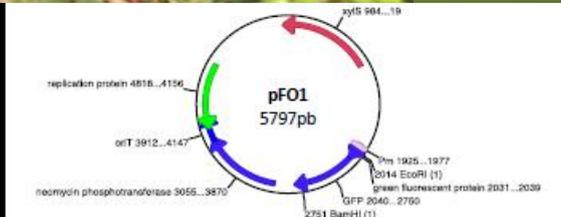


Puesta a punto de herramientas moleculares estándar para el estudio de *Cupriavidus* simbios de Mimosas nativas



TESIS DE GRADO



Florencia Ocampo
Dr. Raúl Platero

Departamento de Bioquímica y
Genómica Microbianas, Instituto de
Investigaciones Biológicas Clemente
Estable



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA FACULTAD DE CIENCIAS

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIATURA EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS
ORIENTACIÓN BIOTECNOLOGÍA

Puesta a punto de herramientas moleculares
estándar para el estudio de *Cupriavidus*
simbiontes de *Mimosas* nativas

FLORENCIA OCAMPO LAZO

Dr. Raúl Platero
Profesor Adjunto de Investigación, Departamento de Bioquímica y
Genómica Microbianas, IIBCE.

Montevideo, Uruguay

2017



INSTITUTO DE
INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
CLEMENTE ESTABLE

Agradecimientos

A Raúl Platero por su dedicación constante en la tutoría y elaboración de esta tesis, y por la motivación transmitida a través de la muestra de su vocación y pasión por la investigación.

Especial agradecimiento a Ana Ramón (Instituto de Biología de Facultad de Ciencias) y Gastón Azziz (investigador del IIBCE), quienes contribuyeron con aportes significativos en la versión final de este informe.

Gracias a mis compañeros del IIBCE y de Facultad de Ciencias por el ánimo, la colaboración y el compañerismo.

Gracias a mi familia y amigos que han ayudado de todas formas posibles y me han apoyado en dificultades y éxitos.

Florencia Ocampo
focmapo@fcien.edu.uy

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN.....	6
1 INTRODUCCIÓN.....	8
1.1 Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN)	8
1.2 Nitrogenasa	9
1.3 Asociación simbiótica rizobio-leguminosa	11
1.4 Genes Nod: diálogo molecular bacteria-hospedero	13
1.5 Aproximaciones moleculares al estudio de la interacción bacteria-hospedero	17
1.5.1 Mutaciones sitio-dirigidas	17
1.5.2 Plásmidos de amplio rango de huésped.....	19
1.6 Cupriavidus como modelo de investigación	21
2 OBJETIVOS.....	24
3 MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
3.1 Cepas bacterianas	25
3.2 Medios de cultivo	25
3.3 Uso de fuentes de carbono por UYMMa02A	26
3.4 Selección de antibióticos	26
3.5 Plásmidos	27
3.5.1 pBAM-gfp.....	27
3.5.2 pSEVA 238.....	28
3.5.3 pSEVA 247Y	28
3.5.4 pSW	29
3.5.5 pEMG.....	30
3.6 Análisis de secuencias y diseño de cebadores	30
3.7 Construcción de herramientas moleculares	31
3.7.1 Construcción de pFO1	35
3.7.2 Construcción de pEMG Δ nodD	36
3.7.3 Construcción de pFO0115	37
4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	39
4.1 Utilización de fuentes de carbono por UYMMa02A	39
4.2 Selección de antibióticos	39
4.3 El vector pFO1 valida el sistema XylS-Pm en UYMMa02A	40
4.3.1 Obtención de una variante de la proteína verde fluorescente compatible con el formato pSEVA	41
4.3.2 Inserción del gen <i>gfp</i> reconstruido en el plásmido pSEVA238	42
4.3.3 Funcionalidad de pFO1.....	44
4.4 Construcción de la herramienta molecular pEMGΔnodD	50

4.4.1	Identificación del operón nod en el genoma de UYMMa02A	50
4.4.2	Avances en la construcción del vector pEMGΔnodD	51
4.5	Estudio de la inducción del promotor <i>pnodB</i>.....	53
4.5.1	El promotor <i>pnodB</i> es identificado en la región intergénica nodD-nodB..	54
4.5.2	Construcción del vector pFO0115	55
4.5.3	Ensayos de expresión del promotor <i>pnodB</i>	57
5	OBJETIVOS ALCANZADOS Y PERSPECTIVAS	59
6	BIBLIOGRAFÍA.....	61
7	ANEXO.....	71
7.1	Composición de los medios de cultivo.....	71
7.2	Protocolo de preparación de células competentes y transformantes por CaCl₂.....	72
7.3	Protocolo de conjugación triparental.....	73

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Fijación Biológica del Nitrógeno (FBN)	9
Figura 2.	Formación del nódulo	12
Figura 3.	Apariencia de un nódulo producido en la raíz de <i>Mimosa uragüensis</i> . ..	13
Figura 4.	Esquema de intercambio de señales moleculares entre bacteria y planta hospedera.....	14
Figura 5.	Estructura molecular de los factores Nod	15
Figura 6.	Esquema de la metodología desarrollada por Deng & Nickoloff (1992) para mutagénesis sitio-dirigida.....	19
Figura 7.	Estructura de un plásmido de la colección Standard European Vector Architecture.....	20
Figura 8.	Esquema de la estructura del vector pBAM-gfp.....	28
Figura 9.	Estructura y nomenclatura de los plásmidos pSEVA	29
Figura 10.	Esquema de obtención de la mutante UYMMa02A <i>nodD</i> Δ por recombinación homóloga.....	32
Figura 11.	Estructura del plásmido pSW	33
Figura 12.	Ensayo de resistencia a antibióticos	40
Figura 13.	Construcción de pFO1	43
Figura 14.	Esquema de obtención del plásmido pFO1 a partir de los plásmidos pBAM- <i>gfp</i> y pSEVA238.....	44
Figura 15.	Esquema de ensayo de fluorimetría/fotometría	45
Figura 16.	Fluorescencia emitida por las transconjugantes UYMMa02A-pFO1 fotografiadas bajo iluminación de luz azul	45
Figura 17.	Fotometría del crecimiento de UYMMa02A-pFO1	47

Figura 18. Porcentaje de crecimiento celular relativo a la concentración de 3MB	48
Figura 19. Operón <i>nod</i> de <i>Cupriavidus sp.</i> UYMMa02A	51
Figura 20. Construcción del plásmido pEMGΔ <i>nodD</i>	53
Figura 21. Esquema de la región intergénica <i>nodD-nodB</i> en UYMMa02A.....	54
Figura 22. Análisis comparativo de las regiones intergénicas <i>nodB-nodD</i> en UYMMa02A y <i>Cupriavidus taiwanensis</i> LMG19424.....	54
Figura 23. Construcción de UYMMa02A-pFO0115.....	56
Figura 24. Esquema del plásmido pFO0115 obtenido (A) vs. esperado (B).....	58

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cepas bacterianas utilizadas	25
Tabla 2. Antibióticos ensayados en UYMMa02A y sus concentraciones.	26
Tabla 3. Plásmidos utilizados y generados	27
Tabla 4. Lista de cebadores utilizados en este trabajo.	31
Tabla 5. Crecimiento de UYMMa02A frente a diferentes fuentes de carbono	39
Tabla 6. Resultado del diseño de cebadores utilizados en la amplificación de <i>gfp</i> por PCR.....	41
Tabla 7. Valores de DO ₆₂₀ de UYMMa02A-pFO1	47
Tabla 8. Valores referentes al crecimiento de UYMMa02A a las 18 horas finales del ensayo de fluorimetría/fotometría	49

RESUMEN

Los rizobios son bacterias del suelo capaces de asociarse simbióticamente con plantas leguminosas, llevando a cabo la fijación biológica de nitrógeno (FBN). En la agricultura, son empleados como fertilizantes biológicos, que a diferencia de los químicos, promueven el crecimiento de los cultivos sin riesgo de contaminación ambiental.

Los procesos del establecimiento de la simbiosis son bien conocidos en rizobios pertenecientes al orden *Rhizobiales* (alfa-rizobios). Contrariamente existe escasa información sobre los mecanismos implicados en asociaciones que involucran rizobios pertenecientes a géneros dentro de las beta-proteobacterias (beta-rizobios). En Uruguay, se han hallado rizobios pertenecientes a los géneros *Burkholderia* y *Cupriavidus* asociados a diversas leguminosas nativas. El estudio de estos beta-rizobios puede promover el desarrollo de nuevas tecnologías en favor de la producción agrícola-forestal.

El modelo de este estudio es la cepa UYMMa02A, aislada de nódulos de *Mimosa magentea* colectada en el país. Mediante análisis filogenéticos se demostró que pertenece al género *Cupriavidus*, pero no coincide con ninguna especie antes descrita. La secuenciación del genoma evidenció un grupo de genes homólogo al operón *nod* caracterizado en otros rizobios. Con la finalidad de avanzar en la caracterización de los procesos involucrados en la interacción beta-rizobios-*Mimosa*, se propuso poner a punto herramientas moleculares: se implementó un sistema de recombinación homóloga para generar mutantes por delección, y se crearon vectores para estudiar la dinámica de expresión de genes presuntamente implicados en la nodulación.

Se generó un vector que validó el uso del sistema de expresión *XylS-pm* en la cepa y se avanzó en la construcción de un vector para generar mutaciones dirigidas. Un tercer vector fue construido para observar la dinámica de expresión del operón *nod* cuando UYMMa02A se expone a extractos radiculares u otros posibles inductores. Estas son nuevas herramientas moleculares aportadas a la comunidad científica que permitirán avanzar en el estudio de la interacción entre beta-rizobios y leguminosas hospederas.

Palabras clave: Rizobios; FBN; *Cupriavidus*; herramientas moleculares; sistema de expresión *XylS-pm*; mutaciones sitio-dirigidas; recombinación homóloga; GFP; factores Nod; dinámica de expresión; simbiosis; leguminosas.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN)

El nitrógeno es un elemento indispensable para todos los seres vivos ya que es necesario para la elaboración de diversas moléculas como lo son las proteínas y los ácidos nucleicos (ADN y ARN), responsables de mantener y propagar la vida. El nitrógeno es también un factor clave en la agricultura ya que es frecuentemente un nutriente limitante del crecimiento vegetal (Vitousek & Howarth, 1991). Si bien es el gas más abundante en la forma química N_2 , la gran mayoría de los seres vivos, entre ellos las plantas, no están metabólicamente adaptados para asimilarlo. En el suelo, el nitrógeno se encuentra en moléculas químicamente asimilables por las plantas (NO_3^- y NH_4^+) (Madigan *et al.*, 2012), sin embargo su abundancia es insuficiente según ciertos requerimientos agrícolas. Debido a esta limitante es que son necesarios los fertilizantes nitrogenados. El uso de fertilizantes acarrea problemas ambientales; ha puesto a la producción agrícola como la principal fuente de contaminación del agua por nitratos y fosfatos. El uso indiscriminado de fertilizantes nitrogenados provoca la acumulación de nitratos en el suelo, los que por lixiviación pueden incorporarse a las aguas subterráneas o ser arrastrados por cauces y reservorios de agua superficiales. El exceso de nitrato en estos medios favorece la proliferación de algas y cianobacterias que consumen grandes cantidades de oxígeno, por lo que las especies animales no pueden subsistir a tal presión ambiental. Incluso la vegetación subacuática parece debido a la escasez de luz. Por otro lado, no solamente las aguas son afectadas; las especies reactivas de nitrógeno (N_2O , NH_4^+) que son liberadas tras el uso de fertilizantes nitrogenados forman parte del total de factores causantes del cambio climático. El uso de fertilizantes no solo ha demostrado ser dañino para la biósfera sino también ineficiente. Solo el 50% del fertilizante suministrado es asimilado por el cultivo. El deterioro ambiental y los perjuicios sobre la población humana debido al mal uso de estos fertilizantes hace evidente la urgencia de implementar prácticas alternativas (FAO, 2016).

Ventajosamente, el nitrógeno atmosférico puede ser naturalmente asimilado e integrado en los suelos por bacterias cuyo metabolismo así lo permiten. Este proceso se conoce como Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN) y es llevado a cabo únicamente por ciertos procariontes denominados diazotófos, los cuales convierten el N_2 a amonio (NH_4^+) (Madigan *et al.*, 2012). De esta manera, el nitrógeno atmosférico entra en

el ciclo del nitrógeno en formas aprovechables por el resto de los seres vivos (figura 1).

A causa de esta exclusiva propiedad, los microorganismos del suelo son los vanguardistas en el desarrollo de tecnologías que prometen mejorar la producción agrícola de forma ambientalmente sostenible. Las bacterias capaces de realizar la FBN tienen por lo tanto una gran importancia económica y ambiental, ya que su utilización permite disminuir el uso de fertilizantes químicos nitrogenados con la consiguiente disminución de los efectos nocivos asociados (Crews & Peoples, 2004).

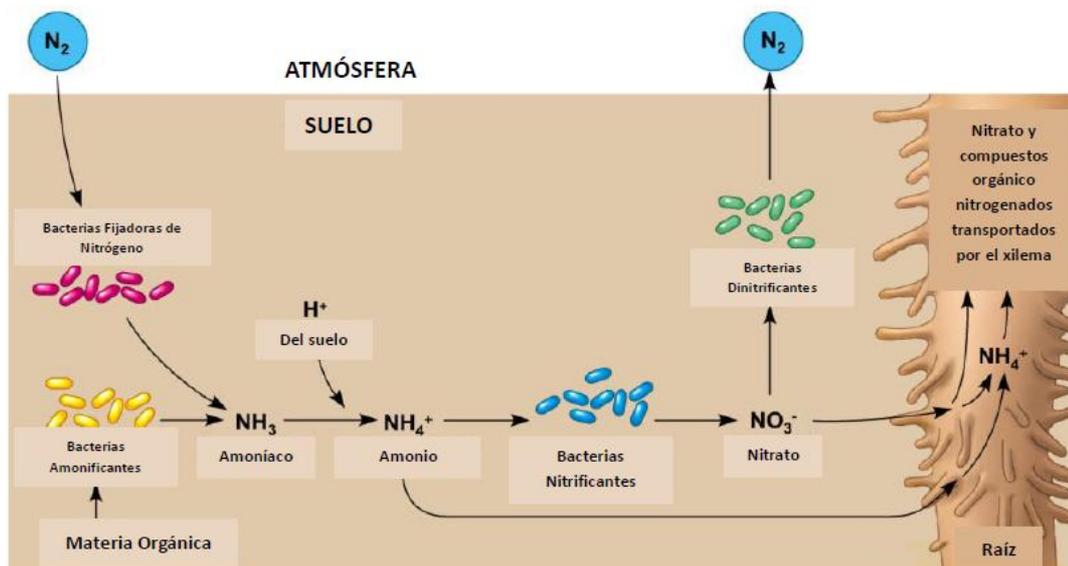
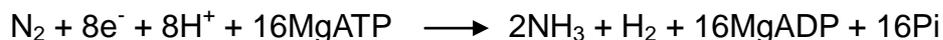


Figura 1. Fijación Biológica del Nitrógeno (FBN). La FBN comienza cuando las bacterias fijadoras de nitrógeno metabolizan el nitrógeno atmosférico (N_2) para elaborar los biopolímeros que necesitan. Su descomposición en los suelos aporta amoníaco (NH_3), el cual se convierte rápidamente en amonio (NH_4^+). El amonio, también producido por amonificación, es aprovechado tanto por las plantas como por las bacterias nitrificantes, las cuales producen nitrato (NO_3^-). El nitrato es otra forma en que el nitrógeno es metabólicamente asimilable por las plantas. Finalmente, completando el ciclo, las bacterias dinitrificantes producen N_2 a partir de NO_3^- . Adaptado de http://www.bio.miami.edu/dana/226/226F08_22.html

1.2 Nitrogenasa

Los procariotas diazótrofos son los únicos capaces de fijar el nitrógeno atmosférico. Esta particularidad metabólica se debe a que poseen el complejo enzimático de la nitrogenasa. Se trata de una metaloenzima dependiente de Mg-ATP que reduce N_2 a dos moléculas de NH_3 en la forma estequiométrica siguiente:



Como se especifica en la ecuación, el proceso de FBN es altamente costoso energéticamente ya que se requieren cerca de 16 moles de ATP para reducir 1 mol de N_2 . El complejo de la nitrogenasa está formado por dos componentes metaloprotéicos, una ferro-molibdenoproteína (MoFe) que se asocia a una ferroproteína (Fe-proteína) durante la reducción del nitrógeno. La Fe-proteína es codificada por el gen *nifH*, mientras que MoFe se forma por los productos de los genes *nifD* (subunidad α) y *nifK* (subunidad β). Contiene 30 átomos de Fe y 2 átomos de Mo organizados en dos pares de grupos metálicos llamados P ($\text{Fe}_8\text{S}_{7-8}$) y cofactor FeMo (Fe_7S_9 Mo-homocitrato) (Peters, Fisher & Dean, 1995).

Hasta la fecha se han descrito tres familias de nitrogenasas que se diferencian por el metal encontrado junto al hierro en el centro activo. La nitrogenasa de hierro y molibdeno (Fe-Mo) es la más eficiente y es encontrada en casi todas las especies bacterianas que fijan nitrógeno. La nitrogenasa de hierro y vanadio (Fe-V) es la segunda en abundancia y en ser descubierta. Por último, existe una forma de nitrogenasa que contiene únicamente hierro en su centro activo (Fe-Fe) y fue descrita por primera vez en *Rhodobacter capsulatus* (Ruiz *et al.*, 2007); esta es menos común y también menos eficiente que las anteriores. Muchos microorganismos diazótrofos contienen genes codificantes para más de un tipo de nitrogenasa, los cuales pueden ser expresados en distintas condiciones ambientales (Ruiz *et al.*, 2007).

Aunque muchas de las bacterias diazótroficas son aerobias, la enzima nitrogenasa es muy sensible al O_2 , por lo que se inactiva en su presencia. Para limitar la difusión de oxígeno hacia la nitrogenasa, los diazótrofos utilizan diferentes estrategias según su estilo de vida; los rizobios, por ejemplo, solamente expresan la nitrogenasa cuando se encuentran en el ambiente microaeróbico proporcionado por los nódulos simbióticos en las raíces y tallos de las leguminosas que los hospedan (ver más adelante) (Soto-Urzúa & Baca, 2001). Las bacterias fijadoras de nitrógeno capaces de formar asociaciones simbióticas con leguminosas son las que aportan a la planta el nitrógeno fijado en forma más eficiente. Además, todos los rizobios poseen la nitrogenasa de molibdeno, de eficiencia mayor respecto a las otras.

1.3 Asociación simbiótica rizobio-leguminosa

El género *Rhizobium* fue nombrado por primera vez en 1889; significa en latín “raíz viviente” (Frank, 1889). Los rizobios son un grupo parafilético de bacterias de la división Proteobacteria, la más amplia y diversa dentro del dominio Bacteria (Kobayashi & Broughton, 2008; Lloret & Martínez-Romero, 2005). El término rizobio se utiliza generalmente para designar a las α y β -proteobacterias capaces de establecer asociaciones simbióticas con leguminosas (Weir, 2016), aunque también se han aislado γ -proteobacterias (Enterobacterias y *Pseudomonas*) en nódulos presentes en raíces de leguminosas del género *Hedysarum* (Benhizia *et al.*, 2004). La mayoría de las especies de rizobios descritas pertenece al orden Rhizobiales dentro del filo de las α -proteobacterias. Más de 80 especies se agrupan en los géneros *Bradyrhizobium*, *Ochrobactrum*, *Azorhizobium*, *Devosia*, *Microvirga*, *Methylobacterium*, *Mesorhizobium*, *Phyllobacterium*, *Rhizobium*, *Shinella* y *Sinorhizobium* (*Ensifer*). Dentro de las β -proteobacterias, los rizobios se encuentran en el orden Burkholderiales representados por los géneros *Burkholderia*, *Cupriavidus* y *Herbaspirillum* (Weir, 2016), los cuales presentan la capacidad de establecer simbiosis rizobio-leguminosa por medio de la formación de nódulos (Nápoles, Gómez, & Costales, 2007).

La simbiosis rizobio-leguminosa comienza mediante un diálogo químico que le permite a la bacteria adherirse a los pelos radiculares, los cuales reaccionan enrollándose alrededor de la infección. Las bacterias atrapadas inducen la hidrolización local de la pared celular, lo que produce la invaginación de la membrana plasmática y por ende la formación del tubo o cordón de infección. Es a través del tubo de infección que finalmente las bacterias alcanzan las células corticales (Gualtieri & Bisseling, 2000) (figura 2). Los rizobios tienen actividad mitogénica sobre las células meristemáticas de las raíces y tallos de las plantas hospederas, lo cual genera la formación de un nuevo órgano llamado nódulo. (Kijne, 1992) (figura 3). Es en los nódulos donde se alojan los rizobios y se lleva a cabo la FBN, que favorece el crecimiento de la planta (Howard & Rees, 1996). A su vez, los rizobios se benefician del carbono que aporta la planta, necesario para soportar el alto coste energético que tiene la FBN. En los nódulos, el rizobio encuentra un ambiente microaerobio donde la nitrogenasa es activa. La baja carga de oxígeno se debe a que las células de la leguminosa presentes en los

nódulos maduros producen una proteína homóloga a la hemoglobina, la leghemoglobina. Esta limita la libre difusión del oxígeno hacia el interior del nódulo mediante un transporte controlado, proveyendo las cantidades necesarias para el funcionamiento del metabolismo aeróbico del rizobio sin que se inactive la nitrogenasa (Soto-Urzuá & Baca, 2001).

