



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas

Tesis

**Generación de mutantes puntuales del gen *cdgD* en
Azospirillum baldaniorum Sp245**

QUE PARA OBTENER EL GRADO:

MAESTRA EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA)

PRESENTA:

BIOL. DULCE ANDREA MONTES PEREZ

Director de tesis:

DR. ALBERTO RAMIREZ MATA

Puebla Pue. México

Enero de 2026



BUAP

Puebla, Pue. a 12 de enero 2026.

A LA ACADEMIA DEL POSGRADO
EN MICROBIOLOGÍA
CICM-ICUAP
PRESENTE.

Por este conducto los abajo firmantes, integrantes del Comité revisor de tesis de Maestría de la alumna **Dulce Andrea Montes Pérez**, les informamos que hemos revisado el escrito titulado:

"Generación de mutantes puntuales del gen *cdgD* en *Azospirillum baldaniorum* Sp245"

A nuestro juicio, la alumna **Dulce Andrea Montes Pérez** puede proceder a la digitalización de la tesis y a la presentación del examen de grado correspondiente.

Sin más que agregar, nos despedimos afectuosamente de ustedes.

Atentamente.
"Pensar Bien Para Vivir Mejor"


D.C. Sandra Raquel Reyes Carmona


D.C. Gerardo Santos López


D.C. Claudia Mancilla Simbro


D.C. Alejandro Carabarin Lima

ABREVIATURAS

PGPR: Rizobacterias Promotoras del Crecimiento de las Plantas

NO: Óxido Nítrico

UFC: Unidades Formadoras de Colonias

HGT: Transferencia horizontal de genes

EPS: Exopolisacáridos

LPS: Lipopolisacáridos

di-GMPc: Ácido di-(3'-5') guanosín monofosfato

DGC: Diguanilato ciclasa

PDE: Fosfodiesterasa

GTP: Guanosín trifosfato

CdgD: Diguanilato ciclasa D

LB: Luria Bertani

Nfb: Fijación biológica de nitrógeno

RC: Rojo Congo

Km: Kanamicina

Gm: Gentamicina

Ap: Ampicilina

DO: Densidad óptica

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primer lugar a Dios por haberme permitido culminar esta etapa tan importante de mi formación académica, por darme la fortaleza para continuar durante los retos del posgrado y por acompañarme a lo largo de este camino.

A mi familia, por su amor, apoyo y paciencia incondicional. A mis padres, por creer en mí, por impulsarme a seguir mis metas y por estar siempre presentes en cada etapa de mi formación, incluso cuando mis explicaciones científicas parecían más un idioma extraño que una conversación normal. A mi hermana, por ser un apoyo constante y por saber que siempre puedo contar con ella.

A mi asesor de tesis, el Dr. Alberto Ramírez Mata, agradezco especialmente su paciencia, orientación y disposición durante el desarrollo de este trabajo, así como los comentarios que permitieron mejorar y concluir esta tesis.

A la Dra. Sandra, por sus comentarios, consejos y apoyo dentro del laboratorio.

A la Mtra. María, por su ayuda constante, su disposición y por estar siempre al pendiente del trabajo experimental, lo cual facilitó el avance de este proyecto.

A la Dra. Baca, agradezco el apoyo brindado en la etapa inicial de este trabajo.

A mis compañeros y amigos del laboratorio, Maggie, Nora y Cristian, por el apoyo diario, las discusiones científicas, la ayuda en el laboratorio y los momentos de convivencia que hicieron más llevadero el posgrado.

Un agradecimiento muy especial a Fernanda, quien me motivó a estudiar la maestría en este programa y fue un impulso importante para dar este paso en mi formación académica. Gracias por la confianza y el apoyo.

A cDra. Itzel, mi roomie, gracias por el apoyo, la paciencia y las conversaciones que siempre venían acompañadas de una mente crítica, analítica y, según ella misma, excepcionalmente brillante.

A todos los profesores, compañeros y personal académico que, de manera directa o indirecta, contribuyeron a mi formación durante estos años de maestría, gracias por las enseñanzas y experiencias compartidas.

Finalmente, agradezco a la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI) por la beca otorgada durante el desarrollo de esta maestría, así como a la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado por el apoyo brindado para la realización y conclusión de este trabajo.

INDICE

ABREVIATURAS	3
RESUMEN.....	7
SUMMARY	8
1. INTRODUCCION.....	9
1.1. Rizosfera.....	9
1.2. Género <i>Azospirillum</i>	10
1.2.1. <i>Azospirillum baldaniorum</i> Sp245.....	11
1.2.2. Interacción de <i>Azospirillum</i> con la planta.....	11
1.3. Movilidad y quimiotaxis	12
1.4. Biopelículas	14
1.5. El segundo mensajero c-di-GMP	15
1.5.1. Síntesis del c-di-GMP	17
1.5.2. Degradación del di-GMPc	18
1.6. Proteínas híbridas	18
1.7. Dominios de señalización en bacterias	19
1.7.1. Dominios PAS	20
2. ANTECEDENTES	21
3. JUSTIFICACION	22
4. OBJETIVO GENERAL	23
4.1. OBJETIVOS ESPECIFICOS	23
5. HIPOTESIS	23
6. MATERIAL Y METODOS	24
6.1. Diagrama de trabajo	24
5.2. Material biológico	25
5.3. Medios y condiciones de cultivo.....	27
5.4. Análisis bioinformático.....	28
5.5. Diseño de mutaciones y construcción de plásmidos	28
5.6. Cuantificación relativa de c-di-GMP a través de un biosensor de c-di-GMP	29
5.7. Ensayo de movilidad.....	30
5.8. Análisis estadístico	31
6. RESULTADOS	32
6.2. Arquitectura modular de CdgD en <i>A. baldaniorum</i> sp245.....	32

6.3.	Caracterización <i>in silico</i> del dominio PAS.....	32
6.4.	Ensayos de acoplamiento molecular del dominio PAS	36
6.5.	Construcción de las variantes genéticas de <i>cdgD</i>	38
6.6.	Estimación de los niveles intracelulares de c-di-GMP	40
6.7.	Validación de mutantes puntuales	43
6.8.	Ensayos de movilidad.....	46
7.	DISCUSION.....	50
8.	CONCLUSION.....	54
9.	REFERENCIAS	55

RESUMEN

Las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR), como *Azospirillum baldaniorum* Sp245, dependen del segundo mensajero c-di-GMP para ajustar la transición entre estilos de vida móviles y sésiles durante la colonización de la rizosfera. En esta especie, la proteína híbrida CdgD presenta la arquitectura CHASE-PAS-GGDEF-EAL, lo que sugiere que combina dominios sensores con dominios catalíticos para controlar los niveles de c-di-GMP. El objetivo de la investigación fue estudiar cómo el dominio PAS y los centros catalíticos GGDEF y EAL de CdgD influyen en la motilidad de *A. baldaniorum* Sp245. Para ello, se generaron mutantes puntuales en los motivos conservados GGDEF (mutante GGKEF, D584K) y EAL (mutante AAL, E710A) para modificar de forma específica las actividades de diguanilato ciclasa y fosfodiesterasa de estos dominios proteicos. De manera paralela, se realizó un análisis bioinformático del dominio PAS de la CdgD, realizando un modelado con I-TASSER, con el que se comparó con dominios PAS cristalizados, el modelado estructural y el alineamiento con dominios PAS cristalizados confirmaron que el dominio conserva el pliegue α/β característico y se identificaron regiones importantes dentro de su cavidad interna: una cisteína central (Cys407) y una hélice α conservada. Con base en este análisis, se diseñaron dos mutantes adicionales en el dominio PAS: C407S y la eliminación de la α hélice conservada ($\alpha 2$). Las mutantes puntuales se realizaron en el plásmido pBBRcdgD. Las variantes catalíticas (GGKEF y AAL), junto con la construcción cdgD silvestre, se evaluaron en un sistema heterólogo de *Escherichia coli* AR3110 portador del plásmido pDZ-2, que contiene un riboswitch sensible a c-di-GMP acoplado a las proteínas fluorescentes TurboRFP y AmCyan; la razón RFP/AmCyan se utilizó como indicador relativo de los niveles intracelulares de c-di-GMP. Posteriormente, todas las construcciones (cdgD, GGKEF, AAL, C407S y $\Delta\alpha H$) se introdujeron por conjugación en *A. baldaniorum* Sp245 y se realizaron ensayos de movilidad en medios mínimos semisólidos con prolina o malato como fuentes de carbono. Las mutantes mostraron cambios en la señal del biosensor consistentes con una menor contribución de la actividad diguanilato ciclasa en la mutante GGKEF y con una alteración de la actividad fosfodiesterasa en la mutante AAL. En *A. baldaniorum* Sp245, ambas variantes modificaron el diámetro de los halos de motilidad en comparación con la cepa silvestre. Las mutantes del dominio PAS (C407S y $\Delta\alpha H$) también afectaron la motilidad: C407S redujo la movilidad respecto a la cepa silvestre, mientras que la delección de la hélice α conservada causó la reducción más marcada, con halos casi inexistentes. En conjunto, los datos indican que CdgD contribuye a la regulación de la motilidad de *A. baldaniorum* y que la integridad de los dominios GGDEF, EAL y PAS es importante para esta función. Aunque los datos señalan al PAS como un componente clave para el correcto funcionamiento de CdgD, el mecanismo molecular específico por el cual este dominio influye en la actividad de la proteína aun no es claro.

SUMMARY

Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR), such as *Azospirillum baldaniorum* Sp245, rely on the second messenger c-di-GMP to regulate the transition between motile and sessile lifestyles during rhizosphere colonization. In this species, the hybrid protein CdgD displays a CHASE–PAS–GGDEF–EAL architecture, suggesting that it integrates sensory and catalytic domains to control intracellular c-di-GMP levels. The aim of this work was to investigate how the PAS domain and the GGDEF and EAL catalytic centers of CdgD influence motility in *A. baldaniorum* Sp245. First, point mutations were introduced into the conserved GGDEF (GGKEF mutant, D584K) and EAL (AAL mutant, E710A) motifs to specifically alter the diguanylate cyclase and phosphodiesterase activities of these protein domains. In parallel, the PAS domain of CdgD was analyzed bioinformatically using I-TASSER modeling. Comparison with crystallized PAS domains confirmed conservation of the characteristic α/β fold and allowed the identification of relevant regions within the internal cavity. Based on this analysis, two additional PAS-domain mutants were designed: C407S and deletion of a conserved α helix ($\alpha 2$). All mutations were generated in the pBBRcdgD plasmid. The catalytic variants (GGKEF and AAL), together with the wild-type *cdgD* construct, were evaluated in a heterologous *Escherichia coli* AR3110 system carrying the pDZ-2 plasmid, which contains a c-di-GMP–responsive riboswitch coupled to the fluorescent proteins TurboRFP and AmCyan; the RFP/AmCyan ratio was used as a relative indicator of intracellular c-di-GMP levels. All constructs (*cdgD*, GGKEF, AAL, C407S, and $\Delta\alpha H$) were subsequently introduced into *A. baldaniorum* Sp245 by conjugation, and motility assays were performed on semisolid minimal media containing proline or malate as carbon sources. The mutants showed changes in biosensor signal consistent with a reduced contribution of diguanylate cyclase activity in the GGKEF mutant and with altered phosphodiesterase activity in the AAL mutant. In *A. baldaniorum* Sp245, both variants modified motility halo diameters compared to the wild-type strain. PAS-domain mutants (C407S and $\Delta\alpha H$) also affected motility: C407S reduced displacement relative to the wild type, whereas deletion of the conserved α helix caused the most pronounced reduction, with nearly absent motility halos. Overall, these data indicate that CdgD contributes to the regulation of motility in *A. baldaniorum* and that the integrity of the GGDEF, EAL, and PAS domains is important for this function. Although the results point to the PAS domain as a key component for proper CdgD activity, the specific molecular mechanism by which this domain influences protein function remains unclear.

1. INTRODUCCION

1.1. Rizosfera

La rizosfera es la parte del suelo adyacente a la raíz, cuya química y biota están fuertemente moduladas por la planta, se subdivide operacionalmente en endorizosfera, rizoplasma y ectorizosfera, que funcionan como interfaz entre raíces, suelo y microbiota (Wu et al., 2023) (Figura 1). En este microambiente se producen gradientes de carbono disponible, oxígeno, pH, iones y señales redox, siendo la parte en donde se dan los procesos biogeoquímicos y de interacciones planta-microorganismo (Marschmann et al., 2024). Un rasgo importante de la rizosfera es la liberación de exudados radiculares (mezclas de azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos y metabolitos secundarios) que sirven tanto de sustratos energéticos como de señales para el reclutamiento o exclusión de microorganismos (Wu et al., 2023; Marschmann et al., 2024). Estos exudados no son iguales: su perfil varía según la especie de la planta, el estado de desarrollo y el manejo agronómico, esa plasticidad química repercute directamente en la composición y funciones del microbioma rizosférico (Wu et al., 2023). La diversidad vegetal también modula profundamente la estructura y eficiencia del consorcio microbiano en la rizosfera. Experimentos de campo recientes demuestran que incrementar la diversidad de plantas fortalece las asociaciones microbianas positivas y eleva la eficiencia de uso del carbono en la rizosfera (Domeignoz-Horta et al., 2024).

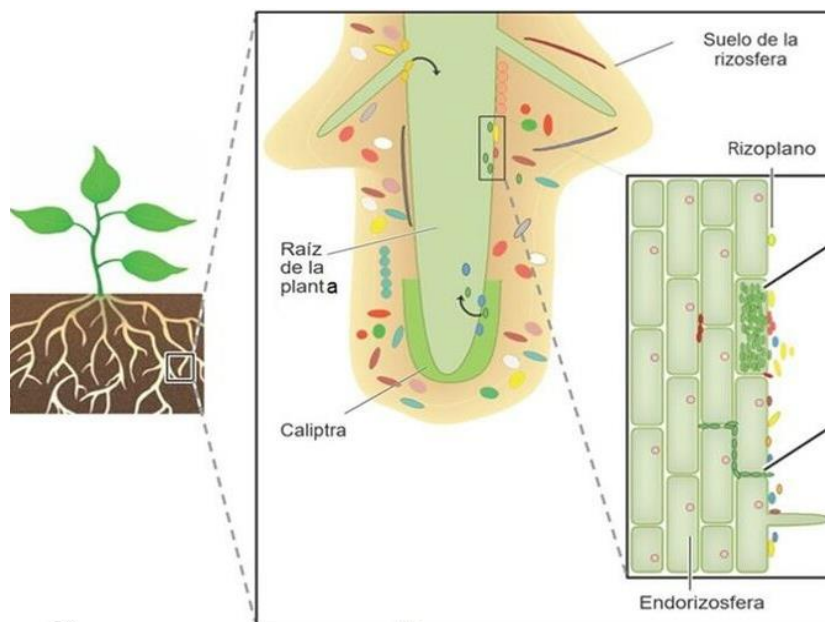


Figura 1. Microhábitats en la interfaz planta-suelo. Se muestran los compartimentos de la rizosfera, rizoplasma y endorizosfera (Reinhold-Hurek et al., 2015).

Para bacterias benéficas asociadas a plantas (PGPR), la colonización exitosa de la rizosfera y del interior radicular involucra etapas secuenciales: quimiotaxis hacia exudados, adhesión, agregación, formación de biopelícula y, en algunos casos, endofitismo, estas etapas son dirigidas por el segundo mensajero Ácido di-(3'-5') guanosín monofosfato (c-di-GMP) (Huang et al., 2024; Schultheiß et al., 2023). Niveles elevados de c-di-GMP favorecen estados sésiles (biopelículas) y suelen

antagonizar la motilidad, ajustando así si permanece en su estado seccil o planctónico según, la presión que ejerzan las señales de la rizosfera (Schultheiß et al., 2023). Dentro de este contexto, *Azospirillum baldaniorum* sp 245 se considera un modelo clásico de PGPR, ya que utiliza mecanismos regulados por c-di-GMP para adherirse, producir exopolisacáridos y colonizar raíces de plantas (Sierra-Cacho et al., 2021). En conjunto, la rizosfera puede entenderse como un entorno altamente selectivo, donde las señales químicas emitidas por la planta y los sistemas de señalización bacteriana, como el c-di-GMP, determinan qué microorganismos logran establecerse, cómo se organiza la microbiota y qué funciones emergen de esas interacciones. Estos procesos repercuten directamente en la nutrición vegetal, la tolerancia al estrés y la defensa frente a patógenos, con implicaciones ecológicas y agronómicas de gran relevancia (Wu et al., 2023; Domeignoz-Horta et al., 2024; Huang et al., 2024).

1.2. Género *Azospirillum*

El género *Azospirillum* agrupa bacterias Gram negativas del orden *Rhodospirillales* (familia *Azospirillaceae*) asociadas a rizosfera y rizoplaneo de numerosas plantas, estas son conocidas por su capacidad diazotrófica (fijación biológica de N_2), producción de fitohormonas (p. ej., Ácido Indol-3-Acético (AIA)), formación de biopelículas y moduladores del crecimiento y la arquitectura radicular (BacDive, 2024; Pelagio-Flores, 2025). En su ecología, la promoción del crecimiento vegetal se explica por un conjunto de mecanismos que actúan al mismo tiempo: fijación de nitrógeno, mejora de adquisición de fósforo y hierro, secreción de auxinas/citoquininas/giberelinas, y componentes estructurales bacterianos que participan en la adhesión de la bacteria a la superficie y en la inmunidad de la planta (Pelagio-Flores, 2025).

En cuanto a fisiología y rasgos de colonización, especies de *Azospirillum* presentan motilidad flagelar dual: un flagelo polar constitutivo para nado en líquido y flagelos laterales inducibles para desplazamiento sobre superficies sólidas (swarming) y establecimiento de biopelículas (Croes et al., 1993; Ganusova et al., 2021; Aroney et al., 2021) (Figura 2).

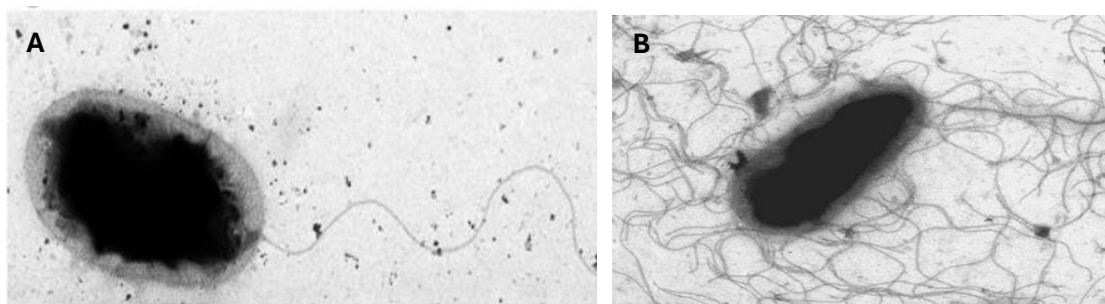


Figura 2. Microscopia electrónica de células de *A. baldaniorum* Sp245. (A) Cultivadas en medio líquido (B) Cultivadas en medio sólido (Vanbleu, E. et al., 2017).

Este repertorio les permite responder a gradientes de exudados y microambiente del suelo, optimizando el tránsito entre estados planctónicos y sésiles, rasgo clave para la colonización efectiva de raíces (Aroney et al., 2021; Ganusova et al., 2021). Finalmente, el potencial biotecnológico de *Azospirillum* ha transitado de pruebas de

laboratorio a inoculantes comerciales en América Latina y otras regiones, con impactos reportados en crecimiento, rendimiento y tolerancia a estrés; la evidencia reciente subraya que estos efectos dependen tanto del genotipo bacteriano como del hospedero, además de que la regulación por c-di-GMP y la motilidad/quimiotaxis influyen en la eficacia de inoculación en campo (Pelagio-Flores, 2025; Aroney et al., 2021).

1.2.1. *Azospirillum baldaniorum* Sp245

Azospirillum baldaniorum Sp245 (antes *A. brasilense* Sp245) es la cepa tipo de la especie y un modelo de rizobacteria PGPR ampliamente usado para estudiar colonización de raíces, motilidad, biopelículas y señalización intracelular. Su estatus taxonómico fue actualizado con base en evidencia genómica, filogenómica de proteínas centrales y rasgos fenotípicos, proponiéndose formalmente el nombre *A. baldaniorum* sp. nov. con Sp245^T como cepa tipo (dos Santos Ferreira et al., 2020). En las bases de datos taxonómicas más reconocidas como LPSN, NCBI Taxonomy y BacDive la cepa ya figura oficialmente como *Azospirillum baldaniorum* Sp245^T (BacDive, 2024; LPSN, 2024). A nivel genómico, Sp245 posee una organización compleja: un cromosoma principal y seis plásmidos, una estructura típica del género que resulta clave para distribuir las funciones que le permiten adaptarse a la vida en la rizosfera (Orlandini et al., 2014). Además de su conocida capacidad para fijar nitrógeno y producir fitohormonas, *A. baldaniorum* Sp245 presenta diversas características genómicas asociadas con su adaptación ecológica, localizadas tanto en el cromosoma como en sus plásmidos. Un ejemplo es la presencia de dos copias del gen *phbC*, una en el cromosoma y otra en el plásmido 4, lo que sugiere cierta redundancia funcional y una notable plasticidad metabólica (del Carmen Fuentes et al., 2024). En el plano fenotípico, la cepa destaca por su resistencia a antibióticos β -lactámicos, una característica relevante tanto para su manipulación experimental como para la selección en estudios genéticos (Otero et al., 2022).

1.2.2. Interacción de *Azospirillum* con la planta

El efecto PGPR de *Azospirillum* es multifactorial. Clásicamente, combina fijación biológica de nitrógeno (FBN) que aporta N a la rizosfera de gramíneas, modulación hormonal (auxinas, citoquininas y giberelinas) que incrementa ramificación y longitud de raíces laterales y pelos radicales, mejora de adquisición de nutrientes (solubilización de fosfatos y quelación de Fe), y tolerancia a estrés mediante ACC desaminasa (disminuye etileno), compuestos antioxidantes y compuestos orgánicos volátiles (VOC) benéficos (Pelagio-Flores, 2025; Tang et al., 2023; El-Saadony et al., 2024; Alonazi et al., 2025; Figura 3). Por otra parte, producción bacteriana de AIA no sólo actúa sobre la planta, también se sugiere que pueden proteger a *Azospirillum* del estrés por indoles, estabilizando el potencial de membrana y favoreciendo su persistencia en la rizosfera, lo que refuerza la idea de una señal mutuamente ventajosa (Ganusova et al., 2025).

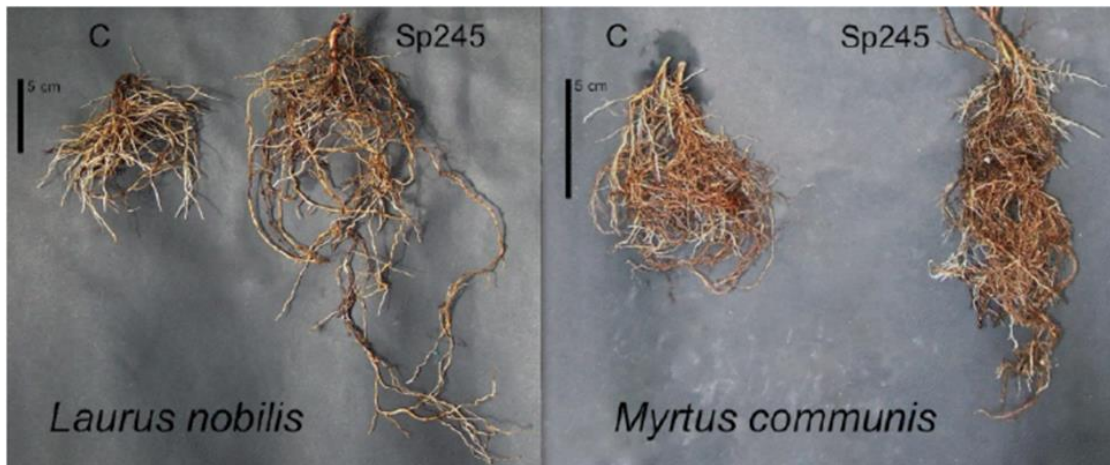


Figura 3. Efecto de la inoculación con *Azospirillum brasilense* Sp245 en el sistema radicular de *Laurus nobilis* y *Myrtus communis* tras nueve meses de cultivo en maceta con suelo contaminado con plomo (Ruso et al., 2012).

