



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Mutación y sobreexpresión del gen *fliD* de *Azospirillum*
baldaniorum Sp245

Tesis que para obtener el título de
LICENCIADO (A) EN BIOLOGÍA

PRESENTA:

Ana Gabriela Córdova Mejía

DIRECTOR (A): D.C. Alberto Ramírez Mata

02/2026



Agradecimientos

A mi mamá, por apoyarme y cuidarme tanto, nada de lo que hago sería posible sin ti.

A mi papá, siempre estarás en cada uno de mis proyectos.

Al Dr. Alberto Ramírez, gracias por recibirme en su laboratorio y confiar en mi para realizar este proyecto. Gracias por todo lo que me enseñó y por su paciencia y disposición al resolver mis dudas.

A los integrantes del laboratorio de la interacción bacteria planta, a la química María Luisa por apoyarme cada que tenía que hacer un nuevo experimento y por siempre resolver mis dudas; a la Dra. Sandra Reyes por siempre estar dispuesta a ayudarme; y a mis compañeros por todo su apoyo y por hacer más amenas las horas en el laboratorio.

A la Facultad de Ciencias Biológicas y a los profesores que me formaron e inspiraron; a la Dra. Rocío Pérez y al Dr. Oswaldo Torres por sus revisiones a este trabajo.

Y a mis amigos, ni la carrera ni la vida serian lo mismo sin ustedes. Alma, gracias por estar para verme cumplir otra de mis metas y gracias Theresse por siempre impulsarme y estar para mí.

Índice

Resumen	5
Introducción	7
Antecedentes	13
Planteamiento del problema	14
Hipótesis.....	15
Objetivo general	15
Objetivos específicos	15
Metodología.....	15
Condiciones de cultivo	15
Sobreexpresión y purificación de FliD.....	16
Extracción de ADN genómico	16
Extracción de ADN plasmídico.....	17
Diseño de oligonucleótidos	18
Clonación en vector pGEM T-Easy	18
Subclonación en el vector suicida pJMS-Km	19
Conjugación biparental	19
Ensayo de movilidad.....	20
Extracción de proteínas de superficie	20
Western blot.....	21
Inmunofluorescencia.....	21
Resultados	22
Análisis bioinformático	22
Purificación de la flagelina polar	26

Eliminación del gen <i>fliD-1</i> de <i>A. baldaniorum</i> Sp245	28
Amplificado de los fragmentos aledaños al gen <i>fliD-1</i>	28
Clonación en vector pGEM-T Easy	30
Subclonación en el vector suicida pJMS-Km	31
Conjugación en <i>A. baldaniorum</i> Sp245 WT	36
Ensayos de movilidad	37
Detección de FliD en extractos de proteínas de superficie	39
Detección de FliD por inmunofluorescencia.....	40
Discusión.....	41
Conclusiones.....	45
Perspectivas.....	45
Bibliografía	45

Resumen

Azospirillum es un género de bacterias promotoras del crecimiento vegetal reconocidas por sus varios mecanismos de promoción del crecimiento como la fijación biológica del nitrógeno, la producción de fitohormonas, la solubilización de nutrientes y la protección ante patógenos. La bacteria establece su interacción con la planta mediante la colonización de la raíz y las plantas inoculadas con *Azospirillum* modifican su arquitectura radicular resultando en una mayor captación de nutrientes y agua. Las bacterias de este género son altamente móviles por su sistema flagelar mixto con un flagelo polar y varios flagelos laterales. El flagelo polar es una estructura anclada a la superficie celular que se compone del cuerpo basal, el gancho y el filamento; este último se compone a su vez de dos proteínas, FliC y FliD, donde probablemente FliD es la responsable de incorporar las subunidades de FliC para construir el filamento. En *Azospirillum*, el filamento de su flagelo polar se ha reportado como una glicoproteína que no solo es necesaria para la movilidad, sino también para que las bacterias puedan colonizar la raíz y que se dé la interacción con la planta. Asimismo, se ha reportado que el flagelo polar participa en otros procesos como la formación de biopelícula, la inducción de respuestas inmunes en las plantas y cambios en la arquitectura radicular. No obstante, se desconoce el papel que cada uno de los componentes del filamento del flagelo tiene en estos procesos. Se ha encontrado que *Azospirillum baldaniorum* Sp245 cuenta con dos genes que codifican para la proteína FliD, aunque se desconoce el papel de cada uno en la formación del filamento flagelar. El objetivo de este proyecto fue eliminar el gen *fliD-1* de *A. baldaniorum* Sp245 y sobreexpresar su producto proteico. La proteína FliD se sobreexpresó en un sistema heterólogo *E. coli* Rosetta pGEX-fliD y se purificó por cromatografía de afinidad. La mutante $\Delta fliD$ se generó por reemplazo alélico y con ella se realizaron ensayos para evaluar cambios en la movilidad y en la detección de la proteína FliD mediante ensayos de movilidad natatoria, extracción de proteínas de superficie e inmunofluorescencia. Los resultados demuestran que la FliD se pudo sobreexpresar y purificar en el sistema heterólogo *E. coli* Rosetta pGEX-fliD. La estrategia de reemplazo alélico permitió

obtener la cepa *A. baldaniorum* $\Delta fliD$ y se detectó una disminución en su movilidad y alteraciones en la detección de la proteína.

Introducción

Las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal, o PGPR por sus siglas en inglés (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria), son un grupo de bacterias ubicadas en la rizosfera, la zona del suelo en contacto con las raíces de las plantas, que se caracterizan por su capacidad de asociarse con las plantas y estimular su crecimiento. El grupo de las PGPR incluye géneros como *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Azotobacter*, *Clostridium* y *Azospirillum*. (Pathania et al., 2020)

El género *Azospirillum* es uno de los más estudiados dentro del grupo de las PGPR. Fue descrito por primera vez en 1925 por Beijerinck, pero ganó popularidad hasta 1970 cuando los trabajos de Döbereiner demostraron la capacidad de las bacterias de este género de fijar nitrógeno y producir fitohormonas. (Cassán et al., 2020) Las bacterias del género *Azospirillum* son microorganismos Gram negativos de vida libre, pertenecientes a las α -proteobacterias y metabolizan diversas fuentes de carbono y nitrógeno. (Ferreira et al., 2020) Las bacterias del género son altamente móviles debido a que poseen un sistema mixto de flagelación con un flagelo polar que, en medio líquido, le permite realizar un movimiento conocido como *swimming* y en medio sólido presenta flagelos laterales que le permiten realizar otro movimiento conocido como *swarming*. (Steenhoudt & Vanderleyden, 2000)

La asociación de *Azospirillum* con las plantas cambia la arquitectura radicular resultando en una disminución en el largo de la raíz primaria, incremento en el número de raíces laterales, mayor número y ramificación de los pelos radiculares e incrementos en la superficie y volumen de la raíz. (Cassán et al., 2020) En consecuencia, la planta aumenta su captación de nutrientes y agua que se traducen en un mayor crecimiento. La promoción del crecimiento por *Azospirillum* se ha atribuido en gran medida a su capacidad de fijación biológica del nitrógeno, que fue el primer mecanismo descrito para esta bacteria, y también a la producción de fitohormonas, principalmente el ácido indol acético, pero también otras auxinas, citoquininas y giberelinas. No obstante, otros mecanismos han sido asociados a la promoción del crecimiento por *Azospirillum* como la solubilización de fosfato

inorgánico, mitigación de estrés abiótico por sequía y salinidad y control biológico de fitopatógenos por la síntesis de sideróforos. (Fukami et al., 2018)

Para que se dé la interacción entre *Azospirillum* y las plantas es necesario que la bacteria colonice la raíz. La movilidad natatoria o *swimming* es el movimiento que realizan las bacterias impulsadas por su flagelo en condiciones de baja viscosidad, como el agua, y se ha mostrado que este tipo de movilidad es clave para que la bacteria establezca interacción con la planta (Alexandre, 2025). Además de la movilidad natatoria, la quimiotaxis, definida como la habilidad que tienen las bacterias de responder a los estímulos químicos de su ambiente para moverse en favor de mejores condiciones y alejarse de condiciones desfavorables, permite que las bacterias se muevan hacia las raíces al verse atraídas por los exudados radiculares que producen las plantas y que se ha descrito pueden estar constituidos por carbohidratos, aminoácidos y ácidos orgánicos que la bacteria puede usar como fuente de energía. (Fournneau et al., 2024) Diversos receptores en la bacteria detectan cambios químicos en el ambiente y desencadenan vías de señalización que cambian el movimiento del flagelo polar para modificar la dirección del movimiento. (Alexandre, 2015)

Una vez que la bacteria ha llegado a las raíces, es necesario que se adhiera a estas para establecer la asociación con la planta. El proceso de adhesión a la raíz comprende dos fases (Figura 1): adsorción y anclaje. En la primera fase la bacteria se adsorbe de forma rápida y reversible a las raíces. Los experimentos de Croes et al. en 1993 demostraron que el flagelo polar es necesario en esta fase al generar cepas de *A. brasilense* Sp7 sin flagelo polar que fueron incapaces de adherirse a las raíces de trigo. La segunda etapa o etapa de anclaje sucede cuando las bacterias forman agregados y se anclan de forma irreversible a las raíces ayudadas por la secreción de exopolisacáridos. (Steenhoudt & Vanderleyden, 2000)

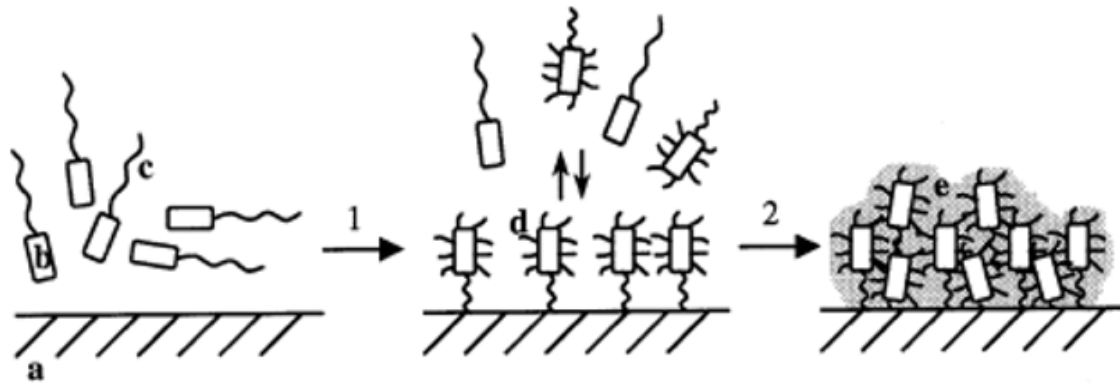


Figura 1. El proceso de anclaje de *Azospirillum brasilense* a la superficie de las raíces de las plantas se da en dos fases. a) superficie de la raíz, b) células de *A. brasilense*, c) flagelo polar, d) flagelos laterales, e) polisacáridos extracelulares. Recuperado de Steenhoudt & Vanderleyden (2000)

Como se ha mencionado, el flagelo polar tiene un papel importante en colonización de las raíces por *Azospirillum*. Las bacterias de este género poseen un único flagelo polar que pesa 100 kDa y se encuentra glicosilado. (Moens et al., 1995) La estructura del flagelo (Figura 2), que se encuentra altamente conservada en todo el dominio, se compone de más de 20 proteínas y se puede dividir en tres secciones principales: el cuerpo basal, el gancho y el filamento. (Al-Otaibi & Bergeron, 2022)

En el cuerpo basal se encuentra el motor del flagelo y consiste en un rotor formado por varios anillos (C, MS, P y L) que rodean un cilindro central y un estator formado por las proteínas Mot ubicadas alrededor de los anillos MS y C. El anillo MS además alberga un sistema de secreción tipo III responsable de la exportación de las proteínas del filamento. La dirección hacia la que gira el motor determina el movimiento de la bacteria y el anillo C junto con las proteínas Mot regulan esta dirección. El gancho es una estructura corta, ligeramente curvada y flexible que transmite el torque generado por el motor hacia el filamento. (Minamino & Kinoshita, 2023) El filamento es una estructura alargada que se conecta al gancho por medio de las proteínas de unión gancho-filamento. En organismos como *Campylobacter jejuni* (Al-Otaibi et al., 2020), *Salmonella enterica* (Einenkel et al., 2025) y *Rhodobacter sphaeroides* (Armitage, 2022) se ha reportado que la proteína FliC es

el principal componente del filamento y se organiza en una estructura helicoidal formada por 11 hebras. En *S. enterica*, si el motor gira en sentido contrario de las manecillas del reloj (CCW) la dirección del superenrollamiento de las hebras es hacia la izquierda y la bacteria avanza en línea recta, en cambio si el motor gira en sentido de las manecillas del reloj (CW) el superenrollamiento es hacia la derecha y la bacteria cambia su dirección (Minamino & Kinoshita, 2023) .Por otro lado, en *R. sphaeroides* el motor gira siempre en sentido CCW y este se detiene y reanuda cada que la bacteria cambia de dirección. (Armitage, 2022) En la punta del filamento se encuentra el cap, en organismos como *S. enterica* y *C. jejuni* se ha observado que es una estructura pentamérica formada por subunidades de la proteína FliD que forma una tapa en el extremo distal del filamento y ayuda en la incorporación de las proteínas FliC. (Al-Otaibi et al., 2020; Einkenkel et al., 2025; Nedeljković et al., 2021).

