

Tesis para optar al título de Licenciada en Bioquímica

# **Dinámica de la expresión de los genes *nod* de rizobios pertenecientes al género *Cupriavidus***

**Bach. Carolina Croci**

Tutor: Dr. Raúl Platero

Co-tutora: Mag. Cecilia Rodríguez-Esperón

Departamento de Bioquímica y Genómica Microbianas

Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

Montevideo, Uruguay

2020

## **AGRADECIMIENTOS**

A Rufo, por toda tu confianza que me permitió encontrar esa confianza también en mí y crecer y madurar tanto en lo curricular como en lo personal durante estos dos años de pasantía compartidos. Gracias por el entusiasmo por la ciencia que transmitís cada día, a cada momento, y que también se ve reflejado en el equipo de trabajo que has conformado, que es un excelente grupo humano muy empático, y aprovecho para agradecerles también a ustedes: Ceci, Flo, Lau y Tito.

A Ceci, por todo tu apoyo, tanto emocional como a nivel del desarrollo científico, a lo largo de toda la pasantía. Fue muy importante para mí saber que podía contar contigo siempre. En particular, con la escritura de mi tesis, fue impresionante tu dedicación constante e incansable hasta los detalles.

También a todos los compañeros del IIBCE y de Facultad de Ciencias, gracias por el apoyo y el compañerismo compartido durante estos años que transcurrimos juntos a lo largo de la carrera, hasta en los momentos más cotidianos como compartir un mate, una charla y tantos otros.

Por último, muchas gracias a mis amigos y familia que siempre estuvieron presentes para dar ánimos y compartir momentos de distensión y relajación. En especial, quiero agradecerle a mi mamá por apoyarme siempre, a no dejarme caer los brazos y estar para cuando me levantara, sobre todo por estar siempre y pese a todo, sin ella no hubiese sido posible llegar hasta acá.

¡Muchas gracias a todos!

## Índice de contenido

|                                                                                 |    |
|---------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>RESUMEN</b>                                                                  | 8  |
| <b>1 INTRODUCCIÓN</b>                                                           | 10 |
| 1.1 Vida en la rizosfera                                                        | 10 |
| 1.2 Fijación biológica del nitrógeno                                            | 11 |
| 1.3 Rizobios                                                                    | 14 |
| 1.3.1 Filogenia de los rizobios                                                 | 14 |
| 1.3.2 Simbiosis rizobio-leguminosa                                              | 16 |
| 1.3.3 Genes simbióticos                                                         | 17 |
| 1.4 Diálogo molecular rizobio-leguminosa                                        | 18 |
| 1.4.1 Moléculas señal: flavonoides                                              | 22 |
| 1.5 Técnicas utilizadas para estudio de la interacción planta-bacteria          | 24 |
| 1.5.1 Genes reporteros                                                          | 24 |
| <b>2 ANTECEDENTES</b>                                                           | 27 |
| <b>3 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>                                                  | 30 |
| 3.1 Hipótesis                                                                   | 30 |
| 3.2 Objetivo general                                                            | 30 |
| 3.3 Objetivos específicos                                                       | 30 |
| <b>4 MATERIALES Y MÉTODOS</b>                                                   | 31 |
| 4.1 Cepas                                                                       | 31 |
| 4.2 Vectores                                                                    | 31 |
| 4.3 Extracción de ADN plasmídico                                                | 32 |
| 4.4 Obtención de células competentes                                            | 33 |
| 4.5 Mecanismos de adquisición de ADN foráneo                                    | 34 |
| 4.6 Amplificación por PCR                                                       | 36 |
| 4.7 Geles de electroforesis                                                     | 38 |
| 4.8 Ensayo de determinación de la actividad de la enzima $\beta$ -galactosidasa | 38 |
| 4.9 Alineamiento de secuencias                                                  | 39 |
| 4.10 Construcción de vector <i>pnodB-gfp</i>                                    | 40 |
| 4.11 Evaluación de la expresión del vector <i>pnodB-gfp</i>                     | 43 |
| 4.12 Curvas de crecimiento                                                      | 43 |
| <b>5 RESULTADOS</b>                                                             | 45 |

|                                                                            |    |
|----------------------------------------------------------------------------|----|
| 5.1 Obtención de <i>Cupriavidus</i> con los vectores pCZ388, pCBM01 y pOT2 | 45 |
| 5.2 Evaluación de la expresión del <i>pnodB-lacZ</i> de pCBM01             | 46 |
| 5.3 Alineamiento de secuencias                                             | 50 |
| 5.4 Construcción de nuevo vector con <i>gfp</i> como gen reportero         | 54 |
| 5.5 Evaluación de la expresión del <i>pnodB-gfp</i> de pCC0119             | 60 |
| 5.6 Curvas de crecimiento                                                  | 61 |
| <b>6 DISCUSIÓN</b>                                                         | 63 |
| <b>7 CONCLUSIONES</b>                                                      | 66 |
| <b>8 ANEXO</b>                                                             | 68 |
| 8.1 Medios de cultivo                                                      | 68 |
| 8.2 Soluciones                                                             | 68 |
| <b>9 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>                                        | 71 |

## Índice de figuras

|                                                                                                                                                                                     |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1.</b> Análisis filogenético de secuencias del gen que codifica para la subunidad del ARNr 16S de $\alpha$ , $\beta$ y $\gamma$ proteobacterias seleccionadas.            | 15 |
| <b>Figura 2.</b> Contexto genómico en plásmido pRalta de <i>C. taiwanensis</i> .                                                                                                    | 17 |
| <b>Figura 3.</b> Diálogo molecular leguminosa-rizobio dependiente e independiente de los factores Nod.                                                                              | 20 |
| <b>Figura 4.</b> Reacciones que desencadenan los factores Nod.                                                                                                                      | 21 |
| <b>Figura 5.</b> Estructura básica de los flavonoides y familias más estudiadas.                                                                                                    | 23 |
| <b>Figura 6.</b> Reacción que cataliza la enzima $\beta$ -D-galactosidasa.                                                                                                          | 25 |
| <b>Figura 7.</b> Reacción de hidrólisis de ONPG.                                                                                                                                    | 26 |
| <b>Figura 8.</b> Contexto genómico del operón <i>nod</i> en <i>Cupriavidus</i> .                                                                                                    | 28 |
| <b>Figura 9.</b> Mapa del vector de clonado pOT2 y región <i>nodB-nodD</i> de <i>Cupriavidus</i> sp. UYMMao2A.                                                                      | 41 |
| <b>Figura 10.</b> Electroforesis en gel de agarosa 1 %. Confirmación de vectores pCZ388 y pCBM01.                                                                                   | 45 |
| <b>Figura 11.</b> Ensayo de determinación de actividad $\beta$ -galactosidasa utilizando luteolina como inductor de las cepas de <i>Cupriavidus</i> LMG19424, UYPR2.512 y UYMMao2A. | 47 |
| <b>Figura 12.</b> Ensayo de determinación de actividad $\beta$ -galactosidasa utilizando luteolina como inductor de la cepa <i>C. necator</i> UYPR2.512.                            | 48 |
| <b>Figura 13.</b> Ensayo de determinación de actividad $\beta$ -galactosidasa utilizando luteolina como inductor de la cepa <i>C. necator</i> UYPR2.512.                            | 48 |
| <b>Figura 14.</b> Ensayo de determinación de actividad $\beta$ -galactosidasa utilizando luteolina, apigenina y genisteína como inductores de la cepa <i>C. necator</i> UYPR2.512.  | 49 |
| <b>Figura 15.</b> Alineamiento de la secuencia nucleotídica de la región intergénica <i>nodB-nodD</i> .                                                                             | 51 |
| <b>Figura 16.</b> Alineamiento de la secuencia nucleotídica del gen <i>nodD</i> .                                                                                                   | 52 |
| <b>Figura 17.</b> Alineamiento de la secuencia de aminoácidos tentativa de las proteínas NodD.                                                                                      | 53 |
| <b>Figura 18.</b> Electroforesis en gel de agarosa 1 %. Digestión y purificación del fragmento <i>pnodB</i> y del vector pOT2.                                                      | 55 |
| <b>Figura 19.</b> Electroforesis en gel de agarosa 1 %. Confirmación por PCR de colonias de <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ transformadas con las reacciones de ligación.               | 56 |
| <b>Figura 20.</b> Electroforesis en gel de agarosa 1 %. Productos de miniprep de las colonias de <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ transformadas con las reacciones de las ligación.      | 57 |
| <b>Figura 21.</b> Parte de la secuencia de la construcción pCCo119.                                                                                                                 | 58 |
| <b>Figura 22.</b> Mapa del vector pCCo119.                                                                                                                                          | 59 |
| <b>Figura 23.</b> Electroforesis en gel de agarosa 1 %. Confirmación por PCR del vector pCCo119.                                                                                    | 60 |
| <b>Figura 24.</b> Curvas de crecimiento de <i>Cupriavidus</i> sp. UYMMao2A y <i>C. necator</i> UYPR2.512.                                                                           | 61 |

## Índice de tablas

|                                                                                                                                                                      |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabla 1.</b> Actividad $\beta$ -galactosidasa de los vectores pCBM01 y pCZ388 en una cepa derivada de LMG19424, utilizando apigenina y luteolina como inductores. | 29 |
| <b>Tabla 2.</b> Características de las cepas utilizadas.                                                                                                             | 31 |
| <b>Tabla 3.</b> Características de los vectores utilizados.                                                                                                          | 32 |
| <b>Tabla 4.</b> Secuencias nucleotídicas de los cebadores utilizados y fragmentos que amplifican.                                                                    | 38 |
| <b>Tabla 5.</b> Reacciones de ligación con enzima T4 ADN Ligasa.                                                                                                     | 56 |

### Lista de abreviaturas

|                                 |                                                      |
|---------------------------------|------------------------------------------------------|
| ADN                             | ácido desoxirribonucleico                            |
| ARN                             | ácido ribonucleico                                   |
| ARNasa                          | ribonucleasa                                         |
| DMSO                            | dimetilsulfóxido                                     |
| dNTP                            | desoxirribonucleótido trifosfato                     |
| DO                              | densidad óptica                                      |
| FBN                             | fijación biológica de nitrógeno                      |
| g                               | fuerza centrífuga relativa (RCF)                     |
| $\beta$ -gal                    | enzima $\beta$ -galactosidasa                        |
| <i>gfp</i>                      | gen que codifica para la proteína verde fluorescente |
| GFP                             | proteína verde fluorescente                          |
| Gm                              | gentamicina                                          |
| GS/GOGAT                        | glutamina sintetasa/glutamato sintasa                |
| KOH                             | hidróxido de potasio                                 |
| <i>lacZ</i>                     | gen que codifica para la $\beta$ -galactosidasa      |
| mQ                              | milliQ                                               |
| Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> | carbonato de sodio                                   |
| N                               | nitrógeno                                            |
| N <sub>2</sub>                  | nitrógeno molecular (atmosférico)                    |
| NH <sub>3</sub>                 | amoníaco                                             |
| NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>    | amonio                                               |
| NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>    | nitrato                                              |
| Nf                              | nitrofurantoína                                      |
| NF                              | factor Nod                                           |

|                |                                       |
|----------------|---------------------------------------|
| <i>nif</i>     | gen de fijación de nitrógeno          |
| <i>nod</i>     | gen de nodulación                     |
| O <sub>2</sub> | oxígeno molecular (atmosférico)       |
| ON             | “overnight” (durante la noche)        |
| ONP            | orto-nitrofenol                       |
| ONPG           | orto-nitrofenil-β-D-galactopiranósido |
| pb             | pares de bases                        |
| PCR            | reacción de polimerización de cadena  |
| rpm            | revoluciones por minutos              |
| SDS            | dodecilsulfato sódico                 |
| sp.            | especie                               |
| spp.           | especies                              |
| Tc             | tetraciclina                          |
| UV             | ultravioleta                          |

## RESUMEN

Los rizobios abarcan un grupo reducido de procariotas dentro de las subdivisiones  $\alpha$  y  $\beta$  de proteobacterias, cuya característica más notable es su capacidad de establecer relaciones simbióticas de mutuo beneficio con plantas leguminosas. Esta asociación requiere un diálogo molecular recíproco entre simbioses que involucra mecanismos de señalización y reconocimiento y culmina con la formación de un nuevo órgano en las raíces de las plantas hospederas, el nódulo, en donde las bacterias simbioses se alojan y llevan a cabo la Fijación Biológica de Nitrógeno. Durante los primeros pasos de la interacción entre los simbioses la planta libera a través de sus raíces diversos compuestos entre los cuales se encuentran flavonoides capaces de inducir la expresión del operón *nod* en los rizobios. Este operón codifica para las proteínas necesarias para la síntesis y secreción de lipo-quito-oligosacáridos conocidos como factores de nodulación, los cuales son a su vez reconocidos por la planta, constituyendo una señal clave para la asociación. Gran parte de la información disponible sobre estos primeros pasos proviene del estudio de modelos en los que intervienen rizobios pertenecientes a las  $\alpha$ -proteobacterias ( $\alpha$ -rizobios), existiendo escasa información sobre los mecanismos implicados en interacciones en las que intervienen  $\beta$ -proteobacterias ( $\beta$ -rizobios). En este contexto, se ha reportado que los flavonoides luteolina y apigenina son capaces de inducir la expresión de genes *nod* en *Cupriavidus taiwanensis*<sup>1,2</sup>, sugiriendo que al menos en parte, los  $\beta$ -rizobios utilizarían una estrategia similar a la empleada por  $\alpha$ -rizobios. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de flavonoides purificados como inductores de los genes *nod* bacterianos en cepas de  $\beta$ -rizobios aisladas de leguminosas nativas. Como modelo de estudio se utilizaron las cepas bacterianas nativas *Cupriavidus necator* UYPR2.512 y *Cupriavidus* sp. UYMMa02A, y la cepa modelo *Cupriavidus taiwanensis* LMG19424<sup>3,4,5</sup>. Para estudiar la inducción de los genes *nod*, se empleó el vector pCBM01, el cual contiene una fusión transcripcional del promotor del gen *nodB* de *C. taiwanensis* al gen reportero *lacZ*. Por otro lado, se generó un nuevo vector, denominado pCC0119, en el cual se colocó el promotor *nodB* de la cepa nativa *Cupriavidus* sp. UYMMa02A, fusionado al gen reportero *gfp*. Mientras que el vector pCBM01 fue introducido mediante conjugación triparental en las cepas

de  $\beta$ -rizobios, el vector pCC0119 fue introducido en las mismas cepas mediante electroporación. Las transformantes obtenidas fueron cultivadas en presencia de flavonoides, evaluando el efecto inductor sobre la expresión del gen *nodB*, mediante la determinación de la actividad enzimática de la enzima  $\beta$ -galactosidasa <sup>6</sup> o la fluorescencia debida a la expresión de la GFP. Se observó un fuerte aumento de la actividad  $\beta$ -galactosidasa cuando la cepa *C. necator* UYPR2.512:pCBM01 se incubó en presencia de luteolina purificada. Esta respuesta fue observada en tan solo dos horas y empleando concentraciones hasta 150 veces menores de las reportadas como inductoras en *C. taiwanensis*. Además se evaluó el efecto de los flavonoides apigenina y genisteína, observándose inducción con ambos flavonoides, siendo menor el efecto en presencia de genisteína. Contrariamente la cepa *Cupriavidus* sp. UYMMa02A:pCBM01 no respondió a la presencia de ninguno de los flavonoides ensayados. Para determinar si la falta de respuesta observada se debía a que el vector pCBM01 no era funcional en esta cepa, se utilizó el vector pCC0119, que contiene el promotor nativo de UYMMa02A fusionado al gen *gfp*. En este caso tampoco se observó inducción en presencia de luteolina, lo que sugiere que o bien esta bacteria no responde a los flavonoides ensayados o utiliza mecanismos de nodulación independientes de los factores Nod.

# 1 INTRODUCCIÓN

## 1.1 Vida en la rizosfera

Se denomina rizosfera a la zona del suelo que se encuentra influenciada por las raíces de plantas, donde ocurren complejas y dinámicas interacciones entre diversos organismos (principalmente microorganismos) y el ambiente fisicoquímico del suelo <sup>7</sup>. La comunidad microbiana existente representa un gran reservorio de diversidad biológica, siendo una zona de batalla entre los distintos microorganismos presentes que compiten por los nutrientes exudados por las raíces de las plantas <sup>8</sup>. Existe un “efecto rizosfera” que define al enriquecimiento microbiano y actividad en la rizosfera, por lo que en cierta medida los exudados radiculares generan un ambiente nutritivo en el suelo y por tanto las comunidades microbianas asociadas a la raíz se enriquecen con las comunidades microbianas del suelo <sup>7</sup>. Dichos microorganismos presentan capacidades fisiológicas como movilidad, quimiotaxis, degradación de polisacáridos, sistemas de dos componentes y sistemas de secreción, lo cual les brinda beneficios de competencia al momento de querer colonizar un huésped <sup>9</sup>.

Análisis metagenómicos (genomas de comunidades) y metatranscriptómicos (expresión de genes de comunidades) de comunidades asociados a las raíces de dos plantas diferentes a nivel filogenético sugirieron que las comunidades microbianas del suelo eran significativamente diferentes de las de la rizosfera, aumentados los niveles de proteobacteria y disminuidos los de actinobacteria con respecto al suelo. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre las comunidades microbianas de los suelos ni entre las de las rizosferas de ambas plantas <sup>9</sup>. Esto estaría indicando que: 1) los exudados radiculares de la planta favorecen a unas especies de microorganismos frente a otras, y 2) el hecho de que no haya diferencias en los microorganismos que habitan la rizosfera de distintas plantas podría implicar que la interacción microorganismo-planta no es específica. Si bien se ha demostrado que algunas especies de plantas pueden seleccionar comunidades similares en diferentes suelos, también se ha determinado que diferentes especies de plantas cuando se crecen en el mismo suelo determinan un cambio diferencial en la comunidad microbiana

de su rizosfera <sup>8</sup>. En este contexto, se ha observado que la diversidad microbiana del suelo es mayor con respecto a la diversidad de la rizosfera, lo que sugiere que la planta selecciona ciertos microorganismos. En base a ello, se estima que un gramo de suelo contiene  $10^4$  especies de bacterias y  $10^9$  células de bacterias. A su vez, factores abióticos, como el pH del suelo, son determinantes en la presencia de uno u otro género de microorganismos <sup>10</sup>.

La planta con su fitomicrobioma constituye lo que se denomina el holobionte, lo que hace que sea más fácil adaptarse a cambios ambientales; de hecho el aumento en la abundancia de microorganismos benéficos en la rizosfera resulta en una menor incidencia de enfermedades y en mayores niveles de actividad microbiana <sup>11</sup>. El triunfo de patógenos depende en cierta medida de la comunidad microbiana presente en la rizosfera, con la que hay una competencia por adquisición de nutrientes y en donde microorganismos benéficos producen antibióticos y enzimas líticas o consumen compuestos estimuladores de patógenos <sup>8</sup>.

En este contexto, se conoce como microorganismos promotores del crecimiento vegetal o MPCV al grupo de microorganismos que establecen una interacción benéfica con la planta mejorando su crecimiento y rendimiento. Durante esta interacción los microorganismos pueden vivir en la superficie de las plantas (epífitos), dentro de la planta (endófitos), o zonas influenciadas por la planta (ej. rizosfera) pero en vida libre <sup>12</sup>. Esta relación puede darse mediante mecanismos directos como la estimulación de fitohormonas o el aumento de disponibilidad de nutrientes <sup>12,13</sup>, mediante por ejemplo la solubilización de fosfatos, producción de sideróforos (quelantes que median la absorción de hierro <sup>14</sup>) o fijación biológica de nitrógeno <sup>15</sup>, y mecanismos indirectos como la atenuación de los efectos deletéreos de patógenos (control biológico) <sup>12</sup>.

## 1.2 Fijación biológica del nitrógeno

El nitrógeno (N) es un elemento esencial para los seres vivos que es parte estructural de las proteínas, ácidos nucleicos y otras moléculas de importancia biológica relevante. El mayor reservorio ambiental de N lo constituye el nitrógeno atmosférico (N<sub>2</sub>), que es el gas más predominante en la atmósfera (78 %) <sup>16,17</sup>.

En particular, las plantas pueden absorber el N por la raíz en las formas inorgánicas nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) y amonio ( $\text{NH}_4^+$ ), pero es escaso como nutriente en los suelos por lo que el N es limitante del desarrollo vegetal <sup>17</sup>. Solamente el 2 % del N total del suelo se encuentra en forma mineral asimilable por las plantas. Por este motivo se utilizan frecuentemente fertilizantes nitrogenados en la producción agrícola. Sin embargo, su utilización conlleva problemas ambientales, dado que solo el 50 % del fertilizante suministrado es asimilado por la planta <sup>18</sup>, mientras que el resto se pierde por lixiviación, contaminando las aguas y capas freáticas, así como también el gasto proveniente de compuestos orgánicos altamente energéticos como el petróleo, necesarios para la producción de fertilizantes <sup>19</sup>.

Para que el  $\text{N}_2$  pueda ser utilizado por las plantas, debe ser previamente reducido a  $\text{NH}_4^+$ , proceso conocido como fijación biológica del nitrógeno (FBN) <sup>17</sup>. La reducción del  $\text{N}_2$  es una reacción catalizada por la enzima nitrogenasa, muy costosa energéticamente dado que hacen falta 16 moléculas de ATP (EC 1.18.6.1) por cada molécula de  $\text{N}_2$  reducida <sup>20</sup>. Por lo tanto, una alternativa a la fertilización química nitrogenada, es el uso de microorganismos fijadores de nitrógeno (diazótrofos) <sup>15</sup>.

Además los diazótrofos son clave en el ciclo del nitrógeno de la tierra, ya que aproximadamente un 60 % del N fijado en los ecosistemas proviene de la FBN, mientras que un 30 % se debe a procesos industriales de Haber-Bosch y un 10 % proviene de procesos no biológicos realizados en la atmósfera <sup>21,22</sup>. Estudios han demostrado que la forestación de árboles de leguminosas con este tipo de microorganismos ha recuperado suelos altamente degradados <sup>15</sup>.

La FBN es realizada por un grupo reducido de procariotas, de los dominios Arquea y Bacteria, denominado diazótrofos (diazó=N, trofos=comida), distribuidos en una gran diversidad de grupos filogenéticos. En bacterias, la habilidad de fijar nitrógeno se distribuye en solo algunos filos incluyendo Chlorobi (bacterias verdes del azufre), Firmicutes (ej. *Clostridium*), Actinobacteria (ej. *Frankia*), Cyanobacteria (ej. *Anabaena*) y todas las subdivisiones de las Proteobacterias (ej. *Alphaproteobacteria*) <sup>16</sup>.