Estos mecanismos se traducen en beneficios agronómicos medibles. Estudios en campo reportan incrementos en biomasa y rendimiento, mayor nodulación cuando se co-inocula con rizobios, y mejoras en calidad del producto en diversos cultivos (soya, maíz, cereales), con magnitud dependiente del genotipo vegetal, cepa, método de inoculación y condiciones edáficas (Barbosa et al., 2021; Prando et al., 2024; Condori et al., 2024). En conjunto, la literatura reciente posiciona a *Azospirillum* como bioinoculante versátil cuyo éxito en campo depende de alinear su biología (quimiotaxis, biopelícula, señalización c-di-GMP) con el contexto de la rizosfera del cultivo objetivo (Khoso et al., 2024; Pelagio-Flores, 2025).

1.3. Movilidad y quimiotaxis

En *Azospirillum*, la movilidad depende de un sistema biflagelar muy particular: un flagelo polar (Fla) que está siempre presente y permite el desplazamiento en medios líquidos, y varios flagelos laterales (Laf) que se forman solo cuando la bacteria se mueve sobre superficies. Este arreglo le da una gran versatilidad: el flagelo polar impulsa el “nado” libre, mientras que los flagelos laterales facilitan el movimiento tipo *swarming* y la transición hacia un estilo de vida adherido o “stick”, esencial para colonizar raíces (Figura 4). De hecho, durante las primeras etapas de interacción con la planta, el filamento del flagelo polar puede unirse de manera específica al tejido radical, lo que evidencia que la motilidad no solo sirve para desplazarse, sino también como un mecanismo temprano de adhesión (Croes et al., 1993; Shelud’ko et al., 2019).

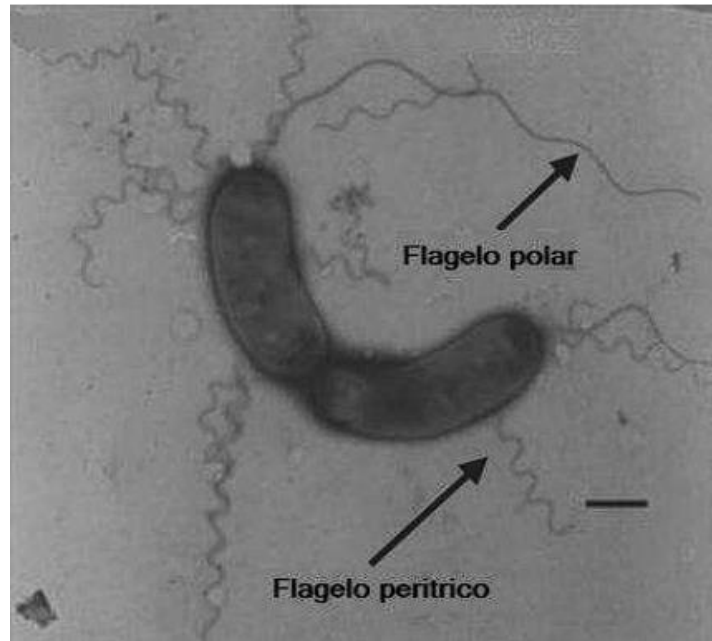


Figura 4. *Azospirillum brasilense*, con sus característicos flagelos polares y peritricos, además de su forma vibroide (Fibach-Paldi et al., 2012).

La quimiotaxis —la capacidad de moverse orientándose por gradientes químicos— está organizada en *Azospirillum* mediante dos rutas de señalización parcialmente especializadas, denominadas Che1 y Che4. Aunque ambas cooperan, cada una cumple funciones distintas: Che1 se asocia con cambios rápidos en la velocidad de nado y con la respuesta al oxígeno (aerotaxis), mientras que Che4 controla la frecuencia con la que la célula invierte su dirección y constituye la principal vía para la quimiotaxis espacial y la colonización del rizoplaneo, especialmente en trigo (Mukherjee et al., 2016; Bible et al., 2012). En la fase final de la respuesta quimiotáctica, diferentes copias del regulador CheY asumen funciones especializadas sobre el comportamiento flagelar. Algunas regulan el sentido de rotación del flagelo polar o lateral, mientras que otras participan en el control del swarming y en la formación de biopelículas, tanto sobre superficies inertes como en raíces (Ganusova et al., 2021). En conjunto, estos hallazgos revelan una interesante división del trabajo dentro del sistema quimiotáctico de *Azospirillum*: mientras Che1/CheA1 optimiza la respuesta a oxígeno y los ajustes de velocidad, Che4/CheA4 y CheY4/CheY7 sustentan la navegación en gradientes y la expansión coordinada sobre superficies. Estas adaptaciones, en conjunto, fortalecen la capacidad competitiva de la bacteria en el entorno complejo y cambiante de la rizosfera (Mukherjee et al., 2016; Bible et al., 2012; Ganusova et al., 2021).

A nivel sensorial, *Azospirillum* utiliza receptores quimiotácticos tipo MCP/Tlp que se agrupan en complejos arreglos conocidos como matrices CheA/CheW. Estas estructuras funcionan de manera altamente cooperativa: pueden amplificar señales muy débiles, combinar diferentes tipos de información ambiental y filtrar el “ruido” del entorno para generar respuestas motoras precisas. Estudios estructurales recientes, en bacterias modelo, han mostrado cómo estas matrices ajustan su sensibilidad y procesan múltiples señales a la vez, principios que también se aplican a rizobios y otras PGPR (Riechmann et al., 2023; Aroney et al., 2021). En la rizosfera este

sistema sensorial permite que *Azospirillum* decida si le conviene seguir explorando (nadar) o establecerse (adherirse o agruparse) dependiendo de los recursos y oportunidades disponibles en cada zona de la raíz (Aroney et al., 2021).

El c-di-GMP actúa como un modulador general del comportamiento móvil en *Azospirillum*: cuando sus niveles aumentan, la motilidad flagelar disminuye y se favorecen estados sésiles como la producción de Exopolisacáridos (EPS) y la formación de biopelículas; cuando bajan, predomina un estado móvil. Estos efectos se ejercen a través de distintos receptores —incluidos dominios PilZ y otros reguladores especializados— que ajustan la actividad de los flagelos y el balance entre nado y swarming (Isenberg & Sondermann, 2024; Hahn et al., 2025). Estudios recientes incluso han demostrado que algunos receptores de c-di-GMP pueden disminuir la actividad de los flagelos y, modular, tanto el nado como el swarming mediante rutas que no involucran directamente a los reguladores clásicos del motor (Hahn et al., 2025). En este marco, proteínas híbridas como CdgB y CdgD pueden vincular señales ambientales con cambios en motilidad y quimiotaxis, contribuyendo a la colonización del rizoplaneo (Sierra-Cacho et al., 2021).

1.4. Biopelículas

Las biopelículas son comunidades microbianas que crecen adheridas a superficies —ya sean vivas o inertes— y están envueltas en una matriz de polímeros extracelulares (EPS) producidos por ellas mismas. Esta matriz, formada por polisacáridos, proteínas, lípidos y ADN extracelular, no funciona solo como un “pegamento”, sino como un sistema altamente activo: mantiene cohesionada la biopelícula, retiene agua y nutrientes, captura metales y compuestos orgánicos, regula el movimiento de solutos y ofrece protección frente a estrés por desecación, temperatura, radiación o antimicrobianos (Flemming & Wingender, 2024). En suelos y sedimentos, los EPS además favorecen la adhesión a partículas minerales, estabilizan agregados y participan en procesos biogeoquímicos, lo que explica por qué su producción, aunque costosa, es tan ventajosa en términos ecológicos (Zhang et al., 2024).

El desarrollo de una biopelícula suele dividirse en etapas: primero ocurre la adhesión reversible de las células a una superficie; luego la unión se vuelve estable y se forman microcolonias; más tarde la biopelícula madura y adquiere una estructura tridimensional con canales y abundante matriz; y finalmente algunas células o fragmentos se dispersan hacia nuevos nichos. Durante todo este proceso aparecen gradientes de oxígeno, nutrientes y pH que generan una notable heterogeneidad fisiológica dentro de la comunidad (Sahoo et al., 2024; Liu et al., 2024). Esto explica por qué las biopelículas muestran una resiliencia mucho mayor que las células libres: el consorcio ofrece protección y amortigua fluctuaciones ambientales (Figura 5).

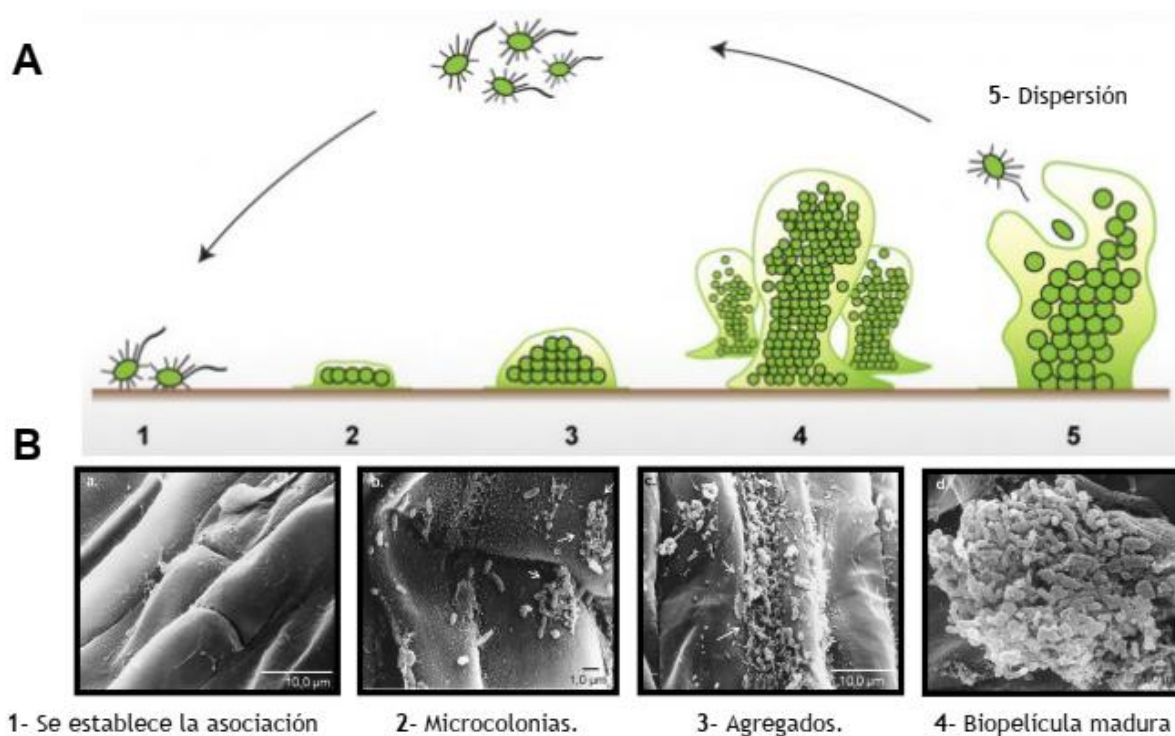


Figura 5. Esquema del proceso de formación de biopelícula bacteriana. (A) Formación de biopelícula Arruebarrena Di Palma et al., 2013; Russell et al., 2013; Romero et al., 2013; Bulgarelli, et al., 2013) (B) Formación de biopelícula en plantas de fresa inoculadas con *Azospirillum*. (Guerrero-Molina et al., 2011).

En la mayoría de los casos, las biopelículas no están formadas por una sola especie. Más bien funcionan como consorcios microbianos donde diferentes miembros aportan funciones complementarias, desde la producción de matriz hasta la degradación de sustratos o la defensa frente a estrés, y se benefician de la compartimentalización espacial y el intercambio de metabolitos (Ren et al., 2024; Beck et al., 2022). Estas interacciones favorecen la estabilidad comunitaria y generan capacidades colectivas, como flujos metabólicos coordinados o la exclusión de patógenos que no se observan cuando las especies crecen por separado.

En el suelo, y especialmente en la rizosfera, las biopelículas representan un modo de vida dominante. Actúan como microhábitats que concentran recursos, amortiguan cambios ambientales y favorecen la permanencia de microorganismos benéficos cerca de la raíz (Bhattacharyya & Yu, 2023; Brokate et al., 2024; Alzate Zuluaga et al., 2024). En este entorno, las biopelículas formadas por rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) fortalecen su interacción con la planta, optimizan el aprovechamiento de exudados y pueden mejorar el rendimiento agronómico al sostener comunidades microbianas cooperativas y eficientes (Rafique et al., 2024).

1.5. El segundo mensajero c-di-GMP

El dinucleótido cíclico c-di-GMP es uno de los segundos mensajeros más importantes en bacterias. Actúa como un coordinador central del estilo de vida

bacteriano: regula la transición entre movimiento y adherencia, la formación de biopelículas, la producción de matriz, la organización del ciclo celular y diversos rasgos ligados a la colonización de hospederos. En ambientes complejos como la rizosfera, c-di-GMP funciona como un “lenguaje” que integra múltiples señales ambientales y fisiológicas para producir respuestas coherentes a nivel intracelular (Isenberg & Sondermann, 2024).

A diferencia de lo que se pensó inicialmente, c-di-GMP no opera como una señal global uniforme. Su actividad está organizada en escalas espaciales y temporales: la síntesis, degradación y lectura del mensajero pueden ocurrir en microdominios muy localizados, cerca de motores flagelares, exportadores o reguladores específicos. Esto permite generar respuestas distintas sin interferencia entre rutas, incluso cuando los cambios en el nivel total de c-di-GMP son mínimos (Junkermeier, Malone, & Jenal, 2023). Estudios recientes también muestran que la interacción física entre enzimas que manejan c-di-GMP y sus efectores puede crear “circuitos privados” que controlan procesos como la formación de biopelículas bajo limitación de nutrientes (Sun et al., 2025) (Figura 6).

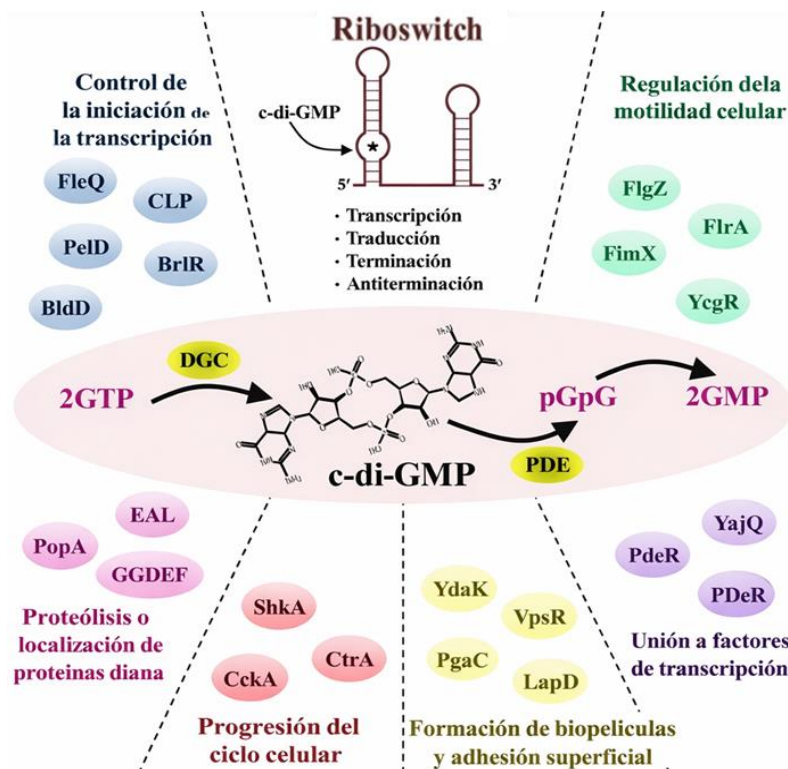


Figura 6. Interacción del c-di-GMP con diferentes proteínas receptoras para controlar diversas funciones biológicas en el sistema bacteriano (Khan, F., et al., 2023).

El repertorio de efectores que leen c-di-GMP continúa expandiéndose. Además de los receptores clásicos como los dominios PilZ, se han descrito proteínas de alta afinidad capaces de traducir fluctuaciones del mensajero en ajustes de motilidad, morfología o expresión génica. Entre los avances recientes destacan: (i) la familia ComFB/CdgR, propuesta como un nuevo grupo de receptores de c-di-NMP implicados en la regulación de la motilidad (Hahn et al., 2025; Samir et al., 2025); (ii) la caracterización estructural de receptores no canónicos con afinidad excepcional

por c-di-GMP (Neißner et al., 2025); y (iii) los riboswitches GEMM, cuyo repertorio funcional sigue creciendo con modalidades regulatorias no convencionales (Liu et al., 2024). En conjunto, estos hallazgos confirman que c-di-GMP no actúa de manera uniforme, sino mediante una variedad de “lectores” que conectan el mensajero con respuestas celulares precisas.

Finalmente, la integración entre señales locales y globales de c-di-GMP —y su posible comunicación con otros nucleótidos como cAMP— se reconoce hoy como un rasgo esencial de esta vía. Esta perspectiva, apoyada por trabajos conceptuales y experimentales recientes, permite comprender cómo pequeñas variaciones en c-di-GMP sostienen transiciones ecológicas clave, como pasar de un estado móvil a uno sésil, sin entrar aún en los detalles enzimáticos que se desarrollan en secciones posteriores (Junkermeier et al., 2023; Isenberg & Sondermann, 2024; Sun et al., 2025).

1.5.1. Síntesis del c-di-GMP

La síntesis del segundo mensajero c-di-GMP (cíclico diguanosín monofosfato) está a cargo de las diguanilato ciclasas (DGC), enzimas definidas por el dominio conservado GGDEF. Este dominio cataliza la unión de dos moléculas de GTP para producir una molécula de c-di-GMP y liberar dos moléculas de pirofosfato inorgánico (PPi). El nombre “GGDEF” proviene de su motivo catalítico central Gly-Gly-Asp-Glu-Phe, identificado por primera vez en proteínas regulatorias bacterianas y cuya conservación es esencial para la catálisis (Paul et al., 2004).

La actividad de las DGC no ocurre de manera aislada: suele estar regulada por dominios sensoriales como PAS (Per-ARNT-Sim), GAF (cGMP-specific phosphodiesterases-Adenylyl cyclases-FhlA) o HAMP (Histidine kinases-Adenylyl cyclases-Methyl-accepting chemotaxis proteins-Phosphatases), que permiten conectar señales ambientales —como luz, oxígeno, estado redox o disponibilidad de metabolitos— con la producción intracelular del mensajero (Lori et al., 2015; Hengge, 2021). De esta forma, la célula ajusta la síntesis de c-di-GMP según las condiciones del entorno.

A nivel estructural, el residuo Asp (D) del motivo GGDEF funciona como base catalítica que facilita las reacciones de transferencia de fosfato, mientras que los residuos Gly (G) aportan la flexibilidad necesaria al lazo catalítico. Las DGC actúan principalmente como dímeros, ya que cada monómero completa el sitio catalítico del otro. Por ello, la dimerización es imprescindible para que la enzima sea funcional. Mutaciones tanto en el motivo GGDEF como en regiones que favorecen esta dimerización pueden reducir o eliminar la actividad enzimática, alterando los niveles celulares de c-di-GMP (Römling et al., 2013; Jenal et al., 2017).

El aumento de c-di-GMP generado por las DGC activa un conjunto diverso de efectores celulares que controlan procesos como la motilidad flagelar, la producción de exopolisacáridos, la adhesión y la formación de biopelículas. Entre estos efectores se encuentran proteínas con dominios PilZ, reguladores transcripcionales y riboswitches específicos (Chou & Galperin, 2016). En bacterias de la rizosfera como *Azospirillum baldaniorum*, la regulación fina de este sistema —en particular a través de proteínas híbridas como CdgD— permite equilibrar los estados de exploración (motilidad) y anclaje (adhesión), favoreciendo así una colonización eficiente del

entorno radicular y su función como rizobacteria promotora del crecimiento vegetal (Sierra-Cacho et al., 2021).

1.5.2. Degradación del di-GMPc

La degradación del c-di-GMP está controlada por dos grandes familias de fosfodiesterasas (PDE): las que contienen el dominio EAL y las que poseen el dominio HD-GYP. Ambas desactivan el mensajero, pero lo hacen de forma diferente. Las PDE tipo EAL hidrolizan c-di-GMP para producir pGpG (5'-fosfoguanosin monofosfato-5'-guanilato), mientras que las HD-GYP pueden continuar la reacción hasta obtener dos moléculas de GMP, completando así su degradación (Christen et al., 2005; Galperin et al., 2019).

El dominio EAL —llamado así por su tríada catalítica conservada Glu-Ala-Leu— adopta una estructura tipo TIM-barrel y requiere iones Mg^{2+} o Mn^{2+} para coordinar los grupos fosfato del sustrato (Barends et al., 2009). Este dominio suele ubicarse en proteínas multimodulares junto con regiones sensoriales como PAS, GAF, HAMP o REC, que ajustan su actividad en función de señales ambientales. Mutaciones en el motivo EAL o en los residuos que coordinan el metal pueden bloquear la hidrólisis del mensajero, lo que provoca acumulación de c-di-GMP y favorece estados sésiles y de adhesión (Römling et al., 2013; Chou & Galperin, 2016).

Por otro lado, las PDE HD-GYP pertenecen a una familia distinta dentro de las metalofosfatasas. Su motivo característico HD-GYP utiliza residuos de histidina y aspartato para coordinar iones de Fe^{2+} o Mn^{2+} , los cuales facilitan la ruptura del enlace fosfodiéster. Se ha visto además que estas enzimas pueden formar dímeros o trímeros estables y que su regulación depende con frecuencia de interacciones proteicas o de dominios sensores localizados en su región N-terminal (Galperin et al., 2022).

En bacterias ambientales y simbióticas, la actividad combinada de DGC y PDE mantiene un equilibrio dinámico de c-di-GMP que ajusta la motilidad, la adhesión y otros comportamientos según las condiciones locales. En *Azospirillum baldaniorum*, este balance es particularmente relevante para responder a los gradientes y fluctuaciones de la rizosfera, donde cambios en oxígeno, nutrientes o estrés osmótico influyen directamente en la colonización de la raíz. En este contexto, la proteína híbrida CdgD, que combina dominios GGDEF y EAL potencialmente funcionales, ejemplifica este control dual: podría sintetizar o degradar c-di-GMP según la señal que reciba su dominio sensorial PAS, un aspecto que aún se está investigando (Cruz-Pérez et al., 2021; Isenberg & Sondermann, 2024).

1.6. Proteínas híbridas

Las proteínas híbridas son elementos centrales en las redes de señalización bacteriana. Se caracterizan por reunir varios dominios funcionales dentro de una misma cadena polipeptídica, lo que les permite captar señales ambientales y convertirlas directamente en respuestas enzimáticas o regulatorias. En la vía de c-di-GMP, estas proteínas suelen combinar dominios sensoriales como PAS, GAF, HAMP o REC con dominios catalíticos GGDEF y/o EAL, responsables de sintetizar o degradar este nucleótido cíclico (Römling et al., 2013; Hengge, 2021).