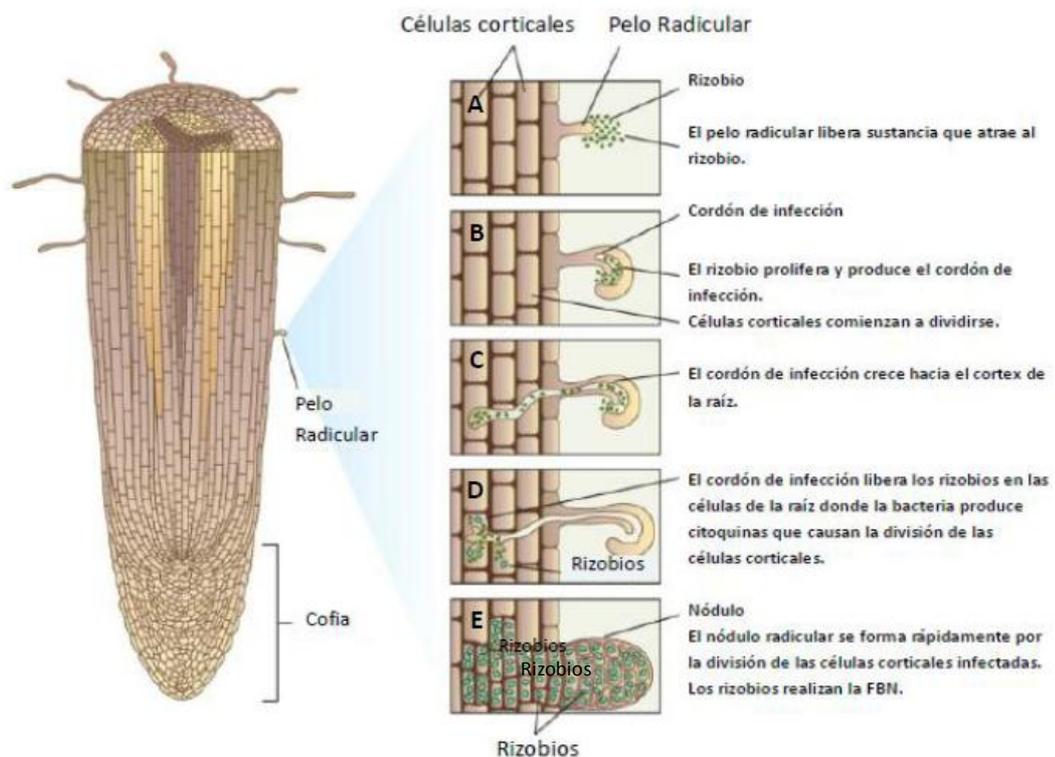


Figura 2. Formación del nódulo. Una comunicación química se desencadena entre rizobio y raíz de leguminosa (A), lo que permite un reconocimiento entre las partes y la formación del cordón de infección (B). El cordón de infección crece en dirección al cortex de la raíz (C) donde las bacterias son liberadas y comienzan a secretar citoquinas que activan la división de las células corticales (D). La división celular resulta en la formación del nódulo donde la bacteria realiza su función simbiótica (E). Adaptado de http://evolution-textbook.org/content/free/figures/06_EVOW_Art/26_EVOW_CH06.jpg

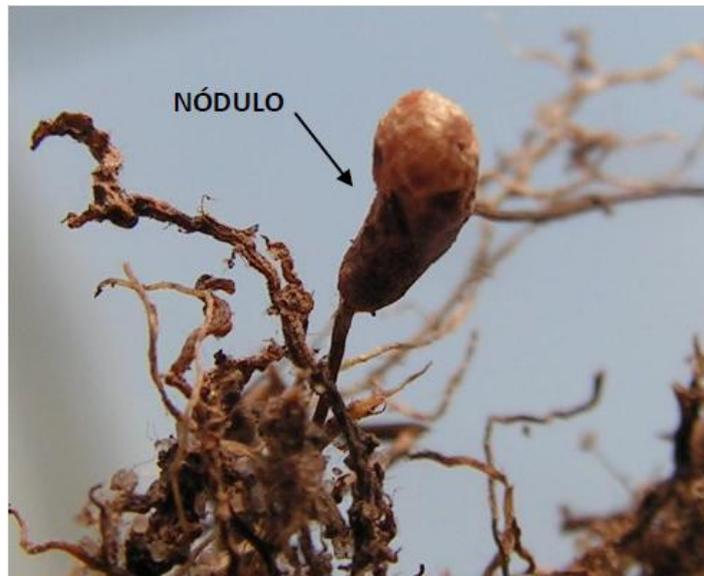


Figura 3. Apariencia de un nódulo producido en la raíz de *Mimosa uragüensis*.

1.4 Genes Nod: diálogo molecular bacteria-hospedero

En 1990, Patrice Lerouge identificó la molécula química responsable del proceso de nodulación en *Sinorhizobium meliloti*, a la cual se atribuyó el nombre de factor de nodulación o factor Nod. En su trabajo, Lerouge observó que el factor Nod tenía la función de inducir un cambio en los pelos radiculares, iniciándose así la formación del nódulo (Lerouge *et al.*, 1990). Desde entonces, los estudios sobre la nodulación han podido constatar que el establecimiento de la simbiosis ocurre tras un complejo intercambio de señales entre la bacteria y la planta hospedera (Masson-Boivin *et al.*, 2009). La mayor parte de las investigaciones al respecto se han centrado en lo que ocurre entre alfa-rizobios y sus plantas hospederas, las cuales muestran que una de las primeras señales tiene lugar tras la secreción de flavonoides o chalconas por la raíz de la planta. Los flavonoides están formados por compuestos aromáticos de dos anillos bencénicos unidos por un compuesto pirano. Según las sustituciones presentes en los anillos existen hasta un total de 4000 tipos de flavonoides. Estas sustancias median la especificidad en el reconocimiento por parte de la bacteria y provocan la inducción de los genes *nod* (genes de nodulación) en ella (Hirsch, Lum, & Downie, 2001). La figura 4 muestra la proteína reguladora NodD interactuando de forma específica con los flavonoides secretados por la planta. NodD es un

regulador transcripcional de la familia AraC (Vlassak *et al.*, 1998), que se activa en presencia de flavonoides específicos. En su forma activa, NodD es capaz de unirse a regiones promotoras presentes en el ADN conocidas como cajas nod y activar la expresión de los genes *nod* responsables de la síntesis de los factores de nodulación o factores Nod. Este reconocimiento de flavonoides por parte de la bacteria constituye el primer nivel de especificidad en la interacción leguminosa-rizobio. Los factores Nod son moléculas de lipoquitinolisacáridos producidas por las enzimas expresadas por los genes de nodulación. Estas moléculas son secretadas al medio donde son reconocidas por la planta hospedera, lo que constituye el segundo nivel de especificidad en la interacción simbiótica entre bacteria y leguminosa (Kamst *et al.*, 1998).

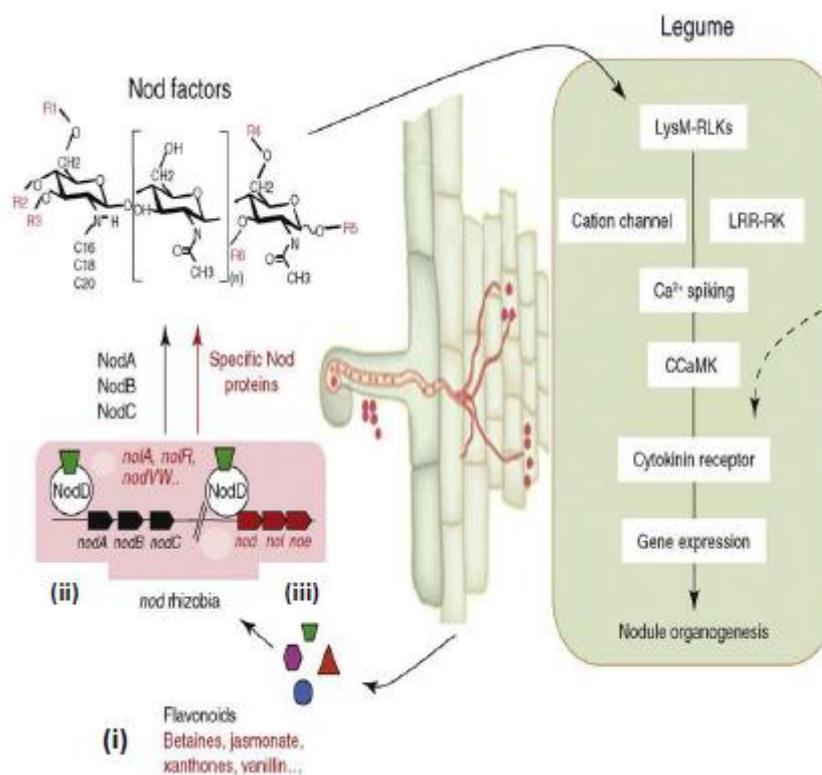


Figura 4. Esquema de intercambio de señales moleculares entre bacteria y planta hospedera. En primera instancia, los flavonoides secretados por la raíz de la leguminosa (i) son captados en el rizobio por la proteína reguladora NodD (ii), la cual, según el flavonoide, activa diferentes genes de nodulación (iii) que producen la síntesis de los factores Nod causantes de la formación del nódulo. Estos lipoquitinolisacáridos son identificados por el hospedador provocando varias respuestas simbióticas en la raíz, tales como flujos de iones, aumento de calcio, deformación del pelo de la raíz, división de las células corticales y formación del cordón de infección que guía a las bacterias hacia el primordio emergente; todo lo cual da paso a la formación del nódulo. Adaptado de Masson-Boivin *et al.* (2009).

La estructura química básica de los factores Nod es bastante conservada en todos los rizobios y consta de una cadena de tres a cinco unidades de N-acetil glucosamina (quitina), unidas por enlace β -1,4. Esta estructura básica tiene en el extremo no reductor una cadena alifática de longitud e insaturación variables y distintas sustituciones en el extremo reductor (acetil, carbamoil, metil, sulfato y grupos azúcares) (figura 5). Estas sustituciones en la estructura conservada son generadas por la acción de enzimas codificadas por genes *nod* específicos y determinan la especificidad del establecimiento de la simbiosis con las leguminosas hospederas. Muchos rizobios son capaces de sintetizar una amplia diversidad de factores Nod, lo que les posibilita colonizar distintas leguminosas. Sin embargo, está claro que solamente ciertos tipos y mezclas específicas de factores Nod permiten al rizobio nodular determinada leguminosa (Spaink, 1995); por esto, estas moléculas son conocidas como “la llave para la puerta leguminosa” (Relic *et al.*, 1994).

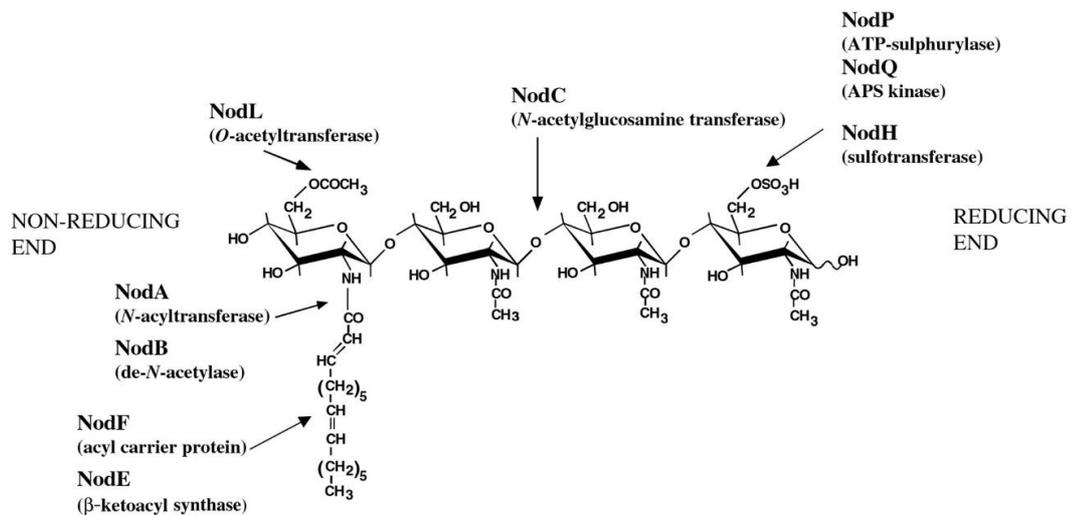


Figura 5. Estructura molecular de los factores Nod. Cada proteína Nod está codificada por su gen equivalente llamado *nod*. Las proteínas NodA, NodB y NodC son comunes a todos los rizobios. El resto de las proteínas Nod son responsables de las modificaciones que confieren especificidad con las leguminosas hospederas. Tomado de Wais, Keating, & Long (2002).

Como ya se mencionó, los factores Nod afectan diferentes procesos fisiológicos en la planta; inducen la deformación de los pelos radicales (Spaink *et al.*, 1991), la ontogenia de la estructura completa del nódulo, la división de las células corticales (Dénairé, Debelle, & Promé, 1996; Fisher & Long, 1992) y la expresión de los genes *nodulina* esenciales para la formación del cordón de infección (Horvath *et al.*, 1993; Minami *et al.*, 1996; Pichon *et al.*, 1993). En esto último, en algunos casos están

involucrados los sistemas de secreción de tipo III (T3SS), tipo IV (T4SS), y posiblemente también del tipo VI (T6SS) (Plá, 2015; Pastor, 2013). Okazaki *et al.* (2013) demostraron que, para lograr la simbiosis, el microsimbionte de la soja *Bradyrhizobium elkanii* utiliza el sistema de secreción de tipo III (T3SS), el cual, si bien es conocido por liberar factores de virulencia en bacterias patógenas, en este caso promueve la infección intercelular. Este sistema también es utilizado por *Cupriavidus taiwanensis* en la infección de *Mimosa pudica* (Chen *et al.*, 2001). Se ha constatado además que cuando T3SS es inactivado en *C. taiwanensis*, este beta-rizobio es también capaz de nodular en la leguminosa arbórea *Leucaena leucocephala* (Saad *et al.*, 2012).

Al contrario de los trabajos antes mencionados, Giraud *et al.* (2007) demostraron que no en todos los casos los genes *nod* están involucrados en la nodulación. Tras analizar las secuencias genómicas completas de dos cepas de *Bradyrhizobium* simbióticas y fotosintéticas (BTai1 y ORS278), los autores observaron que los genes *nodABC* y los factores Nod codificados por estos no son requeridos para la simbiosis en algunas leguminosas. Análisis mutacionales indicaron que estos rizobios utilizan una vía alternativa para iniciar simbiosis, donde un derivado de purina sería clave en la formación del nódulo.

Si bien estas cuestiones son bien conocidas para los alfa-rizobios, hasta el momento continúan siendo pocos los estudios que contribuyen al conocimiento sobre los mecanismos utilizados para el establecimiento de la simbiosis beta-rizobios-leguminosas. Sería de gran aporte el desarrollo de técnicas moleculares y protocolares que permitan responder a las preguntas de cuándo, cómo y por qué los beta-rizobios logran colonizar las raíces de sus hospederos. Aunque la evidencia genética muestra que, al igual que en alfa-rizobios, los genes *nod* también se encuentran en beta-rizobios (Amadou *et al.*, 2008; De Meyer *et al.*, 2015; Iriarte *et al.*, 2016), es necesario demostrar el rol que cumplen estos genes en las distintas especies y dilucidar los mecanismos implicados en su expresión. Los estudios que describen los mecanismos de expresión de los genes *nod* en beta-rizobios se basan principalmente en la especie *C. taiwanensis*, donde se ha demostrado que la luteolina y la apigenina (flavonoides secretados por muchas leguminosas) son capaces de inducir la expresión del gen *nodB* (Marchetti *et al.*, 2010; Marchetti *et al.*, 2011; Saad *et al.*, 2012). Sin embargo aún resta por determinar si los genes *nod* se expresan *in vivo*, y si son realmente imprescindibles en el establecimiento de una simbiosis efectiva, o si existen otros genes involucrados en el proceso.

1.5 Aproximaciones moleculares al estudio de la interacción bacteria-hospedero

1.5.1 Mutaciones sitio-dirigidas

Una de las actividades comúnmente empleadas en la biotecnología es la manipulación genética de organismos. Sea mediante mutación generalizada o dirigida se busca modificar el fenotipo del organismo de interés con la finalidad de estudiar la función de ciertos genes o de resolver problemáticas ambientales, médicas, agrícolas u otras. Una de las limitantes más relevantes para la mutagénesis es la falta de sistemas de experimentación genética compatibles con genomas de bacterias gram-negativas no emparentadas con *E.coli*. Sin embargo, metodologías que utilizan transposones son aplicables a un amplio rango de bacterias gram-negativas. Estos transposones pueden mantenerse en cultivos de *E. coli* para transformar por conjugación otras bacterias y así producir mutaciones que se seleccionan por la resistencia a antibióticos conferida por el mismo transposón (Ruvkun & Ausubel, 1981; Simon, Priefer, & Puhler, 1983). Éste es un ejemplo de mutagénesis generalizada, donde el investigador selecciona fenotipos de interés entre una población de mutantes diversos. Por otro lado, en la mutagénesis dirigida se busca modificar el genoma a voluntad para obtener el fenotipo deseado (Hutchison *et al.*, 1978). La mutagénesis sitio-dirigida *in vitro* es una técnica esencial para el estudio de la relación estructura-función en proteínas, la expresión de genes y para la modificación de vectores. Generalmente, las distintas metodologías desarrolladas para este propósito requieren de múltiples pasos enzimáticos, vectores especializados y sitios de restricción convenientes, o el subclonado de las secuencias de ADN a ser mutadas en un cierto vector para producir y recuperar ADN simple hebra. Este tipo de metodologías son muy laboriosas y requieren mucho tiempo (Kunkel, 1985; Sayers *et al.*, 1988). Sin embargo, otros procedimientos para la mutagénesis sitio-dirigida facilitan la tarea, como por ejemplo el propuesto por Deng & Nickoloff (1992), que elimina la necesidad del subclonado generando templados de ADN simple hebra mediante el empleo de plásmidos de ADN doble hebra. El procedimiento involucra el apareamiento simultáneo de dos cebadores a la misma hebra de ADN plasmídico desnaturalizada por calor, que contiene sitios de restricción no esenciales y únicos. El cebador mutagénico introduce la mutación deseada en el plásmido y el cebador de

selección altera la secuencia del sitio de restricción no esencial y única en el plásmido. La extensión de estos cebadores tras desnaturalización y acción de la ADN polimerasa T4, se obtiene una población de plásmidos en la cual algunos contienen la mutación deseada, y a su vez, carecen del sitio único de restricción. Cuando todos se exponen a la enzima de restricción correspondiente, los plásmidos parentales no mutados son digeridos, mientras que los mutados permanecen sin digerir. Debido a que los plásmidos mutados circulares son transformados más eficientemente que los lineales, la transformación de este ADN en cualquier molécula de ADN de *E. coli* resulta en colonias que contienen el plásmido mutado (figura 6).



Figura 6. Esquema de la metodología desarrollada por Deng & Nickoloff (1992) para mutagénesis sitio-dirigida. Se escoge un plásmido con único sitio de restricción y un sitio blanco para mutar. Se utiliza un cebador de selección y otro mutagénico. Tras desnaturalización y acción de la ADN polimerasa T4, se obtiene un plásmido con su único sitio de restricción faltante y la mutación deseada. Se efectúa una selección con la enzima de restricción correspondiente para linearizar los plásmidos parentales, previo a la transformación en células *E. coli* competentes. Adaptado de Braman, Papworth, & Greener (1996).

En el presente trabajo se adoptó la metodología para mutación sitio-dirigida empleada por Martínez-García & de Lorenzo (2011) aplicable a bacterias gram-negativas no relacionadas con *E. coli*. Esta metodología se basa en los mecanismos de reparación del ADN y recombinación homóloga bacterianos que se desencadenan tras un corte de doble cadena (DSB; del inglés double-strand break) en el genoma, con el fin de generar mutantes por delección. Requiere tan solo de dos plásmidos. El primero tiene la función de integrarse al genoma de la bacteria modelo aportando sitios de corte específicos y secuencias adyacentes al gen a deletar. La integración ocurre por presión selectiva en presencia del antibiótico al cual confiere resistencia. El segundo plásmido contiene el gen para una endonucleasa que reconoce los sitios de corte específicos aportados por el primer plásmido. Se introduce en la bacteria modelo para producir los DSBs que dan paso a la recombinación homóloga. El resultado buscado es que las secuencias adyacentes aportadas por el primer plásmido ocupen el lugar del gen a deletar. Esta metodología se explica en mayor detalle en la sección Materiales y Métodos (ver página 31).

