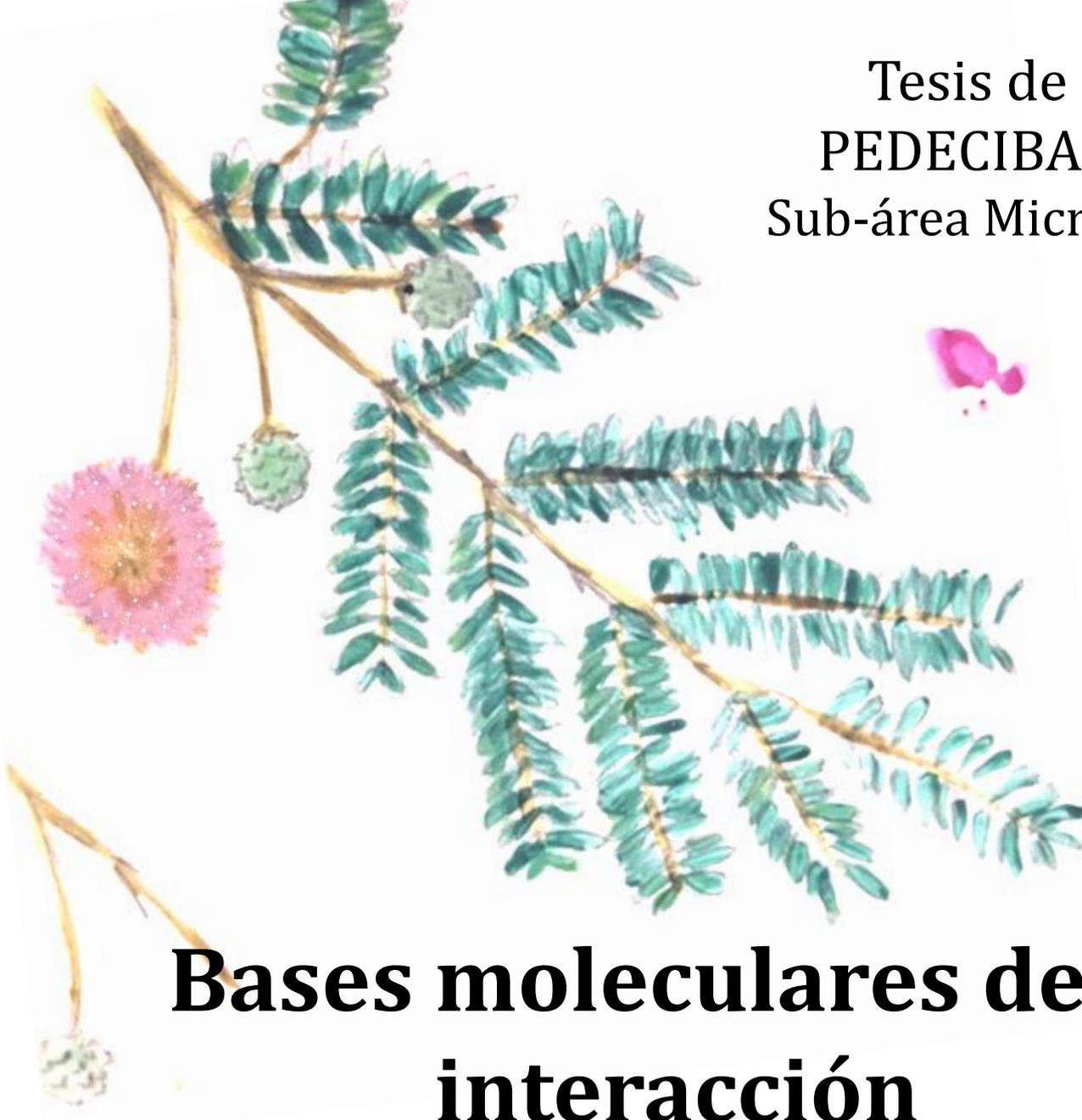


Tesis de Maestría
PEDECIBA Biología
Sub-área Microbiología



Bases moleculares de la interacción

Cupriavidus – Mimosa: una aproximación proteómica

Lic. Laura Sandes Bufano

Tutor: Dr. Raúl Platero

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

2020

Agradecimientos

Este trabajo no hubiera sido posible sin el apoyo y la ayuda de muchas personas a quienes les quiero agradecer.

En primer lugar a Rufo, por darme la oportunidad de formar parte de este proyecto, por su orientación, disposición y dedicación a lo largo de estos años.

También quiero agradecer a Dr. Martín Baraibar, Dra. Rosario Durán y a Madelón Portela por abrirme las puertas de sus laboratorios y brindarme su conocimiento durante las pasantías que realicé en esta Maestría.

Al “Cupria-grupo”, como me gusta llamarlo, los que formamos parte de este grupo de investigación, que estuvieron siempre para colaborar en los ensayos y para discutir resultados, enriqueciendo el trabajo día a día.

A mis compañeros del laboratorio, con los que he compartido muchas horas de trabajo, almuerzos y rituales del té. En especial, agradezco las lindas personas que conocí y las amigas que me llevo.

A los amigos que me dio esta carrera, por festejar juntos las buenas, pero sobre todo por bancarme la cabeza siempre y por levantarme el ánimo una y mil veces.

A los amigos de siempre, por acompañarme en esto desde otro lugar, aunque todavía no sepan mucho que es lo que hago.

A mamá, papá y Lola, fueron imprescindibles en este proceso. Gracias por alentarme a seguir y también por darme mi espacio cuando lo necesitaba. Gracias por creer y confiar en mí más que yo misma.

Gracias Mau por tu infinita paciencia, tu comprensión y compañía. Gracias por ser una vez más incondicional en una nueva tesis, y en la vida.

CONTENIDO

| | |
|---|----|
| CONTENIDO..... | 3 |
| CONTENIDO DE TABLAS..... | 5 |
| CONTENIDO DE FIGURAS..... | 6 |
| 1. RESUMEN..... | 8 |
| 2. INTRODUCCIÓN | 9 |
| 2.1. LOS RIZOBIOS Y LA FBN..... | 9 |
| 2.2. LEGUMINOSAS | 17 |
| 2.3. INTERACCIÓN PLANTA BACTERIA..... | 21 |
| 2.4. LOS PROTAGONISTAS: <i>MIMOSA PUDICA</i> Y <i>CUPRIAVIDUS SP. UYMMA02A</i> | 27 |
| 2.5. PROTEÓMICA..... | 29 |
| 2.6. HERRAMIENTAS MOLECULARES | 32 |
| 2.7. ANTECEDENTES | 33 |
| 3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS..... | 35 |
| 3.1. HIPÓTESIS | 35 |
| 3.2. OBJETIVO GENERAL | 35 |
| 3.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 35 |
| 4. MATERIALES Y MÉTODOS | 36 |
| 4.1. CEPAS, PLÁSMIDOS Y CONDICIONES DE CULTIVO | 36 |
| 4.2. CURVAS DE CRECIMIENTO | 36 |
| 4.3. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES DE CEPAS DEL GÉNERO <i>CUPRIAVIDUS</i> | 36 |
| 4.4. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS..... | 40 |
| 4.5. SDS PAGE..... | 40 |
| 4.6. 2D DIGE..... | 40 |
| 4.7. CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE <i>CUPRIAVIDUS SP. UYMMA02A</i> A NIVEL PROTEÓMICO EN CULTIVOS <i>IN VITRO</i> | 44 |
| 4.8. CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE <i>CUPRIAVIDUS SP. UYMMA02A</i> A NIVEL PROTEÓMICO EN CULTIVOS <i>IN VIVO</i> | 46 |
| 4.9. GENERACIÓN DE MUTANTES DIRIGIDAS | 49 |
| 5. RESULTADOS | 58 |
| 5.1. EXPRESIÓN GLOBAL DE PROTEÍNAS DE <i>CUPRIAVIDUS SP. UYMMA02A</i> | 58 |
| 5.2. CRECIMIENTO DE <i>CUPRIAVIDUS SP. UYMMA02A</i> EN DISTINTAS CONDICIONES DE CULTIVO | 59 |
| 5.3. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE PROTEÍNAS EN RESPUESTA A VARIANTES NUTRICIONALES | 61 |
| 5.4. CONSTRUCCIÓN DE CEPAS MUTANTES DE <i>CUPRIAVIDUS SP. UYMMA02A</i> | 71 |
| 6. DISCUSIÓN..... | 75 |
| 7. CONCLUSIONES..... | 96 |

| | |
|--|-----|
| 8. PERSPECTIVAS..... | 97 |
| 9. ANEXO | 98 |
| 9.1. MEDIOS DE CULTIVO, GELES Y SOLUCIONES | 98 |
| 10. BIBLIOGRAFÍA..... | 101 |

CONTENIDO DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Cepas utilizadas en este trabajo..... | 38 |
| Tabla 2. Vectores plasmídicos utilizados en este trabajo..... | 39 |
| Tabla 3. Diseño experimental para el marcado de muestras (2D-DIGE) para el efecto de la disponibilidad de nitrógeno. | 45 |
| Tabla 4. Diseño experimental para el marcado de muestras (2D-DIGE) para el efecto de la presencia de flavonoides. | 45 |
| Tabla 5. Diseño experimental para el marcado de muestras (2D-DIGE) para el efecto de la presencia del macrosimbionte. | 48 |
| Tabla 6. Cebadores utilizados para la mutagénesis dirigida..... | 50 |
| Tabla 7. Condiciones de inducción para plásmidos con sistema I-SecI | 57 |
| Tabla 8. Concentración de proteínas de <i>Cupriavidus</i> sp. UYMMa02A determinada mediante Bradford para ensayo de disponibilidad de nitrógeno..... | 61 |
| Tabla 9. Características generales de las proteínas expresadas diferencialmente en respuesta a la disponibilidad de nitrógeno..... | 63 |
| Tabla 10. Concentración de proteínas de <i>Cupriavidus</i> sp. UYMMa02A determinada mediante Bradford para ensayo con flavonoides comerciales. | 64 |
| Tabla 11. Características generales de las proteínas expresadas diferencialmente en presencia de apigenina | 66 |
| Tabla 12. Características generales de las proteínas expresadas diferencialmente en presencia de luteolina | 67 |
| Tabla 13. Concentración de proteínas de <i>Cupriavidus</i> sp. UYMMa02A determinada mediante Bradford para ensayo de interacción planta - bacteria..... | 68 |
| Tabla 14. Características generales de las proteínas bacterianas expresadas diferencialmente en presencia de la planta hospedera | 70 |
| Tabla 15. Tamaño esperado para los amplicones involucrados en la mutagénesis dirigida de los genes <i>nodD</i> y <i>prkA</i> | 72 |

CONTENIDO DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Ciclo del nitrógeno..... | 10 |
| Figura 2. Filogenia del gen del ARNr 16S de diazótrofos. | 12 |
| Figura 3. Relación filogenética de proteobacterias capaces de nodular raíces de leguminosas | 15 |
| Figura 4. Características del módulo simbiótico de <i>C. taiwanensis</i> | 16 |
| Figura 5. Filogenia y clasificación de las subfamilias de <i>Fabaceae</i> | 19 |
| Figura 6. Moléculas quimioatrayentes presentes en exudados vegetales..... | 23 |
| Figura 7. Estructura general de factores Nod. | 25 |
| Figura 8. Proceso de formación del nódulo. | 26 |
| Figura 9. Esquema para la estrategia de 2D- DIGE utilizada..... | 30 |
| Figura 10. Marcado mínimo de muestras con CyDye DIGE Fluor | 41 |
| Figura 11. Esquema de trabajo empleado para realizar el 2D-DIGE. | 42 |
| Figura 12. Estrategia experimental con distintas concentraciones de nitrógeno. ... | 44 |
| Figura 13. Estrategia experimental con exudados comerciales. | 46 |
| Figura 14. Sistema co-cultivo planta – microorganismo. | 47 |
| Figura 15. Esquema del proceso de construcción del plásmido mutagénico pLSΔprkA. | 53 |
| Figura 16. Cointegración de pLSΔprkA al genoma de <i>Cupriavidus</i> sp. UYMMa02A mediante recombinación homóloga..... | 54 |
| Figura 17. Resolución de los cointegrados..... | 56 |
| Figura 18. Electroforesis SDS-PAGE de proteínas totales empleando diferentes lisis mecánicas. | 58 |
| Figura 19. Electroforesis SDS-PAGE de proteínas totales empleando distintas soluciones tampón. | 59 |
| Figura 20. Curvas de crecimiento de la cepa <i>Cupriavidus</i> sp. UYMMa02A bajo distintas condiciones de cultivo..... | 60 |
| Figura 21. Mapa con la localización de los spots expresados diferencialmente. | 62 |
| Figura 22. Análisis por 2D-DIGE de los extractos proteicos de <i>Cupriavidus</i> sp. UYMMa02A al suplementar el medio de cultivo con flavonoides sintéticos. | 65 |
| Figura 23. Análisis por 2D DIGE de los extractos proteicos de <i>Cupriavidus</i> sp. UYMMa02A posterior a su interacción con <i>M. pudica</i> y su control..... | 69 |

| | |
|--|----|
| Figura 24. Electroforesis en gel de agarosa mostrando los pasos de la construcción de <i>Cupriavidus</i> sp. UYMMa02A Δ nodD..... | 72 |
| Figura 25. Electroforesis en gel de agarosa mostrando los pasos de la construcción de <i>Cupriavidus</i> sp. UYMMa02A Δ prkA..... | 74 |
| Figura 26. Tipos de ALDH en base al nucleófilo exógeno..... | 84 |
| Figura 27. Participación de RidA en la síntesis de piruvato..... | 91 |

1. RESUMEN

Los rizobios son bacterias del suelo que se encuentran en asociación simbiótica con las leguminosas. Durante esta asociación, estos microorganismos llevan a cabo la fijación biológica de nitrógeno, un proceso de gran impacto ambiental que permite a las plantas adquirir el nitrógeno atmosférico. El establecimiento de la simbiosis se encuentra finamente regulado mediante un diálogo molecular que comienza cuando los organismos se reconocen mutuamente en la rizósfera y culmina con la formación de órganos especializados, llamados nódulos, en las raíces de las plantas hospederas. Los mecanismos moleculares implicados han sido ampliamente estudiados en modelos simbióticos en los que participan rizobios pertenecientes al subgrupo alfa de las proteobacterias. Sin embargo, hasta ahora se tiene muy poca información de cómo ocurre este intercambio de señales entre las leguminosas y los simbiontes pertenecientes a los géneros *Paraburkholderia* y *Cupriavidus* del subgrupo beta de las proteobacterias.

Este trabajo tuvo como objetivo principal identificar las proteínas y principales vías metabólicas implicadas en el establecimiento de la simbiosis entre la cepa de rizobio UYMMA02A, perteneciente al género *Cupriavidus* y uno de sus hospederos, la leguminosa *Mimosa pudica*. Para esto se realizaron distintas aproximaciones, desde la modulación de un nutriente esencial como el nitrógeno, hasta el intercambio de señales entre los dos organismos mutualistas. Los resultados obtenidos indicaron que las proteínas que se sobreexpresaron fueron mayoritariamente las pertenecientes al metabolismo de aminoácidos, la biosíntesis de lípidos y las relacionadas al estrés, destacando la implicancia de estas vías en la interacción entre los protagonistas.

Complementariamente se realizó la construcción de mutantes puntuales en genes seleccionados, obteniendo la cepa *Cupriavidus* sp. UYMMa02A Δ nodD, una cepa que contiene una delección en el gen que codifica para el regulador transcripcional NodD.

De acuerdo a los resultados obtenidos se podría afirmar que *Cupriavidus* sp. UYMMa02A adapta su metabolismo de nutrientes y transporte frente a las distintas condiciones ensayadas, modula diferentes proteínas relacionadas al estrés y la interacción como consecuencia de la presencia de su hospedero; y además sería capaz de nodular plantas de *Mimosa pudica* mediante un mecanismo independiente de la proteína NodD.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Los rizobios y la FBN

El nitrógeno (N) es uno de los elementos indispensables para el desarrollo de todos los seres vivos. Junto con el carbono, hidrógeno, oxígeno y potasio, el nitrógeno compone las biomoléculas estructurales por lo que se considera un macro nutriente. Este elemento forma parte de componentes esenciales como ácidos nucleicos, aminoácidos, fosfolípidos, coenzimas, vitaminas, ATP, entre otros (Azcón-Bieto and Talón, 2003).

Las relaciones entre los estados de oxidación del nitrógeno, que en conjunto conforman el ciclo del N, son consecuencia de la actividad metabólica de microorganismos, plantas y animales (Figura 1). El nitrato (NO_3^-) y el amonio (NH_4^+) son las principales formas de nitrógeno combinado absorbido por las plantas. El NH_4^+ producido a partir de los restos de seres vivos puede ser absorbido por las plantas, transformarse en NO_3^- (nitrificación), o perderse como NH_3 (volatilización). Parte del NO_3^- es reducido a NH_4^+ (amonificación), y en condiciones de bajo O_2 puede ser respirado por algunos microorganismos. La respiración de NO_3^- tiene como consecuencia la salida de nitrógeno de los ecosistemas (desnitrificación) (Monza and Márquez, 2004).

Aunque el N es uno de los elementos más abundantes de la naturaleza, constituyendo el 78% de la atmósfera, en muchos ambientes su biodisponibilidad es limitante. Esto se debe a que la forma gaseosa (N_2), no puede ser asimilada directamente por la mayoría de los seres vivos. El principal mecanismo que existe de entrada de nitrógeno a los ecosistemas ocurre por un proceso reductivo, la fijación biológica de nitrógeno (FBN), el cual es realizado únicamente por microorganismos procariotas (Bruijn, 2015; Monza and Márquez, 2004).

La FBN es la capacidad que tienen ciertas bacterias y archeas de reducir la molécula de dinitrógeno (N_2) a NH_3 . Se ha calculado que este proceso es responsable del 87% del N fijado en la naturaleza, considerándose uno de los servicios ecológicos más importantes que los microorganismos ofrecen a eucariotas (Azcón-Bieto and Talón, 2003). Los microorganismos capaces de llevar a cabo la FBN se denominan diazótrofos (diaz = Nitrógeno, trofo = comida), se encuentran ampliamente distribuidos en el árbol filogenético y tienen diferentes estilos de vida incluyendo organismos aerobios, anaerobios, autótrofos, heterótrofos, metanótrofos, los cuales pueden desarrollarse como células individuales o en filamentos (Roesch et al., 2007; Young, 1992).

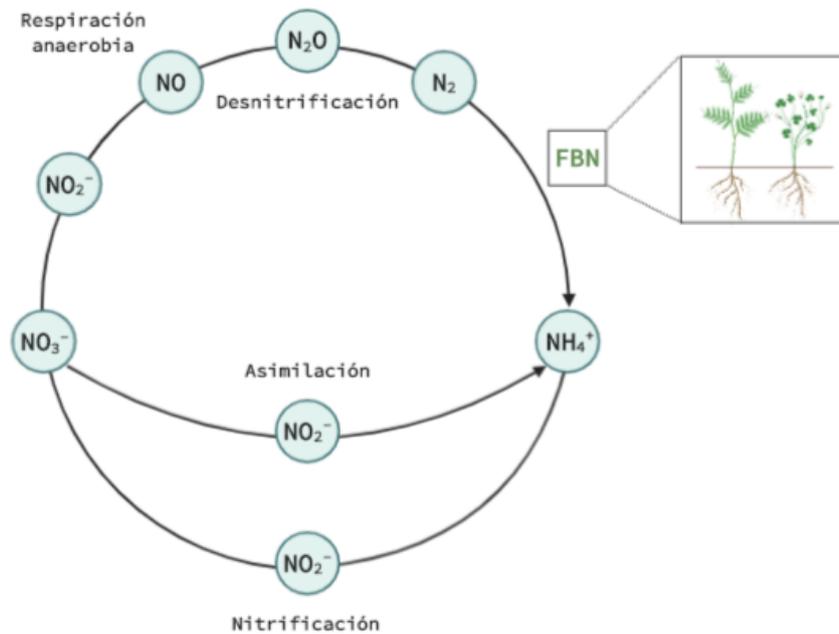
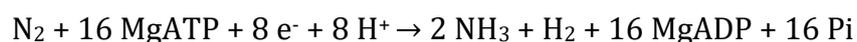


Figura 1. Ciclo del nitrógeno. Relaciones entre diferentes estados de oxidación del nitrógeno como consecuencia de la actividad metabólica de microorganismos, plantas y animales. Creado con BioRender.

El encargado de llevar a cabo el proceso de FBN es el complejo enzimático de la nitrogenasa (NR). Este complejo se encarga de reducir el triple enlace del N_2 implicando un alto costo energético (16 ATP), bajo un mecanismo molecular que aún no se encuentra totalmente dilucidado, para producir NH_3 y H_2 (Ryu et al., 2017; Taiz, L & Zeiger, 2006), según la siguiente reacción:



Desde un punto de vista evolutivo aún se desconocen los orígenes del NR, de todos modos, en la mayoría de los diazótrofos se encuentra un conjunto de genes denominados genes *nif* (*nifH*, *nifD* y *nifK*, que codifican para las subunidades *core* de NR) usualmente utilizados como marcadores genéticos para el estudio de este grupo de microorganismos (Bruijn, 2015). En muchas especies NR depende de la cadena de transporte de electrones codificado por los genes *fixABCX*, que se encarga de reducir flavodoxina o ferredoxina utilizando NADH para suministrarle electrones (Ledbetter et al., 2017; Zheng et al., 2017). NR está compuesto por dos componentes: la proteína Mo-Fe (molibdeno-hierro), también llamada dinitrogenasa o componente I (codificada por los genes *nifDK*), que cuenta con cuatro subunidades, cada una con dos centros Mo-Fe-S y un número variable de centros Fe-S; y la proteína Fe (ferro proteína), también llamada dinitrogenasa reductasa o componente II, la cual es codificada por el gen *nifH*, es de menor tamaño y está

compuesta por dos subunidades idénticas, tiene cuatro centros hierro azufre (4Fe-4S²⁻) que participan en las reacciones redox implicadas en la catálisis. Ninguno de los dos componentes tiene actividad catalítica por sí solo (Taiz, L & Zeiger, 2006). Si bien todos los diazótrofos poseen la nitrogenasa clásica (Mo-Fe nitrogenasa), existen algunos microorganismos que poseen también una o dos complejos enzimáticos alternativos, donde el cofactor Mo del sitio catalítico es sustituido por vanadio (V) o hierro (Fe) (V-Fe o Fe-Fe nitrogenasas) (Bruijn, 2015). Boyd y colaboradores reportaron que la Mo-Fe nitrogenasa fue el primer tipo de nitrogenasa en emerger en archeas metanogénicas y que las nitrogenasas alternativas evolucionaron en respuesta a una limitación de Mo. Cuando el Mo aumentó su biodisponibilidad en la biósfera, la nitrogenasa clásica se hizo frecuente (Boyd et al., 2011). Complementariamente, Fani y colaboradores propusieron que los genes *nifENDK*, implicados en la biosíntesis del cofactor Fe-Mo, estaban presentes antes de la divergencia entre Bacteria y Archea (Fani et al., 2000). De hecho, como se puede observar en la Figura 2, el análisis filogenético indicaría que la fijación de nitrógeno se originó en el último ancestro común de los tres dominios (Bacteria, Archea y Eucaria), esto al menos se infiere por la presencia de NR en los dos dominios procariotas (Zheng et al., 2017). El alto costo energético de la FBN tiene como consecuencia que después de la divergencia, en muchas especies, el debilitamiento de la presión selectiva podría haber resultado, junto con la conversión de la atmósfera a oxigénica, en la pérdida de estos genes para eucariotas y un gran porcentaje de procariotas. Sin embargo, su alto grado de conservación, sugiere que los genes *nif* han prevalecido debido a la transferencia horizontal de genes (THG) (Fani et al., 2000).

En base a la secuencia del gen *nifH*, los diazótrofos caen en cuatro clados distintos: (I) bacterias que tienen secuencias *nifH* y algunas *vnfH* (secuencia que codifica para la V-Fe nitrogenasa), (II) secuencias *anfH* (secuencia que codifica para Fe-Fe nitrogenasa) de bacterias y archeas metanogénicas, (III) secuencias *nifH* de bacterias y archeas anaerobias, y (IV) secuencias de genes parálogos a *nifH* que no tienen rol en la fijación de nitrógeno (Bruijn, 2015).

En bacterias la FBN se da en seis phyla: bacterias verdes del azufre (*Chlorobi*), cianobacterias, Gram positivas de bajo (*Firmicutes*) y alto contenido de G+C (*Actinobacteria*), *Spirochaetes* y *Proteobacteria*, siendo esta última la división bacteriana más abundante en diazótrofos, y particularmente en rizobios (Lloret 2005) (Figura 2). A su vez, pueden dividirse en dos grandes grupos: aquellas que son capaces de fijar el N₂ en asociación - simbiótica o no-simbiótica - con una planta, y las que realizan el proceso de FBN en condiciones de vida libre (Bhattacharjee et al., 2008; Masson-Boivin et al., 2009). Solamente algunos linajes de Angiospermas han evolucionado y conseguido una eficiente simbiosis con microorganismos fijadores de N₂ (Masson-Boivin and Sachs, 2018; Raymond et al., 2001). *Fabaceae* y *Ulmaceae* son las familias que establecieron el mutualismo con rizobios, mientras que bacterias del género *Frankia* fijan nitrógeno junto a *Betulaceae*, *Casuarinaceae*, *Coriariaceae*, *Datisceae*, *Elaeagnaceae*, *Myricaceae*, *Rhamnaceae* y *Rosaceae* (Soltis et al., 1995).

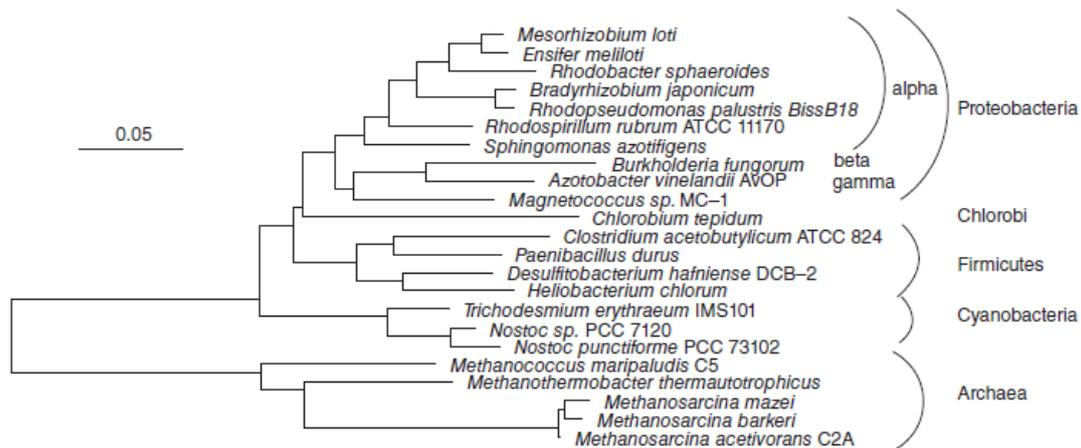


Figura 2. Filogenia de diazótrofos basada en la secuencia del gen del ARNr 16S. Filogenia del gen del ARNr 16S de procariontes que contienen los genes *nif*. El análisis filogenético indicaría que la fijación de nitrógeno se originó en el último ancestro común entre los dominios Bacteria, Archea y Eucaria. Particularmente en bacterias la FBN se da en seis phyla: *Chlorobi*, *Cyanobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Spirochaetes* y *Proteobacteria*, siendo esta última la división bacteriana más abundante en diazótrofos. Tomado de (Bruijn, 2015).

Los rizobios son bacterias del suelo, bacilos *Gram* negativos, que presentan flagelo polar o subpolar o dos a seis flagelos peritricos. La mayoría posee un metabolismo aerobio heterótrofo, tienen la capacidad de utilizar una gran variedad de azúcares como fuente de carbono y pertenecen a varios géneros dentro de las clases α y β de las Proteobacterias ((Azcón-Bieto and Talón, 2003; Shamseldin et al., 2017; Tang and Capela, 2020), Garabato & Sandes, en preparación). Además, una característica que define a estos microorganismos, es la capacidad de formar junto a las leguminosas - y excepcionalmente la no leguminosa *Parasponia* sp. - la asociación simbiótica mutualista más estudiada hasta el momento, considerándose de las más importantes desde el punto de vista agrícola y ambiental (Franche and Lindström, 2009; Hayat et al., 2010). Esta simbiosis se manifiesta con la formación de un órgano especializado en raíces - y ocasionalmente tallos - de las plantas hospedadoras denominado nódulo, en los que se alojan los rizobios y se lleva a cabo la FBN (Gibson et al., 2008). Cuando los rizobios infectan la célula vegetal, estas envuelven a las bacterias en vesículas membranosas denominadas simbiosomas (ver sección 2.3.1). En este compartimento intracelular es que se da la diferenciación del rizobio a bacteroide, el cual está altamente especializado y optimizado para llevar adelante la FBN (Martin et al., 2017). Los bacteroides necesitan un suministro permanente de compuestos carbonados para la generación de ATP y poder reductor a través de la fosforilación oxidativa. La sacarosa es el principal fotosintato que aporta carbono y energía a la fijación. En el nódulo se hidroliza a fructosa y UDP-glucosa por la acción de la sacarosa sintasa, enzima que se considera fundamental para este proceso y cuyos niveles de ARNm están estrechamente asociados con el aumento de la actividad de NR en los bacteroides (Liu et al., 2018). En el citosol de las células del nódulo, las hexosas son catabolizadas por la glicólisis hasta fosfoenolpiruvato (PEP), que puede ser respirado y generar ATP para el mantenimiento energético celular, o ser metabolizado a malato, succinato y fumarato. Estos ácidos carboxílicos ingresan

mediante transportadores específicos situados en la membrana del simbiosoma y del bacteroide, siendo metabolizados en este último mediante el ciclo de Krebs (Liu et al., 2018; Oldroyd et al., 2011).

El proceso simbiótico mutualista se explica porque a cambio de su inversión en fotosíntesis, la leguminosa recibe una fuente de nitrógeno reducido, principalmente amonio (Monza and Márquez, 2004). Las células vegetales evitan la toxicidad por amonio incorporándolo rápidamente a los esqueletos carbonados, a través de la vía de la glutamina sintetasa y glutamato sintasa, formando glutamina y glutamato, respectivamente (Mulley et al., 2011; Seabra et al., 2010). Una vez que se incorpora el nitrógeno, distintas transaminasas se encargan de sintetizar otros aminoácidos como aspartato, alanina y asparagina (Ricoult et al., 2006; Sulieman and Tran, 2013; Xu et al., 2017). Todas las transaminasas son dependiente del cofactor pirodoxal fosfato y se encuentra ampliamente distribuida en los tejidos vegetales como raíces, tallos y hojas (Xu et al., 2017). En estas condiciones el proceso se vuelve muy eficiente, llegando a cubrir las necesidades totales de nitrógeno durante el desarrollo de la planta.

La FBN está regulada tanto por el metabolismo del nitrógeno como por el del carbono. El complejo nitrogenasa se inhibe en presencia de nitrógeno combinado (NO_3^- o NH_4^+) y se inactiva completamente en presencia de oxígeno (O_2) (Boyd et al., 2011).