Los diazótrofos típicamente fijan  $\text{N}_2$  cuando las otras formas de N están ausentes y la expresión de la enzima que cataliza la reacción (nitrogenasa) es inhibida cuando hay  $\text{NH}_4^+$  disponible para las células. Además su expresión es

inhibida en presencia de oxígeno. Sin embargo, el oxígeno es necesario para la respiración aerobia por lo cual las bacterias han desarrollado distintas estrategias para que esto sea posible. Los diazótrofos se clasifican como microorganismos aerobios o anaerobios, capaces de fijar nitrógeno en “vida libre” o en asociaciones con otros organismos, por ejemplo, en asociación con plantas existen bacterias endofíticas o bacterias que forman los nódulos de las plantas leguminosas (rizobios) y de no leguminosas (como es el caso del género *Frankia* (Actinobacteria)) <sup>16,18</sup>. Para evitar la inhibición de la nitrogenasa por O<sub>2</sub>, estos microorganismos han desarrollado diferentes estrategias. Los primeros diazótrofos presentaban la solución más simple: eran microorganismos de vida libre que podían realizar la FBN porque su crecimiento era anerobio (ej. *Clostridium*). Otros mecanismos simples involucran que la FBN se dé cuando el O<sub>2</sub> esté ausente como es el caso de microorganismos aerobios facultativos que fijan N<sub>2</sub> solo cuando crecen en ambientes anaerobios (ej. *Klebsiella*) o como el caso de microorganismos microaerófilos que fijan N<sub>2</sub> solo cuando hay bajas concentraciones de O<sub>2</sub>. También existen soluciones más complejas en microorganismos aerobios, como el caso de algunas Cianobacterias que forman estructuras especializadas denominadas heterocistos. Estas formaciones son células especializadas que presentan una pared más gruesa que dificulta la difusión del O<sub>2</sub> <sup>16</sup>.

Por otro lado, se encuentran las estrategias llevadas a cabo por diazótrofos simbióticos. Las relaciones simbióticas mutualistas, en general, se definen por un huésped que provee un nicho, fuentes de carbono y energía, y alguna medida para regular la concentración de O<sub>2</sub> (un ambiente favorable para fijar nitrógeno), y a cambio el simbionte microbiano le provee al huésped una fuente de nitrógeno que pueda asimilar <sup>16</sup>. En el caso de la simbiosis leguminosa-rizobio, existe una integración del metabolismo de la planta y la bacteria para lo cual se forma un órgano especial denominado nódulo que actúa como barrera física. El correcto suministro de O<sub>2</sub> en el nódulo es regulado por la proteína leghemoglobina sintetizada en la planta que presenta una alta afinidad por el O<sub>2</sub>, la cual lo secuestra (generando un ambiente microaerófilo) y lo transporta a la cadena de electrones para que se dé la respiración celular bacteriana <sup>20,23</sup>. Las asociaciones simbióticas rizobio-leguminosa son responsables de un cuarto del total del N incorporado cada año a los ecosistemas terrestres <sup>24</sup>. A cambio

del nitrógeno que le provee la bacteria dentro del tejido vegetal, la planta le brinda esqueletos carbonados producto de la fotosíntesis <sup>23</sup>.

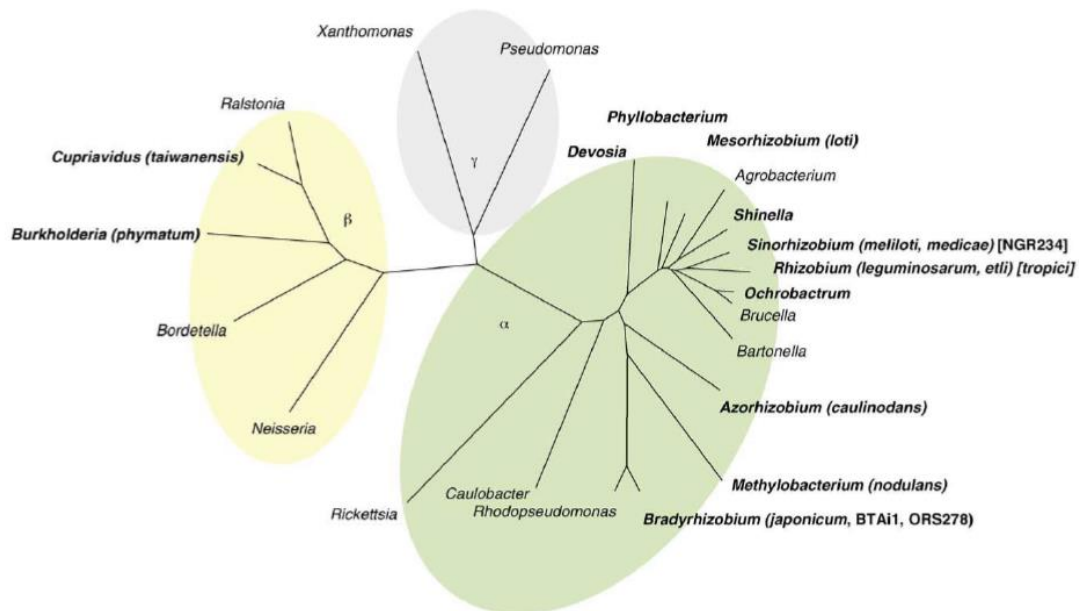
### 1.3 Rizobios

Los rizobios son bacterias gram negativas que presentan un metabolismo aerobio y heterótrofo y pertenecen a las familias de las Rhizobiaceae y Burkholderiaceae, cuya característica más notable es su capacidad de asociarse simbióticamente con plantas leguminosas <sup>16,24</sup>. Las leguminosas son una amplia familia (*Fabaceae*) de plantas, compuesta por cerca de 20.000 especies que reúne árboles, arbustos y hierbas que pueden ser anuales o perennes, que se divide en 3 subfamilias: *Caesalpinoideae*, *Papilionoideae* y *Mimosoideae* <sup>25</sup>. Su fruto (legumbre) hace que sean muy importantes fuentes de alimentos, piensos y biocombustibles <sup>26</sup>. En sus raíces, y a veces en sus tallos, los rizobios inducen la formación de órganos especializados denominados nódulos, donde los rizobios, diferenciados a su forma bacterioide, llevarán a cabo el proceso de FBN <sup>5,24</sup>. En general, cada rizobio tiene un espectro de huéspedes definido, pero no hay una correlación estricta entre la taxonomía de la bacteria y de la leguminosa <sup>24</sup>. De hecho, si bien en general la asociación rizobio-leguminosa es muy específica, determinando un espectro acotado en el que ciertos rizobios nodulan ciertas leguminosas, hay algunos casos en los que el espectro es más amplio <sup>4</sup>. En este sentido, el rizobio más promiscuo conocido es el caso excepcional de la cepa NGR234 de *Sinorhizobium fredii*, la cual nodula 112 especies de leguminosas <sup>10</sup>. Incluso con algunos rizobios se ha demostrado que usan sistemas de secreción (tipo III o IV) específicos para extender o restringir el rango de huéspedes de leguminosas, cuya expresión está coordinada con la expresión de los genes de nodulación. En otras palabras, estos sistemas pueden aumentar la eficiencia simbiótica <sup>1,10</sup>.

#### 1.3.1 Filogenia de los rizobios

Hasta la actualidad, el filo Proteobacteria es la división más grande y diversa dentro del dominio bacteria. Estudios filogenéticos que utilizan como marcador molecular el gen que codifica para la subunidad menor 16S del ARN ribosomal

las agrupa en 6 linajes designados como subdivisiones nombrados  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  y  $\zeta$ <sup>16</sup>. A su vez, los rizobios no son un grupo filogenéticamente discreto, sino que por el contrario se encuentran distribuidos en las subclases  $\alpha$  y  $\beta$  de las proteobacterias (**Figura 1**).



**Figura 1.** Análisis filogenético de secuencias del gen que codifica para la subunidad del ARNr 16S de  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  proteobacterias seleccionadas. Los géneros en negrita contienen rizobios, incluidos en  $\alpha$ -proteobacteria (*Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Phyllobacterium*, *Methylobacterium*, *Devosia*, *Shinella*, *Ochrobactrum*) y en  $\beta$ -proteobacteria (*Burkholderia*, *Cupriavidus*). Imagen extraída de 24.

Históricamente los primeros rizobios descritos y los más estudiados hasta la fecha pertenecían todos únicamente a la clase  $\alpha$ -proteobacterias al orden Rhizobiales restringiendo esta característica a 5 géneros: *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium* (más recientemente denominado *Ensifer*)<sup>24</sup>. En el año 2001, se reportó la identificación de bacterias noduladoras de leguminosas pertenecientes a la subclase  $\beta$  de las proteobacterias, a las que denominaron  $\beta$ -rizobios<sup>27</sup>. Los  $\alpha$ -rizobios comprenden más de 50 especies, distribuidas en 12 géneros (*Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium*, *Ensifer*, *Phyllobacterium*, *Methylobacterium*, *Devosia*, *Shinella*, *Ochrobactrum*, *Herbaspirillum* y *Microvirga*), mientras que

hasta el momento solamente se han descrito 3 géneros de  $\beta$ -rizobios *Paraburkholderia*, *Cupriavidus* y *Trinickia*, pertenecientes al orden Burkholderiales <sup>21,24,26,28</sup>. Con las actuales técnicas en secuenciación masiva y la posibilidad de disponer de genomas bacterianos completos, el área de la sistemática se ha visto revolucionada y la clasificación bacteriana es sometida a un proceso de reevaluación. Los rizobios no son ajenos a esta reestructura y es así que frecuentemente surgen nuevos géneros de rizobios y nuevos reordenamientos.

Los términos “ $\alpha$  y  $\beta$  rizobios” se han creado para clasificar a los rizobios pertenecientes a los subgrupos  $\alpha$  y  $\beta$  de las proteobacterias, respectivamente, dado que dentro de las  $\alpha$  y  $\beta$  proteobacterias no todas son bacterias fijadoras de nitrógeno <sup>29</sup>. De hecho, la capacidad simbiótica está restringida a unas pocas especies dentro de estos géneros. Otros miembros son patógenos vegetales o humanos/animales, así como saprófitos con gran potencial de biorremediación de suelos <sup>21</sup>. En su condición de “vida libre”, los saprófitos suelen localizarse principalmente en la superficie de las raíces (rizoplano) y en el suelo que rodea inmediatamente la raíz (rizosfera). De hecho, se cree que la vida simbiótica en los rizobios evolucionó por eventos de transferencia horizontal, durante los cuales genes de nodulación y de fijación de nitrógeno fueron transferidos por plásmidos, fagos o ADN desnudo a bacterias saprófitas que adquirieron el modo de vida simbiótico <sup>24</sup>.

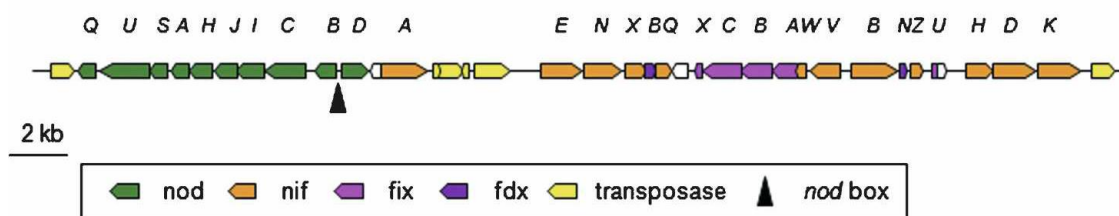
### 1.3.2 Simbiosis rizobio-leguminosa

Este tipo de interacción simbiótica tiene la característica de que las bacterias (rizobios) en su estado diferenciado viven como endosimbiontes, denominados bacteroides, de las células vegetales presentes en los nódulos de las leguminosas y es bajo esa forma diferenciada donde las bacterias llevan a cabo el proceso de la FBN <sup>10</sup>. El poder reductor que utiliza el bacteroide para la FBN proviene de la planta, predominantemente en forma de ácidos dicarboxílicos, que a su vez, aportan los esqueletos carbonados que servirán como transporte para el nitrógeno fijado <sup>30</sup>. Otra forma en la que egresa el nitrógeno fijado es mediante la difusión del  $\text{NH}_3$  a través de la membrana bacteroidal hacia el espacio peribacteroidal, donde el pH ácido promueve la protonación a  $\text{NH}_4^+$ . Este  $\text{NH}_4^+$

es asimilado vía GS/GOGAT para formar glutamato que pasa al sistema vascular de la planta <sup>31</sup>.

### 1.3.3 Genes simbióticos

Los genes simbióticos son aquellos genes que se encuentran en islas simbióticas o en plásmidos y pueden ser transferidos mediante transferencia horizontal entre bacterias <sup>31</sup>. En el caso de los rizobios, los genes simbióticos codifican para proteínas involucradas en el establecimiento de la simbiosis rizobio-leguminosa. En los rizobios los más caracterizados son los genes involucrados en el establecimiento de la simbiosis (*nod/nol/noe*) y los genes necesarios para la FBN (*nif/fix*), que tanto en  $\alpha$  como  $\beta$  rizobios se encuentran agrupados. En dicho contexto, análisis filogenéticos de los genes *nodA* y *nifH* en cepas de  $\alpha$  y  $\beta$  proteobacterias sugieren que los  $\beta$ -rizobios han evolucionado de diazótrofos por múltiples transferencias horizontales de genes. Eso también se puede ver por la presencia de transposasas alrededor del operón *nod* que son un vestigio de la transferencia (**Figura 2**) <sup>29</sup>.



**Figura 2.** Contexto genómico en plásmido pRaltA de *C. taiwanensis*. Se observa el operón de los genes *nod* (color verde) y la caja *nod* o *nod-box* (flecha), de importancia para la expresión de los genes *nod* en la región intergénica *nodB-nodD*. Extraída de <sup>21</sup>.

En  $\alpha$ -rizobios, la habilidad de nodular leguminosas requiere de los genes *nodABC*, responsables de la síntesis de la estructura central de los factores Nod <sup>29</sup>. La presencia y agrupamiento en  $\alpha$  y  $\beta$  rizobios de los genes *nodABC* muy similares y relacionados filogenéticamente apoya fuertemente la hipótesis de un origen único de los genes *nod* comunes <sup>5</sup>. Sin embargo, no está claro si un solo evento de transferencia fue responsable de la diseminación de genes de

nodulación de una subclase a la otra o si ocurrieron recurrentes transferencias entre las dos subclases <sup>29</sup>. Curiosamente, la filogenia del gen de fijación de nitrógeno *nifH* proporciona una representación de los rizobios diferente de la filogenia de *nodA*. De dichos análisis filogenéticos se desprende que los genes *nod* y *nif* de  $\beta$ -rizobios tienen diferentes orígenes <sup>29</sup>. Si bien en un principio se creía que los  $\beta$ -rizobios habían evolucionado de los  $\alpha$ -rizobios, luego se concluyó que los  $\alpha$  y  $\beta$  rizobios son igualmente antiguos.

Típicamente la organización general del genoma de las distintas especies de *Cupriavidus* consta de dos megaplásmidos principales y plásmidos adicionales. En la mayoría de rizobios, la biosíntesis y el transporte de los factores Nod, las moléculas señal que inducen la organogénesis del nódulo, están codificados por los genes de nodulación (*nod*, *nol*, *noe*) <sup>21</sup>. Por ejemplo, *C. taiwanensis* (de los primeros  $\beta$ -rizobios identificados) contiene 10 genes de nodulación, *nodBCIJHASUQ*, ordenados en un operón precedido de una caja *nod* <sup>5</sup>. Mientras el operón *nod* se transcribe hacia un sentido de la hebra, el gen que codifica para la proteína de regulación NodD lo hace hacia el sentido contrario, dicha proteína se une a la caja *nod* y activa la expresión de los genes *nod* en rizobios (**Figura 2**). Seguido de los genes *nod* se encuentran los genes *nif* y *fix* vinculados en la síntesis y funcionamiento de la nitrogenasa, probablemente arreglados en 5 operones <sup>21</sup>.

#### 1.4 Diálogo molecular rizobio-leguminosa

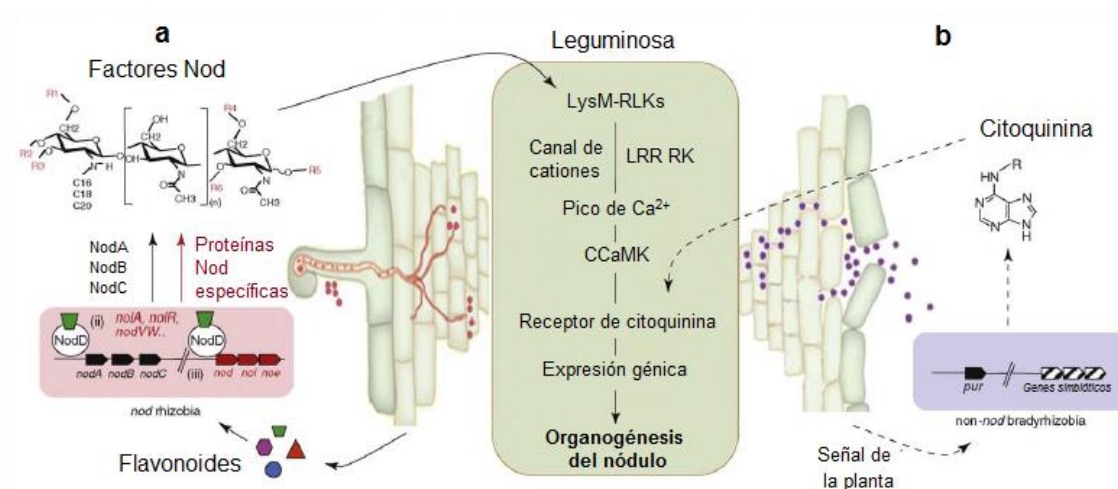
Los exudados radiculares de las plantas contienen mayoritariamente compuestos carbonados producto de la fotosíntesis, incluyendo azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos, ácidos grasos y metabolitos secundarios. El contenido de un exudado radicular depende entre otros factores de la especie de planta, el estado de desarrollo, las condiciones ambientales, el tipo de suelo y la presencia de otros organismos. Si bien hay pocos estudios de las bases químicas y moleculares del rol dinámico de los exudados radiculares en el establecimiento de las comunidades rizosféricas, se ha demostrado que determinados compuestos presentes en los exudados atraen microorganismos. Por ejemplo, compuestos de bajo peso molecular como aminoácidos, ácidos

orgánicos, azúcares, acil-homoserin lactonas, flavonoides, así como también otras moléculas como polímeros y fitohormonas <sup>7</sup>. Sin embargo, algunos metabolitos secundarios exudados por las plantas inhiben el crecimiento de ciertos microorganismos <sup>8</sup>.

Cuando un compuesto liberado por la leguminosa atrae rizobios por quimiotaxis, comienza lo que se denomina el proceso de infección, que comprende el momento desde que los rizobios se asocian a la raíz en la rizosfera hasta que ocupan intracelularmente las células de la planta. Los rizobios no presentan un único modo de entrar al tejido vegetal, sino que pueden ingresar por medio de una vía específica y sofisticada por un pelo radicular desarrollando un hilo de infección (**Figura 3a**) o ingresar por las uniones celulares en raíces laterales (**Figura 3b**). En la mayoría de los casos, la bacteria queda internalizada (bacterioide) en las células vegetales del nódulo, rodeada de una membrana vegetal (simbiosoma) <sup>24</sup>.

El mecanismo que subyace a la formación del nódulo, donde la bacteria eventualmente llevará a cabo la FBN, depende de un diálogo molecular específico, el cual involucra mecanismos de señalización y reconocimiento entre ambos simbiosistas <sup>4,27,32</sup>. En la mayoría de los casos, es un mecanismo dependiente de factores Nod (NF), en el que el diálogo principalmente involucra moléculas inductoras de los genes *nod*, producidos por la planta, y los NF, producidos por el rizobio (**Figura 3a**) <sup>32</sup>. Sin embargo, existen modelos que involucran un mecanismo independiente de estos factores (**Figura 3b**) <sup>24</sup>. La estrategia independiente de NF puede presentarse en rizobios que contengan o no los genes *nodABC*, lo que condiciona que el rizobio pueda usar una estrategia dependiente o independiente de NF según la planta huésped. De hecho, se observó que una cepa de rizobio que nodulaba varias especies de leguminosas podía nodular algunas de ellas de forma independiente de los NF; dado que al mutar a los genes *nodABC*, esta nueva cepa mutante podía nodular algunas de las especies de leguminosas que nodulaba la cepa salvaje pero otras no <sup>24</sup>.

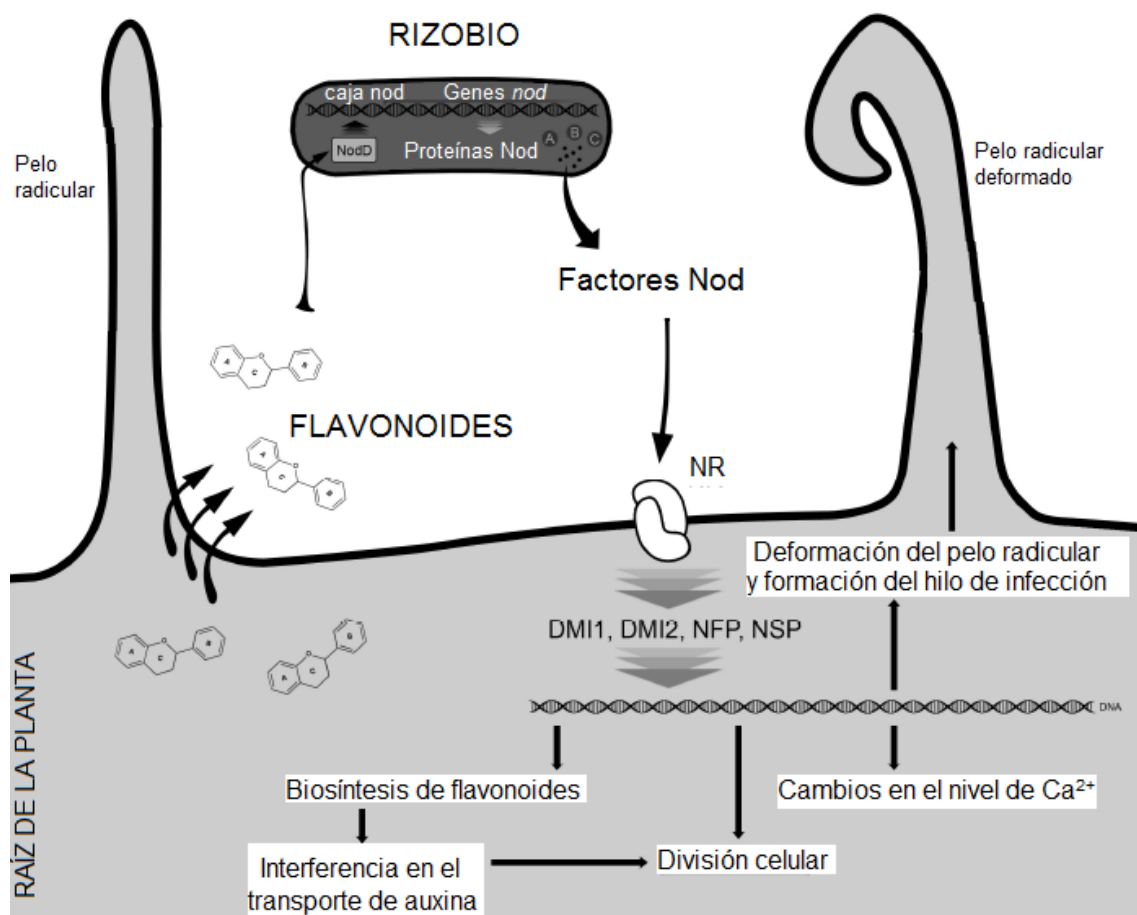
Según una librería de mutantes que realizaron en Masson-boivin (2009) <sup>24</sup>, el mecanismo independiente de NF podría involucrar la producción de citoquinas como señal de inducción en la simbiosis rizobio-leguminosa (**Figura 3b**).