1.5.2 Plásmidos de amplio rango de huésped

Debido a la necesidad de disponer de vectores estandarizados que sean compatibles con el mayor número de bacterias, se han desarrollado diversas colecciones de plásmidos de amplio rango de huésped (Bagdasarian *et al.*, 1981; Santos *et al.*, 2001; Scherzinger *et al.*, 1984). Una de estas colecciones está compuesta por plásmidos de arquitectura modular llamados pSEVA por las siglas de *Standard European Vector Architecture* (Silva-Rocha *et al.*, 2013). En esta colección, los plásmidos mantienen una estructura estándar que consta de tres partes básicas: un origen de replicación (*ori*), un gen que codifica para la resistencia a antibióticos y un *cargo* donde se puede colocar el material genético

deseado mediante el corte con enzimas de restricción y ligación (figura 7). El origen de replicación determina el rango de huésped en que puede replicarse y el número de copias del plásmido. La resistencia a antibióticos permite su selección, y el *cargo* dependerá de la aplicación que se le quiera dar al plásmido; por ejemplo, pueden clonarse allí secuencias de ADN de interés o genes cuales quiera estudiarse su expresión mediante fusiones con genes reporteros. Entre los genes reporteros, son de mucha utilidad aquellos que codifican para proteínas fluorescentes, ya que hacen evidente la expresión del gen fusionado cuando la bacteria transformada con esta construcción emite fluorescencia. Esta técnica tiene la ventaja de ser más sencilla y económica que otras técnicas aplicadas al estudio de expresión de genes como la PCR cuantitativa o el uso de reporteros que utilizan sustratos cromogénicos, sin embargo requiere la disponibilidad de equipos capaces de cuantificar la fluorescencia.

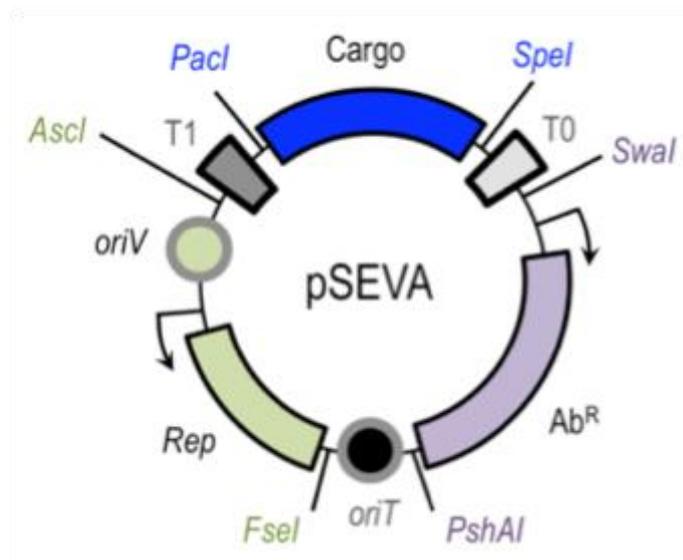


Figura 7. Estructura de un plásmido de la colección Standard European Vector Architecture. Estos vectores están formados por tres módulos variables: un cargo (azul), un origen de replicación (verde), y un marcador de antibiótico (magenta). Las enzimas utilizadas para cambiar los segmentos de ADN funcionales se muestran en el mismo código de colores y los módulos están separados por tres regiones permanentes que son compartidas por todos los vectores, los terminadores transcripcionales T0 y T1 y el origen de la conjugación *oriT*. Tomado de Silva-Rocha *et al.*, (2013).

1.6 Cupriavidus como modelo de investigación

El género *Cupriavidus* fue caracterizado por primera vez por Makkar & Casida (1987) cuando describieron la especie *Cupriavidus necator* como una bacteria del suelo predadora no-obligada de bacterias y hongos del suelo. Los autores describen también a esta especie como altamente resistente al cobre y además, aseguran que su crecimiento inicial se ve estimulado por la presencia de este metal, de lo cual deriva su nombre (Cupria=cobre, vidus=amantes). La capacidad de metabolizar metales es explícito en la especie *Cupriavidus metallidurans*; esta bacteria no solo es resistente a metales pesados (Monchy *et al.*, 2007), sino también capaz de precipitar reductivamente metales como Ag(I), Zn(II), Cd(II), Co(II), Pb(II), Hg(II), Ni(II) y Cr(VI). Además, *C. metallidurans* es conocida por precipitar oro mediante la reducción de AuCl₄ (Reith *et al.*, 2009). Se ha demostrado también la capacidad degradativa de compuestos aromáticos por parte de varias especies de *Cupriavidus*; entre ellas se destacan *C. necator* (Berezina, Yada, & Lefebvre, 2015) y *Cupriavidus pinatubonensis* (Pérez-Pantoja *et al.*, 2008), atribuyéndole a este género un gran potencial para el desarrollo de diversas biotecnologías.

Pasados más de diez años del trabajo de Makkar y Casida, en el año 2001, se registró para el género *Cupriavidus* una especie capaz de formar nódulos en las raíces de las leguminosas *Mimosa pudica* y *Mimosa pigra*. Fue nombrada inicialmente como *Ralstonia taiwanensis*, aislada de nódulos presentes en raíces de estas Mimosas en suelos de Taiwán (Chen *et al.*, 2001). Vandamme & Coenye (2004) reubicaron esta especie en el género *Cupriavidus*. Recientemente, da Silva y colaboradores describieron a *C. necator* como una especie nodulante tras recuperar varios aislamientos a partir de nódulos de *Phaseolus vulgaris* y demostrar su capacidad de reinfestar y fijar nitrógeno en asociación con varias especies de leguminosas (da Silva *et al.*, 2012).

Se ha comprobado que tanto *C. taiwanensis* como *C. necator* son capaces de colonizar varios géneros de leguminosas (da Silva *et al.*, 2012; Saad *et al.*, 2012; Taulé *et al.*, 2012), sin embargo, en la naturaleza, ambas especies han demostrado conservar una relación muy estrecha con leguminosas de la familia *Mimosoideae*, y en particular con el género *Mimosa* (Chen *et al.*, 2001; Platero *et al.*, 2016; Taulé *et al.*, 2012).

Las Mimosas se encuentran ampliamente distribuidas desde México hasta Argentina y Uruguay, alcanzando alrededor de 500 especies (Simon *et al.*, 2011). Mediante el análisis de muestras de raíces de Mimosas provenientes de distintas partes de América, se ha demostrado que los beta-rizobios son más comunes de lo que se creía. Incluso se han hallado más de un género de beta-rizobios coexistiendo en una misma raíz en distintas especies de Mimosas (Barrett & Parker, 2005). Estudios realizados en México, uno de los mayores centros de diversidad de Mimosas con más de 100 especies descritas, muestran que las Mimosas endémicas de esta zona del mundo están asociadas preferentemente a alfa-rizobios (*Rhizobium sp.* y *Ensifer*) (Bontemps *et al.*, 2016). Por otra parte, Brasil es posiblemente el país que reúne el mayor número de especies endémicas de Mimosas, contándose cerca de 200 especies (Simon, 2011). En un estudio exhaustivo llevado a cabo en las regiones del Cerrado y Cattinga de este país, se encontró que la gran mayoría de las Mimosas estaban noduladas por beta-rizobios del género *Burkholderia* (Bontemps *et al.*, 2010; Bueno dos Reis *et al.*, 2010). Por otro lado, estudios realizados en nuestro país han demostrado que si bien se observa la co-existencia de alfa y beta rizobios en las raíces de algunas Mimosas nativas (Ríos Mendaro, 2014; Lagurara, 2016) la mayoría de las especies de Mimosas analizadas están asociadas a bacterias del género *Cupriavidus* (Platero *et al.*, 2016). Estos hallazgos ofrecen suficiente evidencia de que los beta-rizobios tienen un rol clave en la ecología de suelos, siendo su importancia comparable con la de los alfa-rizobios, los cuales han sido mucho más estudiados hasta hoy día.

El Departamento de Bioquímica y Genómica Microbianas (BIOGEM) del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE), desarrolla entre sus principales líneas de investigación el estudio y caracterización de bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas a leguminosas nativas de Uruguay. Desde hace ya algunos años, los esfuerzos de caracterización de simbioses se han centrado en especies de Mimosas nativas. En concordancia con los trabajos antes mencionados, los resultados obtenidos en Uruguay también constatan que estas leguminosas son colonizadas por beta-rizobios, tanto por *Cupriavidus* como *Burkholderia* (Sandes, 2015; Platero *et al.*, 2016; Ríos, 2014). El potencial que estas bacterias presentan para promover el crecimiento vegetal no solamente se limita a las Mimosas sino que también se extiende a especies leñosas y de interés forestal como lo es *Parapiptadenia rigida* (regionalmente conocida como Angico), una

leguminosa perteneciente a la subfamilia *Mimosoideae* (Taulé *et al.*, 2012). En este sentido, las investigaciones realizadas permitieron identificar una cepa de *Cupriavidus* y otra de *Burkholderia* capaces de promover el crecimiento del Angico tanto a nivel de vivero como en campo (Taulé *et al.*, 2012; Zabaleta *et al.*, 2015). Estas investigaciones demuestran que el estudio de estos nuevos rizobios puede promover el desarrollo de nuevas tecnologías a favor de la producción agrícola y forestal, que mitiguen a la vez el impacto ambiental.

El modelo bacteriano seleccionado para este trabajo fue la cepa UYMMa02A, la cual fue aislada a partir de nódulos de una planta de *Mimosa magentea* colectada en la zona del Abra de Zabaleta del Departamento de Lavalleja. Mediante el análisis filogenético de los genes “housekeeping” 16S rRNA, *gyrB* y *recA*, se demostró que UYMMa02A no pertenece a ninguna de las especies de *Cupriavidus* nodulantes descritas hasta ahora, aunque podría estar emparentada con las especies *C. numazuensis* y *C. pinatubonensis* (Platero *et al.*, 2016). UYMMa02A es capaz de formar nódulos en las raíces de las Mimosas nativas *M. ramulosa* y *M. uragüensis*, así como en las cosmopolitas *M. pudica* y *M. polycarpa* (Sandes, 2015; Ríos, 2014).

La secuenciación del genoma de UYMMa02A comprobó la presencia de un grupo de genes con homología a los genes *nod* caracterizados en otros modelos de rizobios (Iriarte *et al.*, 2016). De acuerdo con estudios previos, *nodD* codifica para un regulador transcripcional capaz de unirse a flavonoides producidos por leguminosas hospederas. Esta unión conduce a su activación, lo cual lleva a que actúe como inductor de la expresión de los genes *nodB*, *nodC*, *nodI* y *nodJ* pertenecientes a un mismo operón. Los productos de estos genes están implicados en la síntesis de factores Nod o de nodulación, los cuales son reconocidos a su vez por la planta hospedera, y en muchos casos, fundamentales para el establecimiento de una simbiosis efectiva (Masson-Boivin *et al.*, 2009).

2 OBJETIVOS

Teniendo en cuenta los antecedentes planteados se estableció la siguiente **hipótesis**: El operón *nod* presente en el genoma de la cepa UYMMa02A de *Cupriavidus sp.* es fundamental para la expresión de los factores de nodulación y sin ellos UYMMa02A es incapaz de establecer una simbiosis efectiva con leguminosas hospederas del género *Mimosa*.

A manera de obtener resultados empíricos que demuestren esta hipótesis, se estableció como **objetivo principal** del presente trabajo, la puesta a punto de herramientas moleculares que permitan estudiar el rol del operón *nod* en el establecimiento de una simbiosis efectiva entre la cepa UYMMa02A de *Cupriavidus sp.* y leguminosas hospederas.

Los siguientes **objetivos específicos** guían la metodología hacia la puesta a punto de las herramientas moleculares a emplear:

1. Puesta a punto de un sistema de recombinación homologa para manipulación del genoma de UYMMa02A (Ej. Generación de mutantes limpias)
 1. a. Validar el uso de los sistemas de expresión XylS-*pm* en UYMMa02A
 1. b. Determinar la cinética y condiciones óptimas de inducción de estos sistemas
 1. c. Generar una cepa $\Delta nodD$ utilizando este sistema
2. Estudiar la función del operón *nod* en la interacción planta-bacteria
 2. a. Construir un vector que permita estudiar la dinámica de la expresión del operón *nod*
 2. b. Estudiar la dinámica *in vivo* de la inducción del promotor *pnodB* en leguminosas hospederas y no hospederas.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Cepas bacterianas

Las cepas bacterianas utilizadas en el presente trabajo y sus principales características se listan en la tabla 1.

Tabla 1. Cepas bacterianas utilizadas

Cepa/plásmido	Características	Usos	Referencia
<i>Cupriavidus sp.</i> UYMMa02A	Aislada de <i>Mimosa magentea</i> . Genoma secuenciado	Cepa de estudio	Iriarte <i>et al.</i> (2016); Platero <i>et al.</i> (2016)
<i>Escherichia coli</i> DH5α-λ-<i>pir</i>	Nal ^r , cepa para mantenimiento de plásmidos	Para transformaciones y conjugaciones tri-parentales. El gen <i>pir</i> permite la propagación de plásmidos con origen ori6K	Stock del laboratorio
<i>Escherichia coli</i> HB101	Cm ^r , Helper. Contiene plásmido pRK600 con los genes <i>tra</i>	Asiste la conjugación tri-parental	De Lorenzo & Timmis (1994)

3.2 Medios de cultivo

Las cepas de *E. coli* se cultivaron en medio Luria Broth (LB) (Ausubel *et al.*, 1992) a 37°C. Las cepas de *Cupriavidus sp.* fueron conservadas en Yeast Mannitol Agar (YMA) (Vincent, 1970) o M9-citrato (Ausubel *et al.*, 1992), pero se cultivaron en LB para experimentación. En los casos necesarios se utilizó el antibiótico Kanamicina (Km) en la concentración 50µg/ml. La composición de los medios se detalla en el anexo.

3.3 Uso de fuentes de carbono por UYMMa02A

Para conocer las fuentes de carbono usadas por la cepa de *Cupriavidus sp.* UYMMa02A se realizó un ensayo en el cual se cultivó la cepa en medio mínimo M9 en presencia de diferentes fuentes de carbono en las concentraciones recomendadas: maltosa, manitol, glucosa, fructosa, sacarosa y citrato de sodio. Los cultivos se incubaron por 72 horas a 30°C y se registró el crecimiento.

3.4 Selección de antibióticos

UYMMa02A fue crecida en presencia de diversos antibióticos a concentraciones determinadas (tabla 2) con el fin de verificar la ausencia de resistencia intrínseca a antibióticos y así mismo seleccionar los antibióticos adecuados para la posterior selección de cepas transformadas con los plásmidos utilizados en la metodología. Los antibióticos ensayados fueron Ampicilina (Amp), Cloranfenicol (Cf), Gentamicina (Gm), Kanamicina (km), Estreptomicina (Str) y Tetraciclina (Tc). Se tomaron 10 µl de cada uno y se colocaron en discos de papel sobre el cultivo de células. Cada cultivo se preparó con 15 ml de medio LB, sobre el cual se depositó una capa de 15ml de TOP-Agar (0,7% agar) mezclado con 150µl de un cultivo líquido de la cepa UYMMa02A crecido durante toda la noche.

Tabla 2. Antibióticos ensayados en UYMMa02A y sus concentraciones.

Antibióticos	(ng/µl)
Amp	50
Cf	25
Gm	40
Km	50
Str	100
Tc	10

3.5 Plásmidos

En la tabla 3 se listan los plásmidos utilizados y producidos en el presente trabajo.

Tabla 3. Plásmidos utilizados y generados

Plásmido	Características	Referencias
pSEVA 238	Km ^r , pBBR1, XylS- <i>Pm</i>	(Silva-Rocha <i>et al.</i> , 2013)
pSEVA 247Y	Km ^r , pRO1600/ColE1, <i>yfp</i>	(Silva-Rocha <i>et al.</i> , 2013)
pEMG	Km ^r , R6K, sitio de clonado múltiple, (MCS) flanqueado por sitios de corte I-SceI. Secuencia <i>αlacZ</i>	(Martínez-García & De Lorenzo, 2012)
pBAM-<i>gfp</i>	Km ^r , R6Ky, EGFP	(Martínez-García <i>et al.</i> , 2011)
pSW	Ap ^r , XylS- <i>Pm</i> , I-SceI	(Pósfai <i>et al.</i> , 1999)
pFO1	Derivado de pSEVA238. Contiene EGFP en el MCS	Este trabajo
pFO0115	Derivado de pSEVA247Y. Contiene la región promotora del gen <i>nodB</i> de UYMMa02A en el MCS	Este trabajo

En los siguientes apartados se describen las principales características de los plásmidos utilizados:

3.5.1 pBAM-*gfp*

El plásmido pBAM-*gfp* contiene el gen *gfp* que codifica para la variante EGFP de la Proteína Verde Fluorescente (GFP). Este gen se amplificó y posteriormente se clonó en el plásmido pSEVA 238. Las características estructurales del plásmido pBAM-*gfp* se esquematizan en la figura 8.

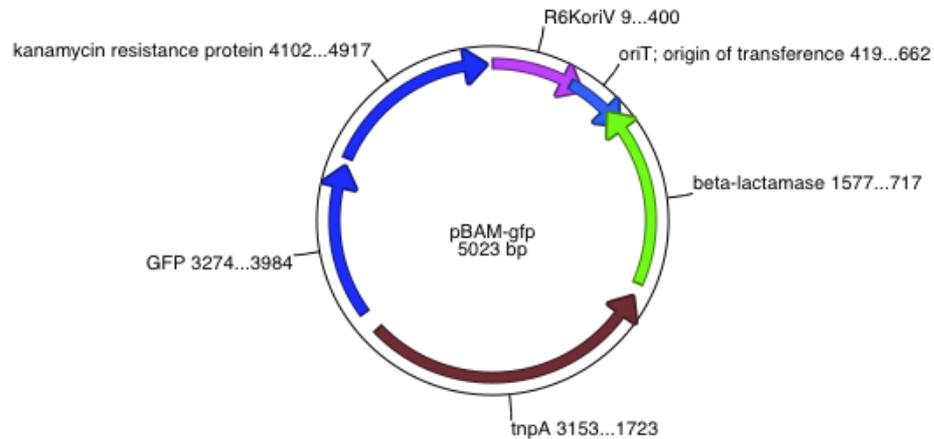


Figura 8. Esquema de la estructura del vector pBAM-gfp.

3.5.2 pSEVA 238

El plásmido pSEVA 238 (figura 9) presenta el sistema de expresión XylS-Pm. Se utilizó para construir el plásmido pF01 para estudiar la cinética de inducción por medio de la expresión del gen reportero *gfp* obtenido del plásmido pBAM-*gfp*.

3.5.3 pSEVA 247Y

El plásmido pSEVA 247Y (figura 9) contiene un sitio de clonado múltiple (MCS) delante del gen *yfp* que codifica para la Proteína Amarillo Fluorescente (YFP). La expresión de *yfp* está sujeta a la actividad promotora del ADN que se inserte en el MCS. En esta región se clonó el promotor *pnodB*, obteniéndose el plásmido pFO0115 con el cual se estudió la expresión de este gen en ensayos con extractos radiculares.

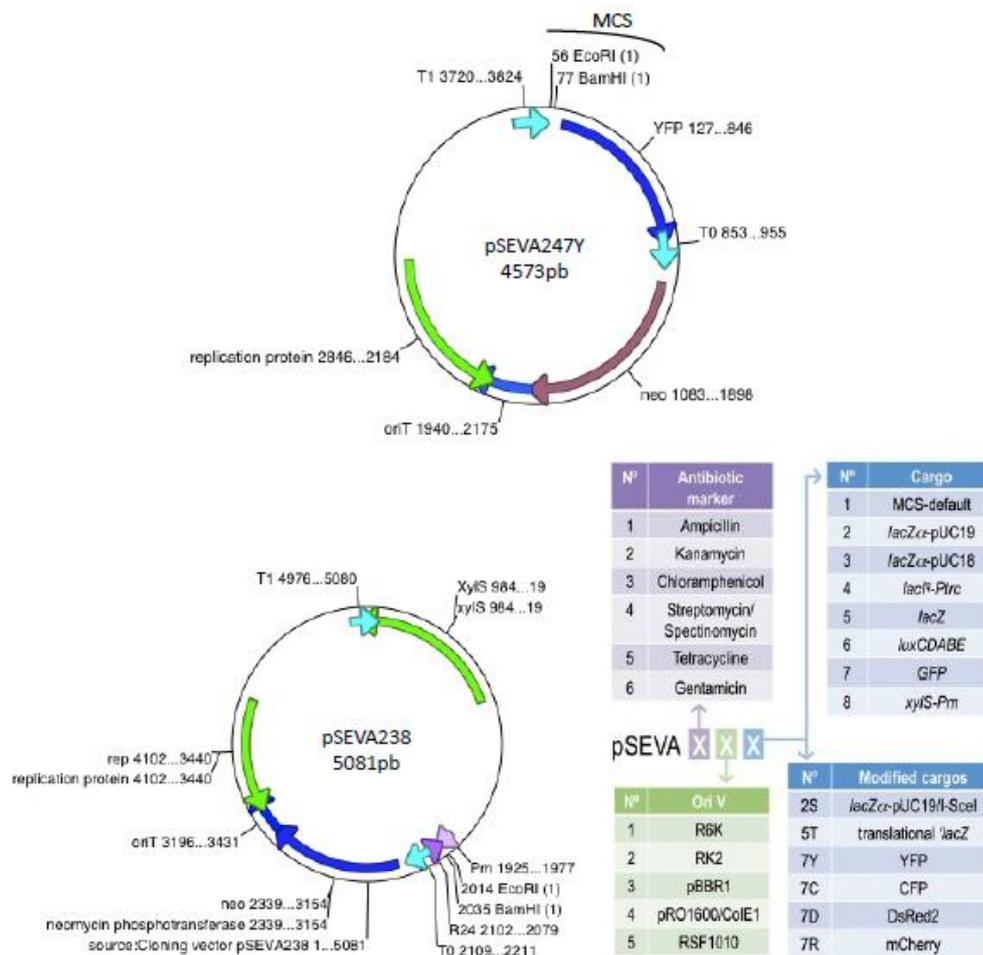


Figura 9. Estructura y nomenclatura de los plásmidos pSEVA. Cada plásmido de la colección SEVA presenta elementos genéticos particulares útiles para el desarrollo de diversas experimentaciones. La nomenclatura en números de cada vector hace referencia a estos elementos como se indica en las tablas. La disposición de cada elemento se representa en los esquemas de los plásmidos pSEVA 247Y y pSEVA 238. Tomado de Silva-Rocha *et al.* (2013).