Este diseño modular ofrece una ventaja clara: permite generar microcircuitos locales donde la producción o el consumo de c-di-GMP ocurre justo al lado del sensor que detecta el estímulo, evitando interferencias con señales más globales. La proximidad entre dominios facilita además mecanismos alostéricos, en los que un cambio estructural inducido en el dominio sensor modifica la actividad del dominio GGDEF o EAL (Schirmer & Jenal, 2009; Stuffle et al., 2021).

En bacterias rizosféricas y simbióticas, las proteínas híbridas cumplen funciones fundamentales para adaptarse al microambiente de la raíz. En especies como *Pseudomonas fluorescens* y *Sinorhizobium meliloti*, se ha visto que su regulación permite ajustar la producción de exopolisacáridos y la arquitectura de las biopelículas en respuesta a gradientes de oxígeno y compuestos orgánicos presentes en la rizosfera (Giovannoni et al., 2015; Rick et al., 2022).

En *Azospirillum baldaniorum* Sp245 existe un repertorio abundante de proteínas híbridas GGDEF–EAL, entre ellas CdgB y CdgD, asociadas con motilidad, colonización y adaptación al entorno radical. Estas proteínas integran señales ambientales dentro de la red de c-di-GMP mediante mecanismos aún no completamente definidos, lo que convierte a CdgD en un modelo idóneo para estudiar cómo la detección sensorial a través del dominio PAS se traduce en regulación catalítica dual. Comprender este acoplamiento estructural-funcional es clave para explicar la plasticidad fisiológica de las PGPR y su potencial en aplicaciones agrícolas sostenibles (Cruz-Pérez et al., 2021; Viruega-Góngora et al., 2022)

1.7. Dominios de señalización en bacterias

Las bacterias tienen una capacidad extraordinaria para detectar y responder a los cambios de su entorno gracias a redes de transducción de señales formadas por proteínas sensoriales altamente versátiles. Estas redes ajustan procesos esenciales como la motilidad, la formación de biopelículas, la expresión génica o el metabolismo según las condiciones ambientales, permitiendo a la célula adaptarse de manera rápida y eficiente (Galperin, 2018). Su eficacia se basa en la amplia variedad de dominios de señalización, módulos estructurales diseñados para percibir estímulos físico-químicos y convertirlos en respuestas bioquímicas específicas (Taylor & Zhulin, 1999; Henry & Crosson, 2011).

Entre los dominios sensoriales más comunes se encuentran PAS, GAF, CHASE y HAMP. Estos módulos funcionan como sensores universales y pueden acoplarse a múltiples tipos de proteínas efectoras, como quinasas, ciclasas y fosfodiesterasas. Una de sus cualidades más destacadas es que son elementos conservados evolutivamente y reutilizados en diferentes contextos celulares, lo que les permite servir como “piezas modulares” que conectan directamente la percepción ambiental con respuestas fisiológicas (Anantharaman & Aravind, 2001; Möglich et al., 2009).

Todos comparten un principio funcional básico: el acoplamiento alostérico. Cuando el dominio sensor detecta un ligando o percibe un cambio físico —como variaciones en redox, luz, oxígeno, pH o metabolitos— su estructura se reorganiza. Esa reorganización se transmite al dominio catalítico o de salida, modulando su actividad (García-Santamarina et al., 2024). De esta forma, los dominios de señalización actúan no solo como receptores, sino como verdaderas interfaces dinámicas que

permiten integrar múltiples señales y transformarlas en decisiones fisiológicas coherentes.

1.7.1. Dominios PAS

Los dominios PAS (Per–ARNT–Sim) son módulos sensoriales muy comunes en bacterias y eucariotas. Su función esencial es detectar cambios físico-químicos del entorno celular y convertirlos en ajustes estructurales que modifican la actividad de las proteínas a las que están unidos (Taylor & Zhulin, 1999; Henry & Crosson, 2011). El nombre proviene de tres proteínas eucariotas donde este motivo fue identificado originalmente: Period, ARNT y Single-minded. En bacterias cumplen un papel análogo, funcionando como sensores intracelulares de oxígeno, luz, potencial redox, metabolitos, voltaje o variaciones en cofactores (Möglich et al., 2009; García-Santamarina et al., 2024).

Estructuralmente, los PAS muestran un pliegue α/β altamente conservado, formado por cinco láminas β antiparalelas rodeadas de varias α hélices. Este arreglo genera una cavidad o “bolsillo sensorial” que puede alojar diversos cofactores, como flavinas (FMN/FAD), heme, NAD^+/NADH o pequeñas moléculas orgánicas, permitiendo una gran diversidad funcional (Möglich et al., 2009; Henry & Crosson, 2011). En algunos casos, incluso responden a cambios fisicoquímicos como temperatura o pH, donde la señal proviene de variaciones en la estabilidad del propio pliegue.

El mecanismo de acción de los PAS se basa en un mecanismo alostérico: cuando el cofactor se une o cambia de estado, el dominio sufre una reorganización estructural que se transmite hacia el dominio adyacente a través de conectores helicoidales o redes de interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno. Esto permite que señales químicas o redox se conviertan en respuestas rápidas, modulando la actividad de quinasas, diguanilato ciclasas o fosfodiesterasas (García-Santamarina et al., 2024).

En proteínas multimodulares como CdgD de *Azospirillum baldaniorum*, el dominio PAS podría funcionar como un regulador para: ajustar la actividad dual de síntesis y degradación de c-di-GMP de sus dominios GGDEF y EAL en función del estado metabólico o redox de la célula. Esta capacidad de integración es clave para equilibrar motilidad y adhesión, procesos esenciales para la colonización de la raíz y para el desempeño de *Azospirillum* como bacteria promotora del crecimiento vegetal (Sierra-Cacho et al., 2021; Isenberg & Sondermann, 2024).

Estudios recientes muestran que los dominios PAS tienen una notable plasticidad evolutiva, con variaciones estructurales que se adaptan a distintas funciones regulatorias. Esta flexibilidad explica su presencia en una gran variedad de arquitecturas de proteínas híbridas y su relevancia en la evolución de nuevas rutas de señalización, lo que los posiciona como uno de los módulos sensoriales más versátiles del mundo microbiano (Corral et al., 2023; Henry & Crosson, 2011).

2. ANTECEDENTES

En los últimos años, los dominios PAS han emergido como un campo de investigación en rápida expansión debido a su ubicuidad en todos los reinos biológicos y a su extraordinaria diversidad funcional. Estos dominios actúan como sensores moleculares versátiles, capaces de detectar señales físicas y químicas como la luz, el oxígeno, el potencial redox o metabolitos específicos, traduciéndolas en cambios conformacionales que regulan la actividad de las proteínas a las que están asociados (Henry & Crosson, 2011; Möglich et al., 2009). Gracias al avance de la genómica comparativa y los métodos bioinformáticos, se han logrado identificar un número creciente de proteínas que contienen dominios PAS, ampliando la comprensión de su papel en la señalización celular y en la adaptación ambiental. Los estudios estructurales han revelado que la unión de cofactores como flavinas (FMN, FAD) o grupos hemo generan cambios conformacionales que modulan la función enzimática o reguladora de las proteínas asociadas. Así, los dominios PAS no solo operan como sensores intracelulares, sino también como elementos de dimerización y transmisión de señales, con implicaciones que abarcan desde la microbiología hasta la biotecnología moderna (Stuffle et al., 2021). El análisis *in silico* de estas proteínas en bacterias del género *Azospirillum* ha revelado un conjunto de enzimas híbridas que integran ambos dominios catalíticos, lo que sugiere la existencia de mecanismos finos de regulación intracelular del c-di-GMP. Este hallazgo es particularmente relevante considerando que *Azospirillum* es una rizobacteria PGPR, capaz de fijar nitrógeno atmosférico, estimular el desarrollo radicular y mejorar la absorción de nutrientes en cultivos agrícolas (Mata et al., 2018).

En este contexto, el estudio del gen *cdgD* adquiere especial relevancia. Este gen codifica una proteína multifuncional con arquitectura CHASE–PAS–GGDEF–EAL, capaz, en principio, de enlazar la detección sensorial extracelular (dominio CHASE) con la percepción intracelular (dominio PAS) y con la modulación catalítica de los niveles de c-di-GMP a través de sus dominios GGDEF y EAL. En *Azospirillum baldaniorum*, se ha demostrado de manera experimental que CdgD actúa como una diguanilato ciclasa (DGC) activa, mientras que su posible función como fosfodiesterasa (PDE) permanece sin validación directa, dejando abierta la pregunta de si esta proteína híbrida opera realmente como una enzima bifuncional (Cruz-Pérez et al., 2021). Particularmente se ha observado que la expresión de *cdgD* aumenta cuando las bacterias crecen en medios suplementados con KNO₃ y también durante la interacción con raíces de *Triticum aestivum* (trigo); en paralelo, las mutantes en *cdgD* presentan patrones de colonización radical modificados respecto a la cepa silvestre, lo que sugiere que CdgD no solo participa en la homeostasis de c-di-GMP, sino que contribuye a modular la manera en que *Azospirillum* explora y ocupa la rizosfera. Así, profundizar en la función del dominio PAS y en la regulación integrada de CdgD en *A. baldaniorum* Sp245 ofrece una oportunidad privilegiada para entender cómo las bacterias rizosféricas sincronizan su fisiología con las condiciones del suelo y de la planta hospedera, generando conocimiento que podría impactar en el diseño de bioinoculantes más eficientes y sostenibles.

3. JUSTIFICACION

El estudio de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB) representa una alternativa sostenible ante el uso excesivo de agroquímicos que degradan los suelos y contaminan los mantos acuíferos (Sekhatha et al., 2016). Entre ellas, el género *Azospirillum* destaca por su capacidad para fijar nitrógeno, estimular el crecimiento radicular y mejorar la productividad de los cultivos (Mahanty et al., 2017; Igiehon & Babalola, 2017; Schmidt et al., 2018; Wang et al., 2019). Sin embargo, los mecanismos moleculares que regulan su adaptación a la rizosfera aún no se comprenden completamente. En *Azospirillum baldaniorum* Sp245, la proteína híbrida CdgD, que contiene los dominios CHASE-PAS-GGDEF-EAL, representa un punto clave en la regulación del segundo mensajero c-di-GMP, esencial para la transición entre motilidad y adhesión celular. El análisis de mutantes puntuales en los distintos dominios de CdgD permitirá no solo explorar cómo el dominio PAS participa en la percepción de señales ambientales, sino también poner a prueba directamente la capacidad catalítica de la proteína híbrida. En este trabajo se mutaron los motivos activos de los dominios GGDEF y EAL, con el fin de confirmar experimentalmente su función como DGC y PDE, respectivamente, y de evaluar cómo CdgD modula el equilibrio entre síntesis y degradación de c-di-GMP. Al mismo tiempo, las alteraciones dirigidas en el dominio PAS buscan esclarecer qué papel desempeña este módulo sensorial en la regulación para activar cada actividad catalítica y a futuro evaluar cómo su pérdida de función repercutiría en la interacción con la planta, considerando que *cdgD* se expresa durante la asociación de *Azospirillum* con las raíces. En conjunto, este conocimiento contribuirá a comprender los mecanismos finos que permiten la adaptación de *Azospirillum* a diferentes condiciones del suelo y sentará bases para el diseño de bioinoculantes más eficientes en el marco de una agricultura sustentable.

4. OBJETIVO GENERAL

Generar y caracterizar mutantes puntuales en los dominios catalíticos del gen *cdgD* de *Azospirillum baldaniorum* Sp245, para estudiar la contribución específica de esta proteína híbrida en el metabolismo del c-di-GMP y la regulación de la motilidad.

4.1. OBJETIVOS ESPECIFICOS

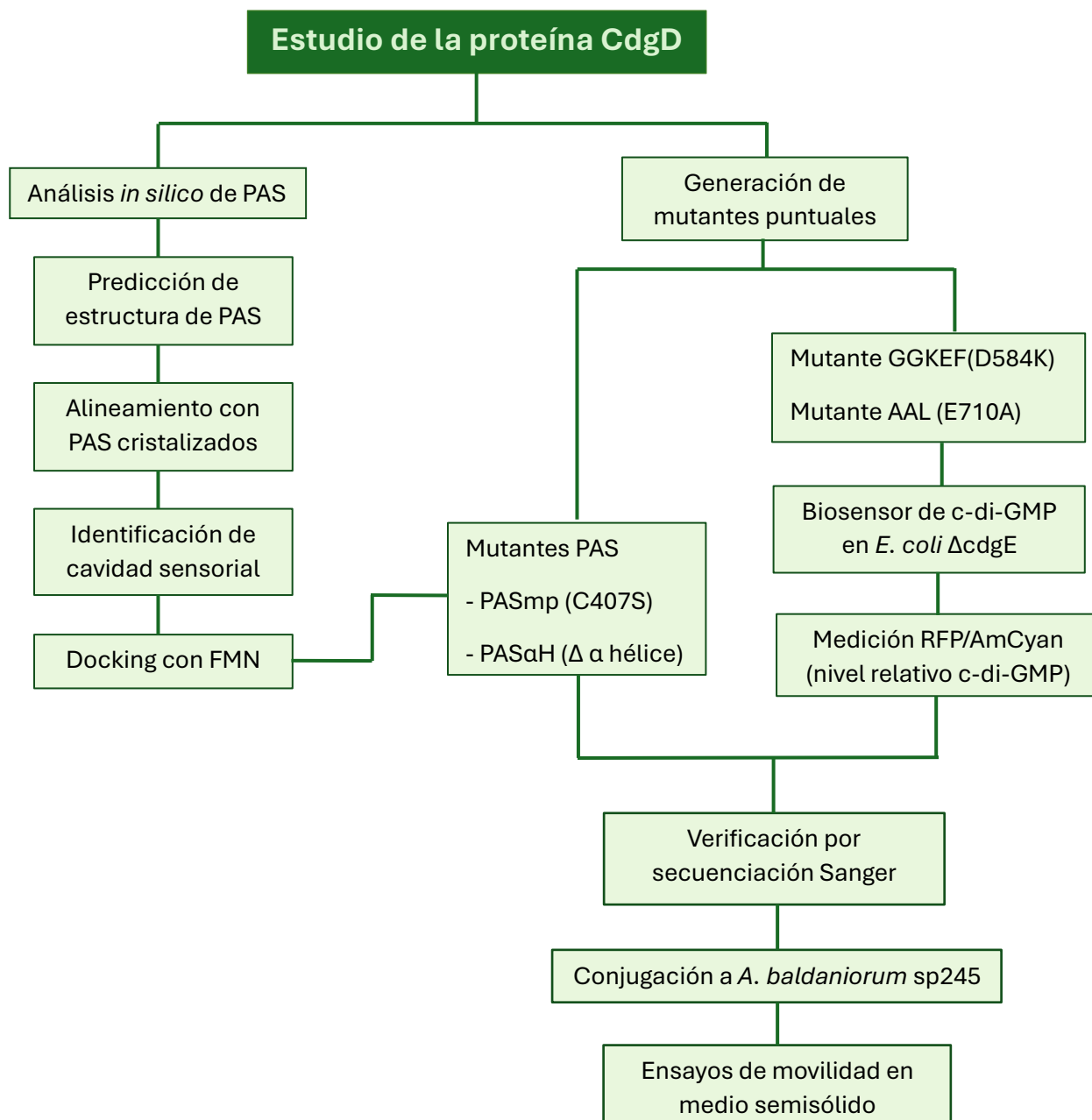
- Realizar un análisis bioinformático estructural y funcional del dominio PAS de la proteína CdgD
- Generar dos mutantes del dominio PAS, una puntual (C407S) y una delección en una α hélice conservada
- Generar una mutante puntual en el dominio GGDEE mediante la sustitución de ácido glutámico por lisina (D584K) con objeto de afectar la actividad de diguanilato ciclasa.
- Generar una mutante puntual en el dominio EAL mediante la sustitución de ácido aspártico por alanina (E710A) dirigido a inactivar la actividad fosfodiesterasa.
- Caracterizar fenotípicamente las cepas mutantes mediante ensayos de movilidad

5. HIPOTESIS

Las mutaciones en el dominio PAS y en los dominios GGDEF/EAL de CdgD modificarán el balance funcional asociado a c-di-GMP y, en consecuencia, producirán cambios medibles en la motilidad de *A. baldaniorum* Sp245.

6. MATERIAL Y METODOS

6.1. Diagrama de trabajo



5.2. Material biológico

El material biológico, así como los plásmidos y cebadores empleados para el proyecto se describen en las Tablas 1, 2 y 3.

Tabla 1. Cepas empleadas en este trabajo

Cepas	Genotipo o fenotipo	Referencias
<i>Escherichia coli</i> DH5α	F ⁻ endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(rK ⁻ mK ⁺), λ ⁻	Hanahan, 1983
<i>Escherichia coli</i> S17-1	recA, thi, pro, hsdR ⁻ M ⁺ , RP4-2-Tc::Mu::Km::Tn7	Simon et al., 1983
<i>E. coli</i> AR3110 ΔcdgE (pDZ-2)	Mutante W3110 con delección de cdgE , porta el biosensor pDZ-2 para cuantificación relativa de c-di-GMP (AmCyan/TurboRFP), Cm ^r	Zamorano-Sánchez, 2019
<i>E. coli</i> DH5α (pBBRcdgD)	Cepa portadora del plásmido pBBRcdgD con el gen cdgD completo bajo su promotor nativo; control positivo de sobreexpresión de CdgD, Gm ^r	Cruz Pérez et al., 2021
<i>E. coli</i> DH5α (pBBRcdgD ^{GGDEF-GGKEF})	Cepa que contiene pBBRcdgD-GGKEF con mutación D584K en el dominio GGDEF (motivo GGDEF→GGKEF), que reduce/inactiva la actividad diguanilato ciclasa, Gm ^r	Este estudio
<i>E. coli</i> DH5α (pBBRcdgD ^{EAL-AAL})	Cepa que contiene pBBRcdgD-AAL con mutación E710A en el dominio EAL (motivo EAL→AAL), que altera la actividad fosfodiesterasa, Gm ^r	Este estudio
<i>E. coli</i> DH5α (pBBRcdgD ^{C407S})	Cepa que contiene pBBRcdgD-PAS con sustitución C407S en el dominio PAS, diseñada para evaluar el papel de la cisteína central en la función sensorial del dominio, Gm ^r	Este estudio
<i>E. coli</i> DH5α (pBBRcdgD ^{ΔPASαH})	Cepa que contiene pBBRcdgD-PASαH con delección de la α hélice conservada del dominio PAS, para analizar su papel en la transmisión conformacional hacia los dominios catalíticos, Gm ^r	Este estudio
<i>E. coli</i> S17-1 (pBBRcdgD y variantes)	Cepas donadoras utilizadas en conjugación biparental con <i>A. baldaniorum</i> Sp245, portadoras de pBBRcdgD o sus variantes mutantes (GGKEF, AAL, PASmp, PASαH), Gm ^r	Este estudio
<i>Azospirillum baldaniorum</i> Sp245 (WT)	Cepa silvestre aislada de raíces de trigo; hospedera para la introducción de cdgD y sus variantes	Baldani et al., 1983
<i>A. baldaniorum</i> Sp245 (pBBR1MCS-5)	Derivada de Sp245, portadora del vector de amplio rango pBBR1MCS-5 (vector vacío), Gm ^r	Este estudio
<i>A. baldaniorum</i> Sp245 (cdgD)	Derivada de Sp245, portadora de pBBRcdgD con el gen cdgD completo (sobreexpresión de CdgD), Gm ^r	Este estudio

<i>A. baldaniorum</i> Sp245 (cdgD-GGKEF)	Derivada de Sp245, portadora de pBBRcdgD-GGKEF con mutación D584K en el dominio GGDEF, Gm ^r	Este estudio
<i>A. baldaniorum</i> Sp245 (cdgD-AAL)	Derivada de Sp245, portadora de pBBRcdgD-AAL con mutación E710A en el dominio EAL, Gm ^r	Este estudio
<i>A. baldaniorum</i> Sp245 (cdgD_{C407S})	Derivada de Sp245, portadora de pBBRcdgD-PASmp con sustitución C407S en el dominio PAS, Gm ^r	Este estudio
<i>A. baldaniorum</i> Sp245 (cdgD_{ΔPASαH})	Derivada de Sp245, portadora de pBBRcdgD-PASαH con delección de la α hélice del dominio PAS, Gm ^r	Este estudio

Ampicilina =ApR; Gentamicina =GmR; Kanamicina =KmR; Tetraciclina =TcR; Cloranfenicol =CmR

Tabla 2. Plásmidos utilizados y contruidos en este trabajo

Plásmido	Genotipo o fenotipo	Referencia
pBBR1MCS	Vector de clonación de amplio rango de hospedero, mob ⁺ , Gm ^r . Utilizado como vector base y control con vector vacío en <i>Azospirillum baldaniorum</i> Sp245.	Kovach et al., 1995*
pBBRcdgD	Derivado de pBBR1MCS-5 que contiene el gen cdgD completo bajo su promotor nativo; utilizado como control positivo de sobreexpresión de CdgD. Gm ^r .	Cruz Pérez et al., 2021
pBBRcdgD_{GGDEF-GGKEF}	Plásmido derivado de pBBRcdgD con mutación puntual D584K en el dominio GGDEF (motivo GGDEF→GGKEF), que disminuye/inactiva la actividad diguanilato ciclasa. Gm ^r .	Este estudio
pBBRcdgD_{EAL-AAL}	Plásmido derivado de pBBRcdgD con mutación puntual E710A en el dominio EAL (motivo EAL→AAL), que altera la actividad fosfodiesterasa de CdgD. Gm ^r .	Este estudio
pBBRcdgD_{C407S}	Derivado de pBBRcdgD con la sustitución C407S en el dominio PAS, diseñado para alterar el papel la función sensorial del dominio. Gm ^r .	Este estudio
pBBRcdgD_{ΔPASαH}	Derivado de pBBRcdgD con la eliminación de la α hélice conservada del dominio PAS, para alterar la transmisión conformacional hacia los dominios catalíticos. Gm ^r .	Este estudio
pDZ-2	Plásmido que porta el biosensor ratiométrico de c-di-GMP basado en un riboswitch, que controla la expresión de las proteínas fluorescentes AmCyan y TurboRFP. Cm ^r .	Zamorano-Sánchez, 2019*

Tabla 3. Oligonucleotidos utilizados

Notación	Iniciador delantero (5'–3')	Iniciador reverso (5'–3')	Referencia
GGKEF-F / GGKEF-R	GCTGGGCGGAaagGAGTTCCTGA	CGGCCCACCGTATCG	Este estudio
AAL-F / AAL-R	GGTCGGGGTGgccGCGCTGTTGC	ACGAGGTCTGGAAATCGCGC	Este estudio
orfGGKEF-F / orfGGKEF-R	ATCTGGCCCATTTACGATCCG	GGAAACAGGCTGATGCCGAT	Este estudio
orfAAL-F / orfAAL-R	CGATGTACAACGCCAAGGAC	ACACCTCGGCTCAACCCAAA	Este estudio
AlfDel-F / AlfDel-R	GGAGTGGGCGGAC	CGGATTGCAGTAGTATCTTG	Este estudio
PASmpCS-F / PASmpCS-R	GATCACTGAGcagcAATCCGGCCTTC	TTGGCGTCCGGGGCCG	Este estudio
AmpPASmut-F	CTCAGGCTTCTGCTGTCGTCCA		Este estudio

5.3. Medios y condiciones de cultivo

Las cepas de *Escherichia coli* DH5 α y S17.1 se cultivaron a 37 °C en medio Luria–Bertani (LB), tanto en su forma líquida como sólida; en este último caso, el agar bacteriológico se añadió al 1.5 % (p/v). Los cultivos líquidos se mantuvieron en agitación constante (150 rpm) durante aproximadamente 16 h, procurando condiciones homogéneas de aireación y crecimiento. Cuando la selección lo requirió, se añadieron antibióticos en las concentraciones Indicadas para el cultivo de las cepas: gentamicina (15 μ g/ml) o cloranfenicol (35 μ g/ml), según el plásmido presente en cada construcción. Las cepas S17.1 se emplearon como donadoras en las conjugaciones biparentales con *Azospirillum baldaniorum* Sp245, mientras que las receptoras se prepararon en paralelo. Estos cruces se realizaron en medio LB modificado (LB*), y la selección de los transconjugantes se llevó a cabo en medio mínimo K–lactato sólido suplementado con los antibióticos correspondientes, siguiendo el procedimiento descrito por Jijón-Moreno et al. (2019).