**Figura 3.** Diálogo molecular leguminosa-rizobio (a) dependiente de los factores Nod, que implica la formación de un hilo de infección, y (b) independiente de los factores Nod, que posiblemente involucre la acción de citoquinas. Imagen extraída y modificada de <sup>24</sup>.

El mecanismo dependiente de NF implica en una primera instancia un exudado radicular de la leguminosa que incluya moléculas que sean reconocidas y que activan a la proteína NodD, una proteína que se expresa constitutivamente en rizobios y que regula la expresión de los genes *nod* <sup>32</sup>. En este sentido, están muy estudiados los flavonoides liberados por la planta como inductores de la proteína NodD, y se ha demostrado que esta proteína se induce con grupos específicos de flavonoides, por lo que en general se da una interacción específica entre leguminosas y rizobios <sup>33</sup>. La proteína NodD pertenece a una familia de factores de transcripción (LysR), cuyo extremo amino terminal (N-t) es el que reconoce y se une específicamente a flavonoides, mientras que su extremo carboxilo terminal (C-t) es el dominio de unión al ADN. Una vez activa la proteína NodD, esta se une a motivos fuertemente conservados en la caja nod presente en la región promotora de los genes *nod*, induciendo su expresión <sup>34</sup>. Los genes *nod* codifican para distintas enzimas que introducen modificaciones en los llamados NF (lipo-quito-oligosacáridos). Los genes *nodABC* codifican para enzimas que dan lugar al esqueleto de los NF, mientras que otros genes *nod*, *nol* o *noe* codifican para enzimas que introducen modificaciones de esa estructura. Una cepa o especie dada en general produce varios NF, y son esas variaciones estructurales las que están involucradas en la especificidad de huésped <sup>32,35</sup>. En este sentido, la especificidad de la interacción rizobio-leguminosa también implica otros mecanismos, como por ejemplo la producción de polisacáridos de superficie en rizobios que son reconocidos por receptores

de la planta <sup>23</sup>. Estos NF son liberados por la bacteria y reconocidos a nivel de la membrana de la célula de la planta por receptores con motivos extracelulares de lisina y motivos intracelulares quinasa (LysM-RLK). Este reconocimiento inicia una cadena de transducción de señales en la planta huésped, que se prepara para la entrada de la bacteria, durante la cual se da la activación de múltiples genes. Como se puede observar en la **Figura 4**, luego del reconocimiento de NF, se da la expresión de genes que conducen a un cambio en el nivel de calcio intracelular y a un cambio en el citoesqueleto del pelo radicular. Estos cambios conducen a un aumento de las divisiones celulares en la raíz, lo que finalmente concluye con la formación de hilos de infección para la formación del nódulo. Además la señal provista por los NF también estimula la expresión de los genes de síntesis de flavonoides y se propuso que estos interfieren con el transporte de auxinas, hormona de la planta que promueve la división celular <sup>33</sup>.

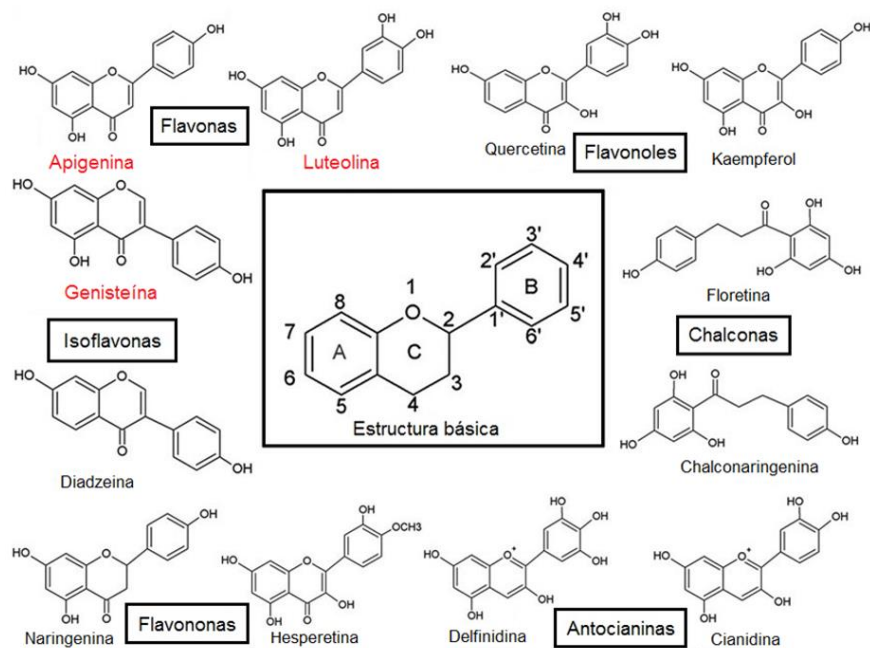


**Figura 4.** Reacciones que desencadenan los factores Nod. Imagen extraída y modificada de <sup>33</sup>.

Si bien la estrategia dependiente de NF ha sido la más exitosa porque es la utilizada por la mayoría de rizobios investigados hasta hoy, se sabe que existen otras estrategias. Estas no involucran únicamente a los genes *nod* sino que también involucran otras moléculas o directamente los genes *nod* no participan en la nodulación. Por ejemplo, existen casos en los que se encuentra involucrado el sistema de secreción tipo 3 (T3SS), que generalmente está controlado por el gen regulador *nodD*, sugiriendo que estos sistemas han sido co-optados por rizobios para propósitos simbióticos durante la evolución. Es decir, los rizobios han usado a los genes *nod* con distintos propósitos pero para el fin común de establecer la simbiosis <sup>23</sup>. A su vez, se han descrito estrategias de nodulación que no involucran ni genes *nod* ni al T3SS; como es el caso de algunas especies de *Bradyrhizobium* que se asocian a plantas del género *Aeschynomene* <sup>23,36</sup>.

#### 1.4.1 Moléculas señal: flavonoides

Los flavonoides son metabolitos secundarios producidos por las plantas. Se conocen más de 9000 flavonoides, los cuales pueden organizarse en distintas clases: Flavonas, Flavononas, Flavonoles, Isoflavonas, Chalconas, Antocianinas (**Figura 5**) <sup>33</sup>. Están presentes en todos los tejidos de la planta, sin embargo en el caso de las leguminosas están particularmente representados en las raíces, pero no está claro si son sintetizados en la raíz o si la síntesis ocurre en el tallo y luego estos son translocados a la raíz para ser acumulados allí <sup>37</sup>. Químicamente pertenecen a una clase de compuestos fenólicos de bajo peso molecular <sup>38</sup>. Su estructura química básica es un esqueleto de 15 carbonos, que consiste en dos anillos bencénicos, A y C, unidos por un anillo pirano heterocíclico, B (**Figura 5**). Las distintas clases de flavonoides varían en su nivel de oxidación y en el patrón de sustitución de los distintos anillos <sup>39</sup>.



**Figura 5.** Estructura básica de los flavonoides y familias más estudiadas: Flavonas, Flavonoles, Isoflavonas, Flavononas, Chalconas, y Antocianinas. En color rojo se muestran los flavonoides que fueron utilizados en este trabajo: luteolina, apigenina y genisteína. Imagen extraída y adaptada de <sup>38</sup>.

Los flavonoides presentan varias funciones importantes en la planta, por ejemplo: participan en la protección frente a factores bióticos como patógenos o herbívoros, estrés abiótico como radiación UV y calor, y debido a sus propiedades antioxidantes también mantienen un estado redox en las células; proveen de color, aroma y gusto a los frutos para que sean atractivos para los animales y así hagan de polinizadores <sup>33</sup>.

Para nuestro particular interés, algunos de estos flavonoides actúan como reguladores de las interacciones simbióticas con microorganismos. En este contexto, concentraciones limitantes de N en el suelo conducen a la secreción de flavonoides en los exudados radiculares de las plantas, actuando como moléculas atrayentes de diazótrofos. Se ha demostrado que ciertos flavonoides estimulan la expresión de los genes *nod*, aunque la capacidad de inducción depende del flavonoide y del rizobio, mientras otros son capaces de inhibirla <sup>33,40</sup>. Por ejemplo en *Rhizobium leguminosarum*, el flavonoide naringenina estimula la expresión de los genes *nod* bacterianos, mientras que la quercetina los reprime, lo cual sugiere una especificidad en la interacción <sup>33</sup>.

## 1.5 Técnicas utilizadas para estudio de la interacción planta-bacteria

### 1.5.1 Genes reporteros

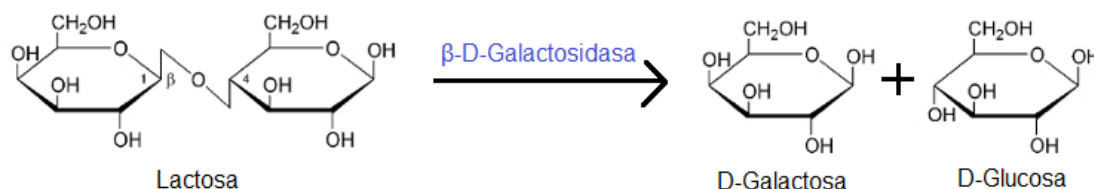
El empleo de genes reporteros es una herramienta ampliamente utilizada en biología molecular con una gran variedad de aplicaciones. Son genes que codifican para proteínas que permiten, por ejemplo, localizar proteínas de interés o monitorear los niveles de expresión génica. Para lograr esto, se fusiona al gen reportero: 1) con el gen que codifica para la proteína de interés que quiere localizarse en la célula u organismo, o 2) con un promotor del cual se pretende estudiar condiciones inductoras. Un gen reportero codifica para una proteína que debe ser estable, inocua para la célula u organismo en el cual está siendo expresada y debe ser fácilmente detectable, incluso aunque esté en pequeñas concentraciones <sup>41</sup>. La expresión del gen reportero puede visualizarse mediante técnicas de microscopía o se puede determinar su nivel de expresión mediante la actividad enzimática de la proteína.

En este contexto, son bastante utilizados el gen *lacZ* y el gen *gfp* que codifican para la enzima  $\beta$ -galactosidasa y la proteína verde fluorescente (GFP), respectivamente.

La GFP es una proteína descubierta en la medusa *Aequorea victoria* en 1961 por Shiomura, pero se expresa y es estable en la mayoría de los metabolismos celulares por lo que es ampliamente usada como gen reportero <sup>16,42</sup>. Es una proteína que fluoresce de color verde brillante cuando se la estimula a una longitud de onda de excitación de 450 a 490 nm, y se monitorea su expresión a una longitud de onda de emisión de 515 nm. Cuando se fusiona al gen *gfp* un promotor o directamente el gen de interés, el nivel de fluorescencia puede ser correlacionado al nivel de expresión de gen <sup>16</sup>. Así también, esta proteína es usada para localizar proteínas en un organismo al fusionarla al gen de la proteína en estudio, esto es posible dado que el tamaño de la GFP es relativamente pequeño y por tanto no modifica la actividad de la proteína a la que se la fusiona <sup>43</sup>. En este contexto, esta proteína se usa para seguir el proceso de infección durante la nodulación, al introducir directamente su secuencia en la bacteria y observando cómo esta se expresa mediante microscopía de láser confocal <sup>1</sup>.

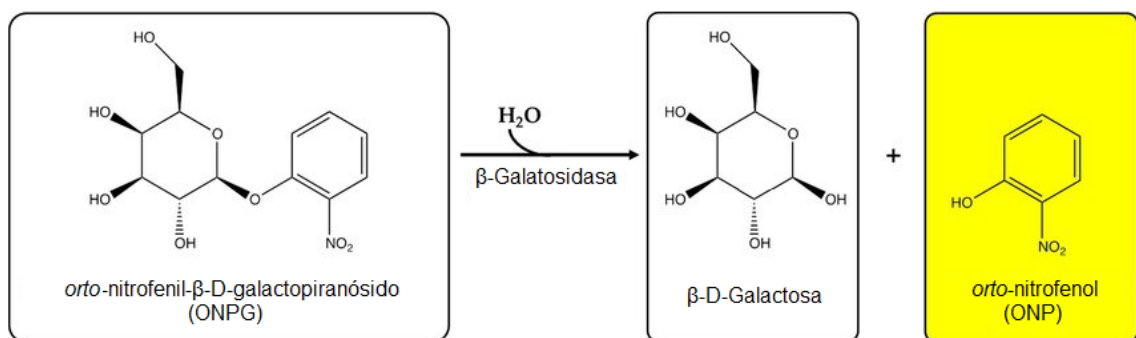
Otra gran ventaja del uso de la *gfp* como gen reportero es que no se deben adicionar sustratos.

El primer gen que fue ampliamente utilizado como gen reportero fue el gen *lacZ* de *E. coli*, donde es importante en el catabolismo de la lactosa. Este gen codifica para la  $\beta$ -galactosidasa ( $\beta$ -gal), enzima que cataliza la hidrólisis de  $\beta$ -galactósidos a monosacáridos (EC 3.2.1.23). El  $\beta$ -galactósido más común es la lactosa, un disacárido entre galactosa y glucosa. La función de la enzima en la célula es escindir la lactosa, resultando como productos monosacáridos la galactosa y la glucosa, que se utilizan como fuente de carbono y energía en la célula (**Figura 6**)<sup>16</sup>.



**Figura 6.** Reacción que cataliza la enzima  $\beta$ -D-galactosidasa. El  $\beta$ -galactósido lactosa es hidrolizado, mediante la acción de la enzima  $\beta$ -D-galactosidasa, a los monosacáridos D-galactosa y D-glucosa.

En biología molecular esta enzima es usada como un gen reportero para monitorear la expresión de genes. El compuesto sintético orto-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido (ONPG) es también reconocido como sustrato de la enzima, que lo escinde para producir galactosa y orto-nitrofenol (ONP) (**Figura 7**). El ONP es un producto de color amarillento, por lo cual la medida de la absorbancia determinada por espectrofotometría a una longitud de onda de 420 nm permite determinar la actividad de la enzima  $\beta$ -gal. Este ensayo se refiere como ensayo de Miller o “Miller essay” y la actividad específica  $\beta$ -gal se expresa en Unidades Miller o “Miller Units”<sup>6</sup>. El funcionamiento de este reportero se basa en el clonado de un promotor delante del gen *lacZ*, así cuando se ensaye una molécula inductora de dicho promotor, entonces se expresará la enzima  $\beta$ -gal. A diferencia del funcionamiento de la GFP, la  $\beta$ -gal necesita de la adición de un sustrato, el ONPG. Al agregarse a la reacción, esta enzima lo hidrolizará dando lugar al producto coloreado ONP (**Figura 7**).



**Figura 7.** Reacción de hidrólisis de ONPG. El ONPG es hidrolizado por la enzima β-galactosidasa para liberar los productos β-D-galactosa y ONP. La presencia del producto ONP de color amarillento es indicativo de la actividad de la enzima en el ensayo denominado “Miller essay”.

## 2 ANTECEDENTES

Durante este trabajo se buscó entender la dinámica de expresión del operón *nod* en dos cepas nativas de *Cupriavidus*, *Cupriavidus necator* UYPR2.512 y *Cupriavidus* sp. UYMMa02A, utilizando como cepa control a *Cupriavidus taiwanensis* LMG19424.

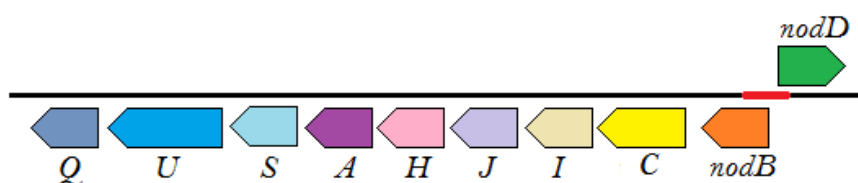
La cepa LMG19424 de *C. taiwanensis* fue aislada de nódulos de *Mimosa púdica* en Taiwán en 2001 por Chen y colaboradores. Posteriormente se determinó su capacidad de formar asociaciones simbióticas efectivas con diversas especies de *Mimosa*, mostrando su capacidad de infectar las raíces a través de la formación de hilos de infección e inducir la formación de nódulos en donde se expresa la nitrogenasa <sup>44</sup>. Su genoma secuenciado, el primero para un  $\beta$ -rizobio, se presentó en 2008 por Amadou y colaboradores.

La cepa *C. necator* UYPR2.512 fue aislada de nódulos de una leguminosa arbórea nativa de Uruguay, *Parapiptadenia rigida* (Angico) <sup>3</sup>. Para poder determinar el género y especie de esta cepa se estudió con qué especie tenía mayor porcentaje de identidad de secuencia del gen que codifica para el ARNr 16S. El resultado permitió determinar que pertenece al género *Cupriavidus*, y que estaba más emparentada con la especie *C. necator* (bacteria aislada del suelo, predadora no obligada de bacterias del suelo <sup>15</sup>) que con *C. taiwanensis*, que hasta ese momento era la única especie dentro del género *Cupriavidus* que tenía cepas de rizobios. La cepa *C. necator* UYPR2.512 es capaz de nodular y promover el crecimiento de plantas inoculadas de *Parapiptadenia rigida* (su hospedero original) así como de la planta modelo *Mimosa púdica* <sup>15</sup>. Su genoma completo secuenciado se presentó en el artículo De Meyer (2015).

Por otro lado, la cepa de *Cupriavidus* sp. UYMMa02A fue aislada de nódulos de *Mimosa magentea* (Platero et al., 2016) y su genoma fue presentado en el artículo de Iriarte (2016), proponiéndose como una nueva especie de *Cupriavidus* estrechamente relacionada con las especies *C. taiwanensis* y *C. necator* <sup>4,45</sup>.

El análisis de los genomas de estas bacterias mostró que el contexto genómico del operón *nod* (**Figura 8**), (1.3.3 Genes simbióticos) muestra que en los dos

modelos bacterianos nativos usados en este trabajo los genes *nod* tienen un orden muy similar al observado en *C. taiwanensis*.



**Figura 8.** Contexto genómico del operón *nod* en *Cupriavidus*. Corriente abajo se observan los genes *nodBCIJHASUQ* y corriente arriba en color verde se observa el regulador transcripcional *nodD*, de expresión constitutiva.

La proteína NodD es un activador de la transcripción que se une a la caja *nod* controlando la expresión del operón *nod*. El gen *nodD*, que se encuentra corriente arriba, se expresa en un sentido y el resto de los genes *nod*, que se encuentran corriente abajo, se expresan en el sentido contrario. El vector pCBM01 (4.2 Vectores) construido por Marchetti (2010) incluye una fusión transcripcional *nodB-lacZ*. El fragmento *nodB* de la construcción incluye la secuencia de la caja *nod* de *C. taiwanensis*, donde se une la proteína NodD (secuencia intergénica *nodB-nodD*), lo cual inducirá la expresión del operón *nod* (**Figura 8**).

A su vez, como se comentó previamente en la introducción (1.4.1 Moléculas señal: flavonoides), la expresión de los genes *nod* se induce en presencia de flavonoides. En este marco, se ha reportado que los flavonoides luteolina y apigenina (**Figura 5**) serían capaces de inducir la expresión de los genes *nod* en *C. taiwanensis* (**Tabla 1**), dado que inducen la expresión del gen *lacZ* presente en el vector pCBM01 <sup>1,2</sup>.

**Tabla 1.** Actividad  $\beta$ -galactosidasa (en unidades Miller) de los vectores pCBM01 (*pnodB-lacZ*) y pCZ388 (*lacZ* sin promotor) en una cepa derivada de LMG19424 incubada durante 24 h en presencia de flavonoides usando 5  $\mu$ M de apigenina o 15  $\mu$ M de luteolina como inductor. Tabla extraída de Saad (2012) <sup>1,2</sup>.

|               | Actividad $\beta$ -Galactosidasa ( $\pm$ SD) |                    |                    |
|---------------|----------------------------------------------|--------------------|--------------------|
|               | Sin inducir                                  | Apigenina          | Luteolina          |
| <b>pCZ388</b> | 25,8 ( $\pm$ 7,3)                            | 18,5 ( $\pm$ 8,8)  | 20,2 ( $\pm$ 10,1) |
| <b>pCBM01</b> | 89,6 ( $\pm$ 8,8)                            | 2.689 ( $\pm$ 322) | 2.287 ( $\pm$ 125) |

### **3 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

#### **3.1 Hipótesis**

Si bien durante la simbiosis entre  $\beta$ -rizobios y sus leguminosas hospederas intervienen una gran diversidad de moléculas, dicho establecimiento involucra un reconocimiento específico, en el cual los flavonoides tienen un rol crucial.

#### **3.2 Objetivo general**

Determinar la dinámica de la expresión del operón *nod* en rizobios nativos pertenecientes al género *Cupriavidus*.

#### **3.3 Objetivos específicos**

- 1) Validar el uso de un vector con la fusión transcripcional *pnodB-lacZ* en los  $\beta$ -rizobios nativos *C. necator* UYPR2.512 y *Cupriavidus* sp. UYMMa02A.
- 2) Estudiar la dinámica de la inducción de *pnodB* en presencia de distintos flavonoides sintéticos en los  $\beta$ -rizobios nativos *C. necator* UYPR2.512 y *Cupriavidus* sp. UYMMa02A.
- 3) Construir un vector reportero empleando la secuencia del promotor *nod* de la cepa *Cupriavidus* sp. UYMMa02A.

## 4 MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Cepas

Se utilizó la cepa de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  <sup>46</sup> para obtener células competentes, a las cuales transformar con los vectores y así aumentar el número de copia de los mismos. Las cepas de *E. coli* fueron incubadas en medio Luria-Bertani o LB <sup>47</sup> a 37°C.

Las cepas de *Cupriavidus*, LMG19424, UYMMa02A y UYPR2.512 (**Tabla 2**), se incubaron en medio LB y en medio mínimo M9 <sup>47</sup>, a 30°C.