3.5.4 pSW

Este plásmido expresa la endonucleasa I-SceI por inducción del promotor *pm* cuando su regulador XylS es activado por 3-metil benzoato (3MB). I-SceI genera un corte de doble hebra en los sitios de corte aportados por el vector pEMG, previamente integrado en el genoma de la cepa en estudio. El DSB promueve los mecanismos de recombinación homóloga entre secuencias específicas del genoma bacteriano también insertadas con anterioridad en el plásmido.

3.5.5 pEMG

Es usado para generar mutaciones dirigidas por delección. Posee el origen de replicación R6K, el cual le hace un vector suicida en bacterias que no presentan el gen λpir , por lo que una vez introducido en la cepa de estudio y bajo presión del antibiótico Km, se integra a su genoma aportando el material genético previamente clonado en su región MCS, el cual se encuentra flanqueado por sitios de corte para la endonucleasa I-SceI.

3.6 Análisis de secuencias y diseño de cebadores

El genoma de la cepa UYMMa02A fue analizado utilizando el servidor RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology) (Aziz *et al.*, 2008). Los genes de interés se identificaron en el servidor BLASTN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine) mediante búsqueda de homología. Con el fin de amplificar secuencias de ADN de interés se utilizó la técnica de PCR. Los cebadores necesarios se diseñaron utilizando los programas ApE (<http://biologylabs.utah.edu/jorgensen/wayned/ape/>) y Primer 3 (Untergrasser *et al.*, 2012; Koressaar & Reem, 2007). Con el fin de clonar los fragmentos de ADN amplificados se adicionaron sitios de corte adecuados en los extremos 5' de los cebadores. En la tabla 4 se describen los cebadores utilizados en este trabajo.

Tabla 4. Lista de cebadores utilizados en este trabajo. Las siglas F y R identifican a los cebadores forward y reverse respectivamente. En mayúsculas se indican los sitios de corte para las enzimas de restricción *EcoRI* (GGAATTC) y *BamHI* (GGATCC). A ambas se les agregó un par CG al inicio. En el cebador forward para GFP, las mayúsculas subrayadas son el sitio RBS (AGGAGG), al cual le sigue una cola poli-A y el ATG de inicio, que se lee en las primeras tres minúsculas cursivas. En el cebador TS1R2, la secuencia subrayada corresponde al reverso complementario del TS2F2, lo que permite que se amplifiquen los dos fragmentos (TS1 y TS2) juntos.

Fragmento	Cebadores	Secuencias de cebadores	Tamaño de amplicón (pb)	Origen
GFP	GFP-F-RBS-EcoRI	CGGAATTCAGGAGGAAAA- atggctagcagtaaaggagaagaacttttcac	742	pBAM- <i>gfp</i>
	GFP-R-BamHI	CGGGATCCtttgatagttcatccatgccatgtg		
<i>pnodB</i>	<i>pnodB</i> -F-EcoRI	CGGAATTCgattgCGgtgcgttatcag	320	UYMMa02A
	<i>pnodB</i> -R-BamHI	CGGGATCCagacaaacgcctcgatgttcc		
TS1	<i>nodD</i> -TS1F-KpnI	GGGGTACCgcattttgacagatcggaatgc	609	UYMMa02A
	<i>nodD</i> -TS1R2	<u>ctaggctccttcgctcaacagttgaggcatccacatgacg</u>		
TS2	<i>nodDcupria</i> -TS2F2	tgttgacgcgaaggagcctag	610	UYMMa02A
	<i>nodD</i> -TS2R-BamHI	CGGGATCCagataacgcagcagatctgtcc		
Plásmidos pSEVA	PS1 PS2	agggcgcggtttgtcc T1 terminador gcggcaaccgagcgttc T0 terminador	1000	pSEVA

3.7 Construcción de herramientas moleculares

En las figuras 10 y 11 se esquematiza la forma en que los vectores pEMG y pSW-I participan en el desarrollo metodológico.

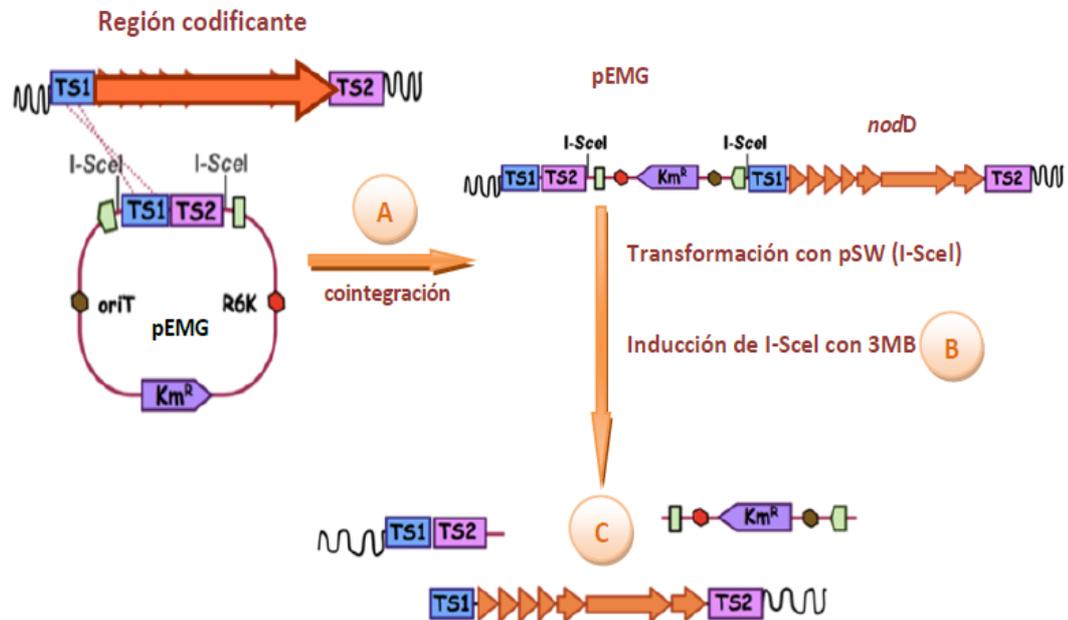


Figura 10. Esquema de obtención de la mutante UYMMa02A *nodDA* por recombinación homóloga. En una primera etapa se amplifican por PCR las secuencias adyacentes al gen *nodD* (TS1 y TS2). Estos amplicones se utilizan como molde para obtener, tras una segunda PCR, un único fragmento TS1-TS2. Este producto de PCR se inserta en el vector suicida pEMG generando el plásmidos pEMG Δ nodD. Los plásmidos pEMG Δ nodD y pSW se introducen en UYMMa02A por medio de conjugación triparental. pEMG Δ nodD se integra al genoma de la bacteria por recombinación (A). La endonucleasa I-SceI expresada por pSW en presencia del inductor 3-metilbenzoato (3MB) reconoce e introduce un corte de doble hebra en los sitios de corte para I-SceI aportados por pEMG Δ nodD (B). El corte de doble hebra induce los mecanismos de reparación de ADN de la cepa hospedera permitiendo la recombinación homóloga entre el fragmento TS1-TS2 presente en el vector plasmídico y las regiones genómicas adyacentes al gen *nodD*. La resolución puede derivar en la delección del gen *nodD* o la reversión a la versión salvaje (C). Adaptado de (Martínez-García & De Lorenzo, 2012)

El vector pEMG es usado para generar delecciones dirigidas como reemplazos alélicos en el genoma blanco. El procedimiento se basa en la recombinación homóloga forzada por la aparición de cortes en la doble hebra de ADN por acción in vivo de la nucleasa I-SceI. Esta endonucleasa sólo puede cortar en un sitio específico de 18pb aportado por pEMG al integrarse al genoma bacteriano, ya que este sitio de corte no existe en ninguno de los genomas bacterianos secuenciados hasta el momento (Martínez-García & De Lorenzo, 2012). El plásmido pEMG porta la resistencia a kanamicina pero tiene un origen de replicación (ori6K), que no es replicable en *Cupriavidus*. En un medio con kanamicina, solamente sobreviven las bacterias que integran el plásmido en su cromosoma, lo cual se facilita por las regiones de homología TS1 y TS2 del gen *nodD* (figura 10). En el plásmido pSW-I, la expresión de la endonucleasa I-SceI

está bajo el control del promotor *pm* inducible con 3-metil-benzoato (3MB) (figura 11). En definitiva, los pasos a seguir en este procedimiento para mutagénesis sitio-dirigida son: 1) clonación de regiones homólogas a las secuencias flanqueantes a la delección/reemplazo deseado en pEMG; 2) cointegrado del plásmido resultante (en este caso pEMG Δ nodD) en el genoma del hospedero elegido; 3) introducción de pSW en las células que contienen el cointegrado; 4) inducción de los DSB provocados por I-SceI; y 5) selección de los genomas deletados/reemplazados.

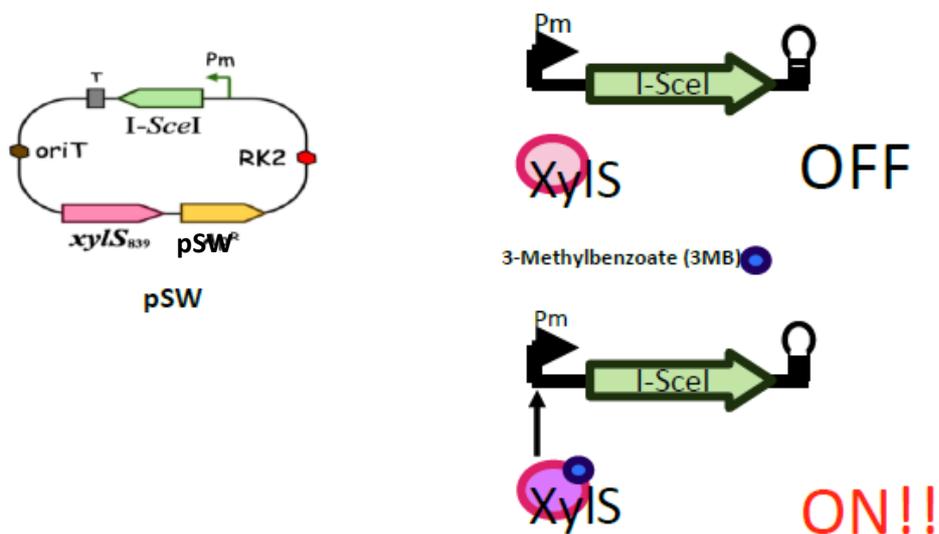


Figura 11. Estructura del plásmido pSW. Este plásmido posee valor metodológico por aportar la endonucleasa I-SceI, la cual es regulada por el promotor Pm. A la izquierda se presenta la estructura del plásmido con sus respectivos elementos genéticos. El esquema a la derecha representa el mecanismo de inducción por 3MB cuando éste activa la proteína reguladora XylS. Tomado de Wong & Mekalanos (2000).

Para poner a punto el uso de las de los plásmidos anteriores con el fin de generar mutantes por delección, fue necesaria la construcción previa de otra herramienta molecular con la finalidad de conocer las condiciones de expresión del sistema XylS-Pm. En esta etapa se usaron los plásmidos pSEVA 238 y pBAM-*gfp*. A continuación se detalla el procedimiento para la construcción de cada herramienta molecular.

PCR

Las amplificaciones por PCR se llevaron a cabo de acuerdo al protocolo recomendado por el fabricante de la ADN polimerasa utilizada DreamTaq (Thermo #EP0702). Cada reacción de 50µl se preparó con 1,25 U de polimerasa, 1µM de cada cebador, 0,2mM de cada dNTP, entre 0,1 y 1µg de ADN molde y 5µl de DreamTaq Buffer 10x con MgCl₂ incluido. Se usó H₂O c.s.p. para completar el volumen final.

Los programas de PCR empleados se comentan para cada construcción. Los productos de PCR fueron purificados usando kit de purificación PureLink Quick Gel Etraction Kit (Invitrogen #K210012) para ser luego usados en las construcciones.

Minipreparación

Todos los plásmidos fueron extraídos de células de *E. coli* DH5α usando el kit PureLink Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen #K210011, Germany) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Digestiones y ligaciones

Cada reacción de digestión y ligación se llevó a cabo conforme al protocolo recomendado por el fabricante de las enzimas; Fermentas en el caso de las digestiones y Thermo en las ligaciones. En las ligaciones, vector e inserto se utilizaron en una relación 1:2 y se preparó un control con la relación inversa o con agua en la cantidad correspondiente al inserto. Estas reacciones se mantuvieron a 25°C por una hora y 30 minutos.

Electroforesis

Los productos de PCR, digestiones, ligaciones y minipreps se sometieron a electroforesis a 85 volts por 50 minutos para ser verificados por tamaño de banda en gel de agarosa 0,8%, con tinción SyBR Safe

Dna Gel Stain, en buffer Tris-Acético-EDTA (TAE 1X). En todas las electroforesis se utilizaron 1,2 μ l (0,5 μ g) del marcador Gene Ruler 1Kb.

Obtención de células competentes y transformación

En el proceso de obtención de células competentes de *E. coli*, el crecimiento bacteriano se midió por espectrofotometría a 600nm, a intervalos de 30 minutos a una hora, hasta alcanzar una D.O. entre 0,2 y 0,3. El protocolo de preparación de células competentes se encuentra en el anexo adjunto. Luego de obtener las células competentes DH5 α λ pir, se transformaron con el producto de ligación correspondiente siguiendo el protocolo para transformación (ver anexo).

3.7.1 Construcción de pFO1

El plásmido nombrado como pFO1 se construyó a partir de la ligación del plásmido pSEVA 238 y el gen de la GFP. El gen *gfp* fue amplificado desde el plásmido pBAM-*gfp* utilizando los cebadores GFP-F-RBS-EcoRI y GFP-R-BamHI (tabla 4). Para identificar la temperatura óptima de amplificación, el volumen total de la reacción de PCR se dividió en 10 tubos para someter a un gradiente de Tm (temperatura de fusión o *melting*) desde 48 a 60°C. El fragmento obtenido fue purificado a partir del gel de electroforesis, digerido con las enzimas *EcoRI* y *BamHI*, y ligado al vector pSEVA 238, digerido también con las mismas enzimas. El producto de la ligación se utilizó para transformar células quimocompetentes de *E. coli* DH5 α . Las transformantes se seleccionaron en placas de petri con medio LB el cual poseía 3MB 15 mM y Km 50 μ g/ml.

Se seleccionaron colonias Km-resistentes y fluorescentes cuando fueron iluminadas con luz azul. La presencia del plásmido en las colonias fluorescentes fue corroborada mediante recuperación por miniprep y digestión. Se comprobó la identidad del fragmento clonado mediante la secuenciación de este fragmento usando el cebador universal de los pSEVA, el PS2.

3.7.1.1 Conjugación UYMMa02A-pFO1 y ensayo de fluorescencia

La cepa en estudio *Cupriavidus* sp. UYMMa02A recibió la construcción pFO1 por conjugación triparental (ver protocolo en anexo). La cuantificación de fluorescencia emitida por la expresión de GFP en las células transconjugantes se realizó mediante un ensayo de fluorimetría/fotometría. En este se compararon los valores entre las cepas UYMMa02A, UYMMa02A-SEVA238 y UYMMa02A-pFO1 en ausencia del inductor 3MB y a las concentraciones de 0,1; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 5; 10 y 15mM. Se utilizó para ello una placa de ELISA en la que cada muestra se ensayó por duplicado. También se dispuso un control únicamente con medio LB. El espectrofluorímetro (Varioskan, Thermo) fue programado para registrar los valores de fluorescencia y densidad óptica (D.O.) cada dos horas, por un total de 18 horas, manteniendo la temperatura a 30°C y realizando un programa de agitación de 20 segundos cada una hora. Para cuantificar el crecimiento bacteriano, se midió la D.O. de los cultivos empleando una longitud de onda de 620nm. La excitación de la GFP se logró iluminando con luz en el rango, de 480-520nm, considerando que el máximo de excitación de esta variante EGFP (S65T) es de 485-489nm (Miller & Lindow, 1997). La emisión fue registrada en el rango 509nm-530nm. Todas estas medidas se realizaron en el equipo Varioskan del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable. Los valores de fluorescencia fueron normalizados por el número de células.

Alternativamente, la fluorescencia de las colonias o cultivos debido a la presencia de proteínas fluorescentes fue observada y fotografiada bajo iluminación con luz azul a una longitud de onda de entre 450 y 500nm (max. 470nm), empleando transiluminador Safe Imager 2.0 (Invitrogen, USA).

3.7.2 Construcción de pEMG Δ nodD

El servidor RAST fue utilizado para identificar el operón *nod* en UYMMa02A. Se amplificaron por PCR regiones de aproximadamente 600pb adyacentes al gen *nodD*, nombradas como TS1 (corriente arriba) y TS2 (corriente abajo). Los cebadores usados fueron *nodD*-TS1F-KpnI y *nodD*-TS1R2 para amplificar TS1, y *nodD*cupria-TS2F2 y *nodD*-TS2R-

BamHI para amplificar TS2 (tabla 4). Los productos de PCR de TS1 y TS2 se purificaron y usaron como molde en una segunda reacción de PCR para obtener un único fragmento TS1-TS2. Los cebadores aquí usados fueron *nodD*-TS1F-KpnI y *nodD*-TS2R-BamHI (tabla 4).

3.7.3 Construcción de pFO0115

Con el fin de conocer las condiciones de inducción del promotor *pnodB*, se propuso construir y poner a punto la herramienta molecular pFO0115. Este vector tiene la finalidad de medir la expresión de *pnodB* por emisión de fluorescencia tras exposición a extractos radiculares. Fue amplificado por PCR en un gradiente de Tm de 58 a 60°C. Los cebadores usados fueron previamente diseñados tras analizarse la secuencia intergénica *nodD-nodB*, incluyendo secuencias de corte para las enzimas de restricción *EcoRI* en el cebador forward y *BamHI* en el reverse (ver tabla 4). Un control negativo sin ADN molde se ubicó en la posición de 58°C y el resto de la reacción completó el volumen final. El ADN molde se obtuvo picando colonias de UYMMa02A. El vector pSEVA 247Y se recuperó por kit de miniprep a partir de cultivos de *E.coli* en LB y kanamicina. El amplicón puro y el plásmido pSEVA 247Y fueron digeridos con las enzimas de restricción *EcoRI* y *BamHI* y posteriormente ligados. La construcción fue transferida mediante conjugación triparental a UYMMa02A (ver anexo). Las transconjugantes se seleccionaron en placas de petri con medio mínimo M9, con citrato de sodio como fuente de carbono y kanamicina.

3.7.3.1 Ensayo de inducción de *pnodB* con extractos radiculares

De acuerdo a protocolos puestos a punto previamente en nuestro laboratorio (Zabaleta *et al.*, 2015; Rios, 2015), 20 semillas de *Mimosas* con las cuales UYMMa02A es capaz de formar asociaciones simbióticas (*M. polycarpa*, *M. pudica*, y *M. uragüensis*) (Sandes, 2015), se incubaron en agua destilada estéril por 24 horas para obtenerse extractos radiculares. Luego de este tiempo, el sobrenadante acuoso conteniendo los exudados fue filtrado en condiciones asépticas utilizando filtros estériles de nitrocelulosa con un tamaño de poro de 0,45µm. Estos extractos fueron alicuotados y conservados a -20°C hasta su uso.

Las transconjugantes UYMMa02A-pFO0115 fueron cultivadas en placa, medio LB, incorporadas justo antes de alcanzar la temperatura de solidificación. En pocillos realizados en la superficie de las placas se agregaron 10µl de los distintos exudados obtenidos. Como control se incluyó un pocillo con agua. Las placas fueron observadas bajo luz azul periódicamente. La inducción del promotor *pnodB* se monitoreó por medio de la expresión de la Proteína Amarillo Fluorescente (YFP).

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Utilización de fuentes de carbono por UYMMa02A

Se observó el crecimiento de la cepa en estudio, UYMMa02A de *Cupriavidus sp.*, en presencia de diferentes fuentes de carbono. Como se muestra en la tabla 5, entre maltosa, manitol, glucosa, fructosa, sacarosa y citrato de sodio. La cepa creció en manitol y citrato de sodio, pero mayormente en éste último.

Tabla 5. Crecimiento de UYMMa02A en diferentes fuentes de carbono. Fue ensayado el crecimiento de UYMMa02A en diferentes fuentes de carbono. Se observó crecimiento en presencia de citrato de sodio y manitol (+), mientras que el crecimiento fue nulo para las demás fuentes de carbono; fructosa, glucosa, maltosa y sacarosa (-).

Fuente de carbono	Crecimiento
Citrato	+
Fructosa	-
Glucosa	-
Maltosa	-
Manitol	+
Sacarosa	-

4.2 Selección de antibióticos

UYMMa02A fue crecida en presencia de diferentes antibióticos con el fin de constatar cualquier resistencia intrínseca y poder seleccionar antibióticos adecuados para la posterior selección de cepas transformadas con plásmidos utilizados en la metodología. Los halos de inhibición observados alrededor de cada papel de filtro indicaron sensibilidad relativa de UYMMa02A a los antibióticos ensayados Tetraciclina (Tc), Kanamicina (Km), Cloranfenicol (Cf), Streptomina (Str), Ampicilina (Am) y Gentamicina (Gm) (figura 12).

