Bacillus cereus* ATCC 14579. *J. Microbiol. Methods.* 67, 543–548. doi: 10.1016/j.mimet.2006.05.005

Tyc, O., Wolf, A. B., and Garbeva, P. (2015). The effect of phylogenetically different bacteria on the fitness of *Pseudomonas fluorescens* in sand microcosms. *PLoS One.* 10, e0119838. doi: 10.1371/journal.pone.0119838

Valencia-Cantero, E., Hernández-Calderón, E., Velázquez-Becerra, C., López-Meza, J. E., Alfaro-Cuevas, R., and López-Bucio, J. (2007). Role of dissimilatory fermentative iron-reducing bacteria in Fe uptake by common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants grown in alkaline soil. *Plant Soil.* 291, 263–273. doi: 10.1007/s11104-007-9191-y

Vázquez-Chimalhua, E., Barrera-Ortiz, S., Valencia-Cantero, E., López-Bucio, J., and Ruiz-Herrera, L. F. (2021a). The bacterial volatile N,N-dimethylhexadecylamine promotes *Arabidopsis* primary root elongation through cytokinin signaling and the AHK2 receptor. *Plant Signal. Behav.* 16, 1879542. doi: 10.1080/15592324.2021.1879542

Vázquez-Chimalhua, E., Ruíz-Herrera, L. F., Barrera-Ortiz, S., Valencia-Cantero, E., and López-Bucio, J. (2019). The bacterial volatile dimethyl-hexa-decylamine reveals an antagonistic interaction between jasmonic acid and cytokinin in controlling primary root growth of *Arabidopsis* seedlings. *Protoplasma.* 256, 643–654. doi: 10.1007/s00709-018-1327-9

Vázquez-Chimalhua, E., Valencia-Cantero, E., López-Bucio, J., and Ruiz-Herrera, L. F. (2021b). N, N, dimethyl-hexadecylamine modulates *Arabidopsis* root growth through

modifying the balance between stem cell niche and jasmonic acid-dependent gene expression. *Gene Expr. Patterns* 41, 119201. doi: 10.1016/j.gep.2021.119201

Vázquez-Rivera, D., González, O., Guzmán-Rodríguez, J., Díaz-Pérez, A., Ochoa-Zarzosa, A., López-Bucio, J., Meza-Carmen, V., Campos-García, J. (2015). Cytotoxicity of cyclodipeptides from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 leads to apoptosis in human cancer cell lines. *Biomed. Res. Int.* 15, 197608. doi: 10.1115/2015/197608

Velázquez-Becerra, C., Macías-Rodríguez, L. I., Lopez-Bucio, J., Altamirano-Hernandez, J., Flores-Cortez, I., and Valencia-Cantero, E. (2011). A volatile organic compound analysis from *Arthrobacter agilis* identifies dimethylhexadecylamine, an amino-containing lipid modulating bacterial growth and *Medicago sativa* morphogenesis in vitro. *Plant Soil.* 339, 329-340. doi: 10.1007/s11104-010-0583-z

Velázquez-Becerra, C., Macías-Rodríguez, L. I., Lopez-Bucio, J., Flores-Cortez, I., Santoyo, G., Hernandez-Soberano, C., et al. (2013). The rhizobacterium *Arthrobacter agilis* produces dimethylhexadecylamine, a compound that inhibits growth of phytopathogenic fungi in vitro. *Protoplasma.* 250, 1251-1262. doi: 10.1007/s00709-013-0506-y

Venturi, V., and Fuqua, C. (2013). Chemical signaling between plants and plant pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 51, 17-37. doi: 10.1146/annurevphyto-082712-102239

Verbeke, F., De Craemer, S., Debunne, N., Janssens, Y., Wynendaele E., Van de Wiele, C., De Spiegeleer, B. (2017). Peptides as quorum sensing molecules: measurement techniques and obtained levels *In vitro* and *In vivo*. *Front. Neurosci.* 11, 183. doi: 10.3389/fnins.2017.00183

Vespermann, A., Kai, M., and Piechulla, B. (2007). Rhizobacterial volatiles affect the growth of fungi and *Arabidopsis thaliana*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 5639-5641. doi: 10.1128/aem.01078-07