**Tabla 2.** Características de las cepas utilizadas durante este trabajo.

| Cepa                                        | Información/Características                                                                                   | Uso                                                 | Referencia                               |
|---------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|------------------------------------------|
| DH5 $\alpha$<br><i>Escherichia coli</i>     | Nal <sup>R</sup> . Cepa para mantenimiento de plásmidos                                                       | Para transformaciones y conjugaciones triparentales | Stock del laboratorio                    |
| UYMMa02A<br><i>Cupriavidus</i> sp.          | Nf <sup>R</sup> . Aislada de <i>Mimosa magentea</i> , Uruguay                                                 | Cepa de estudio                                     | Platero et al. 2016; Iriarte et al. 2016 |
| UYPR2.512<br><i>Cupriavidus necator</i>     | Nf <sup>R</sup> . Aislada de <i>Parapitadenia rígida</i> , Uruguay. Secuenciada por Ion Torrent.              | Cepa de estudio                                     | Taulé et al. 2012; De Meyer et al. 2015  |
| LMG 19424<br><i>Cupriavidus taiwanensis</i> | Nf <sup>R</sup> . Aislada de <i>Mimosa púdica</i> , Taiwán. Primer genoma de beta rizobio secuenciado (2008). | Cepa modelo                                         | Chen et al. 2001; Amadou et al. 2008     |

### 4.2 Vectores

Con el fin de evaluar la expresión del operón *nod*, se estudió la expresión del promotor del primer gen del operón, el gen *nodB* (*pnodB*). Para esto se utilizaron los vectores pCBM01 y pCC0119 (**Tabla 3**), los cuales contienen fusiones transcripcionales *pnodB-lacZ* (en donde *pnodB* corresponde a la región promotora del gen *nodB* de LMG19424) o *pnodB-gfp* (en donde *pnodB* corresponde a la región promotora del gen *nodB* de UYMMa02A) <sup>42,48</sup>,

respectivamente. Como controles se utilizaron los vectores vacíos parentales (desprovistos de promotor) pCZ388 y pOT2 (**Tabla 3**) <sup>49,50</sup>.

Los vectores pCBM01 y pCZ388 tienen el gen que codifica para la resistencia a tetraciclina (Tc), mientras que los vectores pCC0119 y pOT2 tienen el gen que codifica para la resistencia a gentamicina (Gm). Se usaron los antibióticos con las siguientes concentraciones: 8 µg/ml de Tc y 20 µg/ml de Gm. Para realizar las conjugaciones (4.5 Mecanismo de adquisición de ADN foráneo) se utilizó como vector “helper” al pRK600, que tiene el gen que codifica para la resistencia a Cloranfenicol (Cf) <sup>51</sup>.

**Tabla 3.** Características de los vectores utilizados.

| Vector  | Características                                                                                                            | Referencia              |
|---------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| pRK600  | Vector “helper” que asiste la conjugación triparental, porque tiene genes <i>tra</i> ; Cf <sup>R</sup> .                   | Kessler et al. (1992)   |
| pCZ388  | Es un derivado de pLAFR6 que contiene el gen <i>lacZ</i> sin promotor; Tc <sup>R</sup> . Tamaño aproximado de 20 kb.       | Cunnac et al. (2004)    |
| pCBM01  | pCZ388 conteniendo 401 bp del promotor <i>nodB</i> de LMG19424; Tc <sup>R</sup> . Tamaño aproximado de 20 kb.              | Marchetti et al. (2010) |
| pOT2    | Vector de clonado que contiene el gen de la proteína verde fluorescente, <i>gfp</i> ; Gm <sup>R</sup> . Tamaño de 5335 pb. | Allaway et al. (2001)   |
| pCC0119 | pOT2 conteniendo 415 pb del promotor <i>nodB</i> de UYMMa02A; Gm <sup>R</sup> . Tamaño aproximado de 5800 pb.              | En este trabajo         |

### 4.3 Extracción de ADN plasmídico

Se realizaron extracciones de ADN plasmídico (miniprep) en cepas de *E. coli* con el fin de transformar con ese ADN cepas de *Cupriavidus*, y en el caso del vector pOT2 también para la construcción de pCC0119. Dependiendo del caso se realizaron minipreps mediante 2 metodologías: a) método convencional (lisis alcalina) y b) mediante la utilización de un kit comercial.

a) Método convencional - Lisis alcalina <sup>52</sup>

Se partió de un cultivo bacteriano en 5 ml de medio LB líquido suplementado con el antibiótico correspondiente, el cual fue incubado “overnight” (ON) a 37°C (cepas de *E. coli*) o 30°C (cepas de *Cupriavidus*) en un agitador con aireación a 200 rpm. Finalizado ese tiempo, se traspasó el volumen a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml, el cultivo fue centrifugado a 14.000 g durante 90 segundos, y el sobrenadante fue descartado. Esta acción se repitió hasta terminar los 5 ml de cultivo. El “pellet” celular se resuspendió en 300 µl de solución I fría (Anexo), de forma opcional se agregaron 5 µl de ARNasa 1 mg/ml. Se adicionaron 300 µl de solución II fresca (Anexo), se invirtió el tubo 4 veces y se esperaron 5 min. Opcionalmente se pueden agregar 300 µl cloroformo y vortexear con el tubo al revés. Se agregaron 300 µl de solución III (Anexo) fría y se vortexeó con el tubo al revés. La resuspensión se centrifugó a 14.000 g durante 10 min a 4°C, se retiró la fase superior (conteniendo el ADN deseado) y se traspasó a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml nuevo. El ADN se precipitó, agregando 0,7 volúmenes de isopropanol al tubo. La reacción se centrifugó a 14.000 g durante 30 min a 4°C, se descartó el sobrenadante, se le adicionaron 500 µl de etanol 70 % (v/v), y se centrifugó a 14.000 g durante 5 min a 4°C. Luego se descartó el sobrenadante, y el “pellet” celular se secó por centrifugación mediante SpeedVac. Finalmente el “pellet” se resuspendió en 50 µl de H<sub>2</sub>O mQ, y se almacenó a -20°C.

#### b) Método mediante kit comercial

Se cosecharon las células en las mismas condiciones que en el método convencional. Se utilizó el kit comercial de Thermo Fisher, PureLink™ Quick Plasmid DNA Miniprep Kit (Invitrogen), de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

### 4.4 Obtención de células competentes

Con el fin de obtener células competentes (con alta eficiencia de incorporación de ADN plasmídico), se evaluaron dos metodologías que se detallan a continuación.

#### a) Obtención de células quimiocompetentes

Con el objetivo de obtener células competentes de *E. coli*, la cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$  se creció a partir de una placa fresca en 5 ml de medio LB líquido, ON a 37°C, en un agitador (o “shaker”) con aireación a 200 rpm. Se realizó una dilución 1/100 a un matraz con medio LB líquido y se incubó a 30°C en un agitador con aireación a 200 rpm, hasta que el cultivo alcanzó unas 10<sup>7</sup> células/ml (DO<sub>620nm</sub> 0,2-0,3). Se fraccionó el cultivo en tubos de 50 ml estériles y se recuperaron las células mediante centrifugación a 2.000-3.000 g durante 5 min, a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el “pellet” se resuspendió en una solución de CaCl<sub>2</sub> 0,1 M frío (20 ml de CaCl<sub>2</sub> 0,1 M por cada 50 ml de cultivo original) y se mantuvo en hielo durante 20 min. Nuevamente se recuperaron las células centrifugando a 2.000-3.000 g durante 5 min, a 4°C. El sobrenadante se descartó y el “pellet” se resuspendió en una solución de CaCl<sub>2</sub> 0,1 M frío (0,5 ml de CaCl<sub>2</sub> 0,1 M por cada 50 ml de cultivo original). Dado que las células ya estaban competentes se suspendieron con pequeños golpeteos alternando con períodos de hielo. En caso de que se fueran a usar otro día, las células se guardaron a -80°C en glicerol 20 %.

#### b) Obtención de células electrocompetentes

Se partió de un inóculo de la cepa de interés de *Cupriavidus* en 5 ml de medio LB líquido y se incubó ON a 30°C en un agitador con aireación, a 200 rpm. Se traspasaron 1,5 ml a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml y el cultivo fue centrifugado a 8.000 g, durante 2 min y se descartó el sobrenadante. Se lavó el “pellet” 3 veces con 1 ml de H<sub>2</sub>O destilada estéril y se resuspendió en 100  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O destilada estéril (modificado de <sup>53</sup>).

## 4.5 Mecanismos de adquisición de ADN foráneo

### I. Transformación

#### a) Transformación por shock térmico

La transformación por shock térmico de las quimiocompetentes de la cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$  con los ADN plasmídicos de interés se realizó a partir de 100  $\mu$ l de células competentes frescas (o 200  $\mu$ l si se encontraban almacenadas con glicerol a -80°C). A las células competentes se les adicionó entre 1 y 10  $\mu$ l de

ADN plasmídico (o reacción de ligación) y la mezcla se mantuvo en hielo durante 10 min, siempre se incluyó como control un tubo de células competentes que no recibió ADN. Pasados los 10 min en hielo, las células competentes se incubaron en un baño a 42°C durante 90 segundos, e inmediatamente se colocaron en hielo durante 2 min. Seguidamente se les adicionó 1 ml de medio LB líquido y se incubaron durante 1 h a 37°C en un agitador a 200 rpm, para permitir a las células competentes recuperar el ADN y expresar la resistencia al antibiótico. Finalmente, se plaquearon 100 µl de cada preparación en placas de LB sólido con el antibiótico correspondiente, y se incubaron a 37°C, hasta la aparición de colonias transformantes.

#### b) Transformación por electroporación

La transformación de células competentes de *Cupriavidus* se realizó mediante la técnica de electroporación. A un volumen de 100 µl de células competentes preparadas como se describió anteriormente se le adicionó el ADN plasmídico de interés. Siempre se incluyó como control un tubo de células sin ADN. Se utilizaron cubas de electroporación de 1 mm, a las que se les agregó las células competentes con el ADN plasmídico y se las sometió a un pulso de 1,70 kV en un electroporador Modelo Micropulser (BIORAD). Luego de electroporadas las células, se les adicionó 1 ml de medio LB líquido y se traspasó el volumen a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. Para permitir que las células se recuperen y que incorporen el vector, se las incubó a 30°C en un agitador con aireación a 200 rpm, entre 2 y 4 h. Finalizado el tiempo de incubación, se plaquearon 100 µl de cada preparación en placas de medio LB sólido con el correspondiente antibiótico, y se incubaron a 30°C hasta la aparición de colonias transformantes.

## II. Conjugación

Se realizó una conjugación triparental para introducir los ADN plasmídicos pCZ388 y pCBM01 en las siguientes cepas: *C. taiwanensis* LMG19424, *C. necator* UYPR2.512 y *Cupriavidus* sp. UYMMa02A. Como cepa donadora se utilizó *Escherichia coli* DH5α portando los ADN plasmídicos de interés (Tc<sup>R</sup>), como cepa “helper” se usó *Escherichia coli* pRK600 (Cf<sup>R</sup>) y como cepas receptoras las cepas de *Cupriavidus* (Nf<sup>R</sup>) nombradas anteriormente. A partir de una colonia bacteriana fresca se realizó un inóculo en 5 ml de medio LB líquido,

suplementado con el respectivo antibiótico y se incubó ON en un agitador con aireación, a 200 rpm, a 37°C las cepas de *E. coli* y a 30°C las cepas de *Cupriavidus*. Luego de transcurrido ese tiempo, se realizó una dilución 1/100 en medio LB líquido sin antibiótico y se incubó nuevamente en las mismas condiciones, hasta que los cultivos alcanzaron una DO<sub>620nm</sub> 0,2-0,3. Alcanzada esa DO, se tomaron 100 µl de cada cultivo y se mezclaron en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml, mediante las siguientes relaciones: pCBM01 / pCZ388 + pRK600 + LMG19424 / UYPR2.512 / UYMMa02A. Para corroborar que las cepas parentales utilizadas en las conjugaciones no crecieran en las condiciones de selección, se hicieron controles en los que cada cepa se plaqueó en las condiciones de selección. Se centrifugó el cultivo, se descartó el sobrenadante, y el “pellet” fue resuspendido en 50 µl. Se colocó un volumen aproximado de 10 µl de cada preparación en una placa de LB sólido sin antibiótico, se dejó secar la gota, y se incubaron ON a 30°C. Finalizado este tiempo, se tomó una ansada de cada crecimiento bacteriano en placa y se resuspendió en 500 µl de medio LB líquido en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. Se tomaron 70 µl de cada resuspensión y se plaquearon en placas de LB sólido con los antibióticos Tc y Nitrofurantoina (Nf). La Tc permite seleccionar las cepas con los vectores de interés pCZ388 y pCBM01, y la Nf permite seleccionar a las cepas de *Cupriavidus*, ya que inhibe el crecimiento de cepas de *E. coli*.

#### 4.6 Amplificación por PCR

Todas las reacciones de polimerización de cadena (PCR) fueron llevadas a cabo utilizando el kit comercial de Bioline, MangoMix™, según las recomendaciones del fabricante. El programa de PCR utilizado fue el siguiente: un ciclo de desnaturalización inicial de 5 min a 95°C, seguido de 25 ciclos de desnaturalización de 30 segundos a 95°C, hibridación de cebadores de 30 segundos a 58°C y extensión de 1 minuto a 72°C, por último se realizó un ciclo de extensión final de 5 min a 72°C.

La presencia de los vectores en las cepas transformadas se verificó mediante PCR empleando como molde de ADN la incorporación directa de una colonia en la preparación de la reacción. Alternativamente se empleó la técnica de lisado

de colonia bacteriana para la obtención del ADN molde. En este último caso, en 100 µl de H<sub>2</sub>O mQ se resuspendió una ansada de colonias de la cepa a analizar y se mezcló mediante vórtex. Se centrifugó a 8.000 g durante 2 min y se descartó el sobrenadante. El “pellet” se resuspendió en 100 µl de NaOH 0,05 M y se incubó a 100°C durante 4 min. Se finalizó la reacción colocándola en hielo durante 2 min, se completó hasta un volumen de 1000 µl con H<sub>2</sub>O mQ, y se centrifugó a 8.000 g durante 2 min. Se traspasaron 700 µl del sobrenadante a un nuevo tubo de microcentrífuga de 1,5 ml y se almacenó a -20°C. Se emplearon 5 µl de esta solución como molde en la reacción de PCR.

Se utilizaron los pares de cebadores correspondientes de forma de amplificar un fragmento de cada vector que permitiese verificar que el mismo se encontraba presente en dicha colonia. Se utilizó una concentración 0,5 µM de cada cebador, Forward (F) y Reverse (R), por cada 20 µl de reacción. Con el fin de verificar la presencia de los vectores pCZ388 y pCBM01, se utilizaron los cebadores TetA R y F <sup>54</sup>, que amplifican un fragmento aproximado de 200 pb, correspondiente al gen de la tetraciclina. Para verificar la presencia del vector pOT2, se utilizaron los cebadores pOT1 R y F <sup>50</sup>, que amplifican un fragmento de aproximadamente 200 pb (los cebadores pOT1 son los utilizados para pOT2, dado que ambos vectores comparten secuencia). A su vez, también se utilizó la reacción de PCR para la construcción y la verificación de la presencia de pCC0119 (detallado en el apartado 4.10 Construcción de vector *pnodB-gfp*).

**Tabla 4.** Secuencias nucleotídicas de cebadores utilizados y fragmentos que amplifican. Los cebadores pNodB415 contienen la secuencia de corte para las enzimas de restricción (en color rojo); *KpnI* reconoce los sitios GGTAC<sup>^</sup>C, y *PstI* reconoce los sitios CTGCA<sup>^</sup>G.

| Cebadores        | Secuencia                      | Producto amplificado                                                             |
|------------------|--------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| TetA R           | CATAGATCGCCGTGAAGAGG           | TetA de 200 pb                                                                   |
| TetA F           | GCTACATCCTGCTTGCCTTC           |                                                                                  |
| pOT1 R           | CGGTTTACAAGCATAAAGC            | Fragmento de 200 pb del vector pOT2                                              |
| pOT1 F           | CATTTTTCTTCCTCCACTAGTG         |                                                                                  |
| pNodB415L-R-KpnI | GGGGTACCTGACGCGAGCGTCACGTTCCCG | Región intergénica <i>nodB-nodD</i> de 415 pb de <i>Cupriavidus</i> sp. UYMMa02A |
| pNodB415-F-PstI  | AACTGCAGCCTCGCTACAGCTGCGCTC    |                                                                                  |

#### 4.7 Geles de electroforesis

La visualización de ADN plasmídico, productos de digestión y fragmentos amplificados mediante la reacción de PCR, fue llevada a cabo mediante la electroforesis en gel de agarosa 1 %, en buffer TAE 1X (Anexo), a un voltaje de 85 volts. Se utilizaron 2 µl del intercalante (GoodView, SBS Genetech Co., Ltd.) por cada 50 ml agarosa y 2 µl del marcador de peso molecular (GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, Thermo Fisher).

#### 4.8 Ensayo de determinación de la actividad de la enzima β-galactosidasa

El ensayo de determinación de actividad enzimática β-galactosidasa (β-gal) fue llevado a cabo mediante la adaptación del protocolo de Miller (1972) para *E. coli* <sup>6</sup>. Se partió de un cultivo primario de las cepas de *Cupriavidus* portando los vectores pCBM01 o pCZ388 en 5 ml de medio LB líquido, el cual se incubó ON a 30°C, en un agitador con aireación, a 200 rpm. Finalizado este tiempo, se

realizó una dilución 1/100 (v/v) en medio fresco LB líquido y se lo suplementó con el flavonoide a estudiar como posible inductor, se incluyó un control sin inducir. Los flavonoides sintéticos luteolina y genisteína fueron disueltos en DMSO y el flavonoide apigenina fue disuelto en KOH 1M (los tres flavonoides de Sigma-Aldrich). Finalizado el tiempo de inducción utilizado, se determinó la  $DO_{620nm}$  y se centrifugaron 2 ml del cultivo a 5.000 g. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el “pellet” celular en 1 ml de buffer Z (Anexo). De esta resuspensión se tomaron 100  $\mu$ l y se les adicionó 500  $\mu$ l de buffer Z. Para lisar las células se adicionaron 25  $\mu$ l SDS 0.1 %, 50  $\mu$ l cloroformo, se mezcló mediante vórtex y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente.

Para dar inicio a la reacción ( $t=0$ ) se agregaron 200  $\mu$ l del sustrato ONPG (4 mg/ml) (Anexo), se mezcló mediante vórtex y se incubó a 37°C hasta observar coloración amarillenta ( $t$ ), momento en que se detuvo la reacción con 500  $\mu$ l de  $Na_2CO_3$  1M. Se centrifugó la preparación durante 7 min, a 8.000 g. Se determinó la absorbancia a 420 nm del sobrenadante y se cuantificó la actividad enzimática específica según las unidades Miller (“Miller Units”):

$$AE = \frac{Abs_{420}}{b \cdot \varepsilon \cdot \Delta t \cdot DO_{620} \cdot 0,5} \cdot FD$$

Suponiendo que el flavonoide utilizado es un inductor del *pnodB* (presente en pCBM01), entonces este permitirá la expresión del gen reportero que tiene fusionado, el gen *lacZ*. Al expresarse el *lacZ*, este se transcribirá y traducirá dando lugar a la formación de la proteína  $\beta$ -gal. Dicha proteína es la enzima que hidrolizará el ONPG que se agregue a la reacción dando lugar al producto coloreado ONP (**Figura 7**). Por lo que su presencia/ausencia nos informará si el flavonoide utilizado es o no un inductor del *pnodB*, respectivamente.

#### 4.9 Alineamiento de secuencias

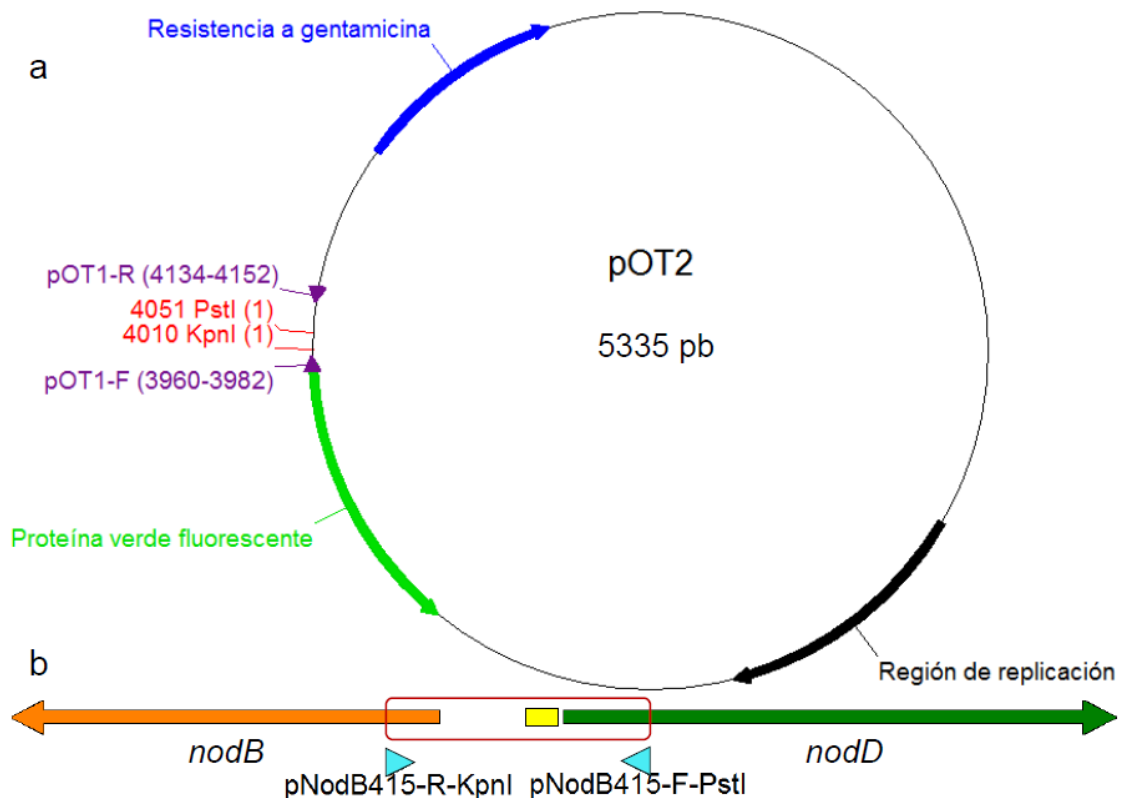
Para estudiar las similitudes y disparidades de las secuencias nucleotídicas de la región intergénica *nodB-nodD* y del gen *nodD* entre las tres cepas de *Cupriavidus* de interés de este trabajo, se realizó en primer lugar una búsqueda en el GenBank (en la base de datos “Nucleotide”) del NCBI (“National Center for

Biotechnology Information”). Luego de encontradas dichas secuencias, se las descargó y se procedió a alinearlas, para lo que se utilizaron los programas ApE (A plasmid Editor) y MEGA-X (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) <sup>55,56</sup>. El ApE se utilizó para alinear las secuencias nucleotídicas de la región intergénica *nodB-nodD*, mientras que con el MEGA-X se alinearon las secuencias nucleotídicas del gen *nodD* (con el algoritmo ClustalW) y también se tradujeron dichas secuencias según el código genético estándar y se alinearon las secuencias aminoacídicas resultantes (con el algoritmo MUSCLE).

