



---

**Centro de Investigación y Asistencia en  
Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco**

**Posgrado de Ciencias de la Floricultura**

TESIS DE MAESTRIA EN CIENCIAS

**Rol de los residuos cisteína del regulador transcripcional  
IscR en la biogénesis de los centros [Fe-S] y la virulencia  
de *Dickeya dadantii* en violeta africana**

Presenta

**Julio César Juárez García**

Comité Tutorial:

Director de tesis: Dr. Gabriel Rincón Enríquez

Codirectora de tesis: Dra. Evangelina Esmeralda Quiñones Aguilar

Asesora: Dra. Sara Elisa Herrera Rodríguez

---

*Guadalajara Jalisco, Febrero de 2015.*



**El trabajo de esta tesis de posgrado fue parte del proyecto intitulado:**

**“Estudio de los mecanismos para la inhibición de la biogénesis de los centros hierro-azufre [Fe-S] en bacterias fitopatógenas”**

***Financiado por el Fondo Sectorial SEP-CONACyT***

(Ciencia Básica 2008)

**Clave CONACyT CB-2008-01-99501**

**La presente investigación se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del estado de Jalisco (CIATEJ) A.C. bajo la codirección de Dr. Gabriel Rincón Enríquez y la Dra. Evangelina Esmeralda Quiñones Aguilar y la asesoría de la Dra. Sara Elisa Herrera Rodríguez.**

---

**De ésta tesis se han generado conocimientos presentados y publicado en los trabajos siguientes:**

## **Publicaciones ISBN o ISSN**

- Juárez-García J. C.,** E. E. Quiñones-Aguilar y G. Rincón-Enríquez. **2013.** Implicación de mutaciones de los residuos de cisteínas del regulador transcripcional *IscR* de *Dickeya dadantii* en la virulencia sobre violeta africana (*Saintpaulia ionantha*). 4<sup>to</sup> Congreso Internacional de Biología, Química y Agronomía. Guadalajara Jalisco. 25-27 de Septiembre de 2013. p. 249-258. (ISBN 978-607-719-003-5).
- Juárez-García J. C.,** E. E. Quiñones-Aguilar y G. Rincón-Enríquez. **2014.** Participación de las cisteínas de *IscR* de *Dickeya dadantii* en la virulencia sobre violeta africana (*Saintpaulia ionantha*). Revista Mexicana de Fitopatología 32: S51. (ISSN: 2007-8080).
- Juárez-García J. C.,** E. E. Quiñones-Aguilar y G. Rincón-Enríquez. **2014.** Mutaciones del regulador transcripcional *IscR*, una herramienta para la disminución de la virulencia en *Dickeya dadantii*. Revista Mexicana de Fitopatología 32: S96. (ISSN: 2007-8080).

## **Participación en Congresos**

### **Congreso de Bioquímica 2012**

**Juárez-García J.C.,** E.E. Quiñones-Aguilar y G. Rincón-Enríquez. **2012.** Estudio del efecto de mutaciones del regulador transcripcional *iscR* de *Dickeya dadantii* sobre su patogenicidad en violeta africana (*Saintpaulia ionantha*). In: XXIX Congreso Nacional de Bioquímica, Sociedad Mexicana de Bioquímica A.C. 11 al 17 de noviembre, Oaxaca, Oaxaca México. (Cartel).

### **Congreso de Biología, Química y Agronomía 2013**

**Juárez-García J. C.,** E. E. Quiñones-Aguilar y G. Rincón-Enríquez. **2013.** Implicación de mutaciones de los residuos de cisteínas del regulador transcripcional *IscR* de *Dickeya dadantii* en la virulencia sobre violeta africana (*Saintpaulia ionantha*). 4<sup>to</sup> Congreso Internacional de Biología, Química y Agronomía. Guadalajara Jalisco. 25-27 de Septiembre de 2013. (Poster).

### **Congreso Bioquímica y Biología Molecular de Bacterias 2013**

**Juárez-García J. C.,** D. E. Navarro-López, E. E. Quiñones-Aguilar, J. A. Qui-Zapata and G. Rincón-Enríquez. **2013.** Characterization of mutant *iscR* of *Dickeya dadantii* for the biogenesis in clusters [Fe-S]. III Congreso de Bioquímica y Biología Molecular de Bacterias. Sociedad Mexicana de Bioquímica, A.C. 3-7 Octubre de 2013, Cuatro Ciénegas, Coahuila. (Poster).

### **Congreso de Fitopatología 2014**

**Juárez-García J. C.,** E. E. Quiñones-Aguilar y G. Rincón-Enríquez. **2014.** Participación de las cisteínas de *IscR* de *Dickeya dadantii* en la virulencia sobre violeta africana (*Saintpaulia ionantha*). XVI Congreso Internacional y XLI Congreso Nacional de Fitopatología. Sociedad Mexicana de Fitopatología, A.C. 20 al 24 de Julio, Ixtapan de la Sal Estado de México, México. (Cartel).

**Juárez-García J. C.,** E. E. Quiñones-Aguilar y G. Rincón-Enríquez. **2014.** Mutaciones del regulador transcripcional *IscR*, una herramienta para la disminución de la virulencia en *Dickeya dadantii*. XVI Congreso Internacional y XLI Congreso Nacional de Fitopatología. Sociedad Mexicana de Fitopatología, A.C. 20 al 24 de Julio, Ixtapan de la Sal Estado de México, México. (Oral).

### **Congreso Bioquímica 2014**

Rincón-Enríquez G., D. E. Navarro-López, **J. C. Juárez-García,** E. E. Quiñones-Aguilar and J. A. Qui-Zapata. **2014.** The *ISC* genetic system involved in the virulence of pathogenic bacteria of plant. XXX Congreso Nacional de Bioquímica, 2 al 8 de noviembre, Guadalajara, Jalisco México. (Cartel).

# ÍNDICE GENERAL

	Pág
	.
<b>1. Introducción</b> .....	20
<b>2. Antecedentes</b> .....	24
2.1. Centros de hierro-azufre [Fe-S].....	24
2.2. Función biológica de los centros [Fe-S].....	25
2.3. Biogénesis de los centros [Fe-S].....	26
2.4. Sistemas de biogénesis de los centros [Fe-S] en bacterias.....	27
2.4.1 Sistema NIF.....	27
2.4.2. Sistemas genéticos Isc, Suf y Csd.....	28
2.5. Condiciones elementales para la biogénesis de centros [Fe-S].....	30
2.5.1. Especies reactivas de oxígeno.....	30
2.5.2. Carencia en hierro.....	32
2.6. Importancia de los residuos de cisteína en las proteínas.....	34
2.7. <i>Dickeya dadantii</i> .....	36
2.8. Violeta africana ( <i>Saintpaulia ionantha</i> ).....	39
2.9. Estudio de la proteína reguladora IscR.....	40
<b>3. Justificación</b> .....	43
<b>4. Hipótesis</b> .....	44
<b>5. Objetivos</b> .....	45
6.1 Objetivo General.....	45
6.2. Objetivos específicos.....	45
<b>6. Metodología</b>	
6.1. Propagación <i>in vitro</i> de violeta africana.....	46
6.1.1. Preparación de medio de cultivo.....	46
6.1.2. Multiplicación <i>in vitro</i> de violeta africana.....	46
6.2. Propagación <i>In vivo</i> de violeta africana.....	46
6.3. Cepas bacterianas y medios de cultivo.....	47
6.4. Análisis <i>in silico</i> por bioinformático.....	47
6.5. Preparación de células electrocompetentes de <i>Escherichia coli</i> y <i>Dickeya dadantii</i> .....	48
6.6. Extracción de ADN de <i>D. dadantii</i> .....	48
6.7. Reacción de amplificación de ADN por PCR y purificación de los productos.....	49
6.8. Purificación de los productos PCR.....	49
6.9. Ligación de <i>iscR</i> en el plásmido pGEM-T (ampicilina resistencia).....	49
6.10. Inserción de la construcción pGEMiscR (amp) y selección en <i>E. coli</i>	

<i>DH5α</i> .....	50
6.11. Extracción de ADN plasmídico.....	51
6.12. Interrupción del gen <i>iscR</i> con la cassette no polar de kanamicina ( <i>aphA3</i> ).....	51
6.13. Transformación y verificación de la construcción del plásmido pGEM- <i>iscR::aphA3</i> (resistencia ampicilina-kanamicina).....	52
6.14. Inserción de construcción (pGEM- <i>iscR::aphA3</i> ) y selección de colonias transformadas en <i>D. dadantii</i> .....	52
6.15. Construcción del mutante nulo de <i>iscR</i> en la cepa 3937 de <i>D. dadantii</i> mediante recombinación homóloga.....	52
6.16. Generación de mutaciones puntuales de las cisteínas de IscR utilizando el kit site-directed mutagenesis.....	54
6.17. Caracterización de las cepas mutantes de las cepas 3937 de <i>D. dadantii</i> y K12 de <i>E. coli</i> en condiciones de estrés oxidativo y carencia en hierro mediante pruebas de complementación fenotípica.....	58
6.18. Pruebas en medio mínimo M9 de cepas mutantes de <i>D.dadantii</i> y <i>E.</i> <i>coli</i> .....	59
6.19. Evaluación de la virulencia de la cepa silvestre y condicional Isc de <i>D.</i> <i>dadantii</i> bajo condiciones <i>in planta</i> .....	59
<b>7. Resultados y Discusión</b> .....	61
<i>Resultados preliminares</i> .....	61
7.1. Propagación <i>in vitro</i> de violeta africana.....	64
7.1.1 Propagación vegetativa de plantas de violeta africana.....	64
7.2. Clonación de la construcción genética <i>IscR::aphA3</i> en el plásmido pGEM para mutagenizar <i>iscR</i> en <i>D. dadantii</i> .....	65
7.3. Mutagénesis por recombinación homóloga de la construcción <i>iscR::aphA3</i> contenida en el plásmido pGEM <i>iscR::aphA3</i> con el gen silvestre <i>iscR</i> del cromosoma de <i>D. dadantii</i> .....	66
7.4. Mutagenesis por cambio de los residuos cisteínas por histidinas del gen <i>iscR</i> de <i>Dickeya dadantii</i> .....	68
7.5. Caracterización fenotípica de las cepas silvestre K12 (WT) y mutante nulo <i>iscR<sup>Δ</sup></i> de <i>E. coli</i> bajo condiciones de estrés oxidativo y carencia en hierro.....	72
7.6. Caracterización fenotípica del efecto de las proteínas IscR portando las mutaciones cisteínas en la cepa silvestre K12 (WT) y mutante nulo <i>iscR<sup>Δ</sup></i> de <i>E. coli</i> bajo condiciones de estrés por carencia en hierro.....	73
7.7. Caracterización fenotípica del efecto de las proteínas IscR portando las mutaciones cisteínas en la cepa silvestre K12 (WT) y mutante nulo <i>iscR<sup>Δ</sup></i> de <i>E. coli</i> en condiciones de crecimiento en medio mínimo.....	77

7.8. Caracterización fenotípica del efecto de las proteínas IscR portando las mutaciones cisteínas en la cepa silvestre 3937 (WT) y mutante condicional <i>isc</i> de <i>Dickeya dadantii</i> bajo condiciones de estrés oxidativo.....	79
7.9. Caracterización fenotípica del efecto de las proteínas IscR portando las mutaciones cisteínas en la cepa silvestre 3937 (WT) y mutante condicional <i>isc</i> de <i>Dickeya dadantii</i> bajo condiciones de estrés por carencia en hierro.....	83
7.10. Caracterización fenotípica del efecto de las proteínas IscR portando las mutaciones cisteínas en la cepa silvestre 3937 (WT) y mutante condicional <i>isc</i> de <i>Dickeya dadantii</i> bajo de crecimiento en medio mínimo.....	85
7.11. Caracterización fenotípica del efecto de las proteínas IscR portando las mutaciones cisteínas en la cepa silvestre 3937 (WT) y mutante condicional <i>isc</i> de <i>Dickeya dadantii</i> en su virulencia sobre plantas de violeta africana.....	87
8. Conclusiones.....	99
9. Perspectivas.....	100
10. Bibliografía.....	101

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pag.
<b>Figura 1.</b> Aspecto general de plantas en floración de violeta africana ( <i>Saintpaulia ionantha</i> ).....	20
<b>Figura 2.</b> Pudrición blanda en hoja de violeta africana (área oscura de la hoja) a los 4 días después de la infección con la bacteria fitopatógena <i>D. dadantii</i> .....	21
<b>Figura 3.</b> Diversidad de tipos, formas y estructura química de los cofactores hierro-azufre [Fe-S]. (A) Rómbica, (B) Cúbica y (C) Fusionados (Johnson <i>et al.</i> , 2005).....	24
<b>Figura 4.</b> Sistemas genéticos (operones) encargados de la biogénesis de centros [Fe-S] en <i>Dickeya dadantii</i> ( <i>Erwinia chrysanthemi</i> ) (Quiñones-Aguilar y Rincón-Enríquez, 2011).....	26
<b>Figura 5.</b> Esquema general de la biogénesis de los centros [Fe-S] (modificado a partir de Lill, 2008).....	27
<b>Figura 6.</b> Estructura química (A) y modelo de un residuo aminoacídico de cisteína (B) y (C). En C los carbonos están representados por esferas blancas, el oxígeno por la esfera negra, el azufre por la gris clara y el nitrógeno por la gris oscura.....	35
<b>Figura 7.</b> Esquema general del mapa del vector pGEM-T utilizado en este estudio como vector de clonación (Promega, 2012).....	50
<b>Figura 8.</b> Esquema general para introducir las mutaciones de cambio de cisteínas por histidinas en el plásmido pGEMiscR mediante el Phusion Site-Directed Mutagenesis Kit (Thermo Scientific®).....	55
<b>Figura 9.</b> Pudrición blanda típica provocada por la cepa silvestre 3937 de <i>Dickeya dadantii</i> sobre hojas de endivia (A), violeta africana (B) y <i>Arabidopsis thaliana</i> (C) después de 6 días de inoculación bajo condiciones <i>in vitro</i> e <i>in planta</i> .....	62
<b>Figura 10.</b> Síntomas de pudrición blanda provocados por la cepa recombinante (posible mutante del sistema <i>isc</i> ) (A) y de la silvestre 3937 (B) de <i>Dickeya dadantii</i> en hojas de endivias ( <i>Cichorium endivia</i> ) a los 8 días después de inoculación bajo condiciones <i>in vitro</i> .....	62
<b>Figura 11.</b> Amplificación del fragmento de 5000 pb que contiene <i>iscR</i> de <i>D. dadantii</i> . Carril 1 = marcador de tamaño de fragmentos (1 Kb plus DNA ladder de Invitrogene®). Carril 2 = amplificación del fragmento de 5000 pb.....	63
<b>Figura 12.</b> Amplificación de la casete no polar <i>aphA3</i> con marcador de resistencia a la kanamicina. Carril 1 = plásmido (con <i>aphA3</i> ); carril 2 = fragmento amplificado de <i>aphA-3</i> (850 pb).....	63
<b>Figura 13.</b> Propagación <i>in vitro</i> de plantas de violeta africana en medio MS con reguladores de crecimiento.....	64
<b>Figura 14.</b> Propagación vegetativa de plantas de violeta africana bajo cuarto de incubación a 27°C.....	64
<b>Figura 15.</b> Verificación de las distintas etapas de la elaboración del plásmido que porta la construcción genética para hacer el mutante nulo <i>iscR</i> de <i>D. dadantii</i> ( <i>iscR::aphA3</i> ). Los carriles con el marcador molecular corresponde a 1 Kb plus DNA ladder de Invitrogene® (1 Kb Plus). (A) carril 2= gen <i>iscR</i> (3500 pb) amplificado a partir del genoma de <i>D. dadantii</i> . (B) Carril 1 = amplificación de <i>aphA3</i> mas el plásmido pJH1 (Caillaud <i>et al.</i> , 1987) que contiene la casete; Carril 2 = amplificación de <i>aphA3</i> (850 pb). (C) Carril 1 = digestión de pGEMiscR con la enzima <i>SmaI</i> (6500 pb); Carril 2 = plásmido pGEMiscR sin digerir. (D1) Carriles 2, 3 y 4 = Plásmidos pGEMiscR:: <i>aphA3</i> digeridos con <i>EcoR1</i> , generando dos fragmentos (3000 y 4350 pb). (D2) Carriles 1= Plásmidos pGEMiscR:: <i>aphA3</i> digeridos con <i>EcoRV</i> , generando 3 fragmentos de	

5722, 624 y 350 pb; carril 2= Plásmido pGEMiscR::aphA3 sin digerir.....	66
<b>Figura 16.</b> Gradientes de temperatura para amplificación del pBADiscR (5037 pb) con las cisteínas 92 (A) y 98 (B) mutadas por histidinas. Los carriles con el marcador molecular corresponde a 1 Kb plus DNA ladder de Invitrogene® (1 Kb Plus). Los números arriba en cada carril indican las distintas temperaturas de fusión a las cuales se evaluó la reacción de PCR para cada par de iniciadores en cada cisteína. (-) = Reacción sin la TAQ-polimerasa, migración del templado (pBADiscR).....	68
<b>Figura 17i.</b> Determinación de la cantidad mínima de templado de ADN (pBADiscR, 5037 pb) para realizar la reacción de PCR de los plásmidos que portan las cisteínas 92, 98 y 104 mutadas por histidinas. Los carriles con el marcador molecular corresponde a 1 Kb plus DNA ladder de Invitrogene® (1 Kb Plus). Los números arriba en cada carril indican las mutaciones para las distintas cisteínas y abajo la concentración de templado en ng $\mu\text{L}^{-1}$ de pBADiscR para la reacción de PCR.....	69
<b>Figura 17ii.</b> Obtención de los pBADiscR <sub>mutantes</sub> (con las distintas mutantes de las cisteínas) linearizados (5037 pb) por PCR por medio del Phusion Site-Directed Mutagenesis Kit (Thermo Scientific®). Los carriles con el marcador molecular corresponde a 1 Kb plus DNA ladder de Invitrogene® (1 Kb Plus). Las claves Cys-número indican la cisteína mutada a histidina. (-) = migración del plásmido pBADiscR.....	70
<b>Figura 18.</b> Comparación de la secuencia de la proteína IscR (164 residuos aminoácidos) con las proteínas IscR que portan cambios de los residuos cisteínas por histidinas en las posiciones 92, 98 o 104 (rectángulos en rojo) y una proteína IscR trucada en C-terminal (rectángulo en negro). (A) Plásmido sometido para cambiar C x H en la posición 92 (rectángulo verde) de IscR no presentó dicha mutación. (B-E) Plásmidos portando cambios C x H en varias posiciones (92, 98 o 104). (F) Plásmido portando una proteína truncada en la posición C-terminal (IscR <sub>-1/2</sub> ).....	71
<b>Figura 19.</b> Crecimiento de las cepas silvestre (WT) y mutante nulo <i>iscR</i> <sup>Δ</sup> de <i>E. coli</i> en medio rico (LB) en condiciones de estrés oxidativo de tipo superóxido provocado por a 0 (A), 80 (B), 160 (C) y 320 (D) $\mu\text{M}$ de paraquat (PQ).....	72
<b>Figura 20.</b> Crecimiento de las cepas silvestre (WT) y mutante nulo <i>iscR</i> <sup>Δ</sup> de <i>E. coli</i> en medio rico (LB) en condiciones de estrés por carencia en hierro provocado por a 0 (A), 150 (B), 350 (C) y 450 (D) $\mu\text{M}$ de 2,2'dipyridil (DIP).....	73
<b>Figura 21.</b> Efecto de proteínas IscR silvestre o mutantes expresadas (arabinosa, ARA) o reprimidas (glucosa, GLU) sobre el crecimiento de la cepa silvestre (WT) de <i>E. coli</i> en medio rico (LB) en condiciones de estrés por carencia en hierro provocado por 450 $\mu\text{M}$ de 2,2'dipyridil (DIP).....	74
<b>Figura 22.</b> Efecto de proteínas IscR silvestre o mutantes expresadas (arabinosa, ARA) o reprimidas (glucosa, GLU) sobre el crecimiento de la cepa <i>iscR</i> <sup>Δ</sup> de <i>E. coli</i> en medio rico (LB) en condiciones de estrés por carencia en hierro provocado por 450 $\mu\text{M}$ de 2,2'dipyridil (DIP).....	75
<b>Figura 23.</b> Efecto de proteínas IscR silvestre o mutantes expresadas (arabinosa, ARA) o reprimidas (glucosa, GLU) sobre el crecimiento de la cepa <i>iscR</i> <sup>Δ</sup> de <i>E. coli</i> en medio rico (LB) en condiciones de estrés por carencia en hierro provocado por 0, 150, 300 y 450 $\mu\text{M}$ de 2,2'dipyridil (DIP). <i>iscR</i> <sup>Δ</sup> de <i>E. coli</i> con plásmidos: JG9 = Sin plásmido. JG10 = pBAD. JG11 = pBADiscR. JG12 = pBADiscR <sub>-92*104</sub> . JG13 = pBADiscR <sub>-98*104</sub> . JG14 = pBADiscR <sub>-92*98</sub> . JG15 = pBADiscR <sub>-92*98*104</sub> . JG16 = pBADiscR <sub>-1/2</sub> .....	76
<b>Figura 24.</b> Efecto de proteínas IscR silvestre o mutantes expresadas (arabinosa, ARA) sobre el crecimiento de la cepa <i>iscR</i> <sup>Δ</sup> de <i>E. coli</i> en medio rico (LB) en condiciones de estrés por carencia en hierro provocado por 450 $\mu\text{M}$ de 2,2'dipyridil (DIP).....	77
<b>Figura 25.</b> Efecto de proteínas IscR silvestre o mutantes expresadas (arabinosa,	



- ARA) o reprimidas (glucosa, GLU) sobre el crecimiento de la cepa silvestre (WT) de *E. coli* en medio mínimo (M9 glicerol, GLY). WT de *E. coli* con plásmidos: JG1 = Sin plásmido. JG2 = pBAD. JG3 = pBADiscR. JG4 = pBADiscR<sub>-92\*104</sub>. JG5 = pBADiscR<sub>-98\*104</sub>. JG6 = pBADiscR<sub>-92\*98</sub>. JG7 = pBADiscR<sub>-92\*98\*104</sub>. JG8 = pBADiscR<sub>-1/2</sub>..... 78
- Figura 26.** Efecto de proteínas IscR silvestre o mutantes expresadas (arabinosa, ARA) o reprimidas (glucosa, GLU) sobre el crecimiento del mutante *iscR*<sup>▲</sup> de *E. coli* en medio mínimo (M9 glicerol, GLY). *iscR*<sup>▲</sup> de *E. coli* con plásmidos: JG9 = Sin plásmido. JG10 = pBAD. JG11 = pBADiscR. JG12 = pBADiscR<sub>-92\*104</sub>. JG13 = pBADiscR<sub>-98\*104</sub>. JG14 = pBADiscR<sub>-92\*98</sub>. JG15 = pBADiscR<sub>92\*98\*104</sub>. JG16 = pBADiscR<sub>1/2</sub>..... 78
- Figura 27.** Efecto de proteínas IscR silvestre o mutantes expresadas (arabinosa, ARA) o reprimidas (glucosa, GLU) sobre el crecimiento de la cepa silvestre 3937 (WT) de *D. dadantii* en medio rico (LB). 3937 (WT) de *D. dadantii* con plásmidos: JC1 = Sin plásmido. JC2 = pBAD. JC3 = pBADiscR. JC4 = pBADiscR<sub>-92\*104</sub>. JC5 = pBADiscR<sub>-98\*104</sub>. JC6 = pBADiscR<sub>-92\*98</sub>. JC7 = pBADiscR<sub>-92\*98\*104</sub>. JC8 = pBADiscR<sub>-1/2</sub>..... 79
- Figura 28.** Efecto de proteínas IscR silvestre o mutantes expresadas (arabinosa, ARA) sobre el crecimiento de la cepa silvestre 3937 (WT) de *D. dadantii* en medio rico (LB) con estrés oxidativo provocado por 40, 60 y 80 μM de paraquat (PQ). 3937 (WT) de *D. dadantii* con plásmidos: JC1 = Sin plásmido. JC2 = pBAD. JC3 = pBADiscR. JC4 = pBADiscR<sub>-92\*104</sub>. JC5 = pBADiscR<sub>-98\*104</sub>. JC6 = pBADiscR<sub>-92\*98</sub>. JC7 = pBADiscR<sub>-92\*98\*104</sub>. JC8 = pBADiscR<sub>-1/2</sub>..... 80
- Figura 29.** Efecto de proteínas IscR silvestre o mutantes expresadas (arabinosa, ARA) o reprimidas (glucosa, GLU) sobre el crecimiento del mutante condicional *isc* de *D. dadantii* en medio rico (LB). Mutante condicional *isc* de *D. dadantii* con plásmidos: JC9 = Sin plásmido. JC10 = pBAD. JC11 = pBADiscR. JC12 = pBADiscR<sub>-92\*104</sub>. JC13 = pBADiscR<sub>-98\*104</sub>. JC14 = pBADiscR<sub>-92\*98</sub>. JC15 = pBADiscR<sub>-92\*98\*104</sub>. JC16 = pBADiscR<sub>-1/2</sub>..... 82
- Figura 30.** Efecto de proteínas IscR silvestre o mutantes expresadas (arabinosa, ARA) sobre el crecimiento del mutante condicional *isc* de *D. dadantii* en medio rico (LB) con estrés oxidativo provocado por 40, 60 y 80 μM de paraquat (PQ). Mutante condicional *isc* de *D. dadantii* con plásmidos: JC9 = Sin plásmido. JC10 = pBAD. JC11 = pBADiscR. JC12 = pBADiscR<sub>-92\*104</sub>. JC13 = pBADiscR<sub>-98\*104</sub>. JC14 = pBADiscR<sub>-92\*98</sub>. JC15 = pBADiscR<sub>-92\*98\*104</sub>. JC16 = pBADiscR<sub>-1/2</sub>..... 82
- Figura 31.** Efecto de proteínas IscR silvestre o mutantes expresadas (arabinosa, ARA) sobre el crecimiento de la cepa silvestre 3937 de *D. dadantii* en medio rico (LB) con estrés en carencia en hierro de 125, 250 y 375 μM de 2',2'-Dipyridil (DIP). 3937 (WT) de *D. dadantii* con plásmidos: JC1 = Sin plásmido. JC2 = pBAD. JC3 = pBADiscR. JC4 = pBADiscR<sub>-92\*104</sub>. JC5 = pBADiscR<sub>-98\*104</sub>. JC6 = pBADiscR<sub>-92\*98</sub>. JC7 = pBADiscR<sub>-92\*98\*104</sub>. JC8 = pBADiscR<sub>-1/2</sub>..... 84
- Figura 32.** Efecto de proteínas IscR silvestre o mutantes expresadas (arabinosa, ARA) sobre el crecimiento del mutante condicional *isc* de *D. dadantii* en medio rico (LB) con estrés en carencia en hierro de 125, 250 y 375 μM de 2',2'-Dipyridil (DIP). Mutante condicional *isc* de *D. dadantii* con plásmidos: JC9 = Sin plásmido. JC10 = pBAD. JC11 = pBADiscR. JC12 = pBADiscR<sub>-92\*104</sub>. JC13 = pBADiscR<sub>-98\*104</sub>. JC14 = pBADiscR<sub>-92\*98</sub>. JC15 = pBADiscR<sub>-92\*98\*104</sub>. JC16 = pBADiscR<sub>-1/2</sub>..... 84
- Figura 33.** Representación esquemática del reconocimiento de la proteína IscR-apo (mutante de sus tres cisteínas por alaninas, IscR<sub>-92A\*98A\*104A</sub>) por la zona promotora de tipo 2 (en este caso del gen *hya* (tomado de Rajagopalan *et al.*, 2013). (A) representación de la proteína y la secuencia de reconocimiento tipo 2 de ADN reconocido por el dímero IscR en su forma apo, las esferas moradas representan las alaninas y la rosa a la histidina. (B) representación esquemática de la interacción entre apo IscR<sub>-92A\*98A\*104A</sub> en su forma dímera y la zona tipo 2 del ADN, W= residuo arginina y RH= reconocimiento de la zona hélice de la proteína

	(involucra residuos aminoacídicos como Glu, Ser y Gln).....	85
<b>Figura 34.</b>	Efecto de proteínas IscR silvestre o mutantes expresadas (arabinosa, ARA) o reprimidas (glucosa, GLU) sobre el crecimiento de la cepa silvestre 3937 de <i>D. dadantii</i> en medio mínimo (M9 glicerol, GLY). 3937 (WT) de <i>D. dadantii</i> con plásmidos: JC1 = Sin plásmido. JC2 = pBAD. JC3 = pBADiscR. JC4 = pBADiscR <sub>-92*104</sub> . JC5 = pBADiscR <sub>-98*104</sub> . JC6 = pBADiscR <sub>-92*98</sub> . JC7 = pBADiscR <sub>-92*98*104</sub> . JC8 = pBADiscR <sub>-1/2</sub> .....	86
<b>Figura 35.</b>	Efecto de proteínas IscR silvestre o mutantes expresadas (arabinosa, ARA) o reprimidas (glucosa, GLU) sobre el mutante condicional <i>isc</i> de <i>D. dadantii</i> en medio mínimo (M9 glicerol, GLY). Mutante condicional <i>isc</i> de <i>D. dadantii</i> con plásmidos: JC9 = Sin plásmido. JC10 = pBAD. JC11 = pBADiscR. JC12 = pBADiscR <sub>-92*104</sub> . JC13 = pBADiscR <sub>-98*104</sub> . JC14 = pBADiscR <sub>-92*98</sub> . JC15 = pBADiscR <sub>-92*98*104</sub> . JC16 = pBADiscR <sub>-1/2</sub> .....	86
<b>Figura 36.</b>	Escala ordinal cualitativa de severidad para cuantificar la virulencia de la cepa silvestre 3937 de <i>Dickeya dadantii</i> sobre plantas de violeta africana. Los síntomas observados fueron realizados en un periodo de 11 días después de la inoculación. Lo síntomas comienzan con la pudrición blanda en el sitio de la infección y se expande hasta alcanzar toda la parte de la hoja hasta llegar al peciolo y provocar el desprendimiento de la hoja. Arriba de los síntomas se muestra la escala de colores que se emplearon para representar la virulencia de las distintas cepas de <i>D. dadantii</i> sobre plantas de violeta africana.....	87
<b>Figura 37.</b>	Comportamiento de la virulencia de las cepas silvestre (3937) y mutante condicional <i>isc</i> ( <i>isc</i> <sup>-</sup> ) de <i>Dickeya dadantii</i> a través del tiempo en plantas de violeta africana. El mutante <i>isc</i> <sup>-</sup> contiene en <i>trans</i> el plásmido pBADiscR que expresa (arabinosa, ARA) o reprime (glucosa, GLU) la trasducción del regulador IscR. Tamaño de la muestras de las hojas evaluadas (n) fue de 20.....	91
<b>Figura 38.</b>	Efecto de proteínas IscR silvestre o mutantes expresadas (arabinosa, ARA) en el comportamiento de la virulencia del mutante condicional <i>isc</i> ( <i>isc</i> <sup>-</sup> ) de <i>Dickeya dadantii</i> a través del tiempo en plantas de violeta africana. El mutante <i>isc</i> <sup>-</sup> contiene en <i>trans</i> los plásmidos pBADiscR, pBADiscR <sub>-92*104</sub> , pBADiscR <sub>-98*104</sub> y pBADiscR <sub>-92*98</sub> que expresan (arabinosa, ARA) la trasducción del regulador IscR silvestre o mutantes en los residuos cisteína. Tamaño de la muestras de las hojas evaluadas (n) fue de 20.....	93
<b>Figura 39.</b>	Efecto de proteínas IscR silvestre o mutantes expresadas (arabinosa, ARA) en el comportamiento de la virulencia del mutante condicional <i>isc</i> ( <i>isc</i> <sup>-</sup> ) de <i>Dickeya dadantii</i> a través del tiempo en plantas de violeta africana. El mutante <i>isc</i> <sup>-</sup> contiene en <i>trans</i> los plásmidos pBADiscR, pBADiscR <sub>-92*98*104</sub> y pBADiscR <sub>-1/2</sub> que expresan (arabinosa, ARA) la trasducción del regulador IscR silvestre o mutantes en los residuos cisteína. Tamaño de la muestras de las hojas evaluadas (n) fue de 20.....	95
<b>Figura 40.</b>	Efecto de proteínas IscR silvestre o mutantes expresadas (arabinosa, A) o reprimidas (glucosa, G) en el comportamiento de la virulencia de las cepas silvestre (3937) y mutante condicional <i>isc</i> ( <i>isc</i> <sup>-</sup> ) de <i>Dickeya dadantii</i> a inicio del experimento (1 y 3 días después de infección, d.d.i.) en plantas de violeta africana. Tamaño de la muestras de las hojas evaluadas (n) fue de 20. JC2 = 3937 / pBAD. JC9 = <i>isc</i> <sup>-</sup> / sin plásmido. JC10 = <i>isc</i> <sup>-</sup> / pBAD. JC11 = <i>isc</i> <sup>-</sup> / pBADiscR. JC12 = <i>isc</i> <sup>-</sup> / pBADiscR <sub>-92*104</sub> . JC13 = <i>isc</i> <sup>-</sup> / pBADiscR <sub>-98*104</sub> . JC14 = <i>isc</i> <sup>-</sup> / pBADiscR <sub>-92*98</sub> . JC15 = <i>isc</i> <sup>-</sup> / pBADiscR <sub>-92*98*104</sub> . JC16 = <i>isc</i> <sup>-</sup> / pBADiscR <sub>-1/2</sub> . Letras distintas arriba de la barra en cada gráfico indican diferencias estadísticamente significativas de acuerdo a la prueba de Dunn ( $p \leq 0.05$ ).....	97
<b>Figura 41.</b>	Efecto de proteínas IscR silvestre o mutantes expresadas (arabinosa, A) o reprimidas (glucosa, G) en el comportamiento de la virulencia de las cepas silvestre (3937) y mutante condicional <i>isc</i> ( <i>isc</i> <sup>-</sup> ) de <i>Dickeya dadantii</i> a final del experimento (6 y 9 días después de infección, d.d.i.) en plantas de violeta africana. Tamaño de la muestras de las hojas evaluadas (n) fue de 20. JC2 = 3937 / pBAD. JC9 = <i>isc</i> <sup>-</sup> / sin plásmido. JC10 = <i>isc</i> <sup>-</sup> /	

pBAD. JC11 =  $isc^{\bar{}}$  / pBADiscR. JC12 =  $isc^{\bar{}}$  / pBADiscR.<sub>92\*104</sub>. JC13 =  $isc^{\bar{}}$  / pBADiscR.<sub>98\*104</sub>. JC14 =  $isc^{\bar{}}$  / pBADiscR.<sub>92\*98</sub>. JC15 =  $isc^{\bar{}}$  / pBADiscR.<sub>92\*98\*104</sub>. JC16 =  $isc^{\bar{}}$  / pBADiscR.<sub>1/2</sub>. Letras distintas arriba de la barra en cada gráfico indican diferencias estadísticamente significativas de acuerdo a la prueba de Dunn ( $p \leq 0.05$ ).....

## ÍNDICE DE CUADROS

	<b>Pag.</b>
<b>Cuadro 1.</b> Secuencias de los iniciadores empleados para generar plásmidos con las distintas mutaciones en la proteína reguladora IscR de <i>D. dadantii</i> ...	55
<b>Cuadro 2.</b> Nomenclatura de las cepas de <i>D. dadantii</i> electroporadas con los plásmidos que contienen al gen silvestre <i>iscR</i> y sus mutantes en el aminoácido cisteína en los sitios 92, 98 y 104.....	56
<b>Cuadro 3.</b> Nomenclatura de las cepas de <i>E. coli</i> electroporadas con los plásmidos que contienen al gen silvestre <i>iscR</i> y sus mutantes en el aminoácido cisteína en los sitios 92, 98 y 104 provenientes del genoma de <i>D. dadantii</i> .....	57
<b>Cuadro 4.</b> Medios de cultivo empleados en pruebas de complementación fenotípica con estrés oxidativo (PQ) y carencia en hierro (Dip) para las dos especies bacterianas en estudio.....	58
<b>Cuadro 5.</b> Concentraciones de los agentes estresantes en las dos especies bacterianas evaluadas bajo condiciones <i>in vitro</i> .....	59
<b>Cuadro 6.</b> Condiciones óptimas para realizar la reacción de PCR y generar los plásmidos (pBADiscR <sub>-mutantes</sub> ) con las distintas mutaciones en la proteína reguladora IscR de <i>D. dadantii</i> .....	69
<b>Cuadro 7.</b> Plásmidos pBADiscR que portan las diferentes mutaciones cisteínas (cambiadas a histidinas) en la proteína reguladora IscR de <i>D. dadantii</i> ...	71
<b>Cuadro 8.</b> Cepas de <i>Dickeya dadantii</i> evaluadas en experimentos para conocer su comportamiento de su virulencia en plantas de violeta africana.....	88
<b>Cuadro 9.</b> Porcentaje de virulencia (o severidad) total de <i>Dickeya dadantii</i> evaluadas en experimentos para conocer su comportamiento de su virulencia en plantas de violeta africana a los 12 días después de la infección.....	96

## ÍNDICE DE APÉNDICES

	<b>Pag.</b>
Apéndice 1. Publicaciones ISBN o ISSN.....	108
Apéndice 2. Participación en Congresos.....	114
<i>Congreso de Bioquímica 2013</i> .....	114
<i>Congreso de Biología, Química y Agronomía 2013</i> .....	115
<i>Congreso Bioquímica y Biología Molecular de Bacterias 2013</i> .....	116
<i>Congreso de Fitopatología 2014</i> .....	117
<i>Congreso Bioquímica 2014</i> .....	119
Apéndice 3. Medios de cultivo empleados en este trabajo de investigación.....	120

## AGRADECIMIENTOS

A mi Director de tesis el Dr. Gabriel Rincón Enríquez por creer en mí y en mi capacidad, por todo el tiempo en que me brindó su apoyo, por compartirme su conocimiento, por sus exigencias y regaños que me ayudaron a mejorar como persona.

Al comité tutorial por el tiempo invertido en revisiones de protocolos, avances de tesis y seminarios, de igual manera gracias a sus comentarios, sugerencias, recomendaciones y correcciones, que fueron de gran ayuda para lograr culminar de la mejor manera este proyecto de maestría.

Al comité sinodal que aceptaron formar parte del mismo, por el tiempo invertido en revisar y analizar mi tesis, así como por sus comentarios, sugerencias y recomendaciones.

El proyecto que financió, material y reactivos, empleado para el desarrollo del trabajo de investigación.

Al Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, (CIATEJ) en especial a la Unidad de Biotecnología Vegetal por la infraestructura y equipo para el desarrollo de mi trabajo de maestría, a CONACYT por la beca otorgada para culminar con éxito los trabajos y experimentos del laboratorio durante los 4 años que forme parte del gran centro que es CIATEJ.

Agradezco a mis amigos Jesús, Adán, Alma, Tania, Pablo, Diego, Paulino, Alejandro Ochoa, Samuel, Ismael, Nelly, Silvio, Alejandra, Bahena y Magda por su apoyo y su amistad, por todos los buenos momentos que pasamos juntos (fiestas, practicas, clases, etc) a cada uno de ellos los llevare siempre en mi corazón.

A mis primos y tíos en general de la ciudad de Guadalajara, por brindarme su apoyo y por hacerme sentir que estaba en casa.

A cada uno de los profesores de la maestría en floricultura e investigadores del laboratorio de biotecnología vegetal en especial al maestro Manuel (Manu), por compartir sus conocimientos en clase y extra clase.

# DEDICATORIA

A Dios.

Por darme la fuerza, la salud, la entrega, la paciencia y la confianza para realizar y lograr cada una de mis metas en la vida. Por cuidarme todo este tiempo en el que realice mi trabajo de maestría. Agradecerle por todas las personas que se cruzaron en mi camino por que cada uno de ellas aportó algo importante que me permitió culminar de manera satisfactoria esta etapa en mi vida.

A mis padres.

Por estar siempre conmigo, porque gracias a ellos y a su gran ejemplo de vida, soy el ser humano que soy, por estar en cada etapa de mi vida, por el apoyo económico que me brindaron para que mi estancia en Guadalajara fuera lo mejor posible. Por aconsejarme en cada decisión y buscarle una solución a cada uno de los problemas que enfrentaba. Por todo ese amor infinito que me brindan para seguir adelante en la vida. Por mostrarme que cuando se propone algo, se tiene que lograr con sacrificio, amor, esfuerzo y entrega. Agradecerles por cada una de las visitas que realizaban porque gracias eso mi espíritu y mi cuerpo se preparaban para lograr un mañana de éxito así como el que ellos han logrado a lo largo de su vida.

A mi hijo

Por ser mi fuerza y mi lucha de seguir adelante día con día para llevarlo por el buen camino, así como mis padre hicieron conmigo, por ser mi mayor motivación porque gracias a él mi vida está llena de alegría y amor, porque juntos lograremos todos nuestros objetivos y metas que nos propongamos, apoyándonos y amándonos toda la vida.

A mis hermanos.

Por apoyarme y aconsejarme cuando pensaba que se me cerraban las puertas y no encontraba la forma de darle una solución a cada una de ellas. Por brindarme el apoyo moral, que a pesar de que mi familia estaba algunos cientos de kilómetros lejos de mí, de una u otra forma me hacían sentir que estaban ahí conmigo.

A mi familia de Guadalajara.

Por abrirme las puertas y hacerme sentir en casa, por todas esas veces que me tuvieron paciencia y me dieron ánimos para que mi estancia en Guadalajara fuera feliz y recordarme día a día que el tiempo pasa rápido y que a base de entrega y dedicación los objetivos se logran y gracias a esto logras crecer como persona. A mi tía Lupe que sin su ayuda no habría logrado este proyecto académico que culmina, a cada una de los integrantes de su hermosa familia que cada uno de ellos aportó algo importante para que me sintiera en confianza pero sobre todo sentir que estaba con mi Familia.

A mis amigos

A Jesús Trinidad que desde que llegue a la ciudad de Guadalajara me brindó su amistad, por aconsejarme y apoyarme en las adversidades que surgían día con día, a Diego Navarro por su amistad y por haberme enseñado las primeras técnicas del laboratorio, por su paciencia al momento de resolverme alguna duda, por ver reflejado en él, que gracias al trabajo del día con día se logra culminar de manera exitosa los objetivos planteados en la vida.

A mi novia Maggy

Por brindarme su tiempo y estar conmigo en los momentos difíciles en la etapa final de la maestría, por todo su apoyo incondicional que me brindo todo este tiempo y que espero se ha para toda la vida, por su trato, su confianza, por todo el amor que me ha demostrado en cada circunstancia y vivencia por las que hemos pasado.