Wang, R., Braughton, K. R., Kretschmer, D., Bach, T. H., Queck, S. Y., Li, M., Kennedy, A. D., Dorward, D. W., Klebanoff, S. J., Peschel, A., DeLeo, F. R., Otto, M. (2007). Identification of novel cytolytic peptides as key virulence determinants for community-associated MRSA. *Nat. Med.* 13, 1510-1514. doi: 10.1038/nm1656

Wang, L., Jeon, B., Sahin, O., and Zhang, Q. (2009). Identification of an arsenic resistance and arsenic-sensing system in *Campylobacter jejuni*. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 5064–5073. doi: 10.1128/AEM.00149-09

Waters, C. M., and Bassler, B. L. (2005). Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21, 319–346. doi: 10.1146/annurev.cellbio.21.012704.131001

Weaver, J. C. (1995). Electroporation theory. Concepts and mechanisms. *Methods Mol. Biol.* 55, 3–28. doi: 10.1385/0-89603-328-7:3

Wertheim, H. F., Melles, D. C., Vos, M. C., van Leeuwen, W., van Belkum, A., Verbrugh H. A., Nouwen, J. L. (2005). The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet. Infect. Dis.* 5, 751-762. doi: 10.1016/S1473-3099(05)70295-4

Wheatley, R. E. (2002). The consequences of volatile organic compound mediated bacterial and fungal interactions. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 81, 357-364. doi: 10.1023/A:1020592802234

Whitehead, N. A., Barnard, A. M., Slater, H., Simpson, N. J., Salmond, G. P. (2001). Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 25, 365-404. doi: 10.1111/j.1574-6976.2001.tb00583.x

Whiteley, M., Diggle, S. P., and Greenberg, E. P. (2017). Progress in and promise of bacterial quorum sensing research. *Nature* 551, 313–320. doi: 10.1038/nature24624

Xie, S., Zang, M., Wu, H., Rajer, F. U., and Gao, X. (2018). Antibacterial effects of volatiles produced by *Bacillus* strain D13 against *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae*. *Mol. Plant Pathol.* 19, 49-58. doi: 10.1111/mpp.12494

Xu, G. (2020). Evolution of LuxR solos in bacterial communication: Receptors and signals. *Biotechnol. Lett.* 42, 181-186. doi: 10.1007/s10529-019-02763-6

Yang, L. L., Liu, H. C., Liu, Q., and Xin, Y. H. (2021). *Arthrobacter cheniae* and *Arthrobacter frigidicola* sp. nov., isolated from a glacier. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 71: 5177. doi: 10.1099/ijsem.0.005177

Zavilgelski, G. B., and Manukhov, I. V. (2001). Quorum sensing, or how bacteria “talk” to each other. *Mol. Biol.* 35, 224-232. doi: 10.1023/A:1010439501530

Zenno, S., and Saigo, K. (1994) Identification of the genes encoding NAD(P)H-flavin oxidoreductases that are similar in sequence to *Escherichia coli* Fre in four species of luminous bacteria: *Photorhabdus luminescens*, *Vibrio fischeri*, *Vibrio harveyi*, and *Vibrio orientalis*. *J. Bacteriol.* 176, 3544-3551. doi: 10.1128/jb.176.12.3544-3551.1994

Zhang, L., Jia, Y., Wang, L., and Fang, R. (2007). A proline iminopeptidase gene upregulated in planta by a LuxR homologue is essential for pathogenicity of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Mol. Microbiol.* 65, 121-136. doi: 10.1111/j.1365-2958.2007.05775.x

Zhang, R-g., Pappas, K. M., Brace, J. L., Miller, P. C., Oulmassov, T., Molyneaux, J. M., Anderson, J. C., Bashkin, J. K., Winans, S. C., Joachimiak, A. (2002). Structure of a bacterial quorum-sensing transcription factor complexed with pheromone and DNA. *Nature* 417, 971-974. doi: 10.1038/nature00833

Zhang, H., Li, Y., Chen, X., Sheng, H., and An, L. (2011). Optimization of electroporation conditions for *Arthrobacter* with plasmid pART2. *J. Microbiol. Methods*. 84, 114-120. doi: 10.1016/j.mimet.2010.11.002