#### 4.10 Construcción de vector *pnodB-gfp*

Por una parte, un fragmento de 415 pb, correspondiente a la región intergénica *nodB-nodD* (fragmento *pnodB* que contiene a la caja *nod*) de *Cupriavidus* sp. UYMMa02A, fue amplificada por PCR a partir de ADN genómico (del que se disponía) de dicha cepa con cebadores específicamente diseñados (**Figura 9b**). Los cebadores utilizados fueron los pNodB415 F y R, que contienen secuencias de reconocimiento de corte para las enzimas de restricción *Pst*I y *Kpn*I, respectivamente (**Tabla 4**).

En paralelo, se realizó una miniprep convencional del vector pOT2 contenido en *E. coli*. Este vector contiene el gen que codifica para la proteína GFP y el gen que le confiere resistencia a Gm (**Figura 9a**). En su secuencia presenta sitios únicos de corte para las enzimas de restricción *Pst*I y *Kpn*I.



**Figura 9.** (a) Mapa del vector de clonado pOT2. En color azul se indica el gen de resistencia al antibiótico gentamicina (Gm); en color verde, el gen de la proteína verde fluorescente (*gfp*); en color negro, la región de replicación del vector (pBBR1 oriV); en color rojo se observan los sitios únicos de corte de las enzimas de restricción usadas para el clonado del fragmento *pnodB* de *Cupriavidus* sp. UYMMa02A, *PstI* y *KpnI*; y en color violeta se observan los sitios donde hibridan los cebadores pOT1 R y F. (b) Región *nodB-nodD* de *Cupriavidus* sp. UYMMa02A. En rojo se remarca el fragmento de 415 pb de *pnodB* a amplificar de *Cupriavidus* sp. UYMMa02A y clonar en el vector pOT2; las flechas celestes indican los sitios en donde hibridan los cebadores pNodB415; y entre los genes de *nodB* (flecha naranja) y *nodD* (flecha verde) se encuentra la caja *nod* (rectángulo amarillo). Figuras realizadas con el programa ApE <sup>55</sup>.

Una vez obtenidos el fragmento *pnodB* de *Cupriavidus* sp. UYMMa02A y el vector pOT2, estos fueron digeridos con las enzimas de restricción *PstI* 10 U/μl (Fermentas) y *KpnI* 10 U/μl (Promega). Dichas enzimas no presentan una alta actividad de corte utilizando el mismo buffer de reacción, sino que presentan 100 % de actividad en los buffer O y J, respectivamente. Por lo tanto, para poder obtener los productos digeridos con ambas enzimas, se realizaron digestiones consecutivas, intercaladas de purificaciones por precipitación. Para asegurarnos que ambas cortaran eficientemente, se realizaron reacciones de digestión en

paralelo e independientemente. Para ello, se realizó una primera digestión con la enzima *Pst*I y luego con *Kpn*I, y en otro caso la digestión se realizó en orden inverso. En un volumen final de 50 µl se digirieron 20 µl de ADN (fragmento *pnodB* o miniprep del vector pOT2) con 1 µl de enzima y 5 µl de buffer 10X. Se incubaron las reacciones de digestión ON a 37°C. Luego se procedió a purificar los fragmentos digeridos. Para esto a la reacción se le adicionó 2,5 volúmenes de etanol 100 % y 1/10 de su volumen de acetato de sodio 3 M pH 5,2 y se incubó ON a -20°C. Al finalizar ese tiempo, se centrifugó a 12.000 g, a 4°C durante 30 min, se descartó el sobrenadante y se le adicionó 1 ml de etanol frío 70 %. Se centrifugó por 5 min en las mismas condiciones, se descartó el sobrenadante y se centrifugó en SpeedVac (Labconco Corporation) hasta sequedad. A continuación, se resuspendió el "pellet" en 42 µl de H<sub>2</sub>O mQ, se le adicionó 5 µl buffer de enzima y 3 µl enzima, incubando ON a 37°C. Se repitió el mismo proceso de purificación que para la primera digestión, y para finalizar se resuspendió el "pellet" en H<sub>2</sub>O mQ.

Con el objetivo de clonar el fragmento *pnodB* en el vector pOT2, una vez obtenidos ambos productos doblemente digeridos y purificados, se unieron con la enzima T4 ADN Ligasa. En un volumen final de 10 µl se mezclaron distintas relaciones de cantidades de inserto/vector (concentraciones por estimación a partir de gel de agarosa: 14 ng/µl de inserto y 6 ng/µl de vector), con 0,5 µl de enzima y 1 µl de buffer 10X. Las reacciones de ligación fueron incubadas a diferentes tiempos y temperaturas. Se incluyó un control del vector sin inserto y un control del vector sin Ligasa.

Se probaron las siguientes relaciones en 10 µl de ligación inserto/vector: 1) 6,5 µl de inserto/2 µl de vector, y 3 µl de inserto/5,5 µl de vector, ambas reacciones se incubaron ON a 37°C; 2) 2 µl de vector/6,5 µl de inserto, y se incubó durante 2 h a 16°C; y 3) 2,5 µl de vector/6 µl de inserto, y 7 µl de inserto/1 µl de vector y ambas reacciones se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente. Los productos de ligación obtenidos fueron utilizados para transformar células quimiocompetentes de *E. coli* DH5α mediante el procedimiento de shock térmico (4.5 Mecanismos de adquisición de ADN foráneo). Con el fin de comprobar, si las colonias transformantes presentaban el fragmento *pnodB*, se las procesó mediante lisado de colonia para posteriormente amplificar el fragmento *pnodB*

mediante reacción de PCR, utilizando el par de cebadores pNodB415 F y R. A continuación, se realizó la miniprep mediante kit de las colonias transformantes que presentaron el inserto. Con el fin de comprobar que los fragmentos clonados no tuvieran mutaciones, los vectores fueron secuenciados en el servicio de Macrogen, Korea y dichas secuencias fueron comparadas con la original.

#### 4.11 Evaluación de la expresión del vector *pnodB-gfp*

Una vez confirmado por secuenciación un clon que se denominó pCC0119, este fue transformado por electroporación a las cepas de *Cupriavidus* spp. UYMMa02A y UYPR2.512. Lo siguiente fue estudiar la producción de fluorescencia en presencia de inductores del *pnodB*. Para esto primero se largaron cultivos primarios de las cepas de *Cupriavidus* spp. UYMMa02A y UYPR2.512 conteniendo el pCC0119 y también como control de fluorescencia las mismas cepas con el vector pOT2. Dichos cultivos fueron de 5 ml del medio LB líquido con Gm, que se incubaron ON en un agitador a 200 rpm, a 30°C. Finalizado el tiempo de incubación, se tomaron 20 µl del cultivo crecido y se agregaron a 3 ml de medio LB líquido con Gm. Para cada cultivo se largó un tubo sin inductor, como control, y otro con una concentración final de 5 µM de luteolina y se incubaron en las mismas condiciones. Para medir la fluorescencia se colocó una alícuota de 200 µl en una placa de ELISA para medir en el Varioskan™ (Thermo Fisher Scientific), la excitación se efectuó con una longitud de onda de 405 nm, y se midió su emisión a una longitud de onda de 505 nm<sup>50</sup>.

#### 4.12 Curvas de crecimiento

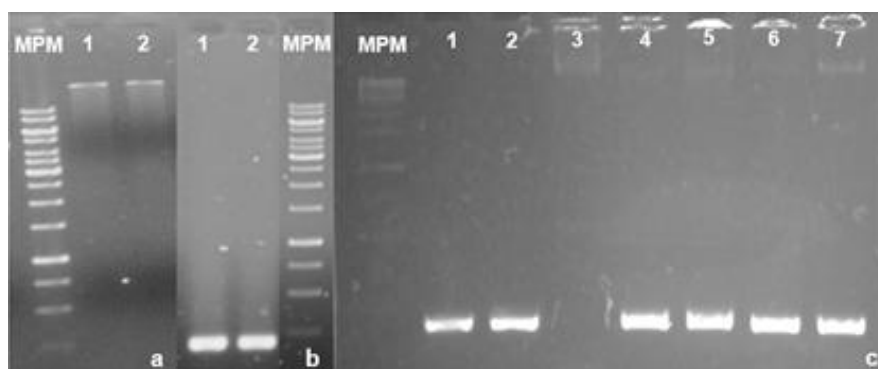
Con el fin de evaluar si el flavonoide luteolina tenía efecto en el crecimiento de las cepas en estudio, *Cupriavidus* spp. UYMMa02A y UYPR2.512, se agregaron distintas concentraciones del mismo (15 µM, 150 nM y 1,5 nM) al medio de cultivo. Se partió de un cultivo primario de 5 ml en medio líquido M9 suplementado con citrato como fuente de carbono de cada cepa de *Cupriavidus* y se incubó ON a 30°C. Finalizado este tiempo, se determinó la DO<sub>620nm</sub> del cultivo y luego se transfirió 1 ml de cultivo a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml

y se centrifugó a 5000 rpm durante 5 min y se descartó el sobrenadante. El “pellet” celular, se resuspendió en 1 ml de NaCl 0,9 % y se normalizaron los cultivos en medio líquido M9 a una  $DO_{620nm}$  de 0,1. En una placa de ELISA se agregaron 20  $\mu$ l del cultivo normalizado ( $DO_{620nm}$  de 0,1), 160  $\mu$ l de medio de cultivo M9 fresco y 2  $\mu$ l de una solución de luteolina de concentración adecuada para lograr una concentración final de 15  $\mu$ M, 150 nM o 1,5 nM de luteolina. Como controles se utilizaron: 1) cultivo sin flavonoide y 2) cultivo con DMSO sin flavonoide. Se realizaron triplicados de cada condición. La placa de ELISA con las muestras se colocó en un lector de placas Varioskan, se incubó durante 62 h. Se realizaron medidas de absorbancia a  $DO_{620nm}$  con un intervalo de 2 h.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Obtención de *Cupriavidus* con los vectores pCZ388, pCBM01 y pOT2

Los plásmidos pCZ388 y pCBM01 nos fueron enviados desde el laboratorio de origen (Marchetti et al., 2010) en las cepas de *E. coli* TG1 (pCZ388) y *C. taiwanensis* LMG19424 (pCBM01), por lo que en primer lugar fueron transferidos a *E. coli* DH5 $\alpha$  para su conservación y para poder tener más cantidad de plásmido. Para esto se extrajeron los plásmidos a partir de las cepas originales utilizando el método de lisis alcalina y luego fueron incorporados por shock térmico a células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$ . Las transformantes fueron usadas como cepas donadoras para realizar conjugaciones triparentales con las cepas receptoras LMG19424, UYPR2512 y UYMMa02A. Las cepas transconjugantes fueron seleccionadas por su resistencia a los antibióticos Nf y Tc y la presencia de los plásmidos se corroboró mediante extracciones plasmídicas y amplificación de fragmentos específicos por PCR (**Figura 10**).

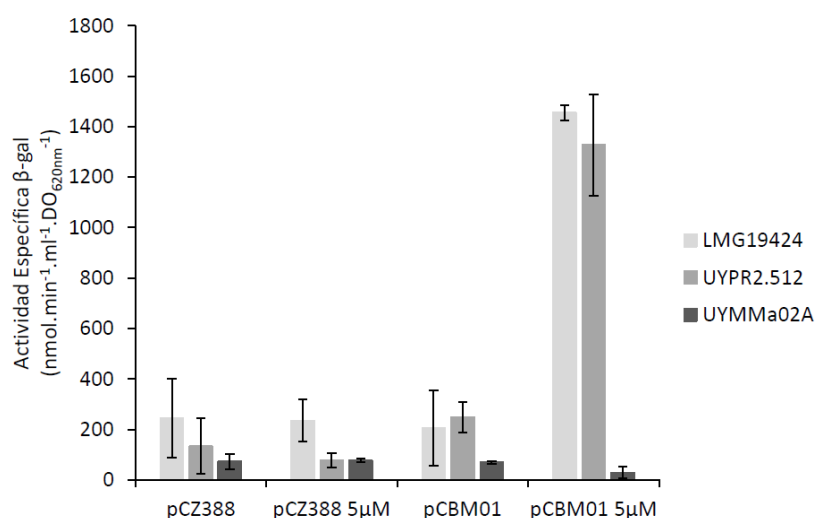


**Figura 10.** Electroforesis en gel de agarosa 1 %. **(a)** Productos de miniprep de los vectores pCBM01 y pCZ388 de sus cepas originales. **(b)** Productos amplificados por reacción de PCR utilizando los cebadores TetA a partir de lisados de colonia de la cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$  con los vectores pCBM01 y pCZ388. **(c)** Productos amplificados por reacción de PCR utilizando los cebadores TetA, carriles 1 y 2: minipreps de los vectores pCBM01 y pCZ388 en la cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$ ; carril 3: colonia de la cepa *Cupriavidus* sp. UYMMa02A como control negativo; carriles 4 y 5: colonia de la cepa *C. taiwanensis* LMG19424 con los vectores pCBM01 y pCZ388; carriles 6 y 7: colonia de la cepa *Cupriavidus* sp. UYMMa02A con los vectores pCBM01 y pCZ388. Marcador de peso molecular (MPM), GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder.

Como se observa en la **Figura 10a** (carriles 1 y 2), se obtuvieron bandas correspondientes a fragmentos de ADN plasmídico mayores a 10 kb en el caso de los vectores pCZ388 y pCBM01 en comparación a la banda de mayor tamaño del MPM. A su vez en la **Figura 10b y c** se puede observar que los cebadores TetA amplificaron un fragmento del tamaño esperado de aproximadamente 200 pb. Dado que: 1) se obtuvieron colonias resistentes a Tc y 2) estas colonias fueron verificadas con amplificación por PCR con los cebadores para el gen de resistencia a tetraciclina, se verificó la presencia de los vectores pCZ388 y pCBM01 en las cepas de *Cupriavidus*.

## 5.2 Evaluación de la expresión del *pnodB-lacZ* de pCBM01

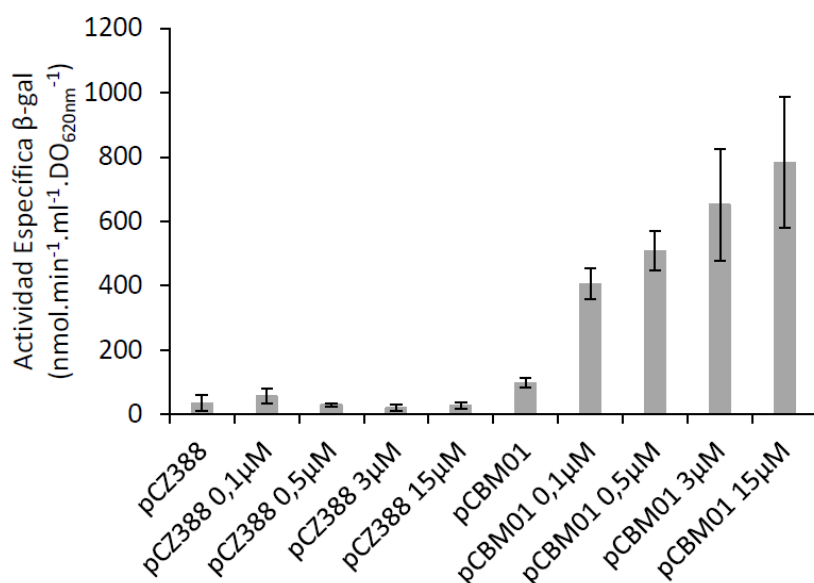
Una vez confirmada la transformación de las cepas de *Cupriavidus* spp. con el plásmido pCBM01 (que contiene la fusión *pnodB-lacZ*) y el plásmido control pCZ388 (vector vacío, tiene el gen *lacZ* pero sin promotor), se evaluó la inducción de los genes *nod* en las tres cepas de *Cupriavidus* mediante el ensayo de determinación de la actividad de la enzima  $\beta$ -galactosidasa ( $\beta$ -gal). En primera instancia se utilizó luteolina como inductor de la actividad  $\beta$ -gal puesto que se había reportado la capacidad inductora de este flavonoide en la cepa LMG19424 (Marchetti et al., 2010) (**Figura 11**).



**Figura 11.** Ensayo de determinación de actividad  $\beta$ -galactosidasa ( $\beta$ -gal) en las cepas de *Cupriavidus* spp. LMG19424, UYPR2.512 y UYMMa02A luego de 18 h de inducción, utilizando 5  $\mu$ M de luteolina como inductor. Se realizaron triplicados biológicos.

Al incubar las bacterias durante 18 h en presencia de luteolina 5  $\mu$ M, se observó un aumento de la actividad  $\beta$ -gal en las cepas de *C. taiwanensis* LMG19424 y *C. necator* UYPR2.512 conteniendo el vector pCBM01, mientras que no se observó inducción en la cepa de *Cupriavidus* sp. UYMMa02A con este vector. Tampoco se observó un aumento de la actividad  $\beta$ -gal en las cepas con el vector control pCZ388 (**Figura 11**). Este resultado sugiere que el *pnodB* se induce por luteolina en las cepas LMG19424 y en UYPR2512, pero no en UYMMa02A. Con este ensayo verificamos el correcto funcionamiento del vector pCBM01 y del ensayo  $\beta$ -gal para nuestro modelo de estudio.

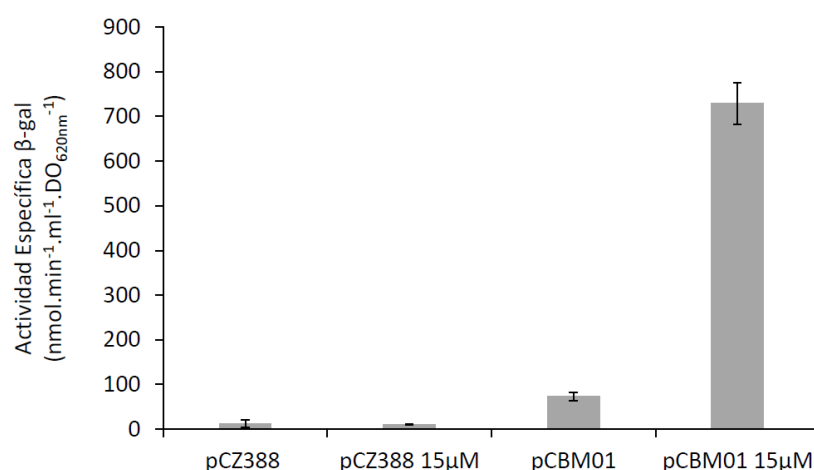
De forma complementaria, a partir de la capacidad de inducción de la luteolina observada en la cepa *C. necator* UYPR2.512, se decidió estudiar el efecto de concentraciones menores de este flavonoide. Para ello, se ensayó el efecto de concentraciones de 0,1  $\mu$ M, 0,5  $\mu$ M y 3  $\mu$ M de luteolina durante 18 h, utilizando 15  $\mu$ M de luteolina como control (**Figura 12**).



**Figura 12.** Ensayo de determinación de actividad β-galactosidasa (β-gal) en la cepa *C. necator* UYPR2.512 utilizando 0,1 μM, 0,5 μM, 3 μM y 15 μM de luteolina, luego de 18 h de inducción. Se realizaron triplicados biológicos.

Como se observa en la **Figura 12**, una concentración 100 nM de luteolina fue suficiente para inducir la expresión de los genes *nod* en la cepa *C. necator* UYPR2.512 indicando una mayor sensibilidad del sistema en esta cepa con respecto a los 15 μM reportados para la cepa *C. taiwanensis* LMG19424 <sup>1,2</sup>.

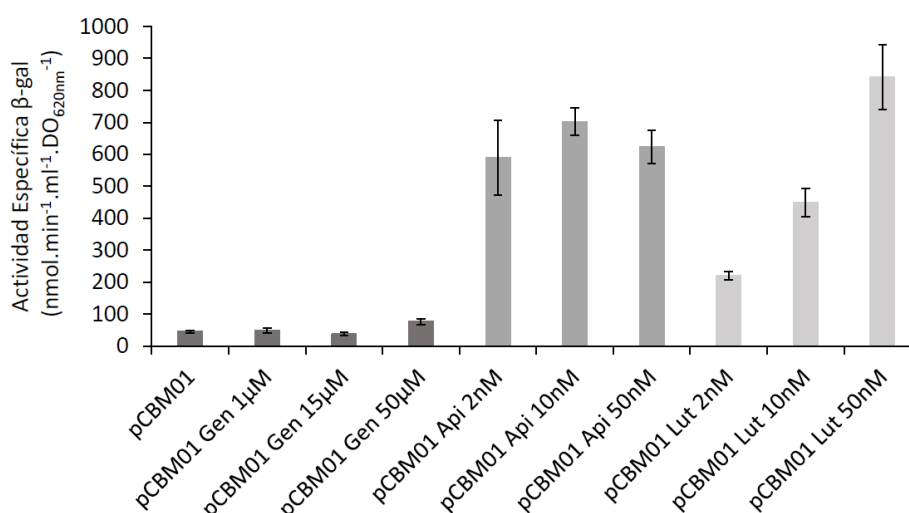
Complementariamente se evaluó el efecto inductor de la luteolina en la cepa *C. necator* UYPR2.512 a un tiempo menor de inducción. Se observó que luego de tan solo 2 h de inducción utilizando 15 μM de luteolina, se alcanzaron valores de expresión de β-galactosidasa similares a los obtenidos luego de 18 h (**Figura 13**).



**Figura 13.** Ensayo de determinación de actividad β-galactosidasa (β-gal) para *C. necator* UYPR2.512 utilizando 15 μM de luteolina, luego de 2 h de inducción.

Estos resultados indican que en esta cepa se observa una respuesta bacteriana más rápida a la presencia del inductor con respecto a las 16 o 24 h reportadas para la cepa *C. taiwanensis* LMG19424 <sup>1,2</sup>.

Con la finalidad de evaluar el efecto de distintos flavonoides sobre la cepa *C. necator* UYPR2.512, se decidió ensayar los flavonoides apigenina y genisteína (Figura 14).



**Figura 14.** Ensayo de determinación de actividad β-galactosidasa (β-gal) para *C. necator* UYPR2.512 utilizando 1 μM, 15 μM y 50 μM de genisteína, 0,01 μM, 0,05 μM y 0,002 μM de apigenina, 0,01 μM, 0,05 μM y 0,002 μM de luteolina, luego de 18 h de inducción. Gen: genisteína; Api: apigenina; Lut: Luteolina. Se realizaron triplicados biológicos.