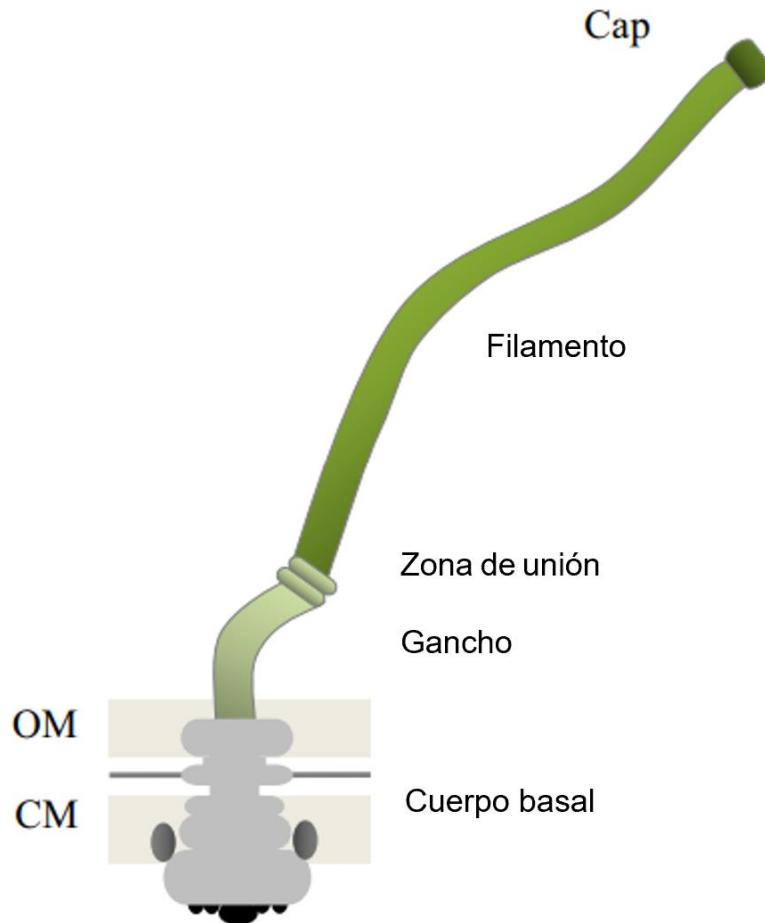


Figura 2. Estructura general de un flagelo. OM: membrana externa, CM: membrana citoplasmática. Modificado de Haiko & Westerlund-Wikström (2013)

La síntesis del filamento del flagelo polar comienza por la formación del cap y sigue con la secreción de proteínas FliC a través del cuerpo basal. Las subunidades de FliD formando el cap interactúan con FliC para incorporarlas al filamento. En su trabajo con *Salmonella enterica*, Eikenkel et al., (2025) proponen un modelo para la incorporación de las subunidades de FliC (Figura 3) donde estas subunidades son secretadas en un estado de plegamiento parcial y su extremo N-terminal entra en contacto con el extremo C-terminal de una subunidad de FliD, entonces el pentámero de FliD hace un giro causando cambios en su estructura que permiten la incorporación de la subunidad de FliC, la cual gira en sentido opuesto y establece interacción con las subunidades de FliC ya incorporadas en el filamento.

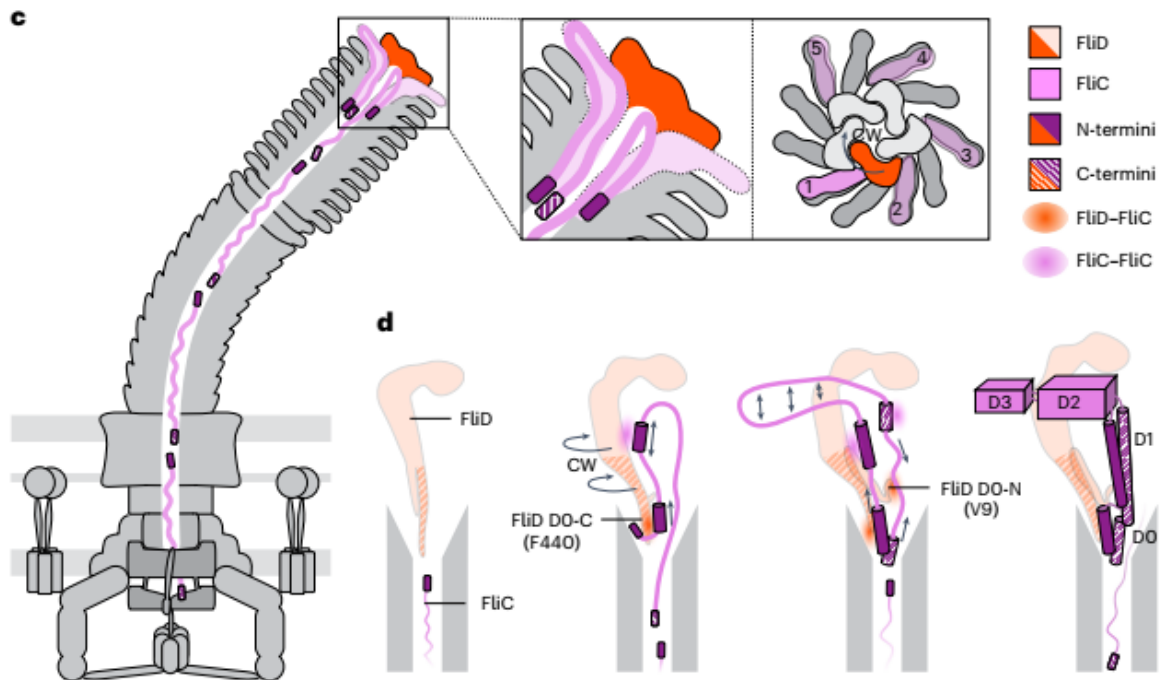


Figura 3. Modelo de incorporación de FliC mediado por FliD. c) Esquema de un corte transversal del flagelo polar y vista desde arriba de la punta del filamento. d) Detalle de las interacciones involucradas en el plegamiento e incorporación de FliC. Recuperado de (Einenkel et al., 2025)

Antecedentes

En 2014, Viruega Góngora mostró la presencia de una proteína de 100 kDa en la biopelícula de *A. brasilense* Sp7 que posteriormente fue identificada por medio de espectrometría de masas MALDI-TOF como la proteína FliD sugiriendo que, aunque en una biopelícula las bacterias han dejado de moverse, el flagelo polar podría tener un papel como adhesina manteniendo unidas a las células. Posteriormente en el 2020, Viruega-Góngora et al. realizaron un análisis espacio temporal de la formación de la biopelícula de *A. brasilense* Sp7 donde encontraron que el flagelo polar se encuentra formando parte de la matriz en los primeros días del establecimiento de la biopelícula comenzando a disminuir sus niveles a partir del día 3.

Se ha explorado también el papel que tiene el flagelo polar de *Azospirillum* en otros procesos de la interacción con la planta. En 2022, Elías et al. purificaron el flagelo polar de *A. argentinense* REC3, nombrado AzFlap, y demostraron que no solo la bacteria sino también la proteína es capaz de desencadenar una respuesta inmune en la planta. En ese estudio, plantas de fresa tratadas con *A. argentinense* REC3 o AzFlap mostraron acumulación de ácido salicílico (SA), una fitohormona que participa en la inducción de la respuesta de resistencia sistémica adquirida (SAR por sus siglas en inglés). Las plantas también presentaron un mayor cierre de estomas y deposiciones de lignina y calosa en la pared celular secundaria, indicando un refuerzo de la pared que previene la entrada de patógenos. Analizaron también la regulación de algunos genes asociados a las respuestas de defensa y encontraron que, tras el tratamiento con AzFlap, las plantas incrementaron la expresión de genes involucrados en las respuestas de defensa (*FaPR1*), la acumulación de H₂O₂ (*FaRBOH-F*), la síntesis de enzimas relacionadas con la defensa (*FaCHI2-2*), la activación de la vía del fenilpropanoide asociada a la respuesta inmune (*FaCHI23*) y la activación de la síntesis de callosa (*FaGSL5*). Demostraron también que el tratamiento con AzFlap redujo la mortalidad de plantas de fresa infectadas por el hongo *Macrophomina phaseolina*. Estos resultados los llevan a concluir que AzFlap está funcionando como un patrón molecular asociado a microbios (MAMP por sus siglas en inglés) capaz de inducir la respuesta inmune

en la planta y ayudándole así a resistir infecciones. Sin embargo, no se conoce el mecanismo por el que la flagelina o alguna de sus partes induce la respuesta.

En 2023, Mora et al. purificaron el flagelo polar de *A. argentinense* Az39 y mostraron que la proteína por si sola es capaz de inducir cambios en la arquitectura radicular de *Arabidopsis thaliana*, mostrando una mayor cantidad de pelos radiculares en las plantas inoculadas que en las no inoculadas, usadas como control.

Planteamiento del problema

Se tiene evidencia de que el flagelo polar de *Azospirillum* participa en diversos procesos asociados con la interacción bacteria-planta, como la modificación de la arquitectura radicular, la formación de biopelícula y la inducción de respuestas inmunes en las plantas además de ser necesario para que la bacteria colonice la raíz. Estas funciones destacan su importancia más allá de ser la estructura responsable de la movilidad. El filamento del flagelo polar se compone de múltiples subunidades de las proteínas FliC y FliD; según lo reportado en *Salmonella*, FliD es la encargada de ensamblar las subunidades de FliC para construir el filamento, además, el filamento del flagelo polar de *Azospirillum* se encuentra cubierto por una capa de azúcares. Sin embargo, se desconoce cuál es el papel que cada uno de estos componentes tiene en los procesos en los que interviene el flagelo polar. Se ha encontrado que *A. baldaniorum* Sp245 cuenta en su genoma con dos genes que codifican para la proteína FliD, pero se desconoce si ambos son constitutivos o si alguno de estos es inducible bajo ciertas condiciones. Conocer el papel que cada uno de esos genes tiene en la formación del flagelo permitirá comprender a mayor detalle el funcionamiento de la proteína, no solo en la síntesis del flagelo sino también su posible participación en otros procesos de la interacción bacteria-planta.

Hipótesis

El gen *fliD*-1 ubicado en el cromosoma de *Azospirillum baldaniorum* Sp245 codifica la proteína FliD y participa en la formación del flagelo polar y en la movilidad natatoria de la bacteria.

Objetivo general

Eliminar el gen *fliD*-1 de *Azospirillum baldaniorum* Sp245 y sobreexpresar su producto proteico.

Objetivos específicos

1. Sobreexpresar y purificar la proteína FliD de *A. baldaniorum* Sp245 a partir del sistema heterólogo *E. coli* Rosetta pGEX-fliD.
2. Realizar un análisis bioinformático del gen *fliD* en cepas de *Azospirillum*.
3. Construir el plásmido mutagénico pJMSFAFB.
4. Obtener la cepa mutante *A. baldaniorum* Δ *fliD*.
5. Evaluar cambios en la movilidad natatoria de la cepa mutante.
6. Detectar por Western blot e inmunofluorescencia de la proteína FliD.

Metodología

Condiciones de cultivo

Para las cepas de *E. coli* (*E. coli* Rosetta, *E. coli* DH5 α y *E. coli* S17.1) se empleó el medio Luria-Bertani (LB) adicionado con antibióticos dependiendo de la cepa en las siguientes concentraciones: Ampicilina 100 μ g/ml y Kanamicina 20 μ g/ml. Los cultivos se incubaron a 37 °C y en agitación cuando se trataba de cultivos líquidos. Para las placas se adicionó 1.5% de agar.

Para *A. baldaniorum* Sp245 se emplearon los medios mínimos K-lactato y K-malato, así como el Medio Difco (MD) y placas de medio Rojo Congo. Se incubaron a 30° y en agitación cuando se trataba de cultivos líquidos, a las placas se les adicionó 1.5% de agar.

Sobreexpresión y purificación de FliD

Primero se estandarizaron las condiciones de inducción y extracción de la proteína FliD. Se empleó la cepa de *E. coli* Rosetta pGEX-fliD previamente construida por Ramírez-Mata A. en el 2020 donde se clonó el gen *fliD-1* en el vector pGEX-4t-1 el cual es inducible por IPTG y añade una etiqueta de GST a la proteína. A partir de un precultivo de *E. coli* Rosetta pGEX-fliD se inoculó un matraz con 20 ml de medio LB y se dejó incubar a 30 °C y 150 rpm hasta que llegó a una D.O.₆₀₀ de 0.3. Se realizó la inducción añadiendo al cultivo 0.05 mM de IPTG y se recuperaron muestras a las 3 h de inducción por centrifugación, el pellet se resuspendió en 300 µl de buffer de lisis (Tris HCl 20 mM pH 8.0, EDTA 5 mM, PMSF 0.15 mM, β-mercapto al 0.1%, lisozima 0.1 mg/ml y glicerol 0.05%), se sonicó y se separó sobrenadante y pellet por centrifugación para emplear el sobrenadante en la purificación.