Las evidencias disponibles sugieren que el origen de la FBN evolucionó en un ambiente anóxico, lo cual sería consistente con la alta sensibilidad al oxígeno por parte del NR (Boyd et al., 2011). Sin embargo, los bacteroides tienen un metabolismo aeróbico, y necesitan del O_2 como aceptor final de electrones en la fosforilación oxidativa, por lo que los procesos de respiración y FBN se encuentran finamente regulados y coordinados para que se puedan efectuar exitosamente. Para esto, los organismos han incorporado distintas adaptaciones que dependen del diazótrofo implicado. Por ejemplo, algunas cianobacterias forman heterocistos, células especializadas con adaptaciones estructurales y funcionales que permiten separar espacialmente la fijación de nitrógeno y la respiración; algunos diazótrofos de vida libre como *Azotobacter*, protegen a la NR aumentando la tasa de respiración, lo que les permite mantener bajos niveles de O_2 en el citoplasma; mientras que los rizobios cuentan con al menos tres mecanismos para regular las concentraciones de O_2 . El primer mecanismo consiste en una barrera en la capa cortical de los nódulos, cuya permeabilidad frente a este gas es controlada por la planta; sólo concentraciones en el rango de nanomolar de esta molécula traspasan esta barrera (Rutten and Poole, 2019). Un segundo mecanismo es mediante la producción de leghemoglobina, una hemo proteína que transporta el O_2 de manera que llegue a los bacteroides para la respiración celular, pero manteniéndolo en bajas concentraciones, para no inhibir el complejo enzimático (Monza and Márquez, 2004; White et al., 2007). En plantas con mutantes *knockout* en leghemoglobina se observó que no hay expresión de la nitrogenasa en bacteroides resaltando de ahí su importancia en este mutualismo. En comparación con la mioglobina (hemoproteína humana), esta tiene mayor afinidad

por el oxígeno, pero la liberación del gas es más lenta. La leghemoglobina tiene la capacidad de limitar el oxígeno libre para prevenir daño a NR y generar altas concentraciones de oxígeno “seguro” para los bacteroides, de manera simultánea (Ott et al., 2005). El tercer mecanismo consiste en un control, por parte de los nódulos, de los niveles de oxígeno de las células vegetales infectadas. Las mitocondrias de las células infectadas emplean oxidasas terminales de alta afinidad que se localizan en áreas de la periferia celular, donde la entrada de oxígeno es probablemente alta. Se cree que esto actúa como una barrera adicional de oxígeno, ya que las mitocondrias consumen este gas protegiendo a los simbiosomas del mismo. También se ha propuesto que este mecanismo serviría para ajustar las tasas de fijación en respuesta a la disponibilidad de oxígeno (Rutten and Poole, 2019).

2.1.1. Diversidad filogenética de rizobios

En las últimas décadas, los análisis filogenéticos han tomado partido en la caracterización de los rizobios. En particular, mediante el uso de secuencias del gen *rrs* que codifica para el ARN ribosomal (ARNr) 16S, se ha establecido la disposición filogenética de estas bacterias a nivel de género (Andrews and Andrews, 2017). En la actualidad hay cerca de 238 especies de rizobios descritas en el mundo, distribuidas en 18 (19, teniendo en cuenta *Trinickia*) géneros pertenecientes a las clases α y β dentro de las proteobacterias (Shamseldin et al., 2017). Los primeros descritos y los más estudiados hasta el momento, son los rizobios pertenecientes al grupo de las α -proteobacterias, también llamados α -rizobios y se clasifican en 16 géneros. En cambio, los pertenecientes a las β -proteobacterias, también conocidos como β -rizobios comprenden solamente 3 géneros, *Cupriavidus*, *Paraburkholderia* y el recientemente postulado *Trinickia*, reportado en base a aproximaciones filogenéticas, identidad nucleotídica promedio (ANI, de sus siglas en inglés) e identidad aminoacídica (AAI, de sus siglas en inglés) (Estrada-de los Santos et al., 2018) (Figura 3). Los géneros *Cupriavidus* y *Paraburkholderia* se describieron por primera vez en 2001 en dos trabajos paralelos. Por un lado, Moulin y colaboradores aislaron dos cepas de *Burkholderia* (STM678 y STM815) de *Aspalathus carnosa* (*Papilionoideae*) en Sudamérica y de *Machaerium lunatum* (*Papilionoideae*) en la Guyana Francesa, respectivamente (Moulin et al., 2001). Estas cepas fueron posteriormente denominadas como *Burkholderia tuberum* y *Burkholderia phymatum* (Vandamme et al., 2002), que luego fueron incorporadas a un nuevo género, *Paraburkholderia* (Sawana et al., 2014). Por otro lado, se describió a *Ralstonia taiwanensis* aislada de dos especies de *Mimosa* (*Mimosa pudica* y *Mimosa diplotricha*) en Taiwan (Chen et al., 2001), que posteriormente fue renombrada a *Cupriavidus taiwanensis* (Vandamme and Coenye, 2004). Desde entonces, diversos estudios mostraron la presencia generalizada de β -rizobios como simbiosomas de especies de *Mimosa* a lo largo del trópico, en Costa Rica, Estados Unidos, Panamá, Venezuela, Brasil, Taiwán, Australia, India, Nueva Guinea, China, Nueva Caledonia, México y Uruguay (Bontemps et al., 2016, 2010; dos Reis et al., 2010; Klonowska et al., 2012; Mishra et al., 2012; Platero et al., 2016; Taulé et al., 2012). Complementariamente, en 2008 Amadou y colaboradores secuenciaron el genoma de *Cupriavidus taiwanensis*, y lo compararon con los genomas disponibles de

rizobios a la fecha. Los investigadores concluyeron que si bien existe un *core genome* entre α y β -rizobios, no existe una genética común para el establecimiento de simbiosis con leguminosas (Amadou et al., 2008).

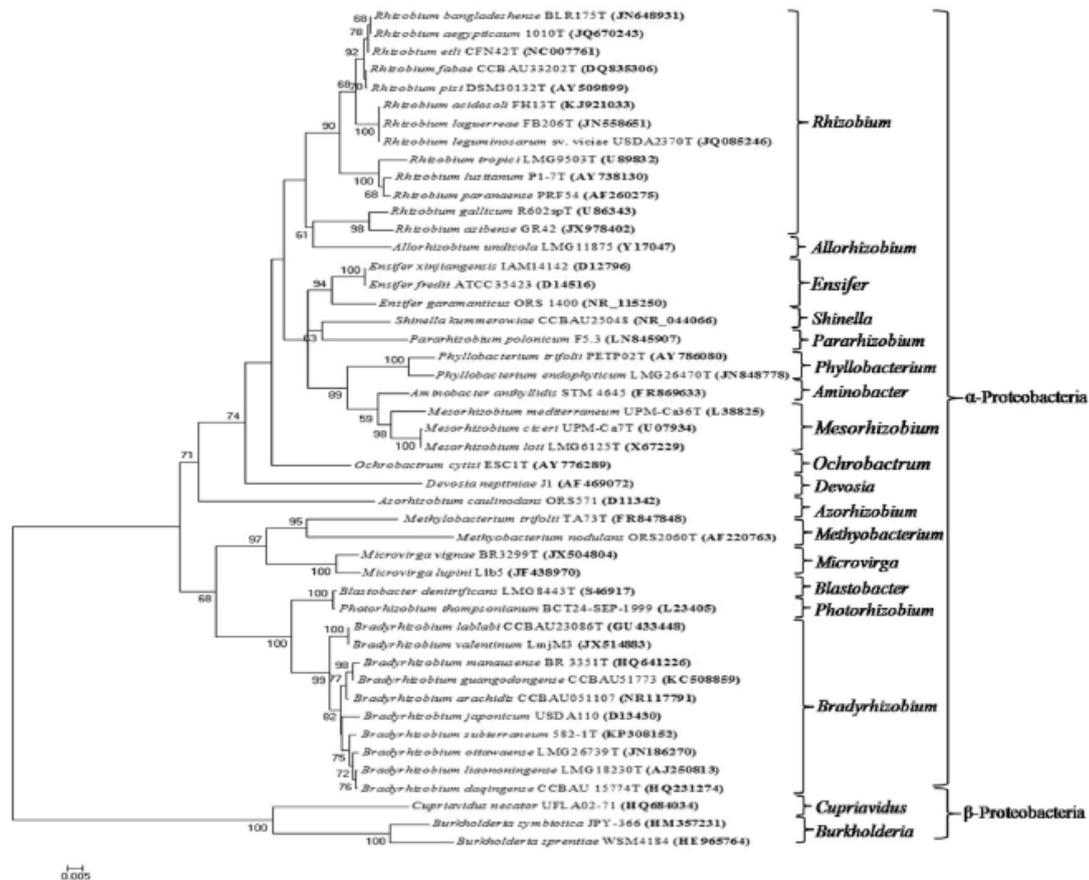


Figura 3. Relación filogenética de proteobacterias capaces de nodular raíces de leguminosas. Análisis filogenético de la secuencia del gen que codifica para el ARNr 16S (1450 pb) de 47 especies representativas de los 18 géneros de bacteria capaces de formar nódulos en raíces. Se indican los valores de bootstrap cuando son mayores al 50% (Shamseldin et al., 2017).

Las condiciones bióticas y abióticas del ambiente influyen fuertemente en la selección de cepas bacterianas y de especies que sean capaces de vivir en el suelo. Además, la presión selectiva del hospedero y la THG son los principales mecanismos que dan forma a la estructura genética de los microorganismos simbióticos (Lemaire et al., 2016, 2015; Mishra et al., 2012). Actualmente, ha aumentado el conocimiento sobre la diversidad de β -rizobios, pudiendo establecer que hay dos principales centros de diversificación de β -rizobios: los asociados a *Mimosoideae* en América del Sur y los asociados a *Papilionoideae* en Sudáfrica (Zheng et al., 2017). Estos grupos no son totalmente independientes debido a que las placas tectónicas de América del Sur y Sudáfrica estaban integradas dentro del súper continente Gondwana (Simon et al., 2011). Por esta razón se establece la hipótesis que el ancestro de las burkholderias ya se encontraba presente en los suelos de Gondwana, antes de la separación del súper continente, y por ende esta ruptura habría generado también

la separación de la población bacteriana. Es probable que las burkholderias sudamericanas encontraran plantas emergentes del género *Mimosa* y que las colonizaran en suelos ácidos y secos de la zona. En paralelo, las burkholderias sudafricanas se asociaron a tribus papilonoideas. Su principal diferencia es que las primeras contienen genes de nodulación muy diferentes a los de los α -rizobios locales, mientras que las últimas poseen un rango de nodulación amplio para varios géneros de leguminosas que son generalmente noduladas por α -rizobios. Si bien es difícil concluir de donde y como se obtuvieron los genes de nodulación, Zheng y colaboradores sugieren que las burkholderias sudamericanas emergieron separadas de la población local de α -rizobios y que es posible que sus ancestros nodularon un género de leguminosas, precedente a las mimosas, que ya se encuentra extinto (Zheng et al., 2017)

Para una simbiosis efectiva, los rizobios requieren genes específicos, que se encuentran usualmente localizados en plásmidos simbióticos (pSym) o regiones móviles del genoma denominadas islas simbióticas; estas incluyen los genes de nodulación (genes *nod*, *nol* y *noe*) y los genes de fijación de nitrógeno (genes *nif*, *fix* y *fdx*) (Lindström and Mousavi, 2019; Zheng et al., 2017). Se cree que el conjunto de genes de nodulación se ensambló muy temprano evolutivamente, pero a su vez estos genes divergieron tanto actualmente que es muy difícil determinar de qué linaje bacteriano surgieron (Remigi 2016). Un gran número de reportes indican que la THG sucedió de los α a los β -rizobios, sin embargo Aoki y colaboradores reportan que *nodIJ* posiblemente se originó en β -proteobacterias, mientras que *nodABC* proviene de actinobacterias (Aoki 2013, Persson 2015). Por otra parte, los genes implicados en la FBN se distribuyen en dominio archea y bacteria y se encuentran distantes de los genes *nod* en cuanto a su filogenia, sugiriendo que los rizobios tomaron estos genes de bacterias diazótroficas en vida libre. Los genes simbióticos y los de nodulación se encuentran juntos como lo señala la Figura 4. Sin embargo, su proximidad no es necesaria para su función, por lo que posiblemente este módulo simbiótico haya sido transferido recientemente (Remigi et al., 2016). La información que se conoce sobre los rizobios pertenecientes a las β -proteobacterias es mucho más escasa que la de α -rizobios, por lo que su estudio será una contribución a la diversidad microbiana del suelo.

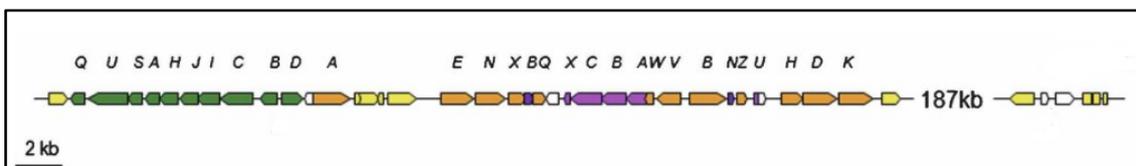


Figura 4. Características del módulo simbiótico de *C. taiwanensis*. Mapa de la región simbiótica, genes *nod* en verde, genes *nif* en naranja, genes *fix* en violeta y trasposasas en amarillo. Adaptado de (Amadou et al., 2008).

2.2. Leguminosas

Las leguminosas conforman un conjunto de plantas angiospermas que se agrupan en la familia *Fabaceae*, una familia de distribución cosmopolita que representa un importante componente ecológico en casi todos los ecosistemas a nivel mundial, encontrándose hasta en los hábitats más extremos (Schrire et al., 2005). Está formada por aproximadamente 19500 especies agrupadas en alrededor de 770 géneros presentes como hierbas, arbustos y árboles. Son el tercer grupo más grande de angiospermas en términos de número de especies, y el segundo más importante desde el punto de vista económico, después de *Poaceae*. La gran mayoría de las especies son capaces de fijar N₂ en simbiosis junto a los rizobios, seguramente su característica más estudiada desde el punto de vista ecológico (Azani et al., 2017).

Recientemente, las leguminosas han sido foco de varios estudios filogenéticos a nivel de subfamilias, tribus y grupos. En consecuencia, el *Legume Phylogeny Working Group* (LPWG) estableció que la clasificación de la familia en tres subgrupos - *Faboideae* (o *Papillioideae*), *Mimosoideae* y *Caesalpinioideae* - está desactualizada y no refleja el conocimiento actual sobre sus relaciones filogenéticas. De acuerdo con los datos genómicos, proponen dividir la familia Leguminosae en seis subfamilias: *Cercidoideae*, *Detarioideae*, *Duparquetioideae*, *Dialioideae*, *Caesalpinioideae* y *Papillioideae*. Uno de los grandes cambios reportados indica que la anteriormente considerada subfamilia *Mimosoideae* sería ahora parte de la subfamilia *Caesalpinioideae* (Figura 5). Este cambio resultó controversial debido a la reconocida y distintiva morfología de las especies pertenecientes a *Mimosoideae*, por lo que considerando que su filogenia no está del todo resuelta, se decidió denominar a lo que era la subfamilia *Mimosoideae*, clado mimosoide (del inglés “*mimosoid clade*”), informalmente (Andrews and Andrews, 2017; Azani et al., 2017).

Dentro de la subfamilia *Papillioideae* se encuentran las leguminosas más conocidas, las que producen las legumbres como poroto, lenteja, garbanzo, haba, maní, etc., alimentos importantísimos para el ser humano, así como las especies forrajeras, alfalfa, trébol o lotus, que se utilizan como alimento para el ganado. Presenta una amplia distribución geográfica, encontrándose mayoritariamente en zonas cálidas (Izaguirre and Beyhaut, 2003a).

Además de su uso como alimento para el hombre y el ganado, las leguminosas son utilizadas frecuentemente como abonos verdes para la fertilización natural del suelo y como especies pioneras en la regeneración de suelos pobres o degradados, con el fin de mitigar la pérdida de biodiversidad y el cambio climático. Es así que, como especies soporte, son incluidas en sistemas de producción, con la finalidad de potenciar el crecimiento de las especies que se usarán como alimento. Estas funciones son características de las especies pertenecientes al “clado mimosoide” (Sprent, 2008; Sprent et al., 2013).

Desde el siglo XX agricultores de todas partes del mundo, han ido incorporando cada vez más la utilización de fertilizantes nitrogenados. En las últimas décadas dichos fertilizantes han sido asociados a numerosos problemas ambientales como la

eutrofización de ríos y mares, la contaminación de aguas subterráneas y la destrucción de la capa de ozono, contribuyendo al calentamiento global. La preocupación sobre la salud ambiental y los recursos limitados de la energía fósil, hacen que el potencial de las leguminosas en su rol como fuente de nitrógeno sea cada vez más valorado en sistemas de rotación con otros cultivos, ofreciendo una práctica de agricultura más sustentable y amigable con el medio ambiente (Crews and Peoples, 2004; Rubiales and Mikic, 2015).

Se estima que la cantidad de nitrógeno incorporado al suelo por año es de alrededor de 275 millones de toneladas a nivel mundial. De esta suma 30 millones son fijadas por causas naturales (tales como la oxidación del N₂ a ácido nítrico provocada por las descargas eléctricas de las tormentas), 70 millones se deben al proceso industrial de Harber-Bosch (el cual consiste en la reducción de N₂ a amonio bajo condiciones de alta temperatura y presión en presencia de un catalizador a base de hierro) y unos 175 millones de toneladas de nitrógeno son incorporadas a los ecosistemas terrestres mediante la FBN. La utilización de este recurso natural para adquirir nitrógeno disminuye la pérdida de este elemento en el suelo, así como el uso de fertilizantes químicos y el consecuente gasto de compuestos orgánicos altamente energéticos como el petróleo, necesarios para la producción de los mismos (Azcón-Bieto and Talón, 2003; Rees et al., 2005).

2.2.1. Mimosa

Mimosa es un género monofilético que incluye plantas herbáceas, arbustos y árboles, dentro de la subfamilia *Caesalpinioideae* de las leguminosas. En Uruguay, es el género más abundante dentro de lo que anteriormente se denominaba subfamilia *Mimosoideae* - ahora llamado clado mimosoideo - con aproximadamente 50 entidades, las cuales se distribuyen principalmente en el hábitat serrano y ribereño. En el primero, las especies forman matorrales densos en el bosque y sus bordes mientras que en el hábitat ribereño, típico de las costas de ríos y arroyos, se desarrollan en forma de arbustos y árboles pequeños erectos o semi erectos, con follaje más delicado y legumbres y/o semillas adaptadas al traslado mediante corrientes de agua (Izaguirre, 2005; Izaguirre and Beyhaut, 2009, 2003b)

Actualmente *Mimosa* consta de más de 500 especies en todo el mundo, capaces de crecer en hábitats ampliamente diversos, desde bosques tropicales, sabanas, bosques seco tropicales y subtropicales, matorrales, desiertos, praderas, hasta humedales; así como también viven en distintos tipos de suelos, ya sea con una baja concentración de nutrientes, a pH ácido o suelos contaminados con metales pesados. Su principal centro de diversificación se encuentra en las regiones del Cerrado y la Caatinga en el centro de Brasil, en donde existen más de 200 especies endémicas, y su distribución abarca desde la zona subtropical de Sudamérica (Paraguay, Argentina, Uruguay y el sur de Brasil) a México y sur de Estados Unidos (dos Reis et al., 2010)(Simon et al., 2011). Este género de leguminosas tiene la particularidad de asociarse simbióticamente a rizobios pertenecientes a las α -proteobacterias y β -proteobacterias, postulándose que la preferencia por uno u otro endosimbionte depende de la ubicación geográfica, del ambiente y de su taxonomía. Hasta el

momento se ha reportado que *Mimosas* spp. son preferentemente noduladas por *Paraburkholderia* en Brasil, *Rhizobium/Ensifer* en México y *Cupriavidus* en Uruguay (Bontemps et al., 2016, 2010; dos Reis et al., 2010; Platero et al., 2016).

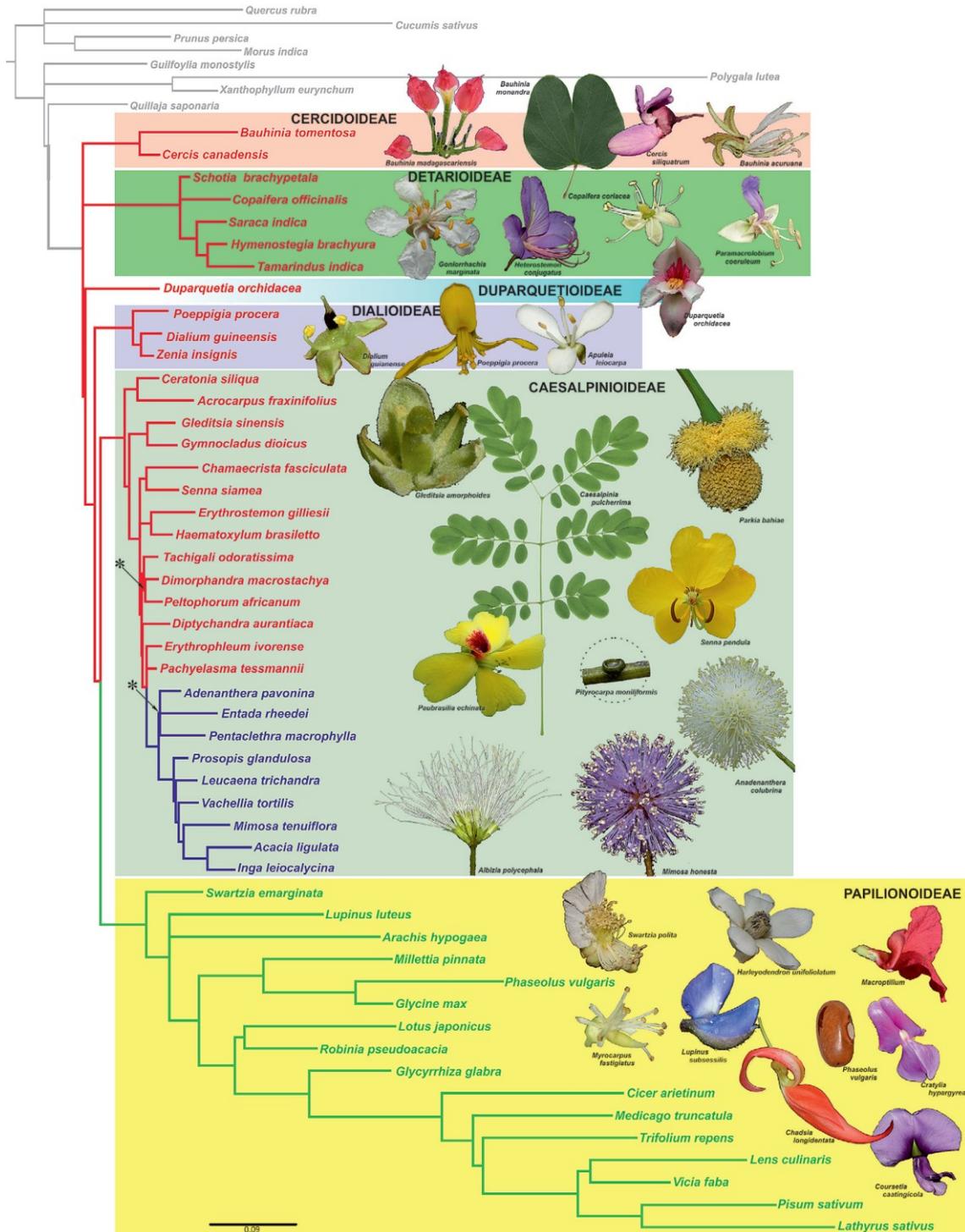


Figura 5. Filogenia y clasificación de las subfamilias de *Fabaceae*. El análisis se basa en 81 secuencias codificantes para proteínas de cloroplastos. Los bloques de colores señalan las seis subfamilias. Las ramas de colores indican las tres subfamilias tradicionales de *Fabaceae*: en rojo se encuentra *Caesalpinioideae*, en azul *Mimosoideae* y en verde *Papilionoideae* (Azani et al., 2017).

Uruguay es considerado uno de los límites de diversificación para *Mimosoideae*, lo que podría ser una de las razones por la que las mimosas nativas son preferentemente noduladas por *Cupriavidus*. Estudios previos reportaron que una mimosa endémica, *M. uragüensis*, no fue nodulada por la cepa perteneciente al género *Paraburkholderia*, *B. phymatum* STM815, en cambio noduló de manera efectiva con la cepa perteneciente al género *Cupriavidus*, *C. taiwanensis* LMG19424 (Elliott et al., 2006). Este comportamiento se demostró opuesto al observado en el resto de la zona de diversificación, indicando que las mimosas uruguayas podrían tener preferencias particulares sobre la selección de simbiositos (Platero et al., 2016).

2.3. Interacción planta bacteria

Las plantas interactúan con el ambiente que las rodea tanto en su parte aérea (filósfera) como raíz (rizósfera). La rizósfera se define como la zona del suelo influenciada por la presencia de las raíces de las plantas. La misma es una matriz compleja que consiste en una relación multivariada entre los organismos y el ambiente, implicando interacciones físicas y moleculares entre el suelo, las plantas y los organismos que allí viven incluidos los microorganismos. A medida que fueron aumentando los estudios sobre la biodiversidad y salud del suelo, la rizósfera fue adquiriendo un rol cada vez más preponderante (Lagunas et al., 2015). En la rizósfera pueden ocurrir distintos tipos de asociaciones entre las plantas y los microorganismos presentes, las hay patógenas, parásitas y mutualistas. En las primeras, los patógenos generan daño activamente en la planta para su propio beneficio, causando por lo general necrosis. En el caso de las relaciones parásitas los microorganismos reciben algún beneficio a expensas del hospedero, causando daño colateral en la planta debido a su presencia. Por último, en las asociaciones mutualistas tanto plantas como microorganismos resultan beneficiados. Dentro de estas últimas la más estudiada es la simbiosis entre rizobios y leguminosas (Newton et al., 2010).

2.3.1. Interacción rizobio - leguminosa

La simbiosis entre leguminosas y rizobios no es obligatoria. Sin embargo, bajo condiciones limitantes de nitrógeno, los simbiosistas se buscan uno a otro mediante un proceso activo que implica mecanismos de señalización y reconocimiento específicos por parte de ambos simbiosistas. Este diálogo molecular varía con el rizobio y la planta hospedera y son múltiples los factores que lo afectan; entre ellos la compatibilidad entre los simbiosistas, las condiciones fisicoquímicas del suelo, y la presencia de ciertas biomoléculas como son los polisacáridos, fitohormonas y flavonoides (Hayat et al., 2010). La secreción de compuestos (exudados) proveniente de las raíces de las leguminosas (aminoácidos, proteínas, azúcares, carbohidratos complejos, flavonoides, alcoholes, vitaminas y ácidos orgánicos) determina la composición de la rizósfera, generando un ambiente rico en nutrientes. Esto atrae a las bacterias del suelo, las cuales se acercan a la raíz provocando una dura competencia por la colonización de este ambiente. En este contexto para comenzar el proceso de infección, los rizobios no sólo deben colonizar la rizósfera, sino también adherirse a la raíz. Muchas son las proteínas participantes en la endosimbiosis rizobio - leguminosas, dentro de las más destacadas se encuentran las adhesinas como ricadhesina que juega un rol muy importante en la adherencia al pelo radicular, proteínas hidrolíticas como las celulasas que erosionan la celulosa del pelo radicular permitiendo la penetración bacteriana y las glucanasas que están implicadas en la formación de biofilms, la nodulación y la modificación de exopolisacáridos (EPS) (Morel and Castro-Sowinski, 2013).

2.3.1.1. Flavonoides y otros compuestos quimioatrayentes

Los flavonoides son compuestos fenólicos de bajo peso molecular producidos por las plantas. Generalmente se describen como no esenciales para la supervivencia de

la planta, por lo que se consideran metabolitos secundarios. Son biológicamente activos y se conocen más de 10000 variantes estructurales producidas por plantas vasculares, gran parte de ellos se han detectado en leguminosas. Debido a sus propiedades físicas y bioquímicas, los flavonoides pueden interactuar con diversos blancos celulares para provocar distintas acciones en microorganismos, plantas y animales (Weston and Mathesius, 2013). Entre los más estudiados se encuentran: flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanoles e isoflavonas (Figura 6). Estos poseen como unidad básica una estructura de 15 átomos de carbono provenientes del malonil-coenzima A y del p-cumaril coenzima A (Cesco et al., 2012). Su estructura es del tipo C6-C3-C6 y se define por dos anillos aromáticos, A y B, unidos mediante un anillo heterocíclico de pirano o pirona, anillo C (Figura 6A) (Brenic, A & Winans, 2005). Entre sus roles principales se encuentran: la influencia en el transporte de auxinas, la modulación de los niveles de especies reactivas del oxígeno (ROS, de sus siglas en inglés) en tejidos vegetales y la coloración de varios tejidos, como por ejemplo flores y frutos (Brenic, A & Winans, 2005).

Entre sus múltiples funciones, los flavonoides tienen un rol destacado en la señalización simbiótica entre rizobios y leguminosas. Los exudados radiculares de leguminosas contienen flavonoides especie-específicos, en particular del tipo flavonas, que son específicamente reconocidos por sus respectivos microsimbiontes en los que activan genes bacterianos (genes *nod*) implicados en la síntesis y secreción de moléculas (factores Nod) que son a su vez reconocidas específicamente por la planta hospedera. Esta acción ocurre a través de la acción de la proteína NodD, un regulador transcripcional del tipo LysR, la cual, en presencia de flavonoides específicos, desencadena la síntesis de factores Nod y la consecuente infección y nodulación del hospedero (ver sección 2.3.1.3). Sin embargo, no todos los flavonoides son capaces de inducir este proceso, una comparación entre sus estructuras reveló que las hidroxilaciones en las posiciones C-7 y C-4 son importantes para la activación (Brenic, A & Winans, 2005). Algunos flavonoides que inducen los factores Nod, como luteolina y apigenina, actúan como quimioatrayentes frente a distintas especies del género *Rhizobium*. A su vez, cabe destacar que la composición de los flavonoides en la rizósfera puede resultar alterada por la microbiota, ya que metabolizan y alteran la estructura de estos compuestos a lo largo del tiempo (Weston and Mathesius, 2013).

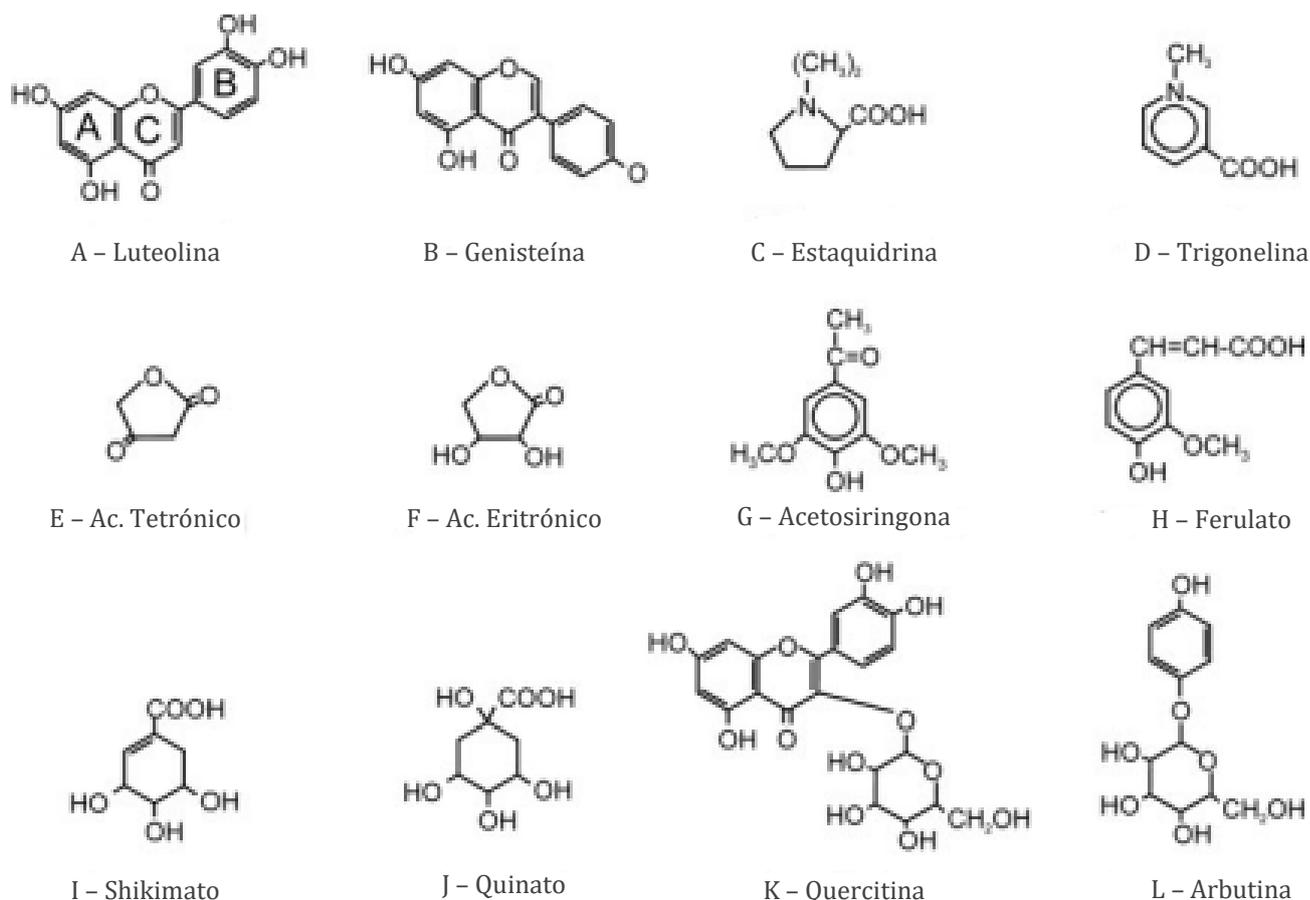


Figura 6. Moléculas quimioatrayentes presentes en exudados vegetales. Ejemplos de moléculas que están presentes en los exudados vegetales que son reconocidas como señales para la inducción en respuesta de varias bacterias asociadas a plantas. Luteolina (A) y Genisteína (B) son flavonoides que inducen la transcripción de genes *nod* de varios rizobios. Estaquidrina (C) y Trigonelina (D) son no flavonoides que inducen los genes *nod* en *S. meliloti*. Ac. Tetrónico (E) y Ac. Eritrónico (F) activan los genes *nod* en *S. meliloti*, *M. loti* y *R. lupini*. Acetosiringona (G) y Ferulato (H) son compuestos fenólicos que inducen los genes de virulencia de *A. tumefaciens*. Shikimato (I) y Quinato (J) inducen genes de la biosíntesis de coronatina en *P. syringae*. Quercitina (K) y Arbutina (L) son glicócidos fenólicos que activan la producción de syringomycina en *P. syringae*. Modificado de (Brencic, A & Winans, 2005).