## **Rol de los residuos cisteína del regulador transcripcional IscR en la biogénesis de los centros [Fe-S] y la virulencia de *Dickeya dadantii* en violeta africana**

La pudrición blanda es una enfermedad provocada por la bacteria fitopatógena *Dickeya dadantii*, dicha bacteria se ubica entre las 10 bacterias fitopatógenas más virulentas de múltiples cultivos de interés para el hombre, una alternativa para la disminución de la virulencia en bacterias fitopatógenas es la generación de mutaciones de genes específicos como en el gen *iscR*, el cual se encuentra involucrado en la respuesta y adaptación al medio ambiente en el que se desarrollan al momento de la infección a la célula vegetal y con esto determinar la influencia que tiene el gen dentro de la virulencia de la bacteria. Múltiples proteínas requieren de cofactores para cumplir su función regulatoria, una de las proteínas que participan en este proceso es la proteína IscR, la cual regula dos operones importantes para que la bacteria pueda adaptarse en condiciones de estrés oxidativo y carencia en hierro, dichos operones codifican para proteínas encargadas de la biogénesis de los centros [Fe-S] donde, estos últimos son cofactores inorgánicos muy versátiles en la naturaleza que determinan el correcto plegamiento y conformación de múltiples proteínas. En este estudio se ha utilizado como herramienta molecular, la generación de mutantes puntuales de IscR en *Dickeya dadantii* para evaluar la función de las cisteínas contenidas en la proteína, realizando posteriormente pruebas de patogenicidad en plantas de violeta africana, estrés oxidativo y carencia en hierro, estos dos últimos se evaluaron ya que al momento de que la bacteria ataca al hospedero, este produce como mecanismos de defensa especies reactivas de oxígeno y metabolitos secundarios que tienen como función disminuir el porcentaje de nutrientes en el ambiente con el fin de someter al patógeno a un ambiente de estrés y así atenuar al patógeno y por ende evitar que siga haciendo daño al órgano al cual está enfermando. Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que las mutaciones puntuales de las cisteínas de IscR tienen efecto en el crecimiento en condiciones de estrés por carencia en hierro en las cepas *E.coli* y *D.dadantii*, en esta última las proteínas IscR<sub>.92\*104</sub> (JC12) y IscR<sub>.92\*98</sub> (JC14) mostraron complementar genéticamente la función de la proteína silvestre, su conformación y plegamiento reconocen al sistema Suf derivando la correcta expresión de los genes involucrados en la biogénesis de los centros [Fe-S]. Para el mutante *isc* de *D. dadantii* las proteínas IscR<sub>.92\*104</sub> (JC12) e IscR<sub>.92\*98</sub> (JC14) permite de igual manera que en estrés por carencia en hierro un crecimiento mayor de las colonias de *Dickeya* en estrés oxidativo (paraquat), en la cepa silvestre bajo este estrés la expresión de las proteínas IscR no presenta efecto. En este mismo estudio se observó que en medio rico (LB + arabinosa) y en medio mínimo (M9 + arabinosa) las proteínas silvestres y mutantes en la cepa silvestre y mutante nulo *iscR*<sup>Δ</sup> de *E. coli* presentan un grado de toxicidad celular derivado de la sobreexpresión de las proteínas IscR. En las cepas *D. dadantii* la sobreexpresión de la proteína no interfiere en el fenotipo (grado de toxicidad) de las cepas, en este caso pasa lo contrario las cepas tienen un mejor crecimiento en comparación con las cepas de *E.coli*, en *D.dadantii* basta con la expresión del sistema Isc para que logre un buen crecimiento, cuando la expresión de dicho sistema se encuentra reprimido las cepas no logran adaptarse al medio y mueren. La expresión de las proteínas IscR (IscR<sub>.92\*104</sub>, IscR<sub>.98\*104</sub>, IscR<sub>.92\*98</sub> e IscR<sub>.92\*98\*104</sub>) mostraron un efecto



positivo (83 al 100%) sobre la virulencia en hojas de violeta africana en comparación con el mutante condicional *isc* de *D. dadantii* donde sólo se expresó las proteínas del sistema Isc (71-80%). El rol de las cisteínas de las proteínas mutantes IscR depende de las condiciones en las cual se encuentre la bacteria.

***Palabras clave:* Pudrición blanda, regulación genética, *D. dadantii*, cisteínas, mutante puntual, operón *isc*.**

Julio Cesar Juárez García: azul19\_jb@hotmail.com

Gabriel Rincón Enríquez: grincon@ciatej.mx

## **Role of cysteine residues of transcriptional regulator IscR in the biogenesis of [Fe/S] clusters and virulence of *Dickeya dadantii* on African violet.**

Soft rot is a disease caused by phytopathogenic bacteria *Dickeya dadantii*, said bacterium is located in the top 10 most virulent pathogenic bacteria of multiple crops of interest for man, an alternative to the reduction of virulence in plant pathogenic bacteria is the generation of mutations in specific genes as *iscR* gene, which is involved in the response and adaptation to the environment in which they develop at the time of infection to plant cell and thereby determine the influence of the gene in the virulence of the bacteria. Multiple proteins require cofactors to meet its regulatory function of the proteins involved in this process is the IscR protein, which regulates two major operons for the bacteria to adapt to conditions of oxidative stress and iron deficiency, these operons encoding proteins responsible for the biogenesis of the centers [Fe-S] which latter are inorganic cofactors very versatile in nature that determinate the correct folding and formation of multiple proteins. In this study was used as a molecular tool, the generation of point mutants IscR on *D.dadantii* to evaluate the role of the cysteines contained in the protein, making pathogenicity tests on African violet plants, oxidative stress and lack of iron, these last two were evaluated since the bacteria attacks the host, this occurs as defense mechanisms reactive oxygen species and secondary metabolites whose function is to decrease the percentage of nutrients in the environment in order to submit the pathogen to a stressful environment and because of that attenuate the pathogen and so prevent the damage that is affecting to the organ which is getting sick. The results obtained in this study show that point mutations of cysteines IscR effect on growth under iron deficiency stress in *E.coli* and *D.dadantii* strains, in this last the proteins IscR<sub>.92\*104</sub> (JC12) y IscR<sub>.92\*98</sub> (JC14) showed genetically complement the function of wild protein conformation and folding recognize the Suf system deriving the correct expression of genes involved in the biogenesis of the centers [Fe-S]. For mutant *isc* of *D. dadantii* the proteins IscR<sub>.92\*104</sub> (JC12) e IscR<sub>.92\*98</sub> (JC14) allows the same way as in iron deficiency stress further growth of colonies *Dickeya* in oxidative stress (paraquat) in the wild strain under this stress, the expression of proteins IscR had no effect. In this same study it was observed that in rich medium (LB + arabinose and in minimal medium (M9 + arabinose) wild and mutant proteins in null mutant and wild strain of *E. coli* and *iscR*<sup>▲</sup> have a degree of cell toxicity resulting from overexpression of the protein IscR. In *D. dadantii* strains overexpressing the protein does not interfere with phenotype (toxicity) strains, in this case the opposite happens; strains had a better growth compared with *E.coli* strains, in sufficient *D.dadantii* Isc expression system to achieve good growth, when the expression system is suppressed strains fail to adapt to the environment and die. The proteins IscR (IscR<sub>.92\*104</sub>, IscR<sub>.98\*104</sub>, IscR<sub>.92\*98</sub> e IscR<sub>.92\*98\*104</sub>) expression showed a positive effect (83 to 100%) on virulence in African violet leaves compared to the conditional mutant of *D. dadantii* *isc* in which only Isc system proteins (71-80%) was expressed. The role of cysteine mutant proteins IscR depends of the conditions in which the bacterium is located.

**Keywords:** Soft rot, genetic regulation, *D. dadantii*, cysteine, point mutant, *isc* operon.

Julio Cesar Juárez García: azul19\_jb@hotmail.com  
Gabriel Rincón Enríquez: grincon@ciatej.mx

## 1. Introducción

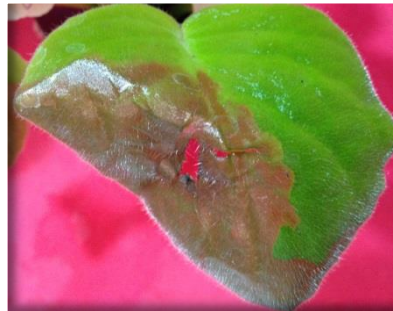
En México desde tiempos prehispánicos ya se trabajaba en el ámbito de la floricultura, la diversidad climática en México permite el desarrollo de la producción de gran variedad de plantas de ornato que son de interés para el hombre (Medina, 2004). La riqueza florística en todo el territorio mexicano supera a la de Estados Unidos y Canadá, por esta razón en particular su región tropical se considera en la categoría de las zonas florísticamente más ricas del mundo, a la par que Malasia y Centroamérica (Flores, 1988). Las plantas ornamentales se distinguen por sus valores decorativos, a veces muy especiales, éstos pueden ser: la forma y/o estructura de toda la planta, las hojas, las flores y los frutos. El valor decorativo y ornamental de estas plantas puede ser temporal, por ejemplo durante la floración, o durante toda la vida de la planta (Leszczyńska-Borys, 1990).

Uno de los cultivos ornamentales más importantes en México y en particular en estados como: Morelos, Puebla, Estado de México y Jalisco, es la violeta africana (*Saintpaulia ionantha*), cultivada por primera vez como planta de interior desde hace cincuenta años, hoy es una de las plantas de flor de interior más populares por sus características particulares que le confieren un atractivo especial y es de fácil cultivo. Es una planta con tallo corto, tiene abundantes hojas de color verde oscuro manchado y rayado, con áreas de color crema, en arreglo de roseta. Las hojas varían de ovalado-elípticas a redondeadas y generalmente son pubescentes (vellosas). Los márgenes pueden ser enteros u ondulados. Las corolas generalmente son de color blanco, rosa, rojo carmín, azul, malva, lila, violeta, de un único color o bicolor (Figura 1).



**Figura 1.** Aspecto general de plantas en floración de violeta africana (*Saintpaulia ionantha*).

Los cultivos ornamentales se ven afectados por distintos factores abióticos y bióticos, estos últimos son los que ocasionan la mayor problemática al momento de llevar a cabo el cultivo de una planta ornamental. Los microorganismos fitopatógenos con el paso del tiempo han adquirido y desarrollado nuevos mecanismos para provocar múltiples enfermedades en distintos cultivos de interés para el hombre. El estudio de la patología en plantas ornamentales ha sido abordado con interés creciente en México debido a la importancia que en los últimos años ha representado, sobre todo en el sector florícola. La producción de violeta africana se ve fuertemente afectada durante las diferentes etapas de su producción (Sedano, 2013). Se presentan problemas fitosanitarios que inciden negativamente en la calidad y cantidad de la planta. Una de las principales enfermedades que ataca a estos cultivos es la enfermedad provocada por la bacteria fitopatógena *Dickeya dadantii* (antes *Erwinia chrysanthemi*) provocando la enfermedad denominada pudrición blanda (Figura 2), dicha bacteria produce una gran cantidad de enzimas con actividad pectolítica como pectinasas y celulasas, las cuales degradan los principales componentes de la pared celular, provocando la muerte de la planta. Dicha bacteria ha generado mecanismos de virulencia, los cuales le han servido para vencer y sobrevivir a los mecanismos de defensa de las células vegetales al momento de la interacción fitopatógeno-planta.



**Figura 2.** Pudrición blanda en hoja de violeta africana (área oscura de la hoja) a los 4 días después de la infección con la bacteria fitopatógena *Dickeya dadantii*.

Las bacterias y en general todos organismos vivos requieren de múltiples mecanismos y rutas que les permitan su supervivencia y adaptación a distintos ambientes en las diferentes condiciones en la que se encuentren. En dichos procesos intervienen un sin fin de moléculas, elementos químicos y en algunos casos cofactores que hacen

funcionales a distintas proteínas que participan en mecanismos importantes dentro de los organismos. Uno de los principales cofactores que existen en la naturaleza y que prácticamente está presente en todos los organismos son los centros metálicos hierro-azufre [Fe-S] (Lill y Munhlehoff, 2005). La versatilidad química del hierro y el azufre permite que estos centros posean una amplia diversidad funcional y estructural, dichos centros participan en la transferencia de electrones, regulación de la expresión genética, actividad enzimática, fuentes de azufre, reducción de disulfuro (Beinert 2000).

Se han realizado múltiples trabajos para avanzar en la búsqueda de cómo se lleva a cabo la síntesis de dichos cofactores inorgánicos en una amplia variedad de microorganismos, en los que hasta la fecha se ha determinado que existen tres sistemas para la síntesis de estos centros [Fe-S] denominados Nif (*Nitrogen fixation*), Suf (*Sulphur mobilization*) e Isc (*Iron sulphur cluster assembly*). Este conjunto de sistemas son encargados de la maduración de múltiples proteínas ya sean involucradas en el metabolismo tanto aerobio como anaerobio, en proteínas funcionales como reguladores o transportadores y además son importantes para la adaptación de los microorganismos a condiciones tanto de estrés oxidativo como de la limitación de hierro donde la carencia de cada uno de ellos genera deficiencias fisiológicas que afectan a su crecimiento y desarrollo. A diferencia del sistema Suf y Nif el sistema Isc es el único que ha mostrado ser altamente conservado en múltiples organismos de los cuales su genoma ha sido secuenciado (Takahashi y Nakamura, 1999; Tokumoto y Takahashi, 2001).

Los centros [Fe-S] son coordinados a sus proteínas generalmente por los residuos de cisteína (Cys) contenidos en las proteínas las cuales contienen estos residuos dentro de su cadena polipeptídica, la unión del ion Fe de la Cys con el centro, produce en la proteína un cambio conformacional para que cumpla con alguna función específica. (Einsle *et al.*, 2002). Sin embargo, durante la última década numerosos estudios han revelado que las especies reactivas de oxígeno (ROS) también modulan el estado de oxidación del azufre en los residuos de cisteína específicos de algunas proteínas importantes como lo es la proteína IscR la cual se encarga de regular la biogénesis de los centros [Fe-S] y que contiene en su secuencia de aminoácidos un total de tres

cisteínas. De esta manera, estudiar las mutaciones de las cisteínas de la proteína IscR ayudará a determinar el papel que cumplen no solo en la proteína en general sino también al momento que se realice la expresión para que se lleve a cabo la formación de los centros [Fe-S] al momento que la bacteria sea atacada por las ROS producidas por la planta y por ende la bacteria sea llevada a un estrés oxidativo.

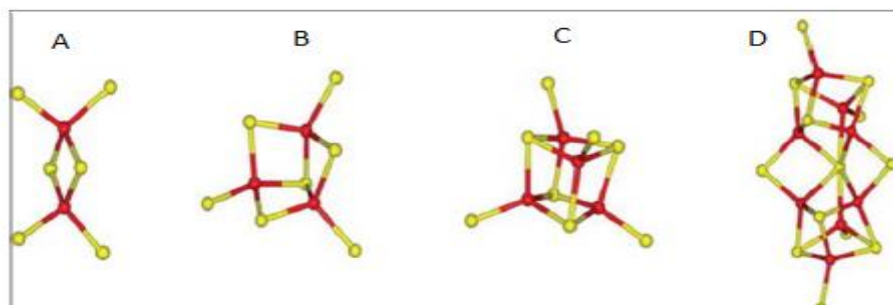
En el presente estudio, se utilizaron dos especies bacterianas para determinar el papel de los residuos de cisteínas de la proteína reguladora IscR, la primera especie fue *D. dadantii* silvestre (3937) así como la cepa mutante condicional Isc de la misma especie (3937), esta cepa carece del promotor del sistema Isc y del regulador transcripcional *iscR* y en su lugar hay un regulador de la arabinosa, el cual induce la expresión de los genes del sistema Isc involucrados en la biogénesis de los centros [Fe-S] (Rincón-Enríquez *et al.*, 2008); la segunda especie bacteriana fue *Escherichia coli* (cepa K12) es probablemente el organismo mejor conocido del mundo, ya que se ha utilizado como modelo para estudiar todo tipo de aspectos de genética y fisiología. Su genoma entero se conoce desde hace algunos años (Blattner *et al.*, 1997) y su biología general está bien estudiada. Una de las principales cepas con las que se ha trabajado en el rol de cada uno de dichos sistemas genéticos formadoras de centros [Fe-S] es K12, dicha cepa se utilizó en este trabajo para evaluar por medio de un mutante nulo de *iscR*, la implicación de los residuos cisteínas en la biogénesis de los centros [Fe-S].

## 2. Antecedentes

### 2.1. Centros de hierro-azufre [Fe-S]

Se ha propuesto que las formas iniciales de la vida en la tierra se formaron en la superficie de los minerales de sulfuro de hierro, lo que sugiere una participación del hierro (Fe) y el azufre (S) (Wächtershäuser y Hunber, 2007). La versatilidad de los cofactores estructurales y propiedades químicas del Fe y el S, facilita la selección del mismo como grupos prostéticos para la función de múltiples proteínas (Py y Barras, 2010). El descubrimiento de nuevas proteínas Fe-S y cofactores [Fe-S] resultó gracias a su amplia diversidad estructural y funcional, que reflejan la versatilidad de elementos formadores (Beinert *et al.*, 1997).

Los cofactores, clusters, grupos o centros [Fe-S] se encuentran prácticamente en todas las formas de vida. El descubrimiento de estos cofactores se llevó en la décadas de 1960, se caracterizaron por métodos espectroscópicos y química analítica como grupos prostéticos ácido resistentes contenidos en una clase de proteínas transportadora de electrones llamadas ferredoxinas (Beinert *et al.*, 1997). Se han identificado en la purificación de enzimas de plantas y bacterias, en cloroplastos y en los complejos de respiración I-III de bacterias y mitocondrias (Lill, 2006). Estos cofactores inorgánicos pueden contener elementos de Fe y S en diferentes proporciones molares. Los tipos más comunes son los [2Fe-2S] y [4Fe-4S] rombos y cúbicos respectivamente, el acoplamiento o pérdida de diferentes estructuras y elementos de los cofactores da lugar a distintos tipos (Figura 3) (Beinert *et al.*, 1997; Johnson *et al.*, 2005).



**Figura 3.** Diversidad de tipos, formas y estructura química de los cofactores hierro-azufre [Fe-S]. (A) Rómbica, (B) Cúbica y (C) Fusionados (Johnson *et al.*, 2005).



Se sabe que ciertas holoformas de proteínas Fe-S contienen centros de tipo [2Fe-2S] y [4Fe-4S] que pueden ser formadas *in vitro* por la simple adición de  $S^{2-}$  y  $Fe^{2+/3+}$ . Esto conduce a la idea de que los centros de [Fe-S] pueden espontáneamente incorporarse en sus correspondientes proteínas *in vivo*. Pero esto no es compatible con la toxicidad fisiológica de los niveles de Fe y S requeridos para la maduración *in vitro*. Sin embargo, como el hierro en forma ferrosa o férrica y la forma S del sulfito son tóxicos *in vivo*, se propuso la existencia de una o varias maquinarias biosintéticas para la formación de los centros [Fe-S] en células vivas (Lill y Muhlenhoff, 2006).

## 2.2. Función biológica de los centros [Fe-S]

Una de las funciones más comunes de los centros [Fe-S] es la transferencia de electrones que se realiza gracias a la propiedad del Fe para cambiar su estado de oxidación, debido a esto, los centros [Fe-S] llevan a cabo la función de donantes y receptores de electrones en múltiples reacciones biológicas (Johnson *et al.*, 2005).

Las funciones enzimáticas como la de la nitrogenasa necesitan la adición de un centro [Fe-S-Mo] para que se una al canal para el paso de electrones y llevan a cabo la reducción del nitrógeno produciendo amonio (Fontecilla *et al.*, 2007; Schwartz *et al.*, 2001).

Los centros [Fe-S] están implicados en la regulación transcripcional y traduccional en la expresión génica en bacterias (Kiley y Beinert, 2003). Por ejemplo, la proteína SoxR que detecta el estrés oxidativo y reacciona estimulando la transcripción de la proteína SoxS, la cual es la responsable de activar numerosas enzimas respondiendo así al estrés oxidativo (Lee *et al.*, 2004; Johnson *et al.*, 2005; Watanabe *et al.*, 2008) la proteína FNR (reducción del fumarato y del nitrato) es regulada debido a la oxidación de la forma dimérica del centro [4Fe-4S] a su forma monomérica [2Fe-2S]<sup>2+</sup>, dando pie a la expresión de genes implicados en la respiración tanto aerobia como anaerobia en *Escherichia coli* (Johnson *et al.*, 2005).

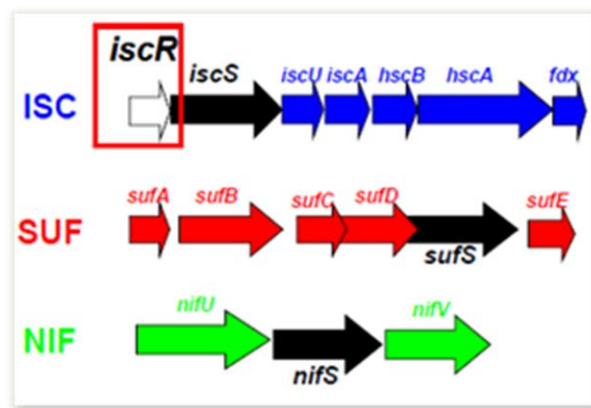
La regulación post transcripcional de la expresión génica donde participan los centros [Fe-S] está dado por la proteína reguladora IRP1, que bajo condiciones de incremento en hierro, lleva a cabo funciones como la aconitasa cuando lleva integrado el centro [4Fe-4S], pero al perderlo bajo condiciones de carencia en hierro es inestable y puede

unir estructuras llamadas elementos responsables de hierro (IRES). Los ARNs mensajeros de las proteínas implicadas en la asimilación del hierro, almacenaje y distribución celular insertan una proteína IRP1 sin su centro al extremo 5', así las IRES bloquean la traducción inhibiendo el proceso en el que el ribosoma explora el codón de inicio del RNAm, mientras que cuando se une al extremo 3' las IRES protegen a la célula, contra la degradación de nucleótidos, iniciando así la traducción (Lill, 2008). Los centros [Fe-S] están involucradas en la función de proteínas estructurales, como las enzimas que reparan al ADN, las endonucleasas III.

Diversas investigaciones han reportado que estas enzimas no tienen actividad redox, pero tienen funciones estructurales similares a las proteínas de Zn, en las que el metal controla la estructura de un bucle y son esenciales para el reconocimiento y reparación de daños en el ADN (Johnson *et al.*, 2005). De las funciones que han surgido recientemente de los centros de [Fe-S], son aquellas, que están implicadas en la reducción del disulfuro y donación del S. Por lo menos dos clases de disulfuro reductasas, ferredoxin: tioredoxin reductasa en cloroplastos y hetero-disulfuro reductasas en archaea metanogénica (Dai *et al.*, 2000).

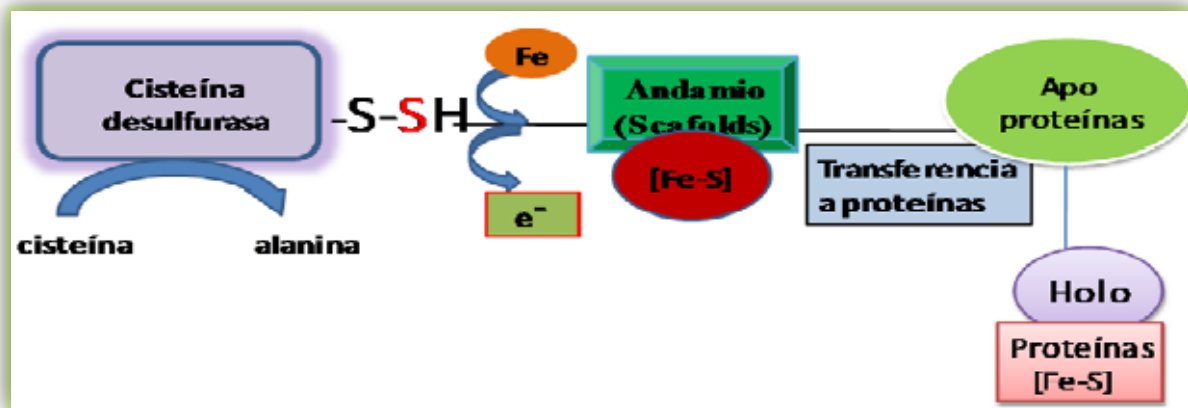
### 2.3. Biogénesis de los centros [Fe-S]

La biogénesis de centros [Fe-S] se lleva a cabo por tres sistemas genéticos: Nif (fijación de nitrógeno), Isc (centros hierro-azufre), Suf (factor de utilización de azufre), en la Figura 4 se muestran los genes que integran a cada sistema genético.



**Figura 4.** Sistemas genéticos (operones) encargados de la biogénesis de centros [Fe-S] en *Dickeya dadantii* (*Erwinia chrysanthemi*) (Quiñones-Aguilar y Rincón-Enríquez, 2011).

Los sistemas están conformados por diversos genes, los cuales codifican para proteínas encargadas de biosintetizar los centros [Fe-S]. En la Figura 5, se muestra que el primer paso se realiza por una cisteína desulfurasa, la cual extrae el azufre de una L-cisteína presente en el citoplasma, transformándola en alanina, después el hierro se transforma a un estado disponible, enseguida otra proteína dona el electrón necesario para cambiarlo a un estado soluble, en donde las proteínas andamio (scaffolds) sostienen a los centros ya formados y por último las proteínas de transferencia insertan el centro en las apoproteínas para formar holoproteínas (Lill, 2008).



**Figura 5.** Esquema general de la biogénesis de los centros [Fe-S] (modificado a partir de Lill, 2008).

## 2.4. Sistemas de biogénesis de los centros [Fe-S] en bacterias

### 2.4.1. Sistema NIF

El sistema NIF fue el primer sistema involucrado en la biogénesis de centros [Fe-S] identificado y descrito siendo utilizado exclusivamente para la maduración de la nitrogenasa en *Azotobacter vinelandii* bajo condiciones de fijación de nitrógeno (Zheng *et al.*, 1998). Sin embargo se han identificado genes similares del sistema NIF en organismos no fijadores de nitrógeno, por ejemplo, *Helicobacter pylori* (Olson *et al.*, 2000), *Entamoeba histolytica* (Ali *et al.*, 2004) y en *D.dadantii* (Rincón-Enríquez *et al.*, 2008). El sistema NIF está compuesto por los genes *nifU* y *nifS*. Estudios realizados revelan que la inactivación de *nifU* y *nifS* resulta en un defecto de la maduración de la proteína con MoFe y Fe, por la inactivación total de éstos genes, sin eliminarse totalmente la actividad de la proteína. El gen *nifS* codifica para una proteína con función

cisteína desulfurasa, esto se comprobó en la purificación de la enzima y su expresión se produce sólo en condiciones de fijación de nitrógeno, esta enzima utiliza la L-cisteína para la movilización del S para la formación de los centros [Fe-S] (Zheng *et al.*, 1993). El gen *nifU* codifica para la proteína NifU la cual funciona de andamio para el ensamble de los centros [Fe-S]. Al ser purificada presentó una forma homodímera y contenía un cofactor permanente de tipo [2Fe-2S] (Dos Santos *et al.*, 2004; Agar *et al.*, 2000). Aproximadamente un centro de [2Fe-2S] transitorio es ensamblado por cada homodímero de NifU y estos cofactores son lábiles y liberados rápidamente. La participación de la parte C-terminal de NifU en el montaje de los centros [Fe-S] transitorios fue sugerida con base a función de las proteínas páralogas de cianobacterias, plantas y organismos superiores que soportan la formación de centros transitorios de tipo [2Fe-2S]<sup>2+</sup> o [4Fe-4S]<sup>2+</sup> (Léon *et al.*, 2003; Tong *et al.*, 2003).

#### 2.4.2. Sistemas genéticos Isc, Suf y Csd

Basándose en la capacidad de las cepas dobles mutantes con supresión de NifS y NifU para producir bajos niveles de nitrogenasa activos en condiciones de fijación de nitrógeno, se sugirió que habría una maquinaria con expresión basal dedicada a la formación de centros de [Fe-S], independientemente de los genes y proteínas NIF (Jacobson *et al.*, 1989).

A partir de análisis bioquímicos se identificaron en *A. vinelandii* nueve genes con función relacionada en la biogénesis de centros [Fe-S], descritos como: *cysE2*, *iscR* (proteína reguladora), *iscS* (cisteína desulfurasa), *iscU* (proteína de andamio), *iscA* (proteína de andamio y posible donadora de Fe), *hscB* (co-chaperona), *hscA* (chaperona), *fdx* (ferredoxina) y *orf3/iscX* (función desconocida). Desde entonces se ha establecido que el sistema Isc está presente en procariotas y eucariotas; Isc es el sistema endógeno fundamental de la biogénesis de centros [Fe-S] en procariotas, como *E. coli* y *A. vinelandii* (Frazzon y Dean, 2003). En la bacteria fitopatogena *E. chrysanthemi* 7 genes conforman el sistema Isc (*iscR*, *iscS*, *iscU*, *iscA*, *hscB*, *hscA* y *fdx*). La maquinaria de biosíntesis Isc consiste básicamente de una cisteína desulfurasa (IscS) y proteínas de andamio (IscU o IscA) donde ocurre el montaje de los cofactores [Fe-S] conectados y transferidos de las proteínas de andamio a las apoproteínas. La

transferencia del centro de IscU se realiza con ayuda de las chaperonas HscA y HscB (Lill *et al.*, 2009).

La proteína IscR es un regulador transcripcional del promotor y los genes *iscS*, *iscU*, *iscA*, *hscB*, *hscA* que actúan en conjunto asistiendo a IscU para integrar el centro [Fe-S] a las apoproteínas (Loiseau *et al.*, 2005; Ayala-Castro *et al.*, 2008). Fdx provee el electrón al hierro que es proporcionado probablemente por CyaY para cambiar su estado de oxidación, proporcionando así la propiedad al hierro de cambiar su estado metálico a un estado soluble y poder ser integrado a la proteína IscU (Lill, 2009). El regulador transcripcional IscR controla negativamente al promotor del sistema Isc y positivamente al promotor del sistema Suf bajo las condiciones de estrés oxidativo y carencia en hierro (Yeo *et al.*, 2006). La proteína IscR es una proteína Fe-S y su cofactor es necesario para la represión de la transcripción del operón *isc*, del cual forma parte (Schwartz *et al.*, 2001).

El sistema Suf está integrado por seis genes que son *sufABCDSE* (Johnson *et al.*, 2005; Ayala-Castro *et al.*, 2008) de los cuales *sufA* y *sufS* son homólogos a *iscA* e *iscS*, los cuales son expresados como proteína andamio y cisteína desulfurasa, además, estudios en *E. coli* demuestran que el complejo SufBCD junto con SufE incrementa la actividad de la cisteína desulfurasa SufS en bacterias en las que se encuentran presentes los dos sistemas. El sistema Isc desempeña el papel primario para formar los centros [Fe-S] y el sistema Suf se activa bajo condiciones de estrés oxidativo y/o carencia en hierro (Yeo *et al.*, 2006; Ayala-Castro *et al.*, 2008); Chahal *et al.*, 2009)

En *E. chrysanthemi* (*D. dadantii*) el sistema Csd está compuesto por tres genes *csdA*, *csdE* y *csdL* las proteínas codificadas por estos genes, son las encargadas de proporcionar azufre para la formación de los centros [Fe-S]; el gen *csdA* codifica por una cisteína desulfurasa similar a IscS, SufS y NifS.

Los sistemas genéticos Isc y Suf son transcritos y activados bajo condiciones ambientales específicas que tienen relación, como lo es el estrés oxidativo y la carencia en hierro. La expresión del operón *iscRSUA-hscBA-fdx* es inducida también por estrés ocasionada por el óxido nítrico y es dirigida por IscR (Outten *et al.*, 2004; Justino *et al.*, 2005; Yeo *et al.*, 2006). La proteína IscR es codificada por un ORF que se encuentra localizado inmediatamente río arriba de los genes que codifican para las proteínas de

ensamble de los centros [Fe-S] en *E. coli*. IscR tiene similitud con aminoácidos de MarA, un miembro de la familia de factores de transcripción MarA/SoxS/Rob. El plegamiento hélice-giro-hélice está involucrado en el mecanismo homeostático que controla la biogénesis de los centros [Fe-S], además se observó por espectroscopia electrónica de resonancia paramagnética, que contiene un centro  $[2\text{Fe-2S}]^{1+}$  que puede ser reversiblemente oxidado/reducido y que es unido en un sitio específico determinado por la región conservada Cys92Cys98Cys104Hys107 (Schwartz *et al.*, 2001; Fleischhacker *et al.*, 2012).

## 2.5. Condiciones elementales para la biogénesis de centros [Fe-S]

### 2.5.1. Especies reactivas de oxígeno

Las células utilizan las reacciones de óxido-reducción (redox) para promover y modular el crecimiento de los organismos y mantener un equilibrio del mismo. Procesos biológicos tan diferentes como la respuesta a situaciones de estrés y la fotosíntesis requieren inevitablemente la transferencia de electrones o de hidrógenos, para que se mantenga las proporciones adecuadas de las formas [oxidada]/[reducida] de un compuesto químico. Esta característica sugiere que las reacciones redox sirven para detoxificar de manera eficientemente las especies reactivas o que ayuden a cumplir un rol en la regulación de las rutas metabólicas. La consecuencia inmediata de estas posibilidades es que la disfunción de los procesos redox estará asociada con determinadas patologías en células vegetales y animales (Martin, 2004).

La señalización redox exhibe diferencias notables con los mecanismos que utilizan la química no-redox en la regulación celular. Un estímulo provoca solamente una respuesta “on/off” cuando los aminoácidos de las proteínas exhiben una única modificación post-traducciona (e.g. fosforilación, acetilación). En consecuencia, la respuesta paulatina a los estímulos requiere la utilización de varios sitios regulatorios en una proteína y/o la activación simultánea de varios pasos metabólicos. De manera que la respuesta gradual y continua en un camino de señalización basado en mecanismos “on/off” depende de un complejo sistema de proteínas y/o residuos y no de un residuo proteico en particular.

La presencia de una atmósfera rica en  $\text{O}_2$  y el uso de esta molécula como oxidante final

de las cadenas respiratorias por una parte significativa de la biósfera implica un flujo continuo de electrones hacia el  $O_2$  para formar  $H_2O$  mediante oxidasas específicas (Martin, 2004). Este proceso está inevitablemente acompañado por la formación de especies derivadas de la reducción monoelectrónica, conocidas colectivamente como especies reactivas de oxígeno (ROS: reactive oxygen species). Si bien las ROS afectan de forma general sitios reactivos en los hidratos de carbono, los lípidos y los ácidos nucleicos, durante la última década numerosos estudios revelaron que las ROS también modulan el estado de oxidación del azufre en residuos cisteína específicos de las proteínas. La notable capacidad del azufre para adoptar múltiples estados de oxidación genera no sólo los oxiácidos sulfénico (RSOH), sulfínico ( $RSO_2H$ ) y sulfónico ( $RSO_3H$ ) sino también otras especies oxidadas [e.g. tiosulfatos (disulfuro-S-monóxidos,  $RS(O)SR^+$ )], revelando que la función de los tioles en las cisteínas no está circunscripta exclusivamente a la formación y ruptura de puentes disulfuro. La flexibilidad de un único residuo cisteína para adoptar diferentes modificaciones post-traduccionales sugiere que varias de estas especies pueden participar en el señalamiento redox intracelular (Jacob, 2003). Sobre estas bases, el reconocimiento del estímulo y su transducción no residen en un sistema complejo ni en múltiples modificaciones de una proteína sino en un único residuo de aminoácido.

Los centros [Fe-S] son muy inestables en condiciones de estrés oxidativo y carencia en hierro, provocando que múltiples proteínas no sean maduradas correctamente, lo que provoca un ambiente tóxico para la célula. Los organismos al verse atacados por agentes oxidantes, producen la activación de un diversos mecanismos involucrados para contrarrestar dicho ataque. Existen agentes ambientales que pueden causar estrés oxidativo como son las ionizaciones cerca de la radiación UV o numerosos compuestos que generan  $O_2^-$  intracelular (paraquat) la cual incrementa cuando la concentración de oxígeno activo se eleva a un nivel que excede la capacidad de defensa de la célula (Cabiscol *et al.*, 2000).

Rincón-Enrriquez *et al.* (2008) obtuvieron cepas mutantes de los genes *iscU*, *hscA* y *fdx* de *D. dadantii* los fenotipos analizados relacionados al estrés ocasionado por un agente generador de superóxido (paraquat), el cual es una de las condiciones que alteran la biogénesis de los centros [Fe-S]. Los resultados observados mostraron deficiencias en

el crecimiento bacteriano en presencia de paraquat en comparación con la cepa silvestre. Otro sistema de biogénesis de centros [Fe-S] relacionado al estrés oxidativo es el sistema Suf, en los que se mostraron que cepas mutantes de *sufC* de *D. dadantii* generaron fenotipos deficientes al paraquat además de una disminución en la actividad de deshidratasa sensible a oxidantes univalentes (Nachin *et al.*, 2001; Nachin *et al.*, 2003; Jang e Imlay, 2010). Otros estudios muestran que los sistemas Isc y Suf de *E. coli* son importantes para la reparación de enzimas dañadas por estrés oxidativo, como es el caso de la fumarasa A, que al ser expuestas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> genera una forma inactiva de su sitio catalítico generando un centro [3Fe-4S]<sup>+</sup>, el cual fue reparado aun cuando el sistema Suf no estaba funcionalmente activo (Jang e Imlay, 2010). Djaman *et al.* (2004) mostraron que en *E. coli* el centro [3Fe-4S]<sup>+</sup> de la fumarasa A requería del sistema Isc para ser reparado cuando el sistema Suf fue expresado en menor proporción. Ambos sistemas pueden emplearse tanto para el ensamble *de novo* como la reparación de centros [Fe-S] dañados.

### 2.5.2. Carencia en hierro

El hierro es un metal de transición que existe en dos estados redox: Fe<sup>2+</sup> y Fe<sup>3+</sup>, que a su vez puede adoptar distintos estados dependiendo del ligando ambiental. Estas propiedades hacen del hierro un elemento prostético altamente versátil para su incorporación en proteínas, participando los grupos hierro-sulfuro en la transferencia de electrones o bien actuando como centros catalíticos y sensores de hierro y oxígeno (Beinert *et al.*, 1997). Las bacterias necesitan una concentración de hierro comprendida entre 10<sup>-6</sup> y 10<sup>-8</sup> M (Pradel *et al.*, 2000), lo cual quiere decir que una célula requiere del orden de 10<sup>-5</sup> 10<sup>-6</sup> iones de hierro por generación para poder crecer (Wandersman y Stojiljkovic, 2000). A densidades celulares altas (10<sup>9</sup> células mL<sup>-1</sup>) cada generación puede consumir 10<sup>18</sup> átomos de hierro por litro (Braun *et al.*, 1998).

La limitación de la disponibilidad de hierro afecta al crecimiento de prácticamente cualquier especie bacteriana. Es por ello que en el caso de bacterias patógenas la adquisición de hierro es uno de los principales pasos en su desarrollo dentro del huésped y determinará su supervivencia en dicho huésped. La disponibilidad de hierro es también un elemento muy importante en la infección bacteriana, ya que puede ser



una señal ambiental que genere la expresión de distintos factores de virulencia (Litwin y Calderwood, 1993).

El mecanismo más importante en la captación de hierro que disponen las bacterias patógenas, tanto Gram negativas como Gram positivas, implican la síntesis y liberación al exterior de moléculas de bajo peso molecular y con elevada afinidad por el hierro, denominadas sideróforos, que secuestran el hierro de las moléculas del huésped.

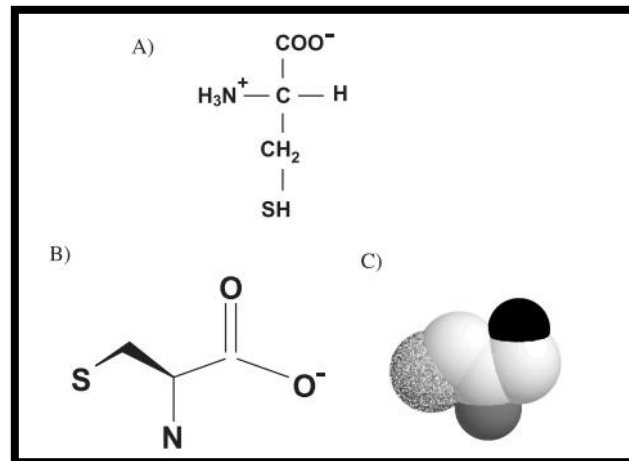
Los distintos factores que inciden en la baja disponibilidad de hierro en la célula, influyen de manera negativa en la biogénesis de los centros [Fe-S], normalmente este tipo de estrés es provocado por algún agente quelante de átomos de hierro y en algunos casos este tipo de estrés se genera al momento en que la bacteria se encuentra atacando al huésped y este produce toxinas o sustancias las cuales tienen afinidad por el hierro, obligando a la bacteria a competir por la disponibilidad del mismo. En gran cantidad de microorganismos el metabolismo del hierro es de vital importancia, ya que está altamente relacionado con las primeras etapas del proceso de infección de algunas bacterias como *D. dadantii*, dicha bacteria coloniza al tejido vegetal produciendo al menos dos tipos de sideróforos, denominados *chrysobactina* y *achromobactina* (Persmark *et al.*, 1989; Mahé *et al.*, 1995).

Un conjunto de genes son los que están involucrados en la síntesis de estos sideróforos, los cuales sintetizan, exportan e internalizan a estos sideróforos y que se encuentran bajo el control del regulador de hierro Fur (Franza *et al.*, 1999) y es deliberado al tejido vegetal debido a que se ha demostrado que *D. dadantii* enfrenta una limitación de hierro durante la infección en células de la planta. Este proceso de la capacidad del hospedero de captar hierro se denomina inmunidad nutricional (Enard *et al.*, 1988; Franza *et al.*, 1999). El regulador Fur además está relacionado con la activación del sistema Suf, el cual se ha demostrado que además de participar en la biogénesis de centros [Fe-S] se relaciona con el metabolismo del hierro. Un trabajo realizado por Nachin *et al.* (2001) en el que obtuvieron mutantes de los genes *sufABCSE* mostraron que generaban una acumulación mayor de hierro intracelular en comparación con la cepa silvestre. Giel *et al.* (2006) realizaron un perfil transcripcional del regulador IscR de *E. coli* en el que mostraron que regula al sistema Suf y que además es requerido para solventar la carencia al estrés por carencia en hierro en *D.*

*dadantii* (Rincón-Enríquez *et al.*, 2008). En recientes estudios en *E. coli* realizados por los investigadores Erin L. Mettert y Patricia Kiliey (Mettert y Kiliey, 2014), demostraron que IscR en sus formas apo y holo pueden inducir la síntesis de centros [Fe-S] *in vitro* producidos por el sistema Suf, esto dependiendo del nivel de estrés al cual se encuentra sometida a la célula, de la misma manera esto está relacionado con la concentración de la proteína IscR, en este mismo estudio se concluyó que *E. coli* requiere de al menos uno de los dos sistemas genéticos (Isc o Suf) involucrados en la biogénesis de los centros [Fe-S] para su viabilidad, si se carece del sistema Isc y de la proteína IscR la bacteria muere en condiciones de estrés.

## 2.6. Importancia de los residuos de cisteína en las proteínas

Se ha observado que la cisteína (Figura 6) es uno de los residuos de aminoácidos menos abundantes en las proteínas, con un porcentaje menor al 3%. Sin embargo, a pesar de su baja abundancia, la capacidad del grupo tiol para donar electrones y para oscilar entre un estado reducido ( $\text{SH}$ ) y diversos estados oxidados, le permite a este residuo participar en muchos aspectos de la estructura y función de las proteínas. Así, los residuos de cisteína tienen un rol importante en la estabilidad, en el plegamiento, en la unión de metales, en la catálisis enzimática y en la regulación de la actividad proteica. Los diferentes estados de oxidación de grupo tiol de los residuos de cisteína son el ácido sulfénico ( $\text{SOH}$ ), el ácido sulfínico ( $\text{SO}_2\text{H}$ ), el ácido sulfónico ( $\text{SO}_3\text{H}$ ) y el puente disulfuro, siendo este uno de los más importantes para que se logre una correcta conformación y plegamiento de las proteínas (Denu y Tanner, 1998).



**Figura 6.** Estructura química (A) y modelo de un residuo aminoacídico de cisteína (B) y (C). En C) los carbonos están representados por esferas blancas, el oxígeno por la esfera negra, el azufre por la gris clara y el nitrógeno por la gris oscura.