La purificación se realizó por cromatografía de afinidad empleando una resina de glutatión agarosa por su afinidad a la GST. Se tomaron 100 µl de resina que fueron equilibrados con 100 µl de PBS, se centrifugó a 7000 rpm por 3 minutos y se descartó el sobrenadante, se añadieron 100 µl de PBS y se centrifugó a 7000 rpm por 3 minutos, se descartó el sobrenadante y se añadieron 500 µl del extracto proteico y se dejó interaccionar durante 20 minutos, después se centrifugó a 7000 rpm por 5 minutos y se recuperó el sobrenadante, se realizaron 3 lavados con 200 µl de PBS, dejando incubar 5 minutos en hielo antes de centrifugar y después se añadieron 200 µl de buffer de elución (Tris HCl 50 mM pH 8.0 y glutatión reducido 10 mM), se agitó suavemente durante 10 minutos y se centrifugó a 7000 rpm por 2 minutos, este paso se repitió 4 veces. Los productos se cargaron en un SDS-PAGE 10%

Extracción de ADN genómico

A partir de un cultivo de *A. baldaniorum* Sp245 en placa de Rojo Congo se tomaron de 2 a 3 colonias y se sembraron en un tubo con 5 ml de medio K-lactato, se dejó incubar 18 h a 30 °C y con agitación a 150 rpm. Se tomaron 3 ml del cultivo y se centrifugó a 10,000 rpm por 3 minutos, se decantó el medio y el pellet se

resuspendió en 500 µl de buffer TE, 40 µl de SDS al 20%, 6 µl de Pronasa E (100 mg/ml), 100 µl de NaCl 3M y 100 µl de CTAB, la muestra se incubó a 65 °C por 10 minutos y después se realizaron dos o tres lavados con 300 µl de una solución de cloroformo-álcohol isoamílico (24:1) y 200 µl de fenol saturado con Tris-HCl. Se añadieron 2 volúmenes de etanol al 100% y se dejó incubar a -20 °C durante 2 horas, después se centrifugó a 10,000 rpm durante 20 minutos y el ADN que se encuentra al fondo del tubo se lavó 2 veces con 500 µl de etanol al 70%, una vez finalizados los lavados la muestra se resuspendió en 40 µl de una solución de RNasa y se incubó durante 1 hora a 37 °C, la muestra se almacenó a -20 °C.

Extracción de ADN plasmídico

Se tomó una colonia de cultivo fresco y se sembró en 5 ml de medio LB para *E. coli* o MD para *A. balduaniorum*, se incubó durante 18 horas y se tomaron 3 ml de cultivo, se centrifugó a 10,000 rpm durante 3 minutos y el pellet se resuspendió en 200 µl de solución reguladora de lisis (Tris-HCl 50 mM pH 8.0, EDTA 10 mM) con lisozima (4 mg/ml), se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente y se agregaron 400 µl de solución de lisis (NaOH 200 mM, SDS 1%), se mezcló por inversión y se incubó en hielo por 5 minutos, se agregaron 300 µl de solución de precipitado (Acetato de potasio 3 M, pH 5.5 ajustado con ácido acético), se mezcló por inversión y se incubó por 30 minutos a -20 °C. Pasado el tiempo se centrifugó a 14,000 rpm por 15 minutos a 4 °C, el sobrenadante se transfirió a otro tubo para realizar uno o dos lavados con 200 µl de fenol saturado con Tris-HCl y 200 µl de una solución de cloroformo-álcohol isoamílico (24:1), se mezcló por inversión durante 5 minutos y se centrifugó a 10,000 rpm por 5 minutos y se realizó un último lavado con la solución de cloroformo-álcohol isoamílico (24:1) para retirar el exceso de fenol. Finalizados los lavados se añadieron 0.6 volúmenes de isopropanol 100% y se incubó a temperatura ambiente durante al menos 10 minutos, se centrifugó a 14,000 rpm por 30 minutos a 4 °C y el sobrenadante se eliminó por decantación, la pastilla de ADN que se encuentra al fondo del tubo se lavó dos veces con etanol al 70% y se resuspendió en una cantidad adecuada de solución de RNasa (0.1 mg/ml), se incubó a 37 °C por 30 minutos, finalmente la muestra se almacena a -20 °C.

Diseño de oligonucleótidos

Se diseñaron 2 pares de oligonucleótidos para amplificar las regiones flanqueantes al gen que codifica para la proteína WP_014239692.1 en el genoma de *A. baldaniorum* Sp245 el cual se nombrará *fliD*-1 en este estudio. La región río arriba se nombró fragmento A y la región río abajo se nombró fragmento B; a cada cebador se le añadieron sitios de reconocimiento para enzimas de restricción que permitieran la clonación de los fragmentos manteniendo la dirección 5'-3'. Los datos de los oligonucleótidos se encuentran descritos en la tabla 1.

Tabla 1. Cebadores diseñados para amplificar los fragmentos A y B			
Cebadores fragmento A			
Nombre	Secuencia	Enzima de restricción	Tamaño
FliDFAK	5'-GGT ACC GAA CAC CTG CAT CAT CAG TTC-3'	KpnI	793 pb
FliDRAX	5'-CTC GAG GGT TCC AAG TCA CCT TCT GAC-3'	XhoI	
Cebadores fragmento B			
FliDFBM	5'-ACG CGT CAG TCG CAG CAG TCG ATC CTG -3'	MluI	1104 pb
FliDRBS	5'-ACT AGT CTG GGA GTC GCC GAA ATT CCT G-3'	SpeI	

Clonación en vector pGEM T-Easy

Una vez amplificados los fragmentos, se clonaron por separado en el vector pGEM-T Easy siguiendo las indicaciones del fabricante (Promega) para obtener los plásmidos pGEMFA y pGEMFB La ligación se realizó con la enzima ligasa T4 DNA Ligase siguiendo las indicaciones del fabricante (Promega). Los productos de las ligaciones se transformaron en células competentes de *E. coli* DH5 α . El vector pGEM-T Easy cuenta con el sistema de selección por color azul-blanco, la inserción de los fragmentos interrumpe el gen de la β -galactosidasa y causa que, en presencia

de X-gal, las colonias transformantes sean blancas y las que no contengan el inserto se vean azules. Además, el vector cuenta con un gen de resistencia a la ampicilina por lo que se seleccionaron las colonias que crecieran en placas de LB adicionadas con ampicilina y que tuvieran coloración blanca. La transformación se confirmó por PCR empleando los iniciadores de cada fragmento.

Subclonación en el vector suicida pJMS-Km

Se emplearon las enzimas de restricción KpnI y XhoI para liberar el fragmento A y para linealizar el vector suicida pJMS-Km (Ramírez-Mata et al., 2016). Los productos de la digestión se ligaron con la enzima T4 DNA Ligase siguiendo las indicaciones del fabricante y los productos de la ligación se transformaron en células competentes de *E. coli* DH5 α . Se seleccionaron las colonias que mostraron resistencia a la kanamicina y se confirmó la clonación por amplificado por PCR empleando los cebadores M13 que hibridan con secuencias contenidas en el vector pJMS-Km.

Una vez clonado el fragmento A en el vector pJMS-Km se usaron las enzimas de restricción MluI y SpeI para liberar el fragmento B y linealizar el vector pJMSFA, los productos de esta digestión se ligaron con la enzima T4 DNA ligase y se transformó en células competentes de *E. coli* DH5 α . Se seleccionaron aquellas colonias que tuvieran resistencia a la kanamicina y se comprobó la clonación amplificando por PCR empleando el cebador directo para el gen de resistencia a kanamicina y el inverso para el fragmento B.

Conjugación biparental

A partir de un precultivo de 18 horas de *A. baldaniorum* Sp245 en MD se inocularon 5 ml de MD (1/100) y se incubó por 18 horas a 30 °C y 150 rpm. Por otro lado, a partir de un precultivo de 18 horas de *E. coli* S17.1 pJMSFAFB en medio LB con kanamicina se inocularon 5 ml de medio LB sin antibiótico (1/100) y se incubaron durante 4 horas a 37 °C sin agitación. Una vez transcurridos los tiempos de incubación, en placas de MD sin antibiótico se colocaron 6 gotas de 10 μ l de la cepa donadora (*E. coli* S17.1 pJMSFAFB) y una vez que secaron se colocaron 15 μ l de la cepa receptora (*A. baldaniorum* Sp245) sobre cada gota de la cepa donadora, se

dejó secar y se incubaron a 30 °C durante toda la noche. Al día siguiente se recuperaron las colonias en un tubo eppendorf con 1 ml de medio K-lactato y se realizaron diluciones de 10^{-1} hasta 10^{-5} , en placas de medio K-lactato con kanamicina se sembraron las diluciones 10^{-2} y 10^{-3} por sembrado masivo y se dejaron incubar a 30 °C durante 2 a 3 días. Las colonias obtenidas se recuperaron y se resembraron en placas de K-lactato con kanamicina. Para la selección de transconjugantes se seleccionaron aquellas colonias que fueron sensibles a la tetraciclina y resistentes a kanamicina. Las colonias obtenidas se sometieron a pruebas de PCR para comprobar la mutación.

Ensayo de movilidad

Para analizar diferencias en la movilidad de la cepa mutada se realizaron ensayos de movilidad natatoria en agar suave. Se tomaron de 2-3 colonias para inocular un tubo con 5 ml de MD, se incubó durante 18 h a 30 °C y 150 rpm. Se tomaron 10 µl del precultivo y se inoculó un matraz con 20 ml de MD, se incubó a 30 °C y 150 rpm hasta obtener una D.O.₆₀₀ de 0.4 para una concentración aproximada de 1×10^6 UFC/5 µl Se prepararon placas de medio base K con 0.25 % de agar y se adicionó con 10 mM de uno de los quimioattractantes a evaluar (malato y/o fructosa). Se inocularon 5 µl de cultivo y se incubaron a 30 °C. La movilidad se evaluó midiendo el halo a las 48 h de incubación. Para determinar diferencias significativas se realizó una prueba de T-student en el programa Prism comparando la cepa mutada con la silvestre.

Extracción de proteínas de superficie

Para extraer las proteínas de superficie de *A. baldaniorum* Sp245 WT y *A. baldaniorum* $\Delta fliD$ se inoculó un tubo de 5 ml de medio K-malato con 2 a 3 colonias, se incubó a 30 °C y 150 rpm hasta una D.O.₆₀₀ de 0.7-0.8. El cultivo se centrifugó a 4600 rpm durante 3 min y se descartó el sobrenadante. Se lavó el pellet con PBS y se resuspendió en 100 µl de PBS, se incubaron las células por 5 min en hielo y se vortexearon durante 10 min a máxima velocidad. Se centrifugaron 25 minutos a 10,000 rpm y 4 °C y se recolectó el sobrenadante que contiene las proteínas de

superficie. Los extractos proteicos se cargaron en un gel de poliacrilamida desnaturalizante 10%.

Western blot

Para identificar la presencia de FliD en los extractos proteicos se realizó un ensayo de Western blot. Se realizó un SDS-PAGE 10% con 30 µg de extracto proteico y mediante una transferencia húmeda con buffer de transferencia (25 mM Tris Base, 192 mM glicina y metanol al 20%) se transfirieron las proteínas a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF). La transferencia se llevó a cabo por 1 hora con 20 minutos a 100 V. Una vez finalizada la transferencia la membrana se sumergió en metanol por 5 minutos y después se sumergió en solución de bloqueo (PBS, leche 5%, Tween 0.05%) y se almacenó a 4 °C durante toda la noche. Se retiró la solución de bloqueo y la membrana se lavó 3 veces con PBS, 10 minutos por lavado, para eliminar restos de la solución de bloqueo, se retiró el PBS y la membrana se sumergió en solución de bloqueo adicionada con anticuerpo primario anti-flagelina de *A. brasilense* Sp7 (1:10000) y se incubó durante 2 horas en agitación, se retiró el anticuerpo primario y se lavó la membrana 3 veces con PBS, se retiró el PBS y se cubrió la membrana con solución de bloqueo adicionada con el anticuerpo secundario anti-rabbit IgG HRP conjugate (1:10000), se incubó durante una hora en agitación y se lavó nuevamente con PBS. Finalmente, la membrana se sumerge en PBS, se añadieron 100 µl de peróxido de hidrógeno y se añadió poco a poco diaminobencidina hasta que las bandas en la membrana adquirieron la intensidad deseada, se retiró la membrana de la solución y se dejó secar.

Inmunofluorescencia

Para identificar modificaciones en la estructura del filamento del flagelo polar se llevó a cabo la técnica de inmunofluorescencia. Se realizaron precultivos de *A. baldaniorum* Sp245 WT y *A. baldaniorum* $\Delta fliD$ en tubos con 5 ml de K-malato y el antibiótico correspondiente dejándolas crecer durante 18 h a 30 °C y 150 rpm. Se colocó un cubreobjetos dentro de una caja Petri y se colocó sobre este una gota de 15 µl de precultivo y sobre esta 15 µl de solución de fijado. La caja se tapó y se incubó toda la noche en cámara húmeda a temperatura ambiente y sin movimiento.

Pasado el tiempo se retiró la solución y se añadió PBS para retirar los restos de la solución de fijado, se repitió el lavado 3 veces y se añadieron 50 µl de solución de bloqueo (BSA 2% en PBS), se incubó durante 1 hora y pasado el tiempo se retiró la solución, se realizaron 3 lavados y se añadieron 50 µl de anticuerpo anti-flagelina de *A. brasilense* Sp7 (1:100) en solución de bloqueo, se incubó durante 2 horas y se retiró el anticuerpo, se lavó con PBS una vez y se añadieron 50 µl de anticuerpo anti-rabbit goat IgG acoplado a fluoresceína-5-isotiocianato (FITC) (1:100) en solución de bloqueo, las muestras se cubrieron de la luz y se incubaron durante hora y media. Pasado el tiempo, y sin exponer las muestras a la luz, se retiró el anticuerpo y se lavó 3 veces con PBS. Se añadieron 5 µl de medio de montaje y 5 µl de DAPI 150 µM, se cubrió la muestra con un cubreobjetos y se selló con barniz de uñas transparente. Se almacenaron las muestras a 4 °C hasta su visualización al microscopio de fluorescencia Nikon TE2000-U.