Además de los flavonoides, existen muchos otros compuestos implicados en el establecimiento de la simbiosis, resultando quimioatrayentes para la bacteria, entre ellos, azúcares, aminoácidos, ácidos dicarboxílicos (succinato, malato, fumarato) y compuestos aromáticos (shikimato, quinato, protocatecuato, vainillina, acetosiringona, catecol) (Brencic, A & Winans, 2005; Cesco et al., 2012). Entre estos compuestos se destacan las betaínas (Figura 6C y Figura 6D), compuestos que contienen amonio cuaternario que se identificaron en exudados de alfalfa como inductores de los genes *nod* en *S. meliloti*. Las betaínas se encuentran en tejidos vegetales expuestos a estrés osmótico y en altas concentraciones en semillas, raíces y exudados radiculares de varias leguminosas. Los ácidos aldónicos, como el ác. tetrónico y el ác. eritrónico (Figura 6E y Figura 6F), así como algunos compuestos fenólicos simples también son inductores de los genes *nod* pero al igual que las

betaínas, para cumplir esta función se necesitan concentraciones mayores (orden mM) que las requeridas de flavonoides (orden μM) (Brencic, A & Winans, 2005).

2.3.1.2. Polisacáridos

Los polisacáridos y oligosacáridos cumplen un rol esencial en la interacción planta - microorganismo. Dentro de los polisacáridos extracelulares bacterianos se incluyen a los exopolisacáridos (EPS), lipopolisacáridos (LPS), polisacáridos capsulares (CPS) y β -glucanos cíclicos, estos se encuentran en la superficie celular bacteriana y/o son secretados en las proximidades de la célula, cumpliendo diversas funciones como adhesión a superficies bióticas y abióticas, protección contra la desecación, inhibición de la respuesta defensiva de la planta frente a la interacción planta - microorganismo, etc. (Kyungseok et al., 2008; Morel and Castro-Sowinski, 2013; Qurashi and Sabri, 2012; Upadhyay et al., 2012).

Particularmente en la asociación rizobio - leguminosa, los EPS son de suma importancia en los procesos de invasión radical, en la formación e infección de nódulos y en el desarrollo de los bacteroides. Además, se encuentran involucrados en la colonización de la planta y la agregación celular, tal como se observó en varias especies de *Azospirillum*, en las que los EPS influyen en la agregación del suelo rizoférico resultando en un aumento en la disponibilidad de agua y nutrientes en plantas inoculadas (Qurashi and Sabri, 2012). Incluso, algunos EPS se unen a cationes como Na^+ , pudiendo actuar en la mitigación del estrés salino (Upadhyay et al., 2012). Bomfeti y colaboradores demostraron que mutantes de las cepas *R. leguminosarum* bv. *viciae* ANU 843 y *R. leguminosarum* RBL 5523 que carecen de EPS (exo), no son capaces de formar los canales o hilos de infección ni invadir los nódulos en sus leguminosas hospederas (Bomfeti et al., 2011). Mutaciones Exo⁻ en *Rhizobium* sp NGR234, *R. leguminosarum* bv. *trifolii* 24.1 y en distintas cepas de *S. meliloti* generaron la formación de nódulos no eficientes o pseudo-nódulos, y esto se revertía mediante el agregado de EPS purificado perteneciente a las cepas parentales. Como consecuencia, estos pseudo-nódulos inducen una alteración en el mecanismo de defensa de la planta, provocando un aumento en el grosor de las paredes, una acumulación de compuestos fenólicos y necrosis de las células corticales del hospedero (Bomfeti et al., 2011).

Los LPS son componentes importantes de las membranas de bacterias Gram negativas, se relacionan con la adaptación y sobrevivencia de los rizobios bajo diferentes condiciones ambientales. Además, es posible que los LPS enmascaren la superficie bacteriana, evitando de este modo que se desencadene la respuesta de defensa en la planta durante el establecimiento de la simbiosis (Fischer et al., 2003). Se ha demostrado que mutantes defectuosos en la síntesis de LPS y β -glucanos cíclicos de *M. loti*, pierden competitividad y tienen menor capacidad de colonización radicular (D'Antuono et al., 2005).

2.3.1.3. Factores Nod

Los factores Nod son moléculas del tipo lipo-quitina-oligosacáridos (LCOs), consisten en un tetra o pentasacárido de N-acetil-D-glucosamina sustituido en el C-2 de su

extremo no reductor por una cadena de ácido graso insaturado (Figura 7). Los genes *nodABC* son necesarios para que ocurra la síntesis de la N-acetil-D-glucosamina, en adición a estos tres genes, cada especie de rizobio contiene genes que juegan roles más sutiles en la nodulación (*nod*, *nol*, o *noe*) que codifican para proteínas especie-específicas que modifican el esqueleto principal de los factores Nod (Andrews and Andrews, 2017; Bonaldi et al., 2010) Además, puede contener otros sustituyentes en diversos carbonos tanto de su extremo reductor como de su extremo no reductor. Los rizobios son capaces de producir diferentes factores Nod, que se distinguen por el grado de saturación de la cadena de ácido graso y los sustituyentes que presentan en sus extremos. Por ejemplo, la cadena N-acyl puede variar entre sustituyentes acetilo, carbamoilo, metilo o sulfurilo, que se pueden unir a la N-acetil-D-glucosamina. Estas decoraciones determinan la especificidad de la interacción entre la leguminosa y el rizobio. NodA es la proteína capaz de reconocer distintas variaciones de ácidos grasos como sustrato contribuyendo a un mayor rango de hospedero, junto con NodC que está implicado en la determinación de la longitud de la estructura del factor Nod (Perret et al., 2000). Otros azúcares como fucosa o arabinosa también pueden adicionarse en distintas ubicaciones de este esqueleto carbonado, y pueden a su vez contar con varios sustituyentes que pueden contribuir aún más con la especificidad de la interacción. Algunos rizobios son capaces de producir varios tipos de factores Nod, aumentando su rango de hospedero, o sea el rango de plantas con las que puede formar asociaciones simbióticas. Un ejemplo destacable es la cepa *Rhizobium* sp. NG234 capaz de asociarse a más de cien especies de leguminosas (Perret et al., 2000).

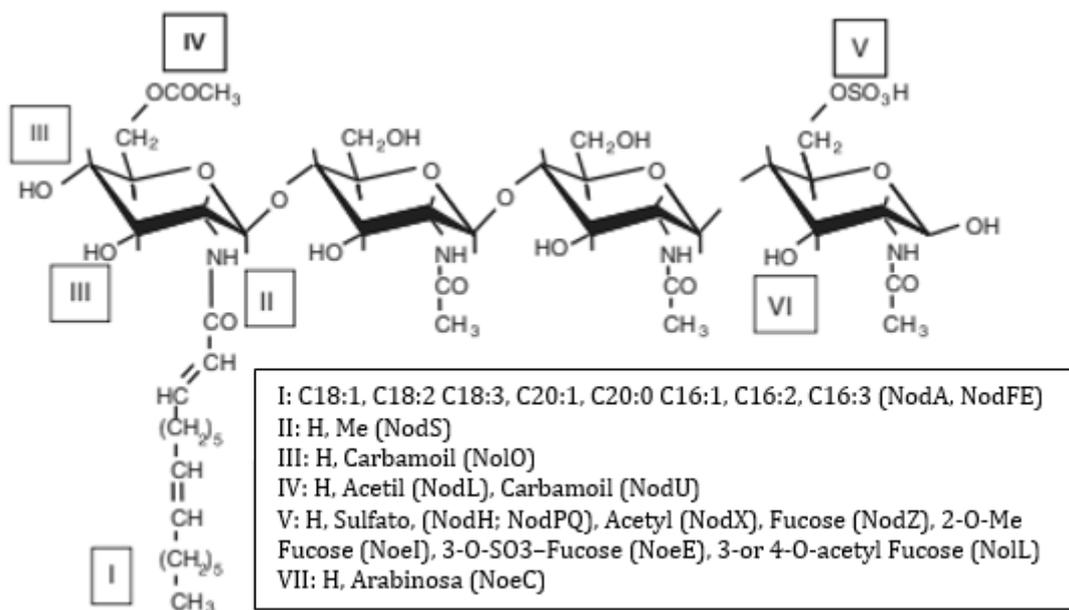


Figura 7. Estructura general de factores Nod. Usualmente los factores Nod tienen cuatro o cinco residuos de β-1-4-N-acetil-glucosamina. Este esqueleto puede tener diferentes decoraciones, las que se encuentran detalladas en el recuadro, junto con el nombre del gen *nod* responsable. Modificado de (Downie, 2010).

Los LCOs son reconocidos por receptores específicos de las células vegetales donde activan la vía de señalización de la simbiosis, lo que conduce a oscilaciones de calcio, inicialmente en las células epidérmicas y luego en las células corticales, precediendo la colonización (Figura 8A). Luego, las bacterias se adhieren a la punta de los pelos radiculares, los cuales se enrollan atrapando a la bacteria (Figura 8B). Una vez atrapadas, se forman los hilos de infección, por los cuales los rizobios alcanzan las células meristemáticas de la raíz a través de invaginaciones formadas por las células de la planta. Durante este proceso, los núcleos y organelos de las células vegetales se reubican en la zona de pre-infección, precediendo la ruta del hilo de infección. Los rizobios comienzan su camino por el hilo de infección como bacterias en vida libre, de hecho, su crecimiento se encuentra restringido a esa zona (Figura 8C). A medida que ingresan se encuentran con una serie de desafíos como el estrés redox, la exportación de metabolitos de defensa contra la planta y la acumulación de polihidroxibutirato como fuente de carbono para la posterior diferenciación a bacteroide. El crecimiento del hilo de infección se considera un paso clave para la selección de rizobios competitivos (Oldroyd et al., 2011). Los hilos de infección crecen hacia el emergente nódulo y se ramifican dentro de este tejido (Figura 8D). En algunos casos, los rizobios permanecen dentro de los hilos de infección, pero por lo general, las bacterias se liberan al citoplasma de las células del nódulo a través de un mecanismo similar al de la endocitosis, como resultado, los rizobios se encapsulan en una membrana de origen vegetal denominada membrana peribacteroidal y coexiste dentro de la célula vegetal como una estructura similar a un organelo llamada simbiosoma (Bruijn, 2015). En esta situación, las bacterias pueden diferenciarse en un estado fijador de nitrógeno, conocido como el bacteroide (Oldroyd, 2013).

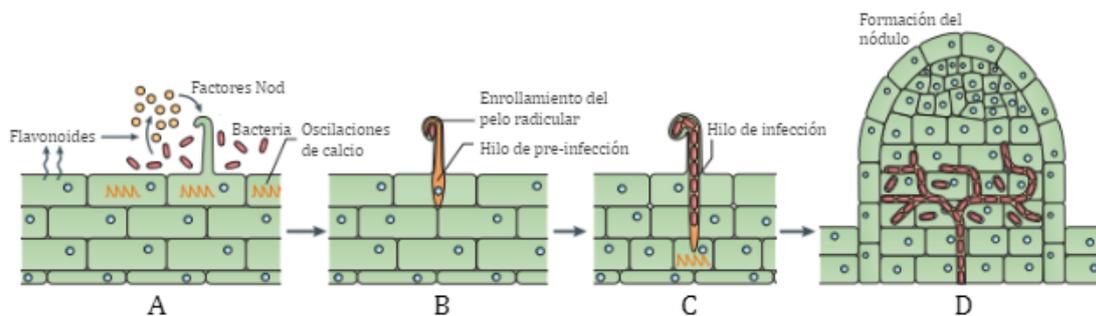


Figura 8. Proceso de formación del nódulo. Formación del hilo de infección y colonización de las células vegetales, concluyendo en la formación del nódulo. Modificado de (Oldroyd, 2013).

2.4. Los protagonistas: *Mimosa pudica* y *Cupriavidus* sp. UYMMa02A

Mimosa pudica, también conocida como vergonzosa, sensitiva o *touch me not* (“no me toques”), es considerada una especie de leguminosa nativa y/o invasora perteneciente al género *Mimosa*, según el lugar biogeográfico en el que se encuentre. Numerosos estudios se han realizado a lo largo del trópico sobre esta especie y sus simbiontes, observándose un claro patrón de diversidad biogeográfica. Mientras que en el centro de diversificación que se encuentra en Sudamérica, es nodulada por bacterias del género *Paraburkholderia* (dos Reis et al., 2010), en América Central se encuentran en sus nódulos aislamientos de los tres géneros *Cupriavidus*, *Paraburkholderia* (Estrada de los Santos et al., 2011) y *Rhizobium* (Barrett and Parker, 2006; Bontemps et al., 2016). En Taiwán *C. taiwanensis* (Chen et al., 2001) es el simbionte encontrado con mayor frecuencia en *M. pudica*, en el sur de China están presentes ambos géneros de β -rizobios. En Nueva Caledonia y Filipinas, *Cupriavidus* domina los nódulos de esta leguminosa. En India las especies endémicas de *Mimosa* están noduladas por *Sinorhizobium* spp, en cambio la especie invasora *M. pudica* permanece asociada a *Cupriavidus* y *Paraburkholderia*, sin que ninguno de los géneros presente dominancia (Melkonian et al., 2014). Su presencia ubicua en el planeta tierra, así como su implicancia en diversos estudios, hacen de esta planta un buen modelo para el estudio de asociaciones mutualistas. Además, presenta otras características importantes a la hora de realizar experimentos como tener un rápido crecimiento, es de ciclo anual, existen proveedores de semillas comerciales y su genoma ha sido secuenciado (Ahmad et al., 2012; Griesmann et al., 2018).

Por otra parte, el género *Cupriavidus*, surge en 1987, cuando describen a *C. necator* como una bacteria del suelo *Gram* negativa, predatora no-obligatoria de bacterias del suelo *Gram* positivas y *Gram* negativas. Makkar & Casida la describen como una especie altamente resistente al cobre e incluso aseguran que su crecimiento inicial se ve estimulado por la presencia de este metal, de ahí su nombre *Cupriavidus* (L. s. cuprum, cobre; L. adj. avidus, amante), amantes del cobre (Makkar and Casida, 1987). La resistencia frente a metales y la degradación de compuestos aromáticos son dos características que se repiten en distintas cepas a lo largo del género (Goris et al., 2001; Lykidis et al., 2010; Makkar and Casida, 1987). A comienzos del siglo XXI Chen y colaboradores reportan a la primera especie de este género capaz de formar asociaciones simbióticas con leguminosas en las que ocurre la FBN (*C. taiwanensis*, ver sección 1.1.1). En Uruguay, se ha reportado la existencia de α y β -rizobios asociados a nódulos presentes en las raíces de diversas leguminosas nativas (Pereira-Gómez et al., 2020; Platero et al., 2016; Taulé et al., 2012), sin embargo, las especies pertenecientes al género *Mimosa* se encuentran preferentemente nodulada por estos amantes del cobre. Existen varios reportes que concluyen que la preferencia por esta asociación mutualista se debe al pH o la presencia de nutrientes del suelo (dos Reis et al., 2010; Elliott et al., 2006; Gehlot et al., 2013; Lammel et al., 2013; Mishra et al., 2012; Pereira-Gómez et al., 2020; Taulé et al., 2012). Sin embargo, Platero y colaboradores midieron el pH y la fertilidad del suelo y no encontraron que estos sean los principales factores involucrados en la selección de

Cupriavidus en esta simbiosis (Platero et al., 2016). Un factor que sí podría estar involucrado en esta selección es el contenido de metales en el suelo. Este factor había sido identificado como importante en la selección de simbiosis en suelos de Nueva Caledonia (Klonowska et al., 2012) y en el caso de las mimosas de nuestro país, se encontraron concentraciones considerables de Zn, Cu, Co, Ni y Fe en los suelos del Abra de Zabaleta. Interesantemente los aislamientos obtenidos de nódulos de plantas que crecen en esta zona presentaron mayor nivel de tolerancia frente a Cu, Zn, Pb, Cd y Ni que rizobios del género *Paraburkholderia*, sugiriendo que el contenido de metales en el suelo puede ser un factor que favorezca la alta incidencia de rizobios del género *Cupriavidus* en esta región del país (Platero et al., 2016).

2.5. Proteómica

El proteoma se define como el conjunto de proteínas expresadas por un organismo en una situación dada. El proteoma refleja con gran exactitud la respuesta celular a las condiciones estudiadas y es mucho más dinámico y plástico que el genoma. Sin embargo, es importante mencionar que su análisis se vuelve más difícil de descifrar, debido principalmente a las numerosas modificaciones o variaciones postraduccionales que las proteínas pueden presentar. Aebersold y Goodlett definen a la proteómica como el intento de estudiar los procesos biológicos de manera integral mediante el análisis sistemático de las proteínas expresadas en una célula o tejido (Aebersold, R & Goodlett, 2001). Desde el punto de vista analítico, un análisis proteómico posee asociada la complejidad de buscar, identificar y caracterizar un conjunto de analitos que se encuentran presentes en diferentes concentraciones y poseen propiedades fisicoquímicas muy diversas.

2.5.1. Proteómica cuantitativa

SDS-PAGE: En la década del 60' comenzaron los estudios de separación de proteínas y la puesta a punto de lo que hoy se considera una técnica de rutina, el SDS - PAGE. Brevemente, esta técnica consiste en la separación de proteínas según su peso molecular en un matriz de poliacrilamida (PAGE: *polyacrylamide gel electrophoresis*) en presencia del detergente aniónico dodecil sulfato sódico (SDS), de ahí su nombre. Las proteínas se desnaturalizan y se cargan negativamente por acción del detergente. Esto les permite migrar en el gel en función a su tamaño, hacia el ánodo gracias a la aplicación de una corriente eléctrica. El sistema de tampones discontinuo ideado por Laemmli en 1970 es el más utilizado hasta hoy. En este sistema, la muestra es concentrada en la primer parte de la corrida electroforética y luego separada por tamaño en la segunda parte (Laemmli, 1970).

Electroforesis en dos dimensiones (2D): Para aumentar la resolución de proteínas individuales en mezclas complejas, se idearon sistemas de electroforesis en dos dimensiones. El sistema más utilizado consiste en la separación de proteínas gracias a la combinación de dos técnicas; una primera separación en base a la carga neta de las proteínas mediante isoelectroenfoque seguida de una segunda separación de las muestras mediante SDS - PAGE, permitiendo obtener un mapeo de proteínas a partir de un extracto proteico complejo (Klose, 1975).

En el último tiempo, se han desarrollado nuevas metodologías, que permiten comparar perfiles de expresión proteica entre distintas condiciones biológicas, entre ellas el 2D-DIGE (*Differential In Gel Electrophoresis*). Esta técnica permite comparar distintas condiciones biológicas en forma cualitativa y cuantitativa mediante el empleo de distintos fluoróforos (Diez et al., 2010) (Figura 9). En esta técnica cada muestra a analizar se marca con un fluoróforo específico. Se utiliza un estándar interno consistente en una mezcla de proteínas provenientes de todas las réplicas biológicas del experimento, el cual se marca con un tercer fluoróforo. De esta forma es posible separar todas las muestras juntas en una misma corrida electroforética en 2 dimensiones. Al finalizar la corrida del gel de SDS-PAGE, los

mismos se analizan con un scanner de fluorescencia que permite detectar en forma independiente cada fluoróforo utilizado. La incorporación de un estándar interno permite comparar la abundancia relativa de cada spot en un mismo gel, así como la comparación inter-gel. Esta aproximación permite no solamente identificar las proteínas presentes de forma exclusiva en una u otra condición, sino también determinar los niveles de expresión relativa de aquellas proteínas presentes en más de una condición. Otra de las ventajas de esta metodología es que los fluoróforos se unen covalentemente a los residuos de lisina, aminoácido que se encuentra prácticamente en todas las proteínas y que tiene una abundancia promedio de 6%. Además, los fluoróforos empleados poseen una carga +1 que reemplaza la carga de la lisina, con lo cual el punto isoeléctrico de las proteínas no se ve afectado (Westermeier and Scheibe, 2008). La principal desventaja de este método es el alto costo de los fluoróforos, lo que restringe en gran medida su aplicación.

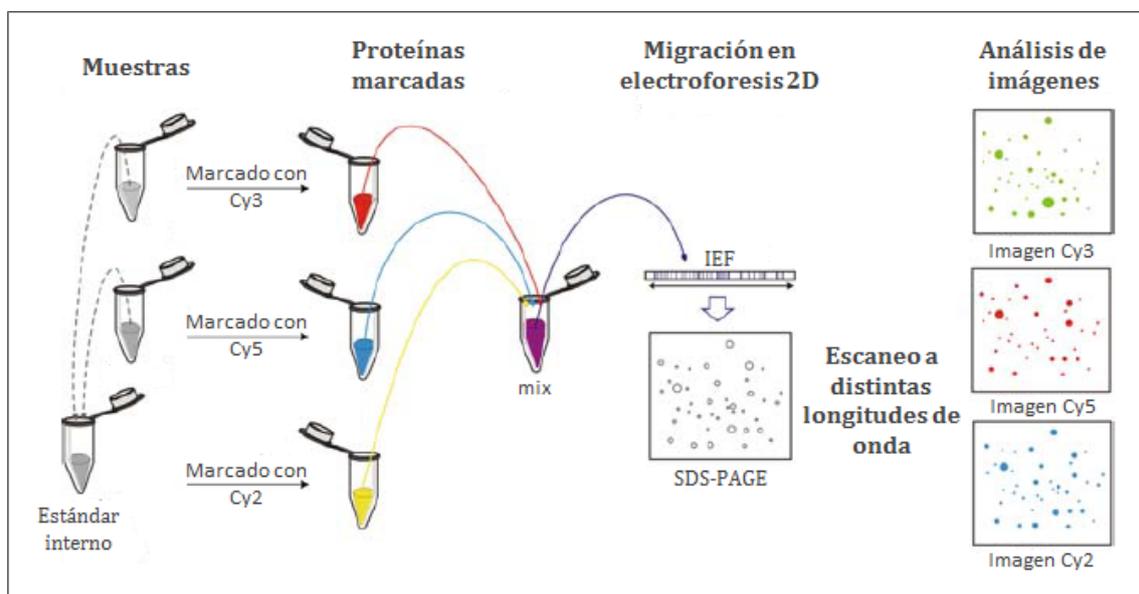


Figura 9. Esquema para la estrategia de 2D- DIGE utilizada. Modificado de (Westermeier and Scheibe, 2008).

2.5.2. Espectrometría de masas MALDI TOF

La espectrometría de masas (MS, de sus siglas en inglés) es una de las principales herramientas para el estudio del proteoma. Es una técnica muy sensible que permite determinar con alta precisión y exactitud la relación masa/carga (m/z) de iones moleculares en fase gaseosa. Además, permite dilucidar aspectos estructurales de las macromoléculas. Su uso se destaca en tres grandes áreas, (I) la caracterización y control de calidad de proteínas recombinantes y otras macromoléculas, (II) la identificación de proteínas tanto en clásicos ensayos bioquímicos como en proteómica a gran escala, y por último, pero no menos interesante, (III) para la identificación y caracterización de modificaciones postraduccionales donde potencialmente se puede identificar cualquier modificación covalente que altere la masa de las proteínas (Mann et al., 2001). Como instrumento se utiliza un espectrómetro de masas, que contiene una fuente de ionización, un analizador de

masas y un detector. Brevemente, este instrumento volatiliza las sustancias a analizar, origina los iones a partir de las moléculas neutras en estado gaseoso, las separa en función a su relación masa/carga y finalmente detecta los iones formados y registra la información de manera adecuada (Aebersold, R & Goodlett, 2001).

En la década del 90', tanto las técnicas como los instrumentos implicados en MS, revolucionaron el análisis de las proteínas. Esto se debió al desarrollo de dos métodos de ionización suave, la ionización por electrospray (ESI) y la desorción/ionización por láser asistida por una matriz (MALDI), que permitió el estudio de péptidos y proteínas a una profundidad nunca antes alcanzada (Aebersold, R & Goodlett, 2001). Para lograr la separación de masas es posible aplicar analizadores, los cuales se rigen por diferentes principios: i) separación en base al tiempo de vuelo (TOF, *time of flight*), ii) la trampa de iones cuadripolar o iii) separación por eyección selectiva de iones de un campo de captura tridimensional (o ciclotrón del ion mediante la transformada de Fourier), entre otros. El analizador TOF es el que se integra típicamente a la fuente de iones del MALDI, su funcionamiento se basa en acelerar todos los iones con la misma energía cinética a través de un campo eléctrico y mide el tiempo que necesitan los iones para alcanzar el detector. Si bien la energía cinética es la misma, la velocidad varía en función de la masa y la carga de los iones, por lo tanto, el ion de menor relación masa/carga (m/z), alcanzará el detector primero. El detector registra la corriente producida cuando un ion pasa cerca o golpea su superficie (Mann et al., 2001).

Para la identificación de proteínas, la estrategia más utilizada es la digestión de las mismas utilizando enzimas específicas, como la tripsina, seguida de la determinación de la relación m/z de los péptidos generados. Este conjunto de datos se denomina mapeo de péptidos analizados o huella peptídica de una proteína. Se basa en la comparación de los valores de los picos de masas provenientes del MS determinados experimentalmente con los valores de masa de los péptidos generados por digestión teórica en una base de datos. Estos péptidos pueden a su vez ser fragmentados dentro del equipo generando espectros de MS/MS, que contienen información de secuencia. (Baldwin, 2004). A medida que se tiene información de secuencias de masa y más genomas, aumenta la cantidad de datos disponibles para hacer este tipo de comparaciones, aumentando la exactitud de esta comparación (experimental vs teórica). Idealmente, es recomendable disponer de la información genómica del organismo con el que se está trabajando para hacer este tipo de análisis.

2.6. Herramientas moleculares

La manipulación genética de organismos se ha vuelto una herramienta muy poderosa para la investigación biológica. El empleo de herramientas moleculares permite realizar mutaciones generalizadas o dirigidas en el genoma del organismo de interés, permitiendo el estudio de la función de uno o varios genes. Mientras que en la mutagénesis generalizada se seleccionan fenotipos de interés en una población de diversos mutantes en genes desconocidos, la mutagénesis dirigida permite modificar el genoma con gran precisión. En este sentido, la mutagénesis sitio-dirigida es una metodología muy eficaz para el estudio de la relación estructura-función de las proteínas y la expresión de genes.

Mucho de los avances en biología molecular y en particular en el desarrollo de herramientas moleculares han sido impulsados por el uso de organismos modelo. En microbiología, uno de los organismos modelo más estudiados es la bacteria entérica *Escherichia coli*. Sin embargo, esto tiene como consecuencia de que muchas de las herramientas desarrolladas tienen un uso limitado en bacterias no modelo y en particular en bacterias ambientales. En los últimos años se han perfeccionado distintas herramientas para el estudio de bacterias no modelo, entre ellas, Martínez-García & de Lorenzo describieron una metodología que permitiría manipular los genomas de bacterias *Gram* negativas ambientales (Martínez-García, E & de Lorenzo, 2012). Brevemente, esta metodología se basa en utilizar los mecanismos de reparación del ADN y la recombinación homóloga bacteriana que se desencadena tras un corte en la doble hebra, para eliminar o agregar segmentos de ADN en el genoma de las bacterias. Esto implica la utilización de plásmidos para en primera instancia insertar un fragmento de ADN en el genoma de una cepa blanco mediante recombinación simple, y en segunda instancia obligar a la bacteria a resolver este co-integrado con el fin de generar mutantes (Figura 15, Figura 16 y Figura 17, sección 4.9). Este método tiene la ventaja de que su implementación permite quitar o insertar fragmentos de ADN deseados sin dejar marcas o cicatrices extra en el genoma modificado (Martínez-García, E & de Lorenzo, 2012).

2.7. Antecedentes

El Departamento de Bioquímica y Genómica Microbianas (BIOGEM) del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE) tiene como una de sus principales líneas de investigación el estudio de microorganismos del suelo y asociados a plantas, particularmente bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV), un grupo heterogéneo de bacterias que son capaces de promover – directa o indirectamente - el desarrollo y crecimiento de algunas plantas.

Con la finalidad de aportar información sobre la distribución, diversidad y capacidad promotora del crecimiento vegetal de rizobacterias nativas, se han realizado diversos estudios. Se aislaron y caracterizaron colecciones de rizobio nodulantes de trébol y lotus (Fabiano and Arias, 1990; Monza et al., 1992) y de bacterias endófitas de caña de azúcar, arroz, sorgo, canola y festuca (de los Santos et al., 2016; Mareque et al., 2015; Taulé et al., 2011). Adicionalmente, se estudiaron en profundidad los mecanismos empleados por algunas BPCV modelo para mantener la homeostasis de hierro y otros metales (Amarelle et al., 2010, 2008; Battistoni et al., 2002; Platero et al., 2004; Rosconi et al., 2013; Trovero et al., 2018).

En los últimos años se ha realizado un relevamiento y una colecta del germoplasma de leguminosas nativas y de sus rizobios asociados como forma de contribuir y mantener el acervo genético de una parte de la diversidad de nuestros montes y pasturas. En este sentido se han realizado estudios tomando como modelo una leguminosa arbórea leñosa y de interés forestal, *Parapiptadenia rigida* (regionalmente conocida como angico), y los rizobios naturalmente asociados a la misma, demostrando por primera vez en nuestro país la existencia de β -rizobios. Las investigaciones realizadas permitieron determinar que angico es preferentemente nodulada por el género *Paraburkholderia*, aunque también se encontraron microsimbiontes pertenecientes a *Cupriavidus* y *Rhizobium*. Complementariamente, se determinó que varios de los aislamientos pertenecientes a los géneros *Paraburkholderia* y *Cupriavidus* fueron capaces de promover el crecimiento de angico tanto a nivel de invernáculo como en el campo (Taulé et al., 2012). Estas investigaciones demuestran que el estudio de rizobios nativos es fundamental para promover el desarrollo de sistemas de producción agrícola y forestal ambientalmente sustentables a la vez que permite el conocimiento de la riqueza presente en los suelos de nuestro país. En base a estos resultados se decidió profundizar en la búsqueda de rizobios pertenecientes a las β -proteobacterias, enfocándose en la caracterización de simbiontes asociados a plantas nativas del género *Mimosa*. Estos trabajos permitieron construir una colección compuesta por de más de 70 aislamientos provenientes de nódulos de 15 especies de mimosas nativas que se encuentran naturalmente en diversas zonas de nuestro territorio (Pereira-Gómez et al., 2020; Platero et al., 2016) (Sandes & Garabato en preparación).