Por su parte, las cepas de *A. baldaniorum* Sp245 se cultivaron a 30 °C en diferentes medios según el propósito experimental. El medio Difco (MD) se utilizó para la preservación de las cepas en glicerol, mientras que el medio Rojo Congo (CR) sirvió para evaluar la morfología colonial y facilitar la diferenciación entre variantes. Para el crecimiento rutinario y el mantenimiento se emplearon los medios mínimos K–malato y K–lactato, además del medio LB*, una variante del LB suplementada con 2.5 mM de MgCl₂ y 2.5 mM de CaCl₂, que resulta particularmente útil durante la conjugación y la recuperación de cepas conjugadas (Sierra-Cacho et al., 2021). En

los medios selectivos para *Azospirillum baldaniorum* Sp245 se añadió gentamicina (30 µg/ml), de acuerdo con las resistencias plasmídicas. En todos los casos, los medios sólidos se prepararon con agar bacteriológico al 1.5 % (p/v) y se esterilizaron por autoclave a 121 °C durante 15 min para asegurar la debida asepsia antes de su uso.

5.4. Análisis bioinformático

La secuencia del gen *cdgD* de *Azospirillum baldaniorum* Sp245 fue obtenida en formato FASTA desde la base de datos NCBI y empleada como entrada para el servidor SMART, con el fin de identificar la arquitectura de dominios funcionales. A partir de los límites determinados por este análisis, se obtuvo la región correspondiente al dominio PAS para su estudio estructural independiente.

El modelado tridimensional del dominio PAS se llevó a cabo mediante el servidor I-TASSER, utilizando la secuencia aminoacídica aislada como entrada. Los modelos generados fueron evaluados según las puntuaciones de confianza y similitud estructural, y se tomaron como referencia las plantillas reportadas por el programa para los análisis comparativos posteriores.

Para la comparación estructural y el alineamiento por estructura secundaria, se empleó el programa PROMALS3D, integrando la secuencia modelada con dominios PAS homólogos seleccionados a partir de las plantillas de I-TASSER. Este alineamiento se utilizó exclusivamente para identificar regiones conservadas y orientar el análisis estructural del modelo obtenido. El protocolo de *docking* se validó mediante un ensayo de *redocking* usando un dominio PAS con estructura resuelta, ajustando parámetros como caja de búsqueda y exhaustividad. Posteriormente, el mismo protocolo se aplicó al modelo del dominio PAS de CdgD (I-TASSER) con fines exploratorios.

El acoplamiento molecular (*docking*) se realizó con AutoDock Vina, aplicando el protocolo estándar de preparación de receptores y ligandos. El procedimiento se validó empleando un dominio PAS con estructura resuelta y posteriormente se aplicó al modelo generado, con el objetivo de evaluar posibles regiones de interacción con cofactores o ligandos. Las configuraciones de búsqueda, energía y parámetros de exhaustividad se mantuvieron según las recomendaciones del programa. Toda la información obtenida se integró para generar una descripción estructural general del dominio PAS de CdgD, que sirvió como referencia para las etapas experimentales posteriores.

5.5. Diseño de mutaciones y construcción de plásmidos

Las mutaciones puntuales en el gen *cdgD* se introdujeron mediante una reacción de PCR inversa utilizando el kit Q5® Site-Directed Mutagenesis (New England Biolabs), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los iniciadores específicos se diseñaron con la herramienta NEBaseChanger (NEB) a partir de la secuencia del gen *cdgD* de *A. baldaniorum* Sp245, considerando los límites de dominio definidos en el análisis

bioinformático. Cada par de iniciadores se diseñó con una longitud promedio de 25–35 pb y un contenido GC adecuado para las condiciones de amplificación.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen total de 25 µL empleando la mezcla maestra incluida en el kit Q5. El programa de amplificación consistió en una desnaturalización inicial a 98 °C por 30 s, seguida de 25 ciclos de desnaturalización (98 °C, 10 s), alineamiento (según T_m calculada) y extensión (72 °C, 30 s/kb), con una extensión final a 72 °C. Al finalizar la reacción de amplificación, los productos se trataron con el mix KLD (NEB) para eliminar el ADN molde metilado y se transformaron en células competentes de *E. coli* DH5α mediante shock térmico. Las colonias transformadas se seleccionaron en medio LB sólido suplementado con gentamicina (15 µg/ml). Los plásmidos recombinantes se aislaron mediante miniprep de ADN plasmídico, empleando un protocolo combinado de extracción alcalina basado en Gilles Morelle y el QIAGEN Plasmid Purification Handbook, modificado para el laboratorio de Interacción Bacteria-Planta. En este método, las células se lisaron con una solución de NaOH / SDS, se neutralizaron con acetato de potasio 3 M (pH 5.5) y se purificaron mediante lavados sucesivos con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico seguidos de precipitación con isopropanol. Los precipitados de ADN se lavaron dos veces con etanol al 70 %, se secaron a temperatura ambiente y se resuspendieron en agua adicionada con RNasa (0.1 mg/mL) a 37 °C durante 20–30 min. Además de las sustituciones puntuales, la delección $\Delta\alpha H$ del dominio PAS se generó mediante el mismo esquema de PCR inversa del kit Q5®. Para ello, los iniciadores se diseñaron en NEBaseChanger de modo que quedaran orientados en sentidos opuestos y flanquearan la región codificante de la α -hélice a eliminar, excluyéndola del amplicón (delección in-frame).

Los plásmidos purificados se verificaron por digestión enzimática y electroforesis en gel de agarosa antes de su envío a secuenciación Sanger. Las construcciones confirmadas se transformaron posteriormente en *E. coli* S17.1 y se transfirieron por conjugación biparental a *A. balduvianus* Sp245 para su posterior caracterización.

5.6. Cuantificación relativa de c-di-GMP a través de un biosensor de c-di-GMP

La cuantificación relativa de c-di-GMP se realizó en un sistema heterólogo de *Escherichia coli* AR3110 $\Delta cdgE$ portador del biosensor pDZ-2, el cual incluye un riboswitch sensible a c-di-GMP que modula la expresión de las proteínas fluorescentes TurboRFP y AmCyan. El cociente entre ambas señales (RFP/AmCyan) se utilizó como un indicador indirecto del nivel intracelular de c-di-GMP. El hospedero AR3110 $\Delta cdgE$ se co-transformó con los vectores de expresión correspondientes a *cdgD* y sus variantes, manteniendo la compatibilidad entre orígenes de replicación y marcadores de selección (cloranfenicol para el biosensor y gentamicina para los vectores derivados de pBBR*cdgD*). Las transformaciones se efectuaron mediante el método químico estándar por choque térmico y las colonias se seleccionaron en medio LB sólido con los antibióticos apropiados.

Para los ensayos, una colonia representativa de cada construcción se cultivó overnight a 37 °C en medio LB con agitación (180 rpm) y los antibióticos

correspondientes. Posteriormente, los cultivos se diluyeron a una OD_{600} inicial ≈ 0.02 en medio fresco. Tras 24 h y 48 h de incubación, se tomaron alícuotas y se fijaron en cubreobjetos preparados con una fina capa de agar-agua al 1 %, lo que permitió inmovilizar las células durante la adquisición de imágenes. La observación se realizó en un microscopio de fluorescencia equipado con filtros para AmCyan (exc. 430–460 nm; em. 485–510 nm) y TurboRFP (exc. 540–560 nm; em. 570–610 nm). El tiempo de exposición, la ganancia y el balance de canales se mantuvieron constantes dentro de cada experimento para asegurar la comparabilidad.

Las imágenes obtenidas se analizaron inicialmente con el software NIS Elements, desde el cual se extrajeron las intensidades de fluorescencia de ambos canales. Con estos valores se calculó la intensidad relativa de fluorescencia $R/A = (RFP / AmCyan)$, que representa de forma relativa los niveles intracelulares de c-di-GMP. Cada condición experimental se evaluó mediante al menos tres réplicas biológicas independientes, cada una cuantificada en triplicado técnico.

Los datos finales se organizaron y analizaron en R v4.3.2, donde se calcularon promedios, desviaciones estándar y comparaciones estadísticas entre variantes mediante ANOVA unifactorial o, cuando la distribución de datos lo requirió, pruebas no paramétricas (Welch o Kruskal–Wallis). Las figuras se representaron como gráficas de barras o boxplots que muestran la variabilidad entre réplicas y los valores de significancia estadística ajustados.

5.7. Ensayo de movilidad

El ensayo de motilidad de tipo natatoria se realizó siguiendo las condiciones descritas por Cruz-Pérez et al. (2021) y Alexandre et al (2010), con modificaciones para *A. baldaniorum* Sp245 y sus variantes. Las cepas fueron cultivadas inicialmente en medio Rojo Congo (CR) para obtener colonias individuales. A partir de una colonia aislada, se inocularon 5 mL de medio rico Difco (MD) y se incubaron a 30 °C con agitación constante durante 18 h. Este precultivo se utilizó para inocular un nuevo cultivo en 5 mL de medio MD fresco, ajustando una densidad óptica inicial (OD_{600}) de 0.01, y se incubó nuevamente a 30 °C hasta alcanzar una OD_{600} de aproximadamente 0.5, correspondiente a $\sim 2 \times 10^6$ UFC/mL.

Una vez alcanzada la densidad deseada, se tomaron 5 μ L de cada cultivo y se inocularon cuidadosamente en el centro de placas con medio mínimo K suplementado con malato o prolina (10 mM) como única fuente de carbono y con agar bacteriológico al 0.25 % (p/v) para permitir la motilidad de tipo nado. Las placas se prepararon el mismo día del experimento y se dejaron solidificar completamente antes de la inoculación.

Las placas inoculadas se incubaron en posición normal a 30 °C en condiciones estáticas. El diámetro del halo de motilidad se midió a las 24 h y 48 h posteriores a la inoculación, utilizando una regla milimétrica estéril. Cada cepa y condición se ensayó con al menos tres réplicas biológicas independientes, cada una evaluada por triplicado técnico.

5.8. Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron con un mínimo de tres réplicas biológicas independientes, cada una derivada de un cultivo inicial distinto y procesada de manera equivalente en todas las condiciones experimentales. Para cada réplica biológica se obtuvieron tres mediciones técnicas (triplicado técnico), cuyos valores se normalizaron y grafico con R (v.4.3.2). Los valores promediados por réplica biológica se agruparon por condición experimental y se evaluaron mediante pruebas de normalidad (Shapiro–Wilk) y homogeneidad de varianzas (Levene o Bartlett, según correspondiera). Cuando los datos cumplieron estos supuestos, se aplicaron pruebas paramétricas: ANOVA unifactorial, seguida de la prueba post-hoc de Tukey para comparaciones múltiples. En los casos donde no se cumplieron los supuestos, se recurrió a métodos no paramétricos, como Kruskal–Wallis con corrección post-hoc de Dunn, ajustando los valores p mediante el procedimiento de Benjamini–Hochberg.

Los resultados se expresaron como media $\pm$ desviación estándar (DE) o como mediana $\pm$ rango intercuartílico, dependiendo de la distribución de los datos. Las figuras se generaron en R utilizando los paquetes ggplot2 y dplyr, y se presentaron como gráficas de barras con puntos individuales o *boxplots*, manteniendo escalas y ejes consistentes entre experimentos para facilitar la comparación directa entre condiciones. Los valores de significancia estadística se consideraron relevantes cuando $p < 0.05$.

6. RESULTADOS

6.2. Arquitectura modular de CdgD en *A. baldaniorum* sp245

El análisis *in silico* de la secuencia de aminoácidos de la proteína CdgD, codificada por el gen *cdgD* de *A. baldaniorum* Sp245, reveló una organización modular típica de las enzimas reguladoras de la señalización por c-di-GMP. La anotación de dominios, es decir, la identificación computacional de regiones que corresponden a dominios proteicos conservados mediante el servidor SMART permitió identificar cuatro regiones principales dispuestas en el orden CHASE–PAS–GGDEF–AAL, lo cual indica que CdgD combina módulos sensoriales y catalíticos dentro de una misma cadena polipeptídica (Figura 7).

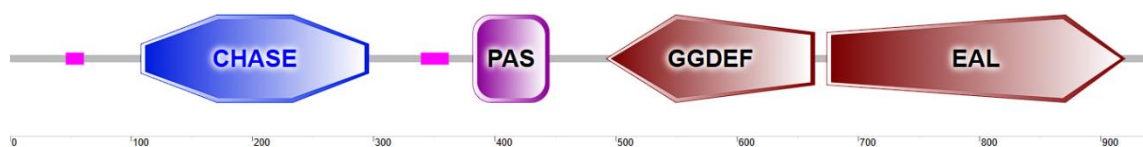


Figura 7. Organización de dominios de la proteína CdgD de *A. baldaniorum* sp245 realizado en SMART que incluye los dominios CHASE, PAS, GGDEF y EAL, implicados en detección de señales y metabolismo de c-di-GMP.

En esta arquitectura, el extremo N-terminal de CdgD corresponde a un módulo tipo CHASE formado por dos segmentos transmembranales y de una región periplasmática compuesta por dos dominios de tipo PAS, uno distal y otro proximal a la membrana citoplasmática, que se han asociado con la detección de señales ambientales y de compuestos presentes en la rizósfera. Inmediatamente después se localiza el dominio PAS, de naturaleza intracelular, el cual está implicado en la percepción de estímulos físicos o químicos, tales como oxígeno, luz o cambios en el estado redox. Las regiones C-terminales comprenden los dominios GGDEF y AAL, responsables respectivamente de la síntesis y la degradación del segundo mensajero c-di-GMP. La presencia simultánea de ambos dominios catalíticos sugiere que CdgD podría comportarse como una enzima híbrida bifuncional, capaz de alternar entre la síntesis y la hidrólisis de c-di-GMP en respuesta a señales detectadas por sus dominios sensoriales. En conjunto, la anotación estructural indica que CdgD constituye un elemento de señalización complejo, posiblemente involucrado en la percepción extracelular a través del dominio CHASE y en la transducción intracelular mediada por el dominio PAS, conectando estas señales con los centros catalíticos responsables del control del c-di-GMP.

6.3. Caracterización *in silico* del dominio PAS

El modelado por homología del dominio PAS de la proteína CdgD de *Azospirillum baldaniorum* Sp245 permitió definir con mayor detalle su organización estructural y

sus posibles características funcionales (Figura 8). El modelo generado mediante I-TASSER presentó un TM-score = 0.872 y un RMSD = 1.81 Å, valores que indican una predicción altamente confiable y bien alineada con estructuras depositadas en el Protein Data Bank. Los cinco mejores análogos estructurales obtenidos correspondieron a proteínas bacterianas con dominios PAS funcionales: 4hiaA, 3p7nA, 6hmjA2, 6i20B y 5hziA, todos con coberturas superiores a 0.98 e identidades de 0.13–0.22, confirmando que el modelo preserva el pliegue α/β característico de esta familia.

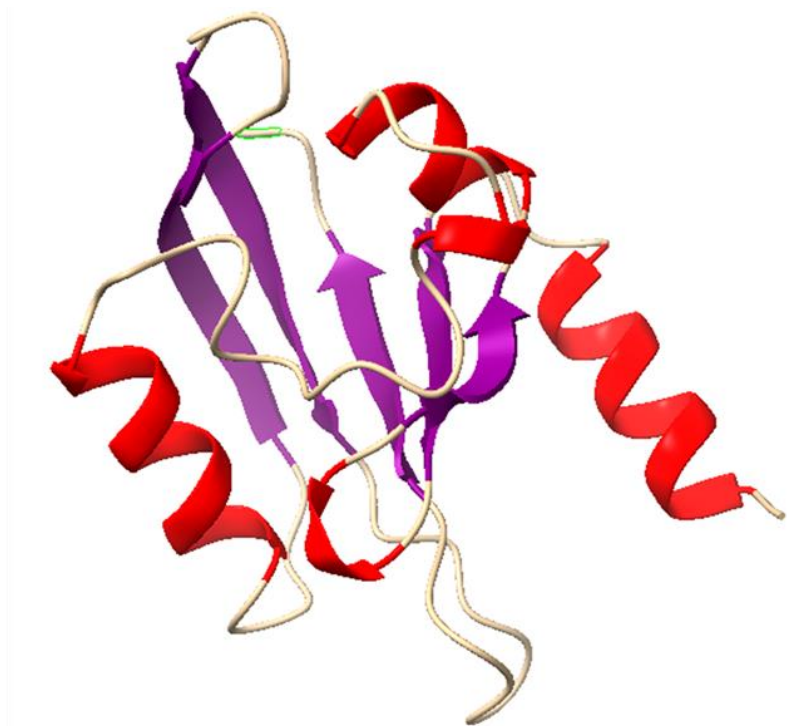


Figura 8. Modelo tridimensional del dominio PAS de la proteína CdgD de *A. baldaniorum* Sp245, predicho por modelado *in silico* (I-TASSER), mostrando la estructura típica compuesta por α hélices (rojo) y láminas β antiparalelas (violeta).

En la proyección tridimensional, el dominio mostró un núcleo central de cinco láminas β antiparalelas, flanqueadas por cuatro α hélices periféricas, disposición típica de los sensores PAS (Figura 8). Este arreglo genera una cavidad interna delimitada por las láminas β y una α hélice terminal extendida hacia el extremo C-terminal, considerada el eje estructural de acoplamiento con los dominios catalíticos GGDEF y EAL. La morfología abierta del bolsillo sugiere un espacio susceptible de interacción con ligandos pequeños o cofactores, como se ha descrito para sistemas PAS de tipo LOV (luz, oxígeno o voltaje) o redox.

La estructura obtenida, se efectuó una comparación con dominios PAS bacterianos de función conocida, seleccionando los modelos 6PH4 (LOV-HK de *Brucella abortus*), 3P7N (EL222 de *Erythrobacter litoralis*) y 2GJ3 (NifL de *Azotobacter vinelandii*). El alineamiento múltiple mediante Clustal Omega, reveló una identidad

global baja (16–23 %), pero evidenció la conservación del andamiaje estructural central (β -core y hélices terminales) (Figura 9).

```

PAS          RRRETELDLLFNQAPLGIALIGP---DAKITDCNPAFARAVGVGRDGLIGIDTKLRAQ-- 55
2GJ3_1|Chains ELLPEIFRQTVEHAPIAISITDL---KANILYANRAFRTITGYGSEEVLGKNESILSNGT 57
3P7N_1|Chains --PAQWVLDLIEASPIASVSDPRLADNPLIAINQAFDTLTGYSEEECVGRNCRFLAGSG 58
6PH4_1|Chains -QATDPFRAAVEFTLMPMLITNPHLPDNPIVFANPAFLKLTGYEAEVDMGRNCRFLQGHG 59
               .  . : : :  : .  .  :  * **  .*  :  : * :  :

PAS          -DPAVIAAIDAAIAGESVRLEVDRLLLAGGRHSHFSLHLQPVSTPGDP-PFVMAFVEDI- 112
2GJ3_1|Chains TPRLVYQALWGRLAQKKPWSGVLVNRKDKTLYLAELTVAPVLNEAGETIYYLGMHRDTS 117
3P7N_1|Chains TEPWLTDKIRQGVREHKPVLVEILNYKKDGTFFRNAVLVAPIYDDDDDELLYFLGSQVEV- 117
6PH4_1|Chains TDPAHVRAIKSAIAAEKPIDIDIINYKKSGEAFWNRLHISPVHNANGRLQHFVSSQLDVT 119
               :  :  ..  .  .  :  : * :  .  .  :  :

```

Figura 9. Alineamiento múltiple de secuencias de dominios PAS de *A. baldaniorum* CdgD (PAS) y proteínas homólogas (PDB IDs: 2GJ3, 3P7N, 6PH4), generado con Clustal Omega. Los residuos conservados se indican con (*) representa identidad completa, (:) similitud/conservación fuerte y (.) similitud/conservación débil.

El posterior alineamiento a través de un análisis de estructura secundaria en PROMALS3D, confirmó la asociación de la secuencia de aminoácidos con la estructura secundaria y permitió identificar regiones que conforman la cavidad de unión en los PAS flavínicos. La inspección detallada de estos alineamientos mostró que los residuos reportados como esenciales para la unión de FMN (resaltados en amarillo) y FAD (resaltados en morado) en los PAS de *B. abortus* y *E. litoralis*, la cisteína que forma el aducto covalente con el carbono C4a del anillo isoaloxazínico de la FMN (aducto Cys–C4a), así como los residuos Gln–Asn–Thr que estabilizan dicho anillo, no se conservan en la secuencia del PAS de *A. baldaniorum* (Figura 10).

```

Conservation:      5 5      5 55 5 9 99 595 5 9 5 5 5 55
B. abortus        1 -QATDPFRAAVEFTLMPMLITNPHLPDNPIVFANPAFLKLTGYEAEVDMGRNCRFLQGHGTDPAHVRAIK 69
E. litoralis      1 --PAQWVLDLIEASPIASVSDPRLADNPLIAINQAFDTLTGYSEEECVGRNCRFLAGSGTEPWLTDKIR 68
Pas-A. baldaniorum 1 RRRETELDLLFNQAPLGIALIGP---DAKITDCNPAFARAVGVGRDGLIGIDTKLRA---QDPVIAAID 64
A. vinelandi      1 ELLPEIFRQTVEHAPIAISITDL---KANILYANRAFRTITGYGSEEVLGKNESILSNGTTERLVYQALW 67
Consensus_aa:     ...p.h..hhp.s.hs..l.s....cs.lh.hN.AF.phhGh..-hhG.s.ph....p..hhh..l.
Consensus_ss:     hhhhhhhhhhhh eeeeeee eeeee hhhhhhhh hhhh hhh hhhhhhhh

Conservation:      5 5      5 5 5 5 95 5 5
B. abortus        70 SAIAAEKPIDIDI-INYKKSGEAFWNRLHISPVHNANGRLQHFVSSQLDVT--- 119
E. litoralis      69 QGVREHKPVLVEI-INYKKDGTFFRNAVLVAPIYDDDDDELLYFLGSQVEV--- 117
Pas-A. baldaniorum 65 AAIAGE-SVRLEVDRLLLAGGRHSHFSLHLQPVSTP-GDPPFVMAFVEDI---- 112
A. vinelandi      68 GRLAQKKPWSGVL-VNRRKDKTLYLAELTVAPVLNEAGETIYYLGMHRDTSSELH 120
Consensus_aa:     ..l..c.sh...l.....s.p.....lh.lPl.s..sc.@hht...-h....
Consensus_ss:     hhhh eeeeeee eee eeeeeeeeeeee eeeeeeeee

```

Figura 10. Alineamiento estructural de dominios PAS obtenido mediante PROMALS3D, utilizando secuencias de *A. baldaniorum*, *E. litoralis*, *A. vinelandii* y *B. abortus*. Las regiones secundarias predichas se indican debajo del alineamiento (α hélices en rosa y láminas β en azul).