La cisteína es un aminoácido que posee un grupo tiol muy reactivo, que no se ioniza a pH fisiológico y que forma puentes de hidrógeno relativamente débiles, por lo que no contribuye significativamente a la estabilidad de las proteínas por medio de enlaces salinos o de puentes de hidrógeno. No obstante, si los grupos tiol de dos residuos de cisteína de la misma cadena o de cadenas polipeptídicas diferentes están próximos y en la orientación adecuada, pueden unirse por oxidación formando un puente disulfuro, que es un enlace covalente fuerte. Estos enlaces estabilizan la estructura nativa de la proteína, haciéndola menos susceptible a la degradación por proteasas y disminuyendo el número de las conformaciones desplegadas posibles características del estado desnaturalizado, el cual al disminuir de esta forma su entropía conformacional resulta energéticamente más difícil de alcanzar (Chivers *et al.*, 1997)

El papel de los residuos de cisteína en la estabilización de la estructura nativa de una proteína depende de la localización de esta última. Puesto que bajo condiciones normales el ambiente en el interior de las células es altamente reductor, las proteínas intracelulares no dependen de puentes disulfuro para estabilizar su conformación nativa. Por el contrario, si estos llegan a formarse bajo una condición de estrés oxidativo, generalmente se altera la estructura nativa de tal forma que se pierde la función de la proteína. El mantenimiento de los grupos  $\text{SH}^-$  de las proteínas

intracelulares en su forma reducida se lleva a cabo por tioredoxinas y glutatión.

La oxidación de los residuos de cisteína generalmente produce pérdida de la función de las proteínas intracelulares (Tu *et al.*, 2000). Sin embargo, existe un importante mecanismo de regulación de numerosos procesos celulares que se basa en modificación reversible por oxidación-reducción específica de residuos de cisteína de proteínas involucradas en la catálisis, la expresión génica, la transducción de señales, el plegamiento (chaperonas), etc. Dichas modificaciones incluyen la formación y ruptura de puentes disulfuro, ya sea de la misma proteína o de disulfuros mixtos con otro tiol como el glutatión. En el ambiente intracelular los residuos de cisteína de las proteínas juegan un papel funcional más que estructural, participando en la unión de metales, en la catálisis enzimática y en la regulación de la actividad de enzimas o de otras proteínas involucradas en diversos procesos, tales como el ciclo celular, la acción hormonal, la replicación del ADN y la transcripción, la meiosis. El grupo tiol de la cadena lateral de las cisteínas es excelente para unir metales, por lo que dichos residuos forman parte de múltiples motivos que hacen funcionales a una gran variedad de proteínas y que de la misma manera cuando se encuentran en ausencia del metal, dichas proteínas en su forma apo también tienen una función específica, todo esto dependiendo de la conformación y plegamiento que adquiera cada una de ellas. Los residuos de cisteína también participan en la unión de las agrupaciones hierro-azufre (Fe-S), que son cofactores de proteínas que juegan un papel de suma importancia en el metabolismo de múltiples microorganismos así como en la expresión genética (Gerber 2002).

### **2.7. *Dickeya dadantii* (sin. *Erwinia chrysanthemi*)**

*Dickeya dadantii*, anteriormente *Erwinia chrysanthemi* (Samson *et al.*, 2005) son bacilos Gram-negativos, miden entre 0.5-1.0 micras con los extremos redondeados, se producen solos o en parejas, pero a veces en cadenas, las células son generalmente móviles por medio de flagelos peritricos. Son bacterias aero/anaerobias facultativas que catabolizan la glucosa por la vía fermentativa y reducen los nitratos a nitritos (Hauben *et al.*, 1998). *D. dadantii* es una enterobacteria fitopatógena que afecta a plantas monocotiledóneas, así como dicotiledóneas, incluyendo muchos cultivos de importancia económica (Starr y Chatterjee, 1972). El síntoma más habitual es una pudrición blanda

que parece estar relacionado con el ataque de los principales constituyentes de la pared celular vegetal por las enzimas pécticas, celulolíticas y proteolíticas producidas por la bacteria.

Estas actividades enzimáticas se pueden detectar en los tejidos de las plantas infectadas (Andro *et al.*, 1984). *D. dadantii* contiene en su cromosoma los 3 sistemas genéticos involucrados en la formación de centros [Fe-S]; los sistemas Isc y Suf son los principales en la producción de dichos centros, cada gen contenido en los sistemas codifica para proteínas específicas para la correcta biogénesis de los centros [Fe-S], estos sistemas están regulados por el regulador transcripcional iscR del sistema ISC, el cual controla negativamente al promotor del sistema Isc y positivamente al promotor del sistema Suf bajo las condiciones de estrés oxidativo y carencia en hierro (Yeo *et al.*, 2006). La función regulatoria de IscR está implicada en la virulencia de diversos procariontes como *Shigella flexneri* y *E. chrysanthemi* (Rincón-Enríquez *et al.*, 2008; Runyen-Janecky *et al.*, 2008).

Respecto a la bacteria patógena *Shigella*, mutantes de los genes contenidos en los sistemas genéticos Isc y Suf resultan sensibles a estrés oxidativo y a limitaciones de hierro, en los mutantes de dichos sistemas también se observó una disminución en la infección a células epiteliales, provocando una disminución en la virulencia de la bacteria. En recientes estudios usando la técnica de mutagenesis, Rajagopalan-Senapathy y colaboradores (2013) obtuvieron mutantes puntuales de las cisteínas de la proteína reguladora IscR, sustituyendo los aminoácidos cisteínas por alaninas; concluyendo que los residuos de cisteínas son de suma importancia para la correcta conformación de IscR, la forma apo y holo de dicha proteína regulan al sistema Suf cuando el sistema Isc se encuentra ausente, esto sugiere que el sistema Suf cumple con la función de mantener la homeostasis de los centros [Fe-S] dentro de la célula (Senapathy *et al.*, 2013). La biosíntesis de los centros [Fe-S], regulados por IscR contribuye a la homeostasis del hierro y a la resistencia a agentes oxidantes en bacterias como *Pseudomonas aeruginosa*, mutantes puntuales de cisteínas de la proteína IscR de dicha bacteria impidieron el correcto ensamble del centro [Fe-S] a la apoproteína, cada cisteína cumple un papel importante dentro de la estructura de la proteína, esto dependiendo de las condiciones en las que la bacteria se esté cultivando,

las tres cisteínas al ser remplazadas por alaninas provoca un ensamble débil del centro [2Fe-2S] obteniendo como resultado mutantes sensibles a estrés oxidativo y carencia en hierro (Romsang *et al.*, 2014).

Una alternativa en la disminución de la virulencia y en el rol de la patogenicidad de *D. dadantii*, es la generación de un mutante nulo y mutantes puntuales del regulador transcripcional IscR. Las mutaciones proporcionan una herramienta en el laboratorio para introducir cambios en el genoma bacteriano. La mayoría de estos errores o alteraciones introducidos en el genoma son corregidos por los mecanismos de reparación del ADN, pero algunos escapan a la corrección y pueden originar cambios heredables que proporcionan una diversidad genética. Dada la baja frecuencia de mutaciones, solo los microorganismos con alta tasa de crecimiento, pueden alcanzar cifras suficientemente altas como para que sean detectables (Dale 1996).

Las mutaciones en las bacterias, frecuentemente afectan propiedades fácilmente reconocibles como requerimientos nutricionales, morfología o resistencia antibiótica. Las mutaciones puntuales, son aquellas que implican un cambio en una única base; pueden provocar el cambio de un aminoácido por otro en el producto proteico (mutación por cambio de sentido). Las mutaciones nulas implican cambios en la función del gen debido a inserción o deleción de bases dado que como se sabe que existe más de un codón para cada aminoácido. Las deleciones y las inserciones producen cambios más notorios en el ADN, provocando la pérdida o la incorporación de cualquier número de pares de bases. Por lo tanto, siempre que éste no sea múltiplo de tres se producirán mutaciones por desplazamiento del marco de lectura, que suele provocar la pérdida total del fenotipo (Joklik *et al.*, 1994).

Existen investigaciones como la de Rincón Enríquez y colaboradores en el 2008 así como Jang e Imlay en 2010 donde se han realizado mutaciones en distintos genes de los sistemas Isc y Suf involucrados en la biogénesis de [Fe-S], en lo que respecta a los mutantes *suf* estos ya no fueron capaces de utilizar sideróforos y se encontró que eran sensibles al estrés oxidativo (Nachin *et al.*, 2001), por lo tanto la virulencia reducida de los mutantes *suf* fue interpretada por la alteración de la utilización del hierro intracelular, así como a la incapacidad para mantenerse al momento en el que enferma a la planta. Está última produce especies reactivas de oxígeno que no le permite la adecuada

adaptación para continuar con la infección (Scandalios 1997).

En *D. dadantii* mutaciones en los genes *iscU*, *hscA* y *fdx*, resultan sensibles al paraquat un generador de estrés oxidativo en la célula bacteriana, en dicho estudio la cepa silvestre crece de manera normal en estas condiciones mientras que las cepas mutantes no mostraron crecimiento, los mutantes también fueron probados en hojas de endivia (*Cichorium endivia*) y en plantas de *Arabidopsis thaliana* para determinar su virulencia observando que disminuye significativamente la enfermedad en comparación a la cepa silvestre (Rincón-Enríquez *et al.*, 2008). En este mismo estudio se elaboró una cepa de *D. dadantii* que no contenían en el sistema Isc el promotor *isc* e *iscR*, sustituyéndolo por el promotor pBAD, donde la expresión del operón *UA-hscBA-fdx* es inducida en presencia de arabinosa y reprimida en presencia de glucosa, esta cepa exhibió sensibilidad hacia el paraquat en la presencia de glucosa, mientras que con arabinosa la cepa fue capaz de crecer en placas que contenían paraquat. Cabe destacar que en dicho estudio se inactivaron los genes *nifS* y *csdA* y no mostraron ninguna sensibilidad al estrés oxidativo y carencia en hierro, en lo que respecta, a las pruebas de virulencia, los mutantes simples de Nif y Csd se comportaron de igual manera que la cepa silvestre. Por lo que se llegó a la conclusión que dichos sistemas Nif y Csd de *D. dadantii* no intervienen en su virulencia.

## 2.8. Violeta africana (*Saintpaulia ionantha*)

La violeta africana es una planta herbácea perenne, baja y compacta, pubescente, de tallo ausente o muy corto, con las hojas formando una roseta de cuyo centro salen las vistosas flores. Las hojas por lo general son oblongo-ovadas o casi circulares, carnosas, de 4-8 cm de largo, de color verde oscuro en el haz y purpúreas o rojizas por el envés. Pecíolo peloso, de 6-7 cm de longitud. Inflorescencias con hasta 8-10 flores de unos 2.5 cm de diámetro, de color lila pálido a azul oscuro, a veces blancas. Estambres fértiles y amarillos. Fruto en cápsula cilíndrica (Núñez, 2012).

Las plantas ornamentales han sido de interés para el hombre desde tiempos antiguos, para la ornamentación de hogares, calles y otros lugares; además, de su valor ornamental estas plantas proporcionan bienestar social y psicológico (Pereira *et al.*, 2004). En la actualidad las plantas ornamentales son muy cotizadas en el mercado

mundial, aportando inmensos ingresos a los países productores y exportadores, tanto como flores de corte como plantas de ornamento. La violeta africana (*Saintpaulia ionantha*) fue descubierta por el barón Walter Van Saint Paul St Claire en las montañas de Usambara, en la provincia del Cabo en Sudáfrica (Pasqual *et al.*, 1996). *S. ionantha* es una planta muy demandada en los mercados, alcanzándose producciones superiores a los cuatro millones de plantas por año en diversos países. Inicialmente se reproducía por semilla o principalmente por esquejes foliares, en la actualidad la forma más habitual de reproducirla es mediante el cultivo *in vitro* de secciones de pecíolo (Bianchini y Pantano, 1991).

El cultivo de violetas africanas en México es cada vez mayor, actualmente se está cultivando la mayor proporción en demanda de estas en plantas. En el mercado nacional, una problemática que se tiene al momento de propagar esta planta es la enfermedad provocada por la bacteria fitopatógena *Dickeya dadantii*, esta bacteria provoca la pudrición blanda en este cultivo, esto es debido a que esta planta se crece y se desarrolla en condiciones de alta humedad, temperaturas que oscilan entre los 26-30°C y altos niveles de nitrógeno. El exceso de agua también es esencial pues permite que las células bacterianas se muevan fácilmente a través del tejido de la planta. Además conlleva a una disminución en la disponibilidad de oxígeno, lo que crea un ambiente anaeróbico dentro de la planta y limita sus defensas dependientes de oxígeno (Toth *et al.*, 2003). Los órganos de estas plantas se ven afectadas por esta enfermedad, principalmente las hojas, debido a que son muy carnosas lo que representa un alto contenido de pectina y celulosa, es por esto que al momento de que esta bacteria enferma a la planta, a los pocos días la planta estará infectada y morirá (Vargas, 1998).

## 2.9. Estudio de la proteína reguladora IscR

Estudios pioneros que implican la caracterización de la proteína IscR fueron coordinadas inicialmente por la investigadora Patricia Kiley, de la Universidad de Wisconsin, Madison-WI USA utilizando como modelo la bacteria *E. coli*, en estos trabajos IscR se describe como un regulador transcripcional que actúa como represor y activador de la expresión genética en más de 40 genes. Entre los genes regulados en este microorganismo, se encuentran los genes con promotores inducidos



anaeróbicamente (como por ejemplo: *dmsA*, *fdnG*, *frdA*, *hyaA*, *hybO*, *napF* y *narG*) y los relacionados con la biosíntesis de los centros o cofactores [Fe-S] (*iscR*, *sufA*, *yadR*, *yhgI*), los responsables al estrés oxidativo (*sodA* y *soxS*) y algunos con función desconocida (*ydiU*, *yjiH* e *yqjI*) (Giel *et al.*, 2006).

Schwartz *et al.* (2001) describió que la proteína codificada por *iscR* actúa como un regulador negativo de la maquinaria Isc encargada de la biogénesis de los centros [Fe-S]. Diversas evidencias soportan estos conocimientos: En primer lugar una porción aislada de IscR contiene un centro de tipo [2Fe-2S]. Segundo, la proteína IscR posee similitudes con secuencias primarias de la familia de reguladores transcripcionales. Tercero, la delección de IscR resulta en una expresión elevada de genes implicados en la síntesis de centros [Fe-S] *in vivo*. Por último, la inactivación de *iscS* y *hscA*, ambos necesarios para la completa formación de los centros [Fe-S], también resulta en una elevación de los transcritos de los genes encargados del montaje de los centros. Estas observaciones refuerzan el modelo de regulación por retroalimentación, donde la demanda para la maduración de las proteínas Fe-S controla la expresión de genes cuyos productos son necesarios para la formación de dichos cofactores (Takahashi y Nakamura, 1999).

En diversas  $\beta$ - y  $\gamma$ - proteobacterias, la regulación de la biogénesis de los centros [Fe-S] por los sistemas Isc y Suf es controlada por una única proteína, IscR, la cual es parte de la familia de reguladores Rrf2 (Giel *et al.*, 2006; Schwartz *et al.*, 2001). IscR contiene una región de unión al ADN en la parte N-terminal formada por una estructura de tipo *hélix-turn-helix* (HTH), un segundo dominio altamente conservado con tres residuos de cisteína, un probable sitio de unión de un centro [Fe-S]. Con base en este contexto genómico y la homología de la secuencia, IscR fue descrito como regulador del operón *iscRSUA* (Schwartz *et al.*, 2001). La función de IscR es reprimir la expresión proteica de la maquinaria Isc, la forma en cual la actividad de IscR es regulada para mantener la cantidad adecuada de centros [Fe-S] no se ha comprendido del todo bien. La inactivación de la ruta de biosíntesis del sistema ISC disminuye la represión del promotor *iscR*, lo que sugiere que un cofactor [2Fe-2S] es necesario para la función represora de IscR (Schwartz *et al.*, 2001). Conforme a esta observación, la limitación de Fe o S también desreprime el promotor IscR (Outten *et al.*, 2004; Gyaneshwar *et al.*,

2005). Con base a estos datos expuestos anteriormente, Schwartz *et al.* (2001) propusieron que este es un mecanismo de retroalimentación (*feedback*). Cuando se incrementa la concentración intracelular de proteínas Isc y Hsc, átomos de Fe<sup>+2</sup> y cisteínas, IscR adquirirá un centro [2Fe-2S], para luego ser capaz de unirse al ADN y reprimir la transcripción del operón *iscRSUA-hscAB-fdx-IscX* (Schwartz *et al.*, 2001; Giel *et al.*, 2006; Py y Barras, 2010). La proteína IscR es una proteína Fe-S, este centro es necesario para la represión de la transcripción del operón *isc*, del cual forma parte (Schwartz *et al.*, 2001). Nesbit *et al.* (2009) demostraron que el cofactor [2Fe-2S] no es necesario para que IscR ejerza su función como regulador en algunos promotores diana. La presencia del cofactor para la regulación parece depender del tipo de secuencia de unión a IscR (Giel *et al.*, 2006). Está descrito hasta hoy, dos secuencias motivo, tipo 1, con 25 pares de bases (pb) (ATASYGACTRwwwYAGTCRRSTAT) y de tipo 2, con 26 pb (AWAECCCYTSnG TTTGMnGKKKTKWA) donde : M=A/C, R=A/G, S=G/C, W=A/T, Y=C/T. Secuencias de tipo 1 requieren [2Fe-2S] -IscR para su represión, ya que las secuencias de tipo 2, a su vez, no requieren ningún cofactor [Fe-S] para su activación (Nesbit *et al.*, 2009). Estudios posteriores demostraron que la proteína IscR, en su forma apo, activa la expresión de los genes del operón *suf* en *E. coli*. Cuando el centro está presente en IscR, la forma holo-IscR reprime la expresión del operón *isc*, cuando está ausente, apo-IscR activa la expresión de los genes *suf*. De esta manera, la regulación dependiente IscR permite el aumento de la expresión de los dos sistemas Isc y Suf, bajo condiciones de estrés oxidativo y carencia en hierro, las condiciones en las cuales IscR es encontrada más comúnmente en su forma apo (Giel *et al.*, 2006). La función regulatoria de IscR está implicada en la virulencia de diversos procariontes como *Shigella flexneri*, en el cual la máxima expresión de los genes *suf* está asociada a la virulencia y *Erwinia chrysanthemi* (Rincón-Enríquez *et al.* 2008, Runyen-Janecky *et al.*, 2008). La deleción de IscR en *Burkholderia mallei* aumentó la sensibilidad al óxido nítrico (Jones-Carson *et al.*, 2008); de la misma manera en recientes estudios realizados por Fuangthong y colaboradores (2014) demostraron que en ausencia de la proteína IscR en la bacteria fitopatógena *Xanthomonas campestris* provoca una disminución en la virulencia de la bacteria, de igual manera en su viabilidad en condiciones de estrés oxidativo provocado por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### 3. Justificación

El cultivo de plantas ornamentales en México es cada vez mayor debido a su amplia diversidad climática, sin embargo la producción de las mismas, se ve afectada por distintas enfermedades causadas por hongos, bacterias y virus entre otras causas. El cultivo de violeta africana es uno de los cultivos que más derrama económica genera en el estado de Jalisco, dicho cultivo es atacado por diversos microorganismos fitopatógenos debido a su fisiología y en las condiciones ambientales en la que se cultiva. Correspondiente a lo mencionado la principal problemática que se tiene actualmente en las pérdidas de producción de violeta es ocasionado por la bacteria fitopatógena *D. dadantii* la cual causa la enfermedad conocida como “pudrición blanda” esta se observa en suelos húmedos y temperaturas que oscilan entre los 24-32°C, provocando grandes pérdidas en la producción en las distintas etapas del cultivo. Así Investigar como las mutaciones puntuales de las cisteínas del regulador transcripcional IscR, ayudará a correlacionar como estos residuos intervienen en la expresión de los genes del sistema Isc y Suf involucrados en la biogénesis de los centros [Fe S] dentro de la célula bacteriana, aportando conocimiento y determinando como *iscR* está implicado en la virulencia y como esta proteína interviene en la adaptación de la bacteria a condiciones de estrés oxidativo y carencia en hierro en las plantas hospedadas.

## 4. Hipótesis

Mutaciones en los residuos cisteínas de la proteína reguladora transcripcional IscR alterará la regulación de la biogénesis de los [Fe-S] en *Dickeya dadantii*, esto tendrá como consecuencia fenotipos relacionados con la perturbación en el crecimiento bacteriano en condiciones de estrés y en la virulencia de *D. dadantii* sobre violeta africana.

## 5. Objetivos

### 5.1. Objetivo general

Evaluar el efecto de mutaciones de los residuos cisteínas de la proteína reguladora IscR en la biogénesis de los centros [Fe-S] bajo condiciones de estrés oxidativo, carencia en hierro y en la virulencia de *Dickeya dadantii* sobre plantas de violeta africana.

### 5.2. Objetivos específicos

- Determinar el efecto de mutaciones puntuales de los residuos cisteínas del regulador IscR de *D. dadantii* sobre un mutante nulo *iscR*<sup>Δ</sup> de *E. coli* bajo condiciones de estrés por carencia en hierro.
- Determinar el efecto de mutantes puntuales de los residuos cisteínas del regulador IscR de *D. dadantii* sobre un mutante condicional del sistema Isc de *D. dadantii* bajo condiciones de estrés oxidativo y carencia en hierro.
- Determinar el impacto de mutaciones de las cisteínas de la proteína IscR sobre el proceso de la virulencia de *D. dadantii* sobre plantas de violeta africana.

## 6. Metodología

### 6.1. Propagación *in vitro* de violeta africana.

#### 6.1.1. Preparación de medio de cultivo

El medio de cultivo que se utilizó para la micropropagación de violetas africanas fue MS (Murashige y Skoog, 1962) con reguladores de crecimiento como auxinas y citocininas: 0.4 mg mL<sup>-1</sup> de ácido indolacético (IAA), con 0.8 mg mL<sup>-1</sup> de benciladenina (BA) a un pH de 5.8, posteriormente se vaciaron 20 mL de medio a frascos y se esterilizaron en autoclave 20 min a 120°C.

#### 6.1.2. Multiplicación *in vitro* de violeta africana

Los explantes de hoja de violeta africana se obtuvieron a partir de cultivos en medio de enraizamiento, el cual este medio induce la formación de raíz de las plántulas para que al momento de establecerse *in vivo* la planta se adapté más rápido a dichas condiciones, de igual manera este medio nos permite obtener una planta bien desarrollada para tomarla como planta madre para posibles explantes a partir de las hojas. Se extrajo la plántula y se cortaron hojas maduras en placas de vidrio para su cultivo en medio MS (Murashige, T. And Skoog, 1962) con reguladores de crecimiento, se establecieron 4 hojas por cada frasco y se observaron cada 2 semanas para determinar el crecimiento de los brotes de las hojas. Después de 5 meses de crecimiento se pasaron las plántulas a medio de enraizamiento durante 6 meses, posteriormente se pasaron a macetas con sustrato para concluir con su propagación.

### 6.2. Propagación *in vivo* de violeta africana

Las plantas de violeta africana se mantuvieron en un cuarto de incubación a 28°C con un fotoperiodo de 8/16 horas (luz/oscuridad) con periodos de riego de 3 días por semana.

Multiplicación *in vivo*: para esta actividad se seleccionó la planta a propagar. Las hojas deben ser sanas, de un color verde oscuro, venas resaltadas en la parte de envés, con brillo y en una edad joven a adulta, para que su establecimiento en una nueva maceta sea de manera rápida y que facilite la adaptación de la misma, los cortes de cada una

de las hojas seleccionadas deben ser de 2.5 cm contando de donde comienza la hoja. El medio debe de cumplir con 4 requisitos: haber pasado por un proceso de esterilización, con el objeto de evitar plagas y enfermedades; sostener la hoja; ser suficientemente poroso para lograr raíces gracias a la oxigenación y conservar la humedad, para las plantaciones de las hojas se utilizó enraizador (radix) con la finalidad de acelerar el rápido enraizamiento de la hoja y tener una planta adulta alrededor de tres meses. Las plantas se regaron en un intervalo de cinco días con agua potable.

### 6.3. Cepas bacterianas y medios de cultivo

Para las técnicas de ADN recombinante se utilizó la cepa DH5 $\alpha$  de *E. coli*, las condiciones en las que se cultivaron fueron sobre medio rico LB (Luria-Bertani) a una temperatura de 37°C en medio tanto sólido como líquido, este último en agitación de 200 rpm (Apéndice). La cepa de referencia de este trabajo fue la bacteria fitopatogena modelo *D. dadantii* cepa 3937, la cual cuenta con su genoma secuenciado y disponible (Glasner *et al.*, 2011) y es causante de enfermedades relacionadas con pudriciones blandas en distintas especies vegetales. Esta especie bacteriana fue crecida en medio LB a temperatura de 30°C. Para la caracterización fenotípica y manipulación de las cepas mutantes se utilizó el medio rico LB así como medio mínimo M9, empleando como fuente de carbono al glicerol o ácido poligalacturónico (PGA) al 0.2% para evaluación de auxotrofías. En lo que respecta a la evaluación en condiciones de estrés oxidativo y carencia en hierro, se le adicionó al medio rico paraquat como agente oxidante (methyl viologen dichloride hydrate, Sigma-Aldrich 856177) o 2,2'-Bipyridyl, Sigma-Aldrich D216305) como quelante de hierro a distintas concentraciones dependiendo de cada bacteria a evaluar (*E. coli* o *D. dadantii*). Cuando se requirió antibiótico, se adicionaron en las siguientes concentraciones: ampicilina 50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , kanamicina 50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , espectinomicina 50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

### 6.4. Análisis in silico por bioinformática

Las secuencias de las cepas 3937 de *D. dadantii* y K12 de *E. coli* fueron obtenidos a partir del genoma disponible en la página electrónica del *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Con cada secuencia de cada

organismo evaluado se realizaron análisis bioinformáticos con distintos programas para determinar *in silico* los sistemas de biogénesis de centros [Fe-S] presentes en sus genomas. Para el alineamiento de secuencias nucleotídicas y proteicas de las distintas mutaciones puntuales del gen *iscR* de las bacterias analizadas se utilizó el programa ClustalW2: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>.

### **6.5. Preparación de células electrocompetentes de *Escherichia coli* y *Dickeya dadantii***

Las células bacterianas se crecieron por 24 horas, pasado este tiempo, se tomó un inóculo de este cultivo y se inició uno nuevo a una densidad óptica (600 nm) de 0.1. Se cultivó hasta su fase exponencial (densidad óptica de 0.6) y a partir de éste, se realizaron tres lavados con agua destilada estéril (4°C), finalmente las células se concentraron, realizando una centrifugación por 10 minutos a 13000 rpm y se resuspendieron en glicerol al 10%, conservándolas a una temperatura de -80°C hasta su utilización (Sambrook *et al.*, 1989). Cabe mencionar que en el caso de *D. dadantii* las células se tomaron frescas para realizar la electroporación, el término “frescas” se refiere a que el mismo día que se realiza la preparación de las células electrocompetentes, ese mismo día se realiza la transformación de la cepa.

### **6.6. Extracción de ADN de *D. dadantii***

La extracción de ADN se llevó a cabo utilizando el método descrito por Wen-ping Cheng y Tsong-teh Kuo (1993), para lo cual, se tomaron 1.5 mL de cultivo concentrado de una noche y se centrifugó por tres minutos a 13 000 rpm, posteriormente la pastilla bacteriana se resuspendió en una solución tampón de 40 mM de tris-acetato pH 7.8, 20 mM de acetato de sodio, 1 mM de EDTA (ácido etilendiaminotetracético) y SDS (dodecil sulfato de sodio) al 1%, para provocar la lisis celular, posteriormente se adicionó 66 µL de cloruro de sodio 5M para facilitar la liberación del ADN intracelular, después se centrifugó por 10 minutos a 13 000 rpm a 4°C. El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio, para enseguida adicionar un volumen igual de cloroformo e invertir suavemente, observándose una solución blanca homogénea se centrifugó por tres minutos a 13 000 rpm, se obtuvieron dos fases separadas por una ligera capa de proteínas, la fase de



interés y que se recuperó fue la fase superior. Finalmente se llevó a cabo la precipitación del ADN con etanol absoluto y dos lavados con etanol al 70%. Enseguida el ADN se reconstituyó en 30  $\mu$ L de agua miliQ y se determinó su concentración por medio de un espectrofotómetro. El ADN geonómico, se conservó a 4°C hasta su utilización.

### **6.7. Reacción de amplificación de ADN por PCR y purificación de los productos**

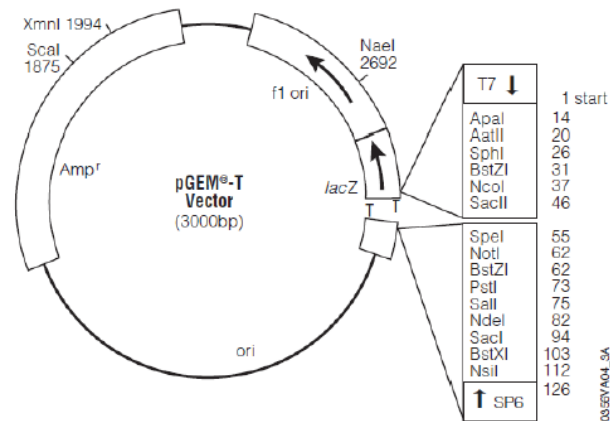
Sobre la secuencia nucleotídica del genoma de *D. dadantii* se determinaron oligonucleótidos específicos con la finalidad de amplificar por PCR los fragmentos de ADN correspondientes al gen *iscR*, para obtener un producto final del gen + los oligos de 3.5 kilo pares de bases (kpb). La reacción de amplificación se llevó a cabo en un termociclador siguiendo la metodología de Sambrook *et al.* (1989). Los iniciadores empleados para la amplificación de *iscR* fueron: Forward (ACT11F): 5'CTGTGCTGTTTGTGCTTG3'; Reverse (ACT11R) 5'CTTGCCTTTCACCCATTC3'.

### **6.8. Purificación de los productos PCR**

La purificación para eliminar el buffer, los oligonucleotidos y los dNTPs del producto PCR se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del kit de purificación PCR de Promega© (Wizard-PCR preps).

### **6.9. Ligación de *iscR* en el plásmido pGEM-T (ampicilina resistencia)**

El producto de amplificación de PCR del fragmento de AND que contenía el gen *iscR* (3.5 kpb), previamente purificado, se ligó en el plásmido pGEM-T easy vector (Promega©). El plásmido pGEM-T tiene las siguientes características: contiene el origen de replicación del fago lambda F1, un sitio múltiple de clonación, el promotor de la lactosa y el gen *lacZ*, el cual codifica por una  $\beta$ -galactosidasa y está abierto con extremos cohesivos con timina (T) (Figura 7).



**Figura 7.** Esquema general del mapa del vector pGEM-T utilizado en este estudio como vector de clonación (Promega, 2012).

Se realizó la ligación del fragmento que contiene a *iscR* / pGEM, haciendo una reacción con  $3 \mu\text{L}^{-1}$  de la enzima T4 ligasa y una solución amortiguadora, la reacción se llevó a cabo por 16 horas a  $16^\circ\text{C}$ . La ligación fue purificada utilizando 10 volúmenes de butanol en relación al volumen de la reacción de ligación y se realizó un lavado con etanol al 70%. La pastilla se resuspendió en  $20 \mu\text{L}$  de buffer EB. Para llevar a cabo la reacción de ligación, se determinó la concentración de ADN necesaria para la ligación utilizando la fórmula siguiente de acuerdo al fabricante (Promega, 2012):

$$ng \text{ ADN inserto} = \frac{(ng \text{ de ADN del vector})(\text{tamaño en pb de inserto})}{\text{tamaño en pb del vector}} \times \frac{3}{1}$$

### 6.10. Inserción de la construcción pGEMiscR (amp) y selección en *E. coli* DH5 $\alpha$

Para este fin se utilizó la cepa de clonación DH5 $\alpha$  de *E. coli*, a la cual se le electroporó la ligación del plásmido pGEM-T con el fragmento de *iscR*, utilizando un electroporador micropulser (Bio-Rad©). Las células electrocompetentes ( $40\text{-}70 \mu\text{L}$ ), se depositaron en celdas de 0.1 cm, agregando aproximadamente 100 ng de ADN plasmídico ligado, llevándose a un choque eléctrico de 1.8 kV, después se agregó 1 mL de medio SOC (ver Apéndice). Posteriormente se dejó en agitación por una hora a  $37^\circ\text{C}$ -200 rpm, al finalizar la hora las células se centrifugaron por tres minutos a 13000 rpm, enseguida se

resuspendió en agua estéril y las células fueron sembradas sobre medio sólido. La selección se llevó a cabo en LB ampicilina ( $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) y 5-bromo 4- cloro3-indolil  $\beta$ -D-galactopiranosido (X-gal), incubándolas a  $37^\circ\text{C}$  por 16 horas. Al ser interrumpido el plásmido en su sitio múltiple de clonación, no se expresa el gen *lacZ*, pero en caso de que no se haya interrumpido este se expresa y toma como sustrato al X-gal. Por lo tanto, cuando el fragmento de interés es ligado en el sitio múltiple de clonación el gen *lacZ* no se expresa y las colonias obtenidas se tornaran de color blanco, de lo contrario si el gen se expresa, utiliza el sustrato y las colonias se tornarán de color azul, tomando en cuenta esto, se llevó a cabo la selección de las colonias obtenidas con el fragmento de interés. Enseguida, las células se cultivaron en medio líquido con el antibiótico de selección y se crioconservaron en glicerol 50% (v/v) a una temperatura de  $-80^\circ\text{C}$ .

#### **6.11. Extracción de ADN plasmídico**

La extracción de ADN plasmídico se llevó a cabo utilizando el kit de extracción “Spin Miniprep” (QIAGEN©), esta extracción se realizó para eliminar impurezas en la muestra como son soluciones tampón, medio de cultivo y ADN no plasmídico. Posteriormente la presencia del inserto de ADN (con *iscR*) en los nuevos plásmidos se verificó mediante PCR con los iniciadores correspondientes para el gen de *iscR*.

#### **6.12. Interrupción del gen *iscR* con la cassette no polar de kanamicina (*aphA3*)**

Una vez obtenidos los plásmidos con el gen de interés, se realizó una carta de restricción utilizando programas bioinformáticos (Snap-gene, Chromas Lite), en donde se examinó el fragmento total del inserto + el vector (6.5 kpb), se verificó empleando el programa NEBcutter, se seleccionó una enzimas que realiza un solo corte en medio del gen *iscR*, para posteriormente insertar la “cassette no polar” de resistencia a la Kanamicina (*aphA3*, marcador de selección) que interrumpe la expresión del gen en la etapa de transducción. La digestión se llevó a cabo utilizando la enzima de restricción *SmaI* con una solución amortiguadora durante 1 hora a  $25^\circ\text{C}$  en un volumen final de  $50 \mu\text{L}$ , generando extremos romos en la base 182 del gen *iscR* (pGEMiscR-SmaI). Posteriormente se verificó la digestión por medio de electroforesis. Al dar positiva la

digestión se realizó la purificación de la digestión, posteriormente este fragmento fue purificado utilizando 10 volúmenes de butanol en relación al volumen de la reacción de digestión y se realizó un lavado con etanol al 70%. La pastilla se resuspendió en 20  $\mu$ L de buffer EB. La “cassette no polar” *aphA3* (resistencia a Kanamicina), se amplificó mediante PCR empleando los iniciadores siguientes: *aphA3*-1 (F): 5´CCGTG CGCATGACTAACTAGGAGGAATAAATG3´ y *aphA3*-2 (R): 5´GCGTGCGCATCATT ATTCCCTCCAGGTAC3´. Posterior a la PCR, se realizó una digestión enzimática utilizando la enzima *FspI*, para generar extremos romos de *aphA3* (*aphA3-FspI*) y facilitar la ligación en el gen *iscR*, posterior a esto, utilizando una T4 DNA ligasa (Invitrogen®), se hizo la reacción de ligación entre *aphA3-FspI* y pGEMiscR-SmaI a un volumen final de 20  $\mu$ L incubando 16 horas a una temperatura de 16°C. Posteriormente se llevó a cabo la precipitación de ADN ligado: se adicionó 10 volúmenes de butanol a la mezcla de reacción, se centrifugó por cinco minutos a 13000 rpm, se retiró el sobrenadante y se lavó la pastilla de ADN con 10 volúmenes de etanol al 70%, se centrifugó por 5 minutos a 10000 rpm, retirando el etanol y dejando evaporar por algunos minutos, al final se resuspendió en 10  $\mu$ L de agua mili-Q estéril.

### **6.13. Transformación y verificación de la construcción del plásmido pGEM-*iscR*::*aphA3* (resistencia ampicilina-kanamicina)**

Se electroporaron 150 ng de ligación pGEM-*iscR*::*aphA3* en la cepa DH $\alpha$ 5 y se seleccionaron sobre medio LB con kanamicina (50  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>), a las células seleccionadas se le extrajo el plásmido, verificando la construcción con una digestión con *EcoRI*, dicha digestión genera dos fragmentos: el plásmido pGEM (3000 pb) y un segundo que contiene el fragmento *iscR*::*aphA3* (4350 pb).

### **6.14. Inserción de construcción (pGEM-*iscR*::*aphA3*) y selección de colonias transformadas en *D. dadantii***

El plásmido extraído con el gen *iscR* mutado (pGEM-*iscR*::*aphA3*), se insertó en células de *D. dadantii*, utilizando un electroporador micropulser (Bio-Rad®). Las células electrocompetentes de *D. dadantii* se depositaron en celdas de 0.5 cm, agregando aproximadamente 500 ng de ADN plásmidico con un volumen de 50 $\mu$ L de células

electrocompetentes, llevándolas a un choque eléctrico de 3.6 kV, después se agregó medio SOC, dejando en agitación por cuatro horas a 30°C, al finalizar este tiempo, las células se centrifugaron por tres minutos a 13 000 rpm, enseguida se resuspendieron en agua mili-Q estéril. La selección se llevó a cabo en caja LB ampicilina y kanamicina (50 µg mL<sup>-1</sup> de cada antibiótico), incubándolas a 30°C por 72 horas.

### **6.15. Construcción del mutante nulo de *iscR* en la cepa 3937 de *D. dadantii* mediante recombinación homóloga**

La cepa electroporada con la construcción pGEM-*iscR*::*aphA3* de *D. dadantii* fue inoculada en medio líquido LB sin antibiótico a 30°C durante 24 horas en agitación para comenzar con el primer subcultivo, la finalidad de realizar dichos subcultivos fue para que se lleve a cabo una doble recombinación homóloga de la construcción pGEM-*iscR*::*aphA3* sobre el cromosoma de la bacteria. Cada 24 horas se realizaron subcultivos, así hasta llegar al subcultivo 30, llegando a este último se hicieron resiembras, de este subcultivo se realizaron diluciones del subcultivo hasta la 10<sup>-5</sup> y se sembraron 100 µL a una concentración de 10<sup>6</sup> UFC mL<sup>-1</sup> en placas de LB con kanamicina y se incubaron a 30°C durante tres días, pasado este tiempo se procedió a realizar replicas en placas con LB con ampicilina con la finalidad de identificar cepas que contienen la doble recombinación homóloga. Con el fin de optimizar el proceso de recombinación homóloga se realizaron tres series de subcultivos:

- La primera serie consistió en crecer la bacteria *D.dadantii* transformada con la construcción (pGEM-*iscR*::*aphA3*, únicamente en medio de cultivo LB líquido sin antibiótico, empezando por el primer subcultivo y se observó que al tercer subcultivo la bacteria desechaba al plásmido con la construcción, por lo cual se propusieron las siguientes estrategias:
- La segunda serie consistió en crecer a la bacteria transformada en medio LB líquido, adicionándole el antibiótico kanamicina (5 µg mL<sup>-1</sup>), con la intención de que no desechará el plásmido tan rápido, cabe mencionar, que la bacteria crecía muy bien en dicho medio, en el lapso en que se realizaban los subcultivos, se hacían replicas en Amp para corroborar que alguna colonia tuviera la doble recombinación homóloga.

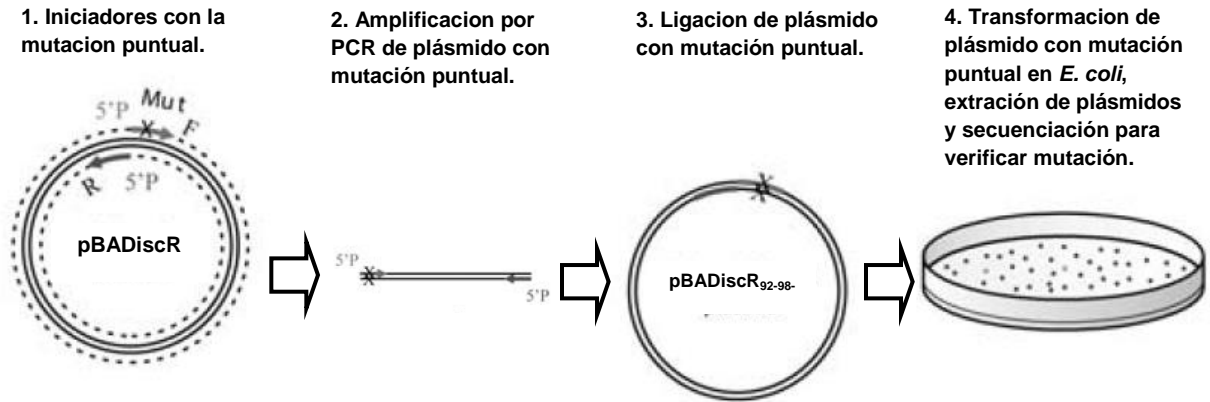
- La tercer serie consistió en crecer a la bacteria transformada en medio LB líquido, adicionándole el paraquat ( $0.2\mu\text{M}/\text{mL}^{-1}$ ) como agente oxidante, que le ocasiona estrés oxidativo a la bacteria, lo que puede ayudar a que se lleve a cabo la doble recombinación homóloga, durante los subcultivos se realizaron resiembras sobre medio selectivo con kanamicina y replicas sobre ampicilina con el fin de corroborar que alguna colonia tuviera la doble recombinación homóloga.

Los resultados fueron negativos respecto a la doble recombinación homóloga con esta técnica por lo cual se procedió a utilizar un mutante condicional nulo del sistema Isc de *D. dadantii* reportado anteriormente por Rincon-Enriquez *et al.* (2008). El inconveniente de esta cepa, fue que la transcripción de dicho sistema es inducido/reprimido por arabinosa/glucosa respectivamente, de la misma manera este mismo sistema de regulación genética induce en el plásmido pBAD la transcripción de las proteínas IscR con las mutaciones puntuales de las cisteínas. Así durante los resultados fue importante considerar este sistema de regulación tanto para el mutante condicional como para los mutantes cisteínas de IscR.

#### **6.16. Generación de mutaciones puntuales de las cisteínas de IscR utilizando el kit site-directed mutagenesis**

Se realizaron mutaciones puntuales de las cisteínas (92, 98 y 104) simples (3), dobles (3) y triple (1) por sustitución a histidinas debido a que dicho aminoácido produce enlaces más fuertes dentro de la estructura y conformación de la proteína. En la proteína IscR se realizaron con el kit Site-Directed Mutagenesis Kit. Pushion® (Thermo scientific) utilizando la técnica de PCR y esquematizado en la Figura 8. Brevemente la técnica para generar las mutantes de las cisteínas por sustitución a histidinas consistió en introducir el cambio de bases para codificación de histidinas en los iniciadores, posteriormente se realizó una PCR empleando como templado a un plásmido que contiene el gen a mutagenizar. Se obtuvieron un total de siete plásmidos conteniendo los distintos juegos de mutaciones puntuales (simples, dobles o triple) de las cisteínas substituyéndolas por histidinas (Cuadro 1), el plásmido molde utilizado en esta técnica fue el vector de clonación pBAD24 (4542 pb) el cual contiene al gen silvestre *iscR* (495 pb) de *D. dadantii* con un tamaño total de 5037 pb (pBADiscR), con un marcador de

selección a la ampicilina. Cabe mencionar que la transcripción del gen *iscR* es inducido/reprimido por el sistema arabinosa/glucosa (Guzmán *et al.*, 1995).



**Figura 8.** Esquema general para introducir las mutaciones de cambio de cisteínas por histidinas en el plásmido pGEMiscR mediante el Phusion Site-Directed Mutagenesis Kit (Thermo Scientific®).

**Cuadro 1.** Secuencias de los iniciadores empleados para generar plásmidos con las distintas mutaciones en la proteína reguladora IscR de *D. dadantii*.