Resultados

Análisis bioinformático

A. baldaniorum Sp245 cuenta en su genoma con dos genes que codifican para FliD, el primero (AZOBR_70032, *fliD-1*) se ubica en el cromosoma y mide 1866 nt, río arriba se ubica un gen que codifica para una proteína de la familia RiDA y un gen para una N-acetiltransferasa, río abajo se ubica un gen para una carboxipeptidasa. El otro gen (AZOBR_p1160045, nombrado en este estudio como *fliD-2*) se ubica en un plásmido y también mide 1866 nt, río arriba y en la misma dirección se ubica un gen que codifica para una 3-oxoacil sintasa y río abajo se ubica un gen para una proteína represora de la biosíntesis del flagelo.

Se realizó este mismo análisis en el genoma de *A. brasilense* Sp7 y *A. argentinense* REC3. En *A. brasilense* Sp7 se encontraron de igual forma dos copias, una en el cromosoma y otra en un plásmido, cada una compartiendo el contexto genómico con su homóloga en *A. baldaniorum* Sp245. En el caso de *A. argentinense* REC3 debido a que su genoma se encuentra en un nivel de ensamble scaffold solo fue posible identificar parcialmente los genes, encontrando dos fragmentos en el

cromosoma y dos fragmentos en plásmido y aunque no coinciden en tamaño si comparten el contexto genético con los genes encontrados en *A. baldaniorum* Sp245 y *A. brasilense* Sp7. La figura 4 muestra un esquema del contexto genético de cada gen encontrado y la tabla 2 contiene los números de acceso para cada proteína, exceptuando los de *A. argentinense* REC3 por el nivel de ensamble de su genoma. La tabla 3 muestra la matriz del porcentaje de identidad entre las secuencias de las proteínas FliD-1 y FliD-2 de *A. baldaniorum* sp245 obtenida por un análisis de secuencias múltiples (MSA) por medio de la plataforma Clustal Omega. Los resultados arrojan una identidad de 92.11% entre las secuencias.

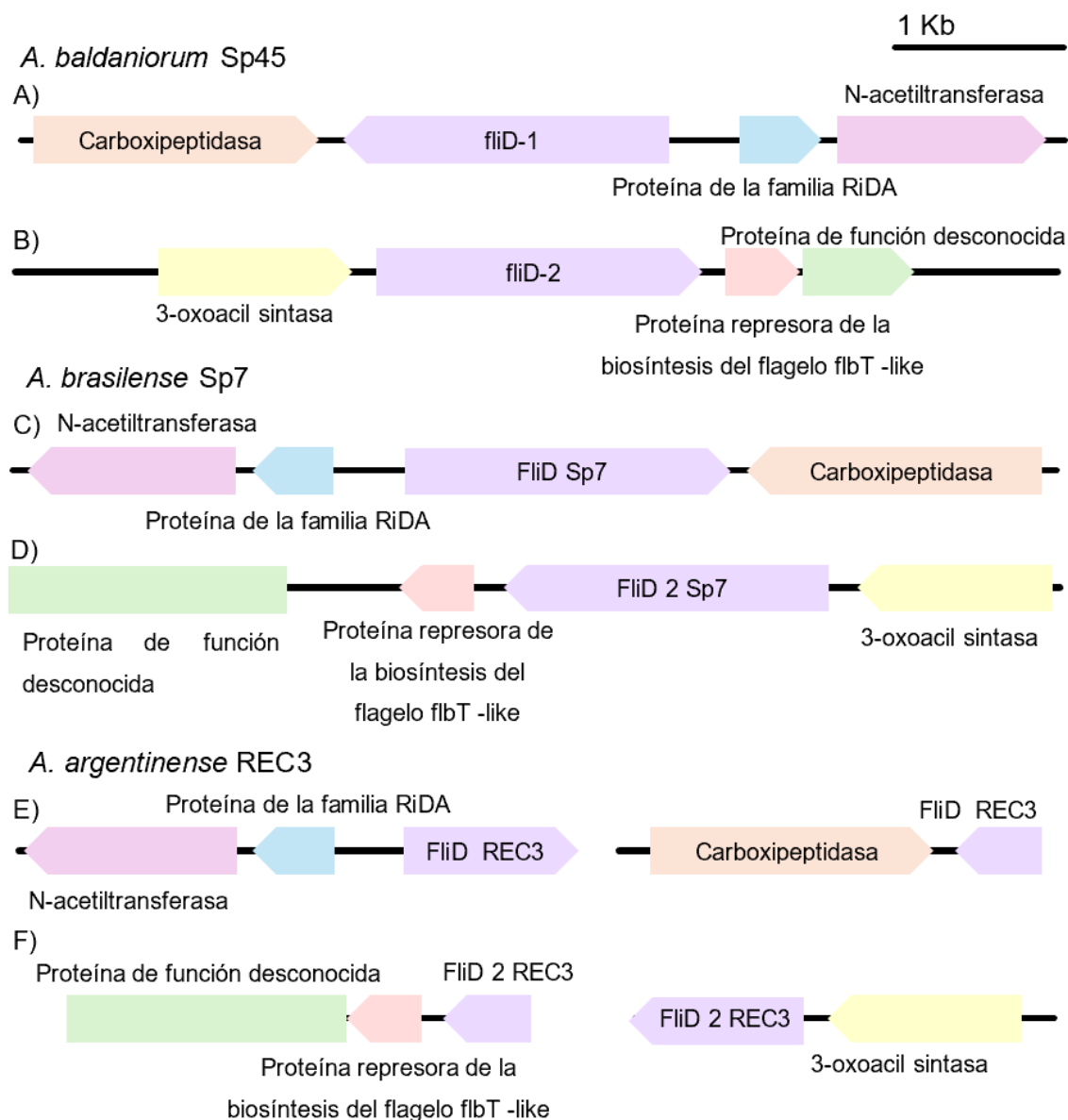


Figura 4. Contextos genéticos de los genes que codifican para FliD en *A. baldaniorum* Sp245 y sus homólogos en *A. brasilense* Sp7 y *A. argentinense* REC3. A, C y E) Genes ubicados en cromosoma, B, D y F) Genes ubicados en plásmido.

Tabla 2. Números de acceso en NCBI Protein de las proteínas encontradas	
<i>A. baldaniorum</i> Sp245	
Nombre	Número de acceso
FliD-1	WP_014239692.1
Carboxipeptidasa	WP_244439360.1
Proteína de la familia RiDA	WP_014239693.1
N-acetiltransferasa	WP_014239694.1
FliD-2	WP_014198638.1
3-oxoacil sintasa	WP_014198637.1
Proteína represora de la biosíntesis del flagelo flbT-like	WP_014198639.1
Proteína de función desconocida	WP_014198640.1
<i>A. brasilense</i> Sp7	
Nombre	Número de acceso
FliD Sp7	WP_149150325.1
Proteína de la familia RiDA	WP_035671998.1
N-acetiltransferasa	WP_059398885.1
Carboxipeptidasa	WP_236778111.1
FliD 2 Sp7	WP_059399258.1
3-oxoacil sintasa	WP_035678972.1
Proteína represora de la biosíntesis del flagelo flbT-like	WP_035678977.1
Proteína de función desconocida	WP_035678977.1

Tabla 3. Matriz de porcentaje de identidad		
	FliD-1	FliD-2
FliD-1	100	92.11
FliD-2	92.11	100

Purificación de la flagelina polar

Se estandarizaron las condiciones de inducción de expresión de la proteína FliD en la cepa *E. coli* Rosetta pGEX-fliD que se observa en la figura 5 como una banda de mayor intensidad debajo de los 100 kDa. El resultado del Western blot con el anticuerpo anti-flagelina de *A. brasilense* Sp7 confirmó que corresponde con la proteína FliD reportada y la detección con el anticuerpo anti-GST confirma la presencia de la etiqueta GST. La cromatografía de afinidad permitió purificar la proteína como se observa en la figura 6.

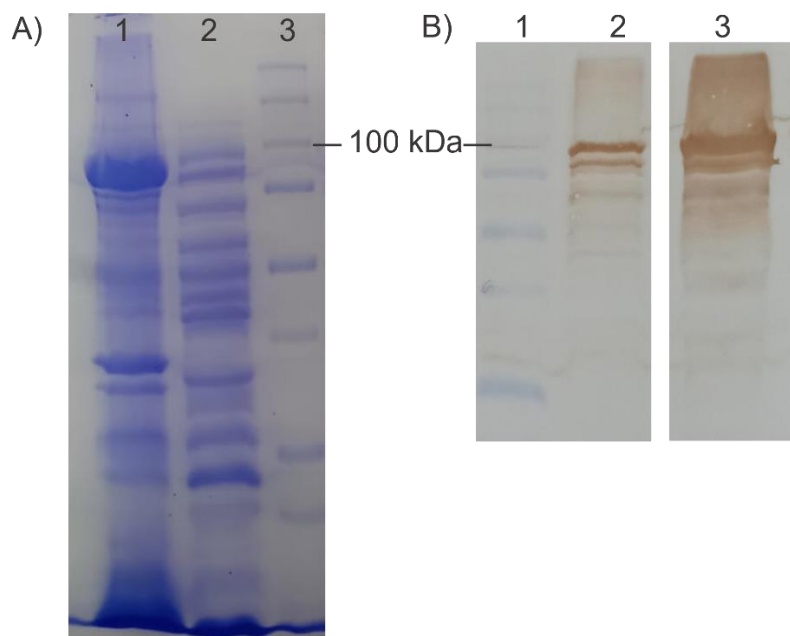


Figura 5. Sobreexpresión de la flagelina a partir de *E. coli* Rosetta pGEX-fliD. A) SDS-PAGE10% mostrando la sobreexpresión de la flagelina Carril 1: extracto con 3 horas de inducción. Carril 2: extracto sin inducir. Carril 3: marcador de peso molecular. B) Ensayo de Western Blot de la sobreexpresión de FliD en *E. coli* Rosetta pGEX-fliD con un anticuerpo primario anti-GST (Carril 2) y anti-flagelina de *A. brasilense* Sp7 (Carril 3); marcador de peso molecular en el carril 1.

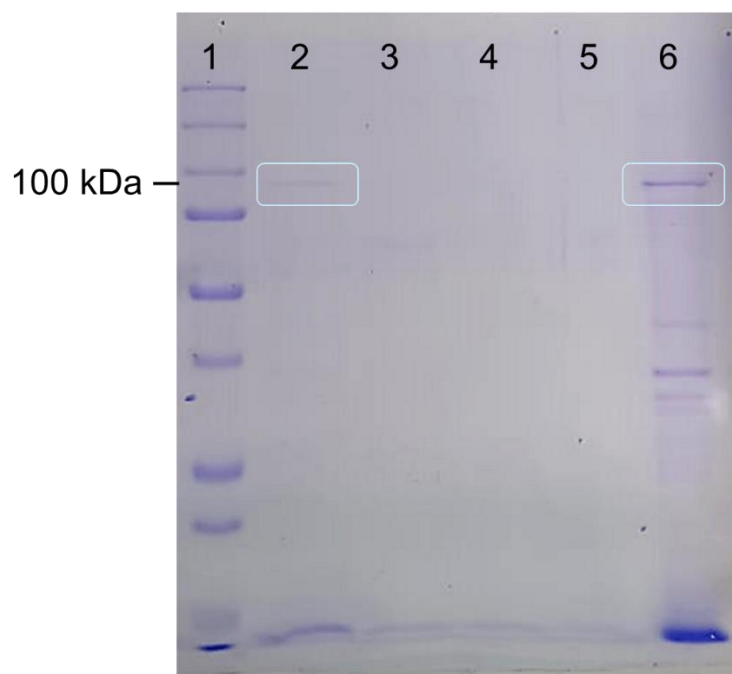


Figura 6. Resultados de la purificación de FliD por cromatografía de afinidad. Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: elución 1, carril 3: elución 2, carril 4: elución 3, carril 5: elución 4, carril 6: resina.

Eliminación del gen *fliD-1* de *A. baldaniorum* Sp245

Amplificado de los fragmentos aledaños al gen *fliD-1*

Se estandarizaron las condiciones de amplificado para los cebadores del fragmento A (Fig. 7) y del fragmento B (Fig. 8), se amplificaron correctamente los fragmentos obteniendo para el fragmento A una banda entre los 750 y 1000 pb correspondiente a los 793 pb que mide el fragmento A mientras que para el fragmento B se obtuvo una banda por encima de los 1000 pb correspondiente a los 1104 pb que mide el fragmento (Fig. 9).