De manera similar, los residuos equivalentes al entorno de protonación del FAD de NifL (*A. vinelandii*) tampoco se hallaron presentes. La ausencia de los motivos característicos de unión a flavinas sugiere que el dominio PAS de CdgD carece del

bolsillo clásico para FMN/FAD, lo que indica un mecanismo sensorial alternativo, posiblemente basado en cambios conformacionales intrínsecos del pliegue o en interacciones proteína–proteína, también está la posibilidad de que sea por algún otro mecanismo, como la unión de otro tipo de cofactor aún no identificado, o a través de un bolsillo modificado con diferente afinidad por FMN/FAD, más que asumir de manera directa la presencia del mismo repertorio de cofactores descrito en dominios LOV descritos. A pesar de las diferencias en los residuos que conforman el bolsillo, el empalme estructural entre el PAS de *A. baldaniorum* y los modelos de referencia (PDB: 6PH4, 3P7N y 2GJ3) mostró una alta coincidencia topológica (TM-score > 0.83) y un bajo RMSD, lo que confirma la conservación del pliegue global característico del dominio PAS a pesar de su baja identidad en secuencia.

El análisis combinado de secuencia y estructura permitió resaltar dos elementos notables del dominio PAS de CdgD:

- a) una cisteína localizada en la región central (C407), única en el modelo y potencialmente relevante por su posición dentro del bolsillo sensorial (Figura 11)
- b) una α hélice terminal altamente conservada, adyacente al núcleo β , implicada en la transmisión estructural.

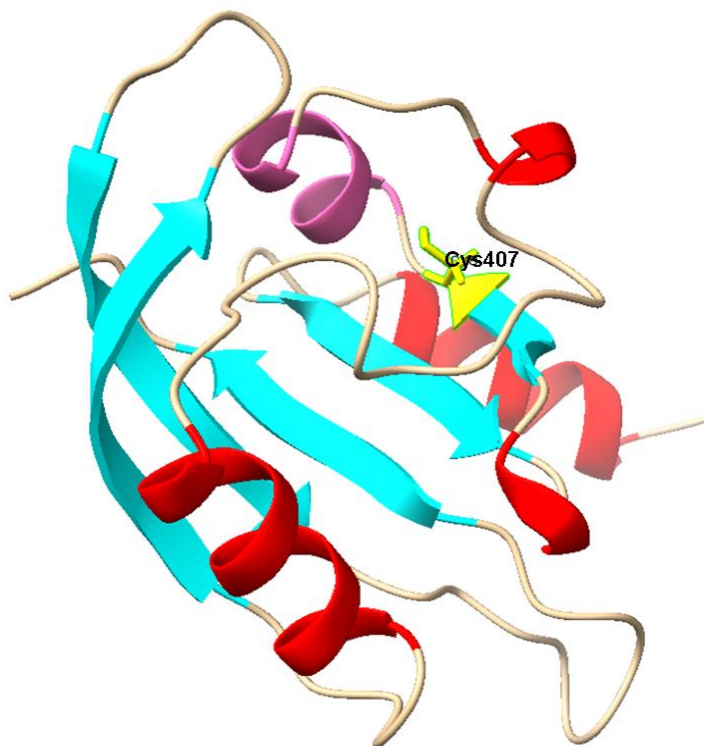


Figura 11. Modelo tridimensional del dominio PAS de CdgD generado en I-TASSER. Las láminas β se muestran en cian, las hélices α en rojo, la hélice eliminada en la mutante PAS- $\Delta\alpha$ H en magenta y el residuo Cys407 en amarillo dentro de la cavidad interna.

Estos elementos fueron identificados como sitios estructuralmente relevantes para la generación de mutantes y para los estudios funcionales posteriores. En conjunto, la caracterización estructural comparativa del dominio PAS de CdgD indica que,

aunque la proteína conserva la topología α/β típica de esta familia, presenta cambios en la secuencia de aminoácidos que podrían permitirle detectar otros cofactores, o incluso flavinas, mediante mecanismos distintos a los descritos previamente en otros microorganismos.

6.4. Ensayos de acoplamiento molecular del dominio PAS

Para explorar el posible comportamiento del dominio PAS como sensor molecular, se realizaron ensayos de acoplamiento molecular (docking) empleando AutoDock Vina. Los análisis se llevaron a cabo utilizando el modelo tridimensional del dominio PAS de la proteína CdgD de *Azospirillum baldaniorum* previamente obtenido por I-TASSER, y un modelo homodimérico generado a partir de la superposición con uno de los moldes estructurales sugeridos por el programa. Esta disposición permitió evaluar la accesibilidad del bolsillo sensorial en una conformación más cercana al arreglo funcional que adoptan los PAS en sistemas biológicos.

Como referencia y control experimental, se realizó un ensayo de redocking del acoplamiento del cofactor flavín-mononucleótido (FMN) en el PAS EL222 de *Erythrobacter litoralis* (PDB 3P7N), obteniéndose una energía de unión de -10.5 kcal/mol y una localización coincidente con lo reportado en la proteína cristalizada (Figura 12A). Este control permitió validar los parámetros de exhaustividad, tamaño de caja y número de poses empleados en el docking.

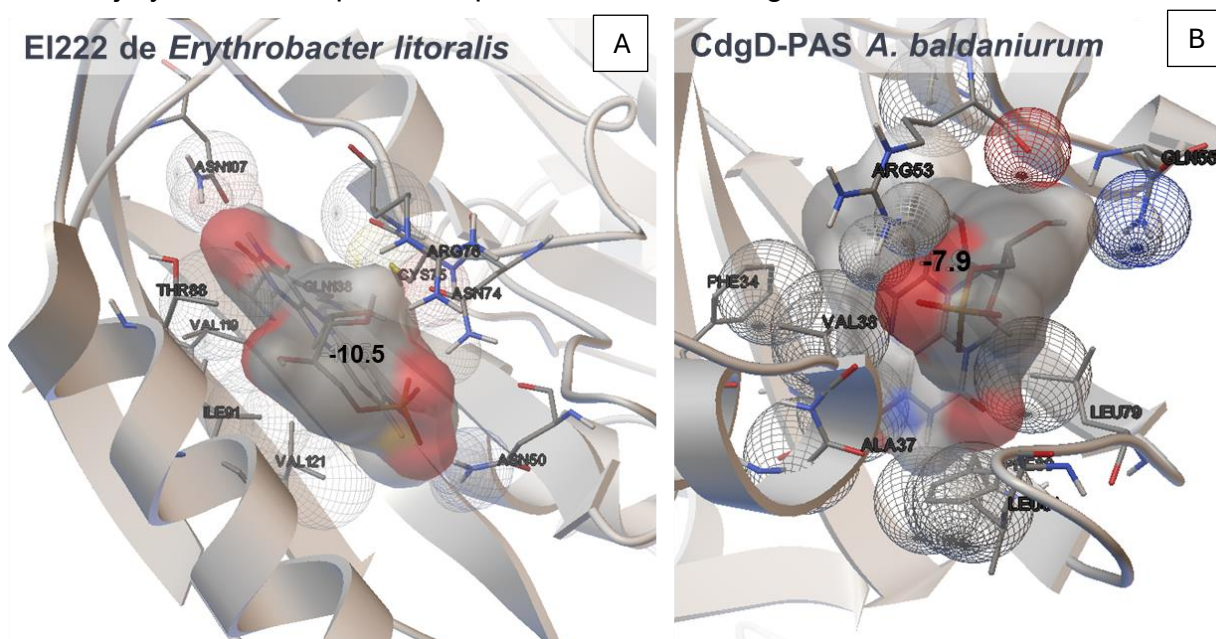


Figura 12. Comparación del acoplamiento molecular (docking) de FMN en dominios PAS en (A) Acoplamiento de FMN en el dominio PAS de EI222 de *Erythrobacter litoralis* (PDB: 3P7N), mostrando la conformación y los residuos clave previamente descritos para la unión al cofactor. (B) Acoplamiento del mismo ligando en el modelo PAS de CdgD de *A. baldaniorum*.

El acoplamiento del mismo ligando sobre el modelo PAS de CdgD reveló una energía de unión de -7.9 kcal/mol y un modo de interacción desplazado respecto al núcleo de láminas β (Figura 12B). En lugar del entorno polar observado en el PAS flavínico,

el ligando se alojó en una cavidad más hidrofóbica delimitada por Phe34, Val38, Ala37, Leu79 y Gln55, lo que sugiere un cambio en la composición química del bolsillo sensorial. El análisis de densidades electrónicas mostró una ausencia de contactos directos tipo puente de hidrógeno con el anillo isoaloxazínico, lo cual coincide con la pérdida de los residuos conservados para la unión de FMN/FAD descritos en los alineamientos estructurales. Sin embargo, las interacciones detectadas entre FMN/FAD y el modelo del PAS de CdgD apuntan a un posible cambio en la conformación del bolsillo de unión en comparación con otros dominios PAS dependientes de flavinas descritos.

A fin de explorar la contribución de regiones específicas del PAS de CdgD, se realizaron acoplamiento adicionales utilizando los modelos con mutación puntual C407S y con la delección de la α hélice terminal (Figura 13). En el mutante C407S, el bolsillo se mantuvo accesible, pero presentó una reducción de la afinidad (-5.1 kcal/mol) y una redistribución de los contactos hacia residuos periféricos, principalmente Thr35 y Arg63 (Figura 13B). En contraste, la eliminación de la hélice α conservada modificó notablemente la geometría del pliegue, generando una cavidad más profunda pero parcialmente colapsada, con una energía de acoplamiento de -5.5 kcal/mol (Figura 13A).

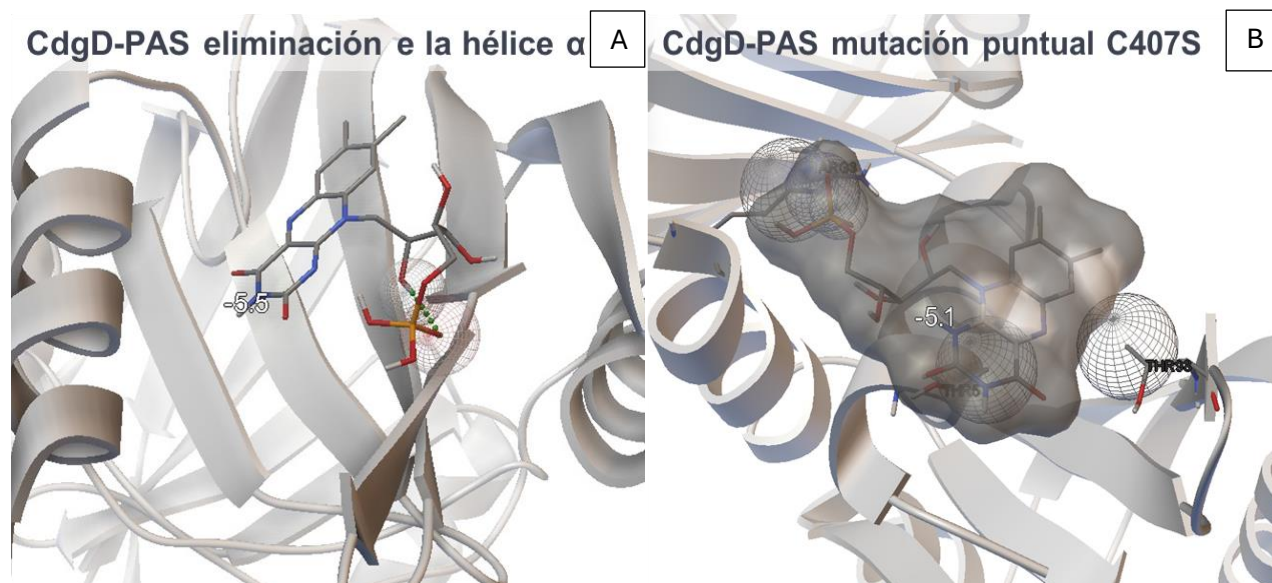


Figura 13. Acoplamiento molecular (docking) de FMN en los modelos mutantes del dominio PAS de CdgD de *A. baldaniorum*. (A) Variante con eliminación de la α hélice, que muestra una cavidad más abierta y una disminución en la afinidad por FMN. (B) Variante con la mutación puntual C407S, en la que el ligando presenta una orientación desplazada y una menor energía de acoplamiento. Ambos modelos evidencian una alteración del bolsillo sensorial y una pérdida de los contactos estructurales que estabilizan la unión del

El conjunto de simulaciones mostró que, en el modelo del dominio PAS de CdgD, las moléculas tipo FMN/FAD aún pueden establecer interacciones con la cavidad sensorial, pero los contactos y las energías de acoplamiento difieren de las descritas para dominios PAS dependientes de flavinas ya caracterizados. Esto es coherente con la baja conservación de los residuos clave de unión observada en los

alineamientos estructurales y sugiere que el bolsillo del PAS de CdgD podría adoptar una conformación distinta, con un modo de reconocimiento de ligando potencialmente modificado. En este contexto, los modelos obtenidos por empalme a partir de PAS previamente cristalizados podrían no reflejar por completo las particularidades de la secuencia de CdgD, por lo que será necesario explorar en el futuro plantillas estructurales alternativas o, en ausencia de estas, plantear la obtención de una estructura experimental del dominio PAS para definir con mayor precisión su afinidad por FMN/FAD y/o la posible participación de otros cofactores.

6.5. Construcción de las variantes genéticas de *cdgD*

Con el objetivo de analizar la contribución de los distintos dominios funcionales de CdgD en el metabolismo y regulación de c-di-GMP, se generaron variantes Génicas específicas mediante mutagénesis sitio-dirigida. Esta metodología permitió introducir sustituciones puntuales en los dominios catalíticos GGDEF y EAL, así como modificaciones dirigidas al dominio PAS, previamente identificado como sensorial a través del modelado estructural y los ensayos de acoplamiento molecular.

Las variantes obtenidas correspondieron a:

- a) GGKEF, en la cual se sustituyó el residuo ácido aspártico por lisina (D584K) dentro del motivo GGDEF, con el propósito de inactivar su función de diguanilato ciclasa
- b) AAL, donde se reemplazó el residuo ácido glutámico (E710A) en el dominio EAL, presuntamente involucrado en la actividad fosfodiesterasa
- c) PAS, mutante puntual Cys407→Ser (C407S), diseñada con base en el modelado *in silico* para evaluar la función de la cisteína central del dominio PAS
- d) PAS, una variante con delección de la α hélice del mismo dominio, asociada estructuralmente a la transmisión conformacional (Figura 6B).

Los oligonucleótidos se diseñaron utilizando la plataforma NEBaseChanger®, ajustando la longitud, el contenido GC y la temperatura de fusión (T_m) para cada reacción. Las secuencias se sintetizaron con las sustituciones deseadas en letras minúsculas y se validaron *in silico* mediante alineamientos con la secuencia de referencia de *cdgD*.

Cada mutación se introdujo mediante una PCR inversa de alta fidelidad con la polimerasa Q5 Hot Start, utilizando como molde el plásmido pBBRcdgD (aproximadamente 8 kb). Las reacciones se sometieron a un gradiente térmico (63–72 °C) para optimizar la amplificación (Figura 14). Los productos obtenidos mostraron bandas definidas del tamaño esperado (~8000 pb), evidenciando una amplificación completa del plásmido en todas las condiciones probadas (Figura 13B).

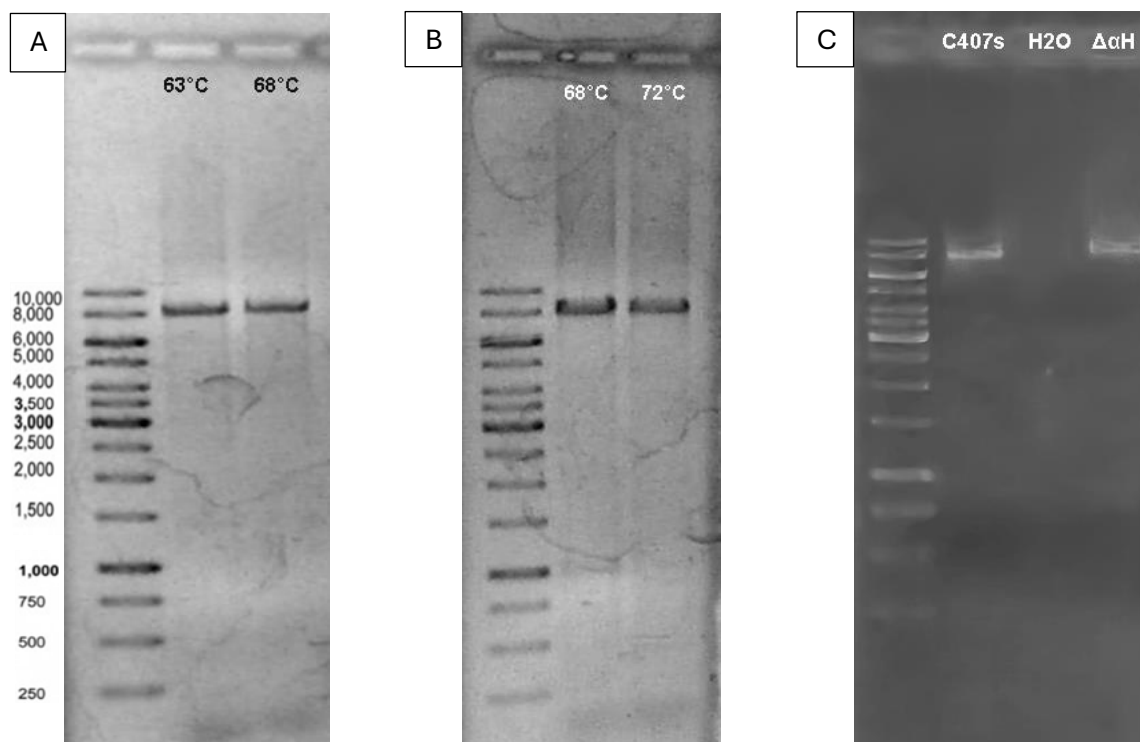


Figura 14. Reacción de PCR inversa para la generación de mutantes puntuales de *cdgD* utilizando el kit Q5®. Se muestran los productos amplificados correspondientes a las mutaciones en los dominios GGKEF (A), AAL (B) y PAS, mutantes C407S y $\Delta\alpha H$ (C). En todos los casos se obtuvieron bandas definidas del tamaño esperado (8000pb), confirmando la eficiencia de la amplificación y la correcta incorporación de las mutaciones diseñadas.

Posteriormente, los productos de PCR fueron tratados con la mezcla KLD Enzyme Mix (quinasa–ligasa–DpnI), que permite la fosforilación de los extremos, la ligación circular del plásmido amplificado y la digestión selectiva del ADN metilado parental. En los ensayos de ligación, realizados por 30 minutos y 1 hora a temperatura ambiente, se observó la aparición de una banda superenrollada (~8000 pb), indicativa de plásmido circularizado (Figura 15).

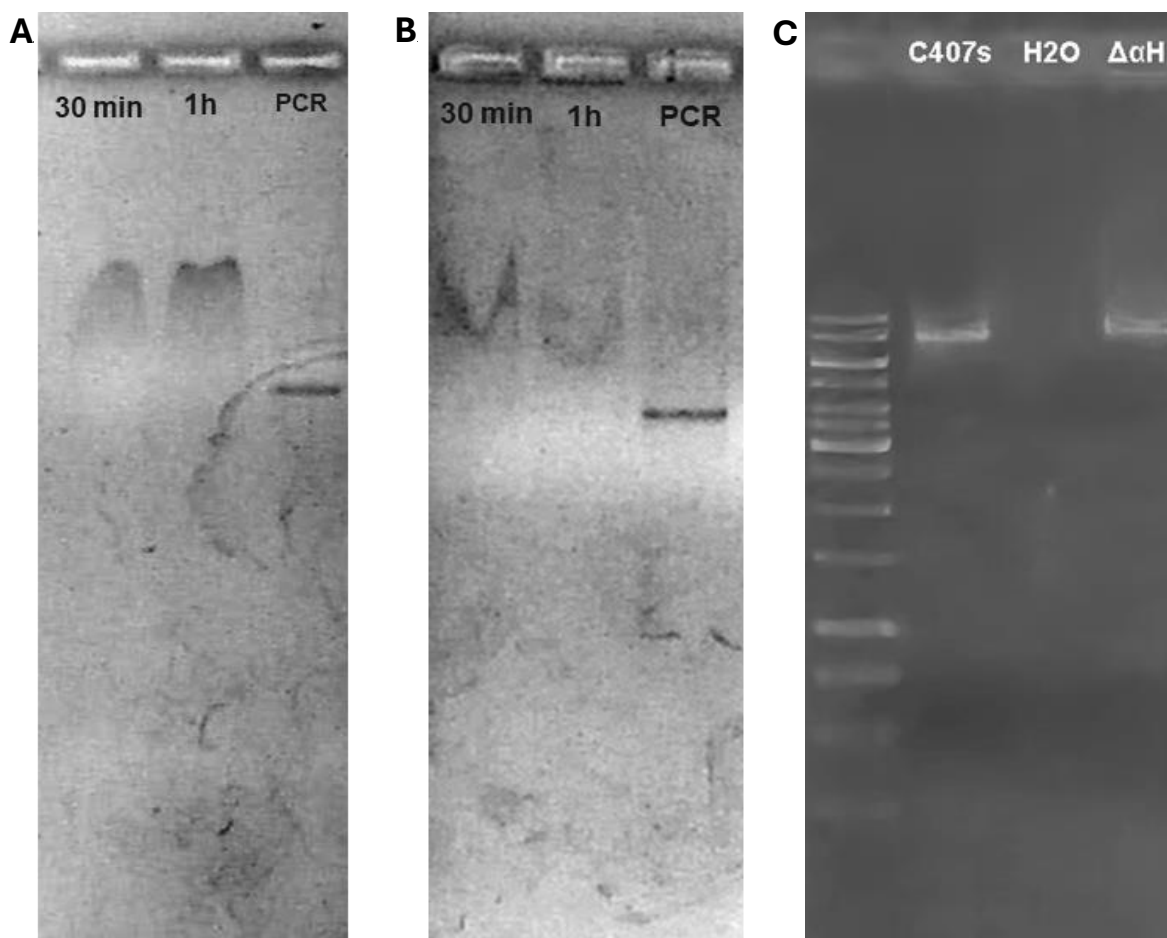


Figura 15. Ensayo de ligación de los productos de PCR inversa mediante la enzima KLD para la generación de mutantes puntuales de *cdgD*. Los paneles (A) y (B) corresponden a las mutaciones en los dominios GGKEF y AAL, respectivamente, donde se evaluaron distintos tiempos de incubación (30 min y 1 h) y se incluyó el control de PCR. El panel (C) muestra los productos de ligación de las mutaciones en el dominio PAS (C407S y $\Delta\alpha H$).

Las construcciones resultantes: GGKEF, AAL, PAS-C407S y $\Delta PAS\alpha H$, fueron posteriormente transformadas en *E. coli* DH5 α , generando colonias recombinantes resistentes a gentamicina (30 $\mu\text{g/mL}$). Estas cepas se mantuvieron como fuente primaria de los plásmidos modificados para los siguientes pasos de validación molecular y transferencia hacia *A. balduaniorum* Sp245.

6.6. Estimación de los niveles intracelulares de c-di-GMP

Con el propósito de evaluar el efecto de las mutaciones generadas en los dominios catalíticos del gen *cdgD*, se determinó la acumulación intracelular del segundo mensajero c-di-GMP en cepas de *Escherichia coli* transformadas con las distintas variantes génicas construidas. Para este análisis se utilizó el biosensor pDZ-2, cuyo sistema de detección se basa en un riboswitch sensible a los niveles intracelulares del nucleótido cíclico, de modo que el cociente entre la fluorescencia roja (TurboRFP) y la verde (AmCyan) es directamente proporcional a la concentración de c-di-GMP (Figura 16 y 17).