Mutación	Iniciador con mutación Cys por His (en negritas)	Plásmido
Cys92	F 5' GACGCTACCCG <b>CACC</b> CAGGGGAAAGAAG 3' R 5' CACGGACTCATCCACGGCGGAGAT 3'	pBADiscR <sub>92</sub>
Cys98	F 5' AGGGGAAAGAAGGG <b>CAT</b> CAGGGCGGCGATCG 3' R 5' GGCAGCGGGTAGCGTCCACGGACT 3'	pBADiscR <sub>98</sub>
Cys104	F 5' GGGCGGCGATCG <b>CAT</b> CTGACCCATACGCTG 3' R 5' TGACACCCTTCTTTCCCCTGGCAG 3'	pBADiscR <sub>104</sub>
Cys92-98	F 5' GCTACCCG <b>CACC</b> CAGGGGAAAGAAGGG <b>CAT</b> CAGGGCGGC 3' R 5' GTCCACGGACTCATCCACGGCGGA 3'	pBADiscR <sub>92*98</sub>
Cys92-104	F 5' CAGGGCGGCGATCG <b>CAT</b> CTGACCCAT 3' R 5' ACACCCTTCTTTCCCCTG <b>GTG</b> GCGGGT 3'	pBADiscR <sub>92*104</sub>
Cys98-104	F 5' AAAGAAGGG <b>CAT</b> CAGGGCGGCGATCG <b>CAT</b> CTGACCCAT 3' R 5' CCCCTGGCAGCGGGTAGCGTCCAC 3'	pBADiscR <sub>98*104</sub>
Cys92-98-104	F 5' GAAGGG <b>CAT</b> CAGGGCGGCGATCG <b>CAT</b> CTGACC 3' R 5' TTTCCCCTG <b>GTG</b> GCGGGTAGC 3'	pBADiscR <sub>92*98*104</sub>

- Los iniciadores se desfosforilaron en el extremo 5', para facilitar la ligación.
- Los primers se purificaron por HPLC.

Para la reacción de PCR se utilizó una concentración de ADN de  $10 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ , en un volumen final de reacción de  $25 \mu\text{L}$ . Posterior a la reacción se cuantificó la concentración de ADN y se migraron  $2 \mu\text{L}$  para corroborar la amplificación correcta del plásmido con la mutación de la cisteína. Los  $21 \mu\text{L}$  del producto PCR restantes se utilizaron en la reacción de ligación. Se ligaron  $250 \text{ ng} \times 5$  minutos a  $25^\circ\text{C}$ . Pasado dicho tiempo se purificó con butanol ( $10$  volúmenes) y se realizó un lavado con etanol al  $70\%$  y se centrifugó  $5$  minutos a  $13\ 000 \text{ rpm}$ . La pastilla se resuspendió en  $40 \mu\text{L}$  de agua mili-Q estéril y se electroporó en células electrocompetentes de *E. coli* DH5 $\alpha$ . Posteriormente se centrifugó el volumen del cultivo a  $13\ 000 \text{ rpm} \times$  ocho minutos y la pastilla se resuspendió en  $100 \mu\text{L}$  de agua mili-Q estéril.  $95 \mu\text{L}$  se sembraron en placas de LB con ampicilina (amp) y los  $5 \mu\text{L}$  restantes se llevaron a un volumen final de  $100 \mu\text{L}$ ,  $50 \mu\text{L}$  se sembraron en LB/amp/arabinosa y LB/amp/glucosa respectivamente, esto se realizó con la finalidad de identificar posibles fenotipos. Las bacterias se cultivaron a  $37^\circ\text{C}$  durante dos días, pasado este tiempo se seleccionaron alrededor de  $10$  colonias, se hizo un miniprep y se secuenciaron para identificar cuál de los minipreps tiene la mutación deseada de las cisteínas ( $92$ ,  $98$  y  $104$ ) simples, dobles o triple.

Los plásmidos con la mutación específica de cada cisteína después de su verificación por PCR-secuenciación, se procedió a re-activar las cepas de  $-80^\circ\text{C}$  que contenían la correcta mutación dentro del gen *iscR*, en medio LB líquido para realizar un midiprep. Los plásmidos con la mutación puntual específica de cada aminoácido, se introdujeron por electroporación en las cepas  $3937$  y condicional *Isc* de *D.dadantii* (Cuadro 2) así como en las cepas  $K12$  e *iscR* de *E. coli* (Cuadro 3). Todas estas cepas se evaluaron con la técnica de complementación fenotípica para estrés oxidativo, carencia en hierro y para las cepas de *D.dadantii* también se evaluó la virulencia en plantas de violeta africana.

**Cuadro 2.** Nomenclatura de las cepas de *D. dadantii* transformadas por electroporación con los plásmidos que contienen al gen silvestre *iscR* y sus mutantes en el aminoácido cisteína en los sitios  $92$ ,  $98$  y  $104$ .



Plásmido	Electroporado en cepa silvestre (3937) de <i>D. dadantii</i>	Electroporado en cepa mutante condicional de <i>D. dadantii</i>
Sin plásmido	JC1	JC9
pBAD	JC2	JC10
pBADiscR	JC3	JC11
pBADiscR <sub>-92*104</sub>	JC4	JC12
pBADiscR <sub>-98*104</sub>	JC5	JC13
pBADiscR <sub>-92*98</sub>	JC6	JC14
pBADiscR <sub>-92*98*104</sub>	JC7	JC15
pBADiscR <sub>-1/2</sub>	JC8	JC16

pBADiscR<sub>-1/2</sub> = plásmido con proteína IscR truncada en la parte C-terminal, a partir de la cys92.

**Cuadro 3.** Nomenclatura de las cepas de *E. coli* electroporadas con los plásmidos que contienen al gen silvestre *iscR* y sus mutantes en el aminoácido cisteína en los sitios 92, 98 y 104 provenientes del genoma de *D. dadantii*.

Plásmido	Electroporado en cepa silvestre (K12) de <i>E. coli</i>	Electroporado en cepa mutante nulo <i>iscR</i> <sup>Δ</sup> de <i>E. coli</i>
Sin plásmido	JG1	JG9
pBAD	JG2	JG10
pBADiscR	JG3	JG11
pBADiscR <sub>-92*104</sub>	JG4	JG12
pBADiscR <sub>-98*104</sub>	JG5	JG13
pBADiscR <sub>-92*98</sub>	JG6	JG14
pBADiscR <sub>-92*98*104</sub>	JG7	JG15
pBADiscR <sub>-1/2</sub>	JG8	JG16

pBADiscR<sub>-1/2</sub> = plásmido con proteína IscR truncada en la parte C-terminal, a partir de la cys92.

Con el fin de tener una inferencia del impacto de los mutantes cisteínas de IscR se realizaron pruebas de complementación fenotípica en el mutante *iscR*<sup>Δ</sup> de la bacteria K12 proporcionado por Dr. Humberto Flores Soto del Instituto de Biotecnología de la UNAM, este mutante fue construido mediante la técnica empleada para construir la colección Keico (Baba *et al.*, 2006).

### 6.17. Caracterización de las cepas mutantes de las cepas 3937 de *D. dadantii* y K12 de *E. coli* en condiciones de estrés oxidativo y carencia en hierro mediante pruebas de complementación fenotípica

Para este análisis se realizaron dos evaluaciones en condiciones de estrés para la biogénesis de los centros [Fe-S], para la inducción de estrés oxidativo se utilizó paraquat (methyl viologen dichloride hydrate, Sigma-Aldrich 856177), un agente superóxido que causa estrés oxidativo en las células; para la inducción de estrés por carencia en hierro se utilizó un quelator de hierro intracelular (2,2'-Bipyridyl, Sigma-Aldrich D216305). La prueba de estrés oxidativo se realizó en medio LB para las dos especies bacterias, cada una con concentraciones diferentes de los agentes de estrés oxidativo y carencia en hierro (Cuadro 4).

**Cuadro 4.** Medios de cultivos empleados en pruebas de complementación fenotípica con estrés oxidativo (paraquat, PQ) y carencia en hierro (dypiridil, DIP) para las dos especies bacterianas en estudio.

<i>D. dadantii</i>		<i>E. coli</i>	
3937	Mutante condicional <i>isc</i>	K12	Mutante nulo <i>iscR</i>
LB	LB	LB	LB
LB Arabinosa	LB Arabinosa	LB Arabinosa	LB Arabinosa
LB Glucosa	LB Glucosa	LB Glucosa	LB Glucosa
LB Arabinosa/40µM PQ	LB Arabinosa/40µM PQ	LB Arabinosa/150µM DIP	LB Arabinosa/150µM DIP
LB Arabinosa/60µM PQ	LB Arabinosa/60µM PQ	LB Arabinosa/300µM DIP	LB Arabinosa/300µM DIP
LB Arabinosa/80µM PQ	LB Arabinosa/80µM PQ	LB Arabinosa/450µM DIP	LB Arabinosa/450µM DIP
LB Arabinosa/125µMDIP	LB Arabinosa/125µM DIP		
LB Arabinosa/250µMDIP	LB Arabinosa/250µM DIP		
LB Arabinosa/375µMDIP	LB Arabinosa/375µM DIP		

En cada caja de LB a las distintas concentraciones se inocularon diluciones seriales de 0 a 10<sup>-5</sup> partiendo de un cultivo de densidad óptica (600 nm) de 2 de las dos especies bacterianas evaluadas. Para las pruebas de carencia en hierro se realizó de la misma manera, mencionando que las cepas de *D. dadantii* fueron inoculadas a 30°C y las cepas de *E. coli* a 37°C, en un tiempo de 1 a 5 días dependiendo de las condiciones de

crecimiento de cada cepa. En este mismo experimento a los medios de cultivo con los distintos agentes de estrés se les adicionó arabinosa y glucosa en pruebas para *E. coli*, para *D. dadantii* y condicional las pruebas se hicieron únicamente con arabinosa, la glucosa se omitió ya que se reprimiría el sistema Isc del condicional, de igual manera que la transcripción de la proteína mutada contenida en el plásmido y los fenotipos observados no son de interés en el estudio. Un resumen de los medios utilizados para el análisis de este experimento se describe en el Cuadro 5.

**Cuadro 5.** Concentraciones de los agentes estresantes en las dos especies bacterianas evaluadas bajo condiciones *in vitro*.

<i>D. dadantii</i>		<i>E. coli</i>	
Paraquat (µM)	Dipyridil (µM)	Paraquat (µM)	Dipyridil (µM)
40	125	80	150
60	250	160	300
80	375	320	450

#### **6.18. Pruebas en medio mínimo M9 de cepas mutantes de *D. dadantii* y *E. coli***

Las cepas mutantes de ambas bacterias (*D. dadantii* y *E. coli*) se sembraron en cajas de M9+glicerol (0.2%) en las que se inocularon diluciones seriales de 0 a  $10^{-5}$  de un cultivo que se llevó a una densidad de 2 (cultivo puro). Dicho experimento se realizó con la finalidad de observar auxotrofias de las cepas mutantes.

#### **6.19. Evaluación de la virulencia de la cepa silvestre y mutante condicional *isc (isc<sup>c</sup>)* de *D. dadantii* bajo condiciones *in planta***

Las pruebas de virulencia se realizaron en hojas de violeta africana, haciendo incisiones de aproximadamente  $1 \text{ mm}^2$  sobre las hojas de violeta africana, se inocularon  $30 \mu\text{L}$  de células a una concentración de  $10^6 \text{ UFC mL}^{-1}$ . Por cada cepa a evaluar se seleccionaron cinco plantas inoculando cuatro hojas por planta (total de hojas,  $n = 20$ ). Los síntomas se evaluaron cada 24 horas por 11 días, determinando el síntoma provocado por la bacteria. Se evaluó siguiendo una escala ordinal de severidad o

virulencia la cual consistió en los siguientes síntomas:

- 0: Plantas sana.
- 1: La bacteria comienza a provocar pudrición en el área de la hoja donde se realizó la incisión.
- 2: La pudrición provocada por la bacteria llega a la zona de la nervadura central de la hoja.
- 3: La pudrición sobre pasa la nervadura central de la hoja, a esta etapa (aproximadamente del 50% al 60% de la hoja se encuentra enferma).
- 4: La hoja se encuentra totalmente podrida.

Los resultados de esta fase experimental fueron analizados mediante un análisis no paramétrico con la prueba de Kruskal-Wallis. Posteriormente se realizó un intervalo de confianza para la mediana de acuerdo a la prueba Dunn ( $p \leq 0.05$ ).

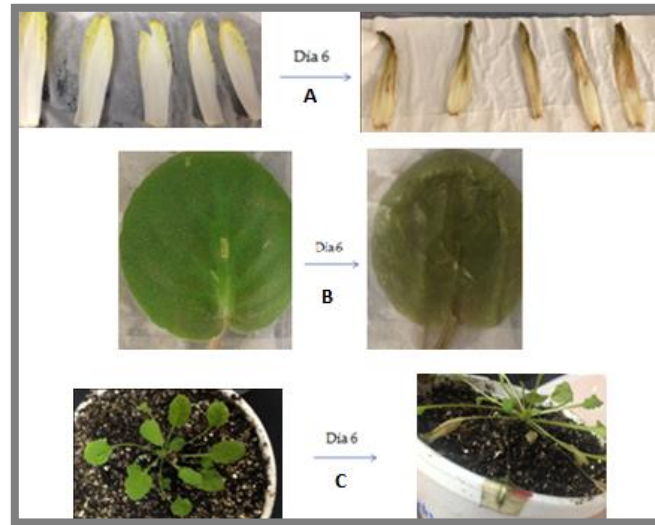
## 7. Resultados y Discusión

### ***Estandarización***

Con el fin de establecer las técnicas de biología molecular, cultivo de tejidos y prueba de virulencia se realizaron pruebas de estandarización, entre los resultados de estos experimentos se muestran a continuación los principales:

### **Recombinación homóloga y pruebas de virulencia en distintas plantas hospederas**

Se llevó a cabo la estandarización de la técnica de transformación de la cepa 3937 de *D. dadantii* utilizando un plásmido con una construcción (pG-Cond-Isc, Rincon-Enriquez *et al.*, 2008) insertándolo de manera satisfactoria. Posterior a la transformación se procedió a seleccionar las cepas transformantes en medio sólido selectivo con antibióticos LB amp/spc, después de obtener las colonias transformadas se crioconservaron a -80°C y a la par se empezaron experimentos de recombinación homóloga mediante la técnica de subcultivos en medio LB sin presión de selección como lo reportado por Rincon-Enriquez *et al.* (2008). Estos subcultivos se realizaron hasta llegar al subcultivo siete para realizar el primer plaqueo en medio LB spc/arabinosa y sus réplicas en LB/amp, con la finalidad de verificar doble recombinación homóloga entre el plásmido y la región homóloga del cromosoma de la bacteria. La recombinación se logró observar en el subcultivo 15. Se realizaron pruebas de patogenicidad y virulencia en hojas de endivia, violeta africana y *Arabidopsis thaliana* (Figura 9). Los resultados para endivia mostraron una disminución de síntomas asociados a la pudrición blanda en la cepa recombinante en comparación con la cepa silvestre (Figura 10). Esto permitió estandarizar y establecer los distintos parámetros para las etapas de transformación e inoculación de cepas mutantes de *D. dadantii*.



**Figura 9.** Pudrición blanda típica provocada por la cepa silvestre 3937 de *Dickeya dadantii* sobre hojas de endivia (A), violeta africana (B) y *Arabidopsis thaliana* (C) después de 6 días de inoculación bajo condiciones *in vitro* e *in planta*.



**Figura 10.** Síntomas de pudrición blanda provocados por la cepa recombinante (posible mutante del sistema *isc*) (A) y de la cepa silvestre 3937 (B) de *Dickeya dadantii* en hojas de endivias (*Cichorium endivia*) a los 8 días después de inoculación bajo condiciones *in vitro*.

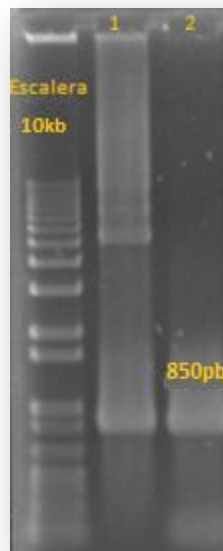
### **Técnicas de biología molecular: amplificación por PCR y ligación en vectores (plásmidos)**

Con el fin de asegurar la recombinación homóloga se planeó la clonación del gen *iscR* con extremos de 2500 pb para asegurar amplias zonas de recombinación homóloga por lo cual se amplificó un fragmento de 5000 pb que contuvo *IscR* (Figura 11) con los iniciadores siguientes: 2500IscR-F 5´TTTCAGACTGCGGCCATTTGC3´ y 2500IscR-R 5´CATCTGCTCCATCAGGAATGC3´. Este fragmento se intentó clonar en el vector

pGEM sin éxito. Por otro lado también se amplificó la casete no polar (*aphA3*) con un gen marcador de resistencia a la kanamicina con los iniciadores siguientes: *aphA3-1* (F): 5'CCGTGCGCATGACTAACTAGGAGGAATAAATG3' y *aphA3-2* (R): 5'GCGTGCGCATCATTATTCCCTCCAGGTAC3' a partir del plásmido (9) con un tamaño de 850 pb (Figura 12).



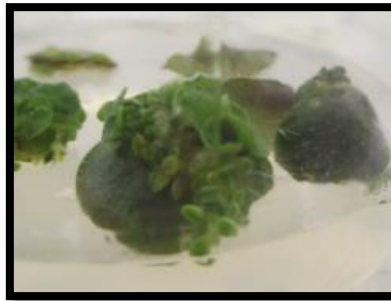
**Figura 11.** Amplificación del fragmento de 5000 pb que contiene *iscR* de *D. dadantii*. Carril 1 = marcador de tamaño de fragmentos (1 Kb plus DNA ladder de Invitrogene®). Carril 2 = amplificación del fragmento de 5000 pb.



**Figura 12.** Amplificación de la casete no polar *aphA3* con marcador de resistencia a la kanamicina. Carril 1 = plásmido (con *aphA3*); carril 2 = fragmento amplificado de *aphA-3* (850 pb).

### 7.1. Propagación *in vitro* de violeta africana

Se logró propagar *in vitro* plantas de violeta africana (Figura 13). Esta propagación pasó por dos procesos antes de ser transferida a sustrato; el primer paso fue la propagación para el desarrollo de nuevos individuos a partir de un mismo explante, el segundo paso fue la etapa de enraizamiento, pasado este tiempo las plántulas se transfirieron a macetas con sustrato (peat moss) para continuar con su crecimiento y posteriormente emplear estas plantas para realizar las pruebas de virulencia de cepas de *D. dadantii*.



**Figura 13.** Propagación *in vitro* de plantas de violeta africana en medio MS con reguladores de crecimiento.

#### 7.1.1. Propagación vegetativa de plantas de violeta africana

De la misma manera se realizó la propagación vegetativa de violeta africana (Figura 14), para la obtención de suficientes plantas desarrolladas que se utilizaron en las pruebas de virulencia de diferentes cepas de *D. dadantii* (silvestre, condicional del sistema *isc*).

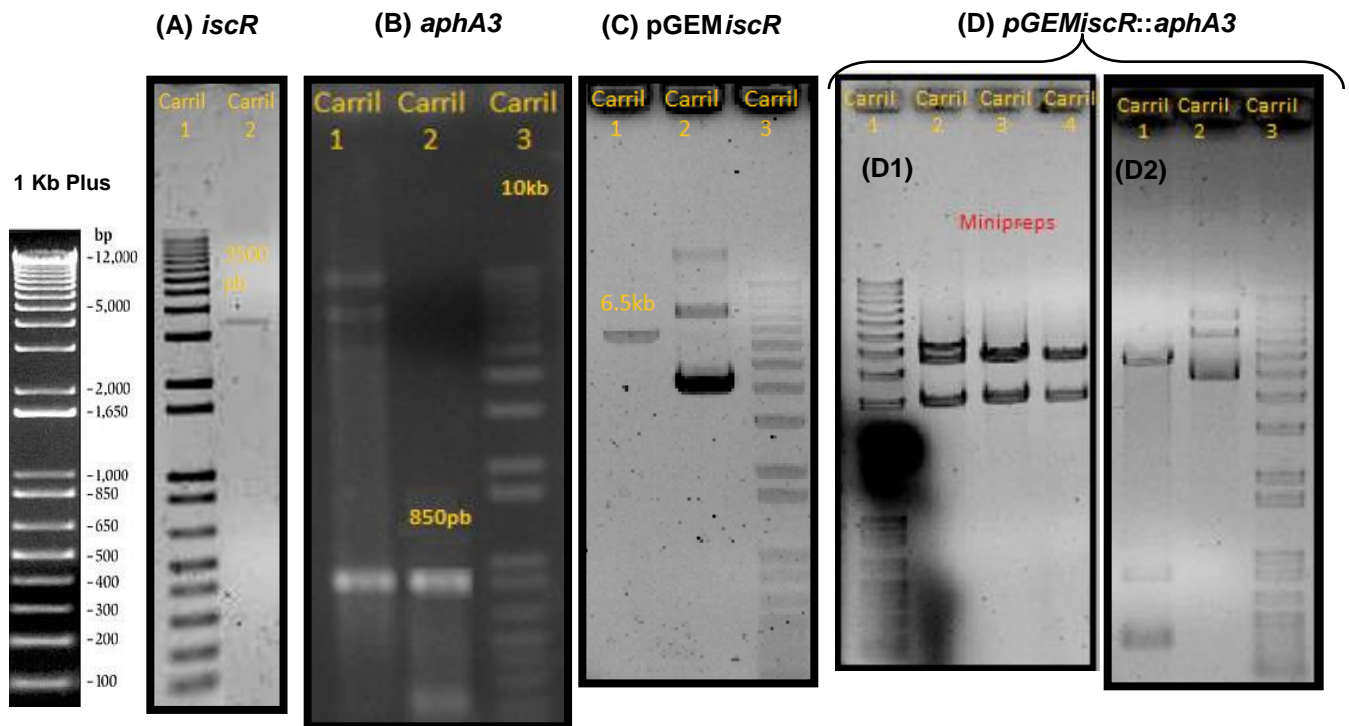


**Figura 14.** Propagación vegetativa de plantas de violeta africana bajo cuarto de incubación a 27°C.



## 7.2. Clonación de la construcción genética *IscR::aphA3* en el plásmido pGEM para mutagenizar *iscR* en *D. dadantii*

Se realizó una construcción con el fragmento *iscR* (3500 pb), en el cual se insertó una casete no polar (*aphA3*) de 850 pb en el vector de clonación pGEM (3000 pb), la construcción final tuvo un tamaño de 7350 pb. Se amplificó por medio de la técnica de PCR, los fragmentos correspondientes a: 1) *iscR* (3500 pb) utilizando los iniciadores siguientes: ACT11F: 5' CTGTGCTGTTTGTGCTTG 3' y ACT11R: 5' CTTGCCTTTCAC CCATTC 3' (Figura 15 A). 2) La casete no polar (*aphA3*) con un gen marcador de resistencia a la kanamicina con los iniciadores siguientes: *aphA3*-1 (F): 5'CCGTGCG CATGACTAACTAGGAGGAATAAATG3' y *aphA3*-2 (R): 5'GCGTGCGCATCATTATTCC CTCCAGGTAC3' a partir del plásmido pJH1 (Caillaud *et al.*, 1987) con un tamaño de 850 pb (Figura 15 B). Posteriormente de la ligación del pGEM con el fragmento *iscR*-3500 pb se verificó mediante un corte con la enzima *SmaI* (sitio de restricción único presente en medio del gen *iscR*), esta digestión generó un fragmento de 6500 pb (Figura 15 C). Posteriormente se ligó a este fragmento, la casete *aphA3*, esta construcción fue verificada mediante la digestión con las enzimas *EcoRI* (Figura 15 D1) y *EcoRV* (Figura 15 D2). Con *EcoRV* logra sugerir la dirección de la ligación de la casete con respecto a la traducción del gen *iscR*: mismo sentido de gen genera tres fragmentos, 5722, 624 y 350 pb (Figura 15 D2).



**Figura 15.** Verificación de las distintas etapas de la elaboración del plásmido que porta la construcción genética para hacer el mutante nulo *iscR* de *D. dadantii* (*iscR::aphA3*). Los carriles con el marcador molecular corresponde a 1 Kb plus DNA ladder de Invitrogene® (1 Kb Plus). (A) carril 2= gen *iscR* (3500 pb) amplificado a partir del genoma de *D. dadantii*. (B) Carril 1 = amplificación de *aphA3* más el plásmido pJH1 (Caillaud *et al.*, 1987) que contiene la casete; Carril 2 = amplificación de *aphA3* (850 pb). (C) Carril 1 = digestión de pGEMiscR con la enzima *SmaI* (6500 pb); Carril 2 = plásmido pGEMiscR sin digerir. (D1) Carriles 2, 3 y 4 = Plásmidos pGEMiscR::aphA3 digeridos con *EcoR1*, generando dos fragmentos (3000 y 4350 pb). (D2) Carriles 1= Plásmidos pGEMiscR::aphA3 digeridos con *EcoRV*, generando 3 fragmentos de 5722, 624 y 350 pb; carril 2= Plásmido pGEMiscR::aphA3 sin digerir.

### 7.3. Mutagénesis por recombinación homóloga de la construcción) *pGEMiscR::aphA3* contenida en el plásmido pGEMiscR::aphA3 con el gen silvestre *iscR* del cromosoma de *D. dadantii*

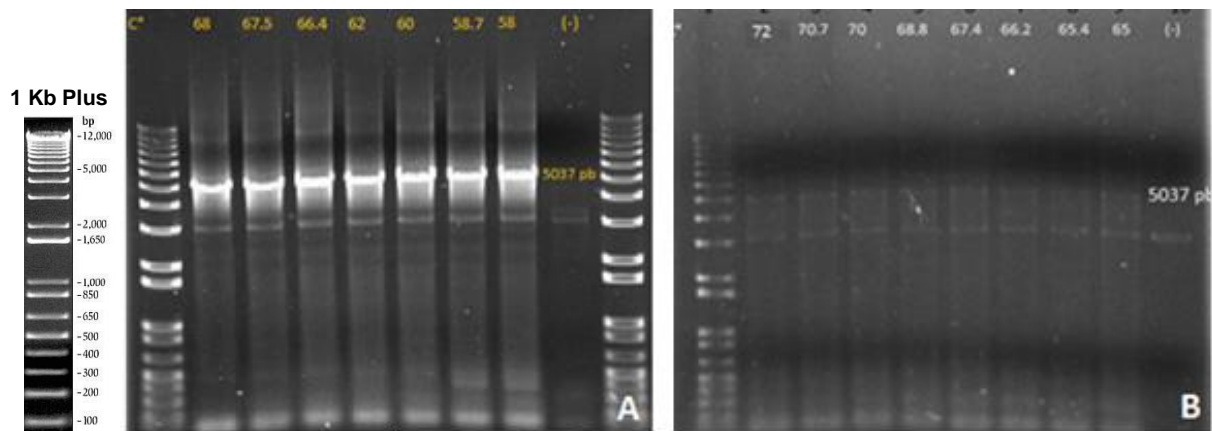
Se electroporaron 300 ng de la construcción pGEMiscR::aphA3 en 200 µL células de *D. dadantii*. Con el fin de iniciar la recombinación homóloga se seleccionó una cepa transformante de *D. dadantii* y se inoculó en medio LB, se cultivó en agitación constante a 30°C durante 24 horas. Pasado este tiempo se tomó inoculó del cultivo de toda la noche y se inoculó un nuevo medio, esto constituyó un subcultivo, así se llevó a cabo hasta el subcultivo 15, al momento de hacer las diluciones del subcultivo 15 y plaquearlas en LB/km, se observó que no hubo ningún crecimiento en las placas, lo que

sugería que la bacteria desechó el plásmido. Observado este fenotipo, se determinó empezar un nuevo subcultivo con una nueva bacteria transformada de *D. dadantii*, al momento de hacer las diluciones del subcultivo 5 y plaquearlas en LB/km, se observó que no hubo ningún crecimiento en las placas, por lo que se llegó a la hipótesis que la bacteria desechaba o degradaba el plásmido de manera muy rápida. Se tomó la decisión de empezar con un nuevo subcultivo pero ahora utilizando presión de selección sobre el plásmido con la kanamicina ( $5 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ ). Cada tercer subcultivo se suministraba la presión de selección y al mismo tiempo se realizó la siembra de las diluciones en placas de LB/km y posteriormente las réplicas en LB/amp para seleccionar recombinantes simples o dobles. El experimento se llevó a cabo hasta el subcultivo 40 sin obtener recombinantes, a la par también se realizaron subcultivos utilizando otra estrategia, esta vez se aplicó un leve estrés en los subcultivos mediante la aplicación de paraquat ( $5 \mu\text{M}$ ), de igual manera se suministró cada tercer día y buscó posibles recombinantes, el resultado fue negativo en la obtención de recombinantes de la mutación nula *iscR* en *Dickeya dadantii*.

Debido a los resultados obtenidos, se optó por utilizar otras cepas bacterianas de *D. dadantii* y *E. coli* con el fin de caracterizar la biogénesis de los centros de [Fe-S] en condiciones de estrés por carencia en hierro y estrés oxidativo. Las cepas bacterianas que se utilizaron fueron el mutante condicional *isc* de *D. dadantii*, dicha cepa carece del promotor *Isc* y del regulador transcripcional *iscR* (Rincon-Enriquez *et al.*, 2008) el sistema ISC de esta cepa mutante es inducido por la arabinosa, promoviendo así la expresión de los genes involucrados en la biogénesis de los centros [Fe-S]. Recordar que los genes *iscR* con las mutaciones puntuales de las cisteínas realizadas en este trabajo de igual manera se inducen con arabinosa. Esta cepa mutante (*isc* condicional) fue empleada en experimentos para evaluar el papel de proteínas IscR con cisteínas mutadas sobre la regulación en la biogénesis de los centros [Fe-S] en distintas concentraciones de estrés oxidativo y carencia en hierro así como para caracterizar el impacto de esas mutaciones en la virulencia en plantas de violeta africana.

#### 7.4. Mutagenesis por cambio de los residuos cisteínas por histidinas del gen *iscR* de *Dickeya dadantii*

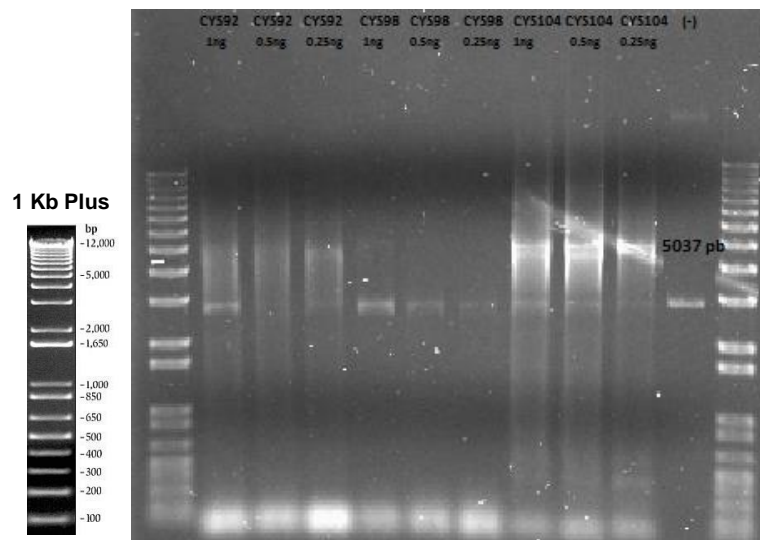
Se estandarizaron los distintos pasos para realizar las mutaciones puntuales de las cisteínas en el plásmido pBADiscR. Para los iniciadores con la mutación puntual se calculó su temperatura de fusión mediante gradientes de temperatura en reacciones de PCR, en la Figura 16 se muestra un ejemplo del resultado para los iniciadores que portaron la mutación en la cisteína 92 y 98. Para el resto de las cisteínas se realizó el mismo procedimiento y los resultados de las temperaturas de fusión se muestran en el Cuadro 6. Finalmente con el fin de introducir la menor cantidad de ADN templado, es decir pBADiscR sin mutaciones se realizó una PCR empleando distintas cantidades de templado y determinar la mínima concentración a colocar en la reacción PCR, los resultados son mostrados en el Cuadro 6 y Figura 17i.



**Figura 16.** Gradientes de temperatura para amplificación del pBADiscR (5037 pb) con las cisteínas 92 (A) y 98 (B) mutadas por histidinas. Los carriles con el marcador molecular corresponde a 1 Kb plus DNA ladder de Invitrogene® (1 Kb Plus). Los números arriba en cada carril indican las distintas temperaturas de fusión a las cuales se evaluó la reacción de PCR para cada par de iniciadores en cada cisteína. (-) = Reacción sin la TAQ-polimerasa, migración del templado (pBADiscR).

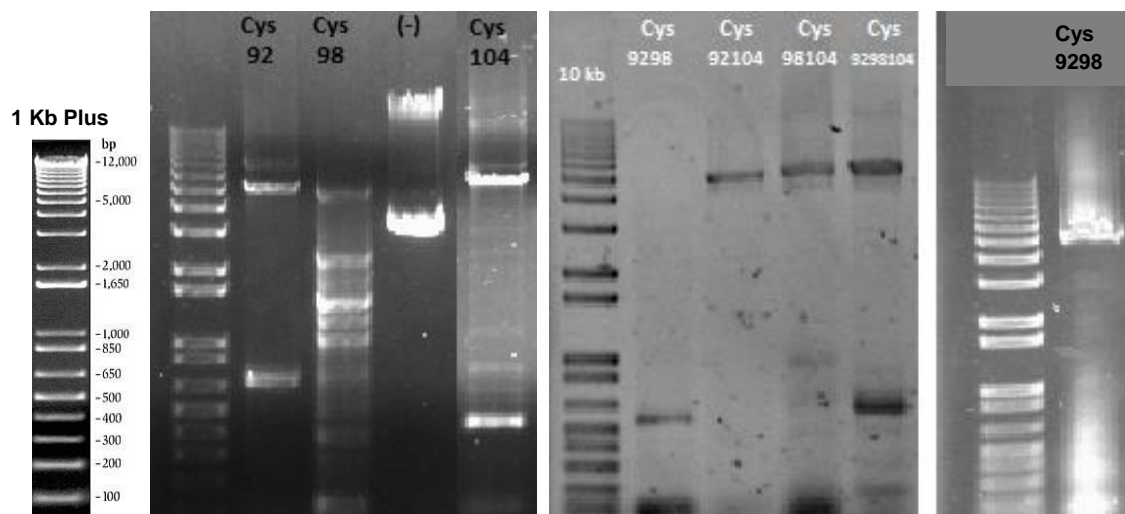
**Cuadro 6.** Condiciones óptimas para realizar la reacción de PCR y generar los plásmidos (pBADiscR<sub>-mutantes</sub>) con las distintas mutaciones en la proteína reguladora IscR de *D. dadantii*.

Mutación	Plásmido lineal generado por la reacción de PCR	Condiciones óptimas para PCR	
		Temperatura de fusión (°C)	Concentración de templado de ADN (ng $\mu\text{L}^{-1}$ )
Cys92	pBADiscR <sub>-92</sub>	60	0.25
Cys98	pBADiscR <sub>-98</sub>	72	0.50
Cys104	pBADiscR <sub>-104</sub>	59	0.25
Cys92-98	pBADiscR <sub>-92*98</sub>	68	0.25
Cys92-104	pBADiscR <sub>-92*104</sub>	68	0.25
Cys98-104	pBADiscR <sub>-98*104</sub>	68	0.25
Cys92-98-104	pBADiscR <sub>-92*98*104</sub>	68	0.25



**Figura 17i.** Determinación de la cantidad mínima de templado de ADN (pBADiscR, 5037 pb) para realizar la reacción de PCR de los plásmidos que portan las cisteínas 92, 98 y 104 mutadas por histidinas. Los carriles con el marcador molecular corresponde a 1 Kb plus DNA ladder de Invitrogene® (1 Kb Plus). Los números arriba en cada carril indican las mutaciones para las distintas cisteínas y abajo la concentración de templado en ng  $\mu\text{L}^{-1}$  de pBADiscR para la reacción de PCR.

A partir de los parámetros del Cuadro 6 se realizó la reacción de PCR para generar los plásmidos pBADiscR que portaron las mutaciones simples, dobles y triple de las cisteínas. El resultado se muestra en la Figura 17ii, a pesar de que se observan en dicho gel bandas inespecíficas amplificadas, dichas bandas al ligarlas fueron incapaces de seleccionarse por no portar el gen de resistencia a la ampicilina. Posterior a la ligación de los plásmidos amplificados se electroporaron en DH5 $\alpha$  y se seleccionaron colonias resistentes a ampicilina. Posteriormente los plásmidos de estas colonias se extrajeron y fueron secuenciados.

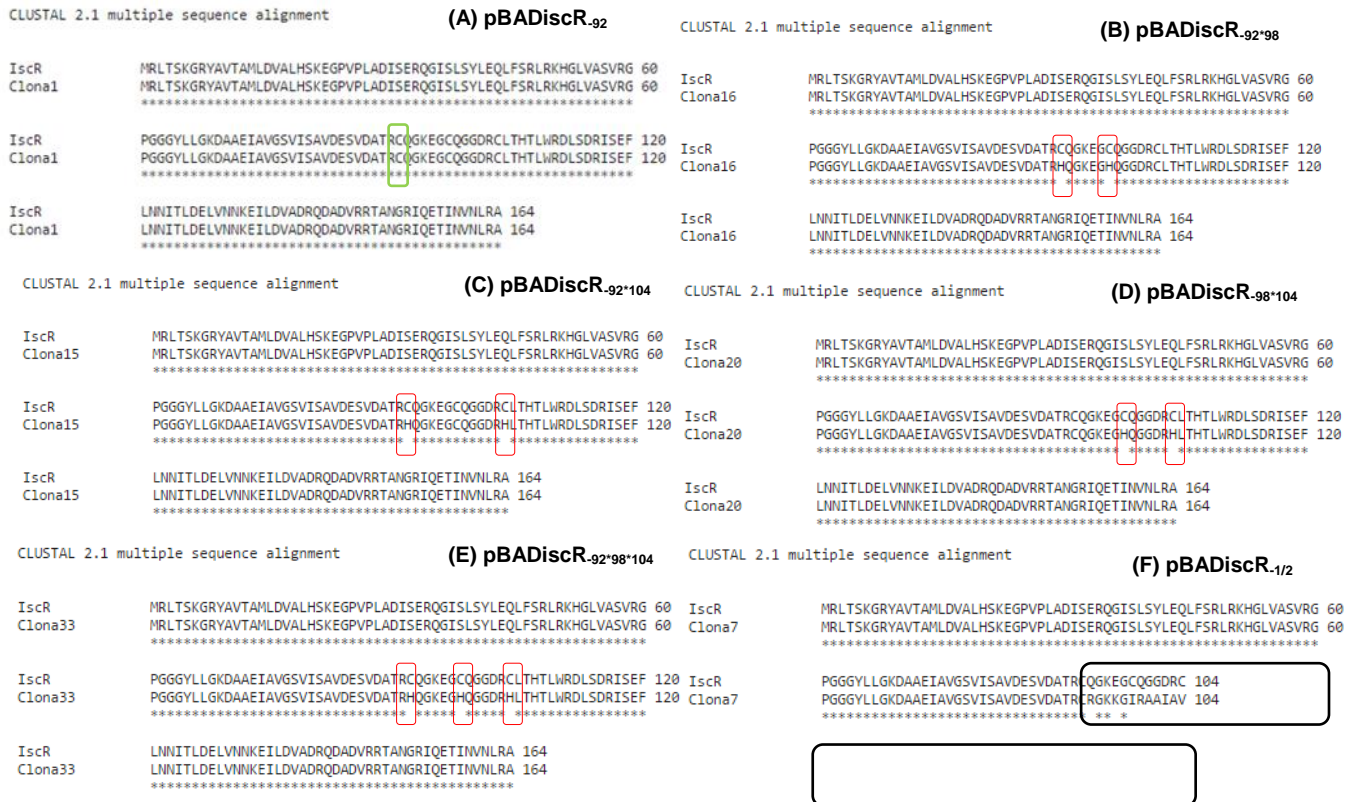


**Figura 17ii.** Obtención de los pBADiscR<sub>mutantes</sub> (con las distintas mutantes de las cisteínas) linearizados (5037 pb) por PCR por medio del Phusion Site-Directed Mutagenesis Kit (Thermo Scientific®). Los carriles con el marcador molecular corresponde a 1 Kb plus DNA ladder de Invitrogene® (1 Kb Plus). Las claves Cys-número indican la cisteína mutada a histidina. (-) = migración del plásmido pBADiscR.

La secuenciación de los plásmidos pBADiscR mutados fue realizada en dos etapas. En la primera etapa se secuenciaron cinco plásmidos obtenidos de distinta clona bacteriana. Los resultados de esta primera etapa mostraron que solo los plásmidos pBADiscR<sub>-92\*104</sub>, pBADiscR<sub>-98\*104</sub>, pBADiscR<sub>-92\*98</sub> y pBADiscR<sub>-92\*98\*104</sub> lograron construirse con las mutaciones deseadas (Cuadro 7, Figura 18).

**Cuadro 7.** Plásmidos pBADiscR que portan las diferentes mutaciones cisteínas (cambiadas a histidinas) en la proteína reguladora IscR de *D. dadantii*.

Mutación	Plásmido objetivo	Verificación de mutación por secuenciación (mutados / total)	
		Etapas 1	Etapas 2
Cys92	pBADiscR <sub>.92</sub>	0/5	0/5
Cys98	pBADiscR <sub>.98</sub>	0/5	0/5
Cys104	pBADiscR <sub>.104</sub>	0/5	0/5
<b>Cys92-98</b>	<b>pBADiscR<sub>.92*98</sub></b>	<b>0/5</b>	<b>3/5</b>
<b>Cys92-104</b>	<b>pBADiscR<sub>.92*104</sub></b>	<b>4/5</b>	--
<b>Cys98-104</b>	<b>pBADiscR<sub>.98*104</sub></b>	<b>4/5</b>	--
<b>Cys92-98-104</b>	<b>pBADiscR<sub>.92*98*104</sub></b>	<b>3/5</b>	--
Total de clonas secuencia		35	20
Total de clonas con mutaciones		11	3

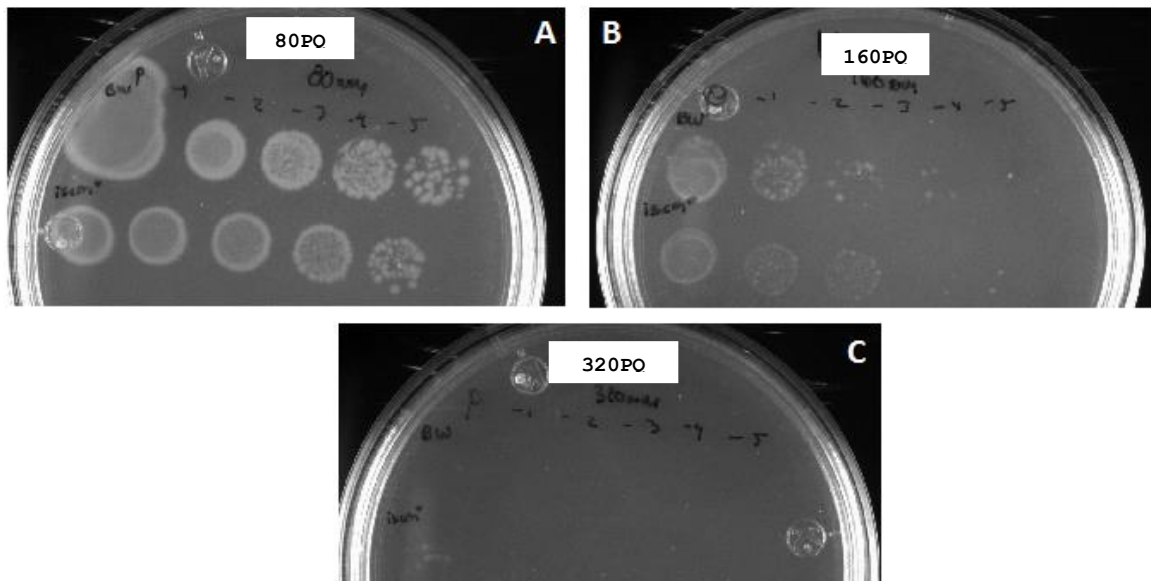


**Figura 18.** Comparación de la secuencia de la proteína IscR (164 residuos aminoácidos) con las proteínas IscR que portan cambios de los residuos cisteínas por histidinas en las posiciones

92, 98 o 104 (rectángulos en rojo) y una proteína IscR trucada en C-terminal (rectángulo en negro). (A) Plásmido sometido para cambiar C x H en la posición 92 (rectángulo verde) de IscR no presentó dicha mutación. (B-E) Plásmidos portando cambios C x H en varias posiciones (92, 98 o 104). (F) Plásmido portando una proteína truncada en la posición C-terminal (IscR<sub>-1/2</sub>).