Aunque han pasado casi 20 años de su primera descripción, hoy en día es relativamente poco lo que se sabe acerca de los mecanismos moleculares implicados en el establecimiento de simbiosis efectivas entre β -rizobios y leguminosas

hospederas. En particular para rizobios del género *Cupriavidus*, la cepa LMG19424 de *C. taiwanensis* ha sido la más estudiada. Su genoma fue secuenciado en 2008 revelando la presencia de genes *nod* y *nif* formando una compacta isla simbiótica de 35 kb contenida en un megaplásmido de 0,6 Mb (Figura 4) (Amadou et al., 2008). En este mismo trabajo se describió la producción de factores Nod sulfatados, cuya síntesis se estimula por presencia del flavonoide luteolina, indicando que al menos parte de los mecanismos descritos para α -rizobios estaría conservado. Más adelante se mostró que el gen *nodB* se expresa durante la interacción con plantas de *M. pudica* e incluso dentro del hilo de infección y el nódulo maduro (Marchetti et al., 2010). Se ha demostrado también que el sistema de secreción tipo III, necesario en algunos rizobios para establecer la simbiosis con plantas hospederas podría tener un rol en la selección del macrosimbionte, aunque los resultados obtenidos muestran que es la pérdida de este sistema y no su presencia lo que le permite a la bacteria entrar en simbiosis con otras plantas (Saad et al., 2012). También se ha visto que la biosíntesis de aminoácidos ramificados es importante para el establecimiento de simbiosis eficientes (Chen et al., 2012). Finalmente, cabe destacar el trabajo publicado en 2018 por Klonowska y colaboradores en el que se describen los cambios a nivel de la expresión génica que ocurren cuando esta cepa es expuesta a exudados producidos por su planta hospedera *Mimosa pudica*. Este trabajo mostró en estas condiciones que los genes *nod* están sobreexpresados, particularmente los genes *nodA* y *nodB* luego de una hora de incubación (Klonowska et al., 2018). Aún cuando estos ejemplos representan trabajos muy interesantes debemos destacar que todos ellos estudian una única especie, *C. taiwanensis*, la cual no está presente en nuestro país y por otro lado la mayoría han sido dirigidos al estudio de uno o pocos genes cuya importancia ya había sido descrita en otros rizobios.

En este trabajo se decidió caracterizar los mecanismos implicados en los primeros pasos de la interacción entre un rizobio nativo perteneciente al género *Cupriavidus* y la planta modelo *M. pudica*. La cepa seleccionada, UYMMa02A, fue aislada a partir de nódulos presentes en *Mimosa magentea* colectados en la zona de Abra de Zabaleta del departamento de Lavalleja (Platero et al., 2016). Mediante análisis filogenético basados en genes *housekeeping rrs*, *recA* y *gyrB*, se demostró que esta cepa no pertenece a la especie *C. taiwanensis*, sugiriéndose que la misma representa una nueva especie dentro del género *Cupriavidus* (Sandes & Garabato, en preparación). La secuenciación de su genoma mostró la presencia de genes *nod* y *nif* implicados tanto en el establecimiento de la simbiosis y como en la FBN en otros modelos de rizobios (Iriarte et al., 2016).

Teniendo esto en cuenta se decidió emplear un abordaje proteómico para estudiar los primeros pasos de la interacción entre la cepa nativa de *Cupriavidus* sp. UYMMa02A, y la planta modelo *Mimosa pudica*.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. Hipótesis

El establecimiento de simbiosis entre *Cupriavidus* y sus plantas hospederas tiene particularidades, cuyo estudio nos ayudará a entender mejor los mecanismos implicados en las interacciones benéficas planta-microorganismo.

3.2. Objetivo general

Identificar las vías metabólicas importantes en los primeros pasos del establecimiento de la simbiosis entre rizobios pertenecientes al género *Cupriavidus* y leguminosas hospederas del género *Mimosa* empleando un abordaje proteómico.

3.3. Objetivos específicos

- I. Desarrollar un protocolo para el estudio de los proteomas de *Cupriavidus* spp.
- II. Estudiar el efecto de la disponibilidad de nitrógeno en *Cupriavidus* sp. UYMMa02A.
- III. Evidenciar los cambios inducidos por los flavonoides luteolina y apigenina en *Cupriavidus* sp. UYMMa02A.
- IV. Identificar las principales adaptaciones bacterianas que ocurren en los primeros pasos de la interacción entre *Cupriavidus* sp. UYMMa02A y *Mimosa pudica*.
- V. Validar una técnica para la edición genómica de *Cupriavidus* sp. UYMMa02A.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Cepas, plásmidos y condiciones de cultivo

La cepa *Cupriavidus* sp. UYMMa02A (Platero et al., 2016) y clones derivados de la misma se crecieron hasta fase de crecimiento exponencial tardío o estacionario, según el experimento a realizar, en medio de cultivo mínimo M9-citrato o en los medios ricos TY y LB (Anexo), a 30 °C. Los cultivos líquidos se incubaron con una agitación de 200 rpm durante 16 h. Las excepciones son mencionadas cuando es pertinente. Las cepas se mantuvieron en placas de TY Agar a 4 °C para su uso diario y se almacenaron en glicerol 25% (v/v) a -80 °C.

También se utilizaron cepas de *Escherichia coli* como herramienta para el mantenimiento de plásmidos y huéspedes intermediarios para la generación de mutantes. Estas cepas se crecieron en placas de LB Agar y medio de cultivo líquido LB a 37 °C.

Se adicionaron los antibióticos Ampicilina 100 µM (Amp₁₀₀), Kanamicina 50 µM (Km₅₀), Nitrofurantoína 50 µM (Nf₅₀), Gentamicina 10 µM (Gm₁₀), Streptomina 100 µM (Str₁₀₀) y Cloramfenicol 25 µM (Cf₂₅) al medio cuando fue necesario.

Las cepas y plásmidos utilizados se encuentran detallados en las Tabla 1 y Tabla 2.

4.2. Curvas de crecimiento

Para realizar las curvas de crecimiento, en primer lugar se cultivó la cepa *Cupriavidus* sp. UYMMa02A en 5 mL de medio TY durante la noche, se lavaron las células con una solución estéril de cloruro de sodio 0,9% (p/v) y se ajustó la DO_{620nm} a 0,05 para que todos los tratamientos comenzaran con la misma carga bacteriana. Se determinó el crecimiento de la cepa bajo 8 condiciones distintas de cultivo, M9-citrato con distintas concentraciones de nitrógeno (NH₄Cl: 20 mM, 4 mM, 1 mM y 0,4 mM), M9 sin fuente nitrogenada, M9 con luteolina 15 µM, M9 con apigenina 5 µM, y en medio para plantas Howieson suplementado con fuentes de carbono y nitrógeno (Anexo). El crecimiento de las cepas se monitoreó mediante medidas de DO_{620nm} cada 2 h en un colorímetro fotoeléctrico Erma (modelo AE-22) a lo largo de un período de 30 h. Los tratamientos se realizaron por triplicado.

4.3. Extracción de proteínas totales de cepas del género *Cupriavidus*

Para la obtención de una técnica adecuada para la extracción de proteínas bacterianas totales, se probaron distintas variaciones de protocolo para la lisis celular y solubilización de proteínas.

4.3.1. Lisis celular

Se partió de cultivos bacterianos crecidos en medio rico LB (Anexo) hasta fase exponencial tardía a 30 °C, con 200 rpm de agitación durante 16 h ($DO_{600} = 1$). Se recuperaron las células mediante centrifugación a 5000 g a 4 °C durante 5 minutos (centrífuga Sigma® 3-30K) y se realizaron 3 lavados con 2 mL de tampón fosfato salino (PBS, Anexo), seguido de centrifugaciones de 5000 g para recuperar las células. Se resuspendió el *pellet* bacteriano en PBS en 1/10 del volumen original de cultivo, manteniendo los tubos en baño de hielo y agua. Para la ruptura celular se probó ultrasonido y presión. Para la ruptura por ultrasonido se empleó un sonicador Ultrasonic Homogenizer (Cole-Parmer Instruments Co.) con el que se aplicaron 7 ciclos de 30 segundos de sonicado en modo continuo y a una potencia relativa de 4, alternados con 30 segundos de descanso en hielo. Para la lisis celular mediante cambios de presión, se empleó una prensa de French a una presión de 100 bar (25,500 lb/in²). Cada muestra se pasó 3 veces por la prensa. En ambos casos los lisados celulares se centrifugaron a 12.000 g durante 15 min a 4 °C y se guardó el sobrenadante conteniendo las proteínas solubles totales a -20 °C hasta su análisis. Para cada extracción se realizaron triplicados biológicos.

4.3.2. Solubilización de proteínas

Se emplearon distintos tampones para evaluar el efecto del agregado de detergentes y agentes caotrópicos en la solubilización de proteínas totales para distintas cepas pertenecientes al género *Cupriavidus*. Se probaron dos tampones distintos, PBS y UT (urea 8 M, tiourea 2 M y dithiothreitol (DTT) 10 mM, pH 8,5), y a su vez se ensayó el efecto del agregado del detergente CHAPS 4% (p/v) a cada uno de ellos. Por lo tanto, se ensayaron cuatro condiciones: PBS, PBS+CHAPS, UT y UT+CHAPS. En estos casos, previo al tratamiento por ultrasonido, los *pellets* celulares fueron resuspendidos en los distintos tampones. Para evitar la formación de espuma, el CHAPS se agregó luego de pasar la muestra por el sonicador. Cada condición se realizó por triplicado.

Tabla 1. Cepas utilizadas en este trabajo.

| Cepa | Resistencia Ab. ^a | Característica | Referencia |
|--|-------------------------------------|---|------------------------|
| <i>E. coli</i> DH5 α - λ -pir | Nal ₂₀ | Usada para el mantenimiento de plásmidos, permite replicación de plásmidos con origen Ori6K | Stock del Laboratorio |
| <i>C. metallidurans</i> CH34 | - | Cepa referencia del género <i>Cupriavidus</i> | (Goris et al., 2001) |
| <i>C. taiwanensis</i> LMG19424 | - | Cepa referencia del género <i>Cupriavidus</i> | (Chen et al., 2001) |
| <i>Cupriavidus</i> sp. UYMMa02A | Amp ₁₀₀ | Cepa salvaje, aislada de nódulos de <i>M. magentea</i> | (Platero et al., 2016) |
| <i>Cupriavidus</i> sp. UYMMa02A::pLS Δ prkA | Km ₅₀ | UYMMa02A con pLS Δ prkA integrado en el genoma | Este trabajo |
| <i>Cupriavidus</i> sp. UYMMa02A::pLS Δ nodD | Km ₅₀ | UYMMa02A, con pLS Δ nodD integrado en el genoma | Este trabajo |
| <i>Cupriavidus</i> sp. UYMMa02A::pLS Δ prkA (pSW-2) | Km ₅₀ Gm ₁₀ | UYMMa02A::pLS Δ prkA, con plásmido pSW-2 | Este trabajo |
| <i>Cupriavidus</i> sp. UYMMa02A::pLS Δ nodD (pSW-2) | Km ₅₀ Gm ₁₀ | UYMMa02A::pLS Δ nodD, con plásmido pSW-2 | Este trabajo |
| <i>Cupriavidus</i> sp. UYMMa02A::pLS Δ prkA (pSEVA434-I-SecI) | Km ₅₀ Str ₁₀₀ | UYMMa02A::pLS Δ prkA, con plásmido pSEVA434-I-SecI | Este trabajo |
| <i>Cupriavidus</i> sp. UYMMa02A::pLS Δ nodD (pSEVA434-I-SecI) | Km ₅₀ Str ₁₀₀ | UYMMa02A::pLS Δ nodD, con plásmido pSEVA434-I-SecI | Este trabajo |
| <i>Cupriavidus</i> sp. UYMMa02A::pLS Δ prkA (pSEVA628S) | Km ₅₀ Gm ₁₀ | UYMMa02A::pLS Δ prkA, con plásmido pSEVA628S | Este trabajo |
| <i>Cupriavidus</i> sp. UYMMa02A::pLS Δ nodD (pSEVA628S) | Km ₅₀ Gm ₁₀ | UYMMa02A::pLS Δ nodD, con plásmido pSEVA628S | Este trabajo |
| <i>Cupriavidus</i> sp. UYMMa02A::pLS Δ prkA (pACBSR) | Km ₅₀ Cf ₂₅ | UYMMa02A::pLS Δ prkA, con plásmido pACBSR | Este trabajo |
| <i>Cupriavidus</i> sp. UYMMa02A::pLS Δ nodD (pACBSR) | Km ₅₀ Cf ₂₅ | Cepa derivada de <i>Cupriavidus</i> UYMMa02A:pLS Δ nodD, con plásmido pACBSR | Este trabajo |
| <i>Cupriavidus</i> sp. UYMMa02A Δ nodD | Amp ₁₀₀ | Cepa mutada en el gen <i>nodD</i> | Este trabajo |

^a el subíndice indica la concentración final del antibiótico expresado en micro molar.

Tabla 2. Vectores plasmídicos utilizados en este trabajo.

| Plásmido | Resistencia ab. ^a | Característica | Referencia |
|---------------|------------------------------|---|--|
| pEMG | Km ₅₀ | oriT, ori R6K, <i>αlacZ</i> , bajo número de copias, necesita la proteína pi para replicarse. Transferible pero no replicable (suicida) en <i>Cupriavidus</i> . | (Martinez-García, E & de Lorenzo, 2012) |
| pLSΔprkA | Km ₅₀ | pEMG, conteniendo los fragmentos TS1 y TS2 del gen <i>prkA</i> | Este trabajo |
| pLSΔnodD | Km ₅₀ | pEMG, conteniendo los fragmentos TS1 y TS2 del gen <i>nodD</i> | Este trabajo |
| pSW-2 | Gm ₁₀ | oriT, ori RK2, bajo número de copias, contiene el gen <i>I-sceI</i> bajo el control del promotor <i>pm</i> , inducible por 3MB. | (Martinez-García, E & de Lorenzo, 2012) |
| pSEVA434-IscE | Str ₁₀₀ | oriT, Ori pBBR1, medio número de copias, Contiene el gen <i>I-sceI</i> bajo el control del promotor <i>lacIq-Ptrc</i> , inducible por IPTG. | Seva collection (http://seva.cnb.csic.es/) |
| pSEVA628S | Gm ₁₀ | oriT, ori RK2, bajo número de copias, contiene el gen <i>I-sceI</i> bajo el control del promotor <i>Pm</i> , inducible por 3MB. | (Silva-Rocha et al., 2013) |
| pACBSR | Cf ₂₅ | oriT, ori p15A, bajo número de copias, contiene el gen <i>I-sceI</i> y <i>λed</i> bajo el control del promotor <i>ara</i> , inducible por L-arabinosa. | (Herring et al., 2003) |
| pRK600 | Cf ₂₅ | Plásmido <i>Helper</i> para conjugaciones triparentales. Provee los genes <i>tra</i> en trans para movilizar plásmidos con origen de transferencia (oriT) | (Kessler et al., 1992) |

^a el subíndice indica la concentración final del antibiótico expresado en micro molar

4.4. Cuantificación de proteínas

La concentración de proteínas se estimó mediante la medida de absorbancia de las muestras a 280 nm (Fasman, 1990) y mediante el método de Bradford (Bradford, 1976). Para este último se realizó una curva de calibración empleando seroalbúmina bovina (BSA, por sus siglas en inglés) como proteína estándar. El procedimiento se siguió de acuerdo a protocolos empleados en el laboratorio (Taulé, 2018).

4.5. SDS PAGE

Para analizar los extractos proteicos obtenidos, se efectuó una electroforesis en una dimensión en sistema discontinuo de geles de poli(acrilamida) (Laemmli, 1970). Para esta se utilizó un gel concentrador conteniendo 5 % de acrilamida-bis(acrilamida) y gel separador con 12 % de acrilamida-bis(acrilamida) (Anexo). La electroforesis se realizó en tampón de corrida (Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1 %) a una corriente constante de 20 mA por gel. Previo a la siembra en el gel, las muestras fueron resuspendidas en un tampón de muestra (Tris 0,25 M, SDS 8 % (p/v), glicerol 40 % (v/v), azul de bromofenol 0,04 % (p/v), β -mercaptoetanol 1 % (v/v) y calentadas durante 5 a 10 min a 95 °C. Luego de la electroforesis, los geles de poli(acrilamida) se fijaron con una solución de etanol: ácido acético: H₂O (proporción 5:1:4) durante 30 minutos y se tiñeron con una solución de azul de Coomassie G-250 en etanol (sulfato de amonio 8 %, ácido fosfórico 0,8 %, Azul de Coomassie G-250 0,08 %, etanol 20 %) hasta la aparición de las bandas. El excedente de colorante se retiró mediante sucesivos lavados de los geles teñidos con agua destilada.

4.6. 2D DIGE

4.6.1. Precipitación de proteínas

Previo a la electroforesis en dos dimensiones (2D), las proteínas presentes en cada extracto se precipitaron y lavaron, para concentrar las muestras y remover las sales presentes. Para esto se utilizó el kit comercial "2-D Clean – Up Kit" (GE Healthcare). Se siguieron las indicaciones del fabricante y finalmente las proteínas se resuspendieron en un tampón de rehidratación (8 M urea, 2 M tiourea, 4 % CHAPS, 40 mM DTT, IPG-buffer (GE Healthcare) 1,2 % (v/v)) pH 8,5.

4.6.2. Marcado de las proteínas

Las proteínas totales presentes en cada condición se marcaron con un fluoróforo específico que permite su detección diferencial luego de la electroforesis. Para esto se tomaron 35 μ g de proteínas totales de cada condición y se realizó el marcado siguiendo las recomendaciones del fabricante empleando el Refraction-2D™ Labeling Kit. En las distintas réplicas las muestras se marcaron con los fluoróforos Cy3 ($\lambda_{\text{exc}} = 532\text{nm}$ / $\lambda_{\text{em}} = 580\text{nm}$) o Cy5 ($\lambda_{\text{exc}} = 633\text{nm}$ / $\lambda_{\text{em}} = 670\text{nm}$), alternando el uso de uno u otro, de forma de normalizar posibles diferencias en la eficiencia del marcado (Tabla 3, Tabla 4 y Tabla 5). Para poder llevar a cabo la comparación inter e intra gel, se utilizó un estándar interno, compuesto por 10 μ g de proteína de cada

una de las muestras, el cual se marcó con el fluoróforo Cy2 ($\lambda_{ex} = 488\text{nm}$ / $\lambda_{em} = 520\text{nm}$). En la Figura 10, se muestra un esquema de la metodología empleada para el marcado de las muestras.

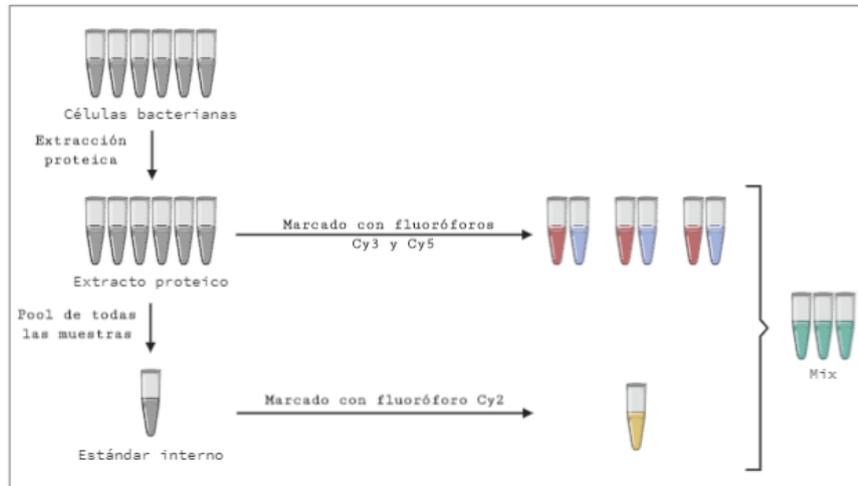


Figura 10. Marcado mínimo de muestras con CyDye DIGE Fluor. En color gris se encuentran las muestras previo a la utilización de fluoróforos, en rojo y azul las muestras marcadas con Cy3 y Cy5 respectivamente. El marcado con Cy2 se observa en amarillo y el Mix se ilustra de color verde.

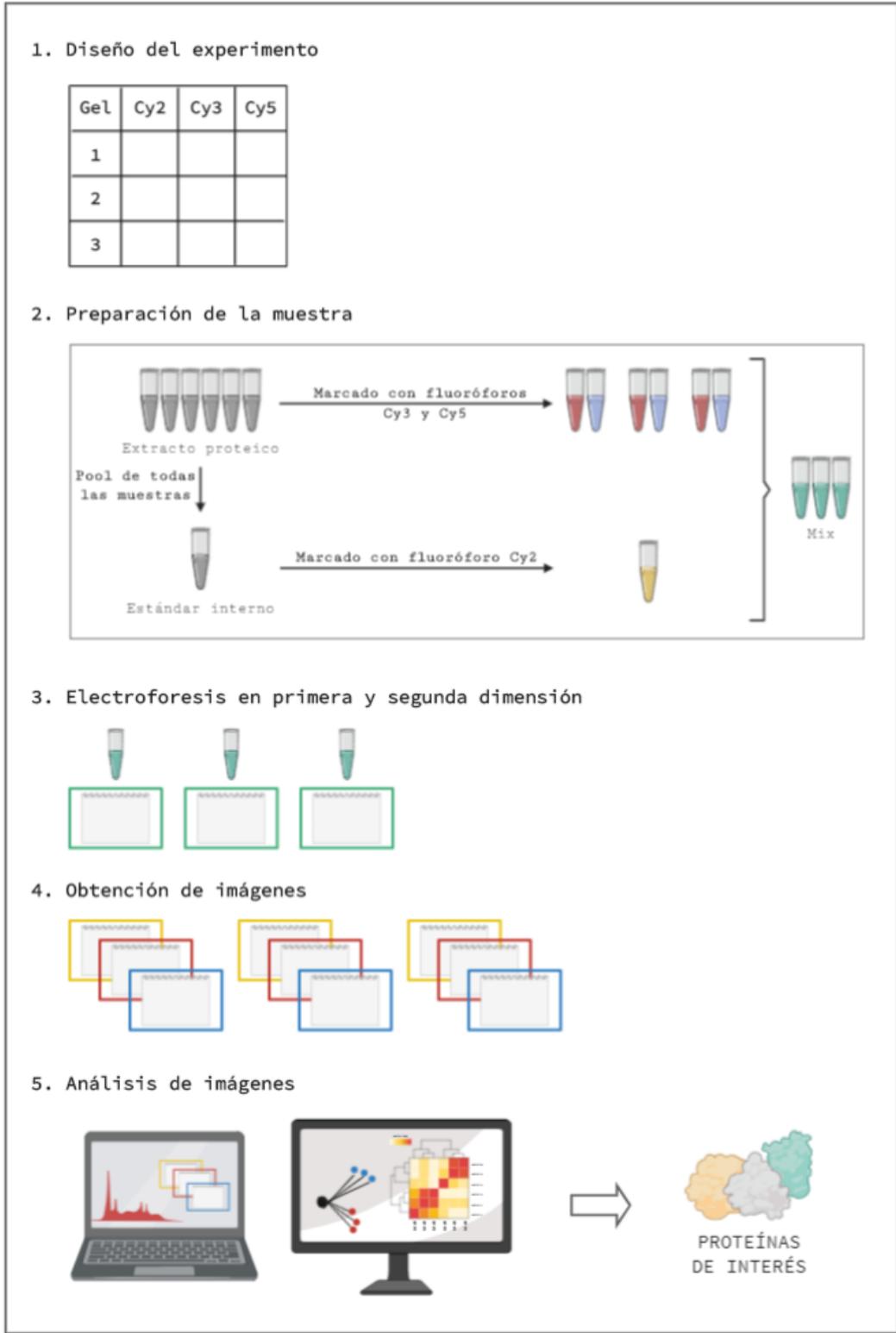


Figura 11. Esquema de trabajo empleado para realizar el 2D-DIGE. 1: Diseño experimental. 2: Preparación de muestras. Las réplicas de cada condición se marcan con Cy3 y Cy5. El estándar interno consiste en la mezcla de todas las réplicas y se marca con Cy2. 3: Electroforesis en primera y segundo dimensión. 4: Obtención de imágenes correspondiente a cada réplica. 5: Análisis de imágenes mediante software Progenesis same spots.

4.6.3. Electroforesis 2D DIGE

La electroforesis en dos dimensiones consta de un primer paso de separación de acuerdo a la carga neta de cada proteína (isoelectroenfoque) y una segunda separación por tamaño empleando SDS-PAGE. En este caso, para la primera separación se emplearon tiras de geles de agarosa de 24 cm de largo y un rango de pH 3 a 10 NL (Immobiline Drystrip GE Healthcare), las cuales fueron previamente hidratadas en un tampón de hidratación (urea 8M, tiourea 2M, CHAPS 2% (p/v)), e IPG-buffer (GE Healthcare) 1,2 % (v/v), de acuerdo a lo establecido por el fabricante, empleando el equipo IPGbox (GE Healthcare). Las muestras se mezclaron y agruparon en el tampón de hidratación (Tabla 3, Tabla 4 y Tabla 5) y se incorporaron de forma pasiva a las tiras. El isoelectroenfoque se llevó a cabo en un equipo IPGphor III (GE Healthcare), el perfil de voltaje empleado fue adaptado para correr durante la noche y consistió en: fase constante de 500 V durante 2 h, fase constante de 2000 V de 2 h, un incremento lineal hasta a 4000 V en 2 h, un incremento lineal a 8000 V en 2 h y una fase final constante a 8000 V durante 4 h. Una vez finalizada la corrida, cada tira fue sumergida en 1 mL del tampón de equilibrio (urea 6 M, SDS 2 % (p/v), glicerol 30 % (v/v), Tris-HCl 50 mM pH 8,6), conteniendo al agente reductor DTT 1 % (p/v), e incubándolas durante 10 minutos con agitación moderada, para reducir los puentes disulfuros. Luego las tiras se transfirieron a 1 mL del tampón de equilibrio suplementado con 4,7 % (p/v) de iodoacetamida, e incubadas durante 10 minutos con agitación moderada, para la alquilación de las cisteínas. Luego de esto, se inactivaron las reacciones mediante la inmersión de las tiras en el tampón de corrida SDS-PAGE.

Para efectuar la separación en la segunda dimensión, se utilizaron geles SDS-PAGE 12 % utilizando una cuba de electroforesis Ettan DALT six Electrophoresis System (GE Healthcare), equipada con la unidad de enfriamiento Multitemp III de (GE Healthcare) y termostalizada a 20 °C. Cada tira se colocó sobre el gel de acrilamida correspondiente y se unió al mismo, usando una mezcla de tampón de corrida suplementado con agarosa 0,2 % termostalizada a 45 °C, conteniendo trazas de azul de bromofenol. La corrida se efectuó a 100 mA y 80 V los primeros 5 minutos y luego se incrementó el voltaje a 120 V hasta que el frente de corrida llegara al final del gel.

4.6.4. Obtención y análisis de imágenes

Una vez finalizada la segunda corrida electroforética, los geles se fijaron con una solución etanol:ácido acético:H₂O (5:1:4) durante 30 minutos. Luego se escanearon utilizando un escáner Typhoon FLA 9500 (GE Healthcare), equipado con filtros de excitación/emisión específicos para cada fluoróforo: 633 nm/bandpass red 670 nm para Cy5; 532 nm/bandpass green 580 nm para Cy3; 488 nm/bandpass blue 520 nm para Cy2, utilizando el software ImageQuant TL v8.1 (GE Healthcare).

Las imágenes obtenidas se analizaron utilizando el software Progenesis same spots (<http://totallab.com/home/samespots/>). Este software permitió la detección, la normalización con el estándar interno y la cuantificación de los spots. Finalmente se

agruparon los geles y se realizó el análisis estadístico para comparar los niveles de expresión de las proteínas. Los spots que presentaron diferencias en el nivel de fluorescencia con un p-valor $\leq 0,05$ y una tasa de cambio $\geq 1,25$ fueron seleccionados para su identificación.

4.7. Cambios en la expresión de *Cupriavidus* sp. UYMMa02A a nivel proteómico en cultivos *in vitro*

4.7.1. Efecto de la disponibilidad de nitrógeno

Para evaluar los cambios proteómicos que ocurren en respuesta a la disponibilidad de nitrógeno en *Cupriavidus* sp. UYMMa02A, la cepa fue cultivada en condiciones contrastantes de disponibilidad de nitrógeno. Para esto se partió de un cultivo de toda la noche en medio mínimo líquido M9-citrato (Anexo). Las células se cosecharon igual que en las condiciones previamente mencionadas, se lavaron con M9-citrato sin nitrógeno y se utilizó una suspensión de células correspondiente a una $DO_{600} = 0,01$ final para inocular matraces con 25 mL de M9- citrato con 20 mM de NH_4Cl (N_1, N_2, N_3) (condiciones favorables para el crecimiento bacteriano) y M9-citrato conteniendo una concentración de nitrógeno 20 veces menor a la normal (1 mM) (N_1 (1/20), N_2 (1/20), N_3 (1/20)) (Figura 12). Los matraces se incubaron a 30 °C con agitación hasta alcanzar una fase exponencial de crecimiento ($DO_{600} = 0,6$). Por último, se cosecharon las células y se procedió a extraer las proteínas como se indica en los apartados anteriores. Se realizaron triplicados biológicos de cada tratamiento.



Figura 12. Estrategia experimental con distintas concentraciones de nitrógeno. A. Cepa *Cupriavidus* sp. UYMMa02A en medio mínimo M9-Citrato (NH_4Cl 20mM). B. cepa *Cupriavidus* sp. UYMMa02A en medio mínimo M9-Citrato, con N disminuido 20 veces (NH_4Cl 1mM).

Las muestras de proteínas totales obtenidas en cada caso fueron marcadas con los fluoróforos de acuerdo a la Tabla 3 y analizadas mediante 2D-DIGE.

Tabla 3. Diseño experimental para el marcado de muestras (2D-DIGE) para el efecto de la disponibilidad de nitrógeno.

| Gel | Nº de tira | Marcado con Cy3 | Marcado con Cy5 |
|-----|------------|-----------------------|-----------------------|
| 1 | 15028 | N ₁ | N ₁ (1/20) |
| 2 | 15027 | N ₂ | N ₂ (1/20) |
| 3 | 18269 | N ₃ (1/20) | N ₃ |

4.7.2. Efecto de la presencia de flavonoides

Siguiendo la misma línea de trabajo, se planteó estudiar el efecto de la presencia de los flavonoides luteolina y apigenina en la expresión de proteínas totales de *Cupriavidus* sp. UYMMa02A. Para esto se realizaron cultivos de *Cupriavidus* sp. UYMMa02A en matraces con 25 mL de medio de cultivo M9-citrato, M9-citrato suplementado con luteolina 15 µM y M9-citrato suplementado con apigenina 5 µM (Figura 13). Los matraces se inocularon con una suspensión de células correspondiente a una DO₆₀₀= 0,01 de un cultivo primario de *Cupriavidus* sp. UYMMa02A, obtenido de igual manera que en el apartado 4.7.1. Los cultivos se incubaron a 30 °C hasta que alcanzaron fase exponencial (DO₆₀₀ = 0,6), se cosecharon las células y se procedió a la obtención de las proteínas totales como se indica en los apartados 4.3 y 4.4.