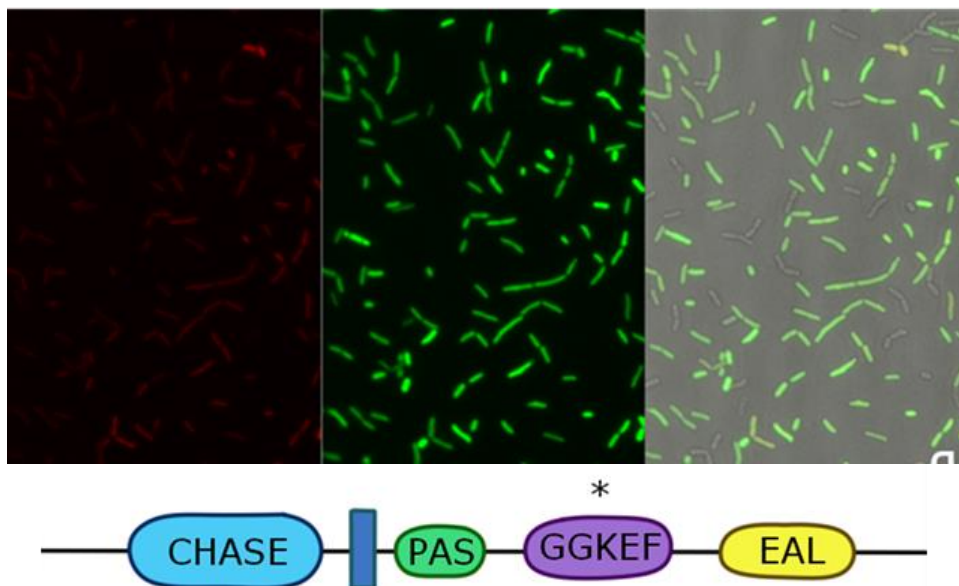


Figura 16. Ensayos de fluorescencia en *E. coli* mostrando, de izquierda a derecha, la imagen merge, la señal verde de AmCyan (control de expresión) y la señal roja de TurboRFP, que actúa como indicador de los niveles de c-di-GMP. En la parte inferior se muestra la organización modular de CdgD, marcando con un asterisco la mutación evaluada. Las imágenes se adquirieron en un microscopio invertido Nikon TE2000U equipado con un objetivo 100X y se analizaron en NIS-Elements.

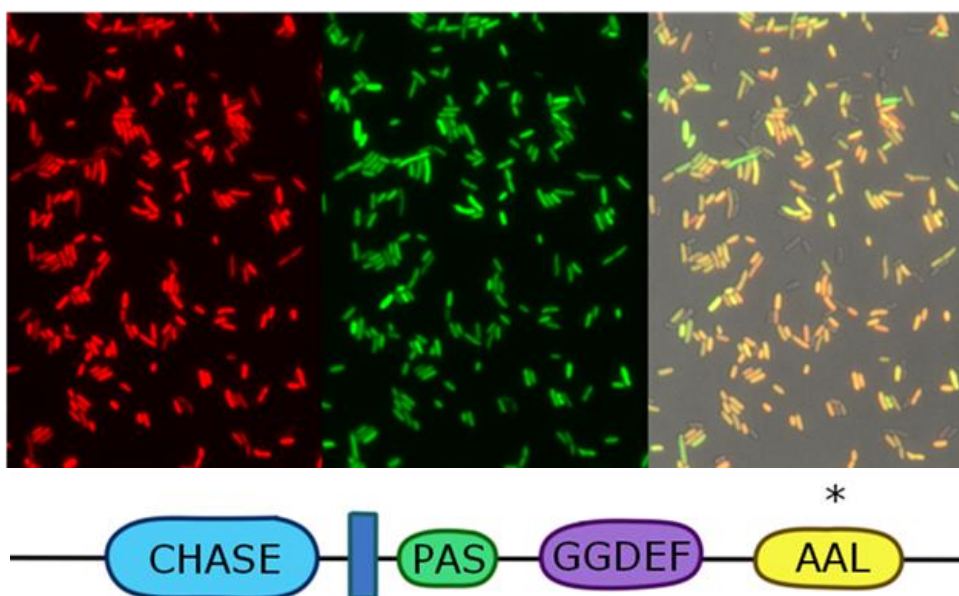


Figura 17. Ensayos de fluorescencia en *E. coli* mostrando, de izquierda a derecha, la imagen merge, la señal verde de AmCyan (control de expresión) y la señal roja de TurboRFP, que indica los niveles de c-di-GMP. En el esquema inferior se muestra la organización modular de CdgD y se señala con un asterisco la mutación ubicada en el dominio AAL. Las imágenes se adquirieron en un microscopio invertido Nikon TE2000U equipado con un objetivo 100X y se analizaron en NIS-Elements.

En cada campo visual se cuantificó exclusivamente la fluorescencia emitida por las bacterias que presentaban señal en el canal AmCyan, correspondiente a la población con expresión activa del biosensor. A partir de esas mismas células se obtuvo el valor de fluorescencia TurboRFP, y con ambos datos se calculó el índice de intensidad

relativa de fluorescencia (RFP/AmCyan). Este índice fue posteriormente normalizado con respecto al control negativo (vector vacío) y al control positivo (cepa portadora del *cdgD* silvestre).

En las cepas transformadas con la variante GGKEF (D584K), dirigida al dominio GGDEF, se observó una disminución general en la intensidad relativa de fluorescencia, lo que sugiere una menor acumulación de c-di-GMP en comparación con la cepa que expresa el gen completo. Entre los distintos clones analizados, las cepas 7-GGKEF y 25-GGKEF mostraron valores intermedios de fluorescencia, mientras que 33-GGKEF y 83-GGKEF presentaron reducciones notorias respecto al control positivo (Figura 18). Este comportamiento es coherente con la sustitución del residuo catalítico Asp584, implicado en la actividad de diguanilato ciclasa, cuya alteración provocaría una disminución en la síntesis del mensajero.

En contraste, las cepas portadoras de la mutación AAL (E710A), correspondiente al

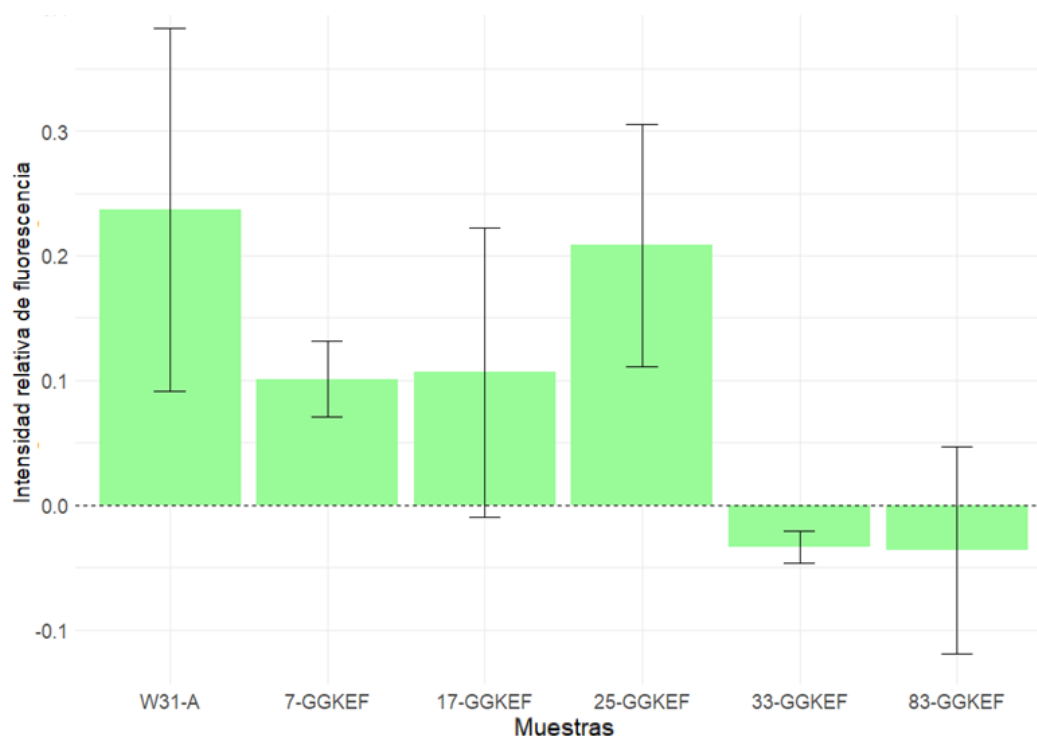


Figura 18. Intensidad de fluorescencia relativa a las 48 h para las mutantes GGKEF, normalizada contra el control negativo (W31-P). Valores por debajo de cero indican fluorescencia menor al control. W31-A corresponde al control positivo. Las barras muestran media $\pm$ DE de tres réplicas biológicas.

dominio EAL, mostraron una tendencia inversa, con un aumento en la intensidad relativa de fluorescencia. En particular, los clones 53-AAL y 62-AAL presentaron las señales más elevadas, mientras que las variantes 13-AAL y 18-AAL mantuvieron intensidades similares a las del control negativo (Figura 19). Este incremento en el cociente de fluorescencia indica una acumulación intracelular de c-di-GMP, atribuible a la pérdida de la actividad fosfodiesterasa por la sustitución del residuo de ácido glutámico conservado del dominio EAL.

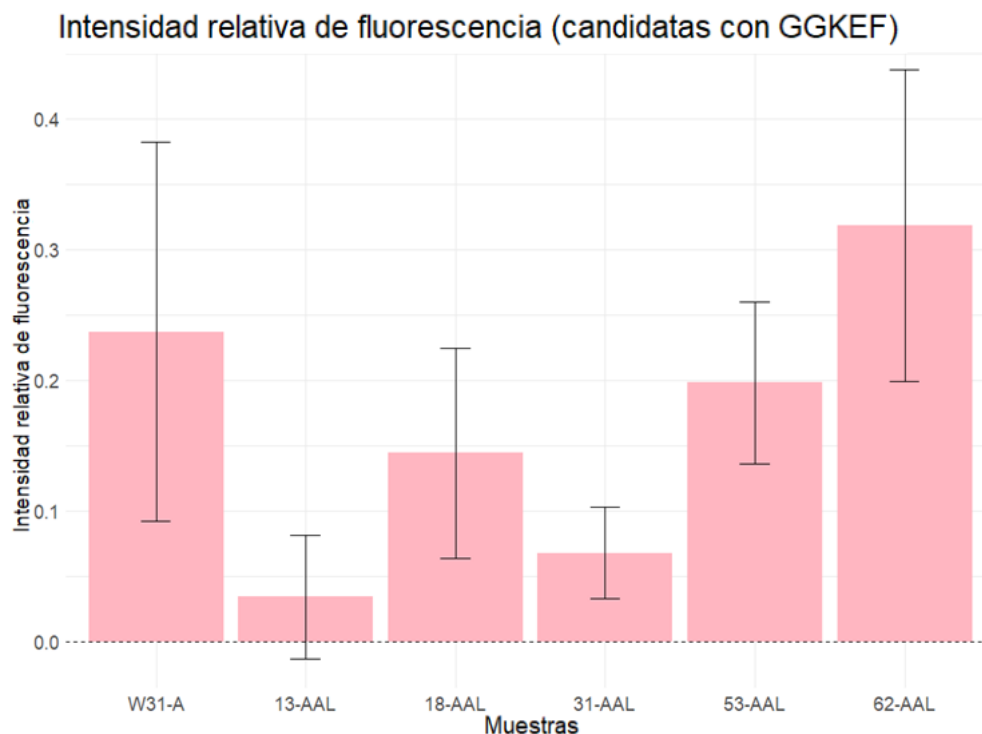


Figura 19. Intensidad de fluorescencia relativa a las 48 h para las mutantes en el dominio AAL, normalizada contra el control negativo (W31-P). W31-A corresponde al control positivo. Los valores representan media $\pm$ DE de tres réplicas biológicas.

Estos resultados confirman que las mutaciones introducidas en los motivos catalíticos GGDEF y EAL alteran significativamente el balance de síntesis y degradación del segundo mensajero. Las diferencias observadas en la intensidad de fluorescencia entre los distintos clones permitieron identificar las construcciones con efectos más pronunciados sobre los niveles de c-di-GMP, las cuales fueron seleccionadas para su posterior confirmación por secuenciación y análisis fenotípico en *A. baldaniorum* Sp245. La medición de fluorescencia se realizó en un sistema heterólogo de *E. coli* portador del biosensor pDZ-2, expresando un gen de *Azospirillum*. Dado que esta aproximación se encuentra en fase de estandarización para CdG, es esperable una variabilidad mayor entre réplicas/clones, lo que puede reducir la significancia estadística con $n=3$, aun cuando exista una tendencia

6.7. Validación de mutantes puntuales

Con el fin de confirmar la correcta introducción de las mutaciones diseñadas en los dominios GGDEF, EAL y PAS del gen *cdgD*, se llevó a cabo la validación molecular de todas las construcciones generadas mediante PCR y secuenciación Sanger. Las regiones modificadas fueron amplificadas utilizando la Phusion™ Plus DNA Polymerase, obteniéndose fragmentos de los tamaños esperados: aproximadamente 400 pb para GGKEF, 300 pb para AAL y ~850 pb para las variantes del PAS (Figura 20-23). La nitidez de las bandas y la ausencia de productos inespecíficos confirmaron la eficiencia y especificidad de las reacciones de PCR.

En las mutantes en los sitios catalíticos, la secuenciación confirmó los cambios planeados: en GGKEF, el codón GAC → AAG, sustituyendo el residuo Asp584 por Lys, y en AAL, el codón GAG → GCG, reemplazando Glu710 por Ala, validando así las mutaciones en los motivos GGDEF → GGKEF y EAL → AAL, respectivamente (Figuras 20–21)

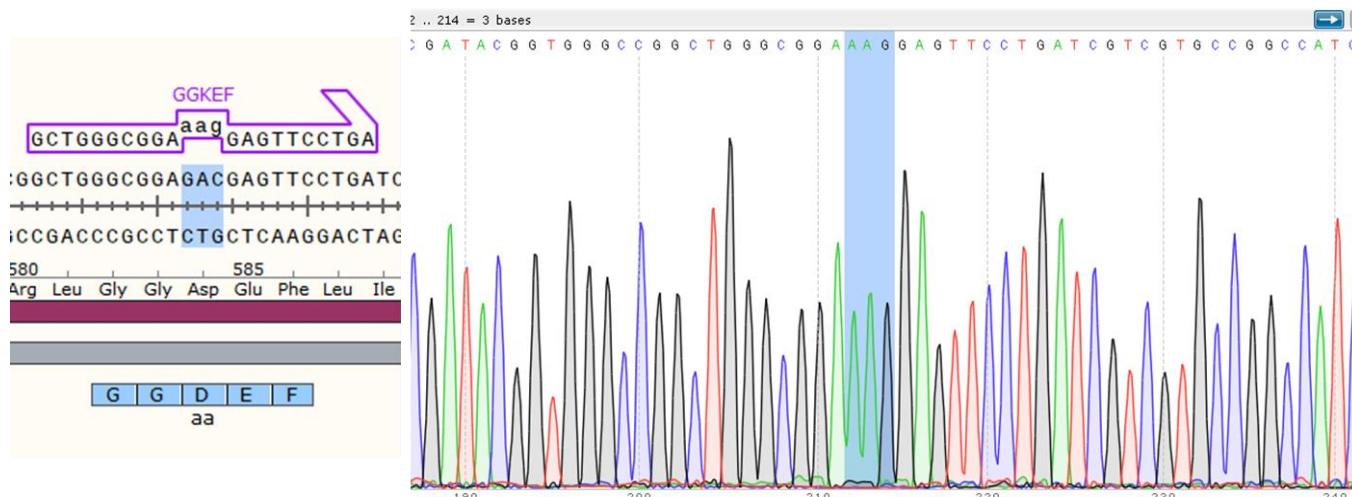


Figura 20. Confirmación por secuenciación Sanger de la mutación GGKEF; el cromatograma muestra el cambio GAC → AAG que sustituye Asp584 por Lys en el dominio GGDEF.

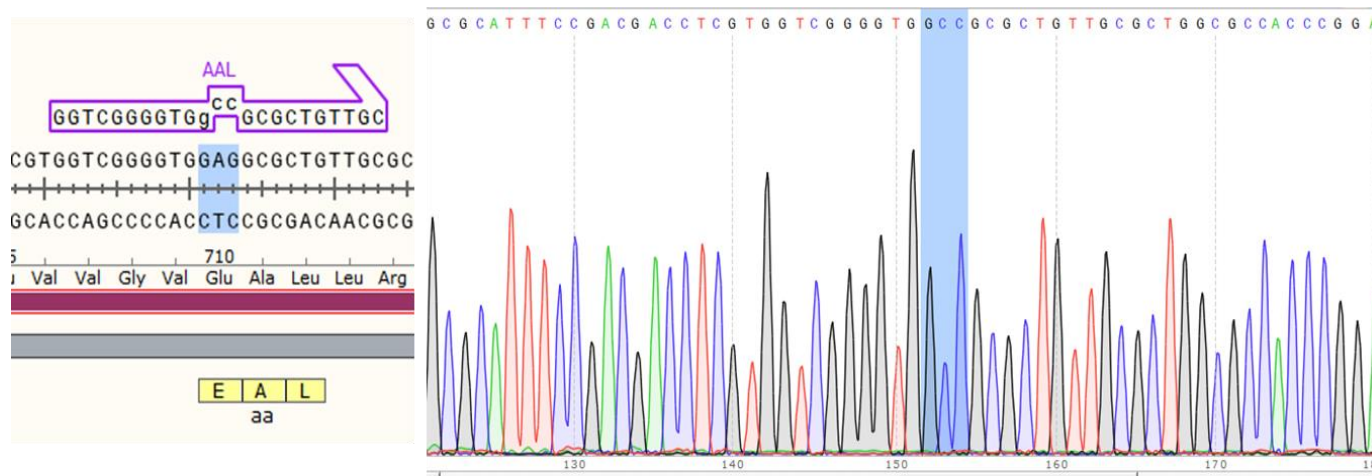


Figura 21. Confirmación por secuenciación Sanger de la mutación AAL; el cromatograma muestra el cambio GAG → GCG que sustituye Glu710 por Ala en el dominio EAL.

De manera similar, las variantes del dominio PAS fueron validadas experimentalmente. La PCR amplificó un fragmento de aproximadamente 857 pb, correspondiente a la región que codifica para el dominio PAS (Figura 21). Las cepas candidatas 1 y 2 correspondieron a la mutación puntual PASmp (C407S), mientras que las candidatas 3 y 4 contenían la eliminación de la α hélice conservada del PAS (PAS Δ H). Ambas modificaciones fueron confirmadas por secuenciación, observándose en el caso de PASmp el cambio del triplete TGC → AGC, que sustituye Cys407 por Ser, mientras que en PAS Δ H se eliminó la α hélice identificada como el

elemento estructural más conservado del dominio, sin afectar los residuos adyacentes ni la topología β - α característica del pliegue PAS (Figura 22-23).

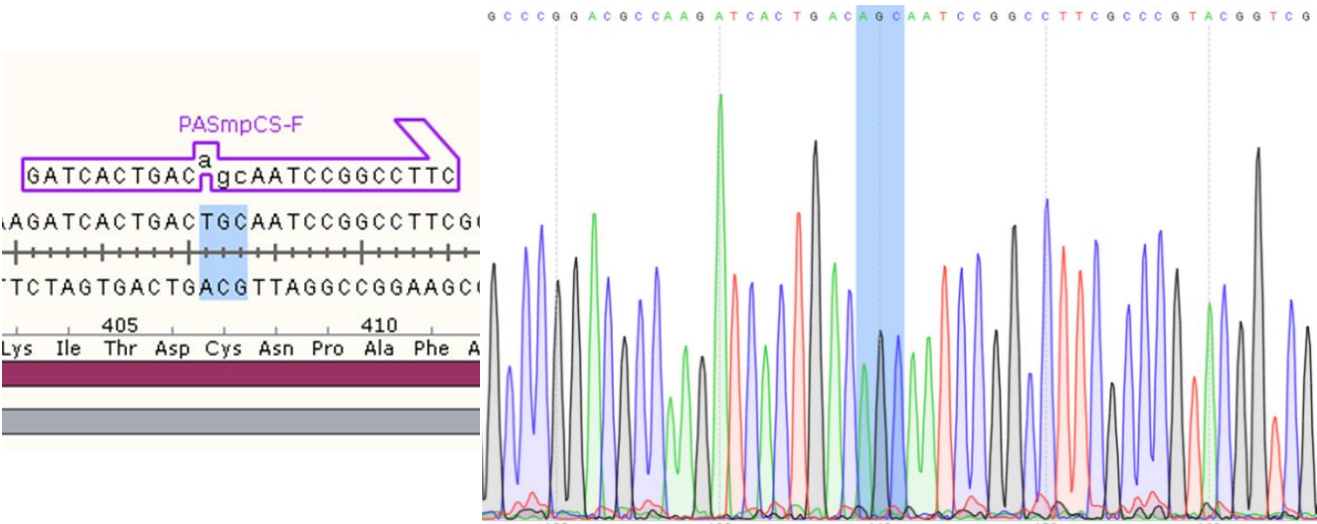


Figura 22. Confirmación por secuenciación Sanger de la mutación PASmp; el cromatograma muestra el cambio TGC → AGC que sustituye Cys407 por Ser en el dominio PAS.

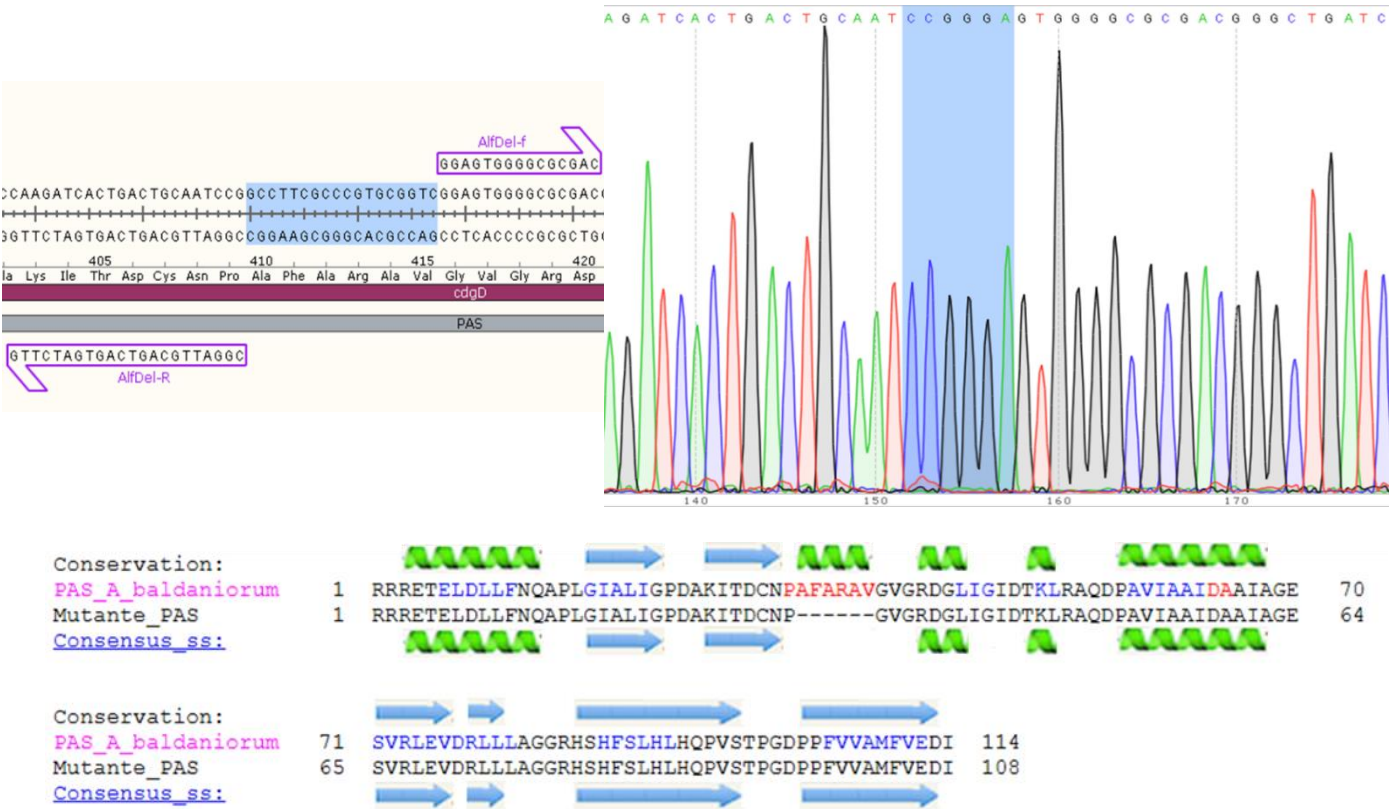


Figura 23. Validación de la mutante PASΔαH de *cdgD*. El cromatograma de secuenciación indicando el sitio de deleción y el alineamiento de la secuencia de aminoácidos del dominio PAS silvestre con la mutante, donde se observa la pérdida parcial de la α hélice conservada y la conservación del resto de la estructura secundaria.