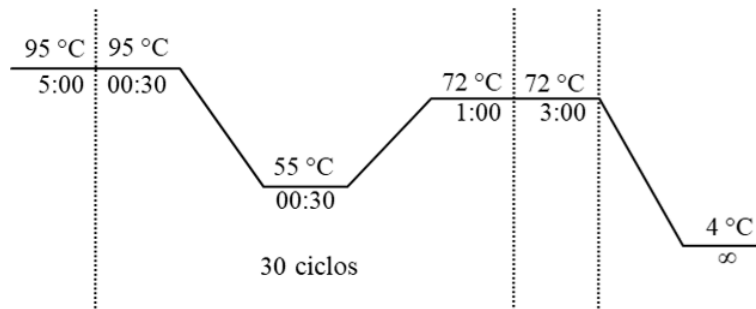


Figura 7. Condiciones de amplificado para el fragmento A

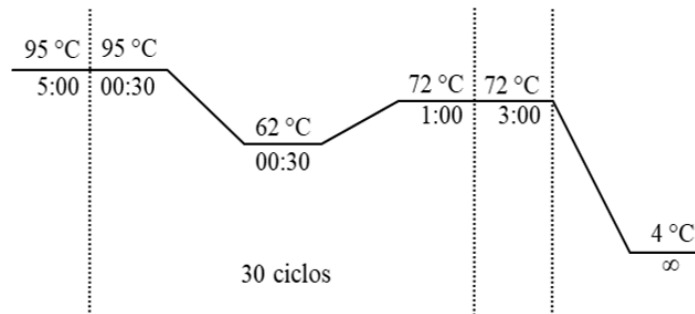


Figura 8. Condiciones de amplificado para el fragmento B

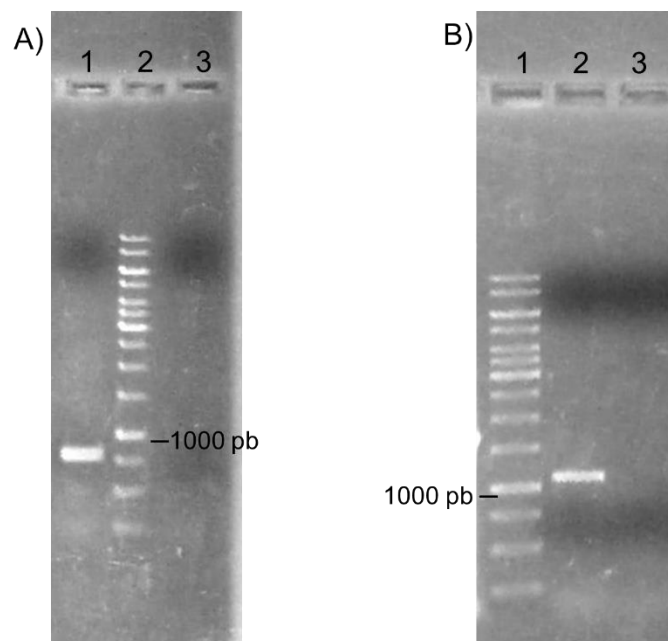


Figura 9. Amplificado de los fragmentos. A) Carril 1: Amplificado del fragmento A de 793 pb, carril 2: Marcador de peso molecular, carril 3: control negativo. B) Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: amplificado del fragmento B de 1104 pb, carril 3: control negativo.

Clonación en vector pGEM-T Easy

Se realizó correctamente la ligación del fragmento A con el vector pGEM-T Easy obteniendo el vector pGEMFA el cual se transformó en células de *E. coli* DH5 α . De las colonias obtenidas de la transformación se seleccionó la clona 11 al ser comprobada por PCR (Fig. 10).

De igual manera la ligación del fragmento B con el vector pGEM-T Easy fue exitosa y se obtuvo el vector pGEMFB el cual fue insertado por transformación en *E. coli* DH5 α , como resultado de esta transformación se seleccionó la clona 2 misma que fue comprobada por PCR (Fig. 11).

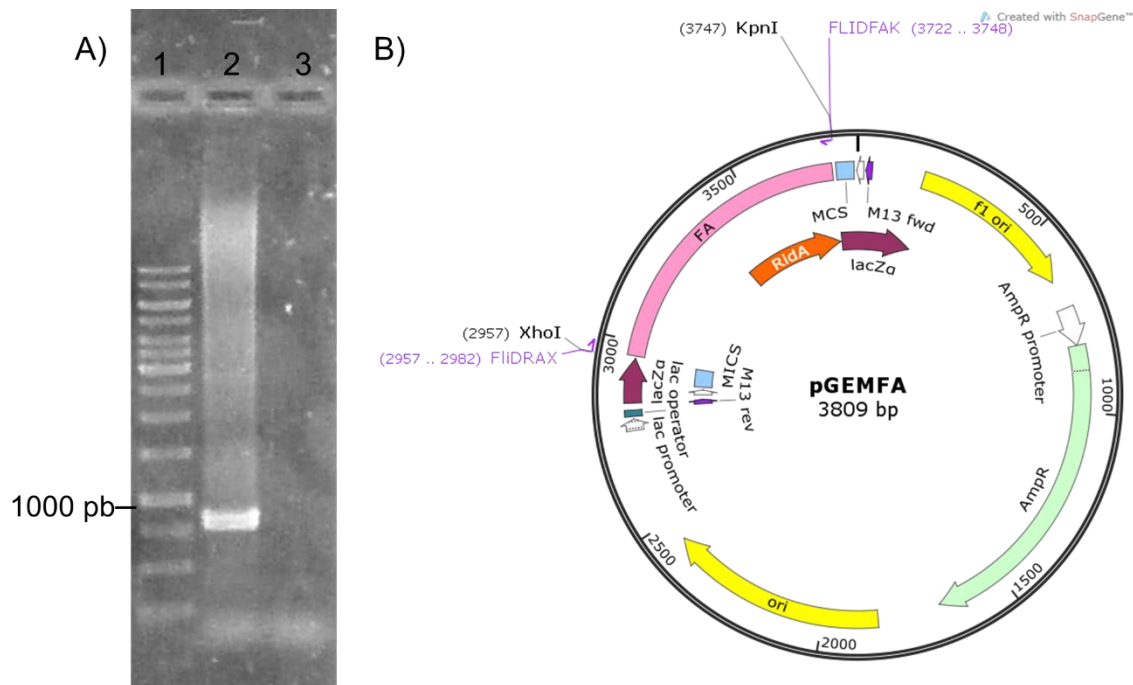


Figura 10. Construcción del vector pGEMFA. A) Amplificado del fragmento A a partir del vector pGEMFA. Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: clona 11, carril 3: control negativo. B) Mapa genético del vector pGEMFA

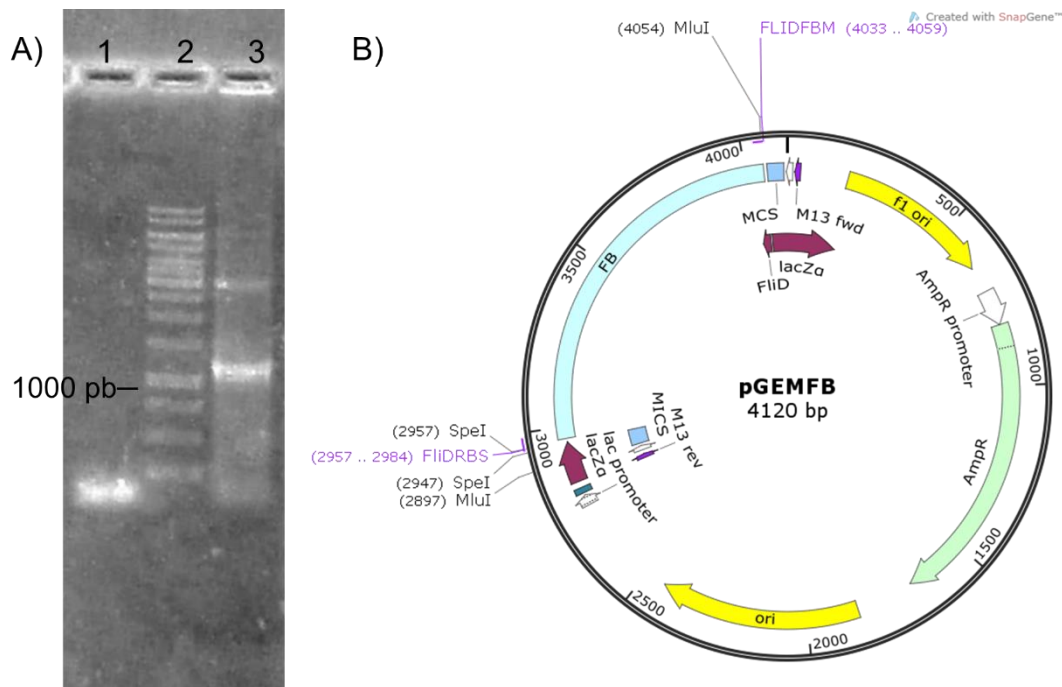


Figura 11. Construcción del vector pGEMFB. A) Amplificado del fragmento B a partir del vector pGEMFB. Carril 1: control negativo, carril 2: marcador de peso molecular, carril 3: clona 2 B) Mapa genético del vector pGEMFB

Subclonación en el vector suicida pJMS-Km

Para construir el vector que permita la eliminación del gen *fliD-1*, se subclonó primero el fragmento A dentro del vector suicida pJMS-Km. Para realizar esto se liberó el fragmento A del vector pGEMFA con las enzimas KpnI y XhoI obteniendo un fragmento de 793 pb correspondiente al fragmento A y un fragmento de aproximadamente 3000 pb correspondiente al vector. De igual forma se linealizó el vector pJMS-Km con las mismas enzimas obteniendo una banda debajo de 10,000 pb (Fig. 12).

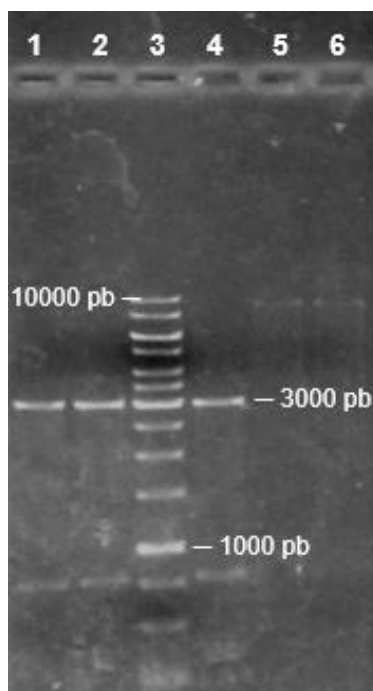


Figura 12. Digestión de los plásmidos pGEMFA y pJMS-Km. Carriles 1,2 y 4: Digestión de pGEMFA, carril 3: marcador de peso molecular, carriles 5 y 6: digestión de pJMS-Km

De la ligación de los productos de la digestión se obtuvo el vector pJMSFA que se insertó por transformación en *E. coli* DH5 α y como resultado de la transformación se seleccionó la clona 15 después de comprobarla por amplificado por PCR con los cebadores M13 que se esperaba que amplificaran un fragmento de 2349 pb (Fig. 13).

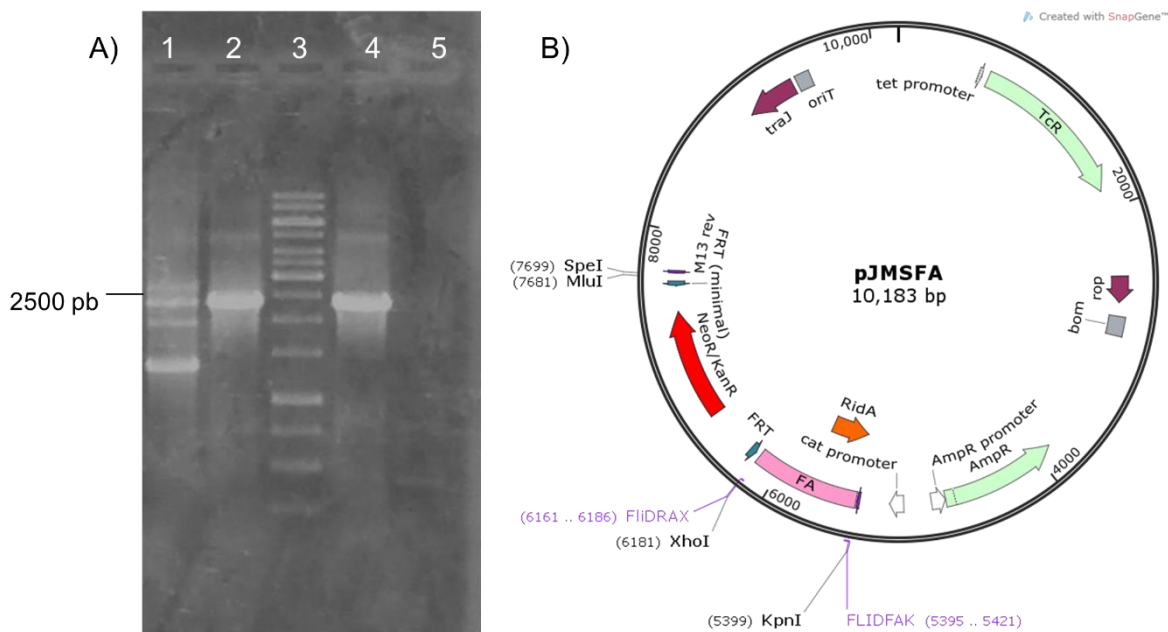


Figura 13. Comprobación del vector pJMSFA. A) Amplificación de clonas de pJMSFA. Carril 1: clona 12, carril 2: clona 15, carril 3: marcador de peso molecular, carril 4: clona 16, carril 5: control negativo. B) Mapa genético del vector pJMSFA

Una vez elegida la clona con el vector pJMSFA se liberó el fragmento B obtenido del plásmido pGEMFB con las enzimas de restricción MluI y SpeI obteniendo un fragmento de 1104 pb correspondiente al fragmento B y de 3000 pb correspondiente al vector, con estas mismas enzimas se linealizó el vector pJMSFA obteniendo una banda de 10,000 pb. (Fig. 14)