Ambos flavonoides tuvieron un efecto en la actividad  $\beta$ -galactosidasa, sin embargo fue necesario emplear 50  $\mu$ M de genisteína para observar un ligero efecto, mientras que 2 nM de apigenina fue suficiente para la inducción de los genes *nod* en la cepa *C. necator* UYPR2.512. A esta concentración, el efecto inductor de la apigenina fue aún mayor que el logrado por luteolina (**Figura 14**).

Los resultados obtenidos sugieren que los flavonoides luteolina y apigenina (ambos reportados como inductores de la expresión de los genes *nod* de *C. taiwanensis* LMG19424 y otros rizobios como especies de *Sinorhizobium* y *Rhizobium*<sup>57,58</sup>) son inductores de los genes *nod* en la cepa nativa *C. necator* UYPR2.512.

Por otro lado, la luteolina no indujo la expresión de los genes *nod* en la cepa nativa *Cupriavidus* sp. UYMMa02A. Estos resultados preliminares podrían deberse a: 1) que la luteolina no sea inductora de esta cepa o 2) que la proteína NodD de *Cupriavidus* sp. UYMMa02A no sea capaz de reconocer al promotor *nodB* de *C. taiwanensis* LMG19424 presente en pCBM01.

Para evaluar la segunda posibilidad, se compararon las secuencias de los promotores, así como de la proteína NodD de las tres cepas de *Cupriavidus*.

### 5.3 Alineamiento de secuencias

Con el fin de evaluar hipótesis que expliquen la falta de inducción observada en la cepa *Cupriavidus* sp. UYMMa02A conteniendo la construcción pCBM01, decidimos comparar las secuencias nucleotídicas de la región intergénica *nodD-nodB* conteniendo la caja *nod* y las secuencias nucleotídicas / aminoacídicas de las proteínas NodD de las cepas de *Cupriavidus* sp. UYMMa02A, *C. necator* UYPR2.512 y *C. taiwanensis* LMG19424.

En la **Figura 15** se muestran los resultados del alineamiento de las secuencias nucleotídicas de la región intergénica *nodB-nodD* de las tres cepas de *Cupriavidus*.

```

1>TGACGCGAGCGTCACGTTCCCGAATTT--CTGGCGGGCAAGACAAACGCCTCGATGTTTCGCGGCACACCTTTTCAGCCAT>79
1>TGACGTTAGCGTCACGTTCCCGAATTG--CTGGCGGGCAAGACAAACGCCTTCGATGCTTCGCTCTGACACCTTTTCAGCCAT>79
1>TGACTTTGGCATCACGTTCTCGAATTTTCCT--CGGCAAGACAAACGTTCCGATGTTTCGCTCTGACACCTTTTCAGCCAT>79

80>GATTTCGTTACGTTACCTATGTCGTT--CACGTGTAAGCCTTCTGTCTCAAAGTGCACCGTGCAGCAATGCGCCGTGCGGAGC>158
80>GATTTCGTTACGTTACCTATGTCGTT--CACGTGTAAGCTTCTGTCTCAAAGTGCACCGTGCAGCAATGCGCCGTGCGGAGC>158
80>GATTTCGTTACGTTACCTATGTTGTTGTTGTCAGGCTAGCCTTCGCTCAAAGTGCACCGTGCAGCAATGCGAC--ACGGAG>156

159>CGACAACTGTACGGTACGTGCGCCTCTGTTGCCCTAAATTGAAAGCCGCCGTAACCTTTGCGGGACCGGTGTTTATTTGTA>239
159>CGACAACTGTACGGTACGTGCGCCTCTGTTGCCCTAAATTGAAAGCCGCCGTAACCTTTGCGGGACCGGTGTTTATTTGTA>239
157>-----ATCTG-----CT-----AATCGTTAGTCGCCCACTTTGCGTACCGGCGCAATTTGTA>207

240>CAATCGATTATTTAAATATCAATCATCCGTCATGTGGATGCCTCAACATGCGCTTCAAAGGCCCTTGATCTCAACCTTCTCG>320
240>CAATCGATTATTTGATATCAATCATCCATGATATGGATGCCTCAACATGCGCTTCAAAGGCCCTTGATCTCAACCTTCTCG>320
208>CAATCGATTATTTGATATCAATCATCATGATATGGATGCCTCAATGCGCTTCAAAGGCCCTTGATCTCAACCTTCTCG>288

321>TTGCACTGGAGCACTGATAACGCACCGCAATCTAACAGCCGCGCGCACAACATCAACTTAAGCCAAACCCGCTATGAGCG>401
321>TTGCACTGGATCACTGATAACGCACCGCAATCTAACAGCCGCGCGCACAACATCAACTTAAGCCAAACCCGCTATGAGCG>401
289>C-CACTT-GAGCACT-CATGACGCACCGGAATCG-CAGCCGCGCGCGCT-GCATCAACCTAAGT-GAGCCGCTATGAGCG>369

402>CAGCTGTAGCGAGG>415
402>CAGCTGTAGCGAGG>415
370>CAGCTGTGCGAGG>383

```

**Figura 15.** Alineamiento de la secuencia nucleotídica de la región intergénica *nodB-nodD*. Se observa el alineamiento de tres secuencias, la secuencia superior corresponde a *Cupriavidus* sp. UYMMa02A, la secuencia del medio corresponde a *C. necator* UYPR2.512 y la secuencia inferior corresponde a *C. taiwanensis* LM19424. En color celeste se señalan las secuencias en donde hibridan los cebadores pNodB415; en color naranja y verde se señala el fragmento del gen *nodB* y *nodD*, respectivamente, amplificado con dichos cebadores; y en color amarillo se señala la caja nod a la que se une la proteína NodD. En color rojo se resaltan los nucleótidos no compartidos o bien donde se introducen gaps entre las secuencias que se están comparando. Realizado con el programa ApE <sup>55</sup>.

Cabe destacar que el diseño de los cebadores utilizados para amplificar el fragmento *pnodB* de 415 pb de *Cupriavidus* sp. UYMMa02A fue realizado en base a aquellos utilizados por Marchetti (2010) para amplificar el fragmento *pnodB* de 401 pb de *C. taiwanensis* LMG19424.

Además, se pueden observar pocas discordancias de secuencia nucleotídicas (“mismatch”) entre las cepas *Cupriavidus* sp. UYMMa02A y *C. necator* UYPR2.512 (con 21 mismatches), incluso al nivel de la caja nod (con tan solo 6 mismatches). La mayor cantidad de diferencias nucleotídicas se da entre las cepas *C. taiwanensis* LMG19424 y *Cupriavidus* sp. UYMMa02A con 60 mismatches y 40 gaps, y luego entre las cepas *C. taiwanensis* LMG19424 y *C. necator* UYPR2.512 con 51 mismatches y 40 gaps. De esto hay que destacar que a diferencia de las otras dos cepas de *Cupriavidus*, la cepa *C. taiwanensis* LMG19424 presenta un gap de 40 nucleótidos previo a la caja nod o, visto al

revés, en las cepas nativas hay 40 bases extras en comparación con LMG19424 (para maximizar el alineamiento el programa añade las separaciones artificiales o gaps). Con respecto a la caja nod, dado que 4 de las 6 diferencias presentes en la caja nod de *Cupriavidus* sp. UYMMa02A están conservadas entre *C. taiwanensis* LMG19424 y *C. necator* UYPR2.512, esta diferencia de secuencia en UYMMa02A podría ser causante de que NodD de UYMMa02A no pueda unirse a la caja nod de LMG19424.

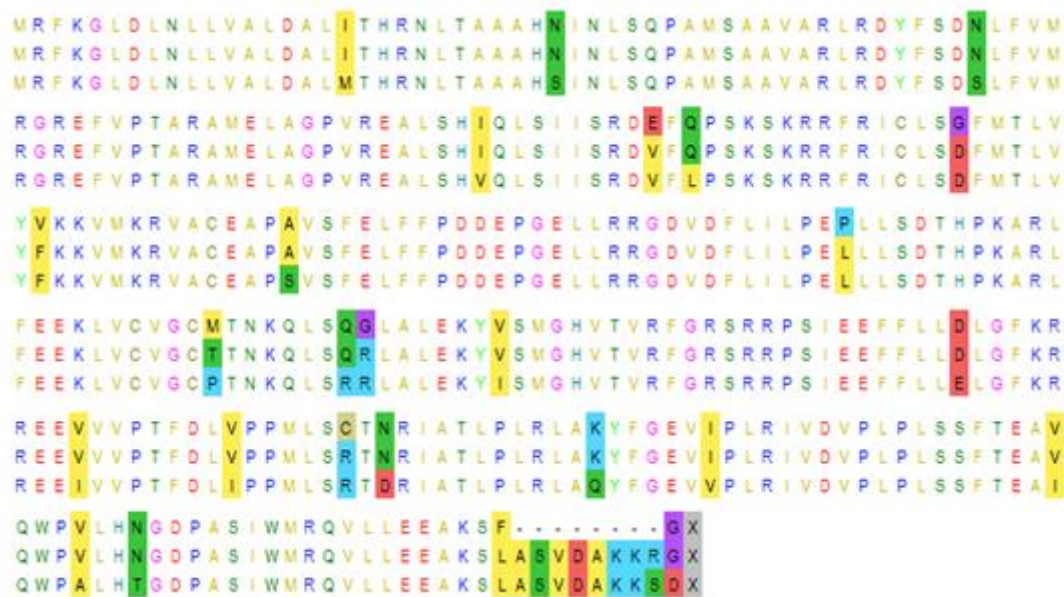
Lo siguiente fue estudiar el alineamiento de la secuencia nucleotídica (**Figura 16**) y la secuencia aminoacídica (**Figura 17**) tentativa de la proteína reguladora NodD entre las mismas 3 cepas de *Cupriavidus*.

```

ATGCGCTTCAAAGGCCTTGA[CTCAACCTTCTCGTTGCACTGGATGCACTGATAACGCACCGCAATCTAACAGCCGCGGCGCA][CATCAACTTAAGGC
ATGCGCTTCAAAGGCCTTGA[CTCAACCTTCTCGTTGCACTGGAGGCACTGATAACGCACCGCAATCTAACAGCCGCGGCGCA][CATCAACTTAAGGC
ATGCGCTTCAAAGGCCTTGA[CTCAACCTTCTCGTTGCACTGGAGGCACTGATAACGCACCGCAATCTAACAGCCGCGGCGCA][CATCAACTTAAGGC
A[ACCCGCTATGAGCGCAGCTGTAGCGAGGCTGCGAGACTATTTTCAGTGACAATCTATTGGTGATGCGGGGGCGCGAGTTCTG][CCGACTGCTCGCGCGAT
AACCCGCTATGAGCGCAGCTGTAGCGAGGCTGCGAGACTATTTTCAGTGACAATCTATTGGTGATGCGGGGGCGCGAGTTCTG][CCGACTGCTCGCGCGAT
AGCCCGCTATGAGCGCAGCTGTGCGGAGGCTGCGAGACTATTTTCAGTGACAATCTATTGGTGATGCGGGGGCGCGAGTTCTG][CCGACTGCTCGCGCGAT
GGAGCTGCGGGGCGCGGTTGCGGAGGCACTATCGCAGCTCTCGATCATCTCAGTGATGTATTCCAGCCATCTAAATCGAAACGCGGCTTCAGA
GGAGCTGCGGGGCGCGGTTGCGGAGGCACTATCGCAGCTCTCGATCATCTCAGTGATGTATTCCAGCCATCTAAATCGAAACGCGGCTTCAGA
GGAGCTGCGGGGCGCGGTTGCGGAGGCACTATCGCAGCTCTCGATCATCTCAGTGATGTATTCCAGCCATCTAAATCGAAACGCA[CGTTTCAGA
ATTTGTCTTTCCGACTTCATGACACTGCTCTACTTAAAGAGGTCATGAAGCGTGTGCGATGTGAGGCTCCCGGGTCACTTCGAATTGTTCTTTCCG
ATTTGTCTTTCCGACTTCATGACACTGCTCTACTTAAAGAGGTCATGAAGCGTGTGCGGTGCGAGGCTCCTGGGTCACTTCGAATTGTTCTTTCCG
ATTTGTCTTTCCGACTTCATGACACTGCTCTACTTAAAGAGGTCATGAAGCGTGTGCGATGTGAGGCGCTTCGTTAGCTTCGAGCTATTCTTTCCG
ACGACGAGCGGGCGAATTGCTTGCAGCTGGCGATGTGATTTCTGATCTTACCGGAGCGGTTGTTGAGTGATACACATCCCAAGGCGCGCTTTTGA
ACGACGAGCGGGCGAATTGCTTGCAGCTGGCGATGTGATTTCTGATCTTGCAGGAGCTGTTGTTGAGTGATACACATCCCAAGGCGCGCTTTTGA
ACGATGAACCTGGCGAATTGCTCAGACGAGGCGATGTGATTTCTGATCTTACCGGAGTTGTTGTTGAGTGATACACATCCCAAGGCGCGCTTTTGA
AGAGAAAGCTGCTGTGCGTAGGCTGTATGACAAACAAACAGCTATCTCAGGGGCTTGCTTTGGAGAAAGTACGTTGTTATGGGCGATGTGACGGTAAGGTTT
AGAGAAAGCTGCTGTGCGTAGGCTGTACGACAAACAAACAGCTGTCTCAGGSACTTGCTTTGGAGAAAGTACGTTGTTATGGGCGATGTGACGGTAAGGTTT
AGAGAAAGCTGCTGTGCGTAGGCTGTGCGACAAATAAGCAGCTGTGCGGAAAGTACGTTGTTATGGGCGATGTGACGGTAAGGTTT
GGGCGTTCCGCGCGCCCTCGATAGAGGAATTTCTCTCTCTGAGCTGGGCTTCAAGAGGCGTGAAGAAAGTTGTAGTACCAACGTTTGACCTGGTCCGCG
GGGCGTTCCGCGCGCCCTCGATAGAGGAATTTCTCTCTCTGAGCTGGGCTTCAAGAGGCGTGAAGAAAGTTGTAGTACCAACGTTTGACCTGGTCCGCG
GGACGTTACGCGCGCCCTCGATAGAGGAATTTCTCTCTCTGAGCTGGGATTCAAGAGACGCGGAAGAGATTGTTGTAACCAACCTTTGACCTGATCCCAAC
CGATGCTGTCTGTACCAATCGCATCGCAACGCTCCGCTACGACTAGCTAGTATTTTGGGGAAGTGATTCTTTGCGCTATGTCGATGTACCACTGCG
CGATGCTGTCTGTACCAATCGCATCGCAACGCTCCGCTACGACTAGCTAGTATTTTGGGGAAGTGATTCTTTGCGCTATGTCGATGTACCACTGCG
CGATGCTGTCTGTACCAATCGCATCGCAACGCTCCGCTACGACTAGCTAGTATTTTGGGGAAGTGATTCTTTGAGGATTGTCGATGTACCACTGCG
ACTTTCTCTGTTTACTGAGGCTGTCCAATGGCCTGTGCTCCATAACGGCGACCGGGCAGCATCTGGATGCGCCAGGTCTACTGGAGGAGGGGAAAGAGC
ACTTTCTCTGTTTACTGAGGCTGTCCAATGGCCTGTGCTCCATAACGGCGACCGGGCAGCATCTGGATGCGCCAGGTCTACTGGAGGAGGGGAAAGAGC
ACTTTCTCTGTTTACTGAGGCTGTCCAATGGCCTGTGCTCCATAACGGCGATCCAGGAGCATTTGGATGCGCCAGGTCTATTGGAGAGGGGAAAGAGT
TTGGCTAG[.....]
TTGGCTAGTTTGACGCGAAGAAGCTGGCTGA
TTGGCTAGTTTGACGCGAAGAAGCTGACTGA

```

**Figura 16.** Alineamiento de la secuencia nucleotídica del gen *nodD*. Se observa el alineamiento de tres secuencias, la secuencia superior corresponde a la cepa *Cupriavidus* sp. UYMMa02A, la secuencia del medio corresponde a *C. necator* UYPR2.512 y la secuencia inferior corresponde a *C. taiwanensis* LMG19424. En color negro se resaltan los nucleótidos no compartidos o bien donde se introducen gaps entre las secuencias que se están comparando. Se realizó con el programa MEGA-X, con el algoritmo ClustalW <sup>56</sup>.



**Figura 17.** Alineamiento de la secuencia de aminoácidos tentativa de las proteínas NodD. Se observa el alineamiento de tres secuencias, la secuencia superior corresponde a la cepa *Cupriavidus* sp. UYMMa02A, la secuencia del medio corresponde a *C. necator* UYPR2.512 y la secuencia inferior corresponde a *C. taiwanensis* LMG19424. Los distintos colores son un código de similitud estructural entre los aminoácidos, y las distintas letras obedecen a cómo se nombran los aminoácidos en el código genético. Se realizó con el programa MEGA-X, con el algoritmo MUSCLE <sup>56</sup>.

En la **Figura 16** se puede observar que las secuencias nucleotídicas que codifican para *nodD* de *C. necator* UYPR2.512 y *C. taiwanensis* LMG19424 son de 933 pb, mientras que la de *Cupriavidus* sp. UYMMa02A es de 909 pb. Las secuencias de UYMMa02A y UYPR2.512 se alinean todo el largo de sus secuencias con una cantidad de 24 mismatches y 26 gaps. Sin embargo, la cepa LMG19424 presenta la mayor diferencia de secuencia en comparación con las otras dos secuencias.

Por otra parte, se puede observar que la mayoría de cambios nucleotídicos se observaron en el tercer lugar del codón, correspondiente a cambios sinónimos. Algunas modificaciones son en el primer o segundo lugar del codón (**Figura 17**), por lo que en la mayoría de estos casos sí se da un cambio de aminoácido, aunque a veces estos cambios dan lugar a un aminoácido estructuralmente similar al original, y no afectaría la funcionalidad de la proteína. Teniendo en cuenta que el extremo N-t de las proteínas NodD está involucrado en el reconocimiento y unión específica a flavonoides, y que el extremo C-t es el

dominio de unión al ADN (caja nod); se puede observar que una diferencia notoria entre las proteínas NodD de LMG19424 / UYPR2.512 y UYMMa02A es el largo de su secuencia, con una diferencia de 8 aminoácidos en el extremo C- t que tal vez pueda afectar su función de unión a la caja nod.

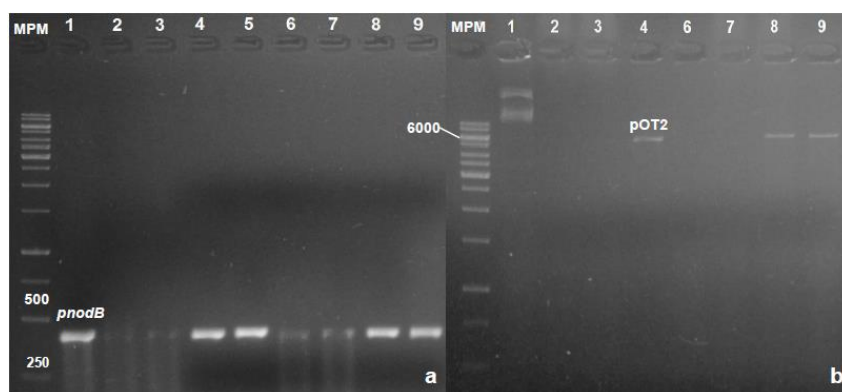
Como vimos diferencias de secuencia, nos propusimos construir un nuevo vector el cual tuviese el promotor del gen *nodB* de *Cupriavidus* sp. UYMMa02A fusionado a un gen reportero.

#### 5.4 Construcción de nuevo vector con *gfp* como gen reportero

Anteriormente, nuestro grupo de investigación construyó diferentes vectores conteniendo la presunta región promotora del gen *nodB* (*pnodB*) de la cepa *Cupriavidus* sp. UYMMa02A. En estas construcciones se utilizaron fragmentos nucleotídicos de aproximadamente 320 pb que abarcaban el supuesto promotor del gen *nodB*. Así se construyeron los vectores pFO0115 <sup>59</sup>, pCR0116 y pCR0216 en los que el fragmento conteniendo al *pnodB* de la cepa UYMMa02A se clonó en el vector pSEVA247Y en los casos de pFO0115 y pCR0116 o en el pSEVA237Y en el caso de pCR0216 <sup>60</sup>. Estos plásmidos fueron introducidos en la cepa UYMMa02A y se evaluó la fluorescencia de las bacterias transformadas en presencia de luteolina, apigenina y exudados de distintas semillas de *Mimosas* con las que esta bacteria puede formar asociaciones simbióticas efectivas. En ninguno de los casos se observó expresión del gen reportero *yfp*, sugiriendo que el promotor *nodB* no se induciría en estas condiciones <sup>59</sup>. De acuerdo a los resultados publicados por Marchetti y colaboradores (2010) y lo observado en este trabajo, pudimos constatar que el fragmento promotor utilizado en pCBM01 es mayor al que empleamos en los vectores descritos anteriormente (*pnodB* *C. taiwanensis* LMG19424, 401 pb Vs *pnodB* *Cupriavidus* sp. UYMMa02A, 320 pb). Por lo tanto decidimos construir un nuevo vector con el fragmento *pnodB* de *Cupriavidus* sp. UYMMa02A pero agregando casi 100 nucleótidos, con el fin de verificar si afectaba la unión de la proteína NodD al fragmento *pnodB*. El nuevo fragmento *pnodB* se clonó en el vector pOT2, el cual

contiene como gen reportero *gfp*. A este nuevo vector se la denominó pCC0119 (**Figura 21**).

A partir del ADN genómico de la cepa *Cupriavidus* sp. UYMMa02A se amplificó por PCR, utilizando los cebadores pNodB415 R y F, el fragmento *pnodB* que incluía la región intergénica de *nodB-nodD* y parte de ambos genes (carril 1, **Figura 18a**), generando un fragmento de tamaño esperado de 415 pb. En simultáneo, el vector pOT2 fue extraído de *E. coli* DH5α por el método convencional de miniprep. Según lo observado en el carril 1 de la **Figura 18b**, parecería que este se encontraba fundamentalmente bajo la forma circular dado que su migración está retrasada. Cuando el vector pOT2 fue digerido se obtuvo su conformación lineal, observándose que su migración correspondía a su tamaño esperado de 5335 pb (carril 4, **Figura 18b**). En la **Figura 18** se muestra el proceso que llevó a obtener ambos productos (*pnodB* y pOT2) doblemente digeridos con las enzimas *Pst*I y *Kpn*I y purificados.