Finalmente, los plásmidos validados se transfirieron exitosamente a *Azospirillum baldaniorum* Sp245 mediante conjugación biparental, ya que la transformación química o por electroporación no es un método rutinario ni reproducible para este hospedero en nuestras condiciones. La integración de las construcciones en el hospedador fue comprobada mediante PCR combinada con un iniciador dirigido al gen de resistencia a gentamicina (presente en el vector pBBR1MCS-2) y otro específico del gen *cdgD*, obteniéndose un producto de aproximadamente 2000 pb únicamente en las cepas transformadas, confirmando la presencia de las variantes recombinantes en *A. baldaniorum* (Figura 24).

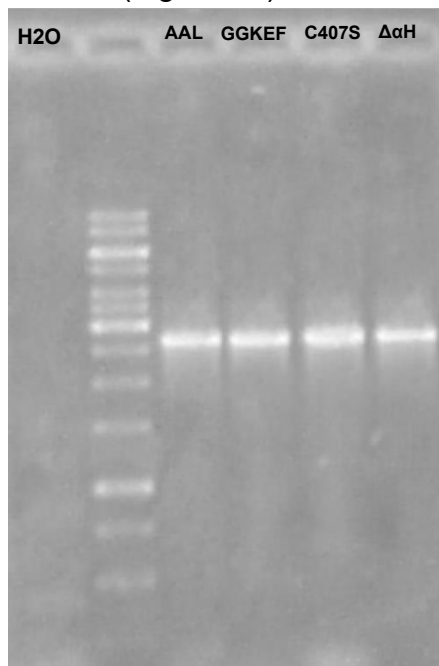


Figura 24. PCR de verificación de la inserción de las construcciones recombinantes en *Azospirillum baldaniorum* Sp245. Se observa un amplicón específico en las cepas transformadas (AAL, GGKEF, C407S y $\Delta\alpha H$), mientras que el control negativo (H_2O) no mostró señal, confirmando la presencia de las variantes del gen *cdgD* en el hospedador.

Estos resultados demuestran la correcta obtención y verificación de las mutaciones puntuales y eliminaciones en el dominio PAS y en los sitios catalíticos de CdgD, estableciendo las bases moleculares para su posterior caracterización funcional en la modulación de los niveles intracelulares de c-di-GMP y su relación con la movilidad bacteriana.

6.8. Ensayos de movilidad

Con el propósito de evaluar el efecto de las mutaciones generadas en el gen *cdgD* sobre la movilidad bacteriana regulada por c-di-GMP, se realizaron ensayos de motilidad natatoria en medio mínimo base K suplementado con prolina o malato como únicas fuentes de carbono. Las cepas de *Azospirillum baldaniorum* Sp245 portadoras de las variantes GGKEF, AAL, PAS-C407S y PAS $\Delta\alpha H$, junto con los controles Sp245 WT, Sp245 (pBBR1MCS) y Sp245 (*cdgD*), se inocularon en el centro de placas en agar semisólido (0.25 %) y se incubaron a 30 °C durante 48 h.

Movilidad en prolina

En medio K–prolina se observaron diferencias claras en el diámetro de los halos de desplazamiento (Figura 25). La cepa Sp245 (*cdgD*), que sobreexpresa el gen completo, mostró el mayor halo de movilidad, significativamente superior al de la cepa silvestre ($p < 0.05$), lo que indica que la sobreexpresión de CdgD favorecen un estado más móvil. La variante Sp245 (*cdgD*^{GGDEF-GGKEF}) también presentó halos amplios, comparables a los de la cepa sobreexpresada, lo que sugiere que la mutación en el motivo GGDEF no impide a CdgD sostener la motilidad en estas condiciones y es consistente con que, bajo este contexto, la proteína opere principalmente como fosfodiesterasa.

El control Sp245 (pBBR1MCS) exhibió halos menores que la WT, lo que probablemente refleja el costo energético de portar el vector vacío. Entre las variantes del dominio PAS, PAS-C407S mostró una reducción consistente en el diámetro de los halos, mientras que PAS- $\Delta\alpha$ H presentó un fenotipo drásticamente afectado, con una movilidad disminuida y diferencias altamente significativas respecto al resto de las cepas ($p < 0.001$). Estos resultados indican que las alteraciones en el PAS, en especial la delección de la α hélice conservada, comprometen severamente la capacidad de desplazamiento en prolina.

La cepa Sp245 (*cdgD*^{EAL-AAL}) mostró halos menores que los de la WT, sin alcanzar la reducción extrema observada en Δ PAS α H. Esto sugiere que la mutación en el dominio EAL tiene un efecto negativo sobre la motilidad, pero no tan marcado como el causado por la alteración estructural profunda del dominio PAS (Figura 26).

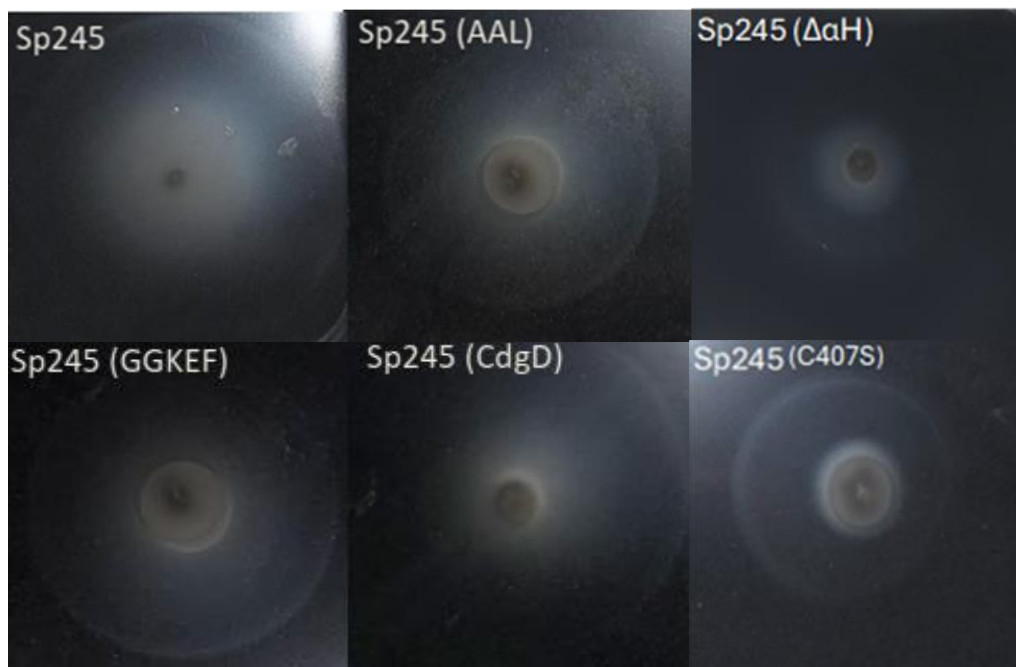


Figura 25. Ensayos de motilidad natatoria en medio K–prolina (48 h) de *Azospirillum baldaniorum* Sp245 y variantes de *cdgD* (*cdgD*, GGKEF, AAL, PAS-C407S, Δ PAS α H), mostrando diferencias en el tamaño de los halos de desplazamiento.

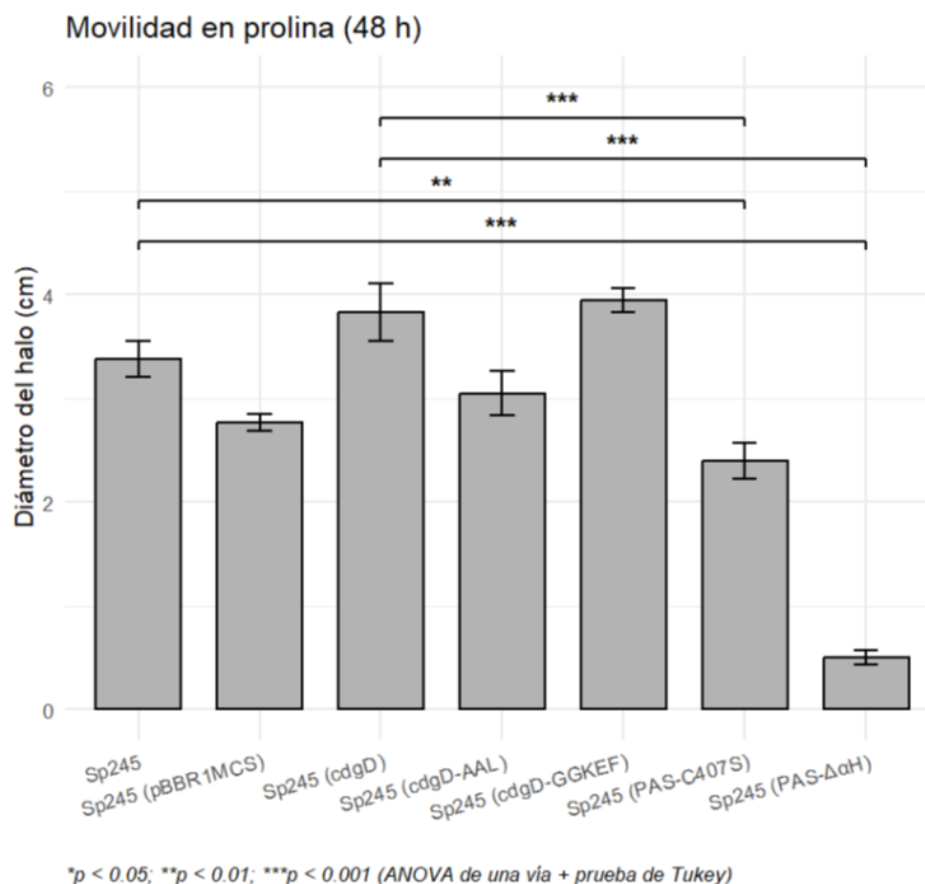


Figura 26. Diámetro de los halos de movilidad en medio K–prolina (48 h) de *Azospirillum baldaniorum* Sp245 y variantes de *cdgD*. Las mutaciones en GGDEF, EAL y PAS alteran la motilidad, con una reducción marcada en la delección de la hélice α del PAS.

Movilidad en malato

En medio K–malato (Figura 27) se observó una tendencia similar, aunque menos pronunciada. Las cepas Sp245 (cdgD) y Sp245 (cdgD^{GGDEF-GGKEF}) mostraron los halos de mayor tamaño, significativamente superiores a los de PAS $\Delta\alpha$ H ($p < 0.001$), lo que indica que, en este sustrato, ambas construcciones sostienen un fenotipo móvil, indicando una función como fosfodiesterasa. La cepa Sp245 (pBBR1MCS-5) se mantuvo cercana al nivel de la WT, mientras que PAS-C407S presentó una disminución en el diámetro de los halos.

Al igual que en prolina, la mutante Δ PAS α H exhibió la mayor reducción de movilidad, con halos notablemente menores que los del resto de las cepas. Por su parte, Sp245 (cdgD^{EAL-AAL}) mostró una disminución de la motilidad respecto a la WT y a las variantes cdgD y GGKEF, consistente con la función de este dominio.

En conjunto, los ensayos de movilidad en prolina y malato indican que la actividad de CdgD depende de la interacción funcional entre sus dominios sensoriales y catalíticos. Las mutaciones en GGDEF y EAL modifican el fenotipo de motilidad con respecto a la WT, mientras que las alteraciones estructurales en el dominio PAS, en especial la delección de la α hélice conservada, disminuyen notablemente la movilidad de *A. baldaniorum* sp245.

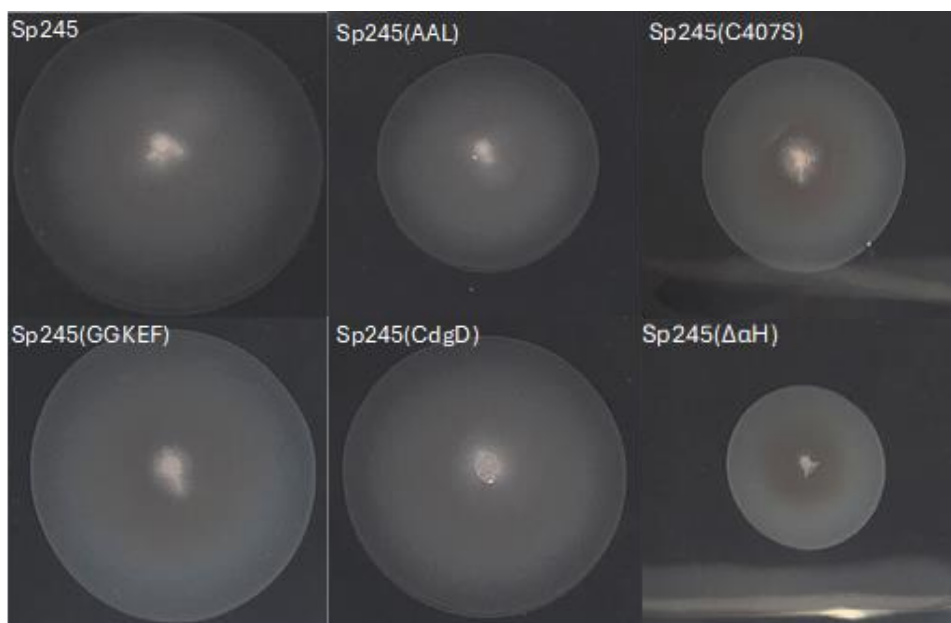


Figura 27. Ensayos de motilidad natatoria en medio K–malato (48 h) de *Azospirillum baldaniorum* Sp245 y variantes de *cdgD*, donde se observa una reducción de la movilidad en las mutantes AAL, PASmp y especialmente PASΔαH.

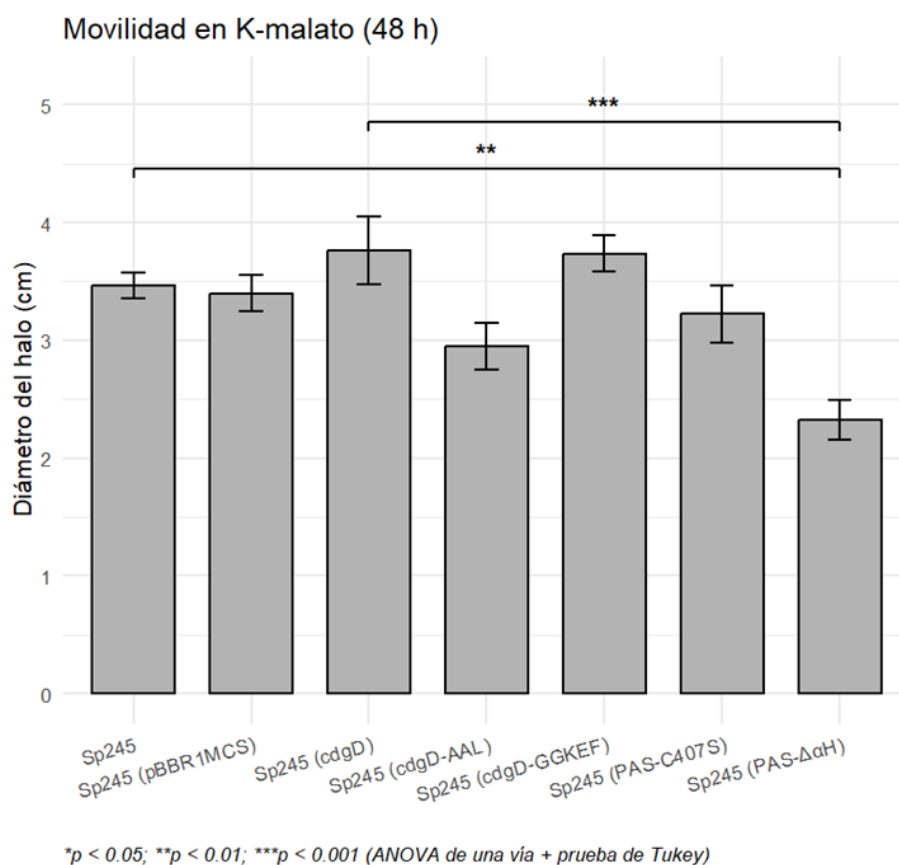


Figura 28. Diámetro de los halos de movilidad en medio K–malato (48 h) de *Azospirillum baldaniorum* Sp245 y variantes de *cdgD*. Las mutaciones en GGDEF, EAL y PAS modifican la motilidad, destacando la disminución observada en PASΔαH.

7. DISCUSION

El presente estudio se enmarca en el creciente interés por comprender cómo las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB) regulan la transición entre los estados móviles y sésiles a través de la señalización intracelular mediada por el segundo mensajero c-di-GMP (Huang et al., 2024). Esta molécula regula múltiples procesos fisiológicos, entre ellos la motilidad, la formación de biopelículas, la producción de exopolisacáridos y la interacción planta–microorganismo (Ryan & Dow, 2006; Valentini & Filloux, 2016). Dentro de este sistema, la proteína híbrida CdgD, la cual integra dominios sensoriales (PAS y CHASE) y catalíticos (GGDEF y EAL), participan de manera importante en la regulación de la motilidad de *Azospirillum baldaniorum* Sp245, en las condiciones evaluadas en este estudio.

La arquitectura modular de CdgD permite que la célula perciba señales intracelulares a través de su dominio PAS y las traduzca en cambios en el nivel intracelular de c-di-GMP mediante las actividades opuestas de sus dominios catalíticos GGDEF (diguanylató ciclasa) y EAL (fosfodiesterasa). Este tipo de proteínas híbridas ha sido reportado en múltiples bacterias (Mata et al., 2018; Seshasayee et al., 2010). En *Azospirillum*, el estudio de CdgD adquiere especial relevancia porque la señalización por c-di-GMP se ha vinculado directamente con la capacidad de esta bacteria para colonizar raíces e internalizarse en tejidos de trigo (Sierra et al., 2021). De forma similar, en otros modelos como *Pseudomonas aeruginosa* y diversas especies del género *Vibrio* se han caracterizado redes extensas de señalización por c-di-GMP que combinan enzimas DGC, PDE y numerosas proteínas GGDEF–EAL híbridas, las cuales coordinan procesos como la motilidad, la formación de biopelículas y la virulencia (Kulasakara et al., 2006; Römling & Galperin, 2023; Gong et al., 2023). En este contexto comparativo, CdgD de *A. baldaniorum* se integra como una de las proteínas híbridas CHASE–PAS–GGDEF–EAL que potencialmente conectan la percepción de señales del suelo y de la planta con la regulación fina de los niveles intracelulares de c-di-GMP. En consecuencia, las mutaciones que afectan cualquiera de sus dominios tienen un impacto directo sobre la motilidad y la capacidad de colonización, como se evidenció en los fenotipos analizados.

Los resultados de este trabajo confirman que el dominio PAS de CdgD cumple un papel central tanto estructural como funcional.

Lejos de actuar únicamente como un sensor pasivo, los fenotipos de las mutantes PAS-C407S y PAS $\Delta\alpha$ H sugieren que el dominio PAS podría funcionar como un módulo de acoplamiento estructural, capaz de transmitir cambios conformacionales hacia los dominios catalíticos y, con ello, contribuir a modular el equilibrio entre la síntesis y la degradación de c-di-GMP. Aunque los modelos de I-TASSER muestran una alta conservación del pliegue PAS con identidades de secuencia de solo 13–22 %, los fenotipos de las mutantes PAS-C407S y Δ PAS α H apoyan la idea de que la integridad del dominio PAS es necesaria para sostener la motilidad y la regulación de c-di-GMP en CdgD.

Los dominios PAS (Per–Arnt–Sim) son sensores universales presentes en todos los reinos de la vida, capaces de detectar estímulos físicos o químicos como luz,

oxígeno, potencial redox o metabolitos (Taylor & Zhulin, 1999; Henry & Crosson, 2011). En bacterias, se asocian frecuentemente a quinasas, ciclasas y fosfodiesterasas, y su función principal consiste en traducir la detección del entorno en una respuesta estructural que activa o inhibe al dominio efector. Estructuralmente, los PAS comparten un pliegue conservado de cinco láminas β antiparalelas rodeadas por 4-6 α hélices, que forman una cavidad interna para la unión de cofactores como FMN, FAD o hemo (Möglich et al., 2009; Stuffle et al., 2021). La unión de estos cofactores altera el estado electrónico del dominio, generando desplazamientos helicoidales que transmiten la señal a regiones adyacentes.

En el caso del PAS de CdgD, los alineamientos estructurales con dominios homólogos de *Brucella abortus* (6PH4), *Erythrobacter litoralis* (3P7N) y *Azotobacter vinelandii* (2GJ3) evidenciaron que, aunque el pliegue global se conserva, los residuos clave para la unión de FMN/FAD no están presentes. Este resultado sugiere que el PAS de CdgD podría no comportarse como un sensor flavínico típico y que, en cambio, podría reconocer otros tipos de ligandos, lo que propone un modo alternativo de detección, posiblemente basado en cambios conformacionales internos o en interacciones proteína-proteína. Casos similares han sido reportados en otros sistemas donde los PAS actúan como transductores mecánicos o reguladores alostéricos sin requerir cofactores (Henry & Crosson, 2011; Amezcua et al., 2002). Por tanto, la ausencia de los motivos flavínicos clásicos no implica pérdida de función, sino una diversificación adaptativa de la señalización PAS, potencialmente ajustada al entorno rizosférico.

Entre los rasgos más destacados del PAS de CdgD se encuentra la presencia de una cisteína expuesta (C407) en la cavidad interna. Aunque no corresponde a las cisteínas reactivas de los sensores LOV o redox, su ubicación sugiere una función estructural relevante, posiblemente asociada a la estabilización del pliegue o al acoplamiento con la hélice terminal. En varios sistemas, las cisteínas del PAS son esenciales para la propagación de la señal, ya sea mediante enlaces covalentes con el cofactor (en LOV) o en la coordinación de grupos redox (en FixL y NifL) (Zoltowski & Gardner, 2011; Burgie & Vierstra, 2014). En dominios PAS tipo LOV, una cisteína conservada ubicada en el bolsillo sensorial forma, tras la excitación con luz azul, un aducto covalente con FMN que desencadena cambios conformacionales propagados al resto de la proteína (Nash et al., 2011; Rinaldi et al., 2021). En CdgD, la Cys407 es la única cisteína presente dentro de la región definida como dominio PAS, por lo que se seleccionó como residuo candidato a cumplir un papel análogo en la detección de señal. La sustitución C407S produjo una disminución de la motilidad, lo que sugiere que este residuo contribuye a la comunicación estructural entre el dominio PAS y los dominios catalíticos. Sin embargo, nuestros datos no permiten establecer si participa de manera directa en fotodetección o en la unión de FMN, de modo que la naturaleza exacta de la señal y la conformación que adopta CdgD *in vivo* deberán abordarse en trabajos futuros.