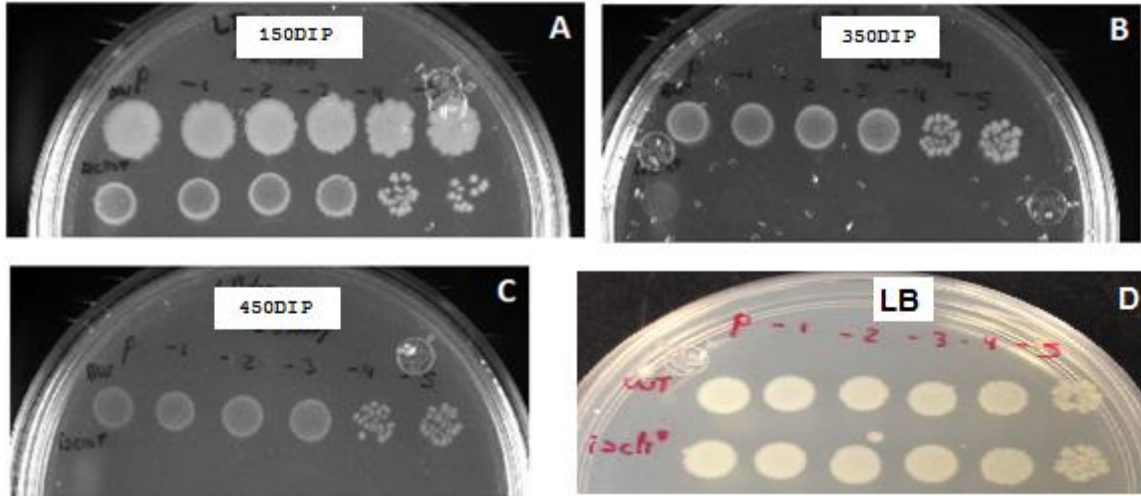
### 7.5. Caracterización fenotípica de las cepas silvestre K12 (WT) y mutante nulo *iscR*<sup>Δ</sup> de *E. coli* bajo condiciones de estrés oxidativo y carencia en hierro

Las Figuras 19 y 20 muestran que el mutante *iscR*<sup>Δ</sup> de *E. coli* presenta un fenotipo diferencial respecto a la cepa silvestre (WT) en estrés en carencia en hierro, lo cual ya ha sido reportado en otros estudios para *E. coli* (Giel *et al.* 2006). Un mutante *iscR*<sup>Δ</sup> desregula el operón *isc* y no activa a *suf* (Outten *et al.*, 2004; Justino *et al.*, 2005; Yeo *et al.*, 2006). Por lo que la ausencia de fenotipo bajo estrés oxidativo sugiere que las proteínas Isc pueden proporcionar los centros [Fe-S] suficientes para no manifestar alguna deficiencia como se observa en la Figura 19. Por otro lado, bajo estrés por carencia de hierro las proteínas Isc no son capaces de proporcionar los centros [Fe-S], a pesar de estar al máximo la expresión del sistema (Isc), de tal forma que la ausencia de expresión de *suf* (por no activación vía IscR) está directamente relacionada al fenotipo presentado en la Figura 20. La pregunta que ahora se tratará de abordar es sobre la capacidad que tiene IscR y las mutantes de las cisteínas proveniente del genoma *D. dadantii* para complementar este fenotipo en el mutante *iscR*<sup>Δ</sup> de *E. coli*.





**Figura 19.** Crecimiento de las cepas silvestre (WT) y mutante nulo *iscR*<sup>Δ</sup> de *E. coli* en medio rico (LB) en condiciones de estrés oxidativo de tipo superóxido provocado por a 0 (A), 80 (B), 160 (C) y 320 (D)  $\mu$ M de paraquat (PQ).

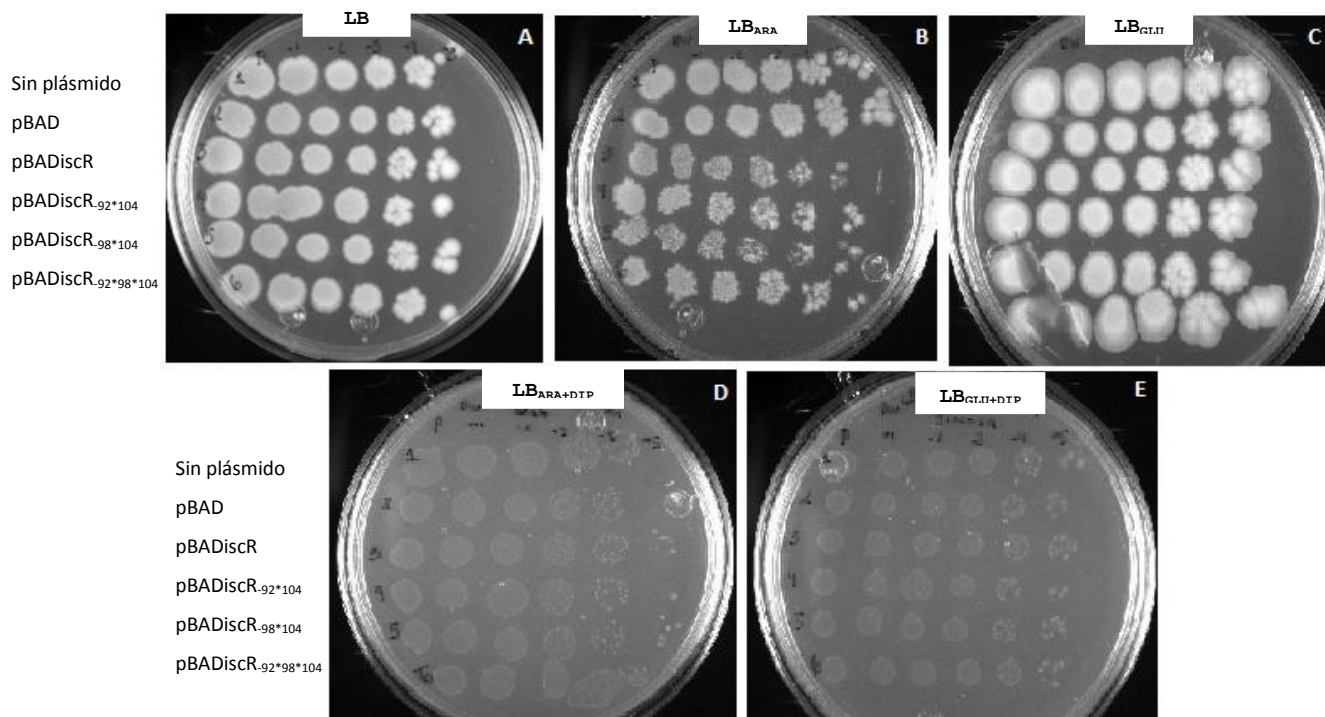


**Figura 20.** Crecimiento de las cepas silvestre (WT) y mutante nulo *iscR*<sup>Δ</sup> de *E. coli* en medio rico (LB) en condiciones de estrés por carencia en hierro provocado por a 0  $\mu$ M (A), 150  $\mu$ M (B), 350  $\mu$ M (C) y 450  $\mu$ M (D) de 2,2'dipyridil (DIP).

### 7.6. Caracterización fenotípica del efecto de las proteínas IscR portando las mutaciones cisteínas en la cepa silvestre K12 (WT) y mutante nulo *iscR*<sup>Δ</sup> de *E. coli* bajo condiciones de estrés por carencia en hierro

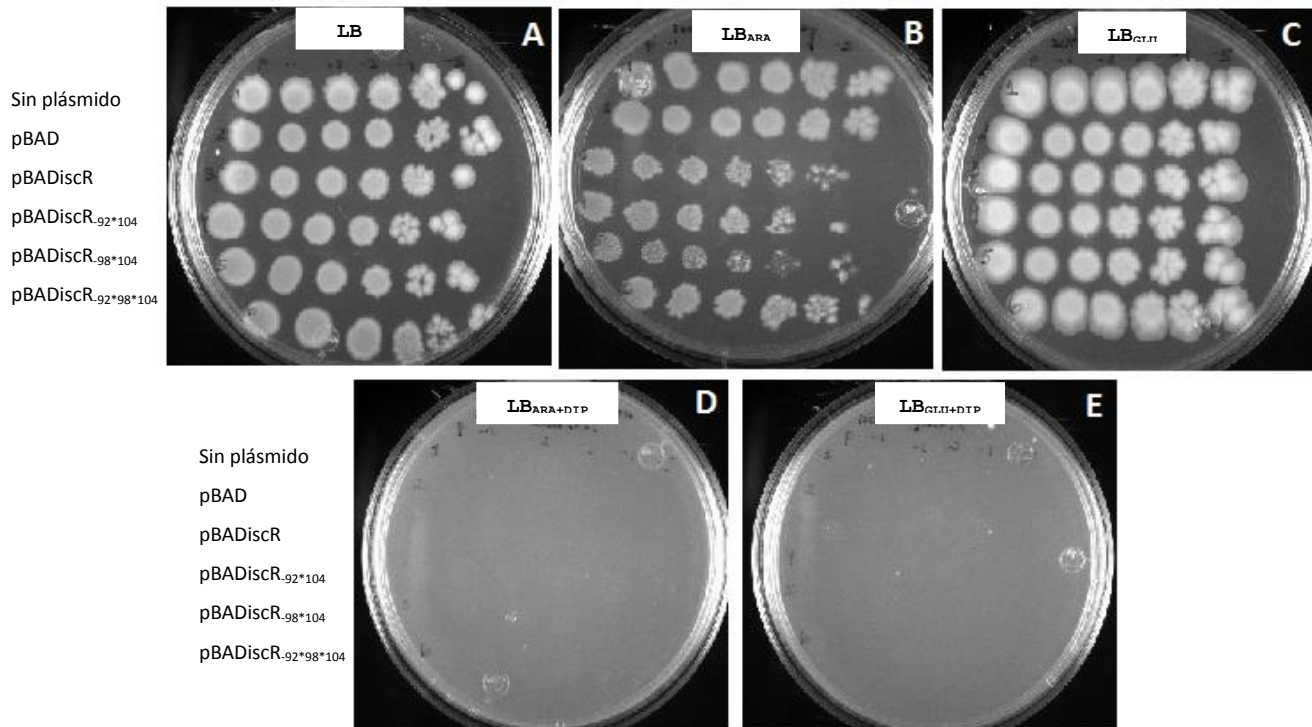
Con el fin de observar posibles efectos tóxicos de la expresión de las proteínas IscR (silvestre o mutantes cisteínas) se realizaron pruebas de complementación de cuatro proteínas IscR (IscR, IscR<sub>-92\*104</sub>, IscR<sub>-98\*104</sub> e IscR<sub>-92\*98\*104</sub>) en la cepa silvestre (WT) en condiciones de carencia en hierro, los resultados de esta prueba se presentan en la Figura 21. En esta figura es claro que cuando se expresan (LB<sub>ARA</sub>) las proteínas IscR hay un efecto negativo en el crecimiento de la cepa WT de mayor a menor grado en la proteína silvestre (IscR) a la proteína con las tres cisteínas mutadas (IscR<sub>-92\*98\*104</sub>) (Figura 21B), lo cual sugiere una posible toxicidad celular, sin embargo este fenotipo no tiene prácticamente efecto cuando se agregan condiciones de carencia de hierro en el medio (Figura 21 D). Cuando se evaluó la complementación fenotípica en el mutante nulo *iscR*<sup>Δ</sup> se encontró que también había un posible efecto de toxicidad celular, similar al observado en la cepa WT (Figura 22B). Sin embargo, cuando el mutante nulo *iscR*<sup>Δ</sup>

es crecido bajo condiciones de escasez en hierro y se expresan las proteínas IscR silvestre o mutadas (IscR, IscR<sub>-92\*104</sub>, IscR<sub>-98\*104</sub> e IscR<sub>-92\*98\*104</sub>) con arabinosa (Figura 22D) las células bacterianas crecen hasta la dilución 10<sup>-5</sup> (las colonias bacterianas fueron muy pequeñas por lo cual no se alcanza a apreciar en esta figura, mientras que al reprimir la expresión de estas proteínas con glucosa la células son incapaces de crecer sobre el medio con dypiridil (carencia en hierro) (Figura 22E). Esto sugiere que la presencia de IscR permite el crecimiento celular por la activación de la expresión de las proteínas del sistema SUF como lo muestran Rincon-Enriquez *et al.* (2008) en sus experimentos de la cuantificación del *sufA* por PCR cuantitativa en tiempo real. Resulta importante resaltar que aun las proteínas que portan las mutaciones de las cisteínas (IscR<sub>-92\*104</sub>, IscR<sub>-98\*104</sub> e IscR<sub>-92\*98\*104</sub>) son capaces de complementar el fenotipo de carencia en hierro, lo cual es explicado dado que la regulación del operón *suf* es mediado por IscR en su forma apo (Outten *et al.*, 2004; Justino *et al.*, 2005; Yeo *et al.*, 2006), lo cual las proteínas IscR<sub>-92\*104</sub>, IscR<sub>-98\*104</sub> e IscR<sub>-92\*98\*104</sub> muy probablemente nunca alcanzaran su holoforma aun en presencia de abundancia de centros [Fe-S] en el citoplasma.



**Figura 21.** Efecto de proteínas IscR silvestre o mutantes expresadas (arabinosa, ARA) o reprimidas (glucosa, GLU) sobre el crecimiento de la cepa silvestre (WT) de *E. coli* en medio rico (LB) en

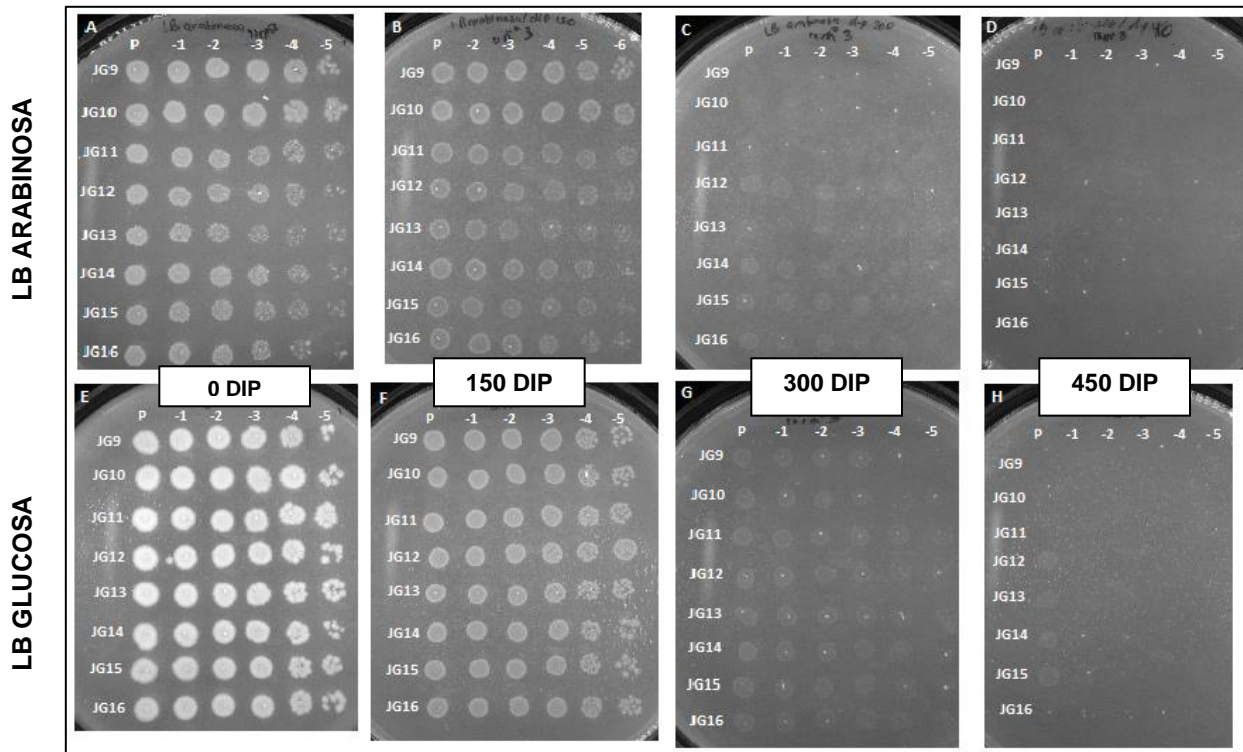
condiciones de estrés por carencia en hierro provocado por 450  $\mu$ M de 2,2'dipyridil (DIP).



**Figura 22.** Efecto de proteínas IscR silvestre o mutantes expresadas (arabinosa, ARA) o reprimidas (glucosa, GLU) sobre el crecimiento de la cepa *iscR*<sup>Δ</sup> de *E. coli* en medio rico (LB) en condiciones de estrés por carencia en hierro provocado por 450  $\mu$ M de 2,2'dipyridil (DIP).

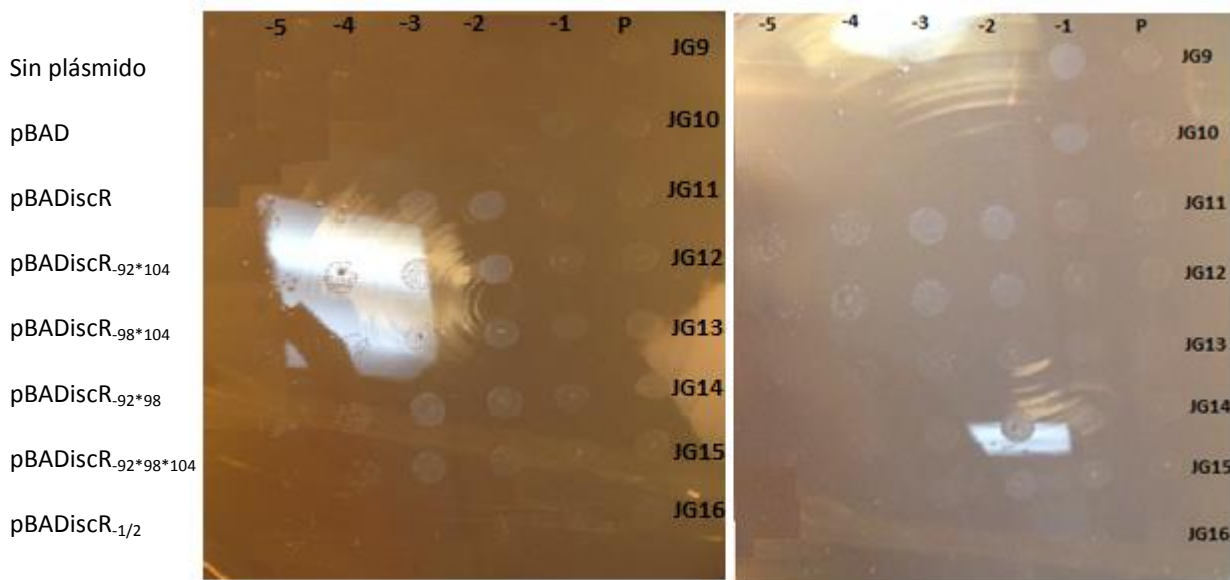
Con el fin de tener mayor presión de las pruebas de complementación fenotípica en el mutantes *iscR*<sup>Δ</sup> en condiciones de carencia en hierro (provocado por el dipyridil) con todas las proteínas IscR (IscR, IscR<sub>92\*98</sub>, IscR<sub>92\*104</sub>, IscR<sub>98\*104</sub>, IscR<sub>92\*98\*104</sub> e IscR<sub>1/2</sub>) se realizó una prueba con todos los controles. Los resultados son presentados en las Figuras (23 y 24). En la Figura 23, se repite prácticamente los resultados observados previamente, es decir, bajo estrés por carencia en hierro (450  $\mu$ M de dipyridil) todas las proteínas IscR (IscR, IscR<sub>92\*98</sub>, IscR<sub>92\*104</sub>, IscR<sub>98\*104</sub> e IscR<sub>92\*98\*104</sub>) complementan el fenotipo del mutante *iscR*<sup>Δ</sup> de *E. coli*, excepto para la proteína IscR truncada (IscR<sub>1/2</sub>), la cual es incapaz de complementar el crecimiento del mutante nulo bajo estrés por carencia en hierro (Figura 23D y 24). Finalmente cuando se reprime la expresión de las proteínas IscR (IscR, IscR<sub>92\*98</sub>, IscR<sub>92\*104</sub>, IscR<sub>98\*104</sub>, IscR<sub>92\*98\*104</sub> e IscR<sub>1/2</sub>) no se

presenta complementación del crecimiento bacteriano bajo condiciones de carencia en hierro (Figura 23H). Resulta importante señalar que en la Figura 24 se presenta a detalle el crecimiento mostrado en la Figura 23D, en la cual las colonias bacterianas son pequeñas, por lo cual no es posible observarlas claramente en esta figura.



**Figura 23.** Efecto de proteínas *IscR* silvestre o mutantes expresadas (arabinosa, ARA) o reprimidas (glucosa, GLU) sobre el crecimiento de la cepa *iscR*<sup>Δ</sup> de *E. coli* en medio rico (LB) en condiciones de estrés por carencia en hierro provocado por 0, 150, 300 y 450  $\mu\text{M}$  de 2,2' dipyridil (DIP). *iscR*<sup>Δ</sup> de *E. coli* con plásmidos: JG9 = Sin plásmido. JG10 = pBAD. JG11 = pBADiscR. JG12 = pBADiscR-<sub>92</sub>\*104. JG13 = pBADiscR-<sub>98</sub>\*104. JG14 = pBADiscR-<sub>92</sub>\*98. JG15 = pBADiscR-<sub>92</sub>\*98\*104. JG16 = pBADiscR-<sub>1/2</sub>.

En la Figura 24 se muestra también que la proteína truncada (*IscR*<sub>-1/2</sub>) no complementa el crecimiento bajo estrés por carencia en hierro, el fenotipo de *IscR*<sub>-1/2</sub> es similar al observado en el mutante *iscR*<sup>Δ</sup> con o sin él plásmido pBAD, lo cual hipotetizaría que no se están formando los dímeros necesarios para la regulación genética para activar al operón *suf* mediante la secuencia proteica tipo II (Giel *et al.*, 2006).

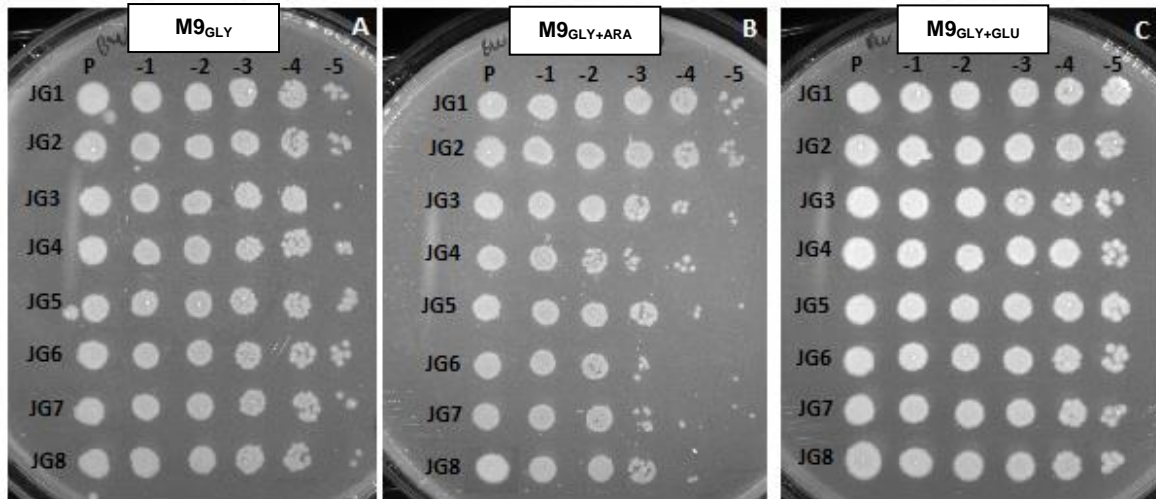


**Figura 24.** Efecto de proteínas IscR silvestre o mutantes expresadas (arabinosa, ARA) sobre el crecimiento de la cepa *iscR*<sup>Δ</sup> de *E. coli* en medio rico (LB) en condiciones de estrés por carencia en hierro provocado por 450  $\mu$ M de 2,2'dipyridil (DIP).

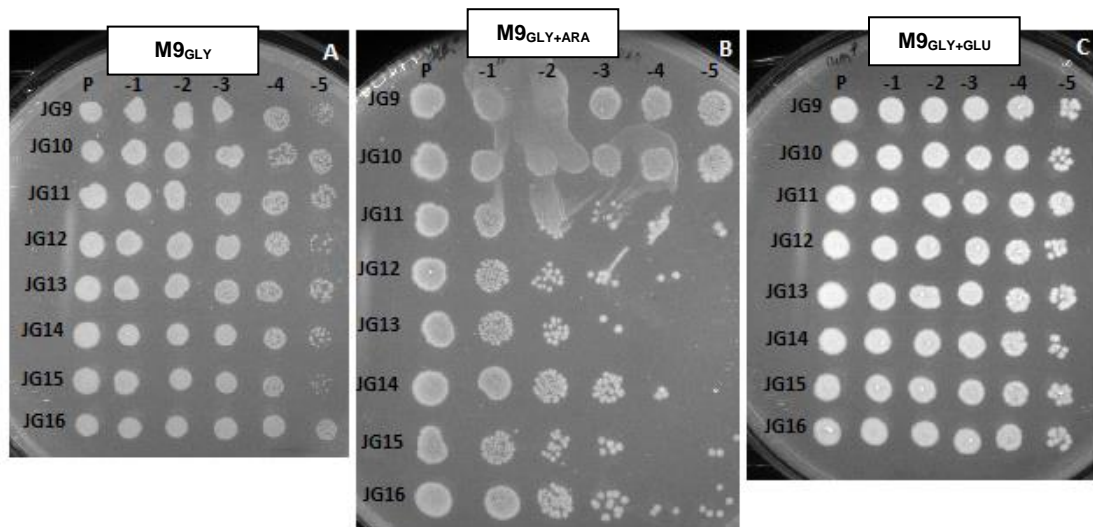
### 7.7. Caracterización fenotípica del efecto de las proteínas IscR portando las mutaciones cisteínas en la cepa silvestre K12 (WT) y mutante nulo *iscR*<sup>Δ</sup> de *E. coli* en condiciones de crecimiento en medio mínimo

Una célula bacteriana en condiciones de crecimiento en medio con sales y una sola fuente de carbono (por ejemplo glicerol) tiene que sintetizar todos sus requerimientos a partir de las sales y empleando la energía de la fuente de energética, en caso de presentar alguna deficiencia en el crecimiento podría indicar un fenotipo de auxotrofias, con esta meta se colocaron las cepas silvestre (WT) y mutante nulo *iscR*<sup>Δ</sup> de *E. coli* en medio mínimo. En las Figuras 25 y 26 se muestran los resultados para cepas WT e *iscR*<sup>Δ</sup>, respectivamente. De manera similar al crecimiento en medio rico (LB) para ambas cepas, se observa que la expresión de las proteínas IscR (IscR, IscR<sub>-92\*98</sub>, IscR<sub>-92\*104</sub>, IscR<sub>-98\*104</sub>, IscR<sub>-92\*98\*104</sub> e IscR<sub>-1/2</sub>) tiene cierto grado de toxicidad celular, dado que hay una disminución del crecimiento bacteriano en las últimas dos-cuatro diluciones, lo cual es revertido cuando se reprime la expresión de estas proteínas mediante la adición de glucosa en el medio (Figuras 25C y 26C). De esta manera, no se detectaron auxotrofias o algún otro fenotipo del mutante nulo *iscR*<sup>Δ</sup> bajo estas condiciones de

crecimiento bacteriano. La biogénesis de los centros [Fe-S] en condiciones de nutrimentos mínimos según estos resultados, se sugiere que el sistema ISC es suficiente para satisfacer de centros [Fe-S] a los requerimientos celulares (Figura 26C).



**Figura 25.** Efecto de proteínas IscR silvestre o mutantes expresadas (arabinosa, ARA) o reprimidas (glucosa, GLU) sobre el crecimiento de la cepa silvestre (WT) de *E. coli* en medio mínimo (M9 glicerol, GLY). WT de *E. coli* con plásmido: JG1 = Sin plásmido. JG2 = pBAD. JG3 = pBADiscR. JG4 = pBADiscR-<sub>92\*104</sub>. JG5 = pBADiscR-<sub>98\*104</sub>. JG6 = pBADiscR-<sub>92\*98</sub>. JG7 = pBADiscR-<sub>92\*98\*104</sub>. JG8 = pBADiscR-<sub>1/2</sub>.

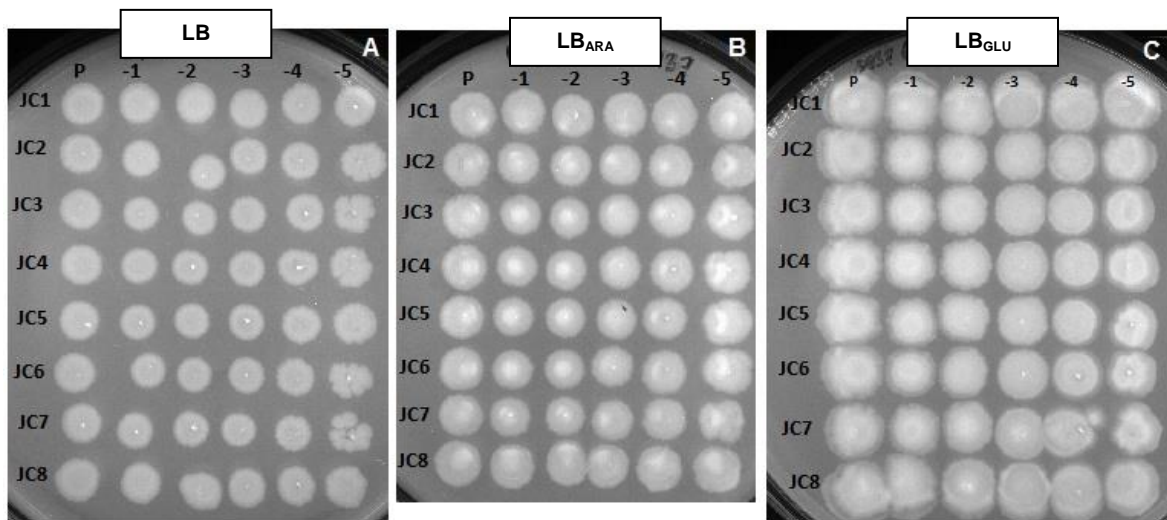


**Figura 26.** Efecto de proteínas IscR silvestre o mutantes expresadas (arabinosa, ARA) o reprimidas (glucosa, GLU) sobre el crecimiento del mutante *iscR*<sup>Δ</sup> de *E. coli* en medio mínimo (M9 glicerol, GLY). *iscR*<sup>Δ</sup> de *E. coli* con plásmidos: JG9 = Sin plásmido. JG10 = pBAD. JG11 = pBADiscR. JG12 = pBADiscR-<sub>92\*104</sub>. JG13 = pBADiscR-<sub>98\*104</sub>. JG14 = pBADiscR-<sub>92\*98</sub>. JG15 = pBADiscR-<sub>92\*98\*104</sub>. JG16 =

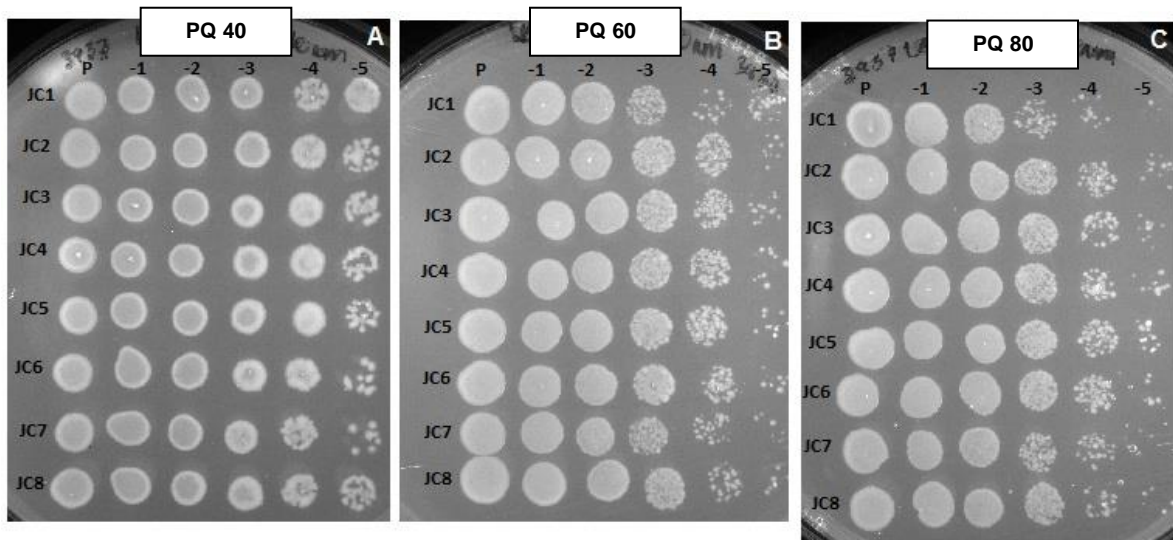
pBADiscR.<sub>1/2</sub>.

### 7.8. Caracterización fenotípica del efecto de las proteínas IscR portando las mutaciones cisteínas en la cepa silvestre 3937 (WT) y mutante condicional *isc* de *Dickeya dadantii* bajo condiciones de estrés oxidativo

En la cepa WT de *D. dadantii* la expresión de las proteínas silvestres o mutantes de IscR con o sin estrés oxidativo (paraquat) no mostró algún fenotipo asociado (Figuras 27, 28). Esta ausencia de fenotipos es debida probablemente debido a dos aspectos implicados en el experimento, 1) al ser la cepa WT y poseer su propio gen *iscR* en cierta medida puede tratar de regular su expresión sobre su cromosoma; 2) dado que las proteínas IscR expresadas en los plásmidos que provienen de *D. dadantii* no provocan toxicidad celular como sucede en el caso de *E. coli* (resultados previos). Esto último sugiere que las proteínas expresadas IscR podrían estar en su forma apo, por lo cual estarían activando la expresión de las proteínas SUF, por lo que estas proteínas fenotípicamente no provocan algún fenotipo visible y tampoco alguna toxicidad celular.



**Figura 27.** Efecto de proteínas IscR silvestre o mutantes expresadas (arabinosa, ARA) o reprimidas (glucosa, GLU) sobre el crecimiento de la cepa silvestre 3937 (WT) de *D. dadantii* en medio rico (LB). 3937 (WT) de *D. dadantii* con plásmidos: JC1 = Sin plásmido. JC2 = pBAD. JC3 = pBADiscR. JC4 = pBADiscR.<sub>92\*104</sub>. JC5 = pBADiscR.<sub>98\*104</sub>. JC6 = pBADiscR.<sub>92\*98</sub>. JC7 = pBADiscR.<sub>92\*98\*104</sub>. JC8 = pBADiscR.<sub>1/2</sub>.

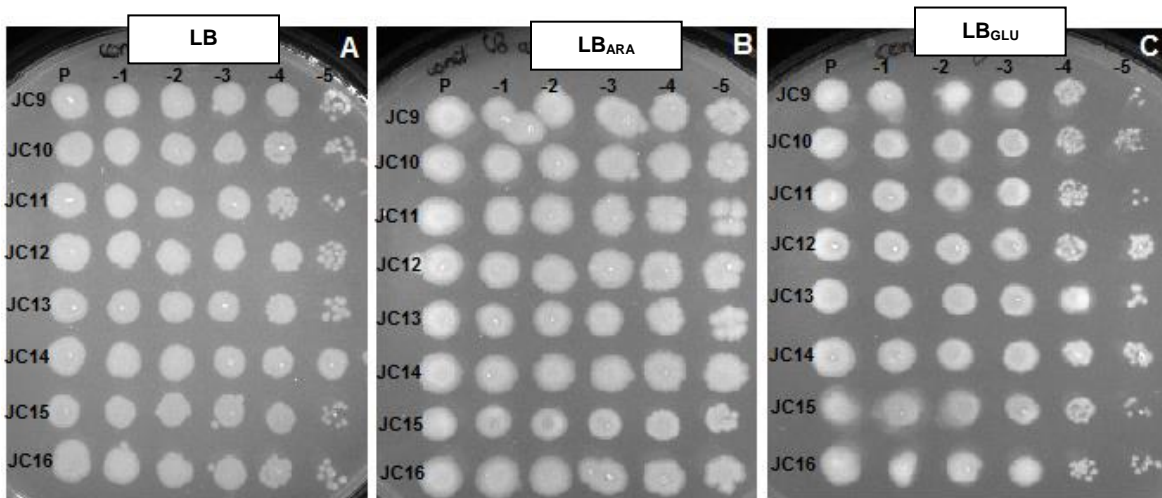


**Figura 28.** Efecto de proteínas IscR silvestre o mutantes expresadas (arabinosa, ARA) sobre el crecimiento de la cepa silvestre 3937 (WT) de *D. dadantii* en medio rico (LB) con estrés oxidativo provocado por 40, 60 y 80  $\mu\text{M}$  de paraquat (PQ). 3937 (WT) de *D. dadantii* con plásmidos: JC1 = Sin plásmido. JC2 = pBAD. JC3 = pBADiscR. JC4 = pBADiscR<sub>-92\*104</sub>. JC5 = pBADiscR<sub>-98\*104</sub>. JC6 = pBADiscR<sub>-92\*98</sub>. JC7 = pBADiscR<sub>-92\*98\*104</sub>. JC8 = pBADiscR<sub>-1/2</sub>.

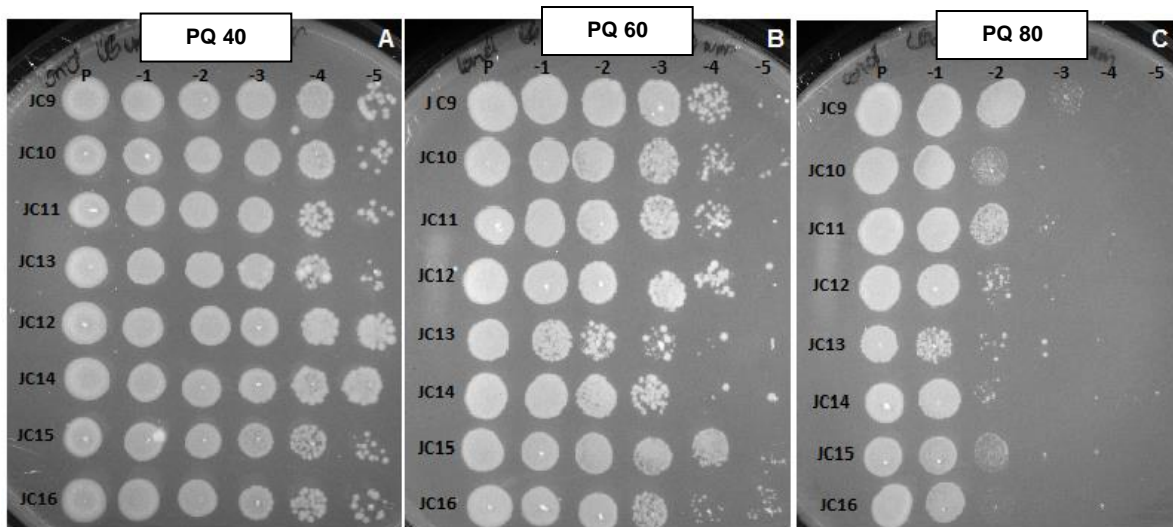
Respecto a la cepa mutante condicional *isc* de *D. dadantii* la expresión (más arabinosa, ARA) de las proteínas silvestres o mutantes de IscR en medio rico no mostró algún fenotipo (Figura 29B), sin embargo cuando se reprime (más glucosa, GLU) el sistema *isc* y proteínas IscR (contenidas en el plásmido pBAD) se observa un crecimiento de las colonias bacterianas similar entre las cepas con el plásmido vacío (JC10) y la que contiene el plásmido con la proteína IscR (JC11), sin embargo cuando están presentes los plásmidos con pBADiscR<sub>-92\*104</sub> (JC12) o pBADiscR<sub>-92\*98</sub> (JC14) el mutante *isc* presenta un crecimiento mayor de las colonias, esta diferencia podría ser explicada por un escape en la expresión de las proteínas del plásmido pBAD (a pesar que esta reprimido el promotor), suponiendo que sucede esto y como el operón *isc* esta reprimido (GLU) entonces las proteínas IscR<sub>-92\*104</sub> e IscR<sub>-92\*98</sub> podrían estar activando levemente el operón *suf*, lo cual confiere una leve mejoría del crecimiento de las colonias bacterianas en ambas cepas (Figura 29C). El mutante condicional *isc* en



condiciones de estrés oxidativo (paraquat) solo crece cuando se expresa las proteínas del sistema ISC (más arabinosa) (Rincon-Enriquez *et al.*, 2008), cuando se complementa el mutante condicional *isc* con IscR en medio con glucosa (reprimiendo *isc* del cromosoma) y paraquat, la cepa solo es capaz de recuperarse en dos diluciones decimales su crecimiento respecto a una cepas silvestre (Rincon-Enriquez, 2010), lo cual sugiere que las proteínas SUF no están implicadas en el crecimiento de *Dickeya* en condiciones de estrés por paraquat. En comparación, en este estudio, el mutante condicional *isc* con estrés oxidativo (paraquat) cuando se expresan las proteínas mutantes IscR tienen un efecto sobre el crecimiento de la cepa (Figuras 30B). A 40  $\mu\text{M}$  de paraquat se observa algo parecido a lo comentado para la Figura 29C, lo cual sugiere que las proteínas IscR<sub>-92\*104</sub> (JC12) e IscR<sub>-92\*98</sub> (JC14) podrían ser afines por la zona reguladora del operón *suf*, lo cual permite un crecimiento mayor de las colonias de *Dickeya* en estrés oxidativo bajo (Figura 30A). Cuando se aumenta el estrés oxidativo a 60  $\mu\text{M}$  de paraquat se observa que la cepas JC13 (*isc*<sup>-</sup> / pBADiscR<sub>-98\*104</sub>) comparada con la JC11 (*isc*<sup>-</sup> / pBADiscR) muestra un menor crecimiento de la bacteria (Figura 30B). Este fenotipo sugiere tres hipótesis: **1)** las proteínas IscR<sub>-98\*104</sub> (expresadas por la activación del promotor por la arabinosa en el pBADiscR<sub>-98\*104</sub>) tienen una interacción negativa (competición, antagonismo, etc) con las proteínas del sistema ISC (expresadas por la activación por el promotor por arabinosa del operón *isc* del cromosoma de *Dickeya*); **2)** la interacción negativa sucede a nivel de proteínas ISC y de las proteínas que IscR<sub>-98\*104</sub> podría estar activando, es decir proteínas SUF; **3)** la sobre expresión de proteínas de los sistemas ISC y SUF podría tener un efecto de toxicidad celular. Resultados similares se generaron en un trabajo realizado por Rincón-Enríquez *et al.* (2008) en el que se evaluó el efecto del estrés oxidativo en mutaciones de genes del operón Isc en *D. dadantii* en el que encontraron fenotipos deficientes a crecimiento bacteriano por efecto del estrés oxidativo, atribuido a la incapacidad de la célula para realizar la biosíntesis de centros [Fe-S] y adaptación a estas condiciones ambientales. Para poder descartar alguna de estas hipótesis deberán realizarse experimentos para cuantificar la expresión de las proteínas SUF y/o IscR<sub>-98\*104</sub>.