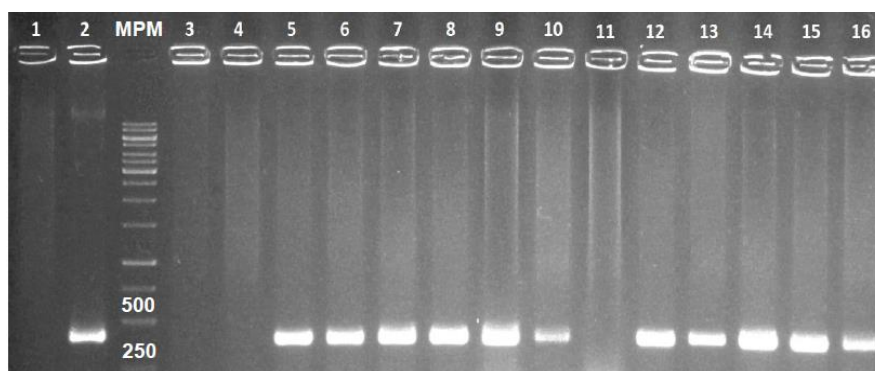
**Figura 18.** Electroforesis en gel de agarosa 1 %. **(a)** Proceso de digestión y purificación del fragmento *pnodB* amplificado de *Cupriavidus* sp. UYMMa02A. En el carril 1: *pnodB* sin digerir; carriles 2 y 3: digestión con *Kpn*I y *Pst*I, respectivamente; carriles 4 y 5: digestiones simples precipitadas; carriles 6 y 7: digerido con ambas enzimas; carriles 8 y 9: digestiones dobles precipitadas. **(b)** Proceso de digestión y purificación del vector pOT2 extraído de *E. coli* DH5α. En el carril 1: pOT2 sin digerir; carriles 2 y 3: digestión con *Kpn*I y *Pst*I, respectivamente; carriles 4 y 5: digestiones simples precipitadas; carriles 6 y 7: digerido con ambas enzimas; carriles 8 y 9: digestiones dobles precipitadas. Marcador de peso molecular (MPM), GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder.

Una vez que se obtuvieron ambos productos doblemente digeridos y purificados, se procedió a realizar distintas reacciones de ligación, que se detallan en la **Tabla 5**, con las que se transformó en células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$ .

**Tabla 5.** Reacciones de ligación con enzima T4 ADN Ligasa. Tubos 1 y 2: reacciones de ligación con inserto y vector; tubos 3 y 4: controles (sin inserto). Se detallan los volúmenes utilizados en cada caso.

| TUBO                 | 1   | 2   | 3   | 4 |
|----------------------|-----|-----|-----|---|
| Ligasa T4            | 0,5 | 0,5 | 0,5 | - |
| Buffer T4 (10X)      | 1   | 1   | 1   | - |
| Vector               | 2,5 | 1   | 2   | 2 |
| Inserto              | 6   | 7   | -   | - |
| H <sub>2</sub> O PCR | -   | 0,5 | 6,5 | 8 |

A partir de las reacciones de ligación utilizadas para transformar células de *E. coli* DH5 $\alpha$  se obtuvieron 8, 4, 32 y 6 colonias resistentes a Gm, de la reacción 1 a la 4 respectivamente (**Tabla 5**). El hecho de haber obtenido colonias de la transformación con la reacción de ligación 4 (sin Ligasa) sugiere que la digestión con una de las enzimas no fue completa o que tal vez se formó un dímero. Con el objetivo de verificar la presencia del inserto en dichas colonias, se realizó la reacción de PCR, utilizando los mismos cebadores utilizados para amplificar el *pnodB* de *Cupriavidus* sp. UYMMa02A, pNodB415 F y R (**Figura 19**).

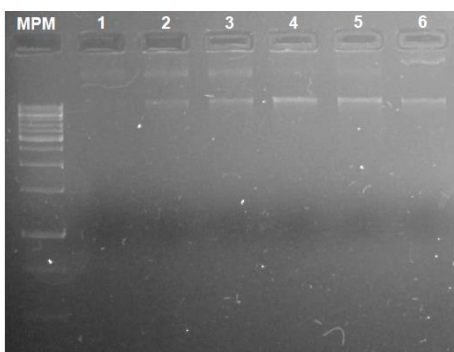


**Figura 19.** Electroforesis en gel de agarosa 1 %. Productos amplificados por reacción de PCR de colonias de la cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$ , transformadas con las reacciones de ligación. De izquierda a derecha, carril 1: control negativo, colonia *E. coli* DH5 $\alpha$ ; carril 2:

control positivo, colonia UYMMa02A; carril 3: colonia ligación 4; carril 4: colonia ligación 3; carriles 5-8: colonias ligación 2; carriles 9-16: colonias ligación 1. Marcador de peso molecular (MPM), GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder.

Como se puede observar en la **Figura 19** utilizando los cebadores pNodB415 F y R no se obtuvieron productos de PCR a partir de colonias transformadas con las reacciones de las ligaciones control 3 y 4 ni tampoco cuando se usó una colonia de la cepa DH5α sin plásmido. Mientras que sí se amplificó un fragmento del tamaño esperado en las reacciones de PCR realizadas a partir de la mayoría de las colonias obtenidas por la transformación con las reacciones de ligación 1 y 2.

A 6 de las colonias que amplificaron un fragmento del tamaño esperado de 415 pb (3 del tubo 1 y 3 del tubo 2) se les realizó miniprep con el kit (**Figura 20**).



**Figura 20.** Electroforesis en gel de agarosa 1 %. Productos de miniprep de las colonias de *E. coli* DH5 transformadas con las reacciones de las ligación. De izquierda a derecha, carriles 1, 2 y 3 corresponden a ADN plasmídico de clones de la reacción de ligación 2; carriles 4, 5 y 6 corresponden a ADN plasmídico de clones de la reacción de ligación 1. Marcador de peso molecular (MPM), GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder.

Con el fin de corroborar la secuencia del fragmento clonado en estos vectores, los productos de las minipreps 2 a 5 (**Figura 20**) fueron secuenciados y su secuencia comparada con la secuencia teórica esperada. En base a esta comparación, decidimos quedarnos con el clon de la reacción de ligación 2 (carril 3, **Figura 20**), ya que detectamos una única mutación en la región intergénica *nodB-nodD* que en principio no afectaría su funcionalidad, y se lo nombró pCC0119 (**Figura 21**).

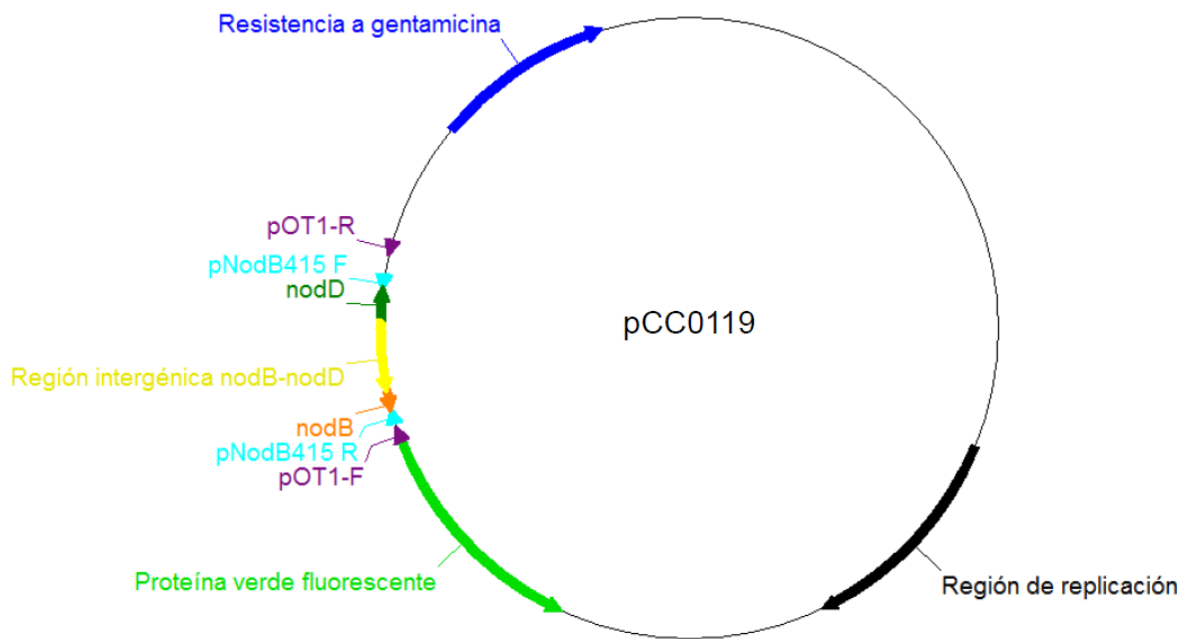
```

TAAGGGTGGGTTTACCCAAGTGGGTGGCTACGGACTGATTGATTAAATTAAGTCG
ACATCTAGAGTTTAACTTTAATTAAGCCCGGGCTGCAGCCTCGCTACAGCTGCG
CTCATAGCGGGTTGGCTTAAGTTGATGTTGTGCGCCGCGGCTGTTAGATTGCGGT
GCGTTATCAGTGCGTCCAGTGCAACGAGAAGGTTGAGATCAAGGCCTTTGAAGCG
CATGTTGAGGCATCCACATGACGGATGATTGATATTTAAATAATCGATTGTACAAA
TAAACACCGGTCCCGCAAAGTTACGGCGGCTTTCAATTTAGGGCAACAGAGGCGC
ACGTACCGTACAGATTGTCGGCTCCGCACGGCGCATTGCGCACGGTGCACTTTG
AGACAGAAGGCTTACACGTGAACGACATAGGTAACGTAACGAATCATGGCTGAAA
AGGTGTGCCGCGAAACATCGAGGCGTCTGTCTTGCCCGCCAGAAATTCGGGAAC
GTGACGCTCGCGTCAAGGTACCAGGCCTAGATAGATAGAGAGAGAGAGAGAGACTAG
TGGAGGAAGAAAAAATG

```

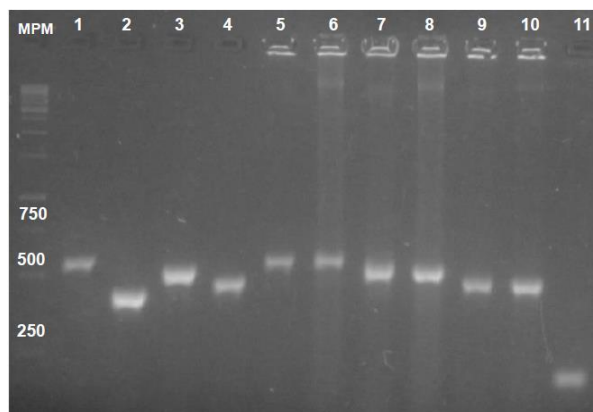
**Figura 21.** Parte de la secuencia de la construcción pCC0119. Se muestra desde donde se secuenció con el pOT1-R (por eso su secuencia no se ve), hasta la secuencia en donde hibrida el pOT1-F (en color rojo). Además se pueden ver los cebadores pNodB415 R y F (en color amarillo; el R es el que está más cerca de donde hibrida el pOT1-F). En color verde se ve parte de la secuencia del gen *nodD*, en color naranja parte de la secuencia del gen *nodB* y, entre ambas, se observa en color azul la secuencia intergénica *nodB-nodD* donde está la caja *nod*. Resaltado en color negro se puede observar la única mutación.

El vector pCC0119 se transformó en las cepas de *Cupriavidus* sp. UYMMa02A y *C. necator* UYPR2.512 por electroporación. Mediante el programa ApE, se observó que para verificar la presencia de pCC0119 en las cepas de *Cupriavidus* se debería utilizar el cebador pNodB415 que hibrida con el fragmento *pnodB* y el pOT1 que hibrida con el vector pOT2, ambos R o F. Al utilizarse ambos F se obtendría un fragmento de 471 pb, mientras que, si se utilizaran los dos R, el fragmento amplificado sería de aproximadamente 509 pb. Esto se puede observar de forma más detallada en la **Figura 22**.



**Figura 22.** Mapa del vector pCC0119. En color azul se indica el gen de resistencia al antibiótico gentamicina (Gm); en color verde el gen de la proteína verde fluorescente (*gfp*); en color negro la región de replicación del vector (pBBR1 oriV); el fragmento de 415 pb de *pnodB* amplificado de *Cupriavidus* sp. UYMMa02A comprende parte del gen *nodB* en color naranja, parte del gen *nodD* en color verde y la región intergénica *nodB-nodD* en amarillo; en color violeta se observan los sitios donde hibridan los cebadores pOT1 R y F; y en color celeste los sitios en donde hibridan los cebadores pNodB415 R y F. Figura realizada con el programa ApE <sup>55</sup>.

Dichas transformaciones fueron verificadas por reacción de PCR de colonia (**Figura 23**).



**Figura 23.** Electroforesis en gel de agarosa 1 %. Confirmación por PCR de la miniprep de pCC0119 y de la presencia de pCC0119 en las cepas de *Cupriavidus* sp. UYMMa02A y *C. necator* UYPR2.512. Verificación de la miniprep pCC0119: carril 1: pOT1 R y F, carril 2: pNodB415 R y F, carril 3: pOT1-R y pNodB415-R, carril 4: pOT1-F y pNodB415-F. Para verificar presencia de pCC0119 en colonias de UYMMa02A: carril 5: pOT1 R y F, carril 7: pOT1-R y pNodB415-R, carril 9: pOT1-F y pNodB415-F. Para verificar presencia de pCC0119 en colonias de UYPR2.512: carril 6: pOT1 R y F, carril 8: pOT1-R y pNodB415-R, carril 10: pOT1-F y pNodB415-F. En el carril 11: pOT2 con cebadores pOT1 R y F. Marcador de peso molecular (MPM), GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder.

Los fragmentos de ADN amplificados (**Figura 23**) con los distintos pares de cebadores utilizados fueron consistentes con los fragmentos teóricos calculados en base a la secuencia de pCC0119 en el programa ApE. A su vez, se observó que la diferencia del tamaño de amplicón con los cebadores pOT1, entre el vector pOT2 (carril 11; 193 pb) y el vector pCC0119 (carril 1; 561 pb), es de aproximadamente 415 pb (tamaño del fragmento *pnodB* clonado en el vector pOT2).

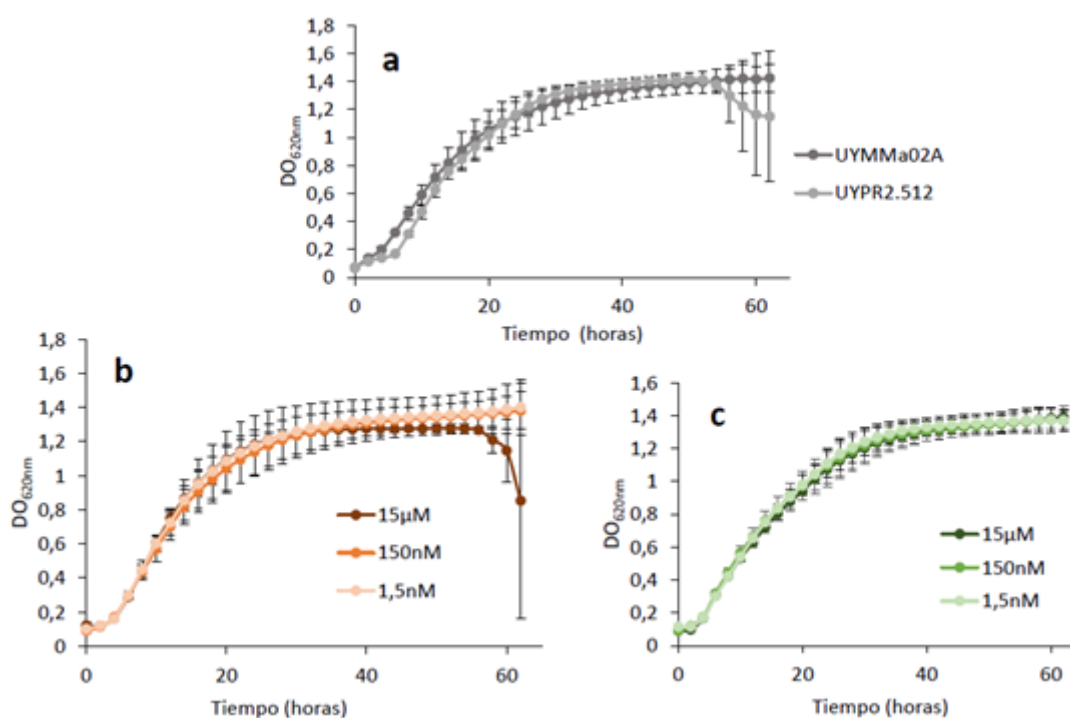
### 5.5 Evaluación de la expresión del *pnodB-gfp* de pCC0119

A partir del resultado obtenido en la **Figura 23**, se confirmó la presencia del vector pCC0119 en las cepas de *Cupriavidus* sp. UYMMa02A y *C. necator* UYPR2.512. Con el objetivo de evaluar la expresión del *pnodB-gfp* de pCC0119 en las cepas de *Cupriavidus* sp. UYMMa02A y *C. necator* UYPR2.512, se incubó el cultivo con 5  $\mu$ M de luteolina (concentración suficiente con la cual se expresarían los genes *nod* en *C. necator* UYPR2.512; **Figura 11**). Si bien se

observó crecimiento bacteriano al medir la  $DO_{620nm}$  (aproximadamente 0,7), no se observó fluorescencia.

## 5.6 Curvas de crecimiento

Finalmente evaluamos el efecto del agregado de luteolina sobre el crecimiento bacteriano para descartar un posible efecto inhibitorio de dicho flavonoide. Para realizar las curvas de crecimiento se sembraron en una placa de ELISA de 96 pocillos 200  $\mu$ l de cada cultivo bacteriano con una  $DO_{620nm}$  inicial de 0,1 y agregamos, cuando correspondía, una concentración determinada de luteolina disuelta en DMSO. Las medidas de  $DO_{620nm}$  fueron tomadas cada 2 h durante 62 h.



**Figura 24.** Curvas de crecimiento de (a) *Cupriavidus* sp. UYMMa02A y *C. necator* UYPR2.512, (b) *Cupriavidus* sp. UYMMa02A utilizando 15  $\mu$ M, 150 nM y 1,5 nM de luteolina y (c) *C. necator* UYPR2.512 utilizando 15  $\mu$ M, 150 nM y 1,5 nM de luteolina, en medio mínimo M9 citrato. Se realizaron triplicados biológicos.

Como se observa en la **Figura 24**, la luteolina a esas concentraciones no afecta el crecimiento de las cepas estudiadas. También se realizó un control usando

solamente el solvente utilizado (DMSO) y no se observó efecto del solvente en el crecimiento de las cepas (datos no mostrados).

## 6 DISCUSIÓN

En este trabajo los vectores pCZ388 y pCBM01 fueron exitosamente introducidos en las cepas de *Cupriavidus* LMG19424, UYPR2.512 y UYMMa02A por conjugación triparental. Mediante el ensayo de la determinación de la actividad de la enzima  $\beta$ -galactosidasa, se evaluó la inducción del *pnodB* en las cepas de *Cupriavidus*, utilizando 5  $\mu$ M de luteolina como inductor, durante 18 h. Los cultivos de las cepas *C. taiwanensis* LMG19424 y *C. necator* UYPR2.512 mostraron inducción del *pnodB* presente en el vector pCBM01. Por otro lado, no se observó inducción del *pnodB* en la cepa de *Cupriavidus* sp. UYMMa02A. Con estos resultados se observó que el pCBM01 funciona en la cepa UYPR2.512, porque el promotor *pnodB* de la cepa LMG19424 es reconocido y activado en presencia de luteolina en la cepa UYPR2.512. Esto no fue lo observado para la cepa UYMMa02A. De forma complementaria se evaluaron menores concentraciones de luteolina y de otros flavonoides (apigenina y genisteína) en la cepa *C. necator* UYPR2.512. Se observó expresión de los genes *nod* incluso utilizando 15  $\mu$ M de luteolina, luego de 2 h de inducción, así como utilizando bajas concentraciones del orden de nM de luteolina, luego de 18 h de inducción. De estos resultados se desprende el hecho de que a menores concentraciones de luteolina y menores tiempos de inducción, igualmente se observa un potente efecto del inductor, en comparación a lo reportado por Marchetti y colaboradores (2010) para el caso de la cepa LMG19424 (15  $\mu$ M y 18 h). También se observó expresión de los genes *nod* al utilizar apigenina para inducir el cultivo durante 18 h, incluso presentó mayor inducción con las concentraciones utilizadas de apigenina respecto a las mismas concentraciones utilizadas de luteolina. Sin embargo, en presencia de 50  $\mu$ M de genisteína se observó un menor efecto en la inducción de los genes *nod* en la cepa *C. necator* UYPR2.512.

Según la bibliografía consultada, las proteínas NodD en general tienen una alta especificidad en cuanto al reconocimiento de flavonoides que llevan a su activación<sup>35</sup>. Si bien todos los flavonoides son polifenoles que comparten una estructura básica común, cambios estructurales como ser dobles enlaces, la presencia de grupos hidroxilos y sus posiciones en la molécula son claves para el reconocimiento de la proteína.

La falta de inducción de los genes *nod* en presencia de luteolina en la cepa de *Cupriavidus* sp. UYMMa02A no era lo esperado. Las evidencias previas se apoyaban en: a) el alto porcentaje de similitud a nivel de secuencia tanto de la caja *nod* como de la proteína NodD, entre las tres cepas de *Cupriavidus*; b) la presencia en su genoma de los genes *nod* en la misma disposición que en la cepa modelo LMG19424; c) y a que la mayoría de los rizobios reportados hasta la fecha tienen como estrategia de nodulación la dependiente de los factores Nod. Es por esto que, con el fin de profundizar en las posibles causas de la falta de respuesta en UYMMa02A, se llevaron a cabo tres estrategias. Como primera estrategia, se realizaron alineamientos detallados entre las secuencias de la región intergénica *nodB-nodD* y del gen *nodD* de las tres cepas de *Cupriavidus*. Respecto a las secuencias de la región intergénica *nodB-nodD*, las diferencias más relevantes se observan comparando la cepa UYPR2.512 y UYMMa02A con LMG19424; los dos rizobios nativos muestran una mayor región intergénica con alrededor de 40 pb más que la cepa modelo. Esta secuencia “extra” forma un solo fragmento conservado entre las cepas nativas y se ubica inmediatamente corriente arriba de la caja *nod*. Desconocemos si esta secuencia tiene algún efecto a nivel de la transcripción y sería interesante estudiarla con más detalle en un futuro. A nivel de secuencia de la proteína NodD se observó una diferencia de 8 aminoácidos en el extremo C-t de la cepa de UYMMa02A en comparación con LMG19424 y UYPR2.512. Teniendo en cuenta que el dominio de unión al ADN (caja *nod*) de la proteína NodD se encuentra en su extremo C-t, podría ser que esta diferencia sea la causante de la falta de inducción de la expresión de los genes *nod* en UYMMa02A. Las diferencias entre el sistema NodD-*pnodB* de LMG19424 (contenido en el plásmido reportero pCBM01) y la cepa UYMMa02A nos llevaron a diseñar la segunda estrategia. En esta se evaluó si los resultados observados con pCBM01 podían deberse a que las diferencias de secuencia en la región promotora de UYMMa02A no permitieran que la proteína NodD de esta cepa reconociera al promotor de LMG19424 clonado en pCBM01. Para resolver esta incógnita, se realizó la construcción del vector pCC0119 con el *pnodB* de *Cupriavidus* sp. UYMMa02A fusionado al gen reportero *gfp*. El vector pCC0119 fue transformado exitosamente por electroporación en las cepas de *Cupriavidus* sp. UYMMa02A y *C. necator* UYPR2.512, donde se evaluó la expresión del *pnodB* mediante la detección de fluorescencia, pero no se observó inducción en

presencia de luteolina en ninguna de las dos cepas. El hecho de que pCC0119 no se induzca en la cepa UYPR2.512 fue inesperado porque el vector pCBM01 sí había funcionado en esta cepa. Este resultado puede significar que: 1) el vector pCC0119 no sea funcional o 2) que el *pnodB* de UYMMa02A no sea funcional y por esto la proteína NodD de UYPR2.512 no lo haya podido reconocer y por tanto no hayamos visto inducción. Sin embargo, habría que hacer un estudio más detallado de cuáles son las bases importantes en la caja nod, así como cambios de secuencia en las proteínas NodD que puedan alterar en la proteína el reconocimiento de las moléculas que normalmente son reconocidas, así como su unión a la caja nod.