Una vez obtenidas las proteínas, se continuó con el ensayo 2D-DIGE, siguiendo los pasos de la sección 4.6, las distintas condiciones son marcadas con los fluoróforos como lo muestra la Tabla 4. En este caso, las imágenes se agruparon de forma de comparar los tres tratamientos a la vez, teniendo en cuenta que dos tratamientos se marquen con Cy3 y uno con Cy5, y luego intercambiar (dos tratamientos con Cy5 y uno con Cy3), de modo que la intensidad del fluoróforo sea una variable despreciable. Por ejemplo, se agruparon para observar la diferencia de expresión entre L₁, A₃ y C₃ y L₂, A₄ y C₁.

Tabla 4. Diseño experimental para el marcado de muestras (2D-DIGE) para el efecto de la presencia de flavonoides.

| Gel | Nº de tira | Marcado con Cy3 | Marcado con Cy5 |
|-----|------------|-----------------|-----------------|
| 1 | 18158 | L ₁ | A ₃ |
| 2 | 18159 | L ₂ | C ₁ |
| 3 | 18160 | A ₂ | C ₂ |
| 4 | 18161 | C ₃ | L ₃ |
| 5 | 15016 | C ₄ | A ₄ |
| 6 | 15017 | A ₁ | L ₄ |

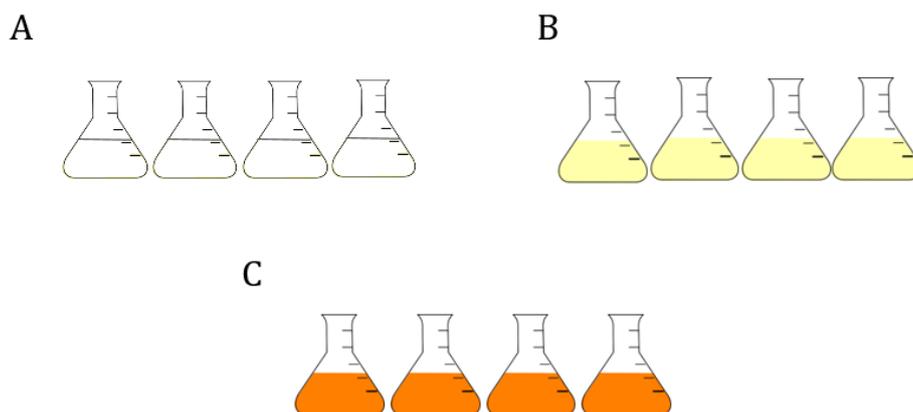


Figura 13. Estrategia experimental con exudados comerciales. **A.** Tratamiento control, cepa *Cupriavidus* sp. UYMMa02A en medio mínimo M9-Citrato. **B.** cepa *Cupriavidus* sp. UYMMa02A en medio mínimo M9-Citrato suplementado con Luteolina 15 μ M. **C.** cepa *Cupriavidus* sp. UYMMa02A en medio mínimo M9-Citrato suplementado con Apigenina 5 μ M.

4.8. Cambios en la expresión de *Cupriavidus* sp. UYMMa02A a nivel proteómico en cultivos *in vivo*

4.8.1. Ensayo en sistema co-cultivo planta – microorganismo

4.8.1.1. Sistema co-cultivo

En este sistema, planta y bacteria comparten un mismo medio de cultivo, pero se encuentran separadas por una membrana (Figura 14 C). No existe un sistema comercial que sirva para nuestro propósito, por lo que se ideó un sistema en el cual las bacterias se colocaron dentro de un cilindro cuyas paredes están formadas por una membrana de celulosa. Se utilizó para esto una membrana de diálisis de celulosa (Sigma, D9652) de 33 mm x 21 mm y con un tamaño medio de poro de 10 a 12 KDa, de forma que las bacterias quedan retenidas pero los metabolitos y nutrientes de peso molecular menor al tamaño del poro pueden difundir libremente. Este cilindro de membrana se encuentra cerrado en uno de sus extremos con un suncho y en el otro tiene un caño de silicona por el que se puede introducir o retirar muestras líquidas de su interior. La membrana se encuentra a su vez sumergida dentro del medio de cultivo vegetal. Para poder acoplar el caño a la membrana se colocó un tubo de vidrio que da rigidez y permite el sellado entre la membrana y el caño de silicona por medio de un precinto de plástico (Figura 14 C).

Una vez ensamblado y para mantener las condiciones asépticas, todo el sistema fue esterilizado mediante irradiación con rayos Gamma con una dosis de 20 a 25 KG en el servicio de irradiación del LATU.

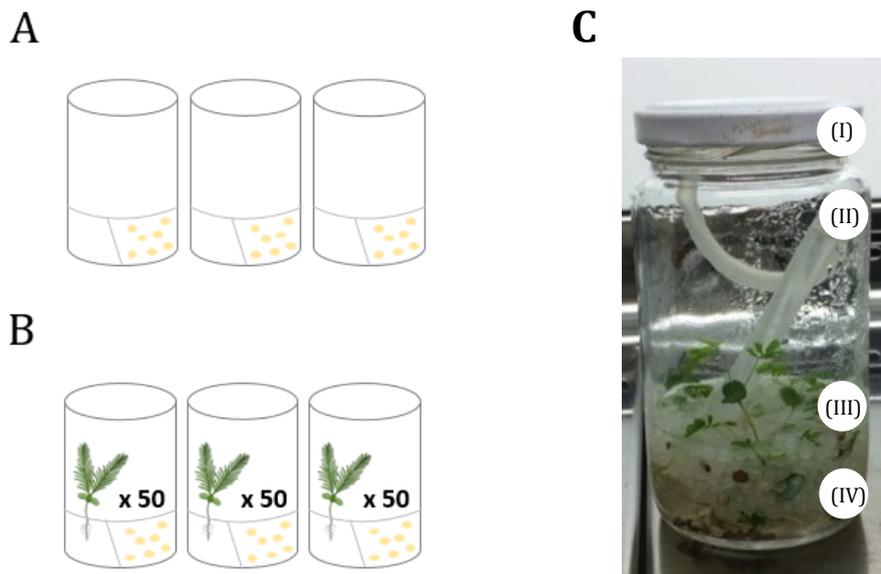


Figura 14. Sistema co-cultivo planta - microorganismo. **A.** Esquema del tratamiento control con la cepa *Cupriavidus* sp. UYMMa02A. **B.** Esquema del tratamiento co-cultivo *Mimosa pudica* - *Cupriavidus* sp. UYMMa02A. **C.** Imagen del tratamiento co-cultivo *Mimosa pudica* - *Cupriavidus* sp. UYMMa02A; (I) frasco co-cultivo; (II) caño de silicona conectado a membrana (no se observa); (III) plantas de *M. pudica*; (IV) Medio de cultivo vegetal con bolitas de polipropileno

Para la puesta a punto de un protocolo que nos permitiera esterilizar la superficie de semillas de *M. pudica* y lograr su germinación, se probaron distintos protocolos incluyendo los siguientes pasos: 1) Disminución de la tensión superficial de las semillas sumergiéndolas durante 1 o 2 minutos en etanol 95 % y posterior secado en papel de filtro; 2) Pretratamiento de las semillas con la finalidad de acelerar la germinación con H_2SO_4 10 M durante 10 o 20 minutos y posteriores lavados con agua destilada estéril; 3) Esterilización de la superficie de las semillas tratándolas con NaClO 4 %, NaClO 2,5 % o con una solución de $HgCl_2$ 9.2 mM en HCl 0,1 N durante 1, 3, 5 y 10 minutos. Finalmente se realizaron 5 lavados con agua estéril, dejando hinchar las semillas en el último lavado con agua destilada estéril durante toda la noche en estufa a 30 °C. El proceso de esterilización se controló colocando algunas semillas tratadas sobre medio de cultivo LB sólido e incubación a 30 °C.

Para la germinación de las semillas, se las colocó en placas de petri con agar/agua 0,8 % y se incubaron en oscuridad en estufa a 30 °C.

4.8.1.2. Efecto de la presencia del macrosimbionte

Para los experimentos de co-cultivo (Figura 14) se cultivaron 50 plantas tratadas y germinadas de *M. pudica* en frascos de vidrio conteniendo 50 mL de medio de cultivo vegetal Howieson (1/10) (Anexo) utilizando bolitas de polipropileno como soporte para las plántulas. Se permitió el desarrollo de las plantas durante 5 a 7 días para permitir la liberación de exudados radiculares, luego de lo cual se inocularon 5×10^8 ufc de la cepa *Cupriavidus* sp. UYMMa02A dentro de la membrana incluida en cada frasco. Como control se utilizó el sistema inoculado, pero sin plantas. En este caso el medio de cultivo Howieson fue suplementado con fuentes de carbono (Citrato de sodio 2 mM) y nitrógeno (NH_4Cl 2 mM). Cada ensayo se realizó al menos por triplicado. Luego de la inoculación, los sistemas se mantuvieron en cuarto de planta en condiciones controladas (25 °C, 18 h de fotoperíodo) de 5 a 7 días, luego las

bacterias fueron recuperadas, procediéndose a la extracción de proteínas totales. Para esto, en condiciones asépticas, se sacaron las membranas de los frascos, se enjuagaron con agua destilada estéril y se recuperaron las células bacterianas del interior mediante una jeringa con aguja estéril. La suspensión bacteriana se colocó en tubos eppendorff estériles, recuperándose las bacterias por centrifugación. Para el 2D-DIGE los tratamientos se combinaron según la Tabla 5.

Tabla 5. Diseño experimental para el marcado de muestras (2D-DIGE) para el efecto de la presencia del macrosimbionte.

| Gel | Nº de tira | Marcado con Cy3 | Marcado con Cy5 |
|-----|------------|-----------------|-----------------|
| 1 | 18273 | CC ₁ | C ₁ |
| 2 | 18274 | C ₂ | CC ₂ |
| 3 | 18275 | CC ₃ | C ₃ |

4.8.2. Análisis de spots expresados diferencialmente

4.8.2.1. Identificación de proteínas por MALDI-TOF/TOF y búsqueda en base de datos.

Una vez que se identificaron los *spots* expresados diferencialmente, se procedió a su extracción de los geles y análisis por MALDI-TOF/TOF para su identificación. Para esto se realizó una pasantía en la Unidad Mixta de Bioquímica y Proteómica Analíticas del IPmont-IIBCE. Los geles fueron teñidos con Azul de Coomassie de acuerdo a la sección 4.5. Luego se recortaron manualmente los *spots* de interés, comparando el mapa del gel previamente escaneado con el gel teñido. Los *spots* recuperados se destiñeron con una solución de 0,1 M NH₄HCO₃ en acetonitrilo (ACN) 50 % (v/v) y posteriormente fueron digeridos *in gel* con tripsina porcina modificada (grado secuenciación, Promega). Para la extracción de los péptidos resultantes del tratamiento con tripsina, las muestras se trataron dos veces, durante una hora cada vez, con una solución 0,1 % (v/v) ácido trifluoroacético (TFA) en ACN 60 %. El ACN se evaporó por vacío utilizando un *SpeedVac*, y las muestras se concentraron y desalaron utilizando micro columnas de fase reversa C18 Zip Tip® (Merck, Millipore) previamente equilibradas con 0,1 % TFA. La elución de los péptidos se llevó a cabo con 3 µL de una solución de matriz (ácido α- ciano-4-hidroxicinámico, CHCA) en 60 % ACN 0,1 % TFA, colocando las muestras directamente en una placa Opti-TOF de 384 posiciones (Ab Sciex). La adquisición de los espectros se realizó en un espectrómetro de masa de tipo MALDI-TOF/TOF (4800 Analyzer Abi Sciex) operando en modo reflector positivo. Los espectros fueron calibrados externamente con una mezcla estándar de péptidos (Applied Biosystems). A partir de los espectros obtenidos (MS) se seleccionaron las señales más intensas para la obtención de espectros de fragmentación (MS/MS).

El procesamiento de los datos obtenidos se realizó con el software Data Explorer v4.9. (Applied Biosystems). Para el filtrado de las señales del espectro se utilizó un valor mínimo de relación señal/ruido de 25 para MS y 15 para MS/MS. Las

búsquedas se llevaron a cabo con el motor de búsqueda Mascot (<http://www.matrixscience.com>) en el modo *Sequence query*, utilizando como base de datos NR del NCBI. Los parámetros de búsqueda fueron: Taxonomía no restringida; saltos de cortes de tripsina permitidos = 1; modificaciones parciales: oxidación de metionina y carbamidometilación de cisteínas; tolerancia de masa de péptidos = 0,05 Da y tolerancia MS/MS = 0,45 Da. Los valores de *m/z* utilizados corresponden a los valores monoisotópicos.

Para considerar que una proteína fue identificada, se exigió que al menos un fragmento fuera asignado a esta (con un *Mascot peptide ion score* $p < 0.05$) y que tuviera además un *Mascot protein score* estadísticamente significativo ($p < 0.05$), siendo *mascot score* la suma de puntaje obtenido por la suma de péptidos individuales o masas de iones de fragmentos MS / MS.

Las proteínas identificadas fueron clasificadas a nivel de función según los clados de grupos ortólogos o COGs, *Clusters of Orthologous Groups* de sus siglas en inglés. Para esto se utilizó la base de datos EggNOG 4.5.1 (<http://eggnogdb.embl.de/#/app/home>). También se clasificaron en cuanto a su locación subcelular con la herramienta CELLO v.2.5: *subcellular Localization predictor* (<http://cello.life.nctu.edu.tw/>). A partir del genoma y con el servidor *Rapid Annotation using Subsystems Technology (RAST) 2.0* (<http://rast.theseed.org/FIG/rast.cgi>) fue posible determinar el contexto genómico de las proteínas y la ubicación de su secuencia génica a nivel cromosomal.

4.9. Generación de mutantes dirigidas

4.9.1. Eliminación de genes mediante sistema I-SceI

Luego de analizar las proteínas expresadas diferencialmente, se decidió realizar la construcción de cepas mutantes derivadas de *Cupriavidus* sp. UYMMa02A en las cuales se eliminaran los genes que codifican para la proteína quinasa PrkA (gen *prkA*) y para el regulador de los genes *nod* NodD (gen *nodD*). Para ello, se utilizó el sistema reportado por Martínez-García y colaboradores basado en la actividad de la meganucleasa I-SceI (Martínez-García, E & de Lorenzo, 2012), el cual fue implementado con éxito en nuestro laboratorio (Taulé et al., 2019). Brevemente, el método consiste en eliminar íntegramente el marco de lectura abierto correspondiente al gen de interés, mediante recombinación homóloga, digestión con la nucleasa y reparación del ADN, sin dejar secuencias foráneas o marcas en el ADN. A continuación se describe con detalle el procedimiento utilizado el cual está esquematizado en la Figura 15.

4.9.1.1. Diseño de cebadores

Se diseñaron y sintetizaron los cebadores necesarios para la construcción de las mutantes, lo cuales se detallan en la Tabla 6. Los cebadores se diseñaron a partir de la secuencia genómica de la cepa UYMMa02A (Iriarte et al., 2016). Para esto se descargaron de la base de datos NCBI, las secuencias correspondientes a los genes a

mutar más 1000 pares de bases a cada lado del gen. Las secuencias se visualizaron utilizando el programa ApE. Los cebadores TS1R inician justo antes del codón de inicio, mientras que los TS2F inician justo después del codón stop. Los cebadores TS1F y TS2R se diseñaron para amplificar entre 500 y 600 pares de bases y se les agregó en su extremo 5' una secuencia de reconocimiento para enzimas de restricción más las bases necesarias para el correcto funcionamiento de las enzimas en los extremos, según las recomendaciones del programa EnzymeX.

Tabla 6. Cebadores utilizados para la mutagénesis dirigida.

| Nombre del gen | Nombre | Secuencia (5' - 3') |
|----------------|---------------------------|--|
| <i>prkA</i> | TS1F-prkA-EcoRI | GGAATTC CCACCACTTGGTCATCGCAGC |
| | TS1R-prkA | GGCCTGGTTCAGGCGCCGTCTCACTCCCCTCAGAGTCC |
| | TS2F1-prkA | CGGCGCCTGAACCAGGCC |
| | TS2R-prkA-XbaI | GCT CTAGAC GACAAATTGGAAGGCGTGCCG |
| | prkA-F-EcoRI | GGAATTC CATGGACATTTTCGGCCATTACG |
| | prkA-R-XbaI | GCT CTAGAGG ACTCTGACGGGAGTGAGGA |
| <i>nodD</i> | TS1F2-nodD-KpnI | ACT GGTACC TACTCCATACGGTGCACGTAGG |
| | TS1R2-nodD | CTAGGCTCCTTGCGTCAACAGTTGAGGCATCCACATGACG |
| | TS2F2-nodD | TGTTGACGCGAAGGAGCCTAG |
| | TS2R-nodD-BamHI | CG GGATCC AGATAACGCAGCGATCTGTCC |
| | nodD-F-con promotor-BamHI | CG GGATCC AGACAAACGCCTCGATGTTTC |
| | nodD-Entero-R-HindIII | TATA AAGCTT CTAGCCGAAGCTCTTCGCCTC |
| | pSW-F | GGACGCTTCGCTGAAAATA |
| | pSW-R | AACGTCGTGACTGGGAAAAC |
| | pS3 | GAACGCTCGGTTGCCGC |
| | pS4 | CCAGCCTCGCAGAGCAGG |

En **negrita** se resaltan las secuencias de reconocimiento de las enzimas de restricción utilizadas en este trabajo.

4.9.2. Construcción de los vectores pLSΔprkA y pLSΔnodD

El vector pEMG o pJP5603-ISceIv2 está diseñado para insertar segmentos de ADN dentro del genoma de la cepa blanco, y también es utilizado para generar deleciones dirigidas en regiones cromosomales específicas (Figura 15). Este vector utiliza un origen de replicación ori6K por lo que solo puede replicarse en cepas que tengan el gen *pir* del fago lambda. Por otro lado, el vector tiene un origen de transferencia

(OriT). En consecuencia, este vector es transferible pero no es replicable en *Cupriavidus*, comportándose como un vector suicida. Sin embargo, el vector puede integrarse en el genoma de la cepa al que fue transferido mediante recombinación homóloga si se clona en él una región de ADN homóloga. Este evento de recombinación simple se puede seleccionar utilizando antibióticos adecuados. A su vez, el plásmido porta secuencias de reconocimiento para la nucleasa I-SceI. Esta endonucleasa en particular proviene de *Saccharomyces cerevisiae*, solo puede escindir en un sitio específico de 18 pb que no se encuentra en ninguno de los genomas bacterianos secuenciados hasta el momento (Martínez-García, E & de Lorenzo, 2012).

4.9.2.1. Amplificaciones por PCR

Se realizó por PCR la amplificación de las dos regiones adyacentes corriente arriba (TS1) y corriente abajo (TS2) de los genes a mutar (*nodD* y *prkA*) utilizando como molde de ADN una colonia de *Cupriavidus* sp. UYMMa02A. Se utilizaron los cebadores TS1F y TS1R, TS2F y TS2R respectivamente (Tabla 6). La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 20 μ L conteniendo: 10 μ l de Dream Taq Green Master Mix (Thermo Scientific), 0,8 μ l de cada cebador 10 μ M y 7 μ l de H₂O. Como control negativo se empleó una mezcla de reacción sin el agregado de ADN en el tubo. El programa de ciclado consistió en una desnaturalización inicial de 5 min a 95°C, seguido de 30 ciclos de una primera etapa de desnaturalización de 1 min a 95°C, hibridación de los cebadores durante 1 min a 48 - 59 °C (gradiente) y una extensión durante 30 segundos a 72 °C. Para finalizar se realizó un paso de elongación final de las cadenas de ADN de 7 min a 72°C.

Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa 1 % (p/v) en tampón TAE, utilizando el intercalante Good View, en una relación de 1 μ L intercalante/50 mL agarosa. Se utilizó un marcador de peso molecular GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder (Fermentas, #SM1332) para confirmar el tamaño del fragmento de amplificación. La corrida electroforética se realizó a 90 V, durante 1 h.

Luego se realizó una segunda amplificación para la unión de las regiones TS1 y TS2, utilizando en este caso como molde 1 μ l de cada uno de los productos de las amplificaciones anteriores (TS1 y TS2) y como cebadores TS1F y TS2R (Tabla 6). El control negativo y el programa de ciclado y la visualización del resultado de la amplificación consistió en el mismo al utilizado previamente, salvo la extensión que fue de 1 min a 72 °C.

4.9.2.2. Digestión con enzimas de restricción

El plásmido pEMG y los fragmentos a insertar fueron digeridos con dos juegos de enzimas de restricción. *EcoRI* y *XbaI* digirieron plásmido e inserto relacionados al gen *prkA*, los tamaños de bandas esperadas eran de 3,5 Kb y 1048 pb, respectivamente. De igual forma, las enzimas *BamHI* y *KpnI* digirieron plásmido e inserto relacionados al gen *nodD* y las bandas esperadas son de 3,5 Kb y 1200 pb. Las digestiones se realizaron de forma sucesiva en un volumen final de 20 μ L conteniendo 5 μ L de la preparación de ADN, 1 μ L de cada una de las enzimas de

restricción correspondientes (10 U), 2 μ L del tampón de reacción 10X suministrado por el fabricante y 12 μ L de H₂O, y se incubaron a 37 °C durante 4 h. Luego de las digestiones, las enzimas de restricción se inactivaron calentando los tubos a 80 °C durante 20 min.

4.9.2.3. Purificación de fragmentos de ADN.

Los amplicones TS1-TS2 y todos los productos de digestiones se separaron por electroforesis en gel de agarosa, los fragmentos de tamaño esperado fueron recortados y purificados utilizando el Kit comercial de extracción marca Qiagen “QIAquick® Gel Extration Kit”, siguiendo las instrucciones del fabricante. Para estimar calidad y concentración el ADN purificado se cuantificó en NanoDrop1000 (Thermo Scientific).

4.9.2.4. Ligación

Para las ligaciones se utilizó la enzima T4 ADN ligasa (Thermo Scientific) y se procedió según lo establecido por el fabricante. Se utilizó una relación molar de vector e inserto 1:2 y como control para la autoligación se colocó el vector sin inserto.

4.9.2.5. Transformación

Las reacciones de ligación fueron empleados para transformar células de *E. coli* competentes, Para esto, se prepararon células electro-competentes de *E. coli* DH5 α λ pir siguiendo protocolos comúnmente utilizados en el laboratorio (Sambrook et al., 1989)

Para la transformación, se mezclaron 5 μ L de la reacción de ligación con 50 μ L de células competentes en celdas de electroporación de 1 mm (Thermo Scientific). Se empleó el programa Ec1 del electroporador MicroPulser de BIO-RAD. Luego del pulso eléctrico, se adicionó 1 mL de medio LB y las células se incubaron a 37 °C, en agitación durante 2 hs para su recuperación. El producto de transformación se esparció sobre placas con LB-Agar conteniendo Km₅₀, XGal (0.4 mg/mL) e IPTG (0.8 mg/mL) y se dejó incubando a 37 °C durante la noche junto con los siguientes controles; células competentes sin ADN y células con plásmido sin inserto. Las colonias blancas resistentes a kanamicina obtenidas fueron repicadas y utilizadas para recuperar los plásmidos resultantes.

4.9.2.6. Extracción de ADN plasmídico y secuenciación del inserto

Para comprobar que la ligación fue correcta y que el inserto se encontraba en el plásmido, se realizó *miniprep* del vector y se volvió a realizar la digestión enzimática. Para la extracción de ADN plasmídico, las células se crecieron en 5 mL de LB- Km50 a 37 °C durante toda la noche. Se utilizó el kit comercial PureLink Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen #K210011) y se siguieron las indicaciones del fabricante.

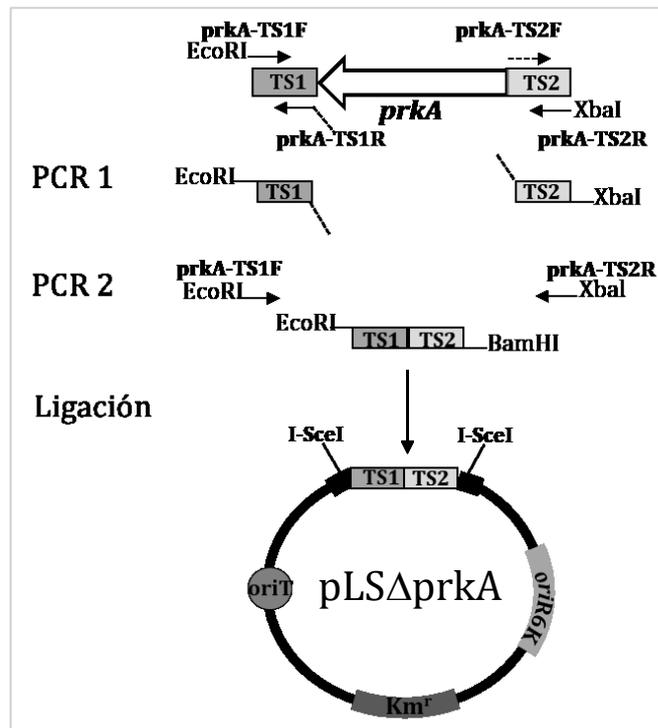


Figura 15. Esquema del proceso de construcción del plásmido mutagénico pLSΔprkA. Se realizan dos PCRs independientes de las zonas flanqueantes al gen utilizando de molde ADN genómico de *Cupriavidus* sp. UYMMa02A (PCR 1). Se denomina TS1 a las 500 pb ubicadas corriente arriba del gen *prkA* hasta el codón de inicio y TS2 a los nucleótidos que van desde el primero luego del codón *stop* hasta 500 pb corriente abajo. Los productos de PCR TS1 y TS2 se fusionan por PCR en la PCR 2 que incluye solamente los cebadores TS1-F y TS2-R. Se obtiene como resultado un producto de PCR de 1000 pb que es digerido con EcoRI y XbaI y ligado al plásmido pEMG digerido con las mismas enzimas, generando el plásmido pLSΔprkA.

La calidad de los plásmidos se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % en TAE 1X y su concentración se cuantificó empleando el equipo NanoDrop1000 (Thermo Scientific). Se evidenció la presencia de los insertos mediante PCR con los cebadores adecuados (Tabla 6) y se procedió a la secuenciación de pLSΔnodD y pLSΔprkA en MacroGen Inc. (Corea) para corroborar la identidad de los fragmentos clonados.

4.9.3. Cointegración de pLSΔprkA y pLSΔnodD en el cromosoma de *Cupriavidus* sp. UYMMa02A

El siguiente paso consistió en integrar los plásmidos pLSΔprkA y pLSΔnodD en el cromosoma de la cepa *Cupriavidus* sp. UYMMa02A. Este proceso se realiza por

recombinación homóloga al someter a las bacterias a la presión del antibiótico ya que el plásmido no es capaz de replicarse en esta cepa (Figura 16). Para esto se utilizaron células de *Cupriavidus* sp. UYMMa02A electro competentes (Croci, 2020) y uno de los respectivos plásmidos. Se siguió el mismo método de electrotransformación detallado anteriormente y las bacterias transformadas fueron seleccionadas en medio LB Km₅₀ (marcador de incorporación del plásmido).

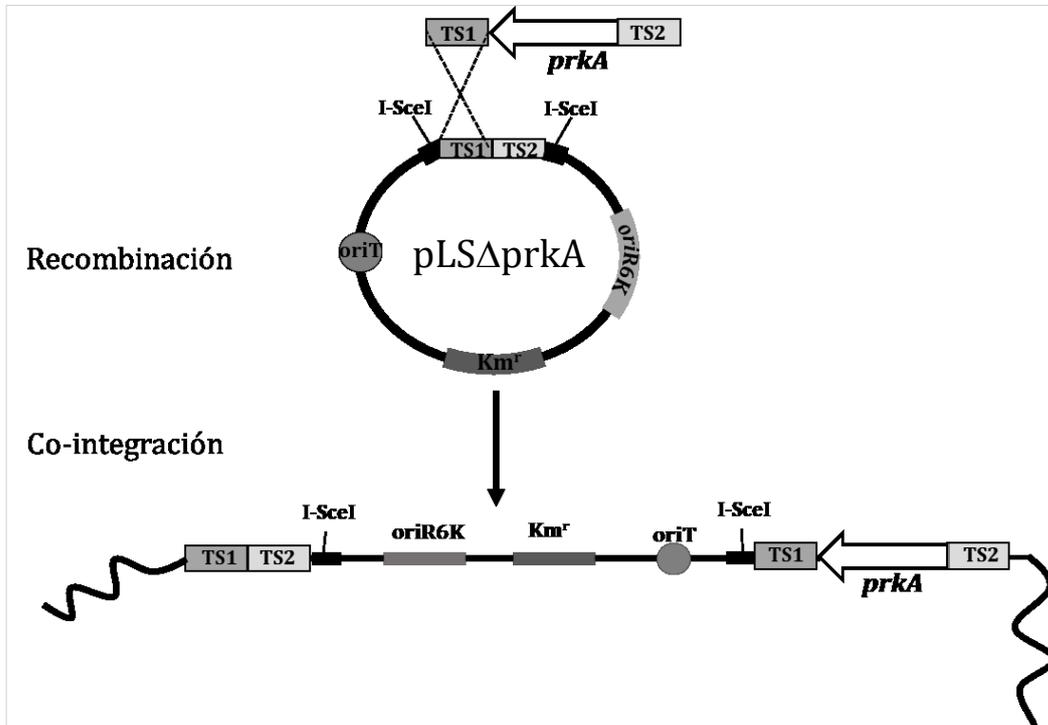


Figura 16. Co-integración de pLSΔprkA al genoma de *Cupriavidus* sp. UYMMa02A mediante recombinación homóloga. *Cupriavidus* sp. UYMMa02A es transformada con el plásmido pLSΔprkA, éste no puede replicarse en la cepa porque contiene el origen de replicación oriR6K. Se seleccionan con Km₅₀ las transformantes que adquirieron el plásmido por recombinación homóloga. La recombinación puede ocurrir en las regiones de homología de TS1 o TS2. La co-integración del plásmido se verifica por PCR.

La co-integración del plásmido pLSΔprkA/ pLSΔnodD al cromosoma se verificó por la capacidad de las transformantes de crecer en el medio de cultivo LB Km₅₀ y por PCR utilizando los cebadores TS1-F y TS2-R para cada gen (Tabla 6). Las condiciones de las PCR y la visualización de los amplicones fueron las mismas que las descritas en la sección 4.9.2.1. En este caso se esperan dos productos de amplificación, uno correspondiente al inserto y otro al gen salvaje. Como resultado se obtuvieron las cepas *Cupriavidus* sp. UYMMa02A:pLSΔprkA y *Cupriavidus* sp. UYMMa02A:pLSΔnodD.

4.9.4. Resolución del cointegrado

Este paso implica la transformación de la cepa con un plásmido inducible que codifica para la nucleasa I-SceI bajo el control de un promotor inducible *meta* (Pm). Pm es activado por la proteína XylS en presencia del inductor 3-metil benzoato (3MB). Consecuentemente, en presencia del inductor, la nucleasa se expresa y genera los cortes en sitios específicos de la doble hebra. Esto induce los mecanismos

de reparación del ADN en la doble hebra causando la resolución del cointegrado observándose como colonias Km sensibles, donde son dos las opciones, que al recombinar la cepa revierte a salvaje o se genere una mutante sin el gen. Esto se determina por PCR (Figura 17).