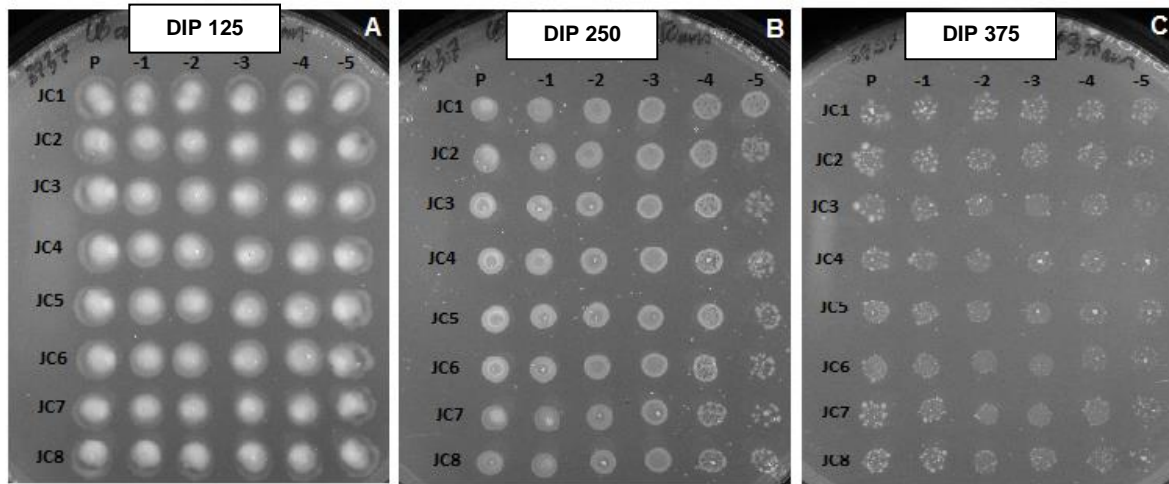
**Figura 29.** Efecto de proteínas IscR silvestre o mutantes expresadas (arabinosa, ARA) o reprimidas (glucosa, GLU) sobre el crecimiento del mutante condicional *isc* de *D. dadantii* en medio rico (LB). Mutante condicional *isc* de *D. dadantii* con plásmidos: JC9 = Sin plásmido. JC10 = pBAD. JC11 = pBADiscR. JC12 = pBADiscR<sub>-92\*104</sub>. JC13 = pBADiscR<sub>-98\*104</sub>. JC14 = pBADiscR<sub>-92\*98</sub>. JC15 = pBADiscR<sub>-92\*98\*104</sub>. JC16 = pBADiscR<sub>-1/2</sub>.



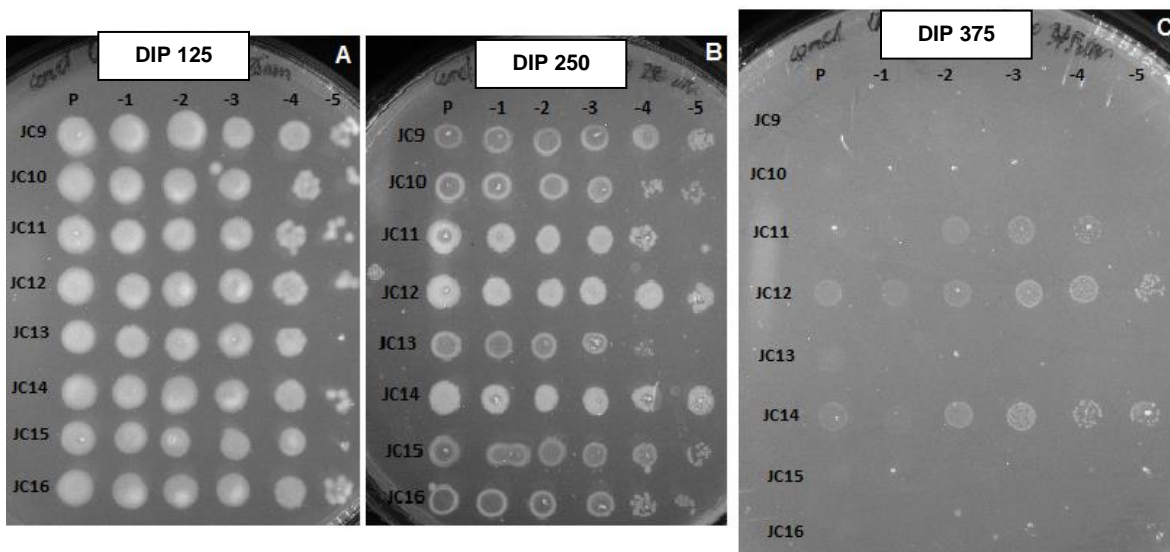
**Figura 30.** Efecto de proteínas IscR silvestre o mutantes expresadas (arabinosa, ARA) sobre el crecimiento del mutante condicional *isc* de *D. dadantii* en medio rico (LB) con estrés oxidativo provocado por 40, 60 y 80  $\mu$ M de paraquat (PQ). Mutante condicional *isc* de *D. dadantii* con plásmidos: JC9 = Sin plásmido. JC10 = pBAD. JC11 = pBADiscR. JC12 = pBADiscR<sub>-92\*104</sub>. JC13 = pBADiscR<sub>-98\*104</sub>. JC14 = pBADiscR<sub>-92\*98</sub>. JC15 = pBADiscR<sub>-92\*98\*104</sub>. JC16 = pBADiscR<sub>-1/2</sub>.

### **7.9. Caracterización fenotípica del efecto de las proteínas IscR portando las mutaciones cisteínas en la cepa silvestre 3937 (WT) y mutante condicional *isc* de *Dickeya dadantii* bajo condiciones de estrés por carencia en hierro**

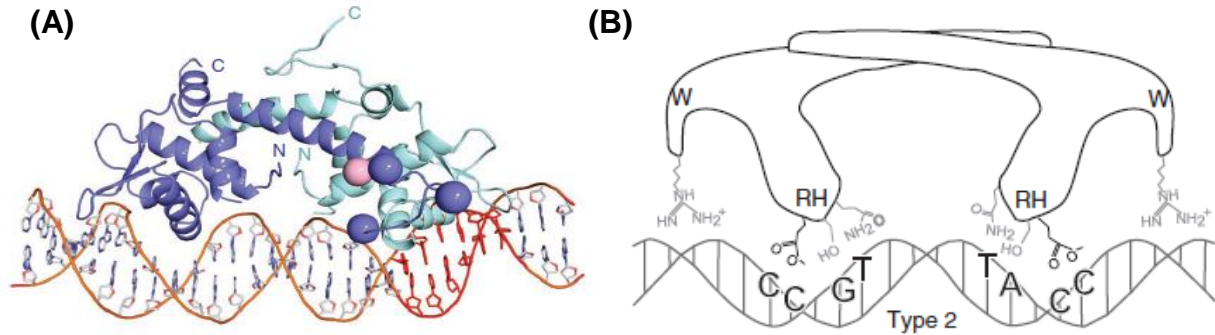
El crecimiento del mutante condicional *isc* de *Dickeya* en condiciones limitantes de hierro (dypiridil) solo es posible cuando se activa el operón *suf* vía la proteína IscR en su forma apo, es decir sin su centro [Fe-S] (Rincon-Enriquez *et al.*, 2008; Rincon-Enriquez, 2010). Es decir, las proteínas del sistema ISC no están implicadas en el crecimiento de *Dickeya* bajo condiciones de estrés por dypiridil. Los resultados de este estudio muestran que en la cepa silvestre 3937 (WT) la expresión en medio con arabinosa de las proteínas silvestre o mutantes IscR (contenidas en el plásmido pBAD) no tienen efecto sobre su crecimiento en condiciones por carencia en hierro en el medio de cultivo (Figura 31). Sin embargo, como se espera en el mutante condicional *isc* a una concentración 250 y 375  $\mu\text{M}$  de dypiridil se nota que las proteínas IscR, IscR-<sub>92\*104</sub>, e IscR-<sub>92\*98</sub>, promueven mejor crecimiento (Figura 32B, C). En particular, a 375  $\mu\text{M}$  de dypiridil solo esas proteínas (IscR, IscR-<sub>92\*104</sub>, e IscR-<sub>92\*98</sub>) permiten el crecimiento del mutante condicional (Figura 32C), específicamente es importante resaltar que IscR-<sub>92\*104</sub>, e IscR-<sub>92\*98</sub> muestran una mejor complementación fenotípica que la proteína silvestre IscR. Este resultado sugiere la hipótesis que las cisteínas cambiadas por histidinas en la posición 92 y 98 de la proteína IscR proporcionan cambios conformacionales a estas proteínas que permiten mayor afinidad por la zona reguladora tipo 2 reconocida por IscR. Por ejemplo, Rajagopalan *et al.* (2013) Realizaron un estudio donde muestra la estabilización de apo-IscR con mutaciones de las cisteínas por alaninas dado que daba mayor estabilidad a la interacción entre esta proteína y la región tipo 2 de ADN del promotor del gen *hya* lo cual permitió cristalizar la interacción proteína-ADN y estudiar a detalle cómo se llevaba a cabo la esta regulación genética (Figura 33). Del mismo modo en las proteínas IscR-<sub>92\*104</sub>, e IscR-<sub>92\*98</sub> podría estar pasando lo mismo, por lo cual se nota un fenotipo de complementación con mayor crecimiento de las colonias bacterianas.



**Figura 31.** Efecto de proteínas LscR silvestre o mutantes expresadas (arabinosa, ARA) sobre el crecimiento de la cepa silvestre 3937 de *D. dadantii* en medio rico (LB) con estrés en carencia en hierro de 125, 250 y 375  $\mu\text{M}$  de 2',Dipyridil (DIP). 3937 (WT) de *D. dadantii* con plásmidos: JC1 = Sin plásmido. JC2 = pBAD. JC3 = pBADiscR. JC4 = pBADiscR<sub>-92\*104</sub>. JC5 = pBADiscR<sub>-98\*104</sub>. JC6 = pBADiscR<sub>-92\*98</sub>. JC7 = pBADiscR<sub>-92\*98\*104</sub>. JC8 = pBADiscR<sub>-1/2</sub>.



**Figura 32.** Efecto de proteínas LscR silvestre o mutantes expresadas (arabinosa, ARA) sobre el crecimiento del mutante condicional *isc* de *D. dadantii* en medio rico (LB) con estrés en carencia en hierro de 125, 250 y 375  $\mu\text{M}$  de 2',Dipyridil (DIP). Mutante condicional *isc* de *D. dadantii* con plásmidos: JC9 = Sin plásmido. JC10 = pBAD. JC11 = pBADiscR. JC12 = pBADiscR<sub>-92\*104</sub>. JC13 = pBADiscR<sub>-98\*104</sub>. JC14 = pBADiscR<sub>-92\*98</sub>. JC15 = pBADiscR<sub>-92\*98\*104</sub>. JC16 = pBADiscR<sub>-1/2</sub>.

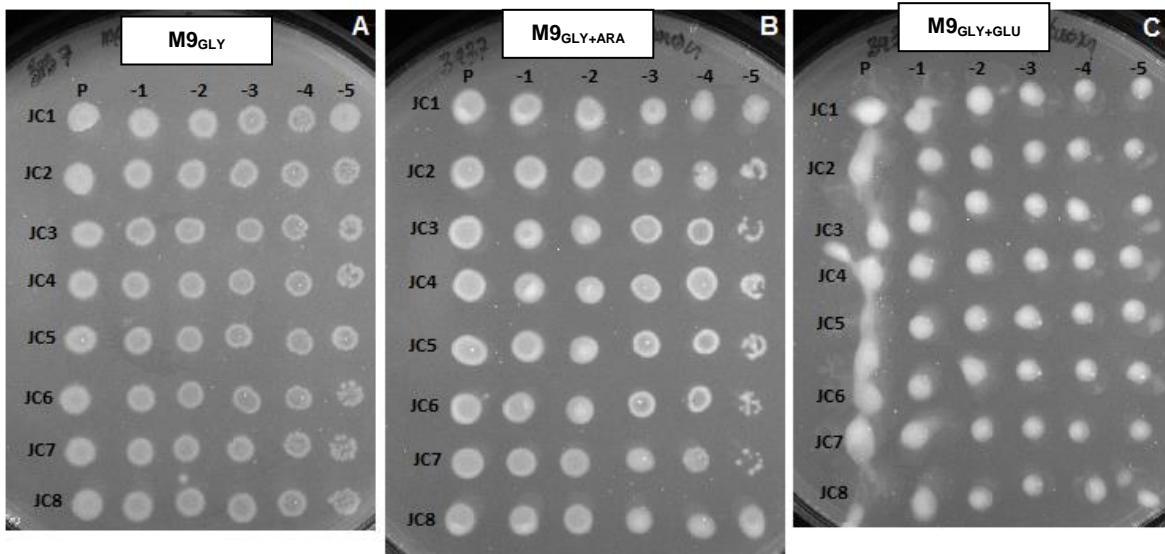


**Figura 33.** Representación esquemática del reconocimiento de la proteína IscR-apo (mutante de sus tres cisteínas por alaninas, IScR<sub>-92A\*98A\*104A</sub>) por la zona promotora de tipo 2 (en este caso del gen *hya* (tomado de Rajagopalan *et al.*, 2013)). (A) representación de la proteína y la secuencia de reconocimiento tipo 2 de ADN reconocido por el dímero IScR en su forma apo, las esferas moradas representan las alaninas y la rosa a la histidina. (B) representación esquemática de la interacción entre apo IScR<sub>-92A\*98A\*104A</sub> en su forma dímera y la zona tipo 2 del ADN, W= residuo arginina y RH= reconocimiento de la zona hélice de la proteína (involucra residuos aminoácidos como Glu, Ser y Gln).

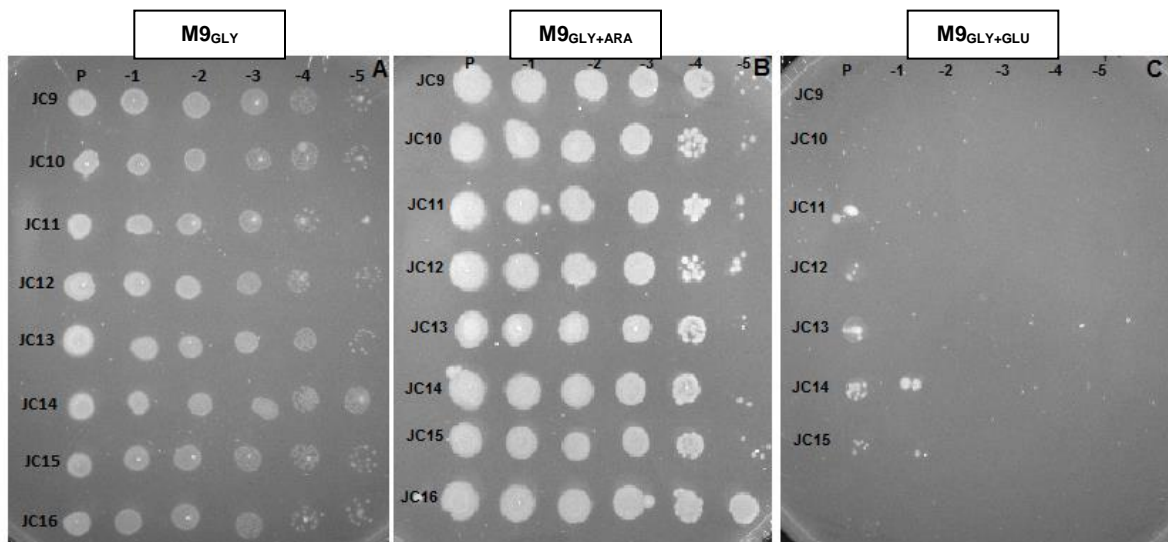
### 7.10. Caracterización fenotípica del efecto de las proteínas IScR portando las mutaciones cisteínas en la cepa silvestre 3937 (WT) y mutante condicional *isc* de *Dickeya dadantii* bajo de crecimiento en medio mínimo

Para conocer si las proteínas IScR (silvestre o mutantes construidas en este estudio) expresadas en el pBAD eran capaces de complementar el fenotipo de auxotrofias en el mutante condicional *isc* (Rincon-Enriquez *et al.*, 2008), se realizaron experimentos con la cepa silvestre 3937, con y sin la expresión de las proteínas IScR (Figura 34); en esta figura no se presentan diferencias entre las cepas con o sin IScR y cuando están o no expresadas (arabinosa o glucosa) lo cual sugiere que no hay efecto de toxicidad celular (Figura 34B); sin embargo en el mutante condicional *isc* (Figura 35) cuando se expresa *isc* y proteínas IScR el mutante creció sin ningún problema, en cambio cuando se reprime la expresión del operón *isc* y las proteínas IScR (silvestres o mutantes) no se presenta complementación fenotípica, dado que son necesarios centros [Fe-S] para la biosíntesis de aminoácidos de cadena ramificada (leucina, isoleucina y valina), lo cual

es una prueba que el modelo de expresión de este estudio (mutante condicional *isc* de *D. dadantii* y pBAD) está funcionando como se planificó



**Figura 34.** Efecto de proteínas IscR silvestre o mutantes expresadas (arabinosa, ARA) o reprimidas (glucosa, GLU) sobre el crecimiento de la cepa silvestre 3937 de *D. dadantii* en medio mínimo (M9 glicerol, GLY). 3937 (WT) de *D. dadantii* con plásmidos: JC1 = Sin plásmido. JC2 = pBAD. JC3 = pBADiscR. JC4 = pBADiscR<sub>-92\*104</sub>. JC5 = pBADiscR<sub>-98\*104</sub>. JC6 = pBADiscR<sub>-92\*98</sub>. JC7 = pBADiscR<sub>-92\*98\*104</sub>. JC8 = pBADiscR<sub>-1/2</sub>.

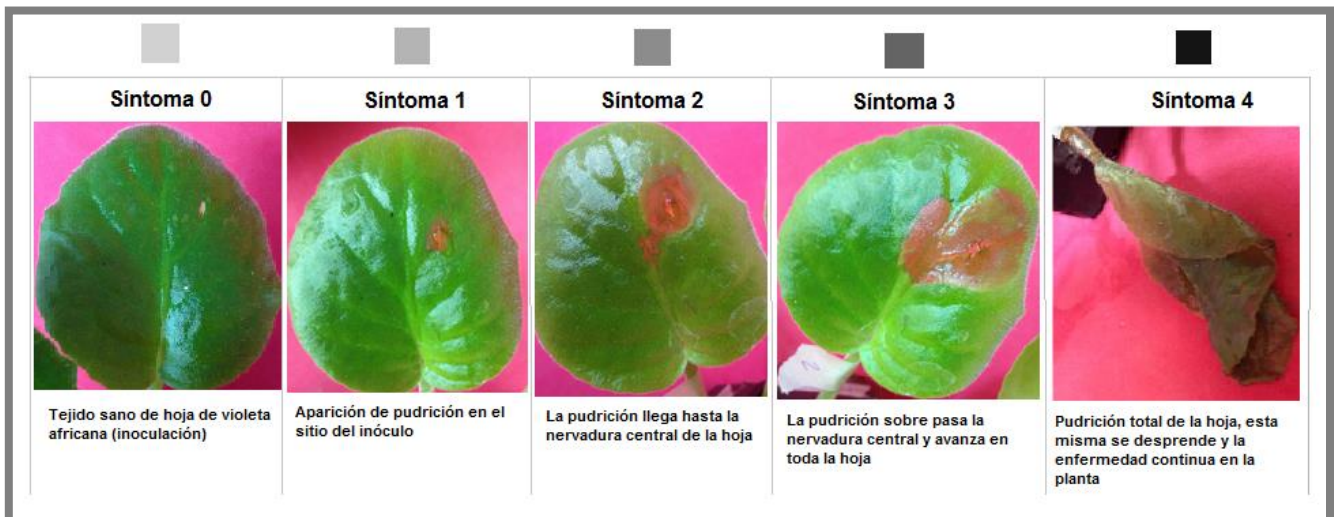


**Figura 35.** Efecto de proteínas IscR silvestre o mutantes expresadas (arabinosa, ARA) o reprimidas (glucosa, GLU) sobre el mutante condicional *isc* de *D. dadantii* en medio mínimo (M9 glicerol, GLY). Mutante condicional *isc* de *D. dadantii* con plásmidos: JC9 = Sin plásmido. JC10

= pBAD. JC11 = pBADiscR. JC12 = pBADiscR<sub>-92\*104</sub>. JC13 = pBADiscR<sub>-98\*104</sub>. JC14 = pBADiscR<sub>-92\*98</sub>. JC15 = pBADiscR<sub>-92\*98\*104</sub>. JC16 = pBADiscR<sub>-1/2</sub>.

### 7.11. Caracterización fenotípica del efecto de las proteínas IscR portando las mutaciones cisteínas en la cepa silvestre 3937 (WT) y mutante condicional *isc* de *Dickeya dadantii* en su virulencia sobre plantas de violeta africana

Con el fin de caracterizar la contribución de la proteína silvestre y mutantes de IscR en la virulencia de *D. dadantii* se realizaron pruebas de complementación fenotípica de los plásmidos (pBAD) portando las construcciones con la secuencia codificante en el mutante condicional *isc* de *Dickeya*, para cuantificar la virulencia se construyó una escala ordinal cualitativa, el resultado de esta escala se presenta en la Figura 36. En esta figura se propone cinco niveles de virulencia en hojas de violeta africana, los niveles de la virulencia se relacionan con la aparición de síntomas provocados por la cepa silvestre 3937 de *D. dadantii* a través del tiempo hasta llegar a la pudrición blanda de toda una hoja de las plantas desarrolladas de violetas africanas (*Saintpaulia ionantha*).



**Figura 36.** Escala ordinal cualitativa de severidad para cuantificar la virulencia de las cepas de *Dickeya dadantii* sobre plantas de violeta africana. Los síntomas observados fueron realizados en un periodo de 11 días después de la inoculación. Los síntomas comienzan con la pudrición blanda en el sitio de la infección y se expande hasta alcanzar toda la parte de la hoja hasta llegar al peciolo y provocar el desprendimiento de la hoja. Arriba de los síntomas se muestra la escala de colores que se emplearon para representar la virulencia de las distintas cepas de *D. dadantii* sobre plantas de violeta africana.

La inoculación de las cepas de *D. dadantii* portando en *trans* distintas construcciones IscR (silvestre o mutantes) para evaluar su efecto en la virulencia se muestra en el Cuadro 8. Resulta importante señalar que en plantas de arabidopsis el mutante condicional *isc* cuando es reprimido demostró una reducción significativa en su virulencia (Rincon-Enriquez *et al.*, 2008), esperando un comportamiento similar en plantas de violeta africana.

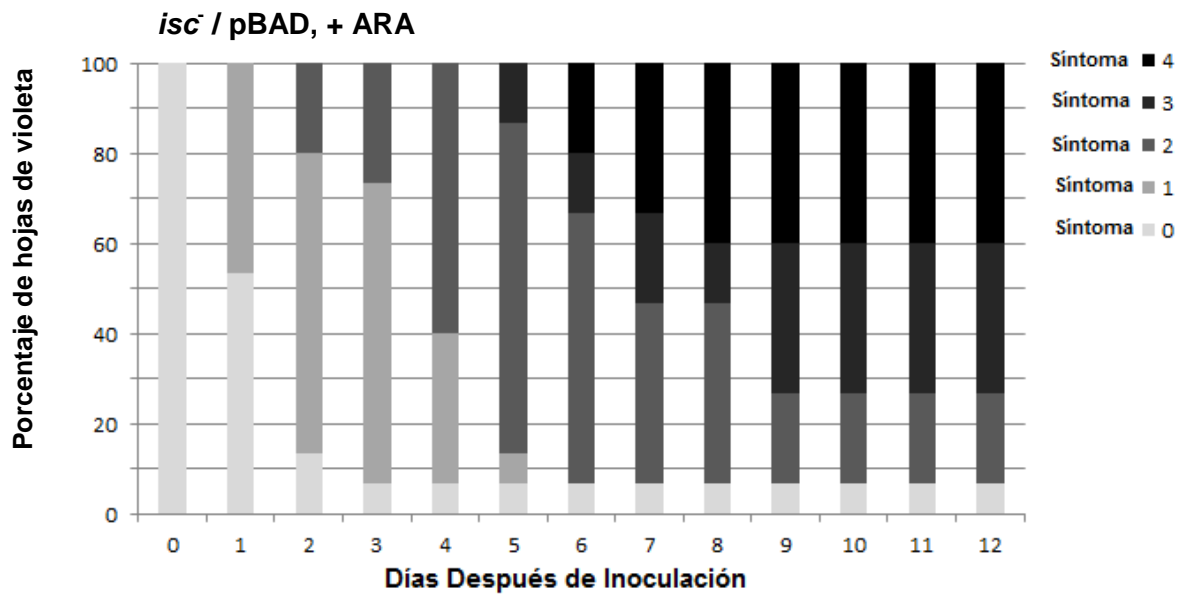
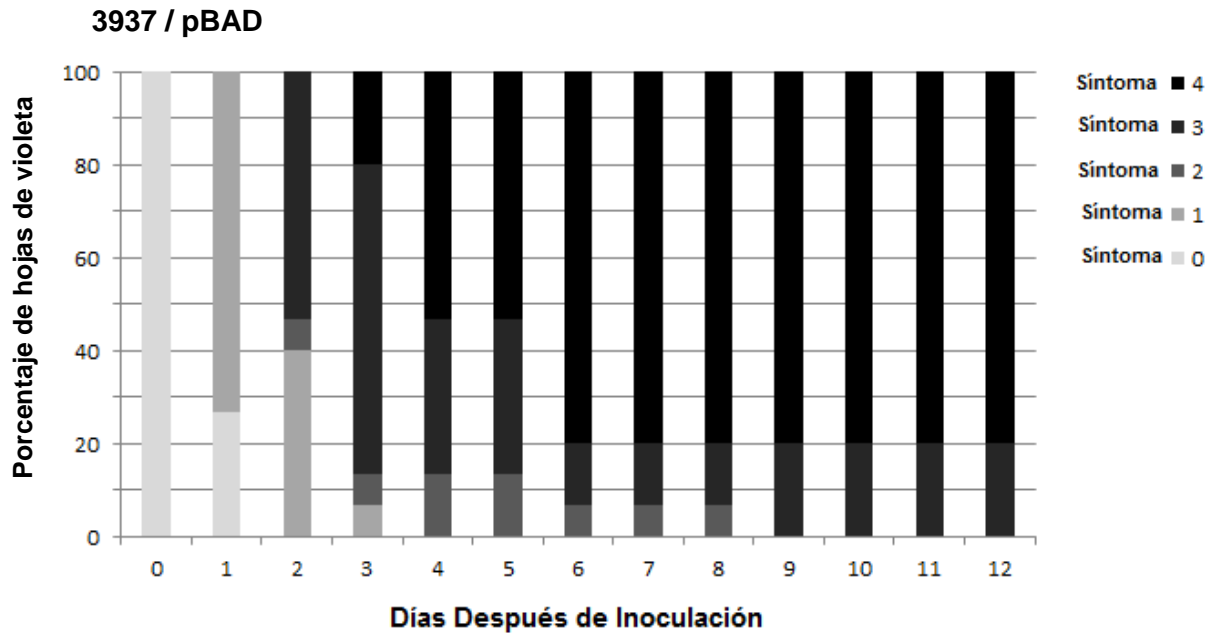
**Cuadro 8.** Cepas de *Dickeya dadantii* evaluadas en experimentos para conocer el comportamiento de su virulencia en plantas de violeta africana.

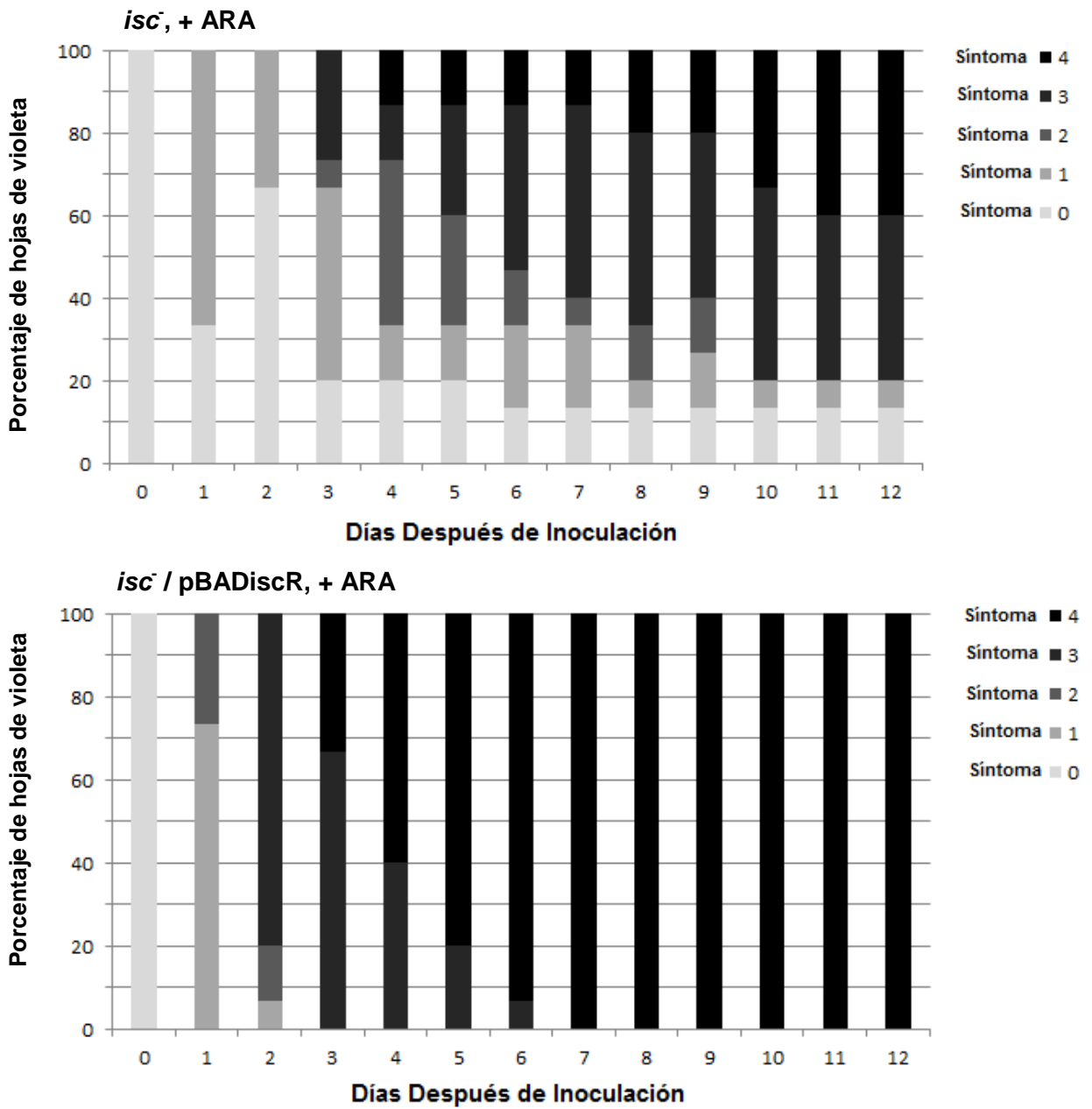
Cepa		Inducción del operón <i>isc</i> en el mutante condicional <i>isc</i> de <i>D. dadantii</i>	
Clave	Genotipo	Inducción (+arabinosa)	Represión (+glucosa)
JC2	3937 / pBAD	n.a.	n.a.
JC9	<i>isc</i> <sup>-</sup> / sin plásmido	+	-
JC10	<i>isc</i> <sup>-</sup> / pBAD	+	n.a.
JC11	<i>isc</i> <sup>-</sup> / pBADiscR	+	n.a.
JC12	<i>isc</i> <sup>-</sup> / pBADiscR <sub>.92*104</sub>	+	n.a.
JC13	<i>isc</i> <sup>-</sup> / pBADiscR <sub>.98*104</sub>	+	n.a.
JC14	<i>isc</i> <sup>-</sup> / pBADiscR <sub>.92*98</sub>	+	n.a.
JC15	<i>isc</i> <sup>-</sup> / pBADiscR <sub>.92*98*104</sub>	+	n.a.
JC16	<i>isc</i> <sup>-</sup> / pBADiscR <sub>.1/2</sub>	+	n.a.

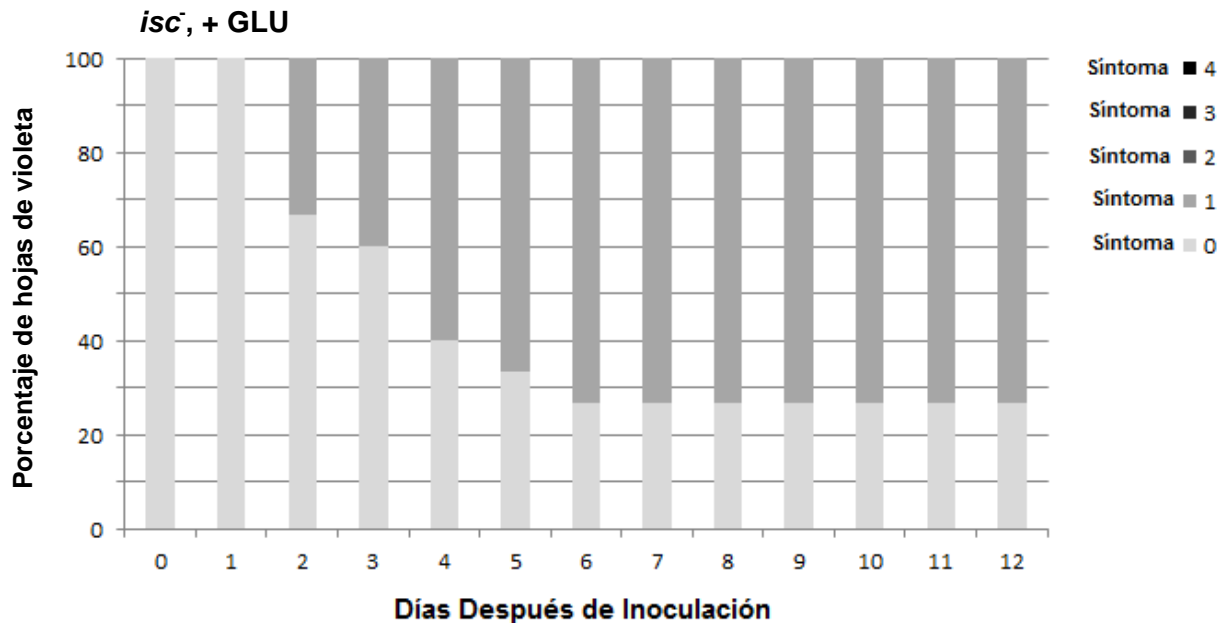
3937 = cepa silvestre de *D. dadantii*; *isc*<sup>-</sup> = mutante condicional *isc* de *D. dadantii*. n.a.= no aplicación.

En la Figura 37 se presenta los resultados de la virulencia de la cepa silvestre (3937) y el mutante condicional *isc* con y sin inducción, se observa que los resultados coinciden con los reportados por Rincon-Enriquez *et al.* (2008). Además de la complementación de IscR en el mutante *isc* mostró una evolución de la virulencia parecida a la observada en la cepa silvestre.





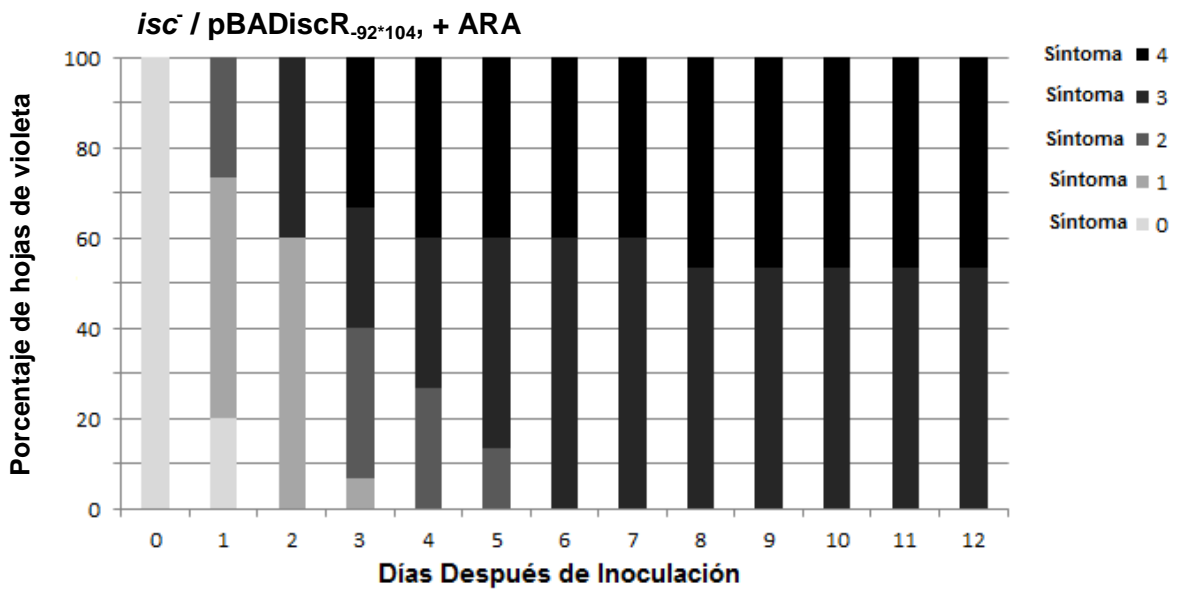
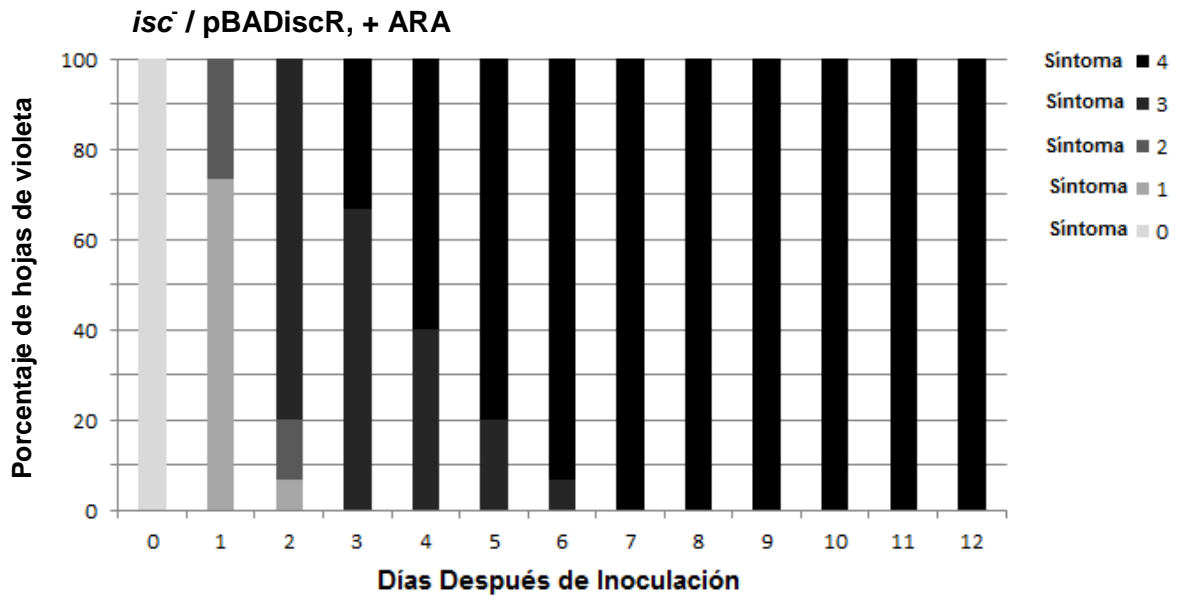


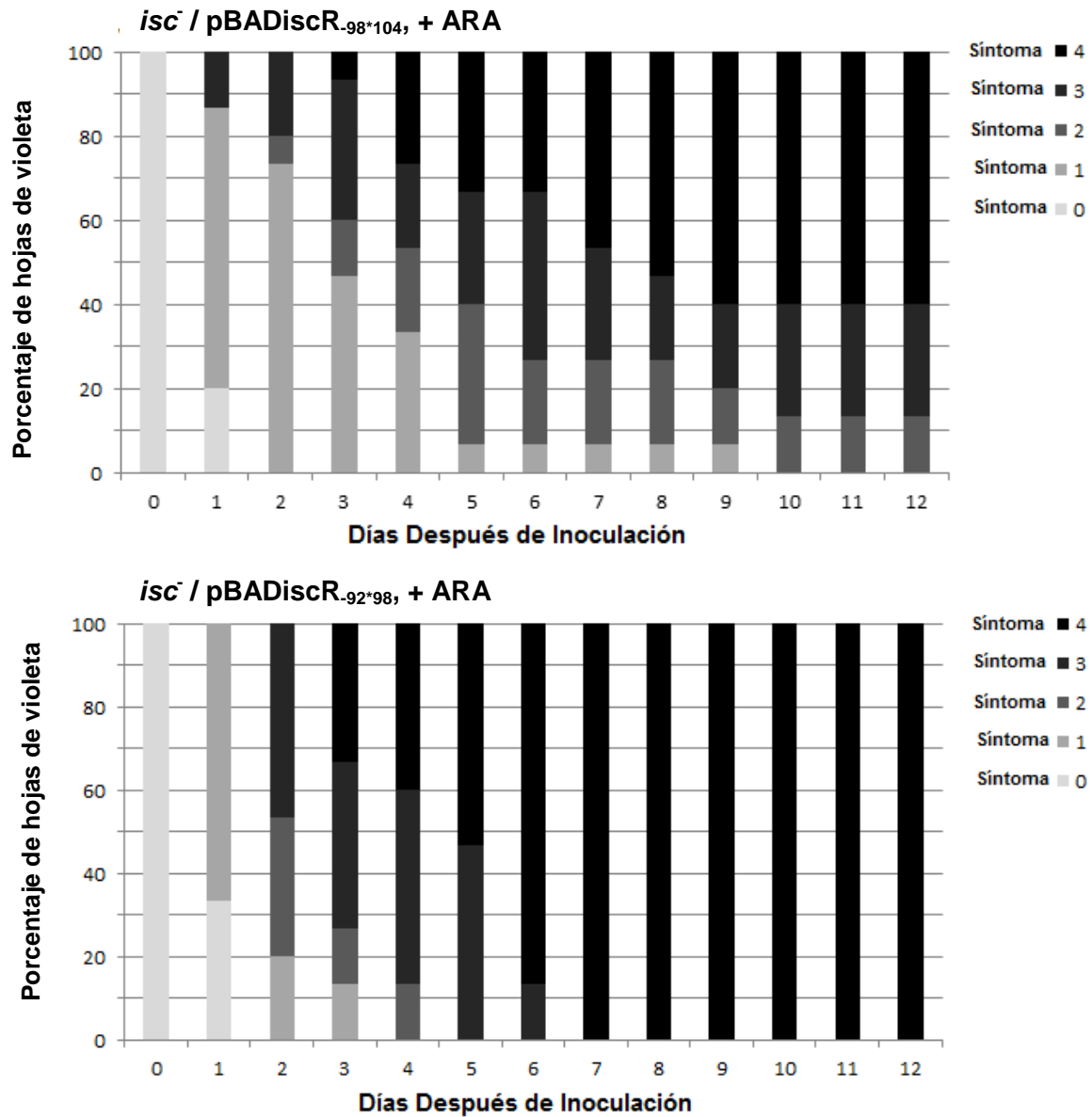


**Figura 37.** Comportamiento de la virulencia de las cepas silvestre (3937) y mutante condicional *isc* de *Dickeya dadantii* (*isc*<sup>-</sup>) a través del tiempo en plantas de violeta africana. El mutante *isc*<sup>-</sup> contiene en *trans* el plásmido pBADiscR que expresa (arabinosa, ARA) o reprime (glucosa, GLU) la trasducción del regulador IScR. Tamaño de la muestras de las hojas evaluadas (n) fue de 20.