A su vez, nuestro grupo de investigación realizó una mutante del gen *nodD* en la cepa de *Cupriavidus* sp. UYMMa02A y con el fin de estudiar su fenotipo se realizaron ensayos de infección en plántulas de *Mimosa pudica* (Sandes y colaboradores, sin publicar). A los 30 días de inoculación no se observaron diferencias en la formación de nódulos maduros entre la cepa mutante y la salvaje. Si la proteína NodD fuera el regulador de los genes *nod* en esta cepa, una mutación en el gen *nodD* afectaría la expresión de todo el operón con la consecuente falta de producción de factores de nodulación y una falla en la nodulación. Sin embargo, los resultados obtenidos contradicen esta hipótesis. Esto sugiere que los genes *nod* en esta cepa no serían esenciales para la nodulación o que existen otras vías de activación de los genes *nod* en esta bacteria. Ciertamente se necesita seguir profundizando en estos estudios para poder determinar cuáles son las causas de los resultados observados.

## 7 CONCLUSIONES

Mediante el ensayo de la determinación de la actividad de la enzima  $\beta$ -galactosidasa con el vector pCBM01 se observó que los flavonoides apigenina y luteolina inducen la expresión del *pnodB* en *C. necator* UYPR2.512 en concentraciones nM a diferencia de lo reportado previamente para *C. taiwanensis* LMG19424, en la que se necesitan concentraciones mil veces mayores para lograr este efecto <sup>1</sup>. La genisteína tuvo un menor efecto en la inducción del promotor *nodB* en la cepa *C. necator* UYPR2.512 aún a una concentración de 50  $\mu$ M, lo que sugiere que, como en la cepa *C. taiwanensis* LMG19424, este flavonoide no sería un inductor fisiológico, dado que difícilmente se alcancen concentraciones tan altas en la naturaleza <sup>1</sup>. Por otra parte, también observamos que existe una rápida inducción de los genes *nod* ante la exposición a luteolina, alcanzando niveles de inducción comparables a los reportados para 18 h en tan solo 2 h <sup>1</sup>. Finalmente, no observamos inducción de la expresión del promotor *nodB* con luteolina (5  $\mu$ M) en la cepa *Cupriavidus* sp. UYMMa02A.

En base a los resultados observados y a la bibliografía consultada <sup>23,36</sup>, la cepa *Cupriavidus* sp. UYMMa02A, podría ser capaz de nodular plantas leguminosas utilizando una estrategia independiente de factores Nod. Además se sugiere que, dependiendo del hospedero, el rizobio podría emplear una u otra estrategia de nodulación y que, al estar imposibilitado de utilizar la estrategia dependiente de factores Nod, igualmente sería capaz de nodular a aquellas plantas con las cuales no sean requeridos.

Como perspectivas nos planteamos clonar el promotor *nodB* de *Cupriavidus* sp. UYMMa02A en el vector pCZ388, dado que sabemos que es un vector que ya ha sido validado en *Cupriavidus*. Alternativamente podríamos evaluar la funcionalidad del vector pOT2 en estas bacterias, mediante el clonado de un promotor constitutivo de expresión alta o inducible como control positivo. Y una vez obtenido el vector corroborado, sea con el vector pCZ388 o pOT2, se podría evaluar la respuesta de los genes *nod* en presencia de extractos de exudados radiculares purificados de diversas leguminosas nativas, pensando en inductores alternativos a los flavonoides ensayados. También se podría estudiar

en profundidad la proteína NodD de *Cupriavidus* sp. UYMMa02A para intentar evaluar su funcionalidad, sea con estrategias *in silico* (modelado) o de biología molecular (clonado y complementación heteróloga). Por otro lado, cabe resaltar que UYMMa02A cuenta en su genoma con genes que podrían estar implicados en estrategias de nodulación independiente de factores Nod, tales como el sistema de secreción tipo III (T3SS), por lo que podrían actuar como alternativa para la nodulación. De hecho, actualmente dentro de nuestro equipo de investigación se están llevando a cabo estrategias ómicas (proteómica y transcriptómica) para definir genes que se inducen en presencia de exudados radiculares, con lo que esperamos poder definir si los genes *nod* se inducen o no en esta cepa, y qué otros genes y proteínas pueden estar implicados en el reconocimiento planta-bacteria.

## 8 ANEXO

### 8.1 Medios de cultivo

- LB

Triptona 10 g

Extracto de levadura 5 g

NaCl 10 g

H<sub>2</sub>O c.s.p 1L

Para el medio sólido se agrega agar 15 g/L.

- M9

Sales M9 5X\* 200 ml

MgSO<sub>4</sub> 1 M 2,0 ml

CaCl<sub>2</sub> 1 M 0,1 ml

Solución 20 % fuente de carbono 20 ml

H<sub>2</sub>O c.s.p 1L

\*Sales M9 5X

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 64 g

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 15 g

NaCl 2,5 g

NH<sub>4</sub>Cl 5,0 g

H<sub>2</sub>O c.s.p 1L

Las sales y el resto de los componentes se esterilizan por separado y luego se arma el medio. Para el medio sólido se agrega agar 18 g/L. Como fuente de carbono se utilizó citrato 14 mM.

### 8.2 Soluciones

- Tampón de electroforesis en geles de agarosa 25X (TAE)

|                         |          |
|-------------------------|----------|
| Tris base               | 121 g    |
| Ácido acético glacial   | 28,55 ml |
| EDTA 0,5 M              | 50 ml    |
| H <sub>2</sub> O c.s.p. | 1L       |

- Solución I (miniprep)

|               |       |
|---------------|-------|
| Glucosa       | 50 mM |
| Tris-HCl pH 8 | 25 mM |
| EDTA pH 8     | 10 mM |

- Solución II (miniprep)

NaOH 0,2 N

SDS 1 %

- Solución III (miniprep)

|                         |         |
|-------------------------|---------|
| Acetato de Potasio 5 M  | 60 ml   |
| Ácido acético glacial   | 11,5 ml |
| H <sub>2</sub> O c.s.p. | 100 ml  |

- Tampón de Elución (T<sub>10</sub>E<sub>1</sub>)

Tris-HCl pH 8 10 mM

EDTA pH 8 1 mM

- Buffer Z

|                                                     |       |        |
|-----------------------------------------------------|-------|--------|
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O | 60 mM | 10,68g |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O  | 40 mM | 5,52g  |
| KCl                                                 | 10 mM | 0,75g  |
| MgSO <sub>4</sub>                                   | 1 mM  | 0,24g  |

H<sub>2</sub>O c.s.p. 1L

Luego de esterilizado mediante autoclave se le agrega β-mercaptoetanol (2,7 ml/L Buffer Z)

- ONPG

4 mg ONPG/ml en buffer Z

## 9 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Marchetti, M., Capela, D., Glew, M., Cruveiller, S., Chane-Woon-Ming, B., et al. (2010). *Experimental Evolution of a Plant Pathogen into a Legume Symbiont*. *PLoS Biol* 8:e1000280. doi: 10.1371/journal.pbio.1000280.
2. Saad, M. M., Crevecœur, M., Masson-Boivin, C., & Perret, X. (2012). *The type 3 protein secretion system of Cupriavidus taiwanensis strain LMG19424 compromises symbiosis with Leucaena leucocephala*. *Appl Environ Microbiol* 78:7476–7479. doi: 10.1128/AEM.01691-12.
3. Taulé, C., Zabaleta, M., Mareque C., Platero, R., Sanjurjo, L., Sicardi, M., Frioni, L., Battistoni, F., & Fabiano, E. (2012). *New betaproteobacterial Rhizobium strains able to efficiently nodulate Parapiptadenia rigida (Benth.) Brenan*. *Appl Environ Microbiol* 78:1692-700. doi: 10.1128/AEM.06215-11.
4. Platero, R., James, E. K., Rios, C., Iriarte, A., Sandes, L., Zabaleta, M., Battistoni, F., & Fabiano, E. (2016). *Novel Cupriavidus strains isolated from root nodules of native Uruguayan Mimosa species*. *Appl Environ Microbiol* 82:3150 –3164. doi: 10.1128/AEM.04142-15.
5. 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*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51:1729-1735. doi: 10.1099/00207713-51-5-1729.
6. Miller, J. H. (1972). *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
7. Zhalnina, K., Louie, K. B., Hao, Z. et al. (2018). *Dynamic root exudate chemistry and microbial substrate preferences drive patterns in rhizosphere microbial community assembly*. *Nat Microbiol* 3:470–480. doi: 10.1038/s41564-018-0129-3.
8. Berendsen, R. L., Pieterse, C. M. J., & Bakker, P. A. H. M. (2012). *The rhizosphere microbiome and plant health*. *Trends Plant Sci.* 17:478–86. doi: 10.1016/j.tplants.2012.04.001.
9. Ofek-Lalzar, M., Sela, N., Goldman-Voronov, M. et al. (2014). *Niche and host-associated functional signatures of the root surface microbiome*. *Nat Commun* 5:4950. doi: 10.1038/ncomms5950.
10. Poole, P., Ramachandran, V., & Terpolilli, J. (2018). *Rhizobia: from saprophytes to endosymbionts*. *Nat Rev Microbiol* 16:291–303. doi: 10.1038/nrmicro.2017.171.

11. Smith, D. L., Praslickova, D., & Ilangumaran, G. (2015). *Inter-organismal signaling and management of the phytomicrobiome*. *Front. Plant Sci.* 6:722. doi: 10.3389/fpls.2015.00722.
12. Laranjo, M., Alexandre, A., & Oliveira, S. (2014). *Legume growth-promoting rhizobia: An overview on the Mesorhizobium genus*. *Microbiol Res.* 169:2-17. doi: 10.1016/j.micres.2013.09.012.
13. Dhole, A., Shelat, H., Vyas, R., Jhala, Y., & Bhange, M. (2016). *Endophytic occupation of legume root nodules by nifH-positive non-rhizobial bacteria, and their efficacy in the groundnut (Arachis hypogaea)*. *Annals of Microbiology*, 66:1397–1407. doi: 10.1007/s13213-016-1227-1.
14. Winkelmann, G. (2002). *Microbial siderophore-mediated transport*. *Biochemical Society Transactions*, 30:691–696. doi: 10.1042/bst0300691.
15. De Meyer, S. E., Fabiano, E., Tian, R. et al. (2015). *High-quality permanent draft genome sequence of the Parapiptadenia rigida-nodulating Cupriavidus sp. strain UYPR2.512*. *Stand in Genomic Sci* 10:13. doi: 10.1186/1944-3277-10-13.
16. Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H., Stahl, D. A., & Brock, T. *Brock biology of microorganisms*. Pearson Education, Inc. (2015).
17. Azcón-Bieto, J., & Talón, M. *Fundamentos de fisiología vegetal*. McGrawHill (2008).
18. Santi, C., Bogusz, D., & Franche, C. (2013). *Biological nitrogen fixation in non-legume plants*. *Annals of Botany*, 111:743–767. doi: 10.1093/aob/mct048.
19. Van der Heijden, M. G. A., Bardgett, R. D., & van Straalen, N. M. (2008). *The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems*. *Ecology Letters*, 11:296–310. doi: 10.1111/j.1461-0248.2007.01139.x.
20. Udvardi, M., & Poole, P. S. (2013). *Transport and Metabolism in Legume-Rhizobia Symbioses*. *Annual Review of Plant Biology*, 64:781–805. doi: 10.1146/annurev-arplant-050312-120235.
21. Amadou, C., Pascal, G., Mangenot, S., Glew, M., Bontemps, C., Capela, D., & Masson-Boivin, C. (2008). *Genome sequence of the -rhizobium Cupriavidus taiwanensis and comparative genomics of rhizobia*. *Genome Research*, 18:1472–1483. doi: 10.1101/gr.076448.108.
22. Galloway, J. N., Dentener, F. J., Capone, D. G., Boyer, E. W., Howarth, R. W., Seitzinger, S. P., Cleveland, C. C., Green, P. A., Holland, E. A., Karl, D. M., Michael, A. F., Porter, J. H., Towsend, A. R., & Vörösmarty, C. J. (2004). *Nitrogen Cycles: Past, Present, and Future*. *Biogeochemistry*, 70:153–226. doi: 10.1007/s10533-004-0370-0

23. Masson-Boivin, C., & Sachs, J. L. (2018). *Symbiotic nitrogen fixation by rhizobia — the roots of a success story*. *Current Opinion in Plant Biology*, 44:7–15. doi: 10.1016/j.pbi.2017.12.001.
24. Masson-Boivin, C., Giraud, E., Perret, X., & Batut, J. (2009). *Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes?* *Trends in Microbiology*, 17: 458–466. doi: 10.1016/j.tim.2009.07.004.
25. Wojciechowski M. F., Klitgaard B. B., & Bruneau A. (2003). *Reconstructing the phylogeny of legumes (Leguminosae): An early 21st century perspective*. Advances in legume systematics, part 10, Higher level systematics Kew, UK. Royal Botanic Gardens, 5–35.
26. Janczarek, M., Rachwał, K., Marzec, A., Grządziel, J., & Palusińska-Szys, M. (2015). *Signal molecules and cell-surface components involved in early stages of the legume–rhizobium interactions*. *Applied Soil Ecology*, 85:94–113. doi: 10.1016/j.apsoil.2014.08.010.
27. Moulin, L., Munive, A., Dreyfus, B., & Boivin-Masson, C. (2001). *Nodulation of legumes by members of the  $\beta$ -subclass of Proteobacteria*. *Nature*, 411:948–950. doi: 10.1038/35082070.
28. Estrada-de los Santos, P., Palmer, M., Chávez-Ramírez, B., Beukes, C., Steenkamp, E., Briscoe, L., & James, E. (2018). *Whole Genome Analyses Suggests that Burkholderia sensu lato Contains Two Additional Novel Genera (Mycetohabitans gen. nov., and Trinickia gen. nov.): Implications for the Evolution of Diazotrophy and Nodulation in the Burkholderiaceae*. *Genes*, 9(8), 389. doi: 10.3390/genes9080389.
29. Chen, W.-M., Moulin, L., Bontemps, C., Vandamme, P., Bena, G., & Boivin-Masson, C. (2003). *Legume Symbiotic Nitrogen Fixation by  $\beta$ -Proteobacteria Is Widespread in Nature*. *Journal of Bacteriology*, 185:7266–7272. doi: 10.1128/jb.185.24.7266-7272.2003.
30. Monza, J., & Márquez, A. *El metabolismo del nitrógeno en las plantas*. Almuzara (2004). ISBN: 84-933378-2-X.
31. Andrews, M., De Meyer, S., James, E., Stępkowski, T., Hodge, S., Simon, M., & Young, J. (2018). *Horizontal Transfer of Symbiosis Genes within and Between Rhizobial Genera: Occurrence and Importance*. *Genes*, 9:321. doi: 10.3390/genes9070321.
32. Cooper, J. E. (2007). *Early interactions between legumes and rhizobia: disclosing complexity in a molecular dialogue*. *Journal of Applied Microbiology*, 103:1355–1365. doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03366.x.

33. Mierziak, J., Kostyn, K., & Kulma, A. (2014). *Flavonoids as Important Molecules of Plant Interactions with the Environment*. *Molecules*, 19:16240–16265. doi: 10.3390/molecules191016240.
34. Gibson, K. E., Kobayashi, H., & Walker, G. C. (2008). *Molecular Determinants of a Symbiotic Chronic Infection*. *Annual Review of Genetics*, 42:413–441. doi: 10.1146/annurev.genet.42.110807.091427.
35. Daubech, B., Poinso, V., Klonowska, A., Capela, D., Chaintreuil, C., Moulin, L., & Masson-Boivin, C. (2019). *noeM, a New Nodulation Gene Involved in the Biosynthesis of Nod Factors with an Open-Chain Oxidized Terminal Residue and in the Symbiosis with Mimosa pudica*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, MPMI–06–19–0168. doi: 10.1094/mpmi-06-19-0168-r.
36. Fabre, S., Gully, D., Poitout, A., Patrel, D., Arrighi, J.-F., Giraud, E., & Cartieaux, F. (2015). *The Nod factor-independent nodulation in Aeschynomene evenia required the common plant-microbe symbiotic “toolkit.”* *Plant Physiology*, pp.01134.2015. doi:10.1104/pp.15.01134.
37. Munakata, R., Larbat, R., Duriot, L., Olry, A., Gavira, C., Mignard, B., Hehn, A., & Bourgaud, F. *Polyphenols from Plant Roots: An Expanding Biological Frontier. Recent Advances in Polyphenol Research, Volume 6*. Wiley (2019).
38. Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). *Flavonoids: an overview*. *Journal of Nutritional Science*, 5. doi: 10.1017/jns.2016.41.
39. Kumar, S., & Pandey, A. K. (2013). *Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview*. *The Scientific World Journal*, 2013:1–16. doi: 10.1155/2013/162750.
40. Perret, X., Staehelin, C., & Broughton, W. J. (2000). *Molecular Basis of Symbiotic Promiscuity*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64:180–201. doi: 10.1128/mmbr.64.1.180-201.2000.
41. MacGregor, G. R., Nolan, G. P., Fiering, S., Roederer, M., & Herzenberg, L. A. (1991). *Use of E. coli lacZ ( $\beta$ -Galactosidase) as a Reporter Gene*. *Gene Transfer and Expression Protocols*, 217–236. doi: 10.1385/0-89603-178-0:217.
42. Shimomura, O. (2009). *Discovery of Green Fluorescent Protein (GFP) (Nobel Lecture)*. *Angewandte Chemie International Edition*, 48:5590–5602. doi: 10.1002/anie.200902240.
43. Hopkins, J., Pierre, O., Kazmierczak, T., Gruber, V., Frugier, F., Clement, M., Frendo, P., Herouart, D., & Boncompagni, E. (2013). *MtZR1, a PRAF protein, is involved in the development of roots and symbiotic root nodules in Medicago truncatula*. *Plant, Cell & Environment*, 37:658–669. doi: 10.1111/pce.12185.

44. Chen, W.-M., James, E. K., Prescott, A. R., Kierans, M., & Sprent, J. I. (2003). *Nodulation of Mimosa spp. by the  $\beta$ -Proteobacterium Ralstonia taiwanensis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 16:1051–1061. doi: 10.1094/mpmi.2003.16.12.1051.
45. 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 Announc* 4:e01258-16. doi: 10.1128/genomeA.01258-16.
46. Hanahan, D. (1983). *Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids*. *J Mol Biol*, 166:557–580.
47. Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.
48. Kalnins, A., Otto, K., R  ther, U., & M  ller-Hill, B. (1983). *Sequence of the lacZ gene of Escherichia coli*. *The EMBO Journal*, 2:593–597. doi: 10.1002/j.1460-2075.1983.tb01468.x.
49. Cunnac, S., Boucher, C., & Genin, S. (2004). *Characterization of the cis-Acting Regulatory Element Controlling HrpB-Mediated Activation of the Type III Secretion System and Effector Genes in Ralstonia solanacearum*. *Journal of Bacteriology*, 186:2309-2318. doi: 10.1128/JB.186.8.2309-2318.2004.
50. Allaway, D., Schofield, N. A., Leonard, M. E., Gilardoni, L., Finan, T. M., & Poole, P. S. (2001). *Use of differential fluorescence induction and optical trapping to isolate environmentally induced genes*. *Environmental Microbiology*, 3:397–406. doi: 10.1046/j.1462-2920.2001.00205.x.
51. Kessler, B., de Lorenzo, V., & Timmis, K. N. (1992). *A general system to integrate lacZ fusions into the chromosomes of gram-negative eubacteria: regulation of the Pm promoter of the TOL plasmid studied with all controlling elements in monocopy*. *Molecular and General Genetics*, 233:293–301. doi: 10.1007/bf00587591.
52. Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory (1989).
53. Tu, Q., Yin, J., Fu, J., Herrmann, J., Li, Y., Yin, Y., Stewart, A. F., M  ller, R., & Zhang, Y. (2016). *Room temperature electrocompetent bacterial cells improve DNA transformation and recombineering efficiency*. *Scientific Reports*, 6:4648. doi: 10.1038/srep24648.
54. Ng, L. K., Martin, I., Alfa, M., & Mulvey, M. (2001). *Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes*. *Molecular and cellular probes*, 15(4), 209-215. doi: 10.1006/mcpr.2001.0363.
55. A plasmid Editor (ApE) versi  n 2.0.49 (2015) de Wayne Davis.

56. Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* **35**:1547-1549.
57. Liu, C.-W., & Murray, J. D. (2016). *The Role of Flavonoids in Nodulation Host-Range Specificity: An Update*. *Plants*, 5(3), 33. doi: 10.3390/plants5030033.
58. Begum, A. A., Leibovitch, S., Migner, P., & Zhang, F. (2001). *Specific flavonoids induced nod gene expression and pre-activated nod genes of Rhizobium leguminosarum increased pea (Pisum sativum L.) and lentil (Lens culinaris L.) nodulation in controlled growth chamber environments*. *Journal of Experimental Botany*, 52(360), 1537–1543. doi: 10.1093/jexbot/52.360.1537.
59. Ocampo, F. (2017). *Puesta a punto de herramientas moleculares estándar para el estudio de Cupriavidus simbiotes de Mimosas nativas* (Tesis de grado). Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, Uruguay.
60. Silva-Rocha, R., Martínez-García, E., Calles, B., Chavarría, M., Arce-Rodríguez, A., de las Heras, A., de Lorenzo, V. (2012). *The Standard European Vector Architecture (SEVA): a coherent platform for the analysis and deployment of complex prokaryotic phenotypes*. *Nucleic Acids Research*, 41(D1), D666–D675. doi:10.1093/nar/gks1119.