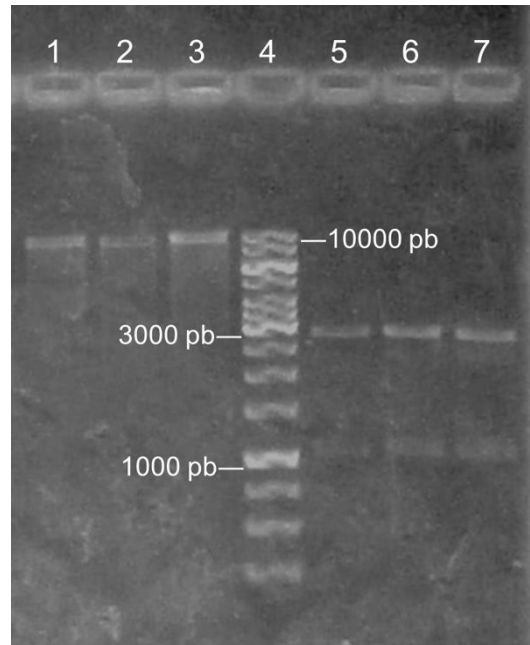


Figura 14. Digestión de pGEMFB y pJMSFA. Carriles 1,2 y 3: digestión de pJMSFA, carril 4: marcador de peso molecular, carriles 5,6 y 7: digestión de pGEMFB

Los productos de las digestiones se ligaron correctamente y se transformaron en *E. coli* DH5 α , como resultado de esa transformación se seleccionó la clona 56 después de haber sido comprobada por amplificado por PCR usando iniciadores para el gen de resistencia a kanamicina y para el fragmento B permitiendo así comprobar que el fragmento B se clonó en el sitio deseado. (Fig. 15)

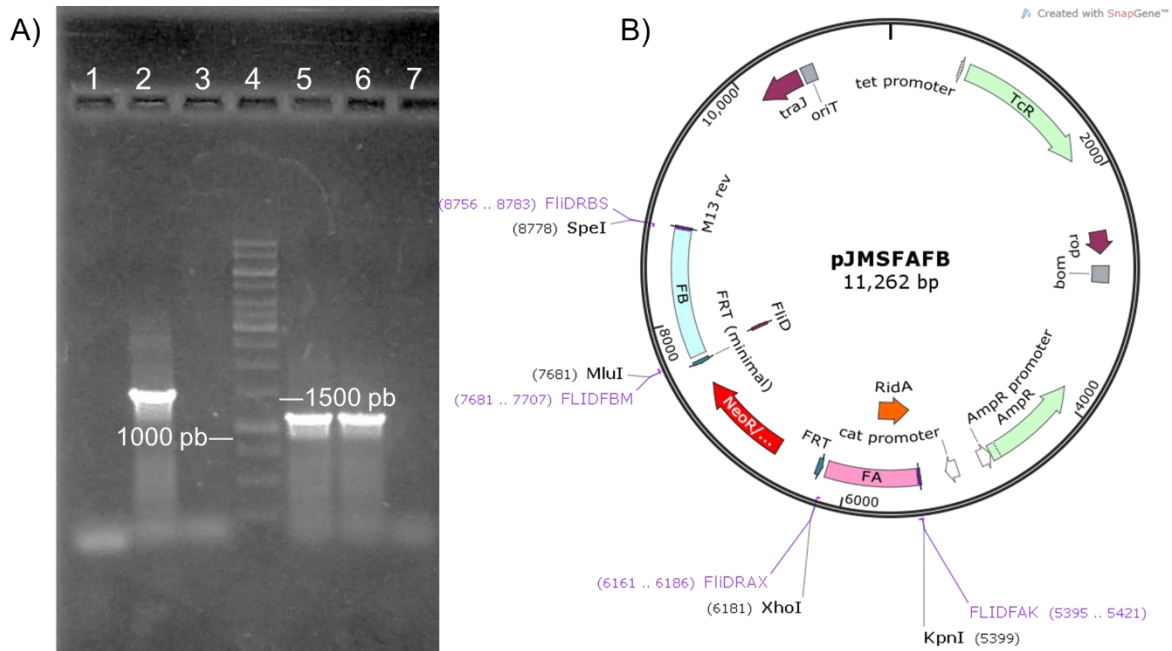


Figura 15. Comprobación del vector pJMSFAFB. A) Amplificado con los iniciadores Km-F + FliDRBS para un amplificado de 1402 pb (Carriles 1,2 y 3) y con los iniciadores para el fragmento B para un amplificado de 1104 pb (Carriles 5,6 y 7). Carril 1: control negativo, carril 2: clona 56, carril 3: clona 60, carril 4: marcador de peso molecular, carril 5: clona 60, carril 6: clona 56, carril 7: control negativo. B) Mapa genético del vector pJMSFAFB

Una vez confirmada la construcción del vector se transformó en células de *E. coli* S17.1 dado que esta cepa puede llevar a cabo la conjugación. Como resultado de la transformación se seleccionó la clona 6 después de haber sido comprobada por PCR empleando iniciadores para el gen de resistencia a kanamicina y para ambos fragmentos para confirmar que ambos fragmentos se encuentran en el sitio deseado. (Fig. 16)

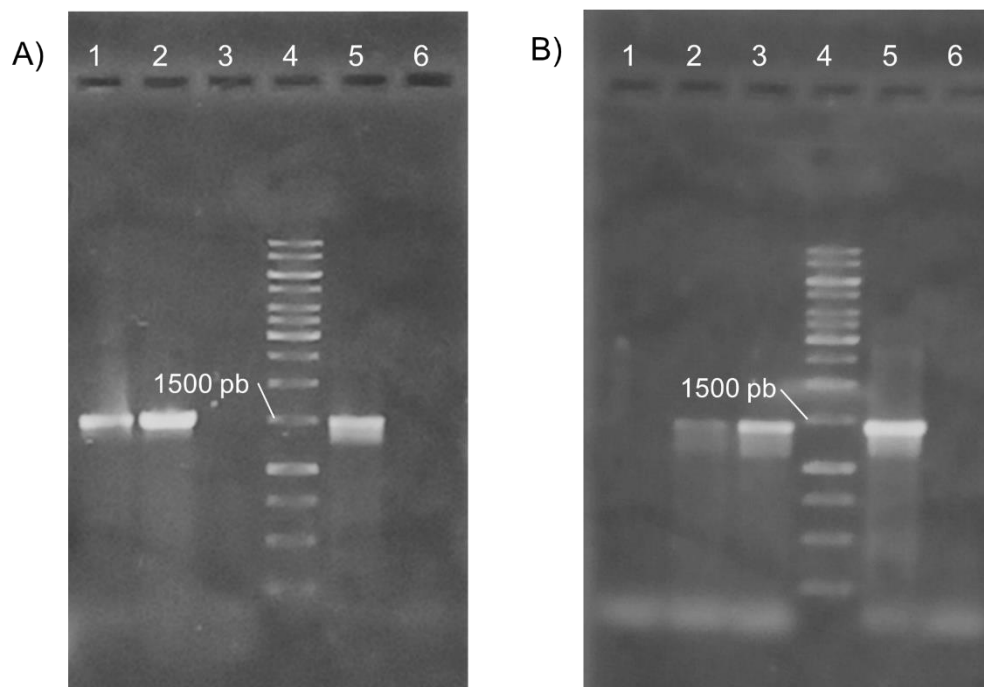


Figura 16. Comprobación de *E. coli* S17.1 pJMSFAFB. A) Amplificado con los iniciadores KmR-R + FliDFAK para un amplificado de 1488 pb. Carril 1: clona 12, carril 2: clona 13, carril 3: clona 21, carril 4: marcador de peso molecular, carril 5: clona 6, carril 7: control negativo. B) Amplificado con los iniciadores KmR-F7 + FliDRBS. Carril 1: clona 12, carril 2: clona 13, carril 3: clona 21, carril 4: marcador de peso molecular, carril 5: clona 6, carril 6: control negativo

Conjugación en *A. baldaniorum* Sp245 WT

Se empleó la clona 6 de *E. coli* S17.1 pJMSFAFB para realizar la conjugación en *A. baldaniorum* Sp245 WT. Como resultado de la conjugación se seleccionaron 2 clones transconjugantes que mostraron ser resistentes a la kanamicina, sensibles a la tetraciclina y finalmente se comprobaron por PCR empleando los cebadores FliDFAK y FliDRBS dando un amplificado de 3390 para las clonas transconjugantes y 3717 pb para *A. baldaniorum* Sp245 WT. (Fig. 17)

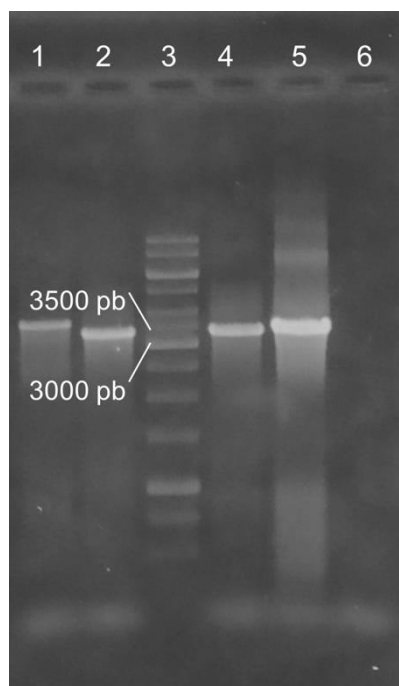


Figura 17. Amplificado de las clonas transconjugantes de $\Delta fliD$. Carril 1: *A. baldaniorum* Sp245 WT, carril 2: $\Delta fliD$ clona 6, carril 3: marcador de peso molecular, carril 4: $\Delta fliD$ clona 22, carril 5: *E. coli* S17.1 pJMSFAFB como control positivo, carril 6: control negativo

Ensayos de movilidad

Los ensayos de movilidad natatoria mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en la movilidad de la mutante en comparación con la cepa silvestre en los dos quimioattractantes evaluados. La figura 18 muestra imágenes representativas de los ensayos con malato a las 48 h y la figura 19 muestra los resultados de los ensayos con fructosa a las 48 h.

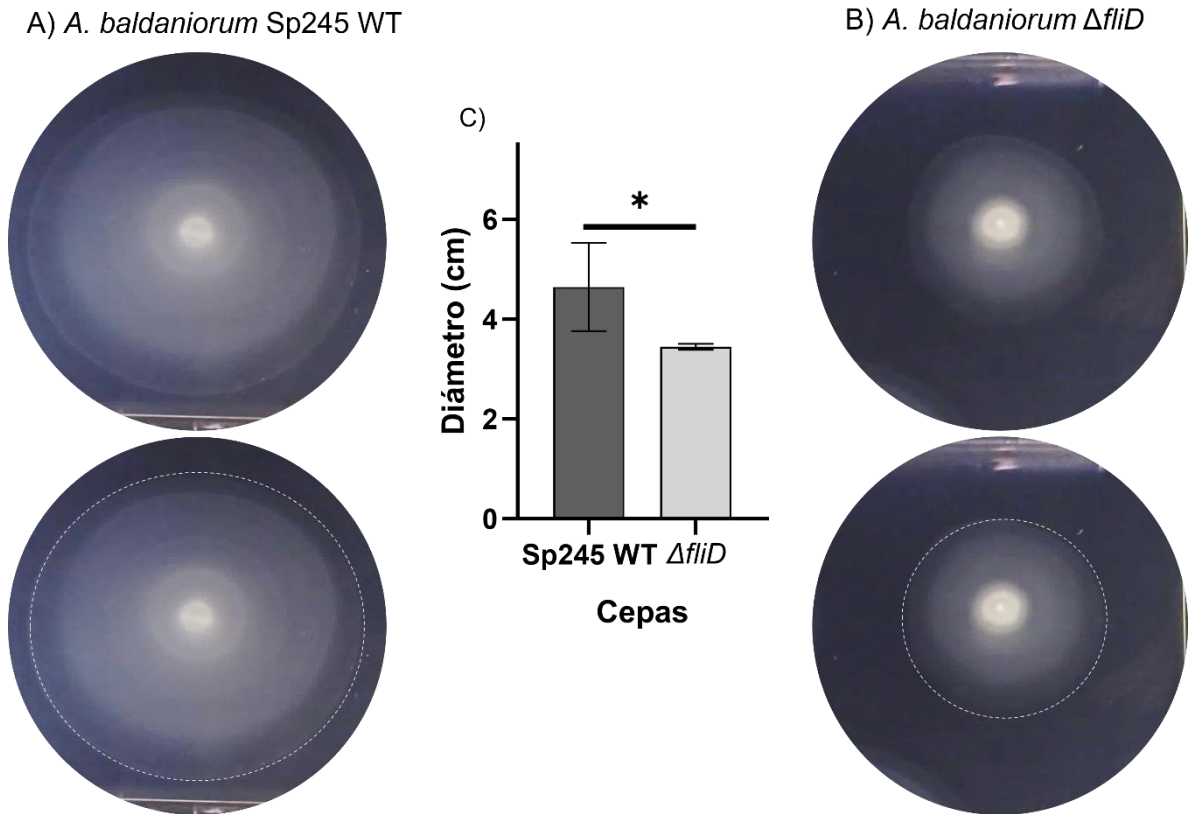


Figura 18. Ensayos de movilidad natatoria en agar suave (0.25% de agar) con malato como quimioattractante. A y B) imágenes representativas de los ensayos a 48 h de inoculación. C) Análisis estadístico de la movilidad a las 48 h (* = $p < 0.05$, prueba de T-student, promedio de 3 ensayos)