4.9.4.1. Conjugación triparental

El siguiente paso en esta mutagénesis consistió en incorporar un plásmido inducible que contenga la secuencia de la enzima endonucleasa I-SceI mediante conjugación triparental. Se ensayaron 4 plásmidos distintos que codifican para la nucleasa. Se utilizó como cepa *helper* *E. coli* pRK600, como cepas donadoras *E. coli* DH5 α λ pir pSW-2, *E. coli* DH5 α λ pir pSEVA434-I-SceI, *E. coli* DH5 α λ pir pSEVA628S y *E. coli* DH5 α λ pir pACBSR, y cepas receptoras *Cupriavidus* UYMMa02A::pLS Δ prkA y *Cupriavidus* UYMMa02A::pLS Δ nodD. Para ello, se crecieron las cepas en medio LB líquido suplementado con los antibióticos necesarios (Tabla 1) durante toda la noche. Al día siguiente se hicieron diluciones 1/100 en medio LB sin antibiótico y se dejaron crecer por 3 h con agitación a 30 °C. Para la conjugación se cosecharon en un tubo eppendorf 200 μ L de una cepa donadora, 200 μ L de la cepa *helper* y 300 μ L de la cepa aceptora, agrupando una de cada tipo en todas las combinaciones posible. Los pellets resultantes se resuspendieron en 20 μ L de LB líquido y se colocaron en forma de gota en una placa de Petri con medio LB agar y se incubaron toda la noche en estufa a 30 °C. Al otro día, se tomó una ansada de la colonia resultante y se resuspendió en 500 μ L de medio LB líquido, de los cuales se sembraron 50 μ L con rastrillo en placas de LB suplementado con Km₅₀ y Nitrofurantoína (Nf₅₀). Éste último antibiótico permitió la contraselección de las colonias, ya que *Cupriavidus* sp. UYMMa02A es resistente, mientras que las cepas de *E. coli* son sensibles a este antibiótico (Jenkins and Bennett, 1976; Sandes, 2015). Como control se sembraron en LB en forma de gota cada una de las cepas por separado para confirmar su correcto crecimiento y en LB Km₅₀ Nf₅₀ para corroborar que las cepas que no recibieron plásmidos eran sensibles.

La presencia de los plásmidos inducibles en las cepas receptoras se confirmó mediante PCR empleando los cebadores adecuados (Tabla 6).

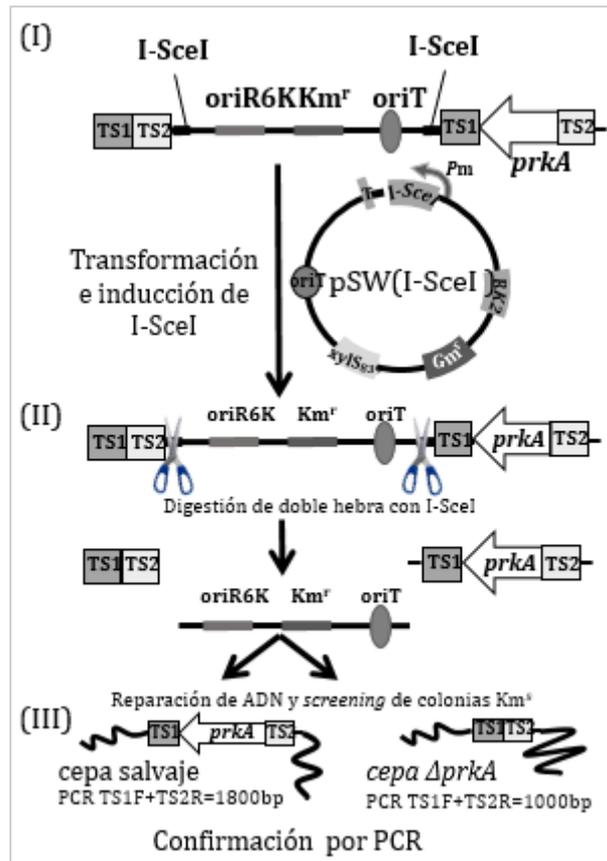


Figura 17. Resolución de los cointegrados. Esquema de la transformación de la cepa con el plásmido inducible pSW-2 (I) y la inducción de la expresión de la nucleasa I-SceI que reconoce y corta en las secuencias blanco específicas, provocando un doble corte en la cadena de ADN y la inducción de los mecanismos de reparación que llevan a la resolución del cointegrado (II). Por último, se muestra las dos resoluciones posibles luego de la reparación del ADN; recuperándose el genotipo salvaje o una cepa mutante que ya no tiene el gen (cepa $\Delta prkA$) (III).

Como resultado se obtuvieron una serie de cepas que tienen el cointegrado y distintos plásmidos que codifican para la nucleasa I-SceI bajo el control de distintos promotores (Tabla 1)

En la Tabla 7 se listan los inductores, sus concentraciones y los tiempos ensayados para lograr la expresión de la nucleasa y la resolución de los co-integrados.

Para todos los casos se realizaron cultivos primarios en 5 mL de LB conteniendo los antibióticos adecuados los cuales fueron crecidos toda la noche a 30 °C con agitación. Al día siguiente se realizaron repiques en medio LB fresco, sin antibiótico con el agregado de los distintos inductores. A los tiempos indicados, se realizaron diluciones seriadas de los cultivos inducidos y se sembraron aproximadamente 1×10^3 ufc/mL en placas con medio LB agar mediante rastrillado y se incubaron a 30 °C durante toda la noche. Para la recuperación de los clones que hubieran resuelto el co-integrado, se seleccionaron las colonias sensibles a la Km. Para esto, las colonias obtenidas se repicaron ordenadamente a placas de petri con medio LB y LB-Km₅₀.

Las colonias sensibles pueden tener un genotipo salvaje o mutante (Figura 17), para averiguarlo se realizó la amplificación por PCR mencionada en la sección 4.9.2.1.

Tabla 7. Condiciones de inducción para plásmidos con sistema I-SecI

| Plásmido | Inductor | Tiempo de inducción |
|-----------------|------------------|------------------------|
| pSW-2 | 3MB 2 mM | 4hs, 1 y 2 días |
| | 3MB 5 mM | 1 día |
| pSEVA434-I-SecI | IPTG 0,5 mM | 4hs, 1, 2 y 5 días |
| | IPTG 1 mM | 1 día |
| pACBSR | Arabinosa 100 mM | 4hs, 1, 2 y 5 días |
| | Arabinosa 100 mM | 1 día |
| pSEVA628S | 3MB 2mM | 4hs, 1, 2, 5 y 10 días |
| | 3MB 5 mM | 1 día |

5. RESULTADOS

5.1. Expresión global de proteínas de *Cupriavidus sp.* UYMMAa02A

5.1.1. Optimización de un método para la obtención de extractos proteicos totales de *Cupriavidus*.

El primer paso para el análisis de la expresión global de proteínas fue ajustar un protocolo de alto rendimiento para la extracción de proteínas totales para el género *Cupriavidus*. En primer lugar, se evaluó la eficiencia para obtener extractos celulares mediante los protocolos de lisis mecánica usando la French press y el ultrasonido. Los extractos celulares obtenidos se compararon mediante SDS-PAGE (Figura 18). Los dos métodos permitieron obtener de cantidades suficientes de proteínas, aunque los perfiles proteicos obtenidos mediante el uso del sonicador presentaron un patrón de bandas más definidas y uniformes. Además, el sonicador nos permite trabajar con volúmenes pequeños de muestra, y es por estas razones que este método de lisis fue el elegido para este trabajo.

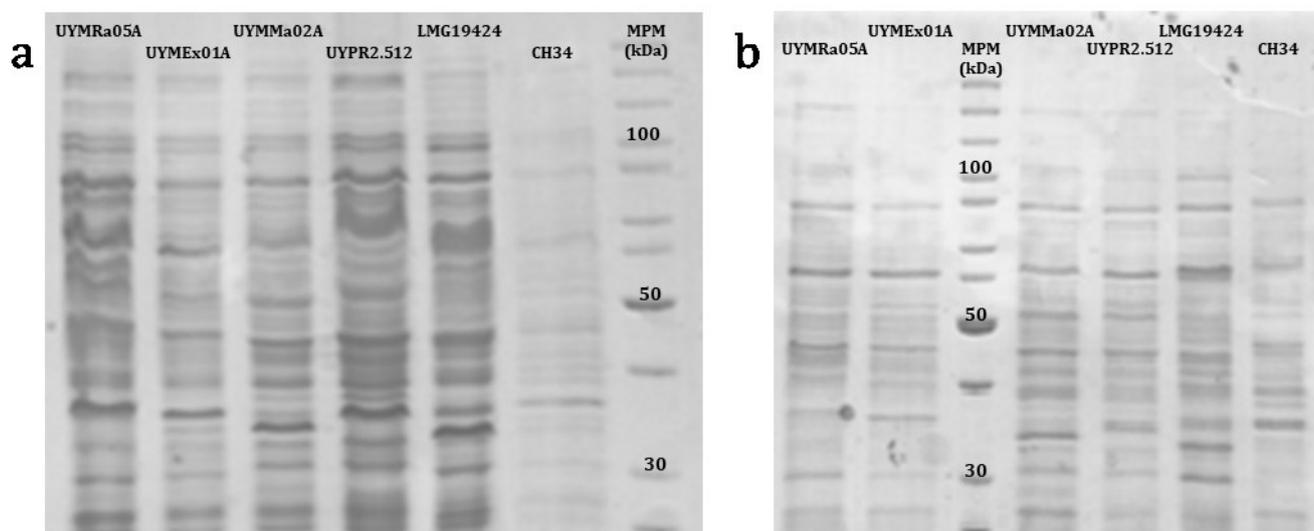


Figura 18. Electroforesis SDS-PAGE de proteínas totales empleando diferentes métodos de lisis celular. Electroforesis SDS-PAGE de proteínas totales de diferentes cepas y especies pertenecientes al género *Cupriavidus*, las primeras cuatro son parte de la colección del laboratorio y las dos últimas son cepas referencia, *C. taiwanensis* LMG19424 y *C. metallidurnas* CH34. Marcador de peso molecular Thermo Scientific, Page Ruler Unstained Protein Ladder, #26614; A) obtenidas mediante French Press. B) obtenidas mediante el uso de sonicador.

El segundo paso fue seleccionar un tampón que permitiera obtener la mayor cantidad de proteínas en forma soluble. Para esto, se compararon los extractos obtenidos empleando un tampón fisiológico (PBS), PBS con detergente CHAPS (PSB+CHAPS) y un tampón conteniendo Urea y Tiourea (UT) (Figura 19). Al usar PBS o PBS+CHAPS se recuperó aproximadamente la misma cantidad de proteínas y

no se encontraron diferencias en el perfil de bandas obtenidas. Sin embargo, al emplear el tampón de extracción desnaturalizante conteniendo Urea-Tiourea, no se observaron bandas definidas en el gel de acrilamida, indicando una menor eficiencia de recuperación de proteínas en estas condiciones, por lo que se descartó su uso.

En consecuencia, decidimos emplear el tampón más sencillo, PBS, para el resto de los experimentos de extracción proteica.

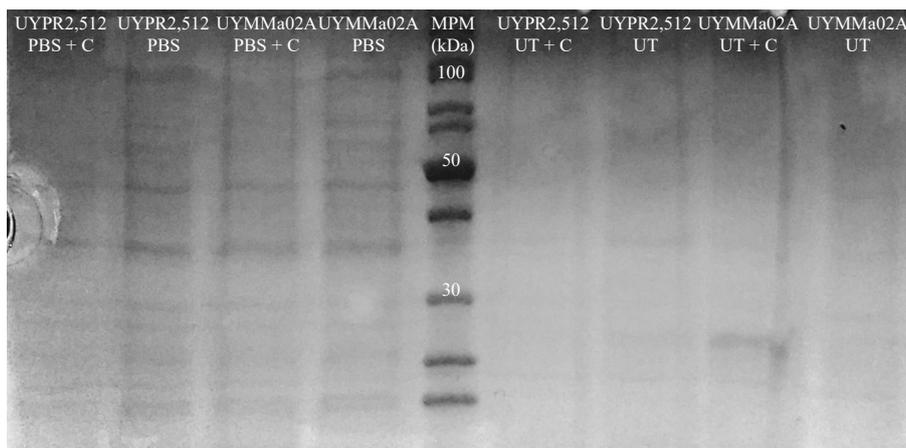


Figura 19. Electroforesis SDS-PAGE de proteínas totales empleando distintas soluciones tampón. Electroforesis SDS-PAGE de extractos celulares de diferentes cepas pertenecientes al género *Cupriavidus* obtenidas por sonicado y presencia de distintas soluciones tampón. Marcador de peso molecular Thermo Scientific, Page Ruler Unstained Protein Ladder, #26614. UT: Urea-Tiourea; C: CHAPS; PBS: Tampón fosfato salino (siglas en inglés).

Una vez seleccionado el método de extracción y el tampón a emplear, se determinó la concentración proteica de los extractos obtenidos. Se determinó que a partir de 1 mL de cultivo de *Cupriavidus* sp. UYMMa02A con una DO_{600nm} de 1, se obtiene aproximadamente 1 mg de proteína total. Complementariamente, se optimizó la cantidad de muestra óptima para una electroforesis en una dimensión. Se estableció que con 60 μ g de proteína total por pocillo se consigue una buena visualización del perfil de proteínas totales al teñir con Azul de Coomasie.

5.2. Crecimiento de *Cupriavidus* sp. UYMMa02A en distintas condiciones de cultivo

Para evaluar el efecto de la disponibilidad de nutrientes y estimulantes en el desarrollo de *Cupriavidus* sp. UYMMa02A, se realizaron curvas de crecimiento de la cepa de estudio en las condiciones en las que se quería evaluar la expresión proteica; (I) Concentraciones decrecientes de nitrógeno, (II) Presencia de los flavonoides luteolina y apigenina y (III) Medio de cultivo vegetal Howieson suplementado con compuestos nitrogenados y carbonados.

Se observó que *Cupriavidus* sp. UYMMa02A fue capaz de crecer en todas las condiciones ensayadas, excepto en medio mínimo M9 sin ninguna fuente de nitrógeno. El agregado de concentraciones crecientes de nitrógeno estimuló el crecimiento bacteriano, el cual alcanzó su máximo a la mayor concentración de nitrógeno ensayada (20 mM). En base a estos resultados, se seleccionó una concentración de amonio 1 mM (correspondiente a 1/20 la dosis normal utilizada) para simular una condición de limitación de nitrógeno. A esta concentración de nitrógeno, *Cupriavidus* sp. UYMMa02A alcanza el 62 % del crecimiento logrado en el mismo período de tiempo en un medio completo (M9 normal).

En cuanto a las células que crecieron en presencia de flavonoides, se vio un leve aumento en la DO alcanzada en comparación con el medio M9 normal, mayor aún para el tratamiento de M9 suplementado con luteolina (Figura 20). Esto sugiere que en las condiciones ensayadas, el agregado de estos compuestos afecta positivamente el crecimiento bacteriano.

Por otro lado, se demostró que el medio Howieson (normalmente utilizado para crecer plantas (Howieson et al., 1993)), permite el desarrollo normal de *Cupriavidus* sp. UYMMa02A cuando es suplementado con fuentes de carbono y nitrógeno, observándose justamente en este medio el mayor crecimiento bacteriano.

Cabe destacar que las medidas graficadas se tomaron utilizando un colorímetro y por lo tanto no son comparables, pero si extrapolables, con las obtenidas por espectrofotómetro.

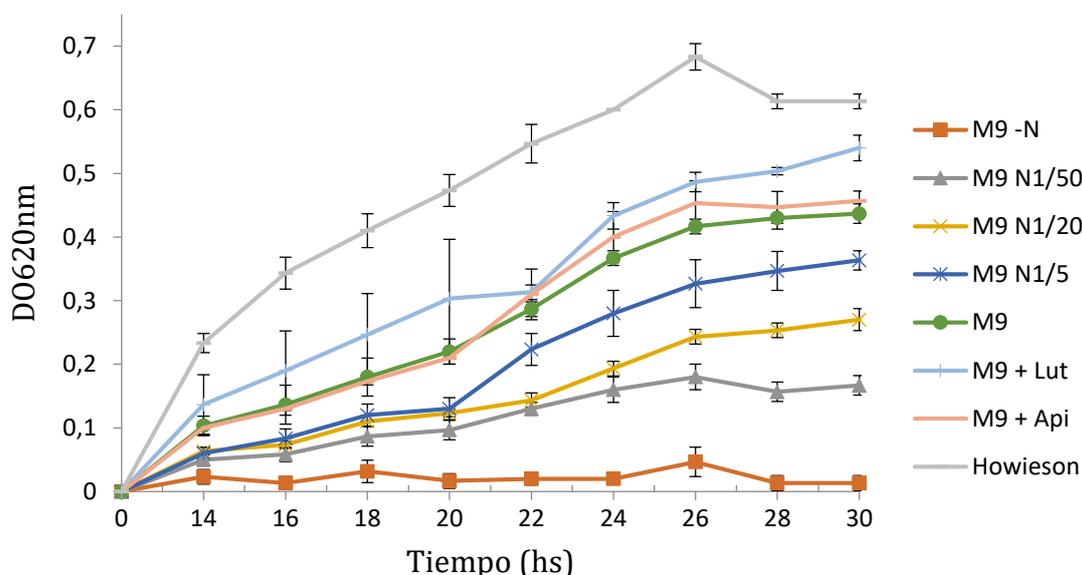


Figura 20. Curvas de crecimiento de la cepa *Cupriavidus* sp. UYMMa02A bajo distintas condiciones de cultivo. Se graficó la DO_{620nm} en función del tiempo. Las medidas de DO_{620nm} se efectuaron cada dos horas hasta las 30 h de cultivo.

5.3. Análisis de la expresión diferencial de proteínas en respuesta a variantes nutricionales

5.3.1. Efecto de la disponibilidad del Nitrógeno

La disponibilidad de nitrógeno es una de las señales que modula el establecimiento de relaciones simbióticas entre rizobios y leguminosas. Por ende, conocer la respuesta de la bacteria a la falta de este elemento podría darnos pautas sobre las adaptaciones metabólicas que ocurren durante la interacción simbiótica. De acuerdo con los resultados anteriores, se prepararon extractos celulares a partir de cultivos bacterianos crecidos en suficiencia de nitrógeno (M9 con cantidades normales de nitrógeno) y en condiciones de deficiencia de nitrógeno (M9 con 1/20 de nitrógeno). Las proteínas obtenidas fueron cuantificadas (Tabla 8), marcadas con distintos fluoróforos, y analizadas mediante 2D-DIGE. Para este análisis se utilizaron 3 réplicas independientes de cada condición.

Tabla 8. Concentración de proteínas de *Cupriavidus* sp. UYMMa02A determinada mediante Bradford para ensayo de disponibilidad de nitrógeno.

| Condición | Concentración ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) |
|-----------------------|---|
| N ₁ | 2,2 |
| N ₂ | 2,5 |
| N ₃ | 3,5 |
| N ₁ (1/20) | 1,2 |
| N ₂ (1/20) | 2,0 |
| N ₃ (1/20) | 2,3 |

El análisis de imágenes obtenidas del 2D-DIGE permitió detectar 471 *spots*, de los cuales 38 tuvieron una expresión diferencial. Considerando que el genoma de *Cupriavidus* sp. UYMMa02A codifica para unas 8200 proteínas hipotéticas (Iriarte et al., 2016), este análisis permitió visualizar entre un 5 y un 6 % del total de proteínas potenciales. De los 38 *spots* expresados diferencialmente, 14 se encontraban significativamente más expresados en la condición de déficit de nitrógeno que en suficiencia de nitrógeno (sobreexpresados), mientras que 24 se encontraban significativamente menos expresados en la condición de déficit de nitrógeno (sub expresados).

Del total de los *spots* con expresión diferencial, 31 tuvieron una intensidad suficiente para ser escindidos manualmente del gel luego de teñirlo con Coomassie. Los *spots* se analizaron por espectrometría de masa MALDI/TOF-TOF, lográndose identificar 9 de estos, correspondientes a 7 proteínas distintas, ya que 2 de ellas estaban presentes en más de un *spot*. La Tabla 9 resume las proteínas identificadas en cada

spot con su respectivo punto isoeléctrico, masa, categoría COG, mascot *score*, porcentaje de cobertura de secuencia, ubicación celular y los datos estadísticos. El mapeo en el genoma de *Cupriavidus* sp. UYMMA02A mostró que los genes que codifican para las 7 proteínas se encuentran en el cromosoma uno, el cual contiene la región más conservada (*core genome*) del genoma en bacterias con genomas multipartitos (Chain et al., 2006; Lykidis et al., 2010). De las proteínas sub expresadas sólo se identificó un transportador ABC de urea que contiene un PI de 9,1 y su locación es periplásmica. Contrariamente, todas las proteínas sobreexpresadas tienen un PI en el entorno de 5 y 5,7 y se localizan en el citoplasma. La mayoría de ellas (44 %) se vincula con el transporte y metabolismo de aminoácidos sugiriendo que, ante la falta de nitrógeno, la bacteria busca captar fuentes alternativas de nitrógeno y reciclar los aminoácidos disponibles. Del resto de proteínas sobreexpresadas, el 22 % están relacionadas con la conversión y producción de energía, 22 % con el transporte coenzimático y metabolismo, y solamente 1 proteína (11 %) está implicada en la modificación transcripcional de chaperonas (Tabla 9).

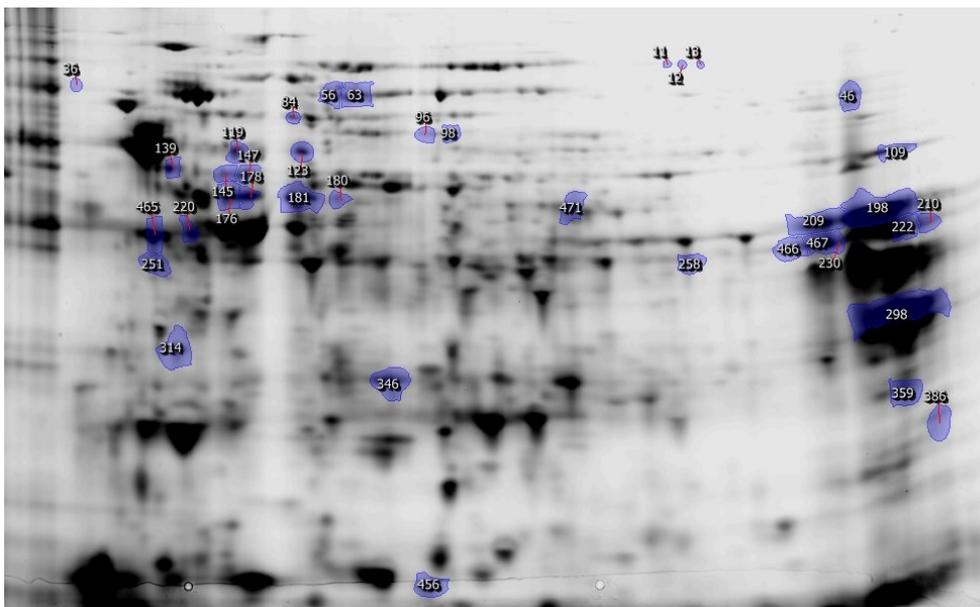


Figura 21. Mapa con la localización de los spots expresados diferencialmente. En la imagen se muestra uno de los geles 2D-DIGE correspondiente a proteínas de las bacterias crecidas con baja concentración de nitrógeno y su control. El gel obtenido fue escaneado y el software utilizado marca con azul y le asigna un número a los *spots* correspondientes a proteínas expresadas diferencialmente, lo cual se usa como mapa para la posterior escisión y análisis mediante MALDI-TOF.

Tabla 9. Características generales de las proteínas expresadas diferencialmente en respuesta a la disponibilidad de nitrógeno

| Nº de spot | Tasa de cambio | Prueba de Student (p-valor) | Mascot score ^a | Cobertura de secuencia (%) | PI | Masa (KDa) | Proteína identificada ^b | | Categoría COG ^c | Clasificación de enzimas | Ubicación celular ^d |
|----------------------------------|----------------|-----------------------------|---------------------------|----------------------------|------|------------|---|---|----------------------------|--------------------------|--------------------------------|
| | | | | | | | NCBI | Rast | | | |
| Proteínas sobreexpresadas | | | | | | | | | | | |
| 96 | 1,6 | 0,0004 | 106 | 30 | 5,74 | 69,5 | phosphomethylpyrimidine synthase ThiC | Phosphomethylpyrimidine synthase ThiC | H | EC 4.1.99.17 | Citoplásmática |
| 98 | 2,1 | 0,007 | 123 | 30 | 5,74 | 69,5 | phosphomethylpyrimidine synthase ThiC | Phosphomethylpyrimidine synthase ThiC | H | EC 4.1.99.17 | Citoplásmática |
| 139 | 2,3 | 0,004 | 134 | 23 | 5,2 | 50,6 | trigger factor | Cell division trigger factor | O | EC 5.2.1.8 | Citoplásmática |
| 147 | 1,3 | 0,009 | 101 | 26 | 5,3 | 55,6 | 2-isopropylmalate synthase | 2-isopropylmalate synthase | E | EC 2.3.3.13 | Citoplásmática |
| 176 | 1,3 | 0,034 | 98 | 36 | 5,3 | 47,1 | homoserine dehydrogenase | Homoserine dehydrogenase | E | EC 1.1.1.3 | Citoplásmática |
| 178 | 1,4 | 0,028 | 150 | 34 | 5,3 | 47,1 | homoserine dehydrogenase | Homoserine dehydrogenase | E | EC 1.1.1.3 | Citoplásmática |
| 181 | 1,4 | 0,007 | 151 | 37 | 5,7 | 43,1 | dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase | Dihydrolipoamide succinyltransferase component (E2) of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex | C | EC 2.3.1.61 | Citoplásmática / Periplásmica |
| 465 | 1,25 | 0,009 | 189 | 37 | 5 | 41,2 | succinate-CoA ligase subunit beta | Succinyl-CoA ligase [ADP-forming] beta chain | C | EC 6.2.1.5 | Citoplásmática |
| Proteínas sub expresadas | | | | | | | | | | | |
| 198 | 2,9 | 0,009 | 100 | 30 | 9,1 | 45,4 | Urea ABC transporter, urea binding protein | Urea ABC transporter, substrate binding protein UrtA | E | - | Periplásmica |

^aLos score de Mascot fueron estadísticamente significativos (p<0,05). ^bLas proteínas se buscaron en la base de datos del NCBI y utilizando como base el genoma de *Cupriavidus* sp. UYMMa02A depositado en Rast. ^cCategorías COG: C-conversión y producción de energía; E-transporte y metabolismo de aminoácidos; O-modificación postraduccional, chaperonas; H-transporte coenzimático y metabolismo. ^dLos resultados provienen de Cello.

5.3.2. Búsqueda de proteínas de *Cupriavidus* sp. UYMMa02A afectadas por la presencia de flavonoides

Como segunda aproximación para estudiar las adaptaciones de *Cupriavidus* sp. UYMMa02A durante los primeros pasos de la interacción simbiótica, se decidió analizar los cambios a nivel del proteoma provocados por los flavonoides luteolina y apigenina. Ambos flavonoides son capaces de activar la expresión de genes *nod* y la síntesis y excreción de factores Nod en *C. taiwanensis* (Amadou et al., 2008; Marchetti et al., 2010). Para este análisis se utilizaron 4 réplicas por tratamiento; creciendo nuestra bacteria en medio M9 sin flavonoides (C), en M9 en presencia de luteolina (L) y M9 con apigenina (A). Las concentraciones proteicas de cada uno de los extractos obtenidos se detallan en la siguiente tabla (Tabla 10). Luego de la cuantificación, se marcaron los tratamientos con los distintos fluoróforos según Tabla 4 y se analizaron mediante 2D-DIGE.

Tabla 10. Concentración de proteínas de *Cupriavidus* sp. UYMMa02A determinada mediante Bradford para ensayo con flavonoides comerciales.

| Condición | Concentración (µg/µL) |
|----------------|-----------------------|
| C ₁ | 4,6 |
| C ₂ | 4,4 |
| C ₃ | 5,2 |
| C ₄ | 5,2 |
| L ₁ | 4,5 |
| L ₂ | 9,2 |
| L ₃ | 7,8 |
| L ₄ | 8,1 |
| A ₁ | 6,0 |
| A ₂ | 8,7 |
| A ₃ | 6,4 |
| A ₄ | 7,1 |

C: Tratamiento control; L: Tratamiento con luteolina; A: Tratamiento con apigenina.

En este experimento se visualizaron un total de 373 *spots*, correspondientes a un 4,5% del total de proteínas potenciales considerando que cada *spot* corresponde a una única proteína, lo cual no siempre es cierto.

En este caso se consideraron como *spots* diferenciales los que presentaron hasta un p-valor de 0,1. Los resultados se analizaron enfrentando las tres condiciones dando como resultado un total de 22 *spots* con expresión diferencial, de los cuales 8 se sobreexpresaron en presencia de luteolina, 8 con apigenina y 6 en el tratamiento

control. Luego de teñir los geles con Coomassie se logró escindir la totalidad de los *spots* para finalmente identificar 12 proteínas mediante MALDI-TOF (Tablas 11 y 12).

Las proteínas Tricarboxylate transport protein TctC y dihydrolipoyltranssuccinase fueron las únicas proteínas básicas identificadas, con un punto isoeléctrico (PI) alrededor de 9; en cambio el resto tiene un PI que oscila entre 5 y 7. Todas las proteínas identificadas se localizan en el citoplasma, excepto TctC que tiene ubicación periplásmica. Un 33,3 % están relacionadas a la conversión y producción de energía y un 25 % se vincula con el transporte y metabolismo de aminoácidos según las categorías COG, las demás se vinculan con una variedad de funciones (Figura 22). Todos los genes que codifican para las proteínas identificadas se encuentran codificadas en el cromosoma uno, a excepción de la aminotransferasa de aá de cadena ramificada (sobreexpresada en el tratamiento con apigenina) y la aldehído deshidrogenasa (sobreexpresada en el tratamiento con luteolina), que se encuentran en el cromosoma dos. Curiosamente no se identificaron proteínas codificadas por el megaplásmido que contiene la isla simbiótica con los genes *nod/nif*.

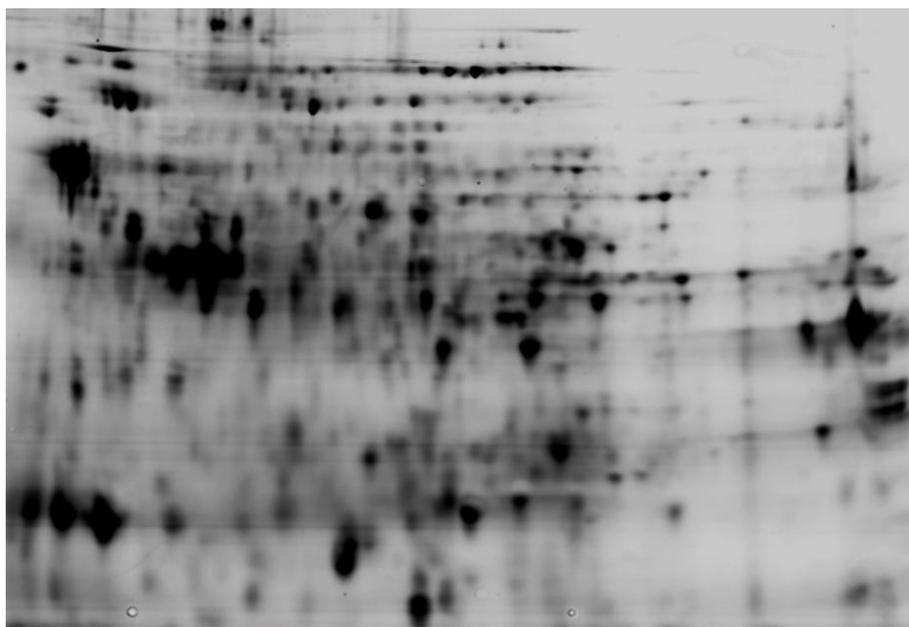


Figura 22. Análisis por 2D-DIGE de los extractos proteicos de *Cupriavidus* sp. UYMMa02A al suplementar el medio de cultivo con flavonoides sintéticos. Imagen representativa de gel 2D-DIGE correspondiente a proteínas de las bacterias suplementadas con apigenina y su control luego de su tinción con Coomassie.