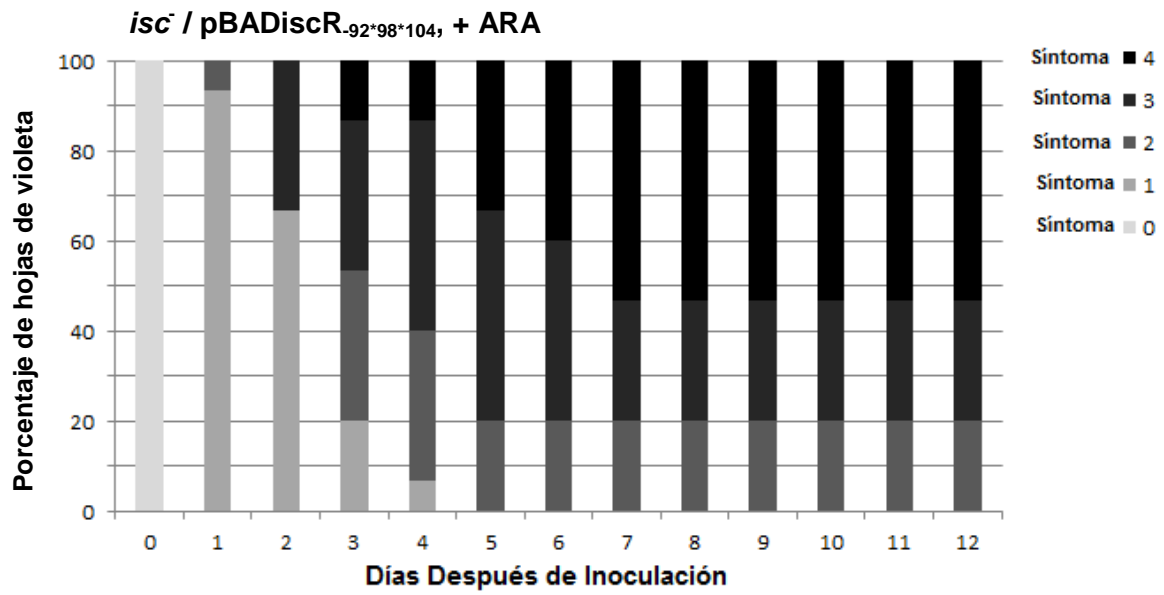
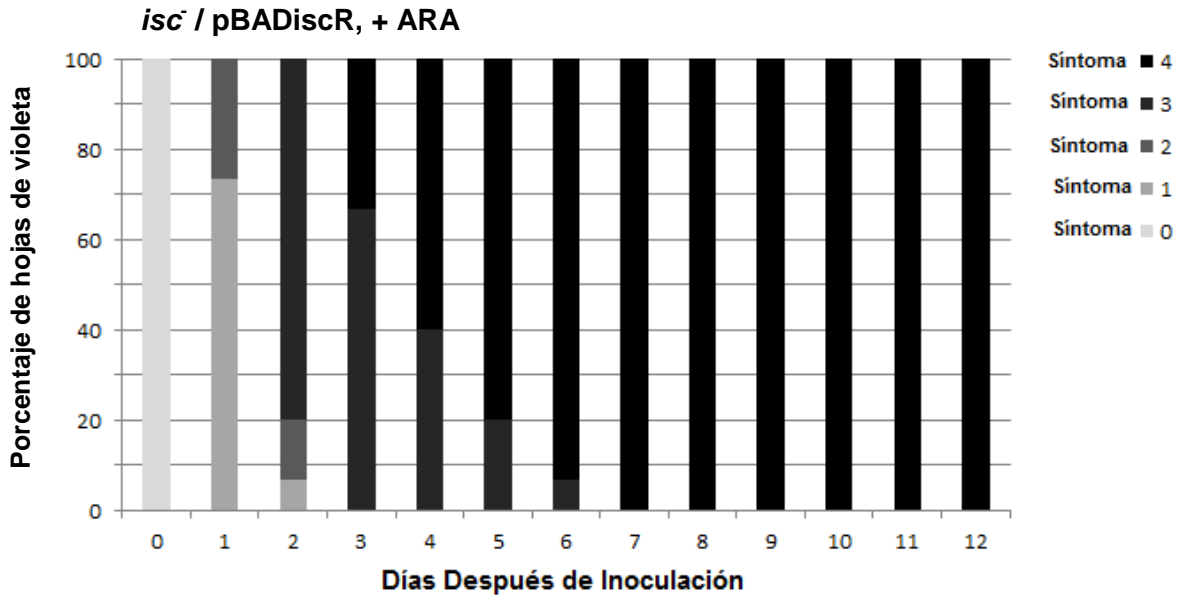
Con el fin de evaluar el efecto de las proteínas IScR (IscR<sub>-92\*104</sub>, IscR<sub>-98\*104</sub>, IscR<sub>-92\*98</sub>, IscR<sub>-92\*98\*104</sub> e IscR<sub>-1/2</sub>) mutantes en las Figuras 38 y 39 se presenta la evolución del comportamiento de la virulencia en el mutante *isc* de *D. dadantii* a través del tiempo, dicho comportamiento es comparado con la proteína IScR silvestre. En las proteínas con las mutaciones dobles solo IscR<sub>-92\*98</sub> es igual a IscR, mientras que en las otras dos (IscR<sub>-92\*104</sub> e IscR<sub>-98\*104</sub>) hay un efecto pequeño en la disminución de la virulencia (Figura 38). La hipótesis que se tiene para tratar de explicar esta observación es que existe una competición por el activador arabinosa entre el promotor del cromosoma y el promotor de los plásmidos (aproximadamente 18-30 por célula), lo cual provoca una disminución de la expresión de los sistemas ISC y/o SUF requeridos para una total virulencia en las plantas de violeta africana. Sin embargo en el caso de la mutante triple (IscR<sub>-92\*98\*104</sub>) y la truncada (IscR<sub>-1/2</sub>) se observa una mayor afectación a la virulencia (Figura 39), lo cual también podría apoyar la hipótesis de alguna interacción negativa entre las proteínas ISC y SUF, ISC e IscR (mutantes) o ISC con otras proteínas inducidas por IscR-apo. Para lo cual será necesario planificar otros experimentos con

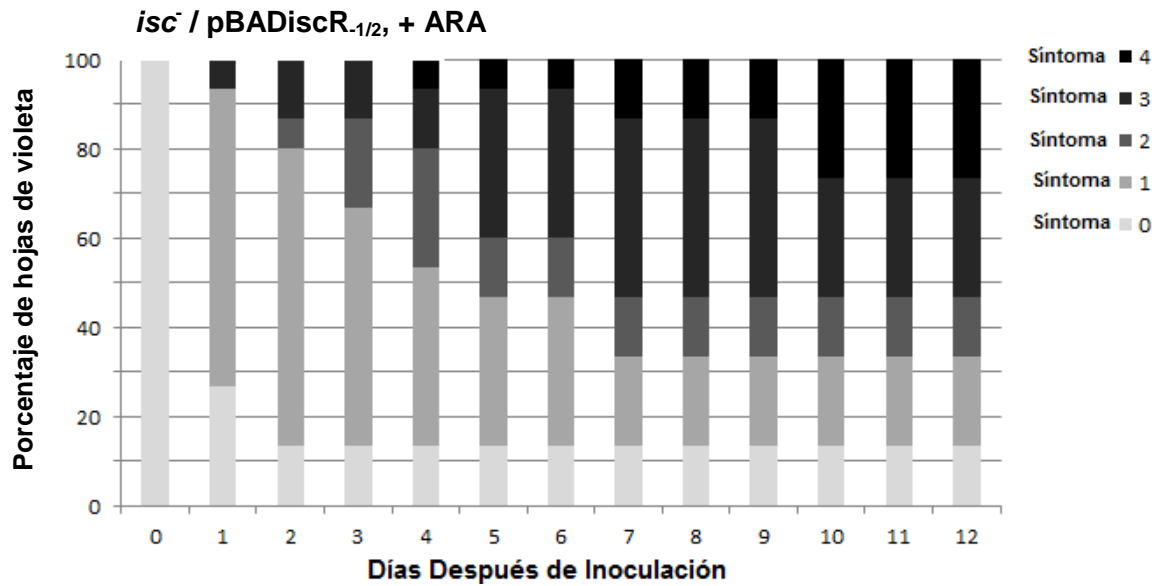
este objetivo específico.





**Figura 38.** Efecto de proteínas IscR silvestre o mutantes expresadas (arabinosa, ARA) en el comportamiento de la virulencia del mutante condicional *isc* (*isc<sup>-</sup>*) de *Dickeya dadantii* a través del tiempo en plantas de violeta africana. El mutante *isc<sup>-</sup>* contiene en *trans* los plásmidos pBADiscR, pBADiscR-92\*104, pBADiscR-98\*104 y pBADiscR-92\*98 que expresan (arabinosa, ARA) la trasducción del regulador IscR silvestre o mutantes en los residuos cisteína. Tamaño de las muestras de las hojas evaluadas (n) fue de 20.





**Figura 39.** Efecto de proteínas IscR silvestre o mutantes expresadas (arabinosa, ARA) en el comportamiento de la virulencia del mutante condicional *isc* (*isc*<sup>c</sup>) de *Dickeya dadantii* a través del tiempo en plantas de violeta africana. El mutante *isc*<sup>c</sup> contiene en *trans* los plásmidos pBADiscR, pBADiscR-92\*98\*104 y pBADiscR-1/2 que expresan (arabinosa, ARA) la trasducción del regulador IscR silvestre o mutantes en los residuos cisteína. Tamaño de la muestras de las hojas evaluadas (n) fue de 20.

Para que quede más clara la implicación de las mutaciones puntuales de las cisteínas de la proteína IscR, se calculó un porcentaje de severidad total de los síntomas provocados por cada cepa, esto se calculó realizando la sumatoria de los síntomas al día 12 después de inoculación sobre las 15 hojas inoculadas, es decir para esto se computo como: **Virulencia = Sumatoria de [(número de hojas por cepa) (síntoma de todas las hojas)]**, por ejemplo para 15 hojas todas con el síntoma 4, la virulencia = (15)(4) = 60, lo cual representa el 100%. En el Cuadro 9 se presenta de manera resumida para el día 12 después de la inoculación el efecto de las proteínas silvestre o mutantes (IscR-92\*104, IscR-98\*104, IscR-92\*98, IscR-92\*98\*104 e IscR-1/2) sobre la virulencia total. En este cuadro resulta claro que las proteínas IscR e IscR-92\*98 complementan al 100% el mutante condicional, lo cual provoca la virulencia total en plantas de violeta africana, lo cual muestra la importancia del regulador IscR en la virulencia de bacterias con estilo de vida como causantes de enfermedades. En este sentido Fuangthong *et al.* (2014) muestran que en hojas de plantas de rábano (*Raphanus sativus*) inoculadas con un mutante nulo *iscR* de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* no provocan la

mancha bacteriana como lo hacen la cepa silvestre. Igualmente en patógenos de animales se ha mostrado que mutantes nulos de *iscR* disminuyen significativamente su virulencia, como es el caso de *Klebsiella pneumoniae* (Wu *et al.*, 2014), *Vibrio vulnificus* (Jong y Choi, 2013) y *Yersinia pseudotuberculosis* (Miller Halie *et al.*, 2014). Esto último se reafirma cuando en un mutante *isc* inducido sin *IscR* solo provoca una virulencia de entre 71-80%. Además la capacidad que tiene la cepa JC14 (*isc*<sup>-</sup> / pBADiscR<sub>-92\*98</sub>) puede ser explicada por la capacidad que tiene a superar el estrés por carencia en hierro como se presentó anteriormente en la Figura 32.

**Cuadro 9.** Porcentaje de virulencia (o severidad) total de *Dickeya dadantii* evaluadas en experimentos para conocer su comportamiento de su virulencia en plantas de violeta africana a los 12 días después de la infección.

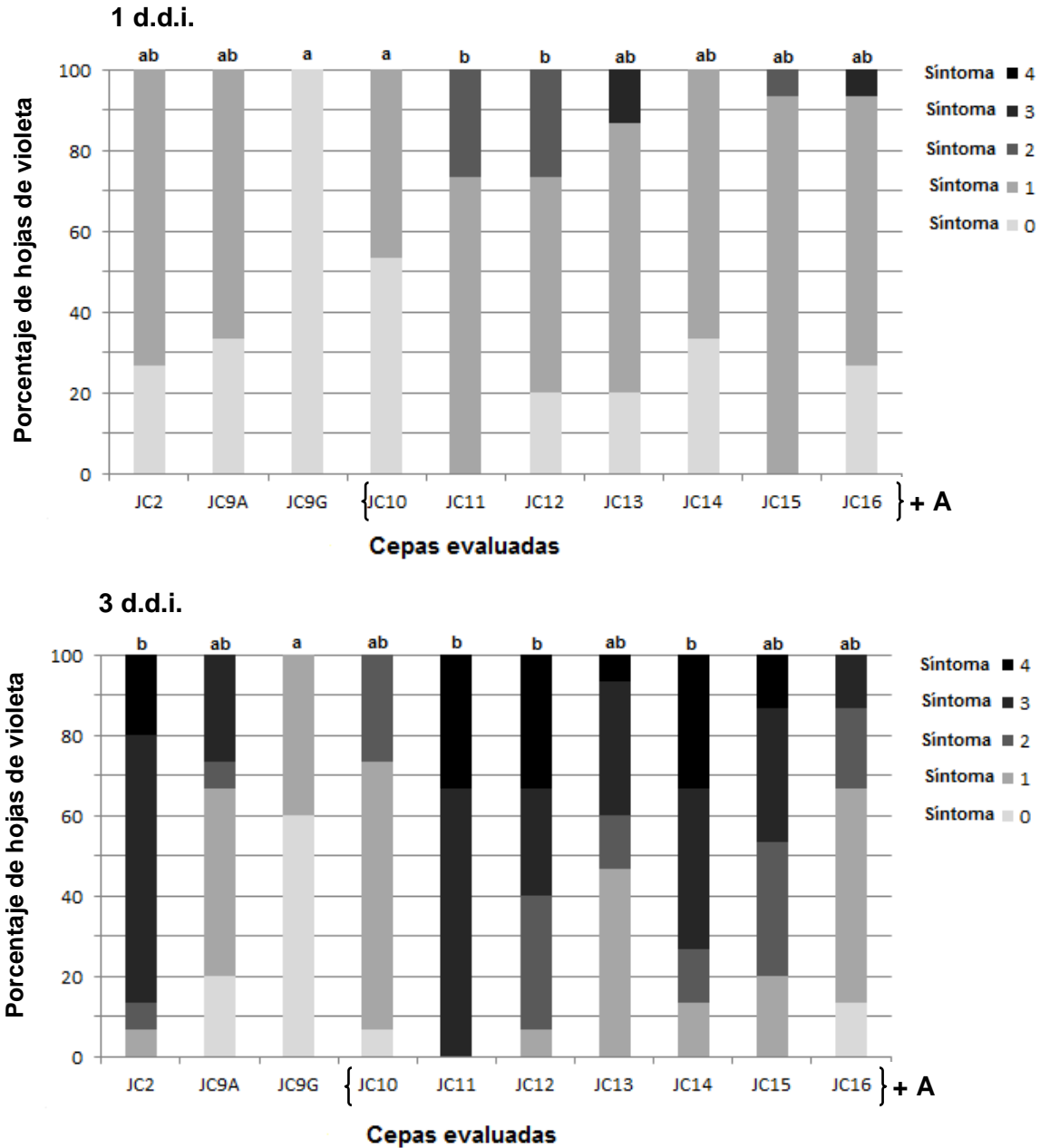
Cepa	Genotipo	Inducción sistema <i>isc</i>	Inducción proteína	Virulencia (%)
JC2	3937 / pBAD	--	--	95.0
JC9	<i>isc</i> <sup>-</sup> / sin plásmido	NO	NO	18.3
JC9	<i>isc</i> <sup>-</sup> / sin plásmido	SI	NO	71.2
JC10	<i>isc</i> <sup>-</sup> / pBAD	SI	NO	80.0
JC11	<i>isc</i> <sup>-</sup> / pBADiscR	SI	SI	100.0
JC12	<i>isc</i> <sup>-</sup> / pBADiscR <sub>-92*104</sub>	SI	SI	86.7
JC13	<i>isc</i> <sup>-</sup> / pBADiscR <sub>-98*104</sub>	SI	SI	86.7
JC14	<i>isc</i> <sup>-</sup> / pBADiscR <sub>-92*98</sub>	SI	SI	100.0
JC15	<i>isc</i> <sup>-</sup> / pBADiscR <sub>-92*98*104</sub>	SI	SI	83.3
JC16	<i>isc</i> <sup>-</sup> / pBADiscR <sub>-1/2</sub>	SI	SI	58.3

3937 = cepa silvestre de *D. dadantii*; *isc*<sup>-</sup> = mutante condicional *isc* de *D. dadantii*.

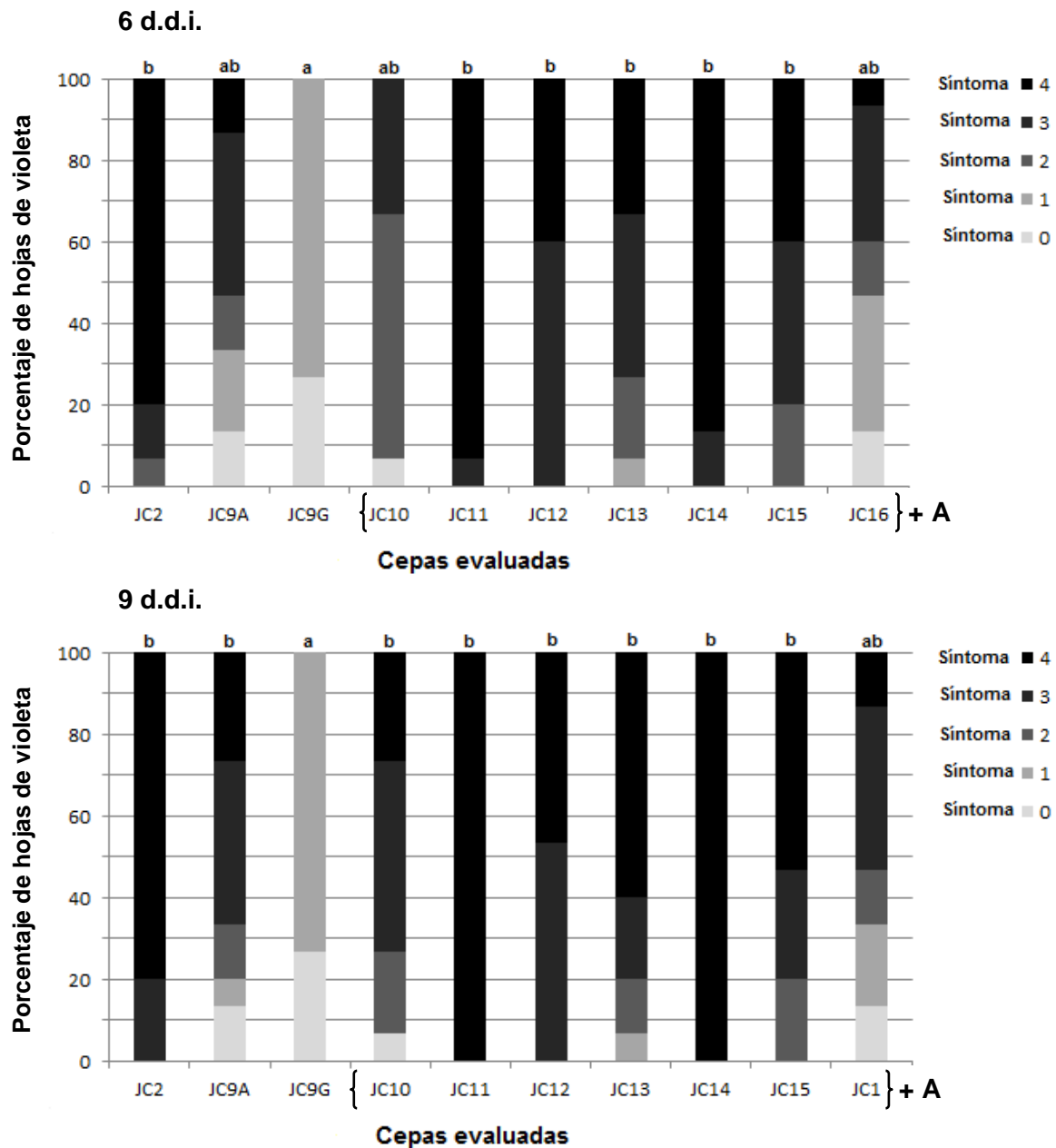
Para tener mayor precisión en la interpretación del comportamiento de la virulencia se realizaron pruebas estadísticas en cuatro tiempos: 1, 3, 6 y 9 días después de inoculación. Los resultados se presentan en las Figuras 40 y 41. En dichas figuras se puede constatar que hay diferencias significativas entre el mutante *isc* activado y reprimido prácticamente desde el primer d.d.i., esto mismo sucede cuando tiene o no en *trans* la proteína silvestre *IscR* o *IscR*<sub>-92\*98</sub>. Lo cual comprueba nuevamente la importancia que tiene *IscR* en la virulencia. Por otro lado respecto a las mutaciones de las proteínas *IscR* (*IscR*<sub>-92\*104</sub>, *IscR*<sub>-98\*104</sub>, *IscR*<sub>-92\*98</sub> e *IscR*<sub>-92\*98\*104</sub>) la virulencia en todos los casos fue mayor a la cepa mutante condicional *isc* (71-80%), además en comparación con la cepa silvestre, cuando se expresaron las proteínas *IscR* e *IscR*<sub>-92\*98</sub> la virulencia fue mayor. En general podría concluirse que al final del experimento (9 d.d.i) la presencia de *IscR* contribuye significativamente a la virulencia del mutante.



condicional *isc* de *D. dadantii*.



**Figura 40.** Efecto de proteínas IscR silvestre o mutantes expresadas (arabinosa, A) o reprimidas (glucosa, G) en el comportamiento de la virulencia de las cepas silvestre (3937) y mutante condicional *isc* (*isc*<sup>c</sup>) de *Dickeya dadantii* a inicio del experimento (1 y 3 días después de infección, d.d.i.) en plantas de violeta africana. Tamaño de la muestras de las hojas evaluadas (n) fue de 20. JC2 = 3937 / pBAD. JC9 = *isc*<sup>c</sup> / sin plásmido. JC10 = *isc*<sup>c</sup> / pBAD. JC11 = *isc*<sup>c</sup> / pBADiscR. JC12 = *isc*<sup>c</sup> / pBADiscR-<sub>92\*104</sub>. JC13 = *isc*<sup>c</sup> / pBADiscR-<sub>98\*104</sub>. JC14 = *isc*<sup>c</sup> / pBADiscR-<sub>92\*98</sub>. JC15 = *isc*<sup>c</sup> / pBADiscR-<sub>92\*98\*104</sub>. JC16 = *isc*<sup>c</sup> / pBADiscR-<sub>1/2</sub>. Letras distintas arriba de la barra en cada gráfico indican diferencias estadísticamente significativas de acuerdo a la prueba de Dunn ( $p \leq 0.05$ ).



**Figura 41.** Efecto de proteínas IscR silvestre o mutantes expresadas (arabinosa, A) o reprimidas (glucosa, G) en el comportamiento de la virulencia de las cepas silvestre (3937) y mutante condicional *isc* (*isc*<sup>-</sup>) de *Dickeya dadantii* a final del experimento (6 y 9 días después de infección, d.d.i.) en plantas de violeta africana. Tamaño de la muestras de las hojas evaluadas (n) fue de 20. JC2 = 3937 / pBAD. JC9 = *isc*<sup>-</sup> / sin plásmido. JC10 = *isc*<sup>-</sup> / pBAD. JC11 = *isc*<sup>-</sup> / pBADiscR. JC12 = *isc*<sup>-</sup> / pBADiscR<sub>.92\*104</sub>. JC13 = *isc*<sup>-</sup> / pBADiscR<sub>.98\*104</sub>. JC14 = *isc*<sup>-</sup> / pBADiscR<sub>.92\*98</sub>. JC15 = *isc*<sup>-</sup> / pBADiscR<sub>.92\*98\*104</sub>. JC16 = *isc*<sup>-</sup> / pBADiscR<sub>.1/2</sub>. Letras distintas arriba de la barra en cada gráfico indican diferencias estadísticamente significativas de acuerdo a la prueba de Dunn ( $p \leq 0.05$ ).

## 8. Conclusiones

Las proteínas IscR mutantes (IscR<sub>-92\*98</sub>, IscR<sub>-92\*104</sub>, IscR<sub>-98\*104</sub> e IscR<sub>-92\*98\*104</sub>) complementan el fenotipo del mutante nulo *iscR*<sup>Δ</sup> en *E. coli*, las cepas que expresan tales proteínas, soportan el estrés por la carencia en hierro (450μM) al igual que la cepa silvestre K12 y que el mutante *iscR*<sup>Δ</sup> de *E. coli* expresando en *trans* la proteína IscR silvestre. La proteína trunca IscR<sub>1/2</sub> es incapaz de complementar el crecimiento del mutante nulo *iscR*<sup>Δ</sup> bajo estrés por carencia en hierro, generándose la hipótesis de que es una proteína no funcional para la regulación del operon *suf*. El crecimiento de la bacteria *E. coli* K12 en condiciones de estrés oxidativo no se ve afectado por la ausencia de la regulación genética del operón *suf* por la proteína IscR. Las proteínas Isc encargadas de proporcionar los centros [Fe-S] son suficientes para no manifestar alguna deficiencia en su fenotipo.

Las proteínas IscR mutantes (IscR<sub>-92\*104</sub> IscR<sub>-92\*98</sub>) logran que el condicional *isc* a una concentración de 40μM de paraquat crezcan ligeramente más que el resto de las cepas, lo cual sugiere que las proteínas IscR<sub>-92\*104</sub> IscR<sub>-92\*98</sub> podrían ser afines para la zona reguladora del operón *suf* logrando una mejor adaptación al medio. La proteína mutante IscR IscR<sub>-98\*104</sub> a una concentración de 60 μM mostro un menor crecimiento respecto a la cepa JC11 (*isc* / IscR). El crecimiento en estrés oxidativo de las cepas del condicional *isc* con sus respectivas proteínas IscR expresadas en *trans* no se obtiene el mismo resultado en el crecimiento con respecto a la cepa silvestre, debido a que la cepa condicional *isc* sigue siendo un mutante donde posibles rutas metabólicas se ven afectadas por la ausencia de la proteína IscR. El crecimiento en carencia en hierro del condicional *isc* expresando las proteínas IscR<sub>92\*104</sub> y IscR<sub>-92\*98</sub> permite un mejor crecimiento del mutante condicional, muestran una mejor complementación fenotípica en comparación con la proteína silvestre. La expresión de las proteínas IscR (IscR<sub>-92\*104</sub>, IscR<sub>-98\*104</sub>, IscR<sub>-92\*98</sub> e IscR<sub>-92\*98\*104</sub>) mostraron un efecto positivo (83 al 100%) sobre la virulencia en comparación con el mutante condicional *isc* de *D. dadantii* donde sólo se expreso las proteínas del sistema ISC (71-80%)

## 9. Perspectivas

Obtener un mutante nulo de *iscR* de *D.dadantii* para entender y comprender mejor la función y/o actividad de la cada una de las proteínas mutantes de la proteína reguladora IscR elaboradas en este estudio, sobre la biogénesis de los centros [Fe-S] y en distintas condiciones de estrés.

Cuantificar las proteínas inducidas por los sistemas genéticos Isc y Suf y determinar que proteínas se producen más en condiciones de estrés y en relación a su virulencia.

## 10. Bibliografía

- Agar J.N., Frazzon J., Huynh B. H., Dean D.R., Johnson M.K. **2000**. IscU as a scaffold for iron-sulfur cluster biosynthesis: sequential assembly and [2Fe-2S] and [4Fe-4S] clusters in IscU. *Biochemistry* 39: 7856-7862.
- Ali V., Shigeta Y., Tokumoto U., Takahashi Y., Nozaki T. **2004**. An intestinal parasitic protist, *Entamoeba histolytica*, possesses a non-redundant nitrogen fixation-like system for iron-sulfur cluster assembly under anaerobic conditions. *J Biol Chem* 279: 16863-16874.
- Andro T., Chambost J.P., Kotoujansky A., Cattaneo J., Bertheau Y., Barras F., Van Gijsegem F., Coleno A. **1984**. Mutants of *Erwinia chrysanthemi* defective in secretion of pectinase and cellulose. *J. Bacteriol.* 160: 1199-1203.
- Ayala-Castro C., A. Saini, F. Wayne O. **2008**. Fe-S cluster assembly pathways in bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 72: 110-125.
- Baba T., T. Ara, M. Hasegawa, Y. Takai, Y. Okumura, M. Baba, K. A. Datsenko, M. Tomita, B. L. Wanner, H. Mori **2006**. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Molecular systems biology* 2:1-11.
- Blattner F.R., I.G. Plunkett, C.A. Bloch, N.T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado Vides, J.D. Glasner, C.K. Rode, G.F. Mayhew, J. Gregor, N.W. Davis, H.A. Kirkpatrick, M.A. Goeden, D.J. Rose, B. Mau, Y. Shao. **1997**. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277: 1453-1462.
- Beinert H., Holm R. H., Munck, E. **1997**. Iron-sulfur clusters: Nature's modular, multipurpose structures. *Science* 227: 653-659.
- Beinert H. **2000**. Iron-sulfur proteins: ancient structures, still full of surprises. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 5: 2-15.
- Braun V., Hantke K., Köster W. **1998** Bacterial iron transport: mechanisms, genetics, and regulation. *Met. Ions Biol. Syst.* 35: 67-145.
- Bianchini F., A.C. Pantano. **1991**. *Tudo verde*, Guía de plantas e flores. Sao Paulo: Mehlhoramentos. 135 p.
- Caillaud F., Trieu-Cuot P., Carlier C., Courvalin P. **1987**. Nucleotide sequence of the kanamycin resistance determinant of the pneumococcal transposon Tn1545: evolutionary relationships and transcriptional analysis of *aphA-3* genes. *Molecular and General Genetics* 207: 509-513.
- Cabiscol E., Tamarit J., Ros J. **2000**. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *International Microbiology* 3: 3-8.
- Chahal K.H., Y. Dai, A. Saini, K. Ayala C., F. Outten W. **2009**. The SufBCD Fe-S Scaffold complex with SufA for Fe-S cluster transfer. *Biochemistry* 48: 10644.
- Chivers P T, Prehoda K E y Raines R T **1997**. The CXXC motif: a rheostat in the active

- site. *Biochemistry* 36: 4061-4066.
- Dai S., Schwendtmayer C., Schürmann P., Ramaswamy S., Eklund H. **2000**. Redox signaling in chloroplasts: cleavage of disulfides by an iron-sulfur cluster. *Science*, 287: 655-658.
- Dale JW. **1996**. Molecular Genetics of Bacteria. 3th Edition. John Wiley & Sons New York. pp 310
- Djaman O., Outten W., Imlay J. **2004**. Repair of oxidized iron-sulfur cluster in *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry* 279: 43: 44590-44599.
- Denu J., Tanner K. **1998**. Specific and reversible inactivation of protein tyrosine phosphatases by hydrogen peroxide: evidence for a sulfenic acid intermediate and implications for redox regulation. *Biochemistry* 37: 5633-5642.
- Dos Santos P.C., Dean D.R., Hu Y., Ribbe M.W. **2004**. Formation and insertion of the nitrogenase iron-molybdenum cofactor. *Chemical Reviews* 104: 1559-1173.
- Einsle O., Tezcan F.A., Andrade S.L.A., Schmid B., Yoshida M., Howard J.B., Rees D.C. **2000**. The nitrogenase MoFe-protein at 1.16Å resolution: A central ligand in the FeMo-cofactor. *Science* 297: 1696-1700.
- Enard C., Diolez A., Expert D. 1988 Systemic virulence of *Erwinia chrysanthemi* 3937 requires a functional iron assimilation system. *J. Bacteriol.* 17: 2419-2426.
- Fleischhacker A. A., Stubna A., Hsueh K. L., Guo Y., Teter S. J., Rose J. C., Bunold T. C., Markley J., Münck E., Kiley P. J. **2012**. Characterization of the [2Fe-2S] cluster of *Escherichia coli* Transcription Factor IscR. *Biochemistry* 5: 4453-4462.
- Frazzon J., Dean, D.R. **2003**. Formation of iron-sulfur clusters in bacteria: an emerging field in bioinorganic chemistry. *Curr. Opin. in Chem. Biol.* 7:166-173.
- Franza T., Sauvage C., Expert D. **1999**. Iron regulation and pathogenicity in *Erwinia chrysanthemi* strain 3937: role of the *Fur* repressor protein. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 12: 119-128.
- Flores C.A. **1988**. Los Árboles Ornamentales de la Ciudad de Cuernavaca, Morelos. Tesis licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. México. 205 pp.
- Flores-Franco G. **1990**. *La Subfamilia Caesalpinoideae (Familia Leguminosae) en el estado de Morelos*. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. México. 135 pp.
- Fontecilla-Camps J.C., Volveda A., Cavazza C., Nicolet Y. **2007**. Structure/function relationships of [NiFe]- and [FeFe]- hydrogenases. *Chem Rev* 107: 4273.
- Fuangthong M., Jittawuttipoka T., Wisitkamol R., Romsang A., Duang-nkern J., Vattanaviboon P., Mongkolsuk S. **2014**. IscR plays a role in oxidative stress resistance and pathogenicity of a plant pathogen, *Xanthomonas campestris*. *Microbiology Research*. (139-46), 0944-5013.
- Gerber J y Lill R **2002**. Biogenesis of iron-sulfur proteins in eukaryotes: components, mechanism and pathology. *Mitochondrion* 2: 71-86.

- Giel J.L., Rodlonov D., Llu M., Blattner F.R., Killely P.J. **2006**. IscR-dependent gene expression links iron-sulfur cluster assembly to the control of O<sub>2</sub>-regulated genes in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* 60: 1058-1075.
- Glasner J.D., Yang C.H., Reverchon S., Hugouvieux-Cotte-Pattat N., Condemine G., Bohin J.P., Van Gijsegem F., Yang S., Franza T., Expert D., Plunkett G., San Francisco M.J., Charkowski A.O., Py B., Bell K., Rauscher L., Rodriguez-Palenzuela P., Toussaint A., Holeva M.C., He S.Y., Douet V., Boccara M., Blanco C., Toth I., Anderson B.D., Biehl B.S., Mau B., Flynn S.M., Barras F., Lindeberg M., Birch P.R., Tsuyumu S., Shi X., Hibbing M., Yap M.N., Carpentier M., Dassa E., Umehara M., Kim J.F., Rusch M., Soni P., Mayhew G.F., Fouts D.E., Gill S.R., Blattner F.R., Keen N.T., Perna N.T. **2011**. Genome sequence of the plant-pathogenic bacterium *Dickeya dadantii* 3937. *J. Bacteriol.* 193: 2076-2077.
- Hauben L., E. R. B. Moore., L. Vauterin., M. Steenackers., J. Mergaert., L. Verdonck., J. Swings. **1998**. Phylogenetic position of phytopathogens within Enterobacteriaceae. *Systematic and Applied Microbiology* 21: 384-397.
- Jacob C.G, G.I., Giles N.M., Helmut S.H. **2003**. Sulfur and selenium: the role of oxidation state in protein structure and function. *Angew. Chem. Int. Ed.* 42: 4742-4758.
- Jacobson M.R., Cash, V.L., Weiss, M.C., Laird, N.F., Newton, W.E., Dean, D.R. **1989**. Biochemical and genetic analysis of the *nifUSVWZM* cluster from *Azotobacter vinelandii*. *Mol. Gen. Genet.* 219: 49-57.
- Jones-Carson J, Laughlin J, Hamad MA, Stewart AL, Voskuil MI, Vázquez-Torres A. **2008**. Inactivation of [Fe-S] Metalloproteins Mediates Nitric Oxide-Dependent Killing of *Burkholderia mallei*. Aballay A, ed. *PLoS ONE*;3(4):e1976. doi:10.1371/journal.pone.0001976.
- Jang S., Imlay J.A. **2010**. Hydrogen peroxide inactivates the *Escherichia coli* Isc iron-sulfur assembly system and OxyR induces the Suf system to compensate. *Molecular Microbiology* 76: 1448-1467.
- Johnson D.C., Dean R.D, Smith A.D., Johnson M.K. **2005**. Structure, function, and formation of biological iron-sulfur clusters. *Annu. Rev. Biochem.* 74: 247-281.
- Jong Gyu Lim and Sang Ho Choi. **2013**. IscR Is a Global Regulator Essential for Pathogenesis of *Vibrio vulnificus* and Induced by Host Cells. *Infect Immun*; 82(2): 569–578.
- Joklik W.K., Willett H.P., Amos D.B., Wilgert C.M. **1994**. *Zinsser Microbiología*. 20<sup>a</sup> ed. BsAs. Panamericana.
- Justino M.C., Vicente J.B., Teixeira M., Saraiva L.M. **2005**. New genes implicated in the protection of anaerobically grown *Escherichia coli* against nitric oxide. *J. Biol Chem* 280: 2636-2643.
- Kiley P.J., Beinert H. **2003**. The role of Fe-S proteins in sensing and regulation in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 6: 181-185.
- Lee W.C., Yoshihara, M., Littleton, J.T. **2004**. Cytoplasmic aggregates trap polyglutamine containing proteins and block axonal transport in a *Drosophila*

- model of Huntington's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101: 3224-3229.
- Leszczyńska-Borys H. **1990**. *Introducción a la Horticultura Ornamental*. Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla. Escuela de Fitotecnia. México. 42 pp.
- Léon S., Touraine B., Ribot C., Briat J.F., Lobreaux S. **2003**. Iron-sulphur cluster assembly in plants: distinct NFU proteins in mitochondria and plastids from *Arabidopsis thaliana*. *Biochem. J.* 371: 823-830.
- Lill R., Muhlenhoff U. **2005**. Iron-sulfur protein biogenesis in eukaryotes. *Trends in Biochemical Science* 30: 133-141.
- Lill R., Muhlenhoff U. **2006**. Iron-sulfur protein biogenesis in eukaryotes: components and mechanisms. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 22: 457-486.
- Lill R., Dutkiewicz R., Elsasser H.P., Hausmann A., Netz D.J., Pierik A.J., Stehling O., Urzica E., Muhlenhoff U. **2006**. Mechanisms of iron-sulfur protein maturation in mitochondria, cytosol and nucleus of eukaryotes. *Biochim. Biophys. Acta* 1763: 652-667.
- Lill R., Muhlenhoff U. **2008**. Maturation of iron-sulfur proteins in eukaryotes: Mechanisms, connected processes, and diseases. *Annual Review of Biochemistry* 77: 669-700.
- Lill R. **2009**. Function and biogenesis of iron-sulphur proteins. *Nature* 460: 831-838.
- Litwin C.M., Calderwood S.B. **1993**. Role of iron in regulation of virulence genes. *Clin. Microbiol. Rev.* 6: 137-149.
- Loiseau L., Ollagnier-de-Choudens S., D. Lascoux E. Forest, M. Fontecave, Barras F. **2005**. Analysis of the heterometric CsdA-CsdE cysteine desulfurase, assisting Fe-S cluster Biogenesis en *Escherichia coli*. *J. Biol Chem* 280: 26769-26760.
- Mansfield J., Genin S., Magori S., Citovsky V., Sriyanum M., Ronald P., Dow M., Verdier V., Beer S., Machado M., Toth I., Salmond G., Foster G. **2012**. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*. 13: 614-629.
- Martin A., S. Mora G., L. Rimmaudo, R. A. Wolosiuk. **2009**. Reevaluación de los residuos de cisteína en el señalamiento redox. *Química Viva* 8: 162-184.
- Mahé B., Masclaux C., Rauscher L., Enard C., Expert D. **1995**. Differential expression of two siderophore-dependent-iron acquisition pathways in *Erwinia chrysanthemi* 3937: characterization of a novel ferrisiderophore permease of the ABC transporter family. *Molecular Microbiology* 18: 33-43.
- Miller. **1972**. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Murashige, T. And Skoog, **1962**. A revised medium of rapid growth and bioassays with tobacco tissue. *Physiol. Plantarum*. 15:473-497.
- Halie K. Miller., Laura Kwuan., Leah Schwiesow., David L. Bernick., Erin Mettert., Hector A. Ramirez., James M. Ragle., Patricia P. Chan., Patricia J. Kiley., Todd M. Lowe., Victoria Auerbuch. **2014**. IscR Is Essential for Yersinia



- pseudotuberculosis Type III Secretion and Virulence. *PLoS Pathog* 10(6): e1004194. doi:10.1371/journal.ppat.1004194
- Moran-Medina F. **2004**. Producción de plantas ornamentales en maceta en invernadero. Centro de Agronegocios Tezoyuca. Memorias del IV Simposio Nacional de Horticultura.
- Nachin L., Hassouni M., Loiseau L., Expert D., Barras F. **2001**. SoxR-dependent response to oxidative stress and virulence of *Erwinia chrysanthemi*: the key role of SufC, and orhan ABC ATPase. *Molecular Microbiology* 39: 960-972.
- Nachin L., Loiseau L., Expert D., Barras F. **2003**. SufC: an unorthodox cytoplasmic ABC/ATPase required for [Fe-S] biogenesis under oxidative stress. *The EMBO Journal* 22: 427-437.
- Nesbit A.D., Giel J.L., Rose J.C., Kiley P.J. **2009**. Sequence-specific binding to a subset of IscR-regulated promoters does not require IscR Fe-S cluster ligation. *J Mol Biol.* 387: 28-41.
- Olson J., W.J. Agar, M. Johnson, R.J. Marier. **2000**. Characterization of the NifU and NifS Fe-S cluster formation proteins essential for viability in *Helicobacter pylori*. *Biochemistry* 39: 16213 – 16219.
- Outten F.W., Djaman O., Storz G. **2004**. A suf operón requirement for Fe-S cluster assembly during iron starvation in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* 52: 861-72.
- Pasqual M. **1996**. Enraizamiento de rotacoes de Violeta Africana (*Saintpaulia ionnatha* Weld): Efecio da incubacao em acido indolbutirico. *Ciencia e Agrotecnología* 20: 462-467.
- Pereira C. **2004**. Efeito de la concentracao salina da solucao nutritiva na aclimatacao de plantas micropropagadas de Violeta Africana (*Saintpaulia ionnatha* Wendl). *Revista de Biologia e Ciências da Terra* 4: 44-49.
- Persmark M., Expert D., Neilands J.B. **1989**. Isolation, characterization and synthesis of chrysoactin, a compound with a siderophore activity from *Erwinia chrysanthemi*. *Journal of Biological Chemistry* 264: 3187-3193.
- Promega, **2012**. Technical Manual: pGEM®-T and pGEM®-T, Easy Vector Systems, instructions for use of products. Disponible en internet: <http://worldwide.promega.com/~media/files/resources/protocols/technical%20manuals/0/pgem-t%20and%20pgem-t%20easy%20vector%20systems%20protocol.pdf?la=en>
- Py B., F. Barras. **2010**. Building Fe-S protein: bacterial strategies. *Natural Reviews Microbiology* 8: 439.
- Quiñones A.E., Rincón-Enríquez G. **2011**. Implication of the iron-sulfur (Fe/S) clusters in the plant bacteria pathogenicity. Rodriguez H.R., Aguilar C.N., Simpson-Williamson J.K., Sanchez G.G. Kerala, India. S. G. Pndalai. Pág 5.