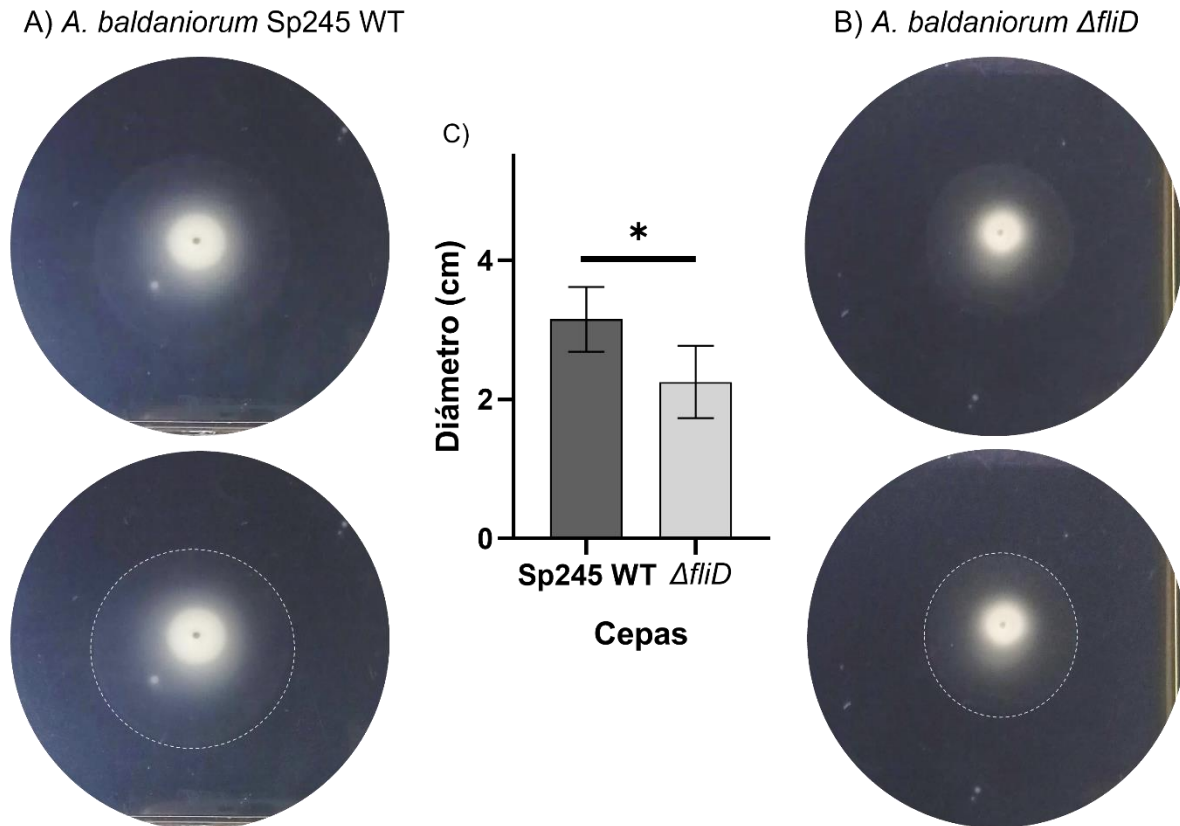


Figura 19. Ensayos de movilidad natatoria en agar suave (0.25% de agar) con fructosa como quimioattractante. A y B) imágenes representativas de los ensayos a 48 h de inoculación. C) Análisis estadístico de la movilidad a las 48 h (* = $p < 0.05$, prueba de T-student, promedio de 3 ensayos)

Detección de FliD en extractos de proteínas de superficie

Los resultados del SDS-PAGE y el western blot a partir de los extractos proteicos de la cepa silvestre y de la mutante muestran que la mutante sigue produciendo una proteína que es reconocida por el anticuerpo generado para el flagelo polar de *A. brasilense* Sp7 a la vez que se pueden observar algunas variaciones en el patrón de bandas. (Fig. 20)

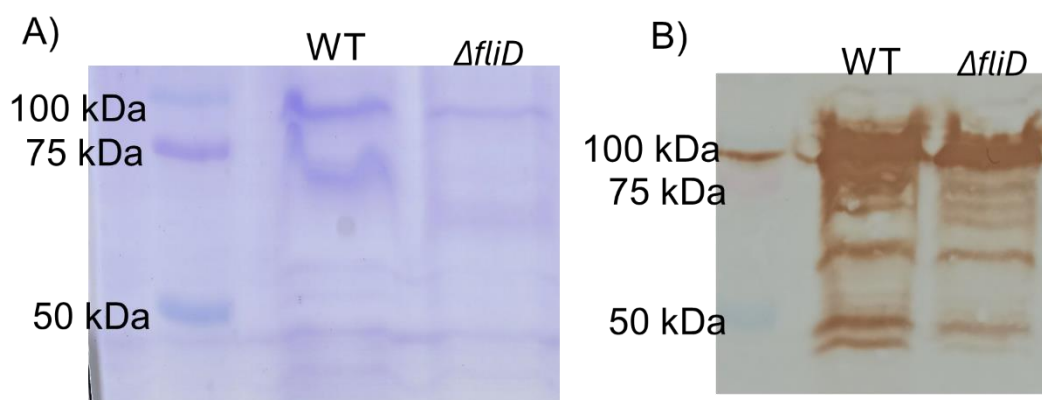
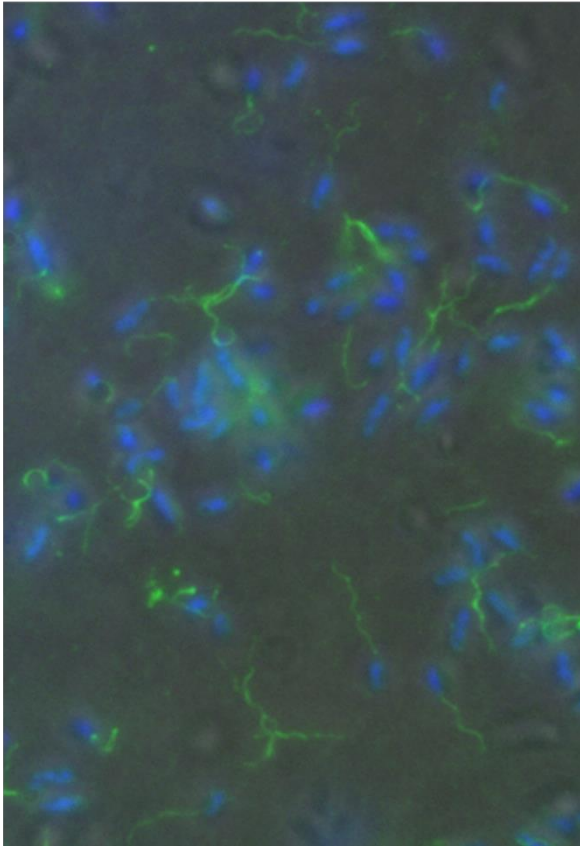


Figura 20. Resultados de A) SDS-PAGE y B) Western blot a partir de un extracto de proteínas de superficie de *A. baldaniorum* Sp25 WT y *A. baldaniorum* Sp245 $\Delta fliD$

Detección de FliD por inmunofluorescencia

Se logró detectar la proteína FliD por microscopia de fluorescencia (Figura 21) mostrando los flagelos en verde. Los resultados del ensayo muestran que la cepa mutante parece tener flagelos que no tienen la estructura típica al compararlos con los de la cepa silvestre.

A) *A. baldaniorum* Sp245



B) *A. baldaniorum* Δ fliD

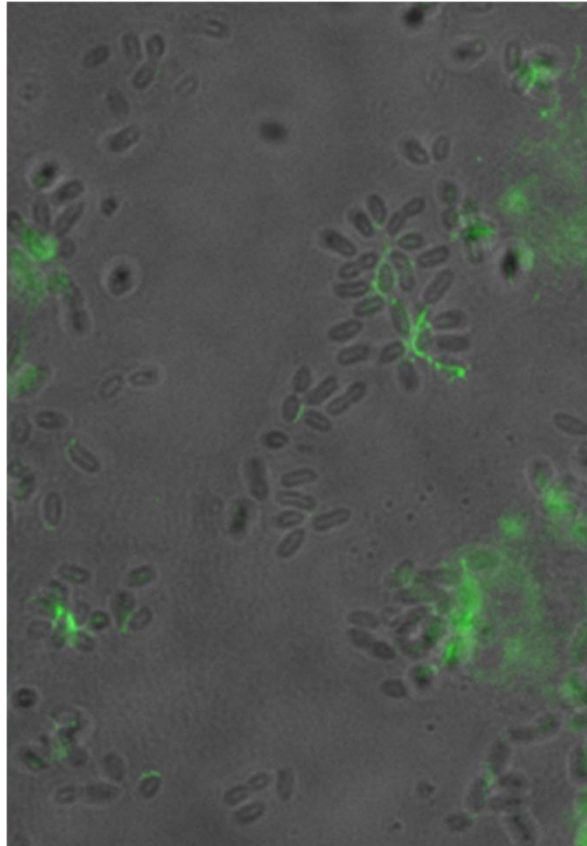


Figura 21. Detección de FliD por microscopía de fluorescencia. Se empleó un anticuerpo anti-flagelina polar de *A. brasilense* Sp7 y un anticuerpo secundario anti-rabbit goat IgG acoplado a FITC.

Discusión

El filamento del flagelo polar se compone de miles de subunidades de la proteína FliC que son ensambladas con ayuda de la proteína FliD. En especial, se ha reportado la existencia de bacterias con múltiples proteínas FliC, como es el caso de *Caulobacter crescentus*, con 6 flagelinas. Faulds-Pain et al. (2011) mostraron que todas participan en la formación del flagelo y, aunque ninguna es realmente indispensable, algunas tienen un mayor efecto cuando son eliminadas que otras. Por otro lado, En *Rhodobacter sphaeroides* se ha reportado (Armitage, 2022) que existen dos conjuntos de genes para la formación del flagelo, el primero se expresa para formar un flagelo subpolar mientras que el segundo conjunto solo se expresa

en condiciones anaerobias para producir un flagelo polar. De acuerdo con Faulds-Pain et al. (2011), varios géneros bacterianos poseen más de una copia del gen para la proteína FliD, sin embargo, los trabajos en esta proteína han sido en bacterias que poseen solo una copia. El análisis bioinformático reveló que al menos 2 especies de *Azospirillum* cuentan con dos copias del gen que codifica para la proteína FliD. Aunque las dos proteínas FliD de *A. baldaniorum* Sp245 son muy similares en su secuencia de aminoácidos, puede ser posible que no se expresen ambas bajo las mismas condiciones, como en el caso de *R. sphaeroides*; asimismo, puede suceder que cada una tenga una participación distinta en la formación del flagelo, como es el caso de las flagelinas de *C. crescentus*.

Como han demostrado Elías et al. (2022) y Mora et al. (2023) para otras especies de *Azospirillum*, el flagelo polar es capaz de desencadenar respuestas inmunes en las plantas con las que se asocia la bacteria. Aún se desconoce cuál de los componentes del filamento del flagelo polar es el responsable de causar estas respuestas. En este trabajo se empleó sistema heterólogo *E. coli* Rosetta pGEX-fliD para la purificación de la proteína FliD-1 de *A. baldaniorum* Sp245 con la intención de que pueda ser usada en ensayos futuros para comprobar si es capaz por sí sola de desencadenar la respuesta inmune en las plantas. Se lograron estandarizar las condiciones de inducción para sobreexpresar la proteína y se confirmó que corresponde con la proteína FliD reportada anteriormente por Viruega-Góngora et al. en 2020 además de que contiene la etiqueta GST. El peso molecular esperado para la proteína FliD de acuerdo con su secuencia es de 65.2 kDa, no obstante, se ha reportado previamente que tiene un peso de 100 kDa y se hipotetiza que el aumento en el peso se debe a que la proteína se encuentra glicosilada. Los resultados muestran que la proteína sobreexpresada pesa menos de 100 kDa, esta diferencia con lo previamente reportado se puede deber a que la proteína sobreexpresada no se encuentra glicosilada ya que *E. coli* no tiene la misma capacidad de *Azospirillum* de glicosilar sus flagelos (Logan, 2006), por lo tanto, el aumento en el peso se debe a la presencia de la etiqueta de GST que pesa 26 kDa dando un peso total de 91.2 kDa que corresponde con lo observado en el gel y el western blot. Se logró obtener la mayoría de la proteína en la fracción soluble y se

lograron estandarizar las condiciones para su purificación. Para poder obtener una cantidad significativa de la proteína se pueden escalar las condiciones de cultivo, así como incrementar la cantidad de la resina o la concentración de glutatión en el buffer de elución.

Se logró eliminar el gen *fliD-1* de *A. baldaniorum* Sp245 obteniendo la cepa mutante *A. baldaniorum* Δ *fliD*. De acuerdo con el análisis bioinformático, el gen *fliD-1* se ubica en sentido contrario a sus genes vecinos por lo que se pudo realizar la mutación insertando un casete de resistencia a kanamicina sin alterar la transcripción de los genes adyacentes.