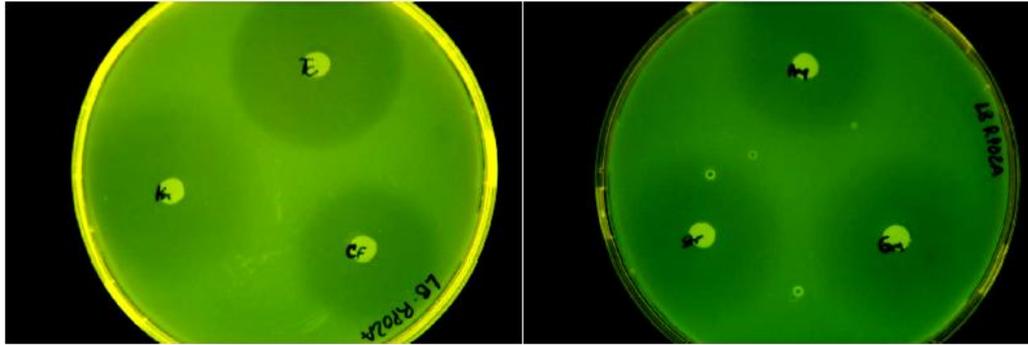


Figura 12. Ensayo de resistencia a antibióticos. La cepa UYMMa02A de *Cupriavidus sp.* fue crecida en presencia de diferentes antibióticos para estudiar su resistencia intrínseca. En la figura de la izquierda se muestra el ensayo con los antibióticos Tetraciclina (Tc), Kanamicina (Km) y Cloranfenicol (Cf). A la derecha, los antibióticos fueron Streptomina (Str), Ampicilina (Am) y Gentamicina (Gm). El medio empleado en ambos casos fue Luria Broth (LB)-Agar. Los halos oscuros alrededor de los discos de papel indican la ausencia de crecimiento de la cepa UYMMa02A debido a la exposición a los diferentes antibióticos.

A partir de los resultados de los ensayos anteriores se escogió al medio mínimo M9, con Citrato de Sodio como fuente de carbono y antibiótico Kanamicina, como medio selectivo para la selección de *Cupriavidus* transconjugantes frente a *E. coli*. La mayoría de las cepas de *E. coli* de laboratorio no son capaces de utilizar citrato de sodio como fuente de carbono, por lo que no pueden desarrollarse en este medio.

4.3 El vector pFO1 valida el sistema XylS-Pm en UYMMa02A

El gen que codifica para la endonucleasa I-SceI en el plásmido pSW, se encuentra bajo la regulación del promotor meta (Pm). Este promotor es inducido por la proteína reguladora XylS, que a su vez es activada por la presencia del inductor 3-metilbenzoato (3MB). De esta forma, cuando el 3MB se encuentra presente, se activa la expresión de los genes bajo el control de Pm (Marqués *et al.*, 1999). Para determinar la cantidad de 3MB necesaria para inducir al promotor Pm en la cepa UYMMa02A de *Cupriavidus sp.*, se construyó el plásmido pFO1 (pSEVA238-*gfp*). El gen que codifica para la proteína verde fluorescente (Green Fluorescent Protein, EGFP) se clonó en el sitio de clonado múltiple del plásmido pSEVA238 (Silva-Rocha *et al.*, 2013). De esta manera, la expresión de *gfp* quedó bajo la regulación del sistema XylS-Pm.

4.3.1 Obtención de una variante de la proteína verde fluorescente compatible con el formato pSEVA

El molde utilizado para obtener el gen de la *gfp* fue el vector pBAM-*gfp* (Martínez-García *et al.*, 2011). Esta versión de *gfp* codifica para la variante S65T (EGFP). Su secuencia ha sido editada para ser compatible con el formato SEVA. Esta versión del gen no cuenta con un sitio de unión a ribosomas (RBS) ni con el ATG de inicio necesarios para su expresión, ya que el vector pBAM-*gfp* fue diseñado para estudiar la expresión de promotores bacterianos que tengan su propio RBS y ATG (Martínez-García *et al.*, 2011). Por este motivo, se incluyó en la secuencia del cebador forward un RBS canónico y un sitio de inicio ATG. El resultado fue un cebador llamado GFP-F-EcoRI de 21pb extra en su extremo 5' (tabla 6).

Tabla 6. Resultado del diseño de cebadores utilizados en la amplificación de *gfp* por PCR. Las siglas F y R identifican a los cebadores forward y reverse respectivamente. En el cebador forward, las secuencias especificadas en letras mayúsculas cursivas corresponden al sitio de corte de la enzima de restricción *EcoRI* (GGAATC); las mayúsculas subrayadas son el sitio RBS (AGGAGG), y el ATG de inicio en minúscula cursiva. Para el cebador reverse, las cursivas en la secuencia corresponden al sitio de corte de la enzima de restricción *BamHI* (GGATCC).

Cebadores	Secuencia
GFP-F-EcoRI	<i>CGAATTCAGGAGG</i> AAAAA <i>atggctagcagtaaaggagaagaactttcac</i>
GFP-R-BamHI	<i>CGGATCC</i> tttgtatagttcatccatgccatgtg

Debido a la cantidad de bases extra presentes en el cebador GFP-F-EcoRI, se realizó una PCR con gradiente de T_m (temperatura de fusión o *melting*) de 48 a 60°C para ajustar la temperatura óptima de amplificación. Como puede observarse en la figura 13A, se obtuvo exitosamente un único amplicón del tamaño esperado (742pb) para todas las temperaturas ensayadas.

4.3.2 Inserción del gen *gfp* reconstruido en el plásmido pSEVA238

Los productos del gen de GFP por PCR en gradiente fueron purificados y reunidos en una única muestra, la cual fue utilizada en todo el procedimiento. El resultado de la purificación se muestra en la electroforesis de la figura 13B.

El plásmido pSEVA238 se recuperó por miniprep a partir de células de *E. coli* DH5 α en las cuales se encontraba conservado. El producto se visualizó por electroforesis (figura 13C).

El plásmido pSEVA 238 y el amplicón de GFP fueron digeridos con las enzimas de restricción *EcoRI* y *BamHI* de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Los fragmentos digeridos se visualizaron y cuantificaron en base a la intensidad relativa de las bandas respecto al marcador de peso molecular utilizado en la electroforesis (figura 13D).

Los productos de digestión fueron ligados, creándose así el plásmido pFO1 que se utilizó para transformar células de *E. coli* DH5 α quimiocompetentes. Las bacterias transformadas fueron seleccionadas en placas con medio sólido LB y Km. Las colonias Km-resistentes fueron repicadas en LB-Km y luego crecidas en medio líquido para corroborar la presencia de la construcción deseada; los plásmidos fueron recuperados por miniprep y digeridos con *EcoRI* y *BamHI* para liberar el inserto (figura 13E). Finalmente, para corroborar que se tratara de la construcción deseada, el vector pFO1 fue enviado a secuenciar (Macrogen, Corea) utilizando el cebador universal M13F (R24). En la figura 14 se esquematiza la obtención de pFO1 a partir de pSEVA 238 y pBAM-*gfp*.

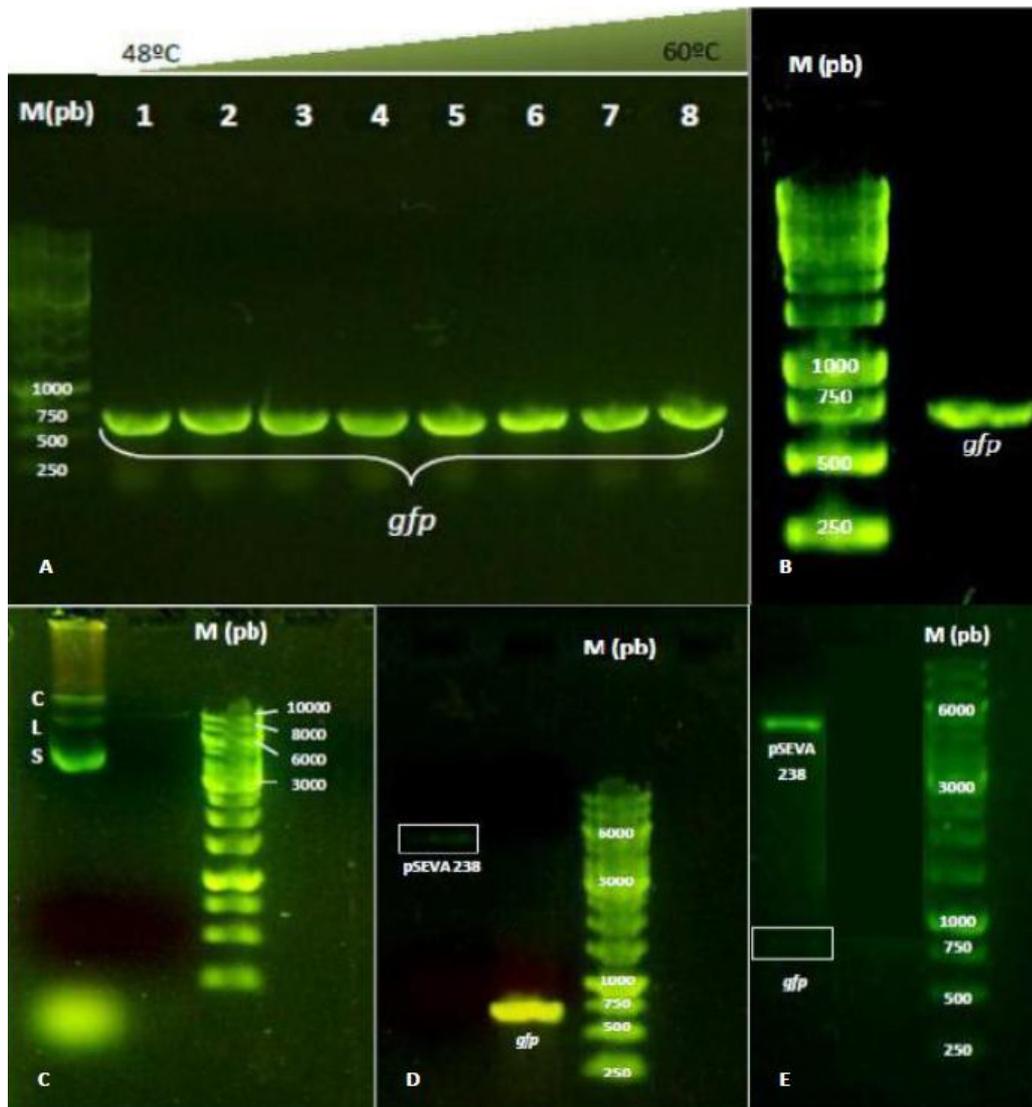


Figura 13. Construcción de pFO1. Electroforesis en gel de agarosa 0,8%. Marcador Gene Ruler 1Kb DNA Ladder, Fermentas (carril M). **A: Amplificación del gen *gfp* por PCR en gradiente de T_m .** Las bandas de los carriles 1 al 8 corresponden al amplicón de 742pb esperado para el gen *gfp*. **B: Producto de PCR del gen *gfp* purificado.** **C: Miniprep del plásmido pSEVA238.** Se visualiza el plásmido pSEVA 238 en sus tres formas: circular (C), lineal (L), y superenrollado (S). **D: Digestiones de pSEVA238 y *gfp* con *EcoRI* y *BamHI*.** La banda de 5081pb corresponde al plásmido pSEVA 238 y la de 742pb a *gfp*. **E: Recuperación del plásmido pFO1 por miniprep de células de *E.coli* transformantes y digestión con enzimas de restricción *EcoRI* y *BamHI*.** El plásmido pSEVA238 corresponde a 5081pb y el inserto *gfp* a 742pb.

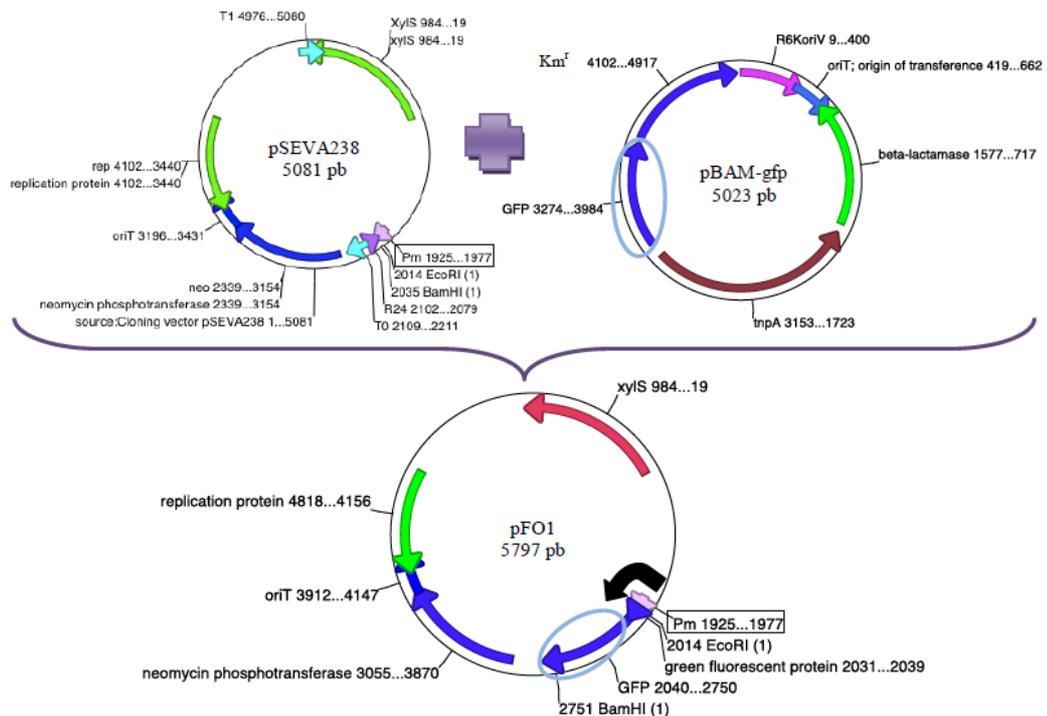


Figura 14. Esquema de obtención del plásmido pFO1 a partir de los plásmidos pBAM-gfp y pSEVA238. En el plásmido pBAM-gfp se identifica la GFP con un óvalo celeste. El plásmido pSEVA238 contiene el promotor Pm, señalado con un recuadro en negro; y a XylIS, correspondiente a la flecha verde superior entre las 19 y 984pb. En el plásmido pFO1, la GFP se identifica con un óvalo celeste entre los sitios de corte de las enzimas de restricción *EcoRI* y *BamHI*, downstream del promotor Pm, en un recuadro en negro. XylIS corresponde a la flecha rosada entre las 984 y 19pb. La flecha negra indica el sentido de la expresión.

4.3.3 Funcionalidad de pFO1

Para corroborar la funcionalidad del vector pFO1, las bacterias transformantes fueron repicadas en placas de LB-Km en presencia del inductor 3MB en la concentración recomendada para *Pseudomonas* (Martínez-García & de Lorenzo, 2011). Al exponer los cultivos a radiación UV las células de *E. coli* se vieron en un tono verde fluorescente característico de la expresión de GFP.

Una vez comprobada la funcionalidad de pFO1 en *E. coli*, el vector fue transferido mediante conjugación triparental (ver protocolo en anexo) a la cepa de estudio UYMMa02A. Las transconjugantes UYMMa02A-pFO1 fueron seleccionadas en placas de petri con medio mínimo M9, citrato de sodio como fuente de carbono, kanamicina y el inductor 3MB. Las

colonias Km-resistentes capaces de crecer en este medio y que emitieron fluorescencia cuando fueron estimuladas con luz azul, fueron repicadas y conservadas para futuros ensayos.

El efecto del inductor 3MB sobre el sistema XyIS-Pm en UYMMa02A, se cuantificó por medio de un ensayo de fluorimetría/fotometría (figura 15). Simultáneamente se evaluaron el crecimiento bacteriano (mediante la determinación de la densidad óptica del cultivo a 620nm) y el nivel de inducción del promotor Pm (mediante la cuantificación de la fluorescencia emitida por la GFP) en respuesta a concentraciones crecientes del inductor. Al finalizar el ensayo, la placa de ELISA sembrada se expuso y se fotografió bajo luz azul, donde se pudo observar que las siembras correspondientes a UYMMa02A-pFO1 efectivamente emitían fluorescencia en color verde para todas las concentraciones del inductor utilizadas (figura 16).

	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
A	0	0	0	0	0.1	0.1	0.1	0.1	0.5	0.5	0.5	0.5
B	0	0	0	0	0.1	0.1	0.1	0.1	0.5	0.5	0.5	0.5
C	1	1	1	1	1.5	1.5	1.5	1.5	2	2	2	2
D	1	1	1	1	1.5	1.5	1.5	1.5	2	2	2	2
E	2.5	2.5	2.5	2.5	3	3	3	3	3.5	3.5	3.5	3.5
F	2.5	2.5	2.5	2.5	3	3	3	3	3.5	3.5	3.5	3.5
G	5	5	5	5	10	10	10	10	15	15	15	15
H	5	5	5	5	10	10	10	10	15	15	15	15

Figura 15. Esquema de ensayo de fluorimetría/fotometría. La tabla representa una placa de ELISA. Los colores corresponden a las concentraciones en mM del inductor 3MB. Cada ensayo fue realizado por duplicado. Columnas 1: medio LB sin inóculo; 2: UYMMa02A; 3: UYMMa02A-SEVA238; 4: UYMMa02A-pFO1.

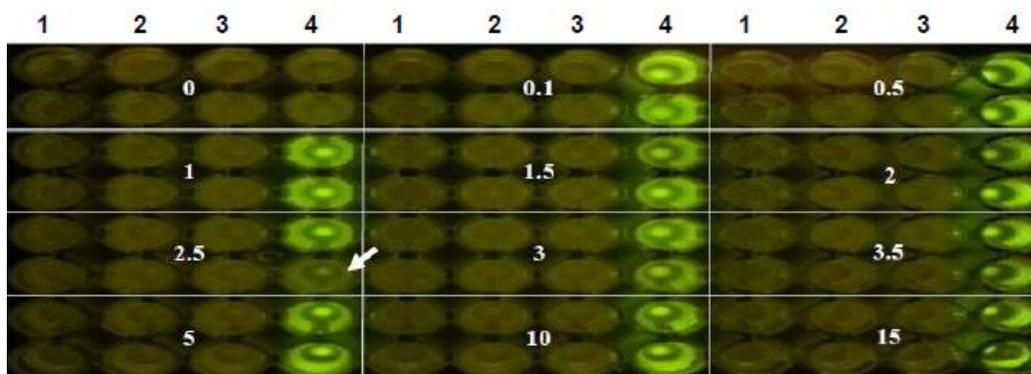


Figura 16. Fluorescencia emitida por las transconjugantes UYMMa02A-pFO1 fotografiadas bajo iluminación de luz azul. Los cuadrantes en la placa de ELISA

refieren a cada una de las concentraciones de 3MB ensayadas (0 a 15mM) por duplicado. Los cultivos de UYMMa02A-pFO1 corresponden a los pocillos que presentan emisión de fluorescencia. La ausencia de fluorescencia en el pocillo señalado por la flecha se debe seguramente a un error en el procedimiento metodológico. Se utilizó transiluminador de luz azul Safelmager™ 2.0 para excitar la fluorescencia de la GFP. Columnas 1: medio LB sin inóculo; 2: UYMMa02A; 3: UYMMa02A-SEVA238; 4: UYMMa02A-pFO1.

El ensayo de fluorescencia en placa de ELISA demostró que el sistema XylS-Pm en UYMMa02A es activado a concentraciones del inductor 3MB de entre 0.1 y 15mM, lo cual se demuestra por la fluorescencia emitida por UYMMa02A-pFO1. La ausencia de fluorescencia en los pocillos de medio LB, UYMMa02A y UYMMa02A-SEVA238 comprueba que no existe fluorescencia intrínseca propia del medio o de las cepas. Por otro lado, el hecho de que UYMMa02A-pFO1 no haya emitido fluorescencia en ausencia del inductor es evidencia de que el sistema XylS-Pm no genera expresión basal. Este resultado asegura que la construcción UYMMa02A-pFO1 es funcional únicamente bajo condiciones controladas por inducción con 3MB, lo que demuestra que el sistema XylS-Pm puede ser usado en la cepa de estudio para la expresión de la endonucleasa I-SceI, sin temor de que la enzima se exprese en momentos no deseados.

A continuación se muestran los valores de DO_{620} obtenidos durante el ensayo (tabla 7). A partir de estos valores, en la siguiente gráfica (figura 17) se exhibe la relación entre el crecimiento de UYMMa02A-pFO1 y las diferentes concentraciones del inductor 3MB ensayadas.

Tabla 7. Valores de DO₆₂₀ de UYMMa02A-pFO1. La primera columna indica el tiempo en que fueron tomadas las medidas de DO₆₂₀ en un total de 18 horas de ensayo, para cada concentración de 3MB, expuestas en la primera fila.