Tabla 11. Características generales de las proteínas expresadas diferencialmente en presencia de apigenina

| Nº de spot | Tasa de cambio | Prueba de Student (p-valor) | Mascot score ^a | Cobertura de secuencia (%) | PI | Masa (KDa) | Proteína identificada ^b | | Categoría COG ^c | Clasificación de enzimas | Ubicación celular ^d |
|--|----------------|-----------------------------|---------------------------|----------------------------|-----|------------|--|---|----------------------------|--------------------------|--------------------------------|
| | | | | | | | NCBI | Rast | | | |
| Proteínas sobreexpresadas en presencia de apigenina | | | | | | | | | | | |
| 103 | 1,5 | 0,019 | 163 | 18 | 5,5 | 60,8 | aspartate 4-decarboxylase* | L-aspartate-beta-decarboxylase | E | - | Citoplásmática |
| 224 | 1,5 | 0,052 | 157 | 33 | 5,9 | 39,4 | branched chain amino acid aminotransferase | Branched-chain amino acid aminotransferase | E | EC 2.6.1.42 | Citoplásmática |
| 272 | 1,4 | 0,027 | 185 | 38 | 5,8 | 27,9 | enoyl-CoA hydratase | Enoyl-CoA hydratase | I | EC 4.2.1.17 | Citoplásmática |
| 257 | 1,5 | 0,004 | 157 | 16 | 9,6 | 33,4 | C4-dicarboxylate ABC transporter substrate-binding protein | Tricarboxylate transport protein TctC | C | - | Periplásmica |
| Proteínas subexpresadas en presencia de apigenina | | | | | | | | | | | |
| 155 | 1,4 | 0,002 | 143 | 36 | 9 | 32,1 | dihydrolipoyltranssuccinase (fragment)* | Dihydrolipoamide succinyltransferase component (E2) of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex | C | EC 2.3.1.61 | Citoplásmática |
| 171 | 1,5 | 0,082 | 95 | 12 | 6,4 | 45 | serine hydroxymethyltransferase* | Serine hydroxymethyltransferase | E | EC 2.1.2.1 | Citoplásmática |

Tabla 12. Características generales de las proteínas expresadas diferencialmente en presencia de luteolina

| Nº de spot | Tasa de cambio | Prueba de Student (p-valor) | Mascot score ^a | Cobertura de secuencia (%) | PI | Masa (KDa) | Proteína identificada ^b | | Categoría COG ^c | Clasificación de enzimas | Ubicación celular ^d |
|--|----------------|-----------------------------|---------------------------|----------------------------|----|------------|--|---|----------------------------|--------------------------|--------------------------------|
| | | | | | | | NCBI | Rast | | | |
| Proteínas sobreexpresadas en presencia de luteolina | | | | | | | | | | | |
| 103 | 1,5 | 0,050 | 163 | 18 | 6 | 60,8 | aspartate 4-decarboxylase* | L-aspartate-beta-decarboxylase | E | - | Citoplásmática |
| 317 | 1,4 | 0,021 | 94 | 44 | 6 | 18,2 | DNA starvation/stationary phase protection protein | Non-specific DNA-binding protein Dps / Iron-binding ferritin-like antioxidant protein / Ferroxidase | P | EC 1.16.3.1 | Citoplásmática |
| 335 | 3,4 | 0,001 | 239 | 33 | 6 | 55 | aldehyde dehydrogenase | aldehyde dehydrogenase | C | EC 1.2.1.3 | Citoplásmática |
| Proteínas subexpresadas en presencia de luteolina | | | | | | | | | | | |
| 131 | 1,6 | 0,080 | 459 | 42 | 5 | 57,3 | molecular chaperone GroEL | GroEL | O | - | Citoplásmática |
| 155 | 1,3 | 0,064 | 143 | 36 | 9 | 32,1 | dihydrolipoyltranssuccinase (fragment)* | Dihydrolipoamide succinyltransferase component (E2) of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex | C | EC 2.3.1.61 | Citoplásmática |
| 171 | 1,5 | 0,105 | 95 | 12 | 6 | 45 | serine hydroxymethyltransferase* | Serine hydroxymethyltransferase | E | EC 2.1.2.1 | Citoplásmática |

^aLos score de Mascot fueron estadísticamente significativos ($p < 0,1$). ^bLas proteínas se buscaron en la base de datos del NCBI y utilizando como base el genoma de *Cupriaavidus* sp. UYMMa02A depositado en Rast. ^cCategorías COG: C-conversión y producción de energía; E-transporte y metabolismo de aminoácidos; I-metabolismo y transporte de lípidos; P-metabolismo y transporte de iones inorgánicos; F-metabolismo y transporte de nucleótidos; O-modificación postraduccional, chaperonas; J-transducción, estructura ribosomal y biogénesis. ^dLos resultados provienen de Cello. *Proteínas que se identificaron en más de una condición.

5.3.3. Evaluación de la interacción planta - microorganismo en un sistema de co-cultivo

La tercera aproximación empleada para responder la principal pregunta que nos planteamos, fue estudiar la respuesta de la bacteria durante su interacción con una planta hospedera. Para esto se realizaron ensayos de co-cultivo en el que la bacteria fue incubada en el mismo medio que la planta, permitiendo el intercambio de señales, pero sin dejar que exista un contacto directo entre los simbios. Como control, las bacterias se mantuvieron en las mismas condiciones, pero sin plantas (Figura 14). Las concentraciones de los extractos proteicos obtenidos se muestran en la Tabla 13.

Tabla 13. Concentración de proteínas de *Cupriavidus* sp. UYMMa02A determinada mediante Bradford para ensayo de interacción planta - bacteria.

| Condición | Concentración (µg/µL) |
|-----------|-----------------------|
| C1 | 1,2 |
| C2 | 0,6 |
| C3 | 0,7 |
| CC1 | 0,9 |
| CC2 | 1,5 |
| CC3 | 1,0 |

C: Control sin planta. CC: co-cultivo planta-bacteria

Luego de analizar las imágenes se observaron 674 *spots*, de los cuales 37 (5,4 %) mostraron expresión diferencial (Figura 23). Veintiséis proteínas se encontraban sobreexpresadas mientras que 11 de ellas estaban sub expresados o reprimidas. Una vez teñidos con Coomassie se lograron escindir y analizar 24 *spots* y finalmente se identificaron 18 *spots*, correspondientes a 17 proteínas distintas. A continuación se muestra el listado de proteínas identificadas junto a sus características (Tabla 14), se observa que un 75 % de las proteínas tiene un PI en el entorno de 5 - 6. El metabolismo y transporte de carbohidratos (19 %) junto con la modificación postraducciona (19 %) son los principales mecanismos implicados. Particularmente en este ensayo se encontró solo 1 proteína implicada en el transporte y metabolismo de aminoácidos, aspartato 4-decarboxilasa, que contrariamente a lo ocurrido en el ensayo con inductores comerciales, se encuentra con expresión disminuida. Con respecto a la localización subcelular: 5 se pueden encontrar tanto en el citoplasma como fuera de la célula, 9 en el citoplasma, 3 se ubican en el periplasma, pero una también puede encontrarse en el citoplasma y por último se identificó una porina que se localiza en la membrana externa. Todos los genes que codifican para las proteínas que resultaron sub expresadas en este experimento se localizan en el cromosoma uno. Sin embargo, las sobreexpresadas están 9 en el cromosoma uno y 5 en el cromosoma dos. Cabe mencionar que dos de

las proteínas sobreexpresadas se identificaron con el mismo nombre - universal stress protein UspA – sin embargo, contienen una secuencia aminoacídica distinta.

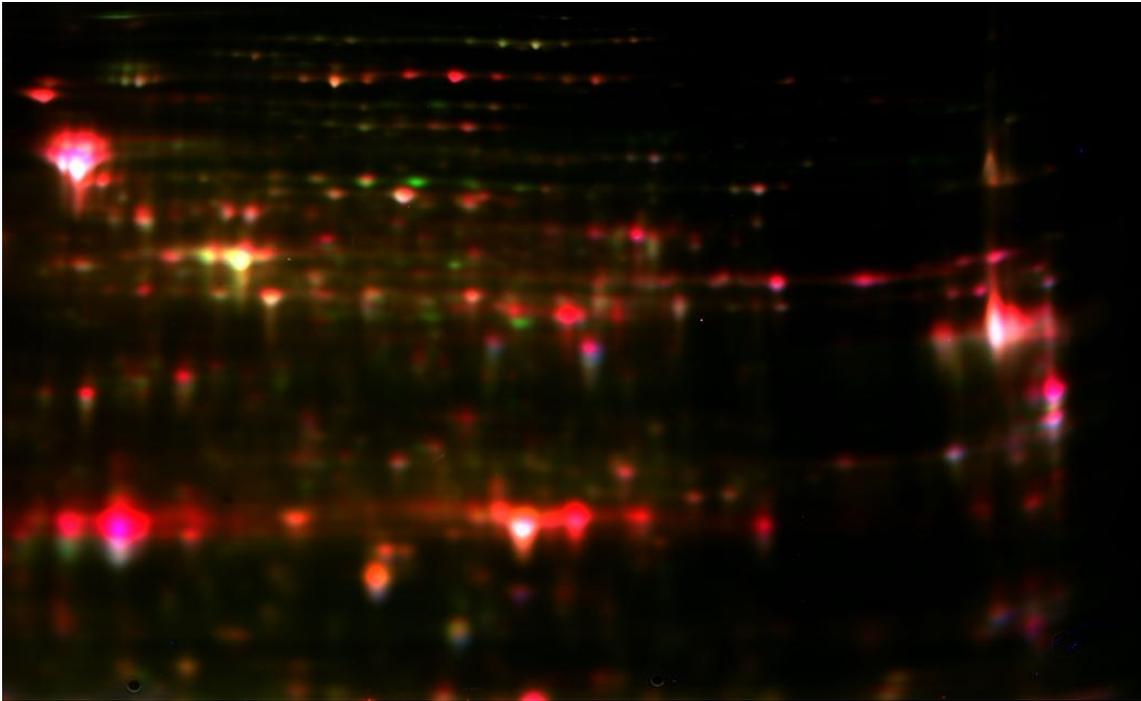


Figura 23. Análisis por 2D DIGE de los extractos proteicos de *Cupriavidus* sp. UYMMa02A posterior a su interacción con *M. pudica* y su control. La imagen muestra la superposición de los canales (Cy2, Cy3 y Cy5).

Tabla 14. Características generales de las proteínas bacterianas expresadas diferencialmente en presencia de la planta hospedera

| Nº de spot | Tasa de cambio | Prueba de Student (p-valor) | Mascot score ^a | Cobertura de secuencia (%) | PI | Masa (KDa) | Proteína identificada ^b | | Categoría COG ^c | Clasificación de enzimas | Ubicación celular ^d |
|--|----------------|-----------------------------|---------------------------|----------------------------|-----|------------|--|---|----------------------------|--------------------------|----------------------------------|
| | | | | | | | NCBI | Rast | | | |
| Proteínas sobreexpresadas en co-cultivo planta - bacteria | | | | | | | | | | | |
| 507 | 1,5 | 0,029 | 147 | 27 | 6,1 | 15,3 | nucleoside-diphosphate kinase | Nucleoside diphosphate kinase | F | EC 2.7.4.6 | Citoplasmática/ Extracelular |
| 629 | 1,8 | 0,036 | 181 | 40 | 9,3 | 32,1 | ABC transporter | ABC transporter, substrate-binding protein (cluster 2, ribose/xylose/arabinose/galactose) | G | - | Extracelular / Citoplasmática |
| 292 | 2,4 | 0,005 | 109 | 13 | 9 | 42,2 | membrane protein | Outer membrane protein (porin) | M | - | Membrana externa |
| 308 | 2,3 | 0,041 | 111 | 39 | 5,2 | 36 | pyruvate dehydrogenase subunit beta | Acetoin dehydrogenase E1 component beta-subunit | - | EC 2.3.1.190 | Citoplasmática |
| 357 | 1,2 | 0,026 | 348 | 28 | 5,6 | 27,5 | enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase | Enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase [NADH] | I | EC 1.3.1.9 | Citoplasmática / Periplásmica |
| 391 | 1,8 | 0,034 | 184 | 51 | 6,2 | 24,1 | peroxidase | Alkyl hydroperoxide reductase subunit C-like | O | - | Periplásmica |
| 499 | 1,5 | 0,035 | 74 | 12 | 5,9 | 16,2 | L-PSP family endoribonuclease | RidA/YER057c/UK114 superfamily, group 2, YoaB-like | J | - | Citoplasmática |
| 462 | 1,3 | 0,041 | 352 | 66 | 5,7 | 18,1 | cyclophilin | Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase PpiB | O | EC 5.2.1.8 | Citoplasmática |
| 199 | 1,5 | 0,004 | 251 | 37 | 6,2 | 43,3 | efflux transporter periplasmic adaptor subunit | Cobalt/zinc/cadmium efflux RND transporter, membrane fusion protein, CzcB family | P | - | Citoplasmática |
| 361 | 1,3 | 0,007 | 126 | 28 | 7 | 27,6 | enoyl-CoA hydratase | Enoyl-CoA hydratase | Q | EC 4.2.1.17 | Citoplasmática |
| 528 | 1,4 | 0,036 | 237 | 65 | 6,3 | 15,2 | universal stress protein UspA | Universal stress protein family | T | - | Extracelular / Citoplasmática |
| 512 | 1,3 | 0,002 | 156 | 18 | 5,2 | 15,8 | universal stress protein UspA | Universal stress protein family | T | - | Extracelular / Citoplasmática |
| 78 | 1,7 | 0,013 | 216 | 52 | 5,5 | 73,4 | serine protein kinase PrkA | Uncharacterized protein YeaG | T | - | Citoplasmática |
| 74 | 1,7 | 0,027 | 130 | 19 | 5,5 | 73,4 | serine protein kinase PrkA | Uncharacterized protein YeaG | T | - | Citoplasmática |
| Proteínas subexpresadas en co-cultivo planta - bacteria | | | | | | | | | | | |
| 106 | 1,3 | 0,030 | 163 | 18 | 5,5 | 60,8 | aspartate 4-decarboxylase | L-aspartate-beta-decarboxylase | E | - | Citoplasmática |
| 113 | 2,7 | 0,010 | 221 | 37 | 8,4 | 62,5 | PPQ-dependent dehydrogenase, methanol/ethanol family | Quino(hemo)protein alcohol dehydrogenase, PQQ-dependent | G | EC 1.1.99.8 | Periplásmica |
| 625 | 1,4 | 0,047 | 459 | 42 | 5,1 | 57,3 | molecular chaperone GroEL | GroEL | O | - | Citoplasmática |

^aLos score de Mascot fueron estadísticamente significativos (p<0,05). ^bLas proteínas se buscaron en la base de datos del NCBI y utilizando como base el genoma de *Cupriavidus* sp. UYMMa02A depositado en Rast. ^cCategorías COG: F-metabolismo y transporte de nucleótidos; G-metabolismo y transporte de carbohidratos; M-pared celular, membrana; I-metabolismo y transporte de lípidos; O-modificación postraduccional, chaperonas; J-transducción, estructura ribosomal y biogénesis P-metabolismo y transporte de iones inorgánicos; Q-biosíntesis de metabolitos secundarios, transporte y catabolismo; T-mecanismos de transducción de señal; E-transporte y metabolismo de aminoácidos. ^dLos resultados provienen de Cello.

5.4. Construcción de cepas mutantes de *Cupriavidus* sp. UYMMa02A

Los ensayos realizados permitieron identificar un interesante número de proteínas expresadas diferencialmente en condiciones cercanas a las esperadas durante los primeros pasos de la interacción simbiótica.

Se seleccionaron dos genes de la cepa para la construcción de mutantes y analizar su efecto en la simbiosis con plantas hospederas. Por un lado, se seleccionó al gen *nodD* que codifica para el regulador transcripcional NodD, una proteína de unión al ADN que se une a una región conservada denominada *nod box*, resultando en la activación de los genes que codifican para la síntesis y exportación de los factores de nodulación (Masson-Boivin et al., 2009). Si bien no se encontró este sistema expresado diferencialmente en las condiciones estudiadas, la importancia de los factores Nod en la mayoría de las relaciones simbióticas rizobio-leguminosa llevó a que se estudiara su relevancia en el modelo utilizado. Por otro lado se seleccionó al gen *prkA*, el cual codifica para una posible quinasa de serinas que se encontró sobreexpresada en condiciones de co-cultivo. Proteínas homólogas están muy conservadas en bacterias y archeas, sin embargo, su función en este modelo es aún desconocida. Las quinasas son capaces de fosforilar múltiples sustratos, regulando de esta forma la actividad de otras proteínas.

5.4.1. Construcción de los vectores pLSΔ*nodD* y pLSΔ*prkA*

Para la obtención de mutantes en los genes seleccionados se escogió el método desarrollado por Martínez y de Lorenzo, con el cual se introducen mutaciones dirigidas y que no dejan marcas en el genoma (Martínez-García, E & de Lorenzo, 2012). El primer paso fue obtener un fragmento que contuviera regiones de homología corriente arriba y corriente abajo al gen que queremos eliminar. Para esto, se amplificaron fragmentos de aproximadamente 500 pb de las regiones adyacentes corriente arriba (TS1) y corriente abajo (TS2) de los genes *nodD* y *prkA* (Figura 24 A y Figura 25 A). Ambos fragmentos se unieron mediante una segunda PCR, obteniéndose un único amplicón denominado TS1-TS2. Con respecto al gen *nodD* se obtuvo el fragmento del tamaño esperado (Figura 24 B). En cambio, para el caso del gen *prkA* se amplificaron además del fragmento TS1-TS2 de tamaño deseado (Figura 25 B), productos inespecíficos que por su tamaño podrían corresponder a TS1 o TS2, posiblemente como resultado de arrastre de los cebadores de la primer PCR. Por ende, se optó por recuperar el amplicón TS1-TS2 a partir de la banda correspondiente, la cual fue cortada y purificada a partir del gel de electroforesis. A continuación, los fragmentos TS1-TS2 se clonaron en el plásmido pEMG (Martínez-García, E & de Lorenzo, 2012) generándose los plásmidos denominados pLSΔ*nodD* y pLSΔ*prkA* (Figura 24, Figura 25, Tabla 2).

Tabla 15. Tamaño esperado para los amplicones involucrados en la mutagénesis dirigida de los genes *nodD* y *prkA*.

| Amplicón | Tamaño (pb) | Cebador F | Cebador R |
|---|-------------|--------------------------|--------------------------|
| Información referente a la delección del gen <i>nodD</i> | | | |
| gen <i>nodD</i> | 887 | | |
| TS1 | 600 | TS1F2- <i>nodD</i> -KpnI | TS1R2- <i>nodD</i> |
| TS2 | 600 | TS2F2- <i>nodD</i> | TS2R- <i>nodD</i> -BamHI |
| TS1TS2 | 1200 | TS1F2- <i>nodD</i> -KpnI | TS2R- <i>nodD</i> -BamHI |
| Información referente a la delección del gen <i>prkA</i> | | | |
| gen <i>prkA</i> | 1900 | | |
| TS1 | 525 | TS1F- <i>prkA</i> -EcoRI | TS1R- <i>prkA</i> |
| TS2 | 523 | TS2F1- <i>prkA</i> | TS2R- <i>prkA</i> -XbaI |
| TS1TS2 | 1048 | TS1F- <i>prkA</i> -EcoRI | TS2R- <i>prkA</i> -XbaI |

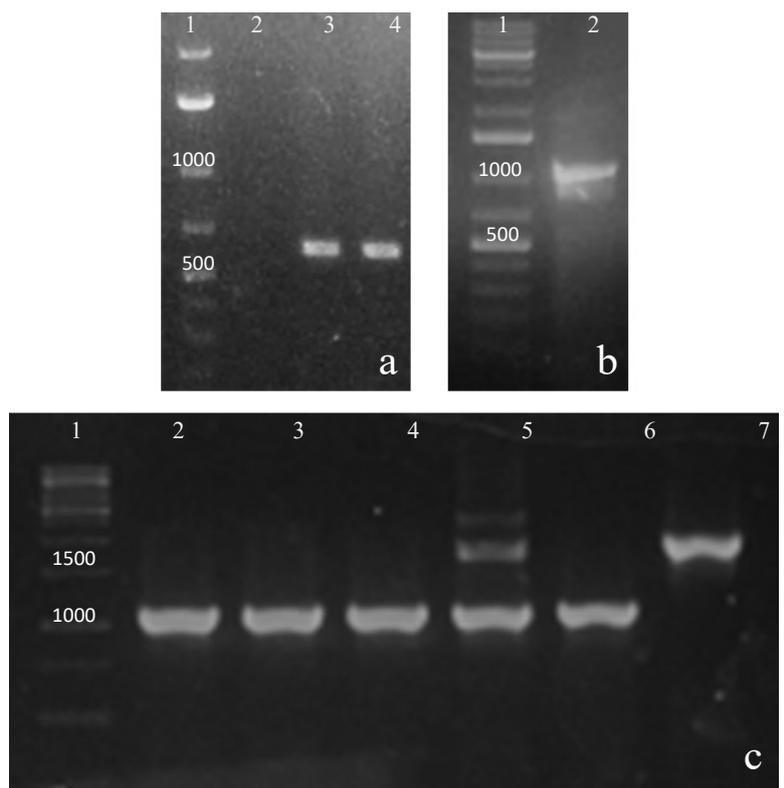


Figura 24. Electroforesis en gel de agarosa mostrando los pasos de la construcción de *Cupriavidus* sp. UYMMa02A Δ *nodD*. A) Producto de amplificación de las zonas adyacentes al gen *nodD* de aproximadamente 600 pb cada uno (TS1 y TS2). B) Producto de amplificación de la unión de las zonas adyacentes al gen *nodD* (TS1-TS2). C) carril 1: MPM; carril 2-4: clones de *Cupriavidus* sp. UYMMa02A Δ *nodD* (1200 pb); carril 5: Productos de amplificación de 1200 y 2000 pb correspondientes al co-integrado *Cupriavidus* sp. UYMMa02A:pLS Δ *nodD*; carril 6: *E. coli* DH5 α : pLS Δ *nodD* (1000 pb); carril 7: *Cupriavidus* sp. UYMMa02A (2000 pb).

Los plásmidos recuperados fueron digeridos con las mismas enzimas usadas para su clonado, mostrando que contenían insertos con el tamaño esperado (Figura 25 C). Luego se comprobó la identidad de los fragmentos y su correcta inserción en los plásmidos mediante el análisis de secuencia de los insertos presentes en los plásmidos pLS Δ nodD y pLS Δ prkA (datos no mostrados).

5.4.2. Cointegración de los vectores pLS Δ nodD y pLS Δ prkA en *Cupriavidus* sp. UYMMa02A

El segundo paso fue la incorporación de los plásmidos en el genoma de *Cupriavidus* sp. UYMMa02A. Los vectores pLS Δ nodD y pLS Δ prkA fueron transferidos mediante conjugación triparental a la cepa bacteriana. Las transconjugantes fueron seleccionadas en medio LB con Km. Debido a que los plásmidos transferidos no son replicables en *Cupriavidus* sp. UYMMa02A, la forma de obtener colonias resistentes a Km es que los plásmidos se integren al genoma de *Cupriavidus* sp. UYMMa02A. La forma más sencilla de que esto ocurra es mediante recombinación homóloga entre las zonas de homología TS1-TS2 incluidas en estos (Figura 16). La co-integración de los plásmidos se corroboró mediante PCR y visualización por gel de agarosa. Se observa que para el caso del gen *nodD*, se obtienen dos bandas de amplificación, por un lado, un fragmento de 1200 pb que corresponde al fragmento TS1-TS2 y por otro un fragmento de 2000 pb que se corresponde con el gen *nodD* (800pb) más las regiones adyacentes (TS1-*nodD*-TS2) (Figura 24 C). Con este resultado se confirmó que el vector pLS Δ nodD se incorporó al genoma bacteriano.

Para el caso del gen *prkA* no se logró amplificar los dos fragmentos esperados en una misma reacción. Para demostrar la co-integración se utilizó una estrategia alternativa empleando dos PCR independientes. En una de ellas se utilizaron los cebadores TS1F-prkA-EcoRI y TS2R-prkA-XbaI para amplificar el fragmento TS1-TS2 y en la otra se emplearon cebadores diseñados para amplificar el gen *prkA* completo (prkA-F-EcoRI y prkA-R-XbaI). Usando esta estrategia se observan los productos esperados de 1 y 2Kb respectivamente (Figura 25 D).

5.4.3. Resolución del co-integrado

La resolución de los co-integrados, evidenciada mediante la pérdida de la resistencia a Km, puede llevar a la obtención de las mutaciones deseadas. Para que esto ocurra debe actuar la nucleasa I-SceI, la cual genera un corte en el ADN que estimula el proceso de resolución. Con la finalidad de optimizar este proceso en *Cupriavidus* sp. UYMMa02A, las cepas portadoras de los co-integrados se electrotransformaron con cuatro plásmidos distintos capaces de expresar la endonucleasa I-SceI en presencia de distintos inductores (Tabla 7). Al emplear los plásmidos pSW-2, pSEVA434-ISceI y pACBSR, se recuperaron siempre colonias Km-resistentes, indicando que el proceso de resolución no ocurrió. Contrariamente, al utilizar el plásmido pSEVA628S, se obtuvieron colonias Km-sensibles para ambas cepas. Mediante la verificación por PCR, se visualizaron bandas únicas, pero del tamaño correspondiente al gen blanco completo, por lo que se infirió que la recombinación llevó a la recuperación de la configuración salvaje.

Finalmente, mediante repiques sucesivos de las cepas portadoras de pSEVA628S durante diez días consecutivos y en presencia del inductor 3-metil-benzoato, se obtuvieron clones Km-sensibles para ambas cepas. En este caso se logró identificar colonias que contenían la mutación buscada en el gen *nodD* ya que se obtuvo una única banda de 1000 pb. Estos resultados confirman la obtención de la cepa *Cupriavidus* sp. UYMMa02A Δ nodD (Figura 24 C).

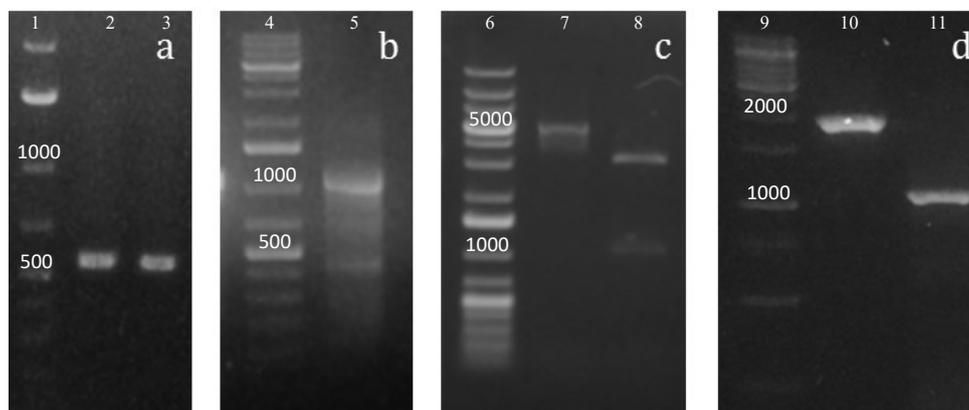


Figura 25. Electroforesis en gel de agarosa mostrando los pasos de la construcción de *Cupriavidus* sp. UYMMa02A Δ prkA. A) Producto de amplificación de las zonas adyacentes al gen *prkA* de aproximadamente 500 pb cada uno (TS1 y TS2). B) Producto de amplificación de la unión de las zonas adyacentes al gen *prkA* (TS1-TS2). C) Productos de amplificación con la verificación de las digestiones, el primer carril contiene un fragmento de 5000 pb que se corresponde con el plásmido pLS Δ prkA sin digerir y el siguiente carril muestra inserto (1000 pb) y plásmido digerido (3500 pb). D) Demostración de cepa co-integrada mediante dos pcrs independientes: productos de amplificación correspondientes al gen *prkA* completo (2000 pb) y a la unión TS1 y TS2 (1000 pb).

Resultados obtenidos por nuestro grupo de investigación indicaron que *Cupriavidus* sp. UYMMa02A Δ nodD no tiene el fenotipo esperado. Se realizaron ensayos de infección en plántulas de *M. pudica* que demostraron que luego de 30 días de inoculación no se observaron diferencias significativas respecto a la formación de nódulos entre las plantas inoculadas con la cepa salvaje y la mutante.

6. DISCUSIÓN

Las leguminosas tienen un gran valor a nivel ecosistémico ya que pueden utilizarse como alimento, como plantas forrajeras, abonos verdes o para la recuperación de ambientes degradados. Es así que conocer en profundidad los recursos naturales de nuestro país, tales como las leguminosas nativas y los rizobios asociados a ellos, es fundamental para su aprovechamiento en el diseño de sistemas productivos sustentables. Las leguminosas pertenecientes al género *Mimosa* tienen uno de sus principales centros de diversificación las regiones del Cerrado y Catinga en el centro y nordeste de Brasil, habiéndose descrito más de 300 especies para estas regiones, sin embargo su distribución también abarca las zonas subtropicales de Sudamérica y México (Simon et al., 2011). En este contexto, Uruguay es un sitio biogeográfico de sumo interés ya que es el hogar de cerca de 50 especies de *Mimosa* y es a su vez límite de distribución de muchas especies pertenecientes a este género (Izaguirre and Beyhaut, 2003b).

A su vez, en nuestro país existe escaso conocimiento sobre las características de las bacterias que tienen capacidad de asociarse simbióticamente con la mayoría de las leguminosas nativas. Estudios previos realizados en nuestro laboratorio han brindado aportes sumamente interesantes en lo que respecta al relevamiento de rizobios a nivel nacional, su caracterización y el estudio de su diversidad. Particularmente, en el marco de un estudio sobre rizobios asociados a la leguminosa arbórea *Parapiptadenia rigida*, en el año 2009, se encontraron rizobios pertenecientes a los géneros *Paraburkholderia* y *Cupriavidus*, abriendo una nueva etapa en la investigación del mutualismo entre estos microorganismos y sus plantas hospederas. Por esta razón, en los últimos años se decidió crear una colección de β -rizobios, mediante la prospección y recolección de nódulos a partir de poblaciones silvestres de diversas especies vegetales pertenecientes al clado mimosoide. Actualmente se cuenta con una colección compuesta por un centenar de rizobios pertenecientes a los géneros *Cupriavidus* y *Paraburkholderia* (Pereira-Gómez et al., 2020; Platero et al., 2016; Taulé et al., 2012).

Considerando la importancia que tienen los β -rizobios como simbioses de leguminosas nativas, en este trabajo se planteó ahondar en el estudio de los mecanismos involucrados en la interacción entre β -rizobios y sus plantas hospederas. El foco principal fue conocer las proteínas y vías metabólicas implicadas en los primeros pasos de la interacción entre rizobios pertenecientes al género *Cupriavidus* y leguminosas hospederas.

Para poder responder algunas de las preguntas que plantea este trabajo se decidió estudiar los cambios proteómicos que ocurren en la bacteria desde lo más simple, como es la respuesta del microsimbionte a la falta de nitrógeno o a la presencia de una molécula señal como lo son los flavonoides luteolina y apigenina; a lo más complejo como los cambios que ocurren durante la interacción planta – bacteria.

Se utilizó este enfoque debido a que las proteínas están implicadas en todos los aspectos de la célula, aportando dinamismo al sistema, y en comparación al genoma, brindan cierta flexibilidad que permite cambios dependientes de la célula propiamente y su entorno. A su vez, esto vuelve al proteoma más complejo para su estudio debido a las numerosas modificaciones postraduccionales que las proteínas pueden presentar. El uso de la proteómica para el estudio de la interacción planta - bacteria es un desafío y requiere adaptaciones específicas de todo el abordaje, incluido el diseño del ensayo, el muestreo y la preparación de muestras, además de la cuantificación, separación e identificación de proteínas. Sin embargo, el análisis del proteoma revela no solo la identidad de las proteínas que ya se sabía que estaban involucradas en cierto proceso, sino que también permite la caracterización de proteínas de función desconocida (Knief et al., 2011).