En este trabajo, la eliminación del gen *fliD-1* de *A. baldaniorum* Sp245 causó una disminución significativa en la movilidad hacia ambos quimioattractantes evaluados. Sin embargo, contrario a lo reportado para otros organismos, la eliminación del gen no causó la pérdida total de la movilidad. Es posible que el gen *fliD-2* este actuando para, al menos de forma parcial, sintetizar un filamento que permite a la bacteria retener cierta capacidad de moverse. Como ha sido reportado en *S. enterica*, la proteína FliD es responsable del correcto plegamiento y ensamble de las subunidades de FliC para la construcción del filamento del flagelo. La eliminación del gen FliD en este organismo resultó en la pérdida de la movilidad natatoria. (Einenkel et al., 2025) En 1999, Seong Kim et al. generaron una mutante de *Helicobacter pylori* con el gen *fliD* interrumpido por un casete de resistencia a kanamicina causando la pérdida completa de la movilidad y la producción de filamentos más cortos a comparación de la cepa silvestre. Al-Otaibi et al. en el 2020 eliminaron el gen *fliD* de *C. jejuni* y la mutante no fue capaz de sintetizar su filamento por lo que también perdió la capacidad de moverse, la complementación con el gen en un sitio distal del cromosoma restauró por completo la movilidad. Postel et al. (2016) generaron una mutante de *P. aeruginosa* sin el gen *fliD* y perdió la movilidad, posteriormente se restauró el fenotipo al complementar con el gen. Huang et al. en el 2022) generaron una mutante de *Bacillus velezensis* SQR9 sin el gen *fliD* lo que disminuyó significativamente su movilidad y adhesión a superficies bióticas y abióticas, la complementación con el gen restauró parcialmente los fenotipos.

La detección de FliD a partir de la extracción de proteínas de superficie de la mutante sugiere que aún con la pérdida del gen *fliD-1* la bacteria sigue produciendo una proteína FliD capaz de ser detectada por el anticuerpo generado por Viruega-Góngora et al., (2020) para el flagelo polar. En la mutante, la banda de 100 kDa muestra ligeramente menor intensidad que la cepa silvestre, sugiriendo que el gen *fliD-2* no se expresa de la misma forma que el gen *fliD-1* y se refleja en una menor detección de la proteína. El anticuerpo empleado se generó para reconocer la proteína FliD reportada con un peso de 100 kDa, la detección de proteínas a menor peso puede indicar que el anticuerpo está reconociendo isoformas de la proteína FliD las cuales podrían ser causadas por el proceso de la extracción, asimismo es posible que se esté dando un reconocimiento inespecífico de otras subunidades del filamento. La ausencia de una banda debajo de los 50 kDa en la cepa mutante indica que puede haber alguna alteración en el reconocimiento causada por la ausencia del gen *fliD-1*.

La detección por inmunofluorescencia coincide con lo visto en el western blot al mostrar que la cepa mutante sigue produciendo una proteína capaz de ser detectada por el anticuerpo empleado. Sin embargo, la ausencia del gen *fliD-1* generó flagelos que muestran una estructura diferente a los que produce la cepa silvestre, similar a lo reportado por Seong Kim et al., (1999) para la mutante de *H. pylori* con el gen *fliD* truncado; sugiriendo que, aunque se siga produciendo la proteína, esta no es capaz de ensamblar correctamente el filamento. La observación de la cepa por microscopía electrónica de barrido en ensayos futuros podrá arrojar más información acerca de las diferencias estructurales que se observan en *A. baldaniorum* Δ *fliD*. El que la cepa mutante genere flagelos truncados puede ser la causa de que no se haya perdido por completo la movilidad como si sucede en otros trabajos como el de Al-Otaibi et al. (2020) con la mutante de *C. jejuni* Δ *fliD* que perdió la movilidad al ser incapaz de sintetizar el filamento. En el trabajo de Faulds-Pain et al. (2011) con *C. crescentus* los autores muestran que existe una relación entre el largo del filamento y la velocidad, donde los filamentos más cortos disminuyen la velocidad en la movilidad natatoria y algo similar podría estar sucediendo con *A. baldaniorum* Δ *fliD*. También es posible que las proteínas del

filamento flagelar se estén desprendiendo del filamento, como lo reportan Einkenkel et al. (2025) para *S. enterica* $\Delta fliD$, y que sean estas las que se detectaron en el western blot.

Conclusiones

La proteína FliD se pudo sobreexpresar en el sistema heterólogo *E. coli* Rosetta pGEX-fliD y se logró purificar la proteína FliD con la etiqueta GST y sin glicosilar.

Se construyó un plásmido que permitió reemplazar el gen *fliD-1* ubicado en el cromosoma de *A. balduanorum* Sp245 por un gen de resistencia a kanamicina. La pérdida del gen *fliD-1* afectó la movilidad de la cepa mutante y la estructura de su flagelo polar

Perspectivas

- Realizar microscopia electrónica para observar cambios en la estructura del filamento del flagelo polar de la cepa mutante
- Evaluar la adhesión y colonización a la raíz por la cepa mutante
- Evaluar si la cepa mutante es capaz de causar los mismos efectos que se han reportado en otras cepas de *Azospirillum* (desencadenar la respuesta inmune, modificar la arquitectura radicular)
- Complementar la cepa mutante con el gen *fliD-1* para comprobar si se restaura el fenotipo
- Eliminar el gen *fliD-2* en *A. balduanorum* Sp245

Bibliografía

Alexandre, G. (2015). Chemotaxis in *Azospirillum*. In *Handbook for Azospirillum* (pp. 101–114). Springer International Publishing.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-06542-7_6

- Alexandre, G. (2025). Movement of bacteria in the soil and the rhizosphere. In *Applied and Environmental Microbiology* (Vol. 91, Number 10). American Society for Microbiology. <https://doi.org/10.1128/aem.00246-25>
- Al-Otaibi, N. S., & Bergeron, J. R. C. (2022). *Structure and Assembly of the Bacterial Flagellum* (pp. 395–420). https://doi.org/10.1007/978-3-031-00793-4_13
- Al-Otaibi, N. S., Taylor, A. J., Farrell, D. P., Tzokov, S. B., DiMaio, F., Kelly, D. J., & Bergeron, J. R. C. (2020). The cryo-EM structure of the bacterial flagellum cap complex suggests a molecular mechanism for filament elongation. *Nature Communications*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16981-4>
- Armitage, J. P. (2022). Swimming Using a Unidirectionally Rotating, Single Stopping Flagellum in the Alpha Proteobacterium *Rhodobacter sphaeroides*. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 13). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.893524>
- Cassán, F., Coniglio, A., López, G., Molina, R., Nievas, S., de Carlan, C. L. N., Donadio, F., Torres, D., Rosas, S., Pedrosa, F. O., de Souza, E., Zorita, M. D., de-Bashan, L., & Mora, V. (2020). Everything you must know about *Azospirillum* and its impact on agriculture and beyond. In *Biology and Fertility of Soils* (Vol. 56, Number 4, pp. 461–479). Springer. <https://doi.org/10.1007/s00374-020-01463-y>
- Croes, C. L., Moens, S., Vanderleyden, J., & Michiels, K. W. (1993). The polar flagellum mediates *Azospirillum brasiliense* adsorption to wheat roots. In *Journal of General Microbiology* (Vol. 139).
- Einenkel, R., Qin, K., Schmidt, J., Al-Otaibi, N. S., Mann, D., Drobnič, T., Cohen, E. J., Gonzalez-Rodriguez, N., Harrowell, J., Shmakova, E., Beeby, M., Erhardt, M., & Bergeron, J. R. C. (2025). The structure of the complete extracellular bacterial flagellum reveals the mechanism of flagellin

- incorporation. *Nature Microbiology*, 10(7), 1741–1757. <https://doi.org/10.1038/s41564-025-02037-0>
- Elías, J. M., Ramírez-Mata, A., Albornóz, P. L., Baca, B. E., Díaz-Ricci, J. C., & Pedraza, R. O. (2022). The Polar Flagellin of *Azospirillum brasilense* REC3 Induces a Defense Response in Strawberry Plants Against the Fungus *Macrophomina phaseolina*. *Journal of Plant Growth Regulation*, 41(7), 2992–3008. <https://doi.org/10.1007/s00344-021-10490-4>
- Faulds-Pain, A., Birchall, C., Aldridge, C., Smith, W. D., Grimaldi, G., Nakamura, S., Miyata, T., Gray, J., Li, G., Tang, J. X., Namba, K., Minamino, T., & Aldridge, P. D. (2011). Flagellin redundancy in *Caulobacter crescentus* and its implications for flagellar filament assembly. *Journal of Bacteriology*, 193(11), 2695–2707. <https://doi.org/10.1128/JB.01172-10>
- Ferreira, N. D. S., Sant’Anna, F. H., Reis, V. M., Ambrosini, A., Volpiano, C. G., Rothballer, M., Schwab, S., Baura, V. A., Balsanelli, E., Pedrosa, F. de O., Passaglia, L. M. P., de Souza, E. M., Hartmann, A., Cassan, F., & 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>
- Fourneau, E., Pannier, M., Riah, W., Personeni, E., Morvan-Bertrand, A., Bodilis, J., & Pawlak, B. (2024). A “love match” score to compare root exudate attraction and feeding of the plant growth-promoting rhizobacteria *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*, and *Azospirillum brasilense*. *Frontiers in Microbiology*, 15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1473099>
- Fukami, J., Cerezini, P., & Hungria, M. (2018). *Azospirillum*: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation. In *AMB Express* (Vol. 8, Number 1). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0608-1>

- Haiko, J., & Westerlund-Wikström, B. (2013). The role of the bacterial flagellum in adhesion and virulence. In *Biology* (Vol. 2, Number 4, pp. 1242–1267). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/biology2041242>
- Huang, R., Feng, H., Xu, Z., Zhang, N., Liu, Y., Shao, J., Shen, Q., & Zhang, R. (2022). Identification of Adhesins in Plant Beneficial Rhizobacteria *Bacillus velezensis* SQR9 and Their Effect on Root Colonization. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 35(1), 64–72. <https://doi.org/10.1094/MPMI-09-21-0234-R>
- Logan, S. M. (2006). Flagellar glycosylation - A new component of the motility repertoire? In *Microbiology* (Vol. 152, Number 5, pp. 1249–1262). <https://doi.org/10.1099/mic.0.28735-0>
- Minamino, T., & Kinoshita, M. (2023). Structure, Assembly, and Function of Flagella Responsible for Bacterial Locomotion. *EcoSal Plus*, 11(1). <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.esp-0011-2023>
- Moens, S., Michiels, K., & Vanderleyden, J. (1995). Glycosylation of the flagellin of the polar flagellum of *Azospirillum brasilense*, a gram-negative nitrogen-fixing bacterium. *Microbiology*, 141(10), 2651–2657. <https://doi.org/10.1099/13500872-141-10-2651>
- Mora, V., López, G., Molina, R., Coniglio, A., Nievas, S., De Diego, N., Zeljković, S. Ć., Sarmiento, S. S., Spíchal, L., Robertson, S., Wilkins, O., Elías, J., Pedraza, R., Estevez, J. M., Belmonte, M. F., & Cassán, F. (2023). *Azospirillum argentinense* Modifies Arabidopsis Root Architecture Through Auxin-dependent Pathway and Flagellin. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 23(3), 4543–4557. <https://doi.org/10.1007/s42729-023-01371-8>
- Nedeljković, M., Sastre, D. E., & Sundberg, E. J. (2021). Bacterial flagellar filament: A supramolecular multifunctional nanostructure. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Number 14). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms22147521>

- Pathania, P., Rajta, A., Singh, P. C., & Bhatia, R. (2020). Role of plant growth-promoting bacteria in sustainable agriculture. In *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* (Vol. 30). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101842>
- Postel, S., Deredge, D., Bonsor, D. A., Yu, X., Diederichs, K., Helmsing, S., Vromen, A., Friedler, A., Hust, M., Egelman, E. H., Beckett, D., Wintrode, P. L., & Sundberg, E. J. (2016). Bacterial flagellar capping proteins adopt diverse oligomeric states. *ELife*, 5. <https://doi.org/10.7554/eLife.18857>
- Ramírez-Mata, A., López-Lara, L. I., Xiqui-Vázquez, M. L., Jijón-Moreno, S., Romero-Osorio, A., & Baca, B. E. (2016). The cyclic-di-GMP diguanylate cyclase CdgA has a role in biofilm formation and exopolysaccharide production in *Azospirillum brasilense*. *Research in Microbiology*, 167(3), 190–201. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2015.12.004>
- Seong Kim, J., Hoon Chang, J., Chung, S. IL, & Sun Yum, J. (1999). Molecular Cloning and Characterization of the *Helicobacter pylori* flhD Gene, an Essential Factor in Flagellar Structure and Motility. In *JOURNAL OF BACTERIOLOGY* (Vol. 181, Number 22). <https://journals.asm.org/journal/jb>
- Steenhoudt, O., & Vanderleyden, J. (2000). *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiology Reviews*, 24(4), 487–506. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2000.tb00552.x>
- Viruega Góngora, V. I. (2014). *Obtención e identificación de proteínas de superficie bacteriana, implicadas en la formación de biopelículas en Azospirillum brasilense Sp7*. [Benemérita Universidad Autónoma de Puebla]. <https://hdl.handle.net/20.500.12371/6977>
- Viruega-Góngora, V. I., Acatitla-Jácome, I. S., Reyes-Carmona, S. R., Baca, B. E., & Ramírez-Mata, A. (2020). Spatio-temporal formation of biofilms and

extracellular matrix analysis in *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiology Letters*, 367(4). <https://doi.org/10.1093/femsle/fnaa037>