Hrs/[3MB](mM)	0	0.1	0.5	1	1.5	2
2	0,274195	0,2570705	0,22055	0,162599	0,16588	0,155537
4	0,4268535	0,414369	0,356669	0,2735305	0,2537195	0,235275
6	0,44831	0,4418685	0,405479	0,3300305	0,276186	0,2799955
8	0,6460645	0,651961	0,586082	0,481421	0,434304	0,4045805
10	0,7327675	0,7367745	0,667716	0,563626	0,5122435	0,4715505
12	0,798486	0,8046835	0,7349735	0,6257625	0,5780855	0,537948
14	0,8629735	0,8674215	0,7891155	0,684069	0,637908	0,59375
16	0,9113325	0,9136475	0,833886	0,734006	0,6870225	0,643746
18	0,915874	0,9128055	0,833462	0,7334815	0,6853895	0,6408735

Hrs/[3MB](mM)	2.5	3	3.5	5	10	15
2	0,1103485	0,0976032	0,112213	0,0747557	0,069155	0,07153195
4	0,1889985	0,158217	0,17431	0,1241407	0,10847005	0,1074602
6	0,245275	0,210775	0,213353	0,149276	0,135684	0,132434
8	0,3452955	0,2866905	0,3167265	0,2370605	0,200708	0,1950215
10	0,410366	0,3452635	0,3762415	0,2887335	0,241769	0,2305295
12	0,4763885	0,4027115	0,451104	0,35101	0,2865955	0,274164
14	0,531646	0,460321	0,504725	0,403439	0,3185905	0,3013585
16	0,58224	0,514988	0,563519	0,450779	0,3537665	0,3347925
18	0,5826405	0,514779	0,56281	0,454374	0,3542745	0,3339115

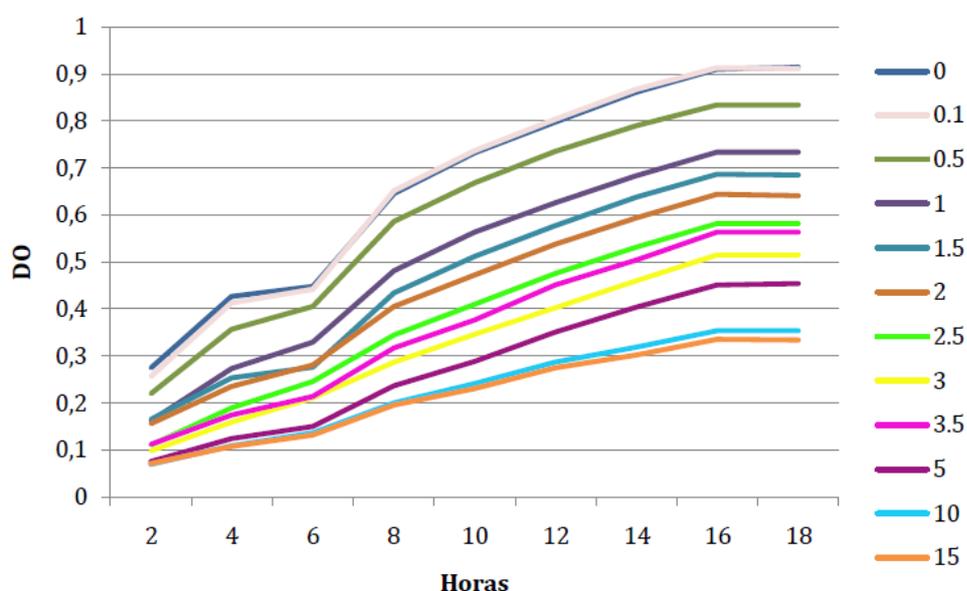


Figura 17. Fotometría del crecimiento de UYMMa02A-pFO1. Las líneas en color representan el crecimiento de UYMMa02A-pFO1 según los valores de DO₆₂₀ alcanzados respecto a las diferentes concentraciones en mM del 3MB, tras 18 horas de ensayo.

Como puede verse en la figura 17, a medida que la concentración de 3MB aumenta, el crecimiento celular disminuye. A las 18 horas del ensayo, en ausencia de 3MB y a la concentración de 0,1mM el cultivo celular alcanza una DO_{620} de 0,9, mientras que a 15mM apenas alcanza una DO_{620} de 0,3. Este resultado sugiere que el 3MB podría resultar tóxico para *Cupriavidus* si se utiliza a la concentración de 15mM recomendada originalmente para *Pseudomonas* (Martínez-García & de Lorenzo, 2011). Este efecto inhibitorio puede apreciarse mejor en la siguiente gráfica (figura 18), en la que se muestra el crecimiento celular relativo alcanzado para cada concentración de 3MB a las 18 horas finales del ensayo.

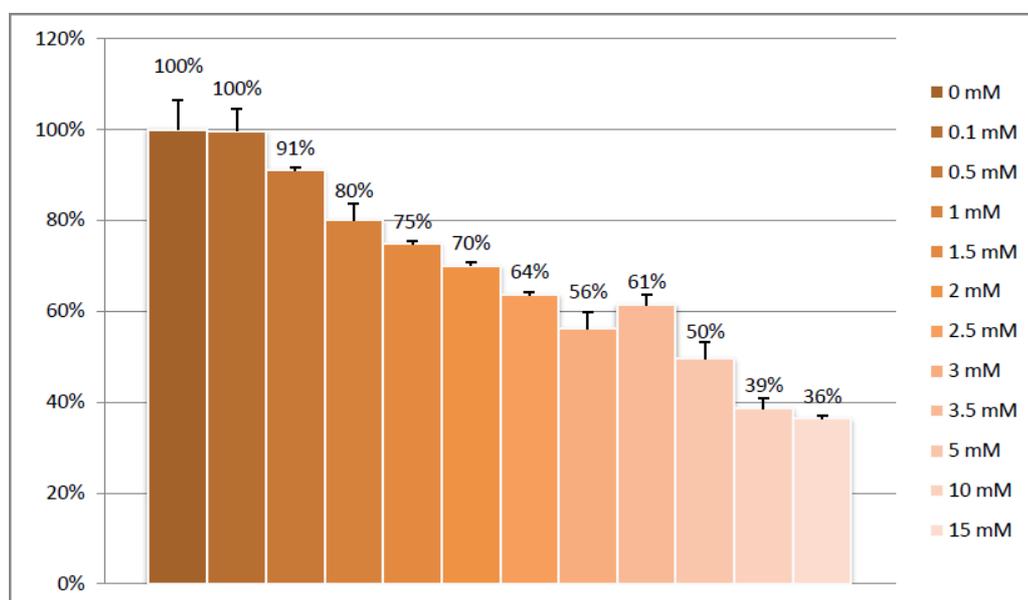


Figura 18. Porcentaje de crecimiento celular relativo a la concentración de 3MB. Cada barra representa el porcentaje de crecimiento de la cepa UYMMa02A-pFO1 expuesta a las diferentes concentraciones del inductor 3MB, a las 18h.

En la gráfica de barras de la figura 18 se observa que el crecimiento máximo (100%) corresponde a los cultivos de UYMMa02A-pFO1 en ausencia de 3MB y a la concentración de 0,1mM. Los cultivos expuestos a mayores concentraciones mostraron menor crecimiento. Los valores correspondientes a la gráfica y el desvío estándar de cada muestra se especifican en la siguiente tabla. Las medidas de DO_{620} tomadas por duplicado (valor positivo y valor negativo) se utilizaron para hallar el desvío estándar de cada muestra. El porcentaje máximo de crecimiento se halló a partir de la D.O. media obtenida para la cepa en ausencia de 3MB (ver tabla 8).

Tabla 8. Valores referentes al crecimiento de UYMMa02A a las 18 horas finales del ensayo de fluorimetría/fotometría. Para cada concentración de 3MB ensayada se registraron los valores de DO₆₂₀ por duplicado (valor negativo y valor positivo), la DO media y el desvío estándar. Se muestran los porcentajes de crecimiento relativo hallados, correspondiendo el máximo (100%) a la DO media en ausencia de 3MB.

[3MB] (mM)	0		0,1	
DO (valor positivo)	0,956193	104%	0,946792	103%
DO (valor negativo)	0,875555	95%	0,878819	96%
DO (media)	0,915874	100%	0,9128055	100%
Desvío estándar	0,06363961		0,049497475	
[3MB] (mM)	0,5		1	
DO (valor positivo)	0,827058	90%	0,711588	77%
DO (valor negativo)	0,839866	91%	0,755375	82%
DO (media)	0,833462	91%	0,7334815	80%
Desvío estándar	0,007071068		0,035355339	
[3MB] (mM)	1,5		2	
DO (valor positivo)	0,687902	75%	0,645637	70%
DO (valor negativo)	0,682877	74%	0,63611	69%
DO (media)	0,6853895	75%	0,6408735	70%
Desvío estándar	0,007071068		0,007071068	
[3MB] (mM)	2,5		3	
DO (valor positivo)	0,584033	64%	0,494649	53%
DO (valor negativo)	0,581248	63%	0,534909	58%
DO (media)	0,5826405	64%	0,514779	56%
Desvío estándar	0,007071068		0,035355339	
[3MB] (mM)	3,5		5	
DO (valor positivo)	0,550329	59%	0,475331	52%
DO (valor negativo)	0,575291	62%	0,433417	47%
DO (media)	0,56281	61%	0,454374	50%
Desvío estándar	0,021213203		0,035355339	
[3MB] (mM)	10		15	
DO (valor positivo)	0,368792	40%	0,336142	36%
DO (valor negativo)	0,339757	37%	0,331681	35%
DO (media)	0,3542745	39%	0,3339115	36%
Desvío estándar	0,021213203		0,007071068	

La construcción de pFO1 se empleó con éxito tanto en *E. coli* como en UYMMa02A. Se demostró que el sistema XylS-Pm funciona en *Cupriavidus*, es inducible por 3MB y no se expresa en forma basal. Estos resultados garantizan que pFO1 sea una herramienta funcional únicamente en condiciones controladas.

Si bien la expresión de GFP fue exitosa para todas las concentraciones de 3MB ensayadas, las altas concentraciones del inductor demostraron ser inhibitorias del crecimiento de UYMMa02A. Debido a esto, se resolvió utilizar las concentraciones de 3MB para las cuales el crecimiento fue mayor al 70%.

4.4 Construcción de la herramienta molecular pEMG Δ nodD

Si bien los plazos pautados para este trabajo fueron excedidos, por lo cual la creación del vector pEMG Δ nodD y su uso para generar la mutante deseada debieron suspenderse, los siguientes resultados obtenidos descritos a continuación garantizan que esta parte del trabajo puede ser concretada en el futuro.

4.4.1 Identificación del operón *nod* en el genoma de UYMMa02A

Como primer paso se identificó el operón *nod* en el genoma de UYMMa02A. Esto se hizo en el servidor RAST. En la figura 19A, se muestra la organización génica del operón *nod* en UYMMa02A, donde los genes *nod* se encuentran de forma contigua, siendo *nodD* codificado en un sentido y los genes *nodB*, C, I, J, H, A, S, etc., en el sentido opuesto. Este arreglo génico es idéntico al observado en *C. taiwanensis* (Amadou *et al.*, 2008), lo que sugiere que el factor Nod producido por ambas cepas es el mismo (figura 19C).

La secuencia de la figura 19B corresponde a la región intergénica entre *nodD* y *nodB*, donde se observa una posible caja *nod* (*nod*-Box) en color fucsia, que correspondería al sitio de unión del regulador NodD.

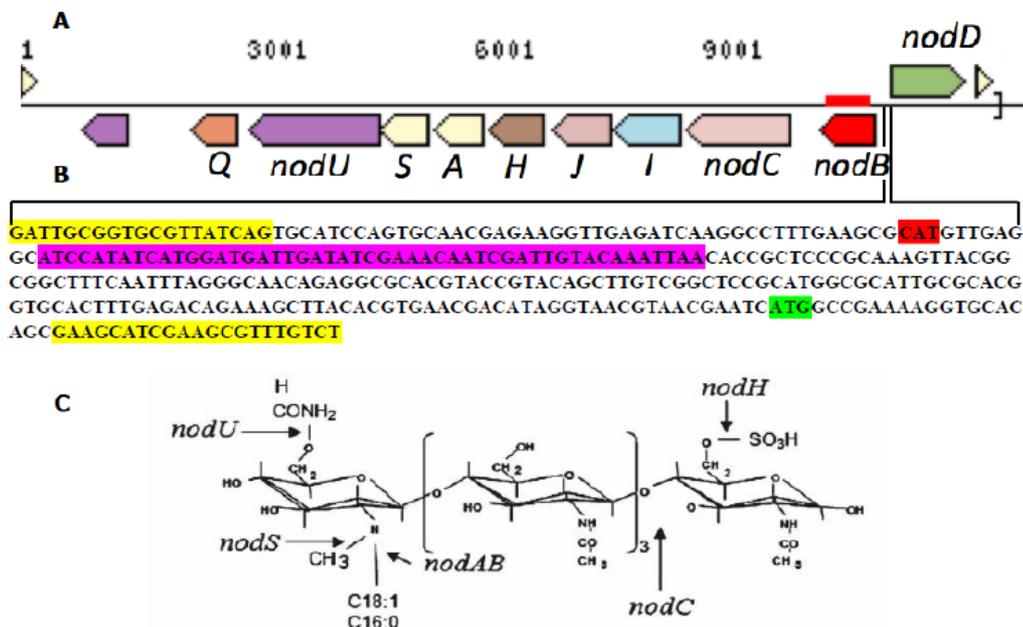


Figura 19. Operón *nod* de *Cupriavidus sp.* UYMMa02A. A: Organización génica del operón *nod* en el genoma de UYMMa02A. B: Región intergénica entre los genes *nodD* y *nodB*. En amarillo se resaltan las secuencias utilizadas para diseñar los cebadores para amplificar *pnodB*. En rojo, el codón de inicio del gen *nodB*. En fucsia, la posible caja *nod* (*nod-Box*). En verde, el codón de inicio del gen *nodD*. C: Esquema de la molécula de un factor *Nod* producido por *Cupriavidus*. Las flechas señalan los sitios de acción de las enzimas codificadas por el operón *nod*. Tomado de Amadou *et al.*, 2008.

4.4.2 Avances en la construcción del vector pEMGΔ*nodD*

Si bien los plazos pautados para este trabajo fueron excedidos, por lo cual la creación del vector pEMGΔ*nodD* y su uso para generar la mutante deseada debieron suspenderse, los siguientes resultados obtenidos descritos a continuación permiten proyectar esta parte del trabajo en el futuro.

El primer paso consistió en amplificar por PCR fragmentos correspondientes a las regiones inmediatamente adyacentes corriente arriba y corriente abajo de *nodD*, TS1 y TS2 (por las siglas en inglés de *targeting sequences*), respectivamente. En una tercera PCR, se utilizaron los productos anteriores para obtener un único fragmento de ADN llamado TS1-TS2. Esto se consiguió por el uso de cebadores complementarios (ver tabla 4 en Mat. y Mét.). El siguiente paso no realizado consiste en clonar TS1-TS2 en el vector pEMG, obteniéndose pEMGΔ*nodD*.

4.4.2.1 Obtención de las secuencias adyacentes al regulador *nodD*: TS1-*nodD* y TS2-*nodD*

Para la amplificación de TS1 y TS2 se usó como molde el ADN genómico de UYMMa02A y los cebadores que se especifican en la tabla 4 en Mat. y Mét. Los amplicones TS1 (610pb) y TS2 (609pb) se obtuvieron con éxito como lo demuestran las dos bandas que aparecen de forma definida en la figura 20A. Si bien la marcada diferencia en la migración de las bandas indicaría una diferencia mayor a 1pb entre ambos amplicones, se estima que TS2 presentó mayor concentración de ADN, lo cual retrasó la migración. En la corrida electroforética del pocillo de TS2 puede verse al final una banda no esperada que puede corresponder a un exceso de cebadores que no hibridaron.

4.4.2.2 Obtención de la secuencia TS1-TS2-*nodD* a clonar en pEMG

Una vez obtenidos los productos de PCR de TS1 y TS2 se purificaron y utilizaron como molde en una segunda PCR a fin de obtener el amplicón TS1-TS2. Esto se facilitó debido a que los cebadores *nodD*-TS1F-KpnI y *nodD*-TS1R2 se diseñaron con regiones que hibridan perfectamente (ver tabla 4 en Mat. y Mét). El producto se observa en la figura 20B. Además del fragmento de 1200pb esperado para TS1-TS2, se obtuvieron productos no buscados o inespecíficos. Por su peso molecular, la penúltima banda podría corresponder a TS2, posiblemente resultado del arrastre de cebadores de la primera PCR. La banda observada al frente de la corrida electroforética podría corresponder a cebadores libres. Esto ocurre de igual manera en la electroforesis anterior, en la cual aparece una banda adicional al final de la corrida del pocillo para TS2. Se intentó mejorar las condiciones para obtener una única banda de amplificación, pero al no lograrse, se optó por recuperar el amplicón TS1-TS2 a partir de la banda correspondiente, la cual fue recortada y purificada a partir del gel de electroforesis.

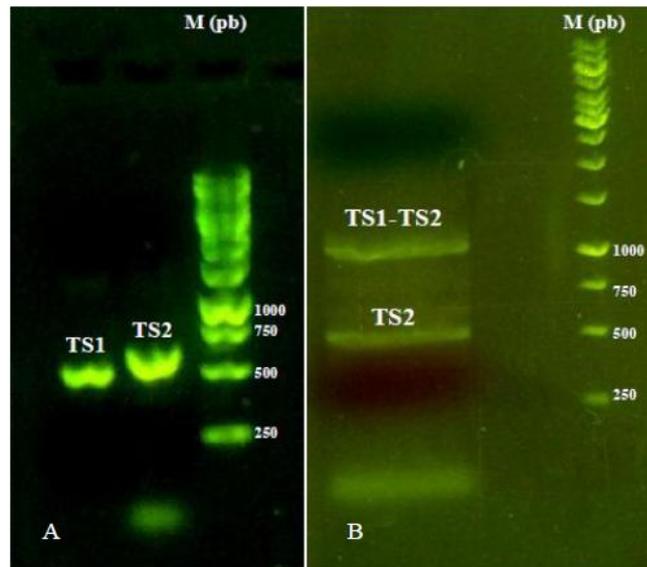


Figura 20. Construcción del plásmido pEMGΔ*nodD*. Electroforesis en gel de agarosa 0,8%. Marcador Gene Ruler 1Kb DNA Ladder, Fermentas (carril M). **A: Amplificación por PCR de TS1 y TS2.** Las bandas de TS1 y TS2 corresponden a 610 y 609pb respectivamente. La marcada diferencia en la migración de las bandas pudo deberse a una diferencia en la concentración de ADN. La banda al frente de la corrida electroforética en el pocillo de TS2 puede atribuirse a un exceso de cebadores. **B: Producto de PCR puro de TS1-TS2.** La banda de TS1-TS2 corresponde a aproximadamente 1100pb. Las bandas adicionales son probablemente producto de amplificación de residuos de cebadores de la PCR anterior. La banda media coincide en su peso molecular con TS2. La banda al frente de la corrida electroforética puede corresponder a un exceso de cebadores.

4.5 Estudio de la inducción del promotor *nodB*

Una fusión entre el promotor del gen *nodB* y el gen reportero *lacZ*, ha demostrado que en *C. taiwanensis*, *nodB* se expresa tanto en la rizósfera como en nódulos de plantas hospederas, en presencia de flavonoides tales como Luteolina y Apigenina (Marchetti *et al.*, 2010; Saad *et al.*, 2012). Sin embargo, no se conocen cuáles son las condiciones en las que se expresa este operón en UYMMa02A. Para ello, se construyó una herramienta que permitiría conocer las condiciones necesarias para la inducción del promotor *nodB* mediante ensayos con exudados radiculares. A continuación se exponen los resultados obtenidos en el procedimiento.

4.5.1 El promotor *pnodB* es identificado en la región intergénica *nodD-nodB*

En el esquema del operón *nod* de UYMMa02A mostrado en la figura 21, puede observarse que el gen *nodB* es el primero de los implicados en la síntesis y exportación de los factores de nodulación. En la región intergénica entre este gen y *nodD*, se pudo identificar una caja *nod*, la cual podría ser reconocida por el regulador NodD para modular la expresión del operón. Se utilizó el programa Ape para alinear esta secuencia con la correspondiente en el genoma de *C. taiwanensis* LMG19424 (Amadou *et al.*, 2008) (figura 22). La secuencia superior pertenece a UYMMa02A y la inferior a *C. taiwanensis* LMG19424.

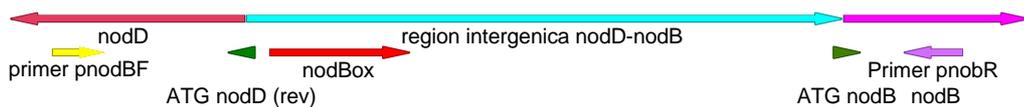


Figura 21. Esquema de la región intergénica *nodD-nodB* en UYMMa02A. Mediante la herramienta informática BLASTN se identificó una posible caja *nod* o *nodBox* (flecha en rojo) en la región intergénica *nodD-nodB* del genoma de UYMMa02A. La localización de los cebadores *pnodBF* y *pnodBR* utilizados se marcan en amarillo y fucsia, respectivamente. Las flechas verdes indican los sitios de inicio (ATG) de los genes *nodB* y *nodD*.