- Rajagopalan S., Teter S.J., Zwart P.H, Brennan R.G, Phillips K.J, Kiley P.J. **2013**. Studies of IscR reveal a unique mechanism for metal-dependent regulation of DNA binding specificity. *Nat Struct Mol Biol* 20: 740-747.
- Rincón-Enríquez G., P. Crété, F. Barras, B. Py **2008**. Biogénesis of Fe/S proteins and pathogenicity: IscR plays a key role in allowing *Erwinia chrysanthemi* to adapt to hostile conditions. *Molecular Microbiology* 67: 1257-1273.
- Romsang A., J. Duang-Nkern, P. Leesukon, K. Saninjuk, P. Vattanaviboon, S. Mongkolsuk. **2014**. The iron-sulphur cluster biosynthesis regulator IscR contributes to iron homeostasis and resistance to oxidants in *Pseudomonas aeruginosa*. PLoS ONE 9(1): e86763. doi:10.1371/journal.pone.0086763
- Runyen-Janecky L., Daugherty A., Lloyd B., Wellington C., Eskandarian H., SAGRANSKY M. **2008**. Role and regulation of iron-sulfur cluster biosynthesis genes in *Shigella flexneri* virulence. *Infect Immun.* 76: 1083-1092.
- Sambrook J., Fritsh E. F. and Maniatis T. **1989**. Molecular Cloning a manual second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press Pág. 74
- Samson R., J.B. Legendre., R. Cristen., L.S. Fisher., W. Achouak., L. Gardan. **2005** Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Burkholder *et al.*, 1953) Brenner *et al.*, 1973 and *Brenneria paradisiacal* to the genus *Dickeya* gen. nov. as *Dickeya chrysanthemi* com. Nov and *Dickeya paradisiacal* comb. Nov and deliniation of four novel species. *Dickeya dadantii* sp. nov. *Dickeya dianthicola* sp. nov., *Dickeya dieffebanchiae* sp. nov. And *Dickeya zae* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55: 1415-1427.
- Senapathy R., S.J. Teter., P.H. Zwart., R.G. Brennan, K.J., P.J. Kiley. **2013**. Studies of IscR reveal a unique mechanism for metal-dependent regulation of DNA binding specificity. *Struct Mol Biol.* 20: 740-747
- Sedano-Vargas R. **2012**. Cultivos de violeta africana en el estado de Jalisco. *Revista de origen propio según su experiencia en cultivos ornamentales*, 2: 4-32
- Schwartz C.J., Giel J.L., Patschkowski T., Luther C., Ruzicka F.J., Belmont H., Kiley P.J. **2001**. IscR, an Fe-S cluster-containing transcription factor, represses expression of *Escherichia coli* genes encoding Fe-S cluster assembly proteins. *Proct. Natl. Acad. Sci. USA.* 98: 14895-14900.
- Scandalios JG. **1997**. Molecular genetics of superoxide dismutase in plants. En: Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses. Scandalios JG. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. pp.527-568.
- Starr M.P., Chatterjee A.K. **1972**. The genus *Erwinia* enterobacteria pathogenic to plants and animals. *Annu. Rev. Microbiol.* 26: 389-426.
- Takahashi Y., Nakamura M. **1999**. Functional assignment of the ORF2-iscS-iscU-iscA-hscB-hscA-fdx-ORF3 gene cluster involved in the assembly of Fe-S clusters in *Escherichia coli*. *Biochemistry* 128: 917-926.
- Takahashi Y., Tokumoto U. **2002**. A third bacterial system for the assembly of iron-sulfur clusters with homologs in archaea and plastids. *J. Biol. Chem.* 277: 28380-28383.

- Tong W.H., Jameson G.N., Huynh B.H., Rouault T.A. **2003**. Subcellular compartmentalization of human Nfu, an iron-sulfur cluster scaffold protein, and its ability to assemble a [4Fe-4S] cluster. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 9762-9767.
- Tokumoto U., Takahashi Y. **2001**. Genetic analysis of the *isc* operon in *Escherichia coli* involved in the biogenesis of cellular iron-sulfur proteins. *The Journal of Biochemistry* 130: 63-71.
- Tu B P, Ho-Schleyer S C, Travers K J y Weissman J S. **2000**. Biochemical basis of oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum. *Science* 290: 1571-1574.
- Wächtershäuser G., Huber C. **2007**. Debating evidence for the origin of life on earth response. *Science* 315: 938-939.
- Watanabe S., Kita A., Kobayashi, Miki K. **2008**. Crystal structure of the [2Fe-2S] oxidative stress sensor SoxR bound to DNA. *PNAS* 105: 4121-4126
- Wu C-C, Wang C-K, Chen Y-C, Lin T-H, Jinn T-R, et al. **2014** IscR Regulation of Capsular Polysaccharide Biosynthesis and Iron-Acquisition Systems in *Klebsiella pneumoniae* CG43. *PLoS ONE* 9(9): e107812. doi:10.1371/journal.pone.0107812
- Yeo W. S., J. Lee H., K. Chang L., J. Hye R. **2006**. IscR acts as an activator in response to oxidative stress for the operon encoding Fe-S assembly proteins. *Molecular Microbiology* 61: 206.
- Zheng L., V. Cash L., D. Flint, H., D. Dean R. **1998**. Assembly of iron-sulfur clusters: identificación of an *iscSUA-hscBA-fdx* gene cluster from *Azotobacter vinelandii*. *J. Biol. Chem* 273: 13264-13268.

## Apendice 1. Publicaciones ISBN o ISSN

### Publicaciones ISBN o ISSN

Juárez-García J. C., E. E. Quiñones-Aguilar y G. Rincón-Enríquez. 2013. Implicación de mutaciones de los residuos de cisteínas del regulador transcripcional IscR de *Dickeya dadantii* en la virulencia sobre violeta africana (*Saintpaulia ionantha*). 4<sup>to</sup> Congreso Internacional de Biología, Química y Agronomía. Guadalajara Jalisco. 25-27 de Septiembre de 2013. p. 249-258. (ISBN 978-607-719-003-5).



La información compendiada en éste libro digital proviene de trabajos presentados durante el marco del 4to Congreso Internacional de Biología, Química y Agronomía de la Universidad Autónoma de Guadalajara celebrado del 25 al 27 de septiembre de 2013. La información fue presentada por investigadores y grupos de trabajo especializados sobre quienes recae la responsabilidad de la validez. Los autores, comité editorial y la casa editorial no somos responsables de las consecuencias del uso que se de a la información presentada. Los contenidos no necesariamente reflejan las políticas o puntos de vista de la Universidad Autónoma de Guadalajara ni la mención de productos comerciales o servicios implican compromisos o afiliaciones por parte de ésta.

Se autoriza el uso y distribución de los contenidos, libremente proporcionados por los autores para su compilación y registro ante ISBN, para lo cual se requiere sean citados dando créditos a sus creadores. Cualquier duda o aclaración deberán ser realizadas directamente con los autores correspondientes cuyos datos de contacto están registrados en cada contribución.

Documento de Internet

ISBN: 978-607-719-003-5

EDITORIAL: Universidad Autónoma de Guadalajara, A.C. Av. Patria 1201. Lomas del Valle, Zapopan Jalisco.



## Implicación de mutaciones de los residuos de cisteínas del regulador transcripcional IscR de *Dickeya dadantii* en la virulencia sobre violeta africana (*Saintpaulia ionantha*)

Julio Cesar Juárez-García<sup>1\*</sup>, Evangelina Esmeralda Quiñones-Aguilar<sup>1</sup>, Gabriel Rincón-Enríquez<sup>1+</sup>

<sup>1</sup> Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco.

\*Autor que presentará el trabajo.

<sup>+</sup>Autor a quien la correspondencia deba ser enviada; Avenida Normalistas No. 800, Colonia Colinas de la Normal, CP 44270, Guadalajara, Jalisco MEXICO. Tel 33-33455200 Ext. 1703. grincon@ciatej.net.mx.

Área del Conocimiento: *Biología molecular*

**Resumen:** Los centros hierro-azufre [Fe-S] constituyen cofactores de muchas proteínas que desempeñan diversas funciones de gran importancia en los seres vivos como la respiración, el metabolismo central, la regulación genética, la replicación y reparación del ADN. En los últimos años los mecanismos implicados en la biogénesis de los centros [Fe-S] han sido motivo de intensas investigaciones en varios organismos, incluidos aquellos considerados modelo como la bacteria *Escherichia coli* y la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. En las bacterias la biosíntesis de los centros [Fe-S] está codificada por diferentes grupos de genes organizados en operones, que tienen la capacidad de autorregular su expresión en respuesta a las necesidades de centros [Fe-S] en las proteínas en las cuales son requeridos. A la fecha se han descrito los sistemas Nif, Isc y Suf para la biogénesis de los centros [Fe-S], además del Csd que actúa como fuente potencial de azufre. *Dickeya dadantii* (sin. *Erwinia chrysanthemi*), bacteria fitopatógena que causa pudrición blanda en numerosas plantas de importancia agrícola, posee los cuatro sistemas de biogénesis de centros [Fe-S], lo que parece conferirle alta capacidad virulenta. Se ha mostrado que la proteína IscR regula genes involucrados en la biogénesis de centros [Fe-S] incluyendo a *erpA* y *nfuA*, respiración anaerobia. En la biogénesis de los centros [Fe-S], *iscR* regula negativamente al operon Isc y positivamente al sistema Suf. Esta regulación se atribuye al centro [2Fe-S] de IscR, el cual funciona como un “sensor” de la cantidad de centros disponibles en la célula. Por lo que el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de mutaciones puntuales de los sitios de unión (cisteínas) del centro [Fe-S] en la proteína reguladora IscR sobre la virulencia de *D. dadantii* en *Saintpaulia ionantha*. Los avances que se tienen hasta el momento es la amplificación del gen *iscR* y del

Juárez-García J. C., E. E. Quiñones-Aguilar y G. Rincón-Enríquez. 2014. Participación de las cisteínas de IscR de *Dickeya dadantii* en la virulencia sobre violeta africana (*Saintpaulia ionantha*). Revista Mexicana de Fitopatología 32: S51. (ISSN: 2007-8080).

# REVISTA MEXICANA DE FITOPATOLOGÍA

Mexican Journal of Phytopathology

Vol. 32 Suplemento  
Julio, 2014  
July, 2014

Revista oficial de la Sociedad Mexicana de Fitopatología  
Official publication of the Mexican Phytopathological Society

**Sociedad Mexicana de Fitopatología**  
**Mexican Phytopathological Society**  
Fundada en 1967  
Founded in 1967

**Dirección/Address:**  
Km. 36.5 Carretera México-Texcoco  
C.P. 56230, Montecillo, Mpio. de Texcoco, Edo. de México  
Teléfono/Phone: 01 595 952 0200 ext. 1620  
E-mail: revmexfitopatologia@prodigy.net.mx  
Website: www.socmexfito.org

#### **Directorio/Staff Members**

##### **Presidenta/President**

Dra. María de Jesús Yáñez Morales. Colegio de Postgraduados.

##### **Vice-presidente/Vice-president**

Dr. Santos Gerardo Leyva Mir. Universidad Autónoma Chapingo.

##### **Secretario/Secretary**

Dr. Luciano Martínez Bolaños. Universidad Autónoma Chapingo.

Dr. Ramón Villanueva Arce. Instituto Politécnico Nacional. (Suplente)

##### **Tesorería/Treasury**

M.C. Juan Manuel Tovar Pedraza. Colegio de Postgraduados.

MC. Judith Alfonsina Hernández. Colegio de Postgraduados. (Suplente)

Dra. Patricia Rivas Valencia. INIFAP-Coatlinchan-Texcoco. (Suplente)

---

#### **Revista Mexicana de Fitopatología**

#### **Mexican Journal of Phytopathology**

Revista oficial de la Sociedad Mexicana de Fitopatología  
Official publication of the Mexican Phytopathological Society  
ISSN 2007-8080

#### **Editor en Jefe (Editor in Chief)**

Dr. Gustavo Mora Aguilera. Colegio de Postgraduados.

#### **Editor Técnico (Technical Editor)**

Lic. Ivonne Aracely Sáenz Ortega. RMF.

#### **Editoras(es) Adjuntos (Senior Editors)**

Dra. Sylvia Patricia Fernández Pavía. UMSNH.

Dra. Emma Zavaleta Mejía. Colegio de Postgraduados.

Dra. Irasema del Carmen Vargas Arispuro. CIAD.

Dra. Graciela Dolores Ávila Quezada. CIAD.

Dr. Guillermo Fuentes Dávila. INIFAP.

Dr. Ángel Rebollar Alvirer. Universidad Autónoma Chapingo.

#### **Comité Editorial Internacional**

##### **(International Editorial Advisory Board)**

Dra. Liliana Aragón Caballero. Universidad Nacional Agraria. La Molina, Perú.

Dra. Anna Maselli. Centro Nac. de Investigaciones Agropecuarias, Venezuela.

Dr. R. Kenneth Horst Cornell. University, USA.

Dr. Eduardo R. French. Programa Internacional de la Papa (Retirado), Perú.

Dr. Rodrigo Valverde. Louisiana State University, USA.

Dr. Charles L. Wilson. USDA-ARS, Appalachian Fruit Research Station, USA.

Dr. André Lévesque. Agriculture and Agri-Food, Canada.

Dr. Rafael M. Jiménez Díaz. Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC, España.

Dr. Terence L. Robinson Cornell. University, USA.

Dr. Kenneth Evans Rothamsted. Research, UK.

Dr. Louis K. Prom. USDA-ARS Southern Plains Research Center, USA.

Dr. Rodrigo Rodríguez Kábana. Auburn University, USA.

Dr. Sami Jorge Michereff. Universidad Federal Rural de Pernambuco, Brasil.

XVI Congreso Internacional y XLI Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología

mediante PCR, se realizó con los cebadores: L1 441 y el 63f. La purificación de los productos amplificados se realizó con el kit, QIAEX II (Qiagen) y la secuenciación se realizó en el secuenciador automático de ADN de 16 capilares (Applied Biosystems, modelo 3130xl). Las secuencias de los genes 16S ribosomales de 48 genomas del género *Pseudomonas*, se obtuvieron de la base del NCBI (National Center for Biotechnology Information). Los alineamientos múltiples se realizaron con el software MUSCLE 3.8.31 86 win32 (www.ebi.ac.uk) y el árbol filogenético se construyó con el método Neighbor-Joining con el programa Mega 5.2.2. El ensamblado de las secuencias amplificadas mostró que la similitud ( $\geq 99\%$ ) de las especies de *Pseudomonas* fue a: *P. brenneri*, *P. gessardii*, *P. fragi* o *P. psychrophila* y *P. korensis* o *P. moraviensis*.

115

**MUTACIONES DEL REGULADOR TRANSCRIPCIONAL IScR, UNA HERRAMIENTA PARA LA DISMINUCIÓN DE LA VIRULENCIA EN *Dickeya dadantii*.** [Mutations in the transcriptional regulator IScR, a tool for reducing the virulence of *Dickeya dadantii*] Julio César Juárez-García, Evangelina Quiñones-Aguilar y Gabriel Rincón-Enríquez. CIATEJ. grincon@ciatej.mx

Uno de los agentes causales de la pudrición blanda en plantas es *D. dadantii*, dicha bacteria está entre las diez más estudiadas dada su capacidad de enfermar diversos cultivos de importancia agrícola. Una herramienta para entender su virulencia es la generación de mutaciones de genes involucrados en la respuesta y adaptación al medio ambiente en el que se desarrollan la bacteria cuando interacciona con su huésped. A nivel de proteínas, se ha mostrado que IScR regula dos operones implicados en la adaptación a condiciones de estrés oxidativo, carencia en hierro y a la virulencia, dichos operones codifican para proteínas encargadas de la biogénesis de centros hierro-azufre. En este estudio el objetivo fue emplear como herramienta molecular la generación de mutaciones nulas y puntuales de IScR para evaluar la función de las cisteínas contenidas en esta proteína. Para realizar este estudio se construyó un plásmido con el gen *iscR* interrumpido por *aphA-3* (mutante nulo) en un fragmento de 4350 pb, esta construcción se insertó en la cepa silvestre 3937 de *D. dadantii* y se realizaron subcultivos sin presión de selección para promover doble recombinación homóloga del gen silvestre *iscR*, se obtuvieron recombinantes simples y se continúa con la recombinación para obtener una cepa doble recombinante. Por otro lado, se construyeron tres mutantes puntuales de cisteínas de IScR. Se comprobó la sustitución de las cisteínas por alaninas en IScR y se observó un impacto negativo en el crecimiento de un mutante nulo IScR sobre estrés oxidativo. Patrocinador FONSEC SEP-CONACYT, Ciencia Básica (99501).

116

**BACTERIAS ENDOFÍTICAS ASOCIADAS A LA RAÍZ DE MAÍZ EN TRES LOCALIDADES DE MÉXICO.** [Endophytic bacteria associated to maize roots of three localities from México]. Alma Sánchez-Bautista<sup>1</sup>, Carlos De León-García de Alba<sup>1</sup>, Sergio Aranda-Ocampo<sup>1</sup>, Emma Zavaleta-Mejía<sup>1</sup> y George Mahuku<sup>2</sup>. <sup>1</sup>Colegio de Postgraduados, Instituto de Fitosanidad; <sup>2</sup>Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo. Patología de Maíz. zancheza@gmail.com

La presencia de bacterias endofíticas puede ejercer efectos específicos deseables en el desarrollo vegetal y rendimiento del maíz, entre los que se puede citar la producción de fitohormonas, fijación de nitrógeno atmosférico, producción de sideróforos y sustancias antimicrobicas, entre otras. Dentro de este contexto, el objetivo del presente estudio fue aislar bacterias endofíticas cultivables asociadas a raíces de 14 líneas de mejoramiento de maíz *Zea mays* L. cultivadas en tres localidades de México. Las poblaciones bacterianas endofíticas se aislaron en medios de cultivo nutritivos. Las colonias bacterianas se agruparon con base en la observación directa de sus características fenotípicas y culturales. Se realizó la extracción del ADN y se amplió el fragmento 16S con los iniciadores 27F y 1492R por PCR. Las secuencias obtenidas de la PCR se compararon con las existentes en la base de datos del GenBank de la NCBI y el análisis arrojó una similitud del 96% en todos los casos con los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Burkholderia*, *Stenotrophomas*, *Sinorhizobium*, *Chryso bacterium*, *Agrobacterium*, *Acinetobacter*, *Klebsiella* y *Serratia*. Dentro de las bacterias identificadas destacan algunos géneros conocidos como antagonistas eficientes de hongos fitopatógenos, fijadores de N y productores de sideróforos. En las raíces de maíz existe gran diversidad de bacterias endofíticas cultivables que puede constituir una fuente de recursos microbianos para aplicaciones biotecnológicas.

117

**APERTURA ESTOMÁTICA DE PLANTAS DE FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L.) AL TIZÓN COMÚN MEDIANTE INDUCTORES DE RESISTENCIA SISTÉMICA.** [Stomatal opening of bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.) to "Common Bacterial Blight" and the inducer systemic resistance] Nazario Francisco-Francisco, Gabriel Gallegos-Morales y Francisco Daniel Hernández-Castillo. Departamento de Parasitología, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, Coahuila, México. fafnaz@hotmail.com

La inducción de la resistencia sistémica es un fenómeno ampliamente estudiado, sin embargo aún se requiere de manera específica explicar como ocurre morfológicamente en distintas plantas. El objetivo del

Juárez-García J. C., E. E. Quiñones-Aguilar y G. Rincón-Enríquez. 2014. Mutaciones del regulador transcripcional IscR, una herramienta para la disminución de la virulencia en *Dickeya dadantii*. Revista Mexicana de Fitopatología 32: S96. (ISSN: 2007-8080).

# REVISTA MEXICANA DE FITOPATOLOGÍA

Mexican Journal of Phytopathology

Vol. 32 Suplemento  
Julio, 2014  
July, 2014

Revista oficial de la Sociedad Mexicana de Fitopatología  
Official publication of the Mexican Phytopathological Society

**Sociedad Mexicana de Fitopatología**  
**Mexican Phytopathological Society**  
Fundada en 1967  
Founded in 1967

**Dirección/Address:**

Km. 36.5 Carretera México-Texcoco  
C.P. 56230, Montecillo, Mpio. de Texcoco, Edo. de México  
Teléfono/Phone: 01 595 952 0200 ext. 1620  
E-mail: revmexfitopatologia@prodigy.net.mx  
Website: www.socmexfito.org

**Directorio/Staff Members**

**Presidenta/President**

Dra. María de Jesús Yáñez Morales. Colegio de Postgraduados.

**Vice-presidente/Vice-president**

Dr. Santos Gerardo Leyva Mir. Universidad Autónoma Chapingo.

**Secretario/Secretary**

Dr. Luciano Martínez Bolaños. Universidad Autónoma Chapingo.

Dr. Ramón Villanueva Arce. Instituto Politécnico Nacional. (Suplente)

**Tesorería/Treasury**

M.C. Juan Manuel Tovar Pedraza. Colegio de Postgraduados.

MC. Judith Alfonsina Hernández. Colegio de Postgraduados. (Suplente)

Dra. Patricia Rivas Valencia. INIFAP-Coatlinchan-Texcoco. (Suplente)

---

**Revista Mexicana de Fitopatología**

**Mexican Journal of Phytopathology**

Revista oficial de la Sociedad Mexicana de Fitopatología

Official publication of the Mexican Phytopathological Society

ISSN 2007-8080

**Editor en Jefe (Editor in Chief)**

Dr. Gustavo Mora Aguilera. Colegio de Postgraduados.

**Editor Técnico (Technical Editor)**

Lic. Ivonne Aracely Sáenz Ortega. RMF.

**Editoras(es) Adjuntos (Senior Editors)**

Dra. Sylvia Patricia Fernández Pavía. UMSNH.

Dra. Emma Zavaleta Mejía. Colegio de Postgraduados.

Dra. Irasema del Carmen Vargas Arispuro. CIAD.

Dra. Graciela Dolores Ávila Quezada. CIAD.

Dr. Guillermo Fuentes Dávila. INIFAP.

Dr. Ángel Rebolgar Alvirer. Universidad Autónoma Chapingo.

**Comité Editorial Internacional**

**(International Editorial Advisory Board)**

Dra. Liliana Aragón Caballero. Universidad Nacional Agraria. La Molina, Perú.

Dra. Anna Maselli. Centro Nac. de Investigaciones Agropecuarias, Venezuela.

Dr. R. Kenneth Horst Cornell. University, USA.

Dr. Eduardo R. French. Programa Internacional de la Papa (Retirado), Perú.

Dr. Rodrigo Valverde. Louisiana State University, USA.

Dr. Charles L. Wilson. USDA-ARS, Appalachian Fruit Research Station, USA.

Dr. André Lévesque. Agriculture and Agri-Food, Canada.

Dr. Rafael M. Jiménez Díaz. Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC, España.

Dr. Terence L. Robinson Cornell. University, USA.

Dr. Kenneth Evans Rothamsted. Research, UK.

Dr. Louis K. Prom. USDA-ARS Southern Plains Research Center, USA.

Dr. Rodrigo Rodríguez Kábana. Auburn University, USA.

Dr. Sami Jorge Michereff. Universidad Federal Rural de Pernambuco, Brasil.



XVI Congreso Internacional y XLI Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología

*oxisporum*, *Fusarium solani* y *Rhizoctonia solani* destacando el efecto de *Larrea tridentata*.

29

**INTERACCIÓN DEL DAÑO DE GUSANO ELOTERO CON PUDRICIÓN DE MAZORCA POR *Fusarium* sp. EN MAÍZ GENÉTICAMENTE MODIFICADO.** [Interaction between corn earworm damage with corn rot by *Fusarium* sp. on genetically modified corn] Luis Aguirre-Urbe, Agustín Hernández-Juárez, Gustavo Frías-Treviño, Mariano Flores-Dávila, Ernesto Cerna-Chávez, Jerónimo Landeros-Flores y Yisa Ochoa-Fuentes. Departamento de Parasitología, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. luisaguirreu@yahoo.com.mx

El desarrollo de maíces con la endotoxina de *Bacillus thuringiensis* (Bt) ha demostrado menor pudrición de mazorca. El objetivo fue comparar los híbridos Agrisure 3000 GT (Cry1Ab y mCry3A) y Agrisure 3110 (Cry1Ab y Vip3Aa20) y sus híbridos convencionales, con pudrición en la mazorca por *Fusarium* sp. y su interacción con el daño por gusano elotero. Se establecieron 6 tratamientos y 4 repeticiones con y sin control de insectos usando Permetrina, lambda-cyhalotrina y Benzoato de emamectina. Se evaluó la incidencia y severidad en mazorcas por *Fusarium* sp., usando un diseño completamente al azar y medias de Scheffé ( $P \leq 0.05$ ). El porcentaje de mazorcas afectadas por *Fusarium* sp. fue significativamente menor en ambos híbridos Bt. El Agrisure 3000 GT presentó un 12.5% de mazorcas dañadas, en comparación con el convencional con 48.3 y 83.1% con y sin tratamiento químico. La pudrición fue de 9.54% en el Agrisure 3000 GT y sus convencionales presentaron 24.63 y 63.08% con y sin tratamiento insecticida. El Agrisure 3110 presentó 0.3% de mazorcas dañadas y sus convencionales 29.7 y 60.8% con y sin tratamiento químico; la pudrición de mazorcas en Agrisure 3110 fue 0.07%, mientras un 11.62 y 41.44% en el maíz convencional con y sin tratamiento químico. Los híbridos con el Bt previenen el daño por gusano elotero, eliminando la entrada de *Fusarium* sp., confiriendo protección para enfermedades de la mazorca y la intoxicación por micotoxinas.

30

**REACCIÓN DE CLONES DE CAÑA DE AZÚCAR AL CARBÓN (*Sporisorium scitamineum* (Syd.) Piepenbr & Oberw.) EN CONDICIONES DE INVERNADERO.** [Reaction of sugarcane clones to carbon (*Sporisorium scitamineum* (Syd.) Piepenbr & Oberw.) in greenhouse conditions] Marianguadalupe Hernández-Arenas<sup>1</sup>, Rogelio Miranda-Marini<sup>2</sup>, Ernesto Bravo-Mosqueda<sup>3</sup> y Edwin Javier Barrios-Gómez<sup>1</sup>. <sup>1</sup>INIFAP-Zacatepec, <sup>2</sup>INIFAP-Cotaxtla, <sup>3</sup>INIFAP-Valles Centrales de Oaxaca. hernandez.marian@inifap.gob.mx

El carbón de la caña de azúcar (*Sporisorium scitamineum*) es una de las enfermedades más dañinas, ya que en variedades susceptibles se pueden perder plantaciones enteras. La

severidad de la enfermedad depende del grado de susceptibilidad de las variedades. Con el objetivo de determinar el comportamiento de 38 clones (34 experimentales serie ATEMEX 03 y cuatro testigos comerciales) de caña de azúcar a la enfermedad del carbón se llevó a cabo un experimento en Zacatepec, Morelos utilizando el método de inoculación artificial por inmersión de esquejes. Un total de 12 yemas de cada variedad, se introdujeron en una solución de inóculo con carbón (2 g de masa carbonosa/L de agua) donde se dejaron remojar por una hora. Las yemas fueron sembradas en macetas en condiciones de invernadero y se les proporcionó un riego ligero. Se determinó el porcentaje de infección de cepas con las Escalas Descriptivas para Evaluación de Enfermedades de la Caña de Azúcar (Chavarria, 2006). Un total de 24 clones y las cuatro variedades comerciales fueron clasificadas como resistentes; dos clones moderadamente resistentes; dos susceptibles y seis altamente susceptibles. Los clones que desarrollaron la enfermedad serán eliminados del programa de selección de variedades. El método de inoculación de carbón mediante inmersión de yemas de caña en solución de esporas es efectivo para causar la enfermedad en las plantas. Los síntomas de carbón se presentaron a los 30 días después de la siembra de yemas inoculadas, por lo que es un método eficiente y rápido para descartar variedades susceptibles.

31

**PARTICIPACIÓN DE LAS CISTEÍNAS DE IScR DE *Dickeya dadantii* EN LA VIRULENCIA SOBRE VIOLETA AFRICANA (*Saintpaulia ionantha*).** [Participation of cysteines of IScR of *Dickeya dadantii* in virulence on african violet (*Saintpaulia ionantha*)] Julio César Juárez-García, Evangelina Esmeralda Quiñones-Aguilar y Gabriel Rincón-Enríquez\*. CIATEJ. \*grincon@ciatej.mx

Los centros hierro-azufre [Fe-S] constituyen cofactores de proteínas que desempeñan funciones de gran importancia en los seres vivos; en bacterias la biosíntesis de los centros [Fe-S] está codificada por tres operones, los cuales tienen la capacidad de autorregular su expresión en respuesta a las necesidades de la célula. *Dickeya dadantii* es una bacteria fitopatógena que causa pudrición blanda en plantas de importancia agrícola, posee tres operones de biogénesis de centros [Fe-S], lo que parece conferirle alta capacidad de virulencia. IScR regula los genes involucrados en la biogénesis de centros [Fe-S] y en el cual existen tres residuos cisteínas que juegan un rol importante en su función. Por lo cual, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de mutaciones puntuales de las cisteínas del regulador transcripcional *iscR* de *D. dadantii* sobre la virulencia en *Saintpaulia ionantha*. Se concluyó la construcción de un plásmido que contiene una región homóloga de ADN al operón ISC, la cual contiene el mutante nulo del gen *iscR*; el plásmido se insertó en la cepa silvestre de *D. dadantii* para promover recombinación homóloga mediante subcultivos y generar un mutante nulo *iscR*, a la par se tienen tres mutantes puntuales de cada una de las cisteínas de IScR y un mutante

## Apendice 2. Participacion en Congresos

Juárez-García J.C., E.E. Quiñones-Aguilar y G. Rincón-Enríquez. 2012. Estudio del efecto de mutaciones del regulador transcripcional *iscR* de *Dickeya dadantii* sobre su patogenicidad en violeta africana (*Saintpaulia ionantha*). (Cartel). In: XXIX Congreso Nacional de Bioquímica, Sociedad Mexicana de Bioquímica A.C. 11 al 17 de noviembre, Oaxaca, Oaxaca México.



**Sociedad Mexicana de Bioquímica, A.C.**

FUNDADA EN 1957

AV. CIPRESSES S/N COL. SAN ANDRÉS TOTOLTEPEC,  
C.P. 14400 MÉXICO, D.F. (CASA TLALPAN)  
APARTADO POSTAL 70-600  
TEL. Y FAX: 5622-5742  
TEL. 5622-5603  
http://smb.org.mx  
Correo electrónico: smbq@ifc.unam.mx

MESA DIRECTIVA 2011 - 2013

PRESIDENTE  
DR. JESÚS AGUIRRE LINARES

VICE-PRESIDENTE  
DRA. ALICIA GONZÁLEZ MANJARREZ

SECRETARIO TESORERO  
DR. EMILIO ROJAS DEL CASTILLO

SUB-SECRETARIO TESORERO  
DRA. MARÍA EUGENIA GONSEBATT  
BONAPARTE

La Sociedad Mexicana de Bioquímica otorga la presente

## CONSTANCIA

a

*Julio César Juárez García*

Quien asistió y presentó el trabajo

**Estudio del efecto de mutaciones del regulador transcripcional  
*iscR* de *Dickeya dadantii* sobre su patogenicidad en violeta  
africana (*Saintpaulia ionantha*)**

Por:

Julio César Juárez García, Evangelina Esmeralda Quiñones  
Aguilar y Gabriel Rincón Enríquez.

En la modalidad de cartel durante el XXIX Congreso Nacional de  
Bioquímica del 11 al 17 de Noviembre de 2012 en Oaxaca, Oax.

Atentamente

Por el Comité Organizador



Dr. Jesús Aguirre Linares

**Congreso de Biología, Química y Agronomía 2013**

**Juárez-García J. C., E. E. Quiñones-Aguilar y G. Rincón-Enríquez. 2013.** Implicación de mutaciones de los residuos de cisteínas del regulador transcripcional IscR de *Dickeya dadantii* en la virulencia sobre violeta africana (*Saintpaulia ionantha*). (Poster). 4<sup>to</sup> Congreso Internacional de Biología, Química y Agronomía. Guadalajara Jalisco. 25-27 de Septiembre de 2013.




 Congreso Internacional  
**Biología, Química  
 y Agronomía**

La Universidad Autónoma de Guadalajara  
 a través de la  
 Facultad de Ciencias Químicas y de la  
 Escuela de Ciencias Biológico-Agropecuarias  
 otorga el presente

# Reconocimiento

a **Julio César Juárez García, Evangelina Esmeralda Quiñones Aguilar, Gabriel Rincón Enríquez**

por su trabajo titulado: *Implicación de mutaciones de los residuos de cisteínas del regulador transcripcional IscR de Dickeya dadantii en la virulencia sobre violeta africana (Saintpaulia ionantha).*

4o. Congreso Internacional de Biología, Química y Agronomía  
**“Innovación para el Desarrollo Sustentable”**, celebrado del 25 al 27 de septiembre de 2013.

Zapopan, Jalisco, México, septiembre de 2013.

  
 Ing. José Antonio Barriga de la Torre  
 Decano de la Unidad Académica de  
 Diseño, Ciencia y Tecnología

  
 Ing. Tomás Ornelas Salas  
 Director de la Facultad de Ciencias Químicas

**Trasciende  
 con VALORES.**

 UAG  
 Universidad Autónoma  
 de Guadalajara

**Congreso Bioquímica y Biología Molecular de Bacterias 2013**

Juárez-García J. C., D. E. Navarro-López, E. E. Quiñones-Aguilar, J. A. Qui-Zapata and G. Rincón-Enríquez. **2013.** Characterization of mutant *iscR* of *Dickeya dadantii* for the biogenesis in clusters [Fe-S]. (Poster). III Congreso de Bioquímica y Biología Molecular de Bacterias. Sociedad Mexicana de Bioquímica, A.C. 3-7 Octubre de 2013, Cuatro Ciénegas, Coahuila.



**La Rama de Bioquímica y Biología Molecular de Bacterias  
Sociedad Mexicana de Bioquímica, A.C.**

Otorga la presente constancia a:

**Julio César Juárez García**

Quien asistió y presentó el trabajo:

**Characterization of mutant *iscR* of *Dickeya dadantii* for the biogenesis in clusters [Fe-S]**

Por:

Julio Cesar Juárez-García, Diego Eloyr Navarro-López, Evangelina Esmeralda Quiñones-Aguilar,  
Joaquín Alejandro Qui-Zapata, Gabriel Rincón-Enríquez

En la modalidad de cartel durante el III Congreso de Bioquímica y Biología Molecular de Bacterias del 03 al 07 de octubre de 2013 en Cuatro Ciénegas, Coahuila.

Atentamente

Por el Comité Organizador



Dr. Edmundo Calva Mercado



Dr. Christian Sohlenkamp



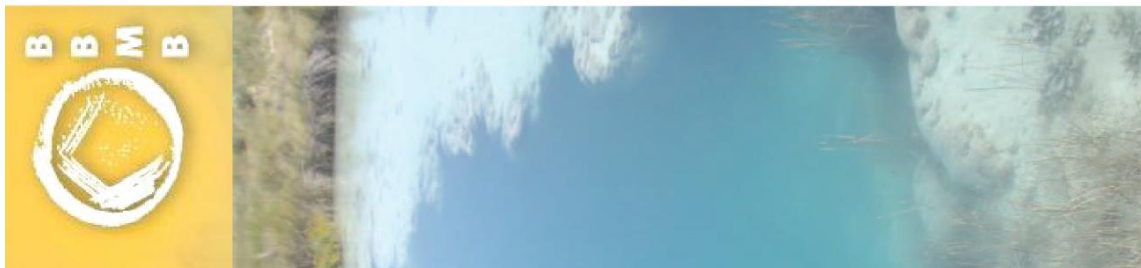
Dra. Gabriela Olmedo Álvarez



Dra. Herminia Loza Tavera



Dra. Valeria Souza Saldívar



**Congreso de Fitopatología 2014**

**Juárez-García J. C.**, E. E. Quiñones-Aguilar y G. Rincón-Enríquez. **2014.** Participación de las cisteínas de IscR de *Dickeya dadantii* en la virulencia sobre violeta africana (*Saintpaulia ionantha*). XVI Congreso Internacional y XLI Congreso Nacional de Fitopatología. Sociedad Mexicana de Fitopatología, A.C. 20 al 24 de Julio, Ixtapan de la Sal Estado de México, México. (Cartel).



**XVI CONGRESO INTERNACIONAL Y XLI CONGRESO NACIONAL  
DE LA SOCIEDAD MEXICANA DE FITOPATOLOGÍA**

Del 20 al 24 de julio de 2014, Ixtapan de la Sal, Estado de México, México

La Sociedad Mexicana de Fitopatología otorga la presente

**CONSTANCIA A:**

**Julio César Juárez García**

**Por su participación como PONENTE en modalidad CARTEL del trabajo: "MUTACIONES DEL  
REGULADOR TRANSCRIPCIONAL IscR, UNA HERRAMIENTA PARA LA DISMINUCIÓN DE LA  
VIRULENCIA EN *Dickeya dadantii*". Por: Julio César Juárez-García, Evangelina Quiñones-  
Aguilar y Gabriel Rincón-Enríquez.**

  
**Dra. María de Jesús Yáñez Morales**  
 Presidenta - Sociedad Mexicana de Fitopatología

  
**Dr. Ramón Villanueva Arce**  
 Coordinador del Comité Local



Juárez-García J. C., E. E. Quiñones-Aguilar y G. Rincón-Enríquez. 2014. Mutaciones del regulador transcripcional IscR, una herramienta para la disminución de la virulencia en *Dickeya dadantii*. XVI Congreso Internacional y XLI Congreso Nacional de Fitopatología. Sociedad Mexicana de Fitopatología, A.C. 20 al 24 de Julio, Ixtapan de la Sal Estado de México, México. (Oral).



**XVI CONGRESO INTERNACIONAL Y XLI CONGRESO NACIONAL  
DE LA SOCIEDAD MEXICANA DE FITOPATOLOGÍA**

Del 20 al 24 de julio de 2014. Ixtapan de la Sal, Estado de México, México

La Sociedad Mexicana de Fitopatología otorga la presente

**CONSTANCIA:**

**Julio César Juárez García**

Por su participación como **PONENTE** en presentación **ORAL** del trabajo: **"PARTICIPACIÓN DE LAS CISTEÍNAS DE IscR DE *Dickeya dadantii* EN LA VIRULENCIA SOBRE VIOLETA AFRICANA (*Saintpaulia ionantha*)"**. Por: Julio César Juárez-García, Evangelina Esmeralda Quiñones-Aguilar y Gabriel Rincón-Enríquez.

**Dra. María de Jesús Yáñez Morales**  
Presidenta - Sociedad Mexicana de Fitopatología

**Dr. Ramón Villanueva Arce**  
Coordinador del Comité Local

Logos of participating institutions: CONACYT, Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, SAGARPA, and others.

**Congreso Bioquímica 2014**

Rincón-Enríquez G., D. E. Navarro-López, J. C. Juárez-García, E. E. Quiñones-Aguilar and J. A. Qui-Zapata. 2014. The ISC genetic system involved in the virulence of pathogenic bacteria of plant. XXX Congreso Nacional de Bioquímica, 2 al 8 de noviembre, Guadalajara, Jalisco México. (Cartel).



**Sociedad Mexicana de Bioquímica, A.C.**

FUNDADA EN 1957

AV. CIPRESES S/N COL. SAN ANDRÉS TOTOLTEPEC.  
C.P. 14400 MÉXICO, D.F. (CASA TLALPAN)  
APARTADO POSTAL 70-606  
TEL. Y FAX: 5622-5742  
http://smb.org.mx  
Correo electrónico: smbq@fc.unam.mx

MESA DIRECTIVA 2013 - 2015

PRESIDENTE  
DRA. ALICIA GONZÁLEZ MANJARREZ

VICE-PRESIDENTE  
DR. MIGUEL LARA FLORES

SECRETARIO TESORERO  
DRA. MARIA EUGENIA GONSEBATT  
BONAPARTE

SUB-SECRETARIO TESORERO  
DRA. ELDA GUADALUPE ESPIN OCAMPO

SOCIOS FUNDADORES

Dr. Barbarín Arreguín Lozano  
Dr. Edmundo Calva Cuadrilla  
Dr. Guillermo Carvajal Sandoval (†)  
Dr. Joaquín Cravioto (†)  
Dr. Carlos del Río Estrada (†)  
Dr. Silvestre Frenk Freund  
Dr. Mario García Hernández (†)  
Dr. Jesús Guzmán García (†)  
Dr. Jesús Kumate Rodríguez  
Dr. José Laguna García (†)  
Dr. Guillermo Massieu Helguera (†)  
Dr. Raúl Ondarza Vidaurreta  
Dr. Efraín G. Pardo Codina  
Dr. Guillermo Soberón Acevedo

La Sociedad Mexicana de Bioquímica otorga la presente

**CONSTANCIA a:**

*Gabriel Rincón Enríquez*

Quien asistió y presentó el trabajo:

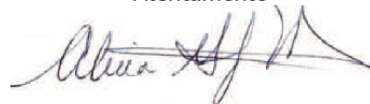
**The ISC Genetic System Involved in the Virulence of  
Pathogenic Bacteria of Plant**

Por:

Gabriel Rincón-Enríquez, Diego Eloyr Navarro-López, Julio Cesar Juárez-García, Evangelina Esmeralda Quiñones-Aguilar, Joaquín Alejandro Qui-Zapata

En la modalidad de cartel durante el XXX Congreso Nacional de Bioquímica del 2 al 8 de noviembre de 2014 en Guadalajara, Jal.

Atentamente



**Dra. Alicia González Manjarrez**  
Presidente

### Apéndice 3. Medios de cultivo empleados en este trabajo de investigación

<b>Medio rico Luria-Bertani (LB)</b>	
<b>Componentes</b>	<b>Proporción en volumen final de 1 L (g)</b>
Extracto de levadura	5
NaCl	10
Triptona	10
Agar	15

Fuente: Miller, 1972.

<b>Medio rico para electroporación: SOC</b>	
<b>Componentes</b>	<b>Proporción en volumen final de 1 L (g)</b>
Extracto de levadura	5.000
Triptona	20.000
KCl	0.186
MgCl <sub>2</sub>	0.952
NaCl	0.584
Glucosa (20%)	3.603

Fuente: Sambrook *et al.*, 1989.

<b>Medio mínimo M9</b>	
<b>Componentes</b>	<b>Proporción en volumen final de 1 L (mL)</b>
M9X50	200.0
MgSO <sub>4</sub> (1 M)	2.0
CaCl <sub>2</sub> (1 M)	0.1
<b>M9-50X proporción en un volumen de 1 L (g)</b>	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	64.0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	15.0
NaCl	2.5
NH <sub>4</sub> Cl	5.0

Fuente: Miller, 1972.



<b>Medio MS (Murashige &amp; Skoog, 1962)</b>	
<b>Compuesto</b>	<b>mg/L (mM)</b>
<b>Macronutrientes</b>	
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650 (20.6)
KNO <sub>3</sub>	1900 (18.8)
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	370 (1.5)
CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O	440 (2.99)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170 (1.25)
<b>Micronutrientes</b>	
KI	0.83 (0.005)
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2 (0.1)
MnSO <sub>4</sub> *4H <sub>2</sub> O	22.3 (0.13)
ZnSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	8.6 (0.029)
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O	0.25 (0.01)
CuSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O	0.025 (0.0001)
CoCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O	0.025 (0.0001)
Na <sub>2</sub> EDTA	37.3 (0.1)
FeSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	27.8 (0.1)
<b>Aminoácidos</b>	
Glicina	2
<b>Vitaminas</b>	
Tiamina HCL	0.50
Piridoxina	0.50
Acido nicotinico	0.50
Myo-inositol	100
<b>Sacarosa</b>	<b>30000</b>
<b>Agar</b>	<b>8000</b>

Fuente: Murashige y Skoog, 1962

- Al medio de enraizamiento se le adicionó 2g/L de carbón activado.