Por otro lado, la mutante PAS Δ H, en la que se eliminó la α hélice más conservada del dominio, mostró un fenotipo mucho más severo, con una pérdida casi total de la

motilidad. Dado que la Cys407 no se localiza en la posición canónica descrita para sensores LOV y la probabilidad de observar un cambio marcado con una sola sustitución era limitada, se optó por una aproximación más agresiva: eliminar dicha hélice para perturbar de manera clara el funcionamiento del dominio PAS. En varios sensores PAS se ha demostrado que las hélices terminales ($\alpha F/\alpha G$) actúan como “bisagras” que transmiten los movimientos del núcleo β hacia el dominio efector o hacia interfaces de dimerización (Amezcueta et al., 2002; Kurokawa et al., 2004). Además, en módulos de señalización por c-di-GMP de *Pseudomonas aeruginosa* se ha propuesto que regiones helicoidales equivalentes contribuyen a la formación de dímeros PAS o a la interacción con dominios GGDEF de otras proteínas, modulando así su actividad catalítica en respuesta a señales como el hierro (Zhan et al., 2024). En este sentido, la pérdida de la hélice probablemente impide la correcta propagación de la señal y/o la formación de complejos funcionales, desestabilizando la conformación activa de los dominios GGDEF o EAL, una hipótesis que deberá explorarse en trabajos futuros.

Los análisis de docking apoyan esta hipótesis. Los modelos mutantes mostraron energías de acoplamiento reducidas (-5.5 y -5.1 kcal·mol⁻¹ frente a -7.9 kcal·mol⁻¹ en el PAS nativo), así como pérdida de contactos en el bolsillo sensorial. Esto sugiere que las modificaciones estructurales debilitan la flexibilidad del dominio y su capacidad de comunicación intramolecular. Así, el PAS de CdgD no funcionaría como un sensor de ligando clásico, sino como un módulo estructural de acoplamiento, cuya integridad determina la orientación y la interacción funcional de los dominios catalíticos.

Además, el modelado del PAS en forma dimérica mostró una cavidad central amplia y una interfaz estable entre monómeros, consistente con la función de dimerización descrita para otras ciclasas dependientes de PAS (Luo et al., 2022). Dado que la actividad de las diguanilato ciclasas requiere la cooperación de dos subunidades (Schirmer & Jenal, 2009), es plausible que el PAS de CdgD facilite esta asociación, alineando los sitios activos catalíticos. En este contexto, la delección de la α hélice conservada podría desestabilizar dicha interfaz, explicando la pérdida de motilidad observada en la mutante PAS Δ H.

En conjunto, los resultados permiten proponer que el PAS de CdgD podría cumplir una doble función: actuar como un sensor estructural capaz de responder a cambios ambientales o redox, y actuar como un módulo de dimerización garantizando la correcta activación de los dominios catalíticos. La sustitución C407S afecta la estabilidad local y la propagación de la señal, mientras que la eliminación de la α hélice impide la dimerización y reduce la actividad de la proteína. Ambos efectos se traducen en un incremento de c-di-GMP intracelular y en una reducción de la motilidad, coherente con un estado constitutivo de alta formación de c-di-GMP.

Esta interpretación concuerda con los modelos propuestos para otras proteínas híbridas PAS–GGDEF–EAL, como SadC o BifA de *P. aeruginosa* (Gong et al., 2023; Sarenko et al., 2017), donde la activación depende de la dimerización mediada por sensores PAS o HAMP.

En conjunto, los resultados de este trabajo apoyan que CdgD participa en la regulación de la motilidad de *A. baldaniorum* bajo las condiciones ensayadas y que la integridad de sus dominios GGDEF, EAL y PAS es importante para esta función. Las mutantes en los motivos catalíticos modifican la señal del biosensor de c-di-GMP en *E. coli* y alteran el patrón de desplazamiento en placa, mientras que las variantes en el PAS, en particular la delección de la α hélice conservada, provocan una reducción marcada de la motilidad. El análisis estructural sugiere que el PAS de CdgD conserva el pliegue típico de la familia, pero presenta cambios en residuos del bolsillo sensorial compatibles con un modo de reconocimiento de ligando distinto al descrito para dominios PAS dependientes de flavinas, lo que abre la posibilidad de que detecte flavinas en un entorno diferente a lo descrito u otros cofactores aún no caracterizados. A futuro, será necesario combinar estudios estructurales experimentales (por ejemplo, cristalografía o espectroscopía) con ensayos funcionales en condiciones de interacción con la planta para definir con mayor precisión el ligando del PAS, el grado de bifuncionalidad de CdgD y su contribución específica a la adaptación de *A. baldaniorum* en la rizósfera.

8. CONCLUSION

El presente estudio demuestra que el dominio PAS de la proteína híbrida CdgD de *Azospirillum baldaniorum* Sp245 desempeña un papel central en la regulación del segundo mensajero c-di-GMP. Para ello, se integró un enfoque combinado que incluyó análisis bioinformático, modelado estructural del dominio PAS, mutagénesis sitio-dirigida y evaluación funcional mediante un biosensor heterólogo de c-di-GMP en *E. coli* y ensayos de motilidad en *A. baldaniorum*. El análisis *in silico* del PAS permitió identificar que, pese a la baja conservación de residuos asociados a PAS flavínicos, el dominio conserva el pliegue global característico de la familia y presenta una cavidad interna con elementos estructurales relevantes para diseño de mutantes. Con base en ello se generaron dos variantes en PAS (C407S y Δ PAS α H), además de mutantes dirigidas en los motivos catalíticos GGDEF (GGKEF) y EAL (AAL). La obtención de estas variantes y su validación permitió disponer de un conjunto de herramientas genéticas para probar la contribución de cada módulo de CdgD en condiciones experimentales controladas.

Los resultados del biosensor en *E. coli* y los ensayos de motilidad en *A. baldaniorum* sp245 mostraron que alteraciones en cualquiera de los dominios evaluados impactan la salida funcional asociada a c-di-GMP. En particular, las mutaciones en el dominio PAS disminuyeron la motilidad respecto a los controles. Por su parte, las variantes catalíticas GGKEF y AAL modificaron la señal del biosensor y el fenotipo de motilidad en comparación con las cepas control, lo cual es consistente con un papel funcional de los motivos GGDEF y EAL en la actividad global de CdgD.

Finalmente, CdgD se consolida como una proteína híbrida multifuncional capaz de integrar percepción ambiental y regulación enzimática mediante el c-di-GMP. El dominio PAS emerge como un módulo clave en esta arquitectura, indispensable para mantener la comunicación estructural y el equilibrio catalítico interno. La pérdida de su integridad conduce a una disfunción regulatoria observable en el fenotipo de motilidad, aportando evidencia de cómo la estructura molecular condiciona la adaptación bacteriana. Este conocimiento amplía la comprensión de los mecanismos de señalización en bacterias rizosféricas y abre nuevas perspectivas para su aprovechamiento biotecnológico en la agricultura sostenible.

9. REFERENCIAS

- 1) Alonazi, M. A., Alenezi, T. M., Almutairi, M. M., Alshahrani, T. S., Alotaibi, A. M., & Alenezi, F. N. (2025). Native plant growth-promoting rhizobacteria containing ACC deaminase improve plant growth under stress. *Microorganisms*, 13(7), 1199. <https://doi.org/10.3390/microorganisms13071199>
- 2) Andersen, J. B., Høiby, N., & Ciofu, O. (2024). The dynamics of biofilm development and dispersal should be included when evaluating anti-biofilm strategies. *NPJ Biofilms and Microbiomes*, 10, 11. <https://doi.org/10.1038/s41522-023-00532-9>
- 3) Amezcua, C. A., Harper, S. M., Rutter, J., & Gardner, K. H. (2002). Structure and interactions of PAS kinase N-terminal PAS domain: Model for intramolecular kinase regulation. *Structure*, 10(10), 1349–1361. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(02\)00865-1](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(02)00865-1)
- 4) Aroney, S. T. N., Poole, P. S., & Sánchez-Cañizares, C. (2021). Rhizobial chemotaxis and motility systems at work in the soil. *Frontiers in Plant Science*, 12, 725338. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.725338>
- 5) BacDive. (2024). *Azospirillum baldaniorum* Sp245 (BacDiveID: 167292). Bacterial Diversity Metadatabase. <https://doi.org/10.13145/bacdive167292.20250331.9.3>
- 6) Barbosa, J. Z., et al. (2021). Meta-analysis reveals benefits of co-inoculation of soybean with *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum brasilense*. *Applied Soil Ecology*, 163, 103913. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2021.103913>
- 7) Barends, T. R. M., et al. (2009). Structure and mechanism of a bacterial light-regulated phosphodiesterase. *Nature*, 459(7249), 1015–1018. <https://doi.org/10.1038/nature07966>
- 8) Bhattacharyya, A., & Yu, S.-M. (2023). Bacterial biofilms as an essential component of rhizosphere colonization. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1210688. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1210688>
- 9) Bible, A. N., Stephens, B. B., Ortega, D. R., Xie, Z., Alexandre, G., & Zhulin, I. B. (2012). The *Azospirillum brasilense* Che1 chemotaxis pathway controls swimming speed and aerotaxis. *Journal of Bacteriology*, 194(12), 3343–3355. <https://doi.org/10.1128/JB.00310-12>
- 10) Burgie, E. S., & Vierstra, R. D. (2014). Phytochromes: An atomic perspective on photoactivation and signaling. *The Plant Cell*, 26(12), 4568–4583. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.133900>
- 11) Chou, S.-H., & Galperin, M. Y. (2016). Diversity of cyclic di-GMP-binding proteins and mechanisms. *Journal of Bacteriology*, 198(1), 32–46. <https://doi.org/10.1128/JB.00333-15>
- 12) Christen, M., Christen, B., Folcher, M., Schauerte, A., & Jenal, U. (2005). Identification and characterization of a cyclic di-GMP-specific phosphodiesterase and its allosteric control by GTP. *Journal of Biological Chemistry*, 280(35), 30829–30837. <https://doi.org/10.1074/jbc.M504429200>

- 13) Condori, T., Vázquez-Cruz, C., Sandoval-Villalba, E., & Távara-Zavala, K. (2024). Inoculation with *Azospirillum brasilense* as a strategy to improve purple maize yield. *Microorganisms*, 12(10), 2107. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12102107>
- 14) Corral, J., Sánchez, L. B., & Zhulin, I. B. (2023). Structural diversity and evolution of bacterial PAS domains. *Molecular Microbiology*, 120(4), 574–588. <https://doi.org/10.1111/mmi.15032>
- 15) Croes, C. L., Moens, S., Van Bastelaere, E., Vanderleyden, J., & Michiels, K. W. (1993). The polar flagellum mediates *Azospirillum brasilense* adherence to wheat roots and biofilm formation. *Microbiology*, 139(9), 2261–2269. <https://doi.org/10.1099/00221287-139-9-2261>
- 16) del Carmen Fuentes, D., Méndez-Albores, A., & Castañeda-León, A. (2024). Bioinformatic and functional analysis of a PHB polymerase (PhbC) gene in *Azospirillum baldaniorum* Sp245. *Journal of Applied Research and Technology*, 22, 100169. <https://doi.org/10.1016/j.jart.2024.100169>
- 17) Díaz, P. R., et al. (2022). *Azospirillum baldaniorum* Sp245 exploits *Pseudomonas fluorescens* A506 metabolites to thrive in dual-species macrocolony biofilms. *Environmental Microbiology Reports*, 14(6), 1165–1174. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.13139>
- 18) Domeignoz-Horta, L. A., et al. (2024). Plant diversity drives positive microbial associations in the rhizosphere enhancing carbon use efficiency in agricultural soils. *Nature Communications*. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-52449-5>
- 19) dos Santos Ferreira, N., Sant'Anna, F. H., Massena Reis, V., Ambrosini, A., Volpiano, C. G., Rothballer, M., ... Zilli, J. E. (2020). Genome-based reclassification of *Azospirillum brasilense* Sp245 as the type strain of *Azospirillum baldaniorum* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(12), 6203–6212. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004517>
- 20) El-Saadony, M. T., et al. (2024). Drought-tolerant PGPR: Roles and mechanisms under water deficit. *Current Research in Microbial Sciences*, 5, 100250. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2024.100250>
- 21) Flemming, H.-C., & Wingender, J. (2024). Microbial extracellular polymeric substances in the environment, technology and medicine. *Nature Reviews Microbiology*, 22(5), 289–305. <https://doi.org/10.1038/s41579-023-00893-8>
- 22) Galperin, M. Y. (2018). Diversity of structure and function of response regulator output domains. *Current Opinion in Microbiology*, 42, 47–55. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.10.008>
- 23) Galperin, M. Y., Chou, S.-H., & Marina, A. (2019). Structural diversity of EAL-domain phosphodiesterases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1867(10), 118626. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2019.05.008>
- 24) Galperin, M. Y., Chou, S.-H., & Marina, A. (2022). Sequence conservation, domain architectures, and evolution of the HD-GYP cyclic di-GMP phosphodiesterases. *Journal of Bacteriology*, 204(3), e00561-21. <https://doi.org/10.1128/jb.00561-21>

- 25) Ganusova, E. E., Zlotnikov, I., & Zhulin, I. B. (2021). Multiple CheY proteins control surface-associated motility in *Azospirillum brasilense*. *Frontiers in Microbiology*, 12, 664826. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.664826>
- 26) Ganusova, E. E., Yang, B., Muhandiram, D., & Zhulin, I. B. (2025). Indole-3-acetic acid (IAA) protects *Azospirillum brasilense* from indole toxicity and stabilizes membrane potential. *Applied and Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/aem.02384-24>
- 27) Hahn, J., Chen, Y., Pandey, S., & Kuipers, O. P. (2025). c-di-GMP-dependent regulation of motility by ComFB and ComFC. *mBio*, 16(1), e01569-24. <https://doi.org/10.1128/mbio.01569-24>
- 28) Hengge, R. (2021). Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 19(12), 735–749. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00613-y>
- 29) Heydorn, A., et al. (2000). Quantification of biofilm structures by the COMSTAT image-analysis software. *Microbiology*, 146(10), 2395–2407. <https://doi.org/10.1099/00221287-146-10-2395>
- 30) Huang, W., Wang, D., Zhang, X.-X., Zhao, M., Sun, L., Zhou, Y., Guan, X., & Xie, Z. (2024). Regulatory roles of the second messenger c-di-GMP in beneficial plant-bacteria interactions. *Microbiological Research*, 285, 127748. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2024.127748>
- 31) Isenberg, R. Y., & Sondermann, H. (2024). Cyclic di-GMP in the wild: Roles during plant and animal host colonization. *Annual Review of Microbiology*, 78, 181–202. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-021824-020153>
- 32) Jenal, U., Reinders, A., & Lori, C. (2017). Cyclic di-GMP: Second messenger extraordinaire. *Nature Reviews Microbiology*, 15(5), 271–284. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.190>
- 33) Junkermeier, E. H., Malone, C. L., & Jenal, U. (2023). Local signaling enhances output specificity of bacterial c-di-GMP networks. *microLife*, 4, uqad026. <https://doi.org/10.1093/femsml/uqad026>
- 34) Kamimura, R., Hattori, Y., Niwano, Y., & Iwasawa, A. (2022). Quantitative analyses of biofilm by using crystal violet: Development of a simple method using ordinary photos. *Microorganisms*, 10(10), 1956. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10101956>
- 35) Khoso, M. A., et al. (2024). Impact of plant growth-promoting rhizobacteria on plant growth and root development. *Current Opinion in Biotechnology*, 84, 103032. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2024.103032>
- 36) Liu, C. (2024). The global regulation of c-di-GMP and cAMP in bacteria. *Molecular Life*, 3(1), e12104. <https://doi.org/10.1002/mlf2.12104>
- 37) Lori, C., Ozaki, S., Steiner, S., Böhm, R., Abel, S., Dubey, B. N., Schirmer, T., & Jenal, U. (2015). Cyclic di-GMP acts as a cell cycle oscillator to drive chromosome replication. *Nature*, 523(7559), 236–239. <https://doi.org/10.1038/nature14473>

- 38) Luo, Y., Li, X., Wang, J., Zhang, Y., Zhang, C., & Zhu, J. (2022). Structural basis for dimerization control of GGDEF diguanylate cyclases. *Nature Communications*, 13, 1754. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-29465-4>
- 39) Marschmann, G. L., et al. (2024). Predictions of rhizosphere microbiome dynamics with a genome-informed and trait-based energy budget model. *Nature Microbiology*. <https://doi.org/10.1038/s41564-023-01582-w>
- 40) Mantoni, F., Bellini, D., Chan, C., Steiner, S., & Boehm, A. (2021). Studying GGDEF domain in the act: Mechanistic insight into diguanylate cyclase activation and regulation. *Life*, 11(1), 31. <https://doi.org/10.3390/life11010031>
- 41) Mata, A. R., del Carmen P., & Peralta, H. (2018). Comparative genomic analysis of GGDEF and EAL domain proteins in *Azospirillum* species. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2456. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02456>
- 42) Mata, A. R., Ramos, C., Martínez-Aguilar, L., & Bashan, Y. (2018). In silico comparative analysis of GGDEF and EAL domain signaling proteins from the *Azospirillum* genomes. *BMC Microbiology*, 18, 115. <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1157-0>
- 43) Möglich, A., Ayers, R. A., & Moffat, K. (2009). Structure and signaling mechanism of Per-Arnt-Sim domains. *Structure*, 17(10), 1282–1294. <https://doi.org/10.1016/j.str.2009.08.011>
- 44) Mukherjee, T., Leclerc, G., Karlyshev, A., & Alexandre, G. (2016). *Azospirillum brasilense* chemotaxis depends on two signaling pathways regulating distinct motility parameters. *Journal of Bacteriology*, 198(13), 1764–1772. <https://doi.org/10.1128/JB.00020-16>
- 45) Neißner, K., Schweers, H., Kruse, K., et al. (2025). The structural basis for high-affinity c-di-GMP binding to GPSII domains. *Journal of Biological Chemistry*, 301(5), 105678. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2024.105678>
- 46) Nash, A. I., McNulty, R., Shillito, M. E., Swartz, T. E., & Gardner, K. H. (2011). Structural basis of LOV domain photoreceptor activation and signal transduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(23), 9449–9454. <https://doi.org/10.1073/pnas.1104251108>
- 47) Otero, I. H., et al. (2022). β -Lactam resistance in *Azospirillum baldaniorum* Sp245 is linked to ampC and ampG. *Journal of Bacteriology*, 204(6), e00010-22. <https://doi.org/10.1128/jb.00010-22>
- 48) Orlandini, V., et al. (2014). The *Azospirillum brasilense* Sp245 case: Plasmid network analysis and genome organization. *BioMed Research International*, 2014, 951035. <https://doi.org/10.1155/2014/951035>
- 49) Paul, R., Weiser, S., Amiot, N. C., Chan, C., Schirmer, T., Giese, B., & Jenal, U. (2004). Cell cycle-dependent dynamic localization of a bacterial response regulator with a novel diguanylate cyclase output domain. *Genes & Development*, 18(6), 715–727. <https://doi.org/10.1101/gad.289504>
- 50) Pelagio-Flores, R., López-Bucio, J. S., & López-Bucio, J. (2025). A century of *Azospirillum*: Plant growth promotion and agricultural promise. *Plant Signaling & Behavior*, 20(1), 2286004. <https://doi.org/10.1080/15592324.2025.2551609>

- 51) Prando, A. M., et al. (2024). Benefits of soybean co-inoculation with *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum brasilense*: A meta-analysis. *European Journal of Agronomy*, 151, 127007. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2023.127007>
- 52) Riechmann, C., Matäus, F., & Thiem, S. (2023). Recent structural advances in bacterial chemotaxis signaling. *Current Opinion in Microbiology*, 71, 102230. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2023.102230>
- 53) Rick, C. E., Lee, C. K., & O'Toole, G. A. (2022). Localized c-di-GMP signaling networks in bacterial biofilm formation. *NPJ Biofilms and Microbiomes*, 8(1), 61. <https://doi.org/10.1038/s41522-022-00322-5>
- 54) Römling, U., Galperin, M. Y., & Gomelsky, M. (2013). Cyclic di-GMP: The first 25 years of a universal bacterial second messenger. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 77(1), 1–52. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00043-12>
- 55) Saharan, B. S., et al. (2024). From formulation to function: A detailed review of microbial extracellular polymeric substances (EPS). *Environmental Advances*, 16, 100317. <https://doi.org/10.1016/j.envadv.2024.100317>
- 56) Samir, S., Elshereef, A. A., Alva, V., Hahn, J., Eck, F., Celma, L., Thormann, K. M., Dubnau, D., Galperin, M. Y., & Selim, K. A. (2025). ComFB, a new widespread family of c-di-NMP receptor proteins. *mBio*, 16(3), e02007-24. <https://doi.org/10.1128/mbio.02007-24>
- 57) Schultheiß, T., Kemlein, M., Fuß, J., Tholey, A., Traulsen, A., Sondermann, H., & Schulenburg, H. (2023). Bacterial c-di-GMP has a key role in establishing host–microbe symbiosis. *Nature Microbiology*, 8, 1809–1819. <https://doi.org/10.1038/s41564-023-01468-x>
- 58) Shelud'ko, A. V., Chupal, S. V., Matveeva, V. A., & Ptitsyn, L. R. (2019). The polar flagellum of *Azospirillum brasilense* is involved in biofilm architecture. *Journal of Bacteriology*, 201(6), e00572-18. <https://doi.org/10.1128/JB.00572-18>
- 59) Sierra-Cacho, D., Ramírez-Mata, A., Martínez-Méndez, R., et al. (2021). CdgC, a cyclic-di-GMP diguanylate cyclase of *Azospirillum baldaniorum* is involved in internalization to wheat roots. *Frontiers in Plant Science*, 12, 748393. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.748393>
- 60) Stets, E. I., Oliveira, D. R., Lopes, L. D., & Pedrosa, F. O. (2015). The role of *Azospirillum* in plant growth: A review. *Plant and Soil*, 390(1), 1–19. <https://doi.org/10.1007/s11104-015-2430-9>
- 61) Stuffle, A. M., Johnson, M. S., Taylor, B. L., & Zhulin, I. B. (2021). PAS domains across the kingdoms: Structure, function, and evolution. *Annual Review of Biochemistry*, 90, 703–732. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-082520-083401>
- 62) Taylor, B. L., & Zhulin, I. B. (1999). PAS domains: Internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(2), 479–506. <https://doi.org/10.1128/MMBR.63.2.479-506.1999>
- 63) Taylor, B. L., Zhulin, I. B., & Johnson, M. S. (2005). Aerotaxis and other energy-sensing behavior in bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 59, 183–200. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.59.031805.133531>

- 64) Teixeira-Santos, R., et al. (2024). The use of biomimetic surfaces to reduce single- and dual-species biofilms: Quantification by CLSM-COMSTAT. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 16(4), 5671–5684. <https://doi.org/10.1021/acsami.3c17030>
- 65) Valentini, M., & Filloux, A. (2016). Biofilms and cyclic di-GMP (c-di-GMP) signalling: Lessons from two decades of research. *Journal of Biological Chemistry*, 291(24), 12547–12555. <https://doi.org/10.1074/jbc.R115.711507>
- 66) Wu, L., Weston, L. A., Zhu, S., & Zhou, X. (2023). Editorial: Rhizosphere interactions: root exudates and the rhizosphere microbiome. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1281010. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1281010>