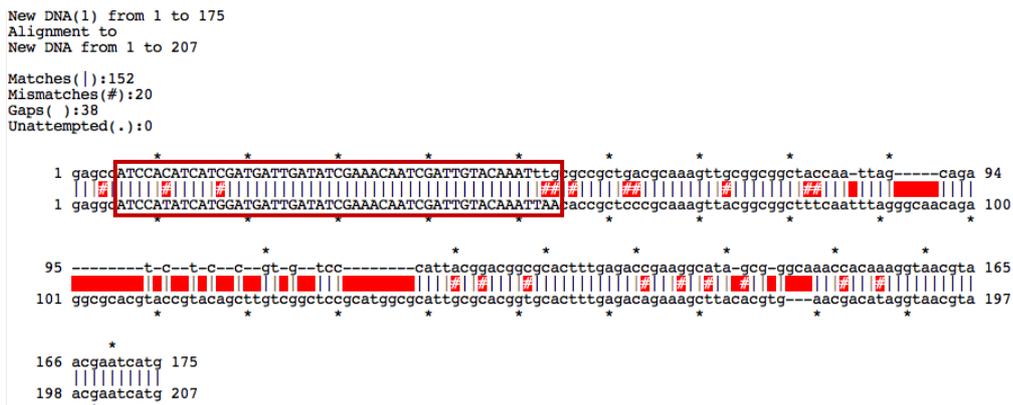


Figura 22. Análisis comparativo de las regiones intergénicas *nodB-nodD* en UYMMa02A y *Cupriavidus taiwanensis* LMG19424. La secuencia superior corresponde a *Cupriavidus taiwanensis* LMG19424, y la inferior a la cepa en estudio UYMMa02A de *Cupriavidus* sp. La secuencia en mayúsculas y enmarcada en rojo corresponde a *nodBox*. Las regiones marcadas con # corresponden a bases no compartidas, mientras que las coincidencias se marcan con |. Los bloques rojos indican bases presentes en una sola de las secuencias.

Si bien existen algunas diferencias genómicas entre UYMMa02A y *C. taiwanensis*, como por ejemplo que la región intergénica *nodB-nodD* en UYMMa02A es 32pb más larga, el análisis genómico comparativo reveló la presencia de una caja *nod*, secuencia que aparece muy conservada en ambas cepas, conocida como promotor *pnodB*. Este resultado fue el punto de partida para la elaboración de la herramienta molecular.

4.5.2 Construcción del vector pFO0115

A partir del ADN genómico de la cepa UYMMa02A de *Cupriavidus* *sp.* se amplificó por PCR la región intergénica *nodB-nodD* (incluyendo parte de ambos genes) donde se presume que se encuentra el promotor de gen *nodB*, *pnodB*. El producto obtenido se muestra en la figura 23A.

El amplicón *pnodB* se purificó y digirió con las enzimas de restricción *EcoRI* y *BamHI*, al igual que el plásmido pSEVA247Y (figura 23B). Luego, vector e inserto fueron ligados y utilizados para transformar células de *E. coli* quimiocompetentes. Las colonias Km-resistentes obtenidas fueron repicadas y usadas para recuperar el plásmido resultante, el cual fue nombrado pFO0115. Para comprobar la presencia del inserto en los plásmidos obtenidos, éstos fueron digeridos con las enzimas *EcoRI* y *BamHI*. Las bandas correspondientes al vector y al inserto se observaron en gel de agarosa (figura 23C). Finalmente, pFO0115 fue secuenciado para corroborar que la inserción fuera correcta (ver más adelante).

4.5.2.1 Conjugación UYMMa02A-pFO0115

Células *E. coli* transformadas con pFO0115 fueron utilizadas para transferir el vector a UYMMa02A por conjugación triparental. Las transconjugantes fueron seleccionadas en medio M9 citrato con Km. Para verificar que dichas transconjugantes contuvieran la construcción pFO0115, se las usó como molde en una PCR para amplificar el inserto. Los cebadores empleados fueron PS1 y *pnodBR-BamHI* (ver tabla 4 en Mát. y Mét). Los amplicones se observaron en gel de agarosa (figura 23D), comprobándose la presencia de pFO0115 en UYMMa02A.

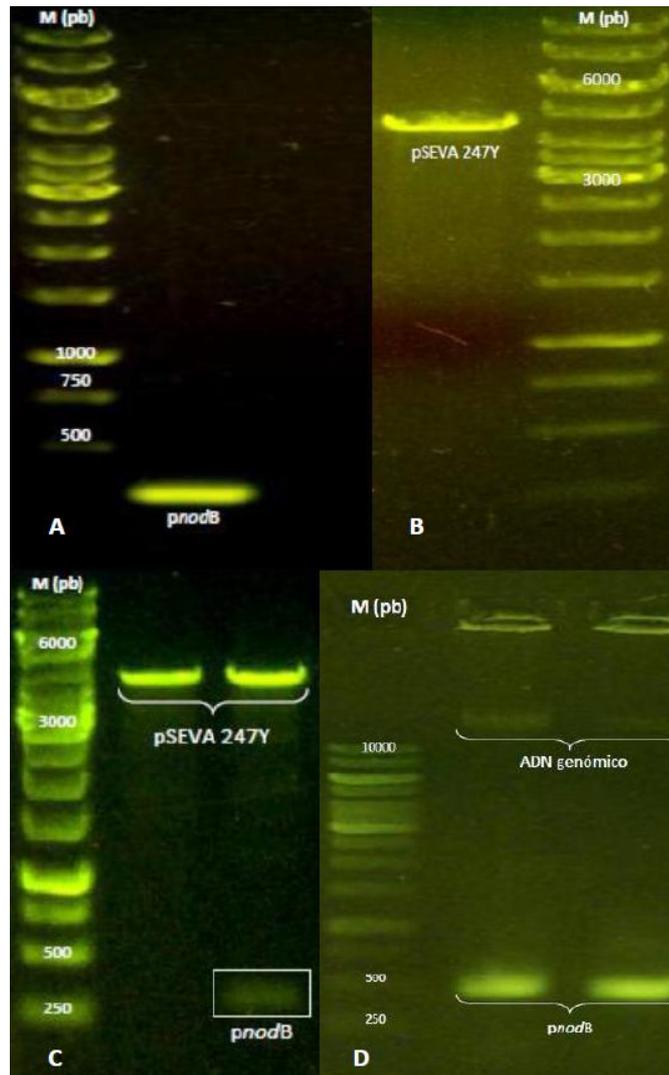


Figura 23. Construcción de UYMMa02A-pFO0115. Electroforesis en gel de agarosa 0,8%. Marcador Gene Ruler 1Kb DNA Ladder, Fermentas (carril M). **A: Amplificación del promotor *nodB*.** La banda *nodB* es de aproximadamente 320pb. El carril a la derecha corresponde al control negativo de una PCR sin ADN molde. **B: Miniprep y digestión del plásmido pSEVA247Y.** El plásmido pSEVA 247Y digerido con las enzimas *EcoRI* y *BamHI* corresponde a una banda de 4573pb. **C: Digestión de pFO0115.** Para verificar que la construcción fuera la esperada, se digirió con las enzimas *EcoRI* y *BamHI* para obtenerse vector e inserto por separado. Las bandas de pSEVA247Y son de aproximadamente 4500pb y la banda del *nodB* de 320pb. El carril de la izquierda es un control sin inserto. **D: PCR con transconjugantes UYMMa02A-pFO0115.** Se corroboró la presencia del inserto por PCR usando lisado de transconjugantes. Se observa en la electroforesis la banda correspondiente a *nodB*. Las bandas al principio de la corrida electroforética corresponden a ADN genómico.

4.5.3 Ensayos de expresión del promotor *pnodB*

Una vez obtenida la cepa UYMMa02A-pFO0115, se estudió la producción de fluorescencia en presencia o ausencia de exudados radiculares de una planta hospedera. Si bien se observó crecimiento bacteriano en todas las placas, no se evidenció un aumento en la fluorescencia de las bacterias alrededor de ninguno de los pocillos cuando las mismas fueron observadas bajo luz azul, lo cual se esperaría si hubiese expresión de YFP debido a la activación del promotor *pnodB* (resultados no mostrados).

Para comprobar la funcionalidad de la herramienta no se usaron controles positivos con sustancias que se sepa induzcan la expresión de los genes *nod* en rizobios, como por ejemplo los flavonoides, luteolina y apigenina (Masson-Boivin *et al.*, 2009). Es posible que los exudados empleados no contengan las sustancias activadoras, ya que fueron obtenidos a partir de semillas y no de raíces en crecimiento. Sería importante obtener y evaluar exudados radiculares en diferentes condiciones para utilizar en futuros ensayos.

Las diferencias observadas entre las regiones intergénicas de los genomas de LMG19424 y UYMMa02A (figura 22) podrían significar que en estos dos microorganismos cercanos la regulación del operón *nod* sea diferente. Una forma de comprobar esto sería ensayar la funcionalidad de pFO0115 en *C. taiwanensis* o, por el contrario, utilizar el vector construido en el trabajo de los autores antes mencionados (Marchetti *et al.*, 2010; Saad *et al.*, 2012) en UYMMa02A. Cabe advertir que en estos trabajos, la secuencia amplificada es ligeramente diferente a la escogida en este proyecto, por lo que se podría repetir la amplificación utilizando los mismos cebadores utilizados por los autores mencionados e integrarla en un plásmido reportero como el utilizado.

Paralelamente a la realización de estos ensayos, se obtuvo la secuencia del plásmido pFO0115. El análisis de la secuencia mostró que había ocurrido una doble inserción del fragmento *pnodB* en el vector. La misma no había sido identificada en la prueba de digestión ya que la digestión produce dos fragmentos, pero de idéntico tamaño. En la figura 24 se esquematiza la estructura de la construcción obtenida y la esperada. Es posible que esta doble inserción interfiera en la correcta expresión del

promotor, por lo que lo correcto sería volver a realizar la construcción y estudiar su expresión. Alternativamente se podrían emplear otras técnicas para evaluar la activación del operón *nod*, como por ejemplo PCR cuantitativa en tiempo real.

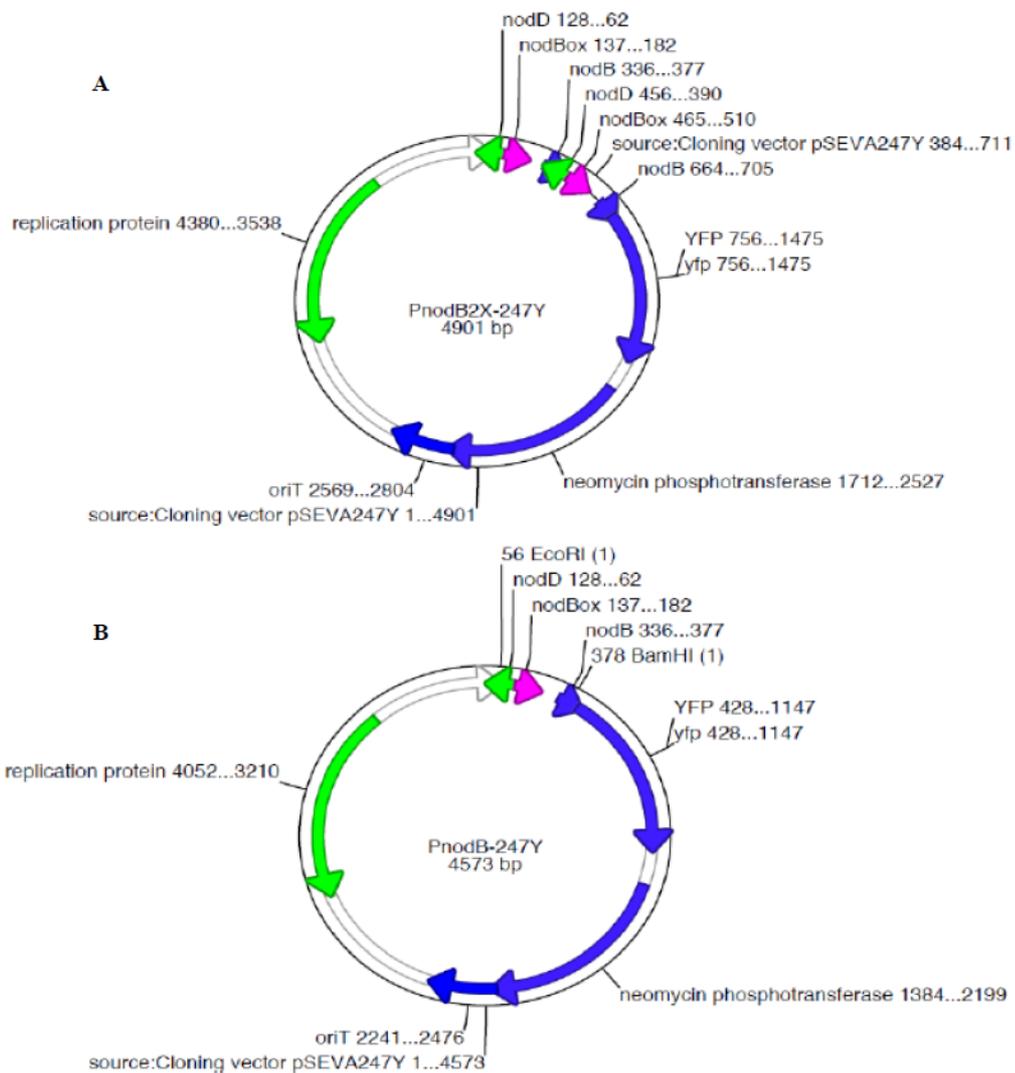


Figura 24. Esquema del plásmido pFO0115 obtenido (A) vs. esperado (B). La construcción obtenida (PnodB2X-247Y) presenta una doble inserción del promotor *nodB* entre los 128 y 705 pares de bases del vector. Downstream se encuentra YFP, entre los 756 y 1475 pares de bases del vector. El total de pares de bases de la construcción obtenida es de 4901 contra 4573pb en la construcción esperada.

5 OBJETIVOS ALCANZADOS Y PERSPECTIVAS

En consideración del objetivo principal de este proyecto: puesta a punto de herramientas moleculares que permitan estudiar la importancia del operón *nod* en el establecimiento de una simbiosis efectiva entre beta-rizobios y leguminosas hospederas; puede decirse que se lograron avances significativos. En primer lugar, se obtuvo con éxito una herramienta molecular que permitió establecer las condiciones óptimas para la inducción del módulo XylS-Pm, parte fundamental del protocolo para la obtención de mutantes por recombinación homóloga. El plásmido construido; pFO1, ha permitido validar el uso del sistema de expresión XylS-Pm en la cepa de estudio *Cupriavidus sp.* UYMMa02A. Más aún esta herramienta podría ser utilizada en otros modelos bacterianos utilizados en nuestro grupo de investigación con el mismo fin, por lo que se ha contribuido con una nueva herramienta molecular a la comunidad científica.

Para el estudio de la función del operón *nod* en *Cupriavidus sp.* UYMMa02A, este proyecto propuso dos vías paralelas: por un lado, generar una mutante $\Delta nodD$ en la cepa UYMMa02A, la cual sería utilizada para ensayos de nodulación en planta; por otro lado, la construcción de una herramienta molecular que permita estudiar la dinámica de la expresión del operón *nod in vivo*. Para concretarse la primera vía, se avanzó en los primeros pasos de la construcción de un vector (pEMG $\Delta nodD$), el cual se utilizaría juntamente con el sistema de expresión XylS-Pm para obtenerse la mutante deseada. Los resultados preliminares obtenidos muestran que los cebadores disponibles son útiles para obtener la construcción deseada por lo que podrán ser usados en un futuro para lograr este objetivo.

En cuanto a la segunda vía, se logró construir el plásmido pFO0115, en el cual la región promotora del gen *nodB* fue clonada delante del gen que codifica para la proteína amarilla fluorescente. pFO0115 fue construido con el propósito de observar la dinámica de la expresión del operón *nod* a través de la emisión de fluorescencia cuando la cepa UYMMa02A que lo contenga sea expuesta a extractos radiculares u otros posibles inductores. En los ensayos preliminares realizados no se observó fluorescencia en presencia de extractos radiculares, sin embargo éstos fueron obtenidos a partir de semillas que podrían no contener inductores,

por lo que habría que ensayar distintos tipos de exudados para descartar su funcionalidad. Además, la secuenciación del plásmido muestra que se insertaron dos copias consecutivas del inserto. Ya que se desconoce cuál puede ser el efecto de esto, se propone volver a construir pFO0115 para obtener una única inserción de *pnodB* y repetir la exposición a extractos radiculares. Por otro lado, se ha demostrado, utilizando una herramienta similar, que *pnodB* de *C. taiwanensis* se expresa en la raíz y nódulos de *Mimosa pudica* (Marchetti *et al.*, 2011) así como en presencia de los flavonoides Luteolina y Apigenina (Marchetti *et al.*, 2010; Saad *et al.*, 2012). Finalmente debe notarse que al realizar un alineado entre las regiones intergénicas *nodD-nodB* de *C. taiwanensis* LMG19424 y *Cupriavidus* sp. UYMMa02A, se observan ligeras variaciones; la más notable es que en la cepa de Uruguay esta secuencia tiene una extensión mayor, difiriendo en un bloque de unas 35pb con respecto a *C. taiwanensis*, lo cual podría tener implicancias en la regulación del operón *nod* en la cepa de estudio.

Si se comprobara la funcionalidad de pFO0115 en UYMMa02A, se podría utilizar esta construcción para estudiar la inducción del promotor *pnodB* tanto *in vivo*, durante su interacción con leguminosas hospederas y no hospederas; como *in vitro*, exponiendo a las bacterias transconjugantes a diversos flavonoides.

En suma, la experiencia acumulada y los resultados obtenidos en esta pasantía de grado constituyen un avance en el desarrollo de herramientas moleculares para el estudio de la interacción entre beta-rizobios y leguminosas hospederas.

6 BIBLIOGRAFÍA

- Amadou, C., Pascal, G., Mangenot, S., Glew, M., Bontemps, C., Capela, D., ... Masson-Boivin, C. (2008). Genome sequence of the β -rhizobium *Cupriavidus taiwanensis* and comparative genomics of rhizobia. *Genome Research*. <https://doi.org/10.1101/gr.076448.108>
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., & Struhl, K. (1992). Short protocols in molecular biology.
- Aziz, R. K., Bartels, D., Best, A. A., DeJongh, M., Disz, T., Edwards, R. A., Formsma, K., Gerdes, S., Glass, E. M., Kubal, M., Meyer, F., Olsen, G. J., Olson, R., Osterman, A. L., Overbeek, R. A., Mc Neil, L. K., Paarmann, D., Paczian, T., Parrello, B., Pusch, G. D., Reich, C., Stevens, R., Vassieva, O., Vonstein, V., Wilke, A., Zagnitko, O. *BMC Genomics*, 2008. <http://rast.nmpdr.org/>
- Bagdasarian, M., Lurz, R., Rückert, B., Franklin, F. C. H., Bagdasarian, M. M., Frey, J., & Timmis, K. N. (1981). Specific-purpose plasmid cloning vectors II. Broad host range, high copy number, RSF 1010-derived vectors, and a host-vector system for gene cloning in *Pseudomonas*. *Gene*, 16(1–3), 237–247. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(81\)90080-9](https://doi.org/10.1016/0378-1119(81)90080-9)
- Barrett, C. F., & Parker, M. A. (2005). Prevalence of *Burkholderia* sp. nodule symbionts on four mimosoid legumes from Barro Colorado Island, Panama. *Systematic and Applied Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2004.09.002>
- Benhizia, Y., Benhizia, H., Benguedouar, A., Muresu, R., Giacomini, A., & Squartini, A. (2004). Gamma proteobacteria can nodulate legumes of the genus *Hedysarum*. *Systematic and Applied Microbiology*. <https://doi.org/10.1078/0723202041438527>
- Berezina, N., Yada, B., & Lefebvre, R. (2015). From organic pollutants to bioplastics: insights into the bioremediation of aromatic compounds by *Cupriavidus necator*. *New Biotechnology*. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2014.09.003>
- Bontemps, C., Elliott, G. N., Simon, M. F., Dos Reis Junior, F. B., Gross, E., Lawton, R. C., ... Young, J. P. W. (2010). *Burkholderia* species

- are ancient symbionts of legumes. *Molecular Ecology*, 19(1), 44–52. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04458.x>
- Bontemps, C., Rogel, M. A., Wiechmann, A., Mussabekova, A., Moody, S., Simon, M. F., ... James, E. K. (2016). Endemic *Mimosa* species from Mexico prefer alphaproteobacterial rhizobial symbionts. *New Phytologist*. <https://doi.org/10.1111/nph.13573>
- Braman, J., Papworth, C., & Greener, A. (1996). Site-directed mutagenesis using double-stranded plasmid DNA templates. *Methods in Molecular Biology*, 57(February), 31–44. <https://doi.org/10.1385/0-89603-332-5:31>
- Bueno dos Reis, F., Simon, M. F., Gross, E., Boddey, R. M., Elliott, G. N., Neto, N. E., ... James, E. K. (2010). Nodulation and nitrogen fixation by *Mimosa* spp. in the Cerrado and Caatinga biomes of Brazil. *New Phytologist*. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03267.x>
- Chen, W. M., Laevens, S., Lee, T. M., Coenye, T., De Vos, P., Mergeay, M., & Vandamme, P. (2001). *Ralstonia taiwanensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* species and sputum of a cystic fibrosis patient. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-5-1729>
- Crews, T. E., & Peoples, M. B. (2004). Legume versus fertilizer sources of nitrogen: Ecological tradeoffs and human needs. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 102(3), 279–297. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2003.09.018>
- da Silva, K., Florentino, L. A., da Silva, K. B., de Brandt, E., Vandamme, P., & de Souza Moreira, F. M. (2012). *Cupriavidus necator* isolates are able to fix nitrogen in symbiosis with different legume species. *Systematic and Applied Microbiology*, 35(3), 175–182. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2011.10.005>
- De Lorenzo, V., & Timmis, K. N. (1994). [31] Analysis and construction of stable phenotypes in gram-negative bacteria with Tn5- and Tn10-derived minitransposons. *Methods in enzymology*, 235, 386-405.
- De Meyer, S. E., Fabiano, E., Tian, R., Van Berkum, P., Seshadri, R., Reddy, T., ... Reeve, W. (2015). High-quality permanent draft

genome sequence of the *Parapiptadenia rigida*-nodulating *Cupriavidus* sp. strain UYPR2.512. *Standards in Genomic Sciences*. <https://doi.org/10.1186/1944-3277-10-13>

- Dénarié, J., Debelle, F., & Promé, J. C. (1996). Rhizobium lipochitooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annual review of biochemistry*, 65(1), 503-535.
- Deng, W. P., & Nickoloff, J. A. (1992). Site-directed mutagenesis of virtually any plasmid by eliminating a unique site. *Analytical Biochemistry*, 200(1), 81–88. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(92\)90280-K](https://doi.org/10.1016/0003-2697(92)90280-K)
- FAO. (2016). *El estado Mundial de la Agricultura y la Alimentación. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación - (FAO)*. <https://doi.org/0251-1371>
- Fisher, R., & Long, S. (1992). Rhizobium-plant signal exchange. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/357655a0>
- Frank, B. (1889). Ueber die Pilzsymbiose der Leguminosen. *Bulletin der Akademie der Wissenschaft in Erakau*.
- Giraud, E., Moulin, L., Vallenet, D., Barbe, V., Cytryn, E., Avarre, J.-C., ... Sadowsky, M. (2007). Legumes Symbioses: Absence of Nod Genes in Photosynthetic Bradyrhizobia. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1139548>
- Gualtieri, G., & Bisseling, T. (2000). The evolution of nodulation. *Plant Molecular Biology*. <https://doi.org/10.1023/A:1006396525292>
- Hirsch, A. M., Lum, M. R., & Downie, J. A. (2001). What makes the rhizobia-legume symbiosis so special? *Plant Physiology*, 127(4), 1484–92. <https://doi.org/10.1104/PP.010866>
- Horvath, B., Heidstra, R., Lados, M., Moerman, M., Spink, H. P., Promé, J.-C., ... Bisseling, T. (1993). Lipo-oligosaccharides of Rhizobium induce infection-related early nodulin gene expression in pea root hairs. *The Plant Journal*.
- Howard, J. B., & Rees, D. C. (1996). Structural Basis of Biological Nitrogen Fixation. *Chemical Reviews*. <https://doi.org/10.1021/cr9500545>

- Hutchison, C. A., Phillips, S., Edgell, M. H., Gillam, S., Jahnke, P., & Smith, M. (1978). Mutagenesis at a specific position in a DNA sequence. *Journal of Biological Chemistry*, 253(18), 6551–6560.
- Iriarte, A., Platero, R., Romero, V., Fabiano, E., & Sotelo-Silveira, J. R. (2016). Draft Genome Sequence of *Cupriavidus* UYMMa02A, a Novel Beta-Rhizobium Species. *Genome Announcements*. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01258-16>
- Kamst, E., Spaink, H. P., & Kafetzopoulos, D. (1998). Biosynthesis and secretion of rhizobial lipochitin-oligosaccharide signal molecules. In *Plant-Microbe Interactions* (pp. 29-71). Springer US.
- Kijne, J. W. (1992). The Rhizobium Infection Process. *Biological Nitrogen Fixation*, 1349.
- Kobayashi, H., & Broughton, W. J. (2008). Fine-tuning of symbiotic genes in rhizobia: flavonoid signal transduction cascade. In *Nitrogen-fixing leguminous symbioses* (pp. 117-152). Springer Netherlands.
- Koressaar, T., & Remm, M. (2007). Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics*, 23(10), 1289-1291.
- Kunkel, T. A. (1985). Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(2), 488–492. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.2.488>
- Lagurara, P. (2014) Caracterización fenotípica de rizobios presentes en el parque Esteros de Farrapos e Islas del Rio Uruguay. Tesis de Grado. Facultad de Ciencias. UdelaR, Montevideo, Uruguay
- Lerouge, P., Roche, P., Faucher, C., Maillet, F., Truchet, G., Promé, J. C., & Dénarié, J. (1990). Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/344781a0>
- Lloret, L., & Martínez-Romero, E. (2005). Evolución y filogenia de *Rhizobium*. *Rev Latinoam Microbiol*, 47(1-2), 43-60.
- Madigan, M.; Martinko, J. . S. D. (2012). Brock. Biology of Microorganisms. In *Brock. Biology of Microorganism*. <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>

- Makkar, N. S., & Casida, L. E. (1987). *Cupriavidus necator* gen. nov., sp. nov.; a Nonobligate Bacterial Predator of Bacteria in Soil. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 37(4), 323–326. <https://doi.org/10.1099/00207713-37-4-323>
- Marchetti, M., Capela, D., Glew, M., Cruveiller, S. S., Chane-Woon-Ming, B. B., Gris, C., ... Masson-Boivin, C. (2010). Experimental evolution of a plant pathogen into a legume symbiont. *PLoS Biology*. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000280>
- Marchetti, M., Catrice, O., Batut, J., & Masson-Boivin, C. (2011). *Cupriavidus taiwanensis* bacteroids in *Mimosa pudica* indeterminate nodules are not terminally differentiated. *Applied and Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/AEM.02358-10>
- Marqués, S., Manzanera, M., González-Pérez, M. M., Gallegos, M. T., & Ramos, J. L. (1999). The XylS-dependent Pm promoter is transcribed in vivo by RNA polymerase with σ_{32} or σ_{38} depending on the growth phase. *Molecular Microbiology*. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01249.x>
- Martínez-García, E., Calles, B., Arévalo-Rodríguez, M., & de Lorenzo, V. (2011). pBAM1: an all-synthetic genetic tool for analysis and construction of complex bacterial phenotypes. *BMC Microbiology*, 11(1), 38. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-38>
- Martínez-García, E., & de Lorenzo, V. (2011). Engineering multiple genomic deletions in Gram-negative bacteria: Analysis of the multi-resistant antibiotic profile of *Pseudomonas putida* KT2440. *Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02538.x>
- Martínez-García, E., & De Lorenzo, V. (2012). Transposon-based and plasmid-based genetic tools for editing genomes of gram-negative bacteria. *Methods in Molecular Biology*. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-412-4_16
- Masson-Boivin, C., Giraud, E., Perret, X., & Batut, J. (2009). Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes? *Trends in Microbiology*, 17(10), 458–466. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2009.07.004>

- Miller, W. G., & Lindow, S. E. (1997). An improved GFP cloning cassette designed for prokaryotic transcriptional fusions. *Gene*. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(97\)00051-6](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(97)00051-6)
- Minami, E., Kouchi, H., Cohn, J. R., Ogawa, T., & Stacey, G. (1996). Expression of the early nodulin, ENOD40, in soybean roots in response to various lipo-chitin signal molecules. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 10(1), 23–32.
- Monchy, S., Benotmane, M. A., Janssen, P., Vallaey, T., Taghavi, S., Van Der Lelie, D., & Mergeay, M. (2007). Plasmids pMOL28 and pMOL30 of *Cupriavidus metallidurans* are specialized in the maximal viable response to heavy metals. *Journal of Bacteriology*. <https://doi.org/10.1128/JB.00375-07>
- Nápoles, M. C., Gómez, G., & Costales, D. (2007). Factores de nodulación. Experiencia en cuba. *Cultivos Tropicales*, 28(4), 71–80.
- Okazaki, S., Kaneko, T., Sato, S., & Saeki, K. (2013). Hijacking of leguminous nodulation signaling by the rhizobial type III secretion system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1302360110>
- Pérez-Pantoja, D., De La Iglesia, R., Pieper, D. H., & González, B. (2008). Metabolic reconstruction of aromatic compounds degradation from the genome of the amazing pollutant-degrading bacterium *Cupriavidus necator* JMP134. *FEMS Microbiology Reviews*. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00122.x>
- Peters, J. W., Fisher, K., & Dean, D. R. (1995). Nitrogenase structure and function: a biochemical-genetic perspective. *Annual Review of Microbiology*. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.49.1.335>
- Pichon, M., Journet, E. P., Dedieu, A., De Billy, F., Huguet, T., Truchet, G., & Barker, D. G. (1993). Expression of the *Medicago truncatula* Enod12 gene in response to *R. meliloti* Nod factors and during spontaneous nodulation in transgenic alfalfa. *New Horizons in Nitrogen fixation*, 285-290.
- Plá, I. 2015. Microorganismos para la agricultura del futuro. Academia de Ciencias Matemáticas, Físico-Químicas y Naturales de Granada. Granada, España.

- Platero, R., James, E. K., Rios, C., Iriarte, A., Sandes, L., Zabaleta, M., ... Fabiano, E. (2016). Novel Cupriavidus strains isolated from root nodules of native Uruguayan Mimosa species. *Applied and Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/AEM.04142-15>
- Pósfai, G., Kolisnychenko, V., Berczki, Z., & Blattner, F. R. (1999). Markerless gene replacement in Escherichia coli stimulated by a double-strand break in the chromosome. *Nucleic Acids Research*, 27(22), 4409–4415. <https://doi.org/10.1093/nar/27.22.4409>
- Reith, F., Etschmann, B., Grosse, C., Moors, H., Benotmane, M. a, Monsieurs, P., ... Brugger, J. (2009). Mechanisms of gold biomineralization in the bacterium Cupriavidus metallidurans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.0904583106>
- Relic, B., Perret, X., Estrada-García, M. T., Kopcinska, J., Golinowski, W., Krishnan, H. B., ... Broughton, W. J. (1994). Nod factors of Rhizobium are a key to the legume door. *Molecular Microbiology*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1994.tb00412.x>
- Ríos Mendaro, C. (2014). Estudio de bacterias simbiotes de leguminosas nativas Aportes para la conservación de la biodiversidad en un área protegida de Uruguay.
- Ruiz Herrera, B. L., Angulo, G., Campos, J. A., & Behrens, N. B. (2008). Cofactor FeMco (M= Mo, V, Fe) en la nitrogenasa. *Educación química*, 19(1), 34-41.
- Ruvkun, G. B., & Ausubel, F. M. (1981). A general method for site-directed mutagenesis in prokaryotes. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/289085a0>
- Saad, M. M., Crèvecoeur, M., Masson-Boivin, C., & Perret, X. (2012). The type 3 protein secretion system of Cupriavidus taiwanensis strain LMG19424 compromises symbiosis with Leucaena leucocephala. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(20), 7476–7479. <https://doi.org/10.1128/AEM.01691-12>
- Sandes, L. (2015) Análisis de Cupriavidus aislados de mimosas nativas de Uruguay. Tesis de Grado. Facultad de Ciencias. UdelaR, Montevideo, Uruguay

- Santos, P. M., Di Bartolo, I., Blatny, J. M., Zennaro, E., & Valla, S. (2001). New broad-host-range promoter probe vectors based on the plasmid RK2 replicon. *FEMS Microbiology Letters*. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(00\)00551-6](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(00)00551-6)
- Sayers, J. R., Schmidt, W., Eckstein, F., & Chemie, A. (1988). 5'—3' Exonucleases in pbosphorothioate-based oligonucleotide-directed mutagenesis Jon R.Sayers, Walter Schmidt and Fritz Eckstein Max-Planck-Institut fur Experimentelle Medizin, Abteilung Chemie, Hermann-Rein-Strasse 3, D-3400 Gottingen, FRG, *16*(3), 791–802.
- Scherzinger, E., Bagdasarian, M. M., Scholz, P., Lurz, R., Rückert, B., & Bagdasarian, M. M. (1984). Replication of the broad host range plasmid RSF1010: requirement for three plasmid-encoded proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *81*(3), 654–658. <https://doi.org/10.1073/pnas.81.3.654>
- Silva-Rocha, R., Martínez-García, E., Calles, B., Chavarría, M., Arce-Rodríguez, A., De Las Heras, A., ... De Lorenzo, V. (2013). The Standard European Vector Architecture (SEVA): A coherent platform for the analysis and deployment of complex prokaryotic phenotypes. *Nucleic Acids Research*, *41*(D1), 666–675. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1119>
- Simon, M. F., Grether, R., de Queiroz, L. P., Särkinen, T. E., Dutra, V. F., & Hughes, C. E. (2011). The evolutionary history of Mimosa (Leguminosae): Toward a phylogeny of the sensitive plants1. *American Journal of Botany*. <https://doi.org/10.3732/ajb.1000520>
- Simon, R., Priefer, U., & Puhler, A. (1983). A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Biotechnology*. <https://doi.org/10.1038/nbt1183-784>
- Soto-Urzúa, L., & Baca, B. E. (2001). Mecanismos de protección de la nitrogenasa a la inactivación por oxígeno. *Revista Latinoamericana de Microbiología*.
- Spaink, H. P. (1995). The molecular basis of infection and nodulation by rhizobia: the ins and outs of sympathogenesis. *Annual Review of Phytopathology*. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.33.090195.002021>

- Spaink, H. P., Sheeley, D. M., van Brussel, A. A. N., Glushka, J., York, W. S., Tak, T., ... Lugtenberg, B. J. J. (1991). A novel highly unsaturated fatty acid moiety of lipo-oligosaccharide signals determines host specificity of *Rhizobium*. *Nature*, *354*(November), 125–130. <https://doi.org/10.1038/354125a0>
- Taulé, C., Zabaleta, M., Mareque, C., Platero, R., Sanjurjo, L., Sicardi, M., ... Fabiano, E. (2012). New betaproteobacterial *Rhizobium* strains able to efficiently nodulate *Parapiptadenia rigida* (Benth.) Brenan. *Applied and Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/AEM.06215-11>
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M., & Rozen, S. G. (2012). Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic acids research*, *40*(15), e115-e115.
- Vandamme, P., & Coenye, T. (2004). Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: A tale of lost and found. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *54*(6), 2285–2289. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63247-0>
- Victor Pastor Martin. (2013). Análisis De Sistemas De Secreción De Proteínas En Bradyrhizobia Aislados De *Lupinus* Spp. De La Península Ibérica.
- Vincent, J. M. (1970). *A Manual for the Practical Study of Root-Nodule Bacteria*. *International Biological Programme handbook*. <https://doi.org/139261>
- Vitousek, P. M., & Howarth, R. W. (1991). Nitrogen limitation on land and in the sea: How can it occur? *Biogeochemistry*. <https://doi.org/10.1007/BF00002772>
- Vlassak, K. M., De Wilde, P., Snoeck, C., Luyten, E., Van Rhijn, P., & Vanderleyden, J. (1998). The *Rhizobium* sp. BR816 nodD3 gene is regulated by a transcriptional regulator of the AraC/XylS family. *Molecular and General Genetics*. <https://doi.org/10.1007/s004380050768>
- Wais, R. J., Keating, D. H., & Long, S. R. (2002). Structure-function analysis of nod factor-induced root hair calcium spiking in *Rhizobium*-legume symbiosis. *Plant Physiology*. <https://doi.org/10.1104/pp.010690>

- Weir, B.S. (2016). The current taxonomy of rhizobia. NZ Rhizobia website. <https://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia> Última actualización: enero, 2016
- Wong, S. M., & Mekalanos, J. J. (2000). Genetic footprinting with mariner-based transposition in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.18.10191>
- Zabaleta, M., Platero, R., Taulé, C., Mareque, C., Battistoni, F., & Fabiano, E. (2015). Mejora del crecimiento de la leguminosa arbórea *Parapiptadenia rigida* (Benth.) Brenan en condiciones de cultivo a campo mediante el uso de bacterias del grupo de los Rizobios. In *V Congreso Latinoamericano de Agroecología-SOCLA (7 al 9 de octubre de 2015, La Plata)*.

7 ANEXO

7.1 Composición de los medios de cultivo

Medio LB

Por litro:

En 950 ml de agua desionizada, 10 g de bacto-triptona
5 g de extracto de levadura
10 g de NaCl

Ajustar el volumen de la solución a 1 litro con agua desionizada.
Autoclavar por 20 minutos a 15 lb/sq en ciclo líquido.

Medio M9

Por litro:

En 750 ml de agua desionizada, 200 ml sales M9 5x
agua desionizada hasta 1 litro
2 ml de 1M MgSO₄
20 ml de solución de fuente de carbono
apropiada al 20%
0.1 ml de 1M CaCl₂

Sales M9 5x para 1 litro: 64 g de Na₂HPO₄
15 g KH₂PO₄
2.5 g de NaCl
5 g de NH₄Cl

Esta solución se divide en alícuotas de 200 ml y se esteriliza por autoclave por 15 minutos a 15 lb/sq en ciclo líquido. Las soluciones de MgSO₄ y CaCl₂ deben prepararse por separado, esterilizarse por autoclave y añadirse después de llevar las sales 5x a 1 litro con agua desionizada.

7.2 Protocolo de preparación de células competentes y transformantes por CaCl_2

Preparado de células competentes frescas de *E. coli* usando CaCl_2 .

Este protocolo es usado para obtener entre 5×10^6 y 2×10^7 colonias transformadas por microgramo de ADN plasmídico.

- 1- Picar una sola colonia desde un cultivo fresco en placa (16-20 hrs a 37°C) y transferir en 100 ml de medio líquido LB en un matraz de 1 ltr. Incubar el cultivo por aproximadamente 3 horas a 37°C en shaker a 300 ciclos por minuto. El número de células no debe exceder 10^8 células/ml. Debe medirse la DO_{600} cada 20-30 minutos. Es importante determinar el número de células viables cultivando en placas con LB sin antibiótico.
- 2- Transferir asépticamente las células a tubos de centrifuga de 50 ml previamente enfriados. Mantener el cultivo en hielo por 10 minutos. Todos los pasos subsecuentes deberán hacerse asépticamente.
- 3- Recuperar las células por centrifugación a 4000 rpm por 10 minutos a 4°C .
- 4- Descartar el medio y dejar drenar todo resto de medio invirtiendo el tubo por 1 minuto.
- 5- Resuspender el pellet en 10 ml de CaCl_2 0.1 M previamente enfriado y dejar reposar en hielo.
- 6- Recuperar las células por centrifugación a 4000 rpm por 10 minutos a 4°C .
- 7- Descartar el fluido de igual manera que en el paso 4.
- 8- Resuspender el pellet en 2 ml de CaCl_2 0.1 M frio por cada 50 ml del cultivo de origen y mantener en 4°C por 24 a 48 horas. La eficiencia de transformación incrementa entre 4 y seis veces entre las 12 y 24 horas en frio y luego decrece al nivel original.

Protocolo de transformación de células *E.coli* competentes por CaCl_2 .

- 1- Transferir asépticamente con pipeta 200 μl de células competentes a un tubo de microcentrífuga. Agregar ADN (no más de 50 ng en un volumen de 10 μl o menos). Mezclar suavemente invirtiendo el tubo varias veces. Dejar reposar en hielo por 30 minutos. Se incluyen al menos los siguientes controles:
 - a) Control 1: Bacterias competentes que reciben una cantidad conocida del plásmido

- b) Control 2: Bacterias competentes que no reciben ningún ADN.
- 2- Transferir los tubos en un flotador a “baño María” a 42°C por 90 segundos.
 - 3- Rápidamente transferir los tubos a hielo y dejar enfriar por 1 o 2 minutos.
 - 4- Agregar LB líquido e incubar por 45 minutos a 37°C con agitación.
 - 5- Transferir la cantidad apropiada de células competentes transformadas a placas con medio LB y el correspondiente antibiótico. Incubar a 30°C por 24 horas.

7.3 Protocolo de conjugación triparental

Cepas utilizadas

- DH5α + pRK2013 (cepa helper). Resistente a Km 50µg/ml
- DH5α + plásmido de interés (cepa donadora)
- Cepa receptora (cepa a la que se quiere introducir el plásmido)

Día 1: Sembrar cultivo primario de las tres cepas (receptora, helper y donadora) en 5ml de medio líquido adecuado con el antibiótico correspondiente. Si la cepa receptora tarda mucho más que *E. coli* en crecer, sembrar los primarios de la receptora y al siguiente día los primarios de las cepas de *E. coli*.

Día 2:

- Hacer un cultivo secundario inoculando 5ml del medio apropiado sin antibiótico, con 100µl de cultivo crecido O.N. (o el tiempo que corresponda).
- Se crecen los cultivos durante aproximadamente 4 horas
- En un eppendorf se mezclan 200µl de cada una de las cepas de *E. coli* y 300µl de la cepa receptora.
- Se centrifuga a 4.000-5.000 rpm
- Se elimina el sobrenadante y se resuspende el pellet en 20µl de medio
- Se establecen controles: en un filtro se colocan 200µl de cada cepa de *E. coli* y en otro filtro, 300µl de la cepa receptora
- En placas con el medio apropiado para la cepa receptora, sin antibiótico, se colocan los filtros estériles de 45µm con pinzas estériles (una placa para cada filtro). Los filtros deben colocarse con las células hacia arriba, es decir, que las células queden separadas del agar por el filtro.

- Se colocan los 20µl del pellet resuspendido en el medio sobre la placa.
- Incubar las placas a 30°C O.N. (o a la temperatura óptima de la cepa receptora). Las placas se colocan con el filtro hacia arriba.

Día 3:

- Se toman las células con un anza y se coloca en un eppendorf con 1ml de medio apropiado para la cepa receptora. Hacer los mismo para cada controles.
- Se lleva el eppendorf a vortex para que las células se resuspendan en el medio.
- Se plaquean los controles y la conjugación en placas con medio apropiado para la cepa receptora, conteniendo todos los antibióticos necesarios (el antibiótico de selección de la cepa receptora y antibiótico que permita determinar que la cepa receptora contiene el plásmido deseado). Típicamente se plaquean 100µl. El eppendorf con el resuspendido restante se guarda a -80°C en glicerol.