Obtención y cuantificación de extractos proteicos

Para realizar los análisis de proteómica es fundamental contar, como punto de partida, con un método reproducible que permita la obtención de extractos proteicos bacterianos de alta calidad. Para eso fue necesario poner a punto la extracción de proteínas de *Cupriavidus* basándose en la bibliografía y la experiencia previa de los integrantes del laboratorio. Se optimizó la extracción proteica utilizando ultrasonido y tampón PBS para la ruptura celular, lográndose un método sencillo, reproducible y aplicable a cantidades variables de muestra. Según bibliografía, se esperaba que el tampón conteniendo Urea y Tiourea (UT) tuviera mayor rendimiento de extracción, contrariamente a lo que mostraron los resultados (sección 4.3.2), donde se observó un aumento en el rendimiento de la extracción proteica cuando se empleó PBS como tampón. Sin embargo, también es posible que el método empleado para cuantificar proteínas en los extractos sea la causa de esto. En esta primera etapa, el método empleado fue la cuantificación de proteínas por absorbancia a 280 nm, la cual se basa en la absorción de los anillos aromáticos de los residuos de tirosina y el triptófano. Este es un método sencillo, práctico, automatizable y no destruye la muestra, pero posee la limitante de subestimar o sobreestimar la concentración de proteínas, ya que esta se encuentra sujeta al número de aminoácidos previamente mencionados presentes en la muestra (Fasman, 1990). Los extractos totales también pueden contener ácidos nucleicos (ARN y/o ADN) que absorben a esta longitud de onda, interfiriendo con la cuantificación, aunque esta situación fue descartada al realizarse electroforesis SDS-PAGE de las muestras tratadas o no con ADNasa, sin que se observaran diferencias en la intensidad de las bandas proteicas (resultados no mostrados). Otra posibilidad es que el tampón UT absorba a 280 nm, en bibliografía se encontró que la urea no absorbe a longitudes de onda mayores a 220 nm, en cambio no fue posible encontrar valores de absorción para la tiourea. Sea cual fuera la causa, se decidió adoptar el método de Bradford para la cuantificación proteica. Este es un método relativamente rápido y sencillo, que puede realizarse en placas de 96 pocillos, aunque tiene la desventaja de que es un ensayo destructivo por lo que se pierde la muestra.

Optimización de las condiciones de cultivo bacteriano

Una vez determinado el método para la obtención de los extractos y su cuantificación se decidió poner a punto las condiciones de crecimiento bacteriano para los ensayos de proteómica posteriores, se estudió el crecimiento de la cepa *Cupriavidus* sp. UYMMa02A bajo distintas condiciones de cultivo, con la intención de evaluar si el desarrollo de la bacteria ocurre satisfactoriamente y determinar la mínima concentración de nitrógeno con la cual esta logre desarrollarse teniendo la necesidad del nutriente. Se observó que en todos los tratamientos que hubo crecimiento, a las 14 h los cultivos ya se encontraban en fase exponencial. Para determinar exactamente cuándo comienza esta etapa es necesario realizar medidas previas a las 14 h. Si bien se podría esperar que al tratarse de una bacteria diazótrofa, esta creciera en un medio con ausencia de nitrógeno realizando FBN, esto no se pudo observar para las condiciones ensayadas. Tampoco es una característica usual en los β -rizobios, aunque se han encontrado algunas excepciones en el género *Paraburkholderia*, como *B. phymatum* que es capaz de crecer en vida libre en un medio de cultivo sin nitrógeno (Elliott et al., 2006). Cabe resaltar que las condiciones experimentales de agitación para la aireación de los cultivos podrían haber incorporado oxígeno suficiente al medio de cultivo como para inhibir al complejo nitrogenasa. Los resultados obtenidos permiten concluir que esta cepa cuenta con una gran capacidad de adaptación a las condiciones nutricionales del sistema, siempre que cuente con los nutrientes esenciales para sobrevivir. Como se observa en la Figura 20 el tratamiento sin nitrógeno no presenta multiplicación bacteriana, pero el crecimiento bacteriano se incrementa proporcionalmente al aumento de nitrógeno del medio.

Uso de la técnica 2D-DIGE

Actualmente, nos encontramos en el auge de “la era de las ómicas”, la proteómica en particular, permite observar directamente la presencia de proteínas, considerándose un avance frente a los estudios de transcriptómica que infieren los niveles proteicos en base a los niveles de expresión de los transcritos. Incluso, la proteómica permite analizar modificaciones postraduccionales, la localización subcelular de las proteínas, y la asignación de funciones a proteínas hipotéticas (Aebersold and Mann, 2016; Čuklina et al., 2016; Marx et al., 2016; Omasits et al., 2017; Stekhoven et al., 2014).

En este trabajo se utilizó la técnica de 2D-DIGE, una aproximación proteómica que permite la separación en dos dimensiones de los proteomas a ser comparados, en una única corrida electroforética, disminuyendo el número de geles a ser procesados, evaluados e interpretados. Una de las principales ventajas que posee esta técnica es que se realiza un *pool* con las muestras, por lo tanto, cualquier imprecisión en el método va a afectar a todas las proteínas de igual forma, aumentando la fiabilidad de la información obtenida. El 2D-DIGE obtiene como resultado final las imágenes de las señales emitidas por cada tratamiento. Esto permite que las mismas proteínas correspondientes a los distintos tratamientos migren conjuntamente a una misma posición (punto isoelectrico y peso molecular),

evadiendo así la variación entre geles y a su vez utilizando la intensidad de los *spots* individuales para el cálculo de abundancia de las proteínas. Uno de los canales de longitud de onda es reservado para el estándar interno que soporta el cálculo de la abundancia relativa de las proteínas y permite la comparación inter-geles de las réplicas. Por último, resaltar que esta técnica posee la habilidad de detectar modificaciones postraduccionales en las proteínas, que muchas veces juegan un rol importante en la modulación de las funciones de las proteínas (Diez et al., 2010; Westermeier and Scheibe, 2008). Dentro de las limitantes que posee el DIGE se encuentran: (i) la dependencia del gel, si bien el número disminuye sigue presente, (ii) los *spots* pueden estar compuestos por más de una proteína y no es posible contarlas en el análisis, (iii) subestima la tasa de cambio observada para las proteínas debido a la señal de fondo presente en los geles (iv) para la identificación de proteínas es necesario la tinción con azul de Commassie y extraer manualmente los *spots* diferenciales conllevando a la obtención de artefactos y la contaminación por queratina (Tannu and Hemby, 2007).

Respuesta de *Cupriavidus* sp. UYMMa02A a la baja disponibilidad de N

Como se mencionó anteriormente, el nitrógeno es un nutriente esencial tanto para los rizobios como para las leguminosas, incluso a menudo es un factor limitante para el crecimiento de los cultivos (Day et al., 2001; Luciński et al., 2002). El nitrato es la fuente de N que mayormente se encuentra en el suelo, y su disponibilidad es la encargada de regular el establecimiento del mutualismo entre el par simbiótico (Streeter and Wong, 1988). La asimilación de amonio en los rizobios varía, por ejemplo *B. japonicum* coordina la acción de dos enzimas, glutamina sintetasa (GS) and glutamato sintasa (GOGAT), cuando se encuentra en vida libre. Sin embargo, en su forma simbiótica la actividad de la GS disminuye, inversamente proporcional a la actividad de la nitrogenasa (Day et al., 2001).

En este experimento se buscó limitar la disponibilidad de N para estudiar la importancia de este nutriente esencial en el metabolismo de *Cupriavidus* sp. UYMMa02A y su posible implicancia en la señalización entre la planta y la bacteria. El 44% de las proteínas identificadas se vincularon con el transporte y metabolismo de aá, por lo que podemos concluir que las condiciones de cultivo seleccionadas lograron efectivamente limitar este nutriente, lo cual alteró una de las principales rutas del metabolismo microbiano. Esto indicaría que al disminuir el N del medio, la bacteria le da prioridad a las funciones vitales, optimizando la asimilación y reciclaje de este nutriente esencial.

En bacterias, ThiC cataliza la conversión del ribonucleótido aminoimidazol, un intermediario en la ruta de biosíntesis de purinas, a hidroximetilpirimidina fosfato. Esta ruta culmina en la formación de pirofosfato de tiamina, un cofactor esencial de enzimas que participan en el metabolismo de carbohidratos y aminoácidos. Distintos estudios establecen que esta enzima es la única integrante de la superfamilia SAM que es dependiente de un grupo 4Fe-4S (Chatterjee et al., 2010, 2008). La tiamina (vitamina B1) deriva de la ruta antes mencionada, es una vitamina soluble liberada por las raíces de las leguminosas, así como también por bacterias y

hongos que se encuentran en la rizósfera. De hecho, se ha relacionado la capacidad de algunas bacterias como *Pseudomonas* y *Azospirillum* spp. de secretar vitaminas a la rizósfera y una mejora en la FBN y el crecimiento de leguminosas noduladas por *Rhizobium* (Karunakaran et al., 2006). Djordjevic y colaboradores han reportado que la proteína ThiC se induce frente a situaciones de estrés como la limitante de nutrientes y en los nódulos de *S. meliloti* (Djordjevic, 2004; Djordjevic et al., 2003). A su vez, en mutantes de *Rhizobium etli*, que poseen una expresión no regulada de los operones de tiamina, se observó que son capaces de fijar más nitrógeno que la cepa salvaje, sugiriendo que la tiamina está implicada en la función normal del nódulo (Miranda-Ríos et al., 1997). De acuerdo con estos reportes, al igual que en otros rizobios, la vía de síntesis de tiamina en *Cupriavidus* sp. UYMMa02A sería importante en la respuesta a la falta de nitrógeno y podría estar implicada también en la interacción con la planta hospedera.

Según la plataforma Kegg la homoserina deshidrogenasa (ThrA) cataliza la reducción de L-aspartato-4-semialdehído a L-homoserina, un intermediario para la biosíntesis de otros aminoácidos como isoleucina, treonina y metionina (Price et al., 2018). El aspartato es un aá clave dentro del metabolismo de los rizobios y bacterias en general ya que está implicado en el metabolismo del C y del N, y además de ser un precursor de varios aá, es un precursor de purinas y pirimidinas (Dunn, 2015). Un aumento de la expresión de ThrA podría estar indicando que, ante la falta de nitrógeno, *Cupriavidus* sp. UYMMa02A aumenta los niveles de aspartato en las células. Un incremento en la síntesis de este aá “comodín” sería una manera de optimizar el metabolismo del N y reciclar este nutriente. Peralta y colaboradores encontraron que el gen que codifica para esta proteína está sobre representado en los genomas de cepas de *Sinorhizobium americanum* aislados de semillas de *Phaseolus vulgaris*, frente a las cepas aisladas de nódulos, lo cual indicaría que ThrA sería importante en el estilo de vida libre de rizobios (Peralta et al., 2016).

La proteína 2-isopropilmalato sintasa es la primera enzima de la ruta de biosíntesis de leucina, formando isopropilmalato a partir de acetil-CoA y ácido alfa-cetoisovalérico. Esta enzima forma parte de la ruta de biosíntesis de los aá de cadena ramificada (BCAA, de sus siglas en inglés), los cuales se ha postulado que son suministrados a los bacteroides por la planta durante la simbiosis (Chen et al., 2012). Se ha visto que mutantes en genes que codifican para enzimas implicadas en esta ruta metabólica, son defectuosos en la nodulación y en la fijación de N tanto en α -rizobios (Prell et al., 2010, 2009) como en β -rizobios (Chen et al., 2012). En *C. taiwanensis*, la mutación en la isopropilmalato isomerasa resultó en una cepa auxótrofa para leucina, generando un fenotipo Nod+ Fix-, ya que los nódulos formados en su huésped resultaron blancos e inefectivos. Esto también sugiere que la planta hospedera no le provee leucina a la bacteria durante la simbiosis (Vandamme et al., 2002), aunque es uno de los aá presentes en exudados radiculares de *M. pudica* (Klonowska et al., 2018). Con la identificación de esta proteína podemos postular que *Cupriavidus* sp. UYMMa02A también utiliza esta ruta para la síntesis de los BCAA, imprescindibles para su crecimiento y para el establecimiento de la simbiosis.

El transportador ABC de Urea fue la única proteína sub expresada con respecto al control para las condiciones ensayadas. En muchas bacterias *Gram* negativas estos transportadores tienen un rol en la nutrición, reciclaje de péptidos de la pared celular y adhesión a la célula hospedera (Higgins and Linton, 2004). Este transportador se encarga del ingreso de N a la célula bacteriana, por ende se puede postular que, ante la disminución de la disponibilidad de este nutriente, *Cupriavidus* sp. UYMMa02A disminuye la expresión de esta proteína como método de ahorro de energía.

La enzima Dihidrolipoil-lisina-residuo succiniltransferasa también denominada componente dihidropoliámid succiniltransferasa (E2) es una de las enzimas que conforma el complejo multienzimático 2-oxoglutarato deshidrogenasa. E2 cataliza el segundo paso en la conversión de 2-oxoglutarato (2-OG) a succinil-CoA y dióxido de carbono, formando parte del ciclo de Krebs o ciclo de ácidos tricarbónicos (TCA, de sus siglas en inglés) dentro del metabolismo de C. A su vez es el proveedor de esqueletos carbonados más importante para reacciones de asimilación de nitrógeno (Huergo and Dixon, 2015). Al igual que el aspartato que se mencionó anteriormente, el 2-OG es un metabolito clave que conecta el metabolismo de C y N en todos los seres vivos, incluyendo a los rizobios. Está implicado en la asimilación de N mediante la biosíntesis y el catabolismo de aá, por lo que su incremento (que se observa indirectamente con la sobreexpresión de la E2) reafirma la hipótesis que *Cupriavidus* sp. UYMMa02A posiblemente se encuentre reciclando el N disponible. Huergo y Dixon resaltan la importancia de 2-OG como un regulador del metabolismo central de un amplio rango de microorganismos. Ellos plantean que investigadores pioneros hallaron que los niveles de 2-OG aumentan cuando baja la disponibilidad de N, pero que en estudios siguientes se demostró lo contrario. Por lo tanto, aún no se ha encontrado una respuesta única hacia la contribución de este metabolito (Huergo and Dixon, 2015). En este trabajo se observó que en condiciones de baja disponibilidad de N, E2 se encuentra sobreexpresada, lo cual indicaría que ante este estrés nutricional *Cupriavidus* sp. UYMMa02A regula los niveles de 2-OG para equilibrar los metabolismos de C y N para cubrir sus necesidades (Dunn, 2015).

La subunidad beta de la Succinato-CoA ligasa (SucC) conforma junto con la subunidad alfa, a la Succinil-CoA sintetasa, enzima que cataliza reversiblemente la reacción de succinil-CoA a succinato bajo el consumo de ATP y también participa del ciclo TCA. Esta enzima facilita el flujo de moléculas hacia otras rutas ya que succinil-CoA es un intermediario necesario para la síntesis de porfirina, grupos hemo y cuerpos cetónico (Nishimura, 1986). Posiblemente estas dos últimas proteínas se encuentren sobreexpresadas junto con todo el complejo enzimático que conforman, pero este análisis sólo pudo detectar una parte.

El número total de proteínas identificadas en este experimento permite tener una imagen parcial de los cambios que ocurren. Sin embargo, los resultados obtenidos sugieren que la falta de un nutriente esencial como el N provoca cambios en el metabolismo central de *Cupriavidus* sp. UYMMa02A, afectando procesos implicados

en la biosíntesis y reciclado de aminoácidos, la coordinación de los metabolismos de N y C y en el ciclo de Krebs.

Respuesta de *Cupriavidus* sp. UYMMa02A a la presencia de flavonoides

Los primeros pasos de la interacción ocurren en la rizósfera cuando las bacterias censan los exudados radiculares liberados por parte de las leguminosas. Dentro de estos exudados se encuentran una variedad de compuestos como azúcares complejos, aminoácidos, flavonoides, vitaminas, ácidos orgánicos, alcoholes, entre otros (Hayat et al., 2010; Morel and Castro-Sowinski, 2013). La calidad y cantidad de exudados radiculares está influenciada a su vez por los microorganismos presentes en la rizósfera (Bruijn, 2015). Entre las moléculas señal más estudiadas en la interacción rizobio-leguminosa, están los flavonoides. Estos son liberados por las plantas y captados por los rizobios, en los cuales provoca importantes cambios, entre ellos la activación de la síntesis y secreción de los factores de nodulación, los cuales son a su vez captados por la planta, desencadenando el proceso de la nodulación (Masson-Boivin et al., 2009; Oldroyd et al., 2011).

Varios investigadores reportaron que los genes de nodulación de *C. taiwanensis* son inducidos por los flavonoides luteolina y apigenina (Amadou et al., 2008; Marchetti et al., 2010; Saad et al., 2012), además estos flavonoides son capaces de provocar una fuerte respuesta quimio-atrayente en rizobios (Hassan and Mathesius, 2012). Para intentar descifrar el efecto de estos flavonoides en la cepa modelo, se estudió los cambios que ocurren cuando *Cupriavidus* sp. UYMMa02A es expuesta a dichos flavonoides y se halló que las proteínas identificadas se encontraban principalmente dentro de las categorías COG: conversión y producción de energía y transporte y metabolismo de aminoácidos.

A nivel de nutrientes, se observaron cambios principalmente en el metabolismo del N. Por ejemplo, la enzima Aspartato-4-decarboxilasa (AsdA) está involucrada en el metabolismo de los aminoácidos, es la enzima que se encarga de la conversión de aspartato a alanina y CO₂, posee doble función, liasa y transaminasa. Es una proteína muy estudiada ya que es la principal en la producción industrial de alanina, aá utilizado como aditivo para alimentos (Feng et al., 2019; Wang and Lee, 2006). Junto con la aminotransferasa de aminoácidos de cadena ramificada (BCAA aminotransferasa) presentan según la plataforma RAST un contexto genómico poco conservado en comparación al resto de las proteínas, sugiriendo la posibilidad que hayan sido adquiridas recientemente mediante algún mecanismo de THG. Esta aminotransferasa transfiere de manera reversible un grupo amino obteniendo como producto final leucina, isoleucina y valina. Chen y colaboradores construyeron mutantes de *B. phymatum* STM815 con actividad BCAA aminotransferasa reducida que resultaron deficientes en la fijación de N, ya que como se mencionó anteriormente, los aá de cadena ramificada son importantes en la invasión del nódulo y en la formación y maduración del bacteroide. A su vez, estas mutantes no resultaron auxótrofas de BCAA como se esperaba, posiblemente otra enzima desconocida se encuentre compensando parcialmente esta actividad (Chen et al., 2012). Adicionalmente, Prell y colaboradores reportaron que los bacteroides de

Rhizobium leguminosarum bv *viciaese* se convierten en auxótrofos simbióticos para BCAA y que dependen de la planta para su suministro, siendo esta quien regula su desarrollo y persistencia, haciéndolo un punto crítico de control para la regulación de la simbiosis (Prell et al., 2009). Al analizar los resultados del experimento con flavonoides se encontró que AsdA y BCAA aminotransferasa se encuentran inducidas por luteolina la primera de ellas y por apigenina ambas, mostrando su importancia en nuestro modelo tanto en condiciones de deficiencia de nitrógeno como en respuesta a la presencia de flavonoides, sugiriendo que ambas enzimas podrían estar implicadas en la interacción entre *Cupriavidus* sp. UYMMa02A y su planta hospedera.

La proteína serina hidroximetil transferasa (GlyA) también pertenece a la categoría E (transporte y metabolismo de áa) dentro de COG, pero en este caso su expresión se encuentra reducida. Esta enzima cataliza reversiblemente la conversión de 3-hidroxi áa a un aldehído y glicina en presencia de 5-piridoxal fosfato, por lo que se encuentra principalmente involucrada en el metabolismo de glicina, serina y treonina (Kumar and Verma, 2018). Con este resultado, se podría especular entonces que esta represión de esta proteína puede estar favoreciendo los niveles de BCAA, áa estrechamente implicados en la interacción rizobio – leguminosa.

La Proteína de unión periplásmica de un Transportador tripartita de C4-dicarboxilatos (Dcu) / Transportador tripartita de tricarboxilatos (TctC), se observó sobreexpresada en presencia de flavonoides. Su identificación varía según la base de datos utilizada ya que se trata de proteínas muy conservadas cuya función puede ser variable. De todas formas, esta proteína de unión periplásmica es parte de un sistema de transportadores transmembrana ATP-dependientes, la diferencia entre ambos sistemas recae en el ácido orgánico que intercambia a través de la membrana, el primero transfiere ácidos orgánicos con dos grupos carboxilo (-COOH) como ácido oxálico, malónico y succínico, mientras que TctC transporta ácidos tricarboxílicos como el ácido cítrico, isocítrico, entre otros. Los ácidos dicarboxílicos de cuatros carbonos son considerados la principal fuente de carbono para los bacteroides durante la fijación y mutaciones que interfieren en el transporte de dicarboxilatos bloquea la fijación de N generando defectos en el desarrollo del nódulo, (Unden et al., 2016; Yurgel and Kahn, 2004). En cambio, el transportador TctC podría estar implicado en el transporte de citrato, principal fuente de carbono presente en el medio de cultivo utilizado. En este caso, la presencia de apigenina estimularía la incorporación de citrato. Este es un metabolito intermediario del ciclo TCA, por lo que seguramente la bacteria se dirige hacia un incremento en la producción de energía, conservándola en forma de PHAs para su posterior utilización. Complementariamente a este análisis se realizó un BLAST que arroja como primer resultado y con un 96,94 % de identidad, que la proteína identificada sería homóloga a TctC de *C. pinatubonensis*. Esto junto con la presencia de citrato en el medio de cultivo indicaría que el transportador TctC es una de las proteínas sobreexpresadas en el experimento con apigenina. Además, cabe mencionar que el gen *tctC* también se encontró sobreexpresado en la cepa *Cupriavidus necator* UYPR2.512 en presencia de luteolina (Rodríguez-Esperón *et al.* en prep.). En este

sentido se postula que en *Cupriavidus* sp. UYMMa02A, la presencia de flavonoides estimula la incorporación de citrato, parte del cual sería destinado a la formación de polímeros de reserva como PHA's. De esta forma en condiciones favorables, la bacteria podría acumular reservas que serían usadas posteriormente durante la colonización e infección de las raíces de la planta hospedera.

La enzima Aldehído deshidrogenasa (ALDH) se encuentra sobreexpresada frente a la adición de luteolina. Esta proteína ha sido extensamente estudiada en animales, hongos y plantas, perteneciendo a una de las superfamilias más ancestral y distribuida entre los seres vivos. Riveros-Rosas y colaboradores se han encargado del estudio de esta superfamilia en bacterias debido a la gran plasticidad metabólica y capacidad de adaptación frente a entornos diversos y cambiantes que estas poseen. Existen distintos tipos de ALDH según el nucleófilo exógeno que participa como se muestra en la Figura 26, ALDH hidrolíticas (Figura 26 A), ALDH CoA-acetiladas (Figura 26 B) y ALDH fosforiladas (Figura 26 C). En *Pseudomonas* se encontraron ALDH de las tres clases y su rol en el organismo depende no sólo de la especificidad de sustrato, sino también con que otras proteínas se co-expresa (Riveros-Rosas et al., 2019). Klonowska y colaboradores reportaron que el gen *aldh* se encuentra inducido en presencia de exudados radiculares en *B. phymatum* y *R. leguminosarum*, pero no en *C. taiwanensis* (Klonowska et al., 2018). Se realizó una búsqueda del contexto genómico del gen que codifica para ALDH en la plataforma RAST para determinar de qué tipo se trata y se observó que se posiciona junto al gen que codifica para la enzima alcohol deshidrogenasa, siendo el subsistema en común la biosíntesis de glicerolípidos. Este resultado sugiere que la proteína identificada sería del tipo hidrolítica (Figura 26 A) la cual cataliza el segundo paso de la ruta de biosíntesis de glicerolípidos, que consiste en la formación de D-gliceraldehído a partir de D-glicerato. Este resultado sugiere que en *Cupriavidus* sp. UYMMa02A la luteolina estimula la síntesis de ácidos grasos, que desde el punto de vista de la interacción rizobio – leguminosa, son una de las decoraciones de los Factores Nod y contribuyen al aumento del rango de hospederos de la bacteria.

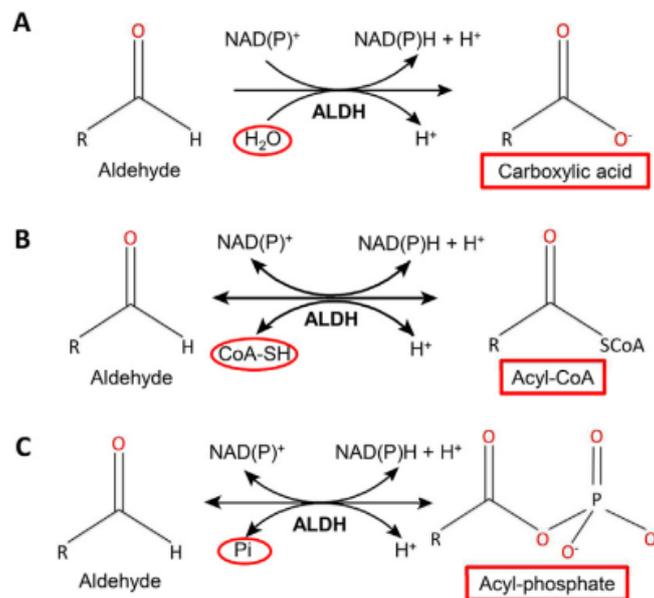


Figura 26. Tipos de ALDH en base al nucleófilo exógeno. A. ALDH hidrolítica, B. ALDH CoA-acetilada y C. ALDH fosforilada (Riveros-Rosas et al., 2019).

La proteína Dihidrolipoil-lisina-residuo succiniltransferasa (E2) fue una de las proteínas que se encontraron sobreexpresada en comparación al tratamiento control en el experimento de variación de N. Contrariamente, en este ensayo E2 se encuentra reprimida al incorporar cualquiera de los dos flavonoides ensayados al medio de cultivo. A su vez, más arriba dentro de esta misma sección, se observó que un transportador de ácidos tricarbóxicos se encontraba sobreexpresado bajo las mismas condiciones. Esto permite especular que en este experimento podría haber un mayor aprovechamiento de citrato como fuente de C, con la posibilidad de un mejor rendimiento energético ya que el compuesto entraría directamente al ciclo de Krebs; indirectamente se observaría a la represión de E2 como una disminución de 2-OG ya que no sería necesario porque la bacteria se encuentra en un estado nutricional suficiente en lo que respecta a los metabolismos de C y N.

La Enoyl-CoA hidratasa (ECH) tiene como función la hidratación reversible del doble enlace entre carbonos de 2-trans/cis-enoil-CoA, un intermediario en el metabolismo de ácidos grasos, beta-oxidación, ruta metabólica que finaliza en la formación de acetil-CoA y energía (ATP). Esta enzima es bidireccional, por lo que en sentido contrario se observaría un aumento en la síntesis de ácidos grasos, lo que podría estar relacionado con cambios en la membrana celular, particularmente en los LPS, donde las bacterias podrían prepararse para una posible interacción con la planta. Tang y Capela reportan que cepas mutantes de rizobio deficientes en la biosíntesis de LPS presentan un hilo de infección no funcional en los primeros pasos de la infección teniendo como consecuencia nódulos incapaces de fijar N (Tang and Capela, 2020). Además, en bibliografía se observó que ECH está involucrada en el metabolismo de compuestos aromáticos en algunas β -proteobacterias como la ruta

metabólica del benzoato (Gescher et al., 2002). Incluso se especula que junto a 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa en una cepa de *Burkholderia xenovorans* cumplen la función de conectar el catabolismo con el ciclo TCA ya que carece de algunas de las enzimas intermediarias (Suvorova and Gelfand, 2019). Complementariamente, varios investigadores sostienen que algunas especies de rizobios son capaces de utilizar compuestos aromáticos, entre ellos los flavonoides, como fuente de energía degradándolos por la vía del catecol y protocatecuato e incorporándolos tras sucesivos clivajes enzimáticos en el ciclo TCA (Cooper, 2004; Rao and Cooper, 1994; Suvorova and Gelfand, 2019). Si bien aún no hay evidencia que *Cupriavidus* sp. UYMMa02A catabolice estos compuestos para obtener fuente de C, en investigaciones previas realizadas por nuestro grupo de trabajo se encontró activa la vía del catecol (Garabato & Sandes, en prep.), que convierte el catecol generado a partir de benzoato, fenol y algunos monómeros de lignina en β -ceto adipato; que luego con dos pasos adicionales logran la conversión de este compuesto en intermediarios del ciclo TCA, succinil-CoA y acetil-CoA (Ledger et al., 2012; Pérez-Pantoja et al., 2008). Otra hipótesis posible podría ser que la presencia de apigenina induzca la síntesis de los ácidos grasos que están implicados en la formación de los factores Nod. Los genes *nodE* y *nodF* de varios alfa-rizobios son los implicados en este paso de la simbiosis (Perret et al., 2000). Apoyando esta hipótesis no se encontraron copias de *nodEF* en el genoma de *Cupriavidus* sp. UYMMa02A. Sin embargo, sí se encontró en este genoma un homólogo al gen *fabG*, que según Amadou y colaboradores sería un parálogo de *nodF* en *C. taiwanensis* (Amadou et al., 2008).

Los rizobios encuentran en las raíces de las leguminosas un nicho favorable, la presencia de nutrientes, la baja competencia e incluso protección frente al estrés ambiental. Sin embargo, durante la interacción la planta produce especies reactivas de oxígeno y otros compuestos bacteriostáticos que constituyen una fuente de estrés biótico para estos microorganismos (Kumar and Verma, 2018). Por este motivo es esperable que diferentes chaperonas y proteínas vinculadas al estrés varíen su expresión durante los primeros pasos de la interacción simbiótica. La proteína de unión al ADN en fase estacionaria (Dps) pertenece a la superfamilia de las ferritinas, oxidando el hierro de Fe (II) a Fe (III). Dps forma parte de un sistema de defensa que protege al ADN contra el daño oxidativo, luz UV, nucleasas, toxicidad por hierro y cobre, entre otros (Chiancone and Ceci, 2010; Karas et al., 2015). Según el análisis realizado, Dps se encuentra sobreexpresada al suplementar el M9 con luteolina. En este sentido se postula que *Cupriavidus* sp. UYMMa02A induce la expresión de Dps en respuesta a la presencia del flavonoide, como forma de prepararse para al estrés oxidativo que ocurriría durante la interacción.

La chaperona GroEL forma parte de la superfamilia de las chaperonas, proteínas que tienen la habilidad de asistir en el plegado, ensamblaje y exportación de otras proteínas o complejos proteicos (Fischer et al., 1999; Guerreiro et al., 1999). GroEL forma parte del complejo GroEL/GroES y tiene un tamaño de 60 kDa, GroES es de 10 kDa y se encuentra en menor proporción. Por esto y por su pequeño tamaño se cree que la técnica no la pudo detectar. GroEL se ha encontrado sobreexpresada en

nódulos de cepas de *Bradyrhizobium japonicum* (Jordan, 1982) y *Sinorhizobium meliloti* (Chen et al., 1988). Para comprobar que realmente estaba implicada en esta simbiosis se realizaron mutaciones *knockout*. Como resultado se obtuvo que algunas de las copias que codifican para la proteína GroEL son imprescindibles para la formación del complejo nitrogenasa (Da Silva et al., 2017). En bibliografía se encontró que en presencia de luteolina *S. meliloti* induce la expresión de dos proteínas con homología a GroEL que estarían implicadas en el plegamiento de proteínas parcialmente plegadas, incluyendo las inducidas por el propio flavonoide (Chen et al., 2000; Cooper, 2004). En una cepa de *Rhizobium etli* esta chaperona se encuentra en los sistemas de secreción tipo II y tipo IV ayudando en el plegado de proteínas en las regiones ácidas. Además, se la encontró en el proteoma extracelular de este rizobio sugiriendo que participa en el proceso de colonización de la planta (Meneses et al., 2010).

Opuesto a lo que se reporta usualmente, en este análisis se obtuvo que la cepa de interés tiene la proteína GroEL reprimida luego de estar en contacto con luteolina, junto con el factor de elongación Tu, factor que participa en la síntesis de nuevas proteínas. Este último no llegaba a los valores de significancia mínimos exigidos por el análisis, por lo que fue descartado. Sin embargo, los resultados obtenidos sugieren que en *Cupriavidus* sp. UYMMa02A, estas chaperonas no serían necesarias para el correcto plegamiento de proteínas inducidas por luteolina.

Análisis proteómico de *Cupriavidus* UYMMa02A en co-cultivo con plantas de *M. pudica*.

El objetivo de este experimento consistió en analizar los primeros pasos de la interacción entre *Cupriavidus* sp. UYMMa02A y plántulas de *M. pudica* *in vitro*. Para ello, se diseñó un sistema en que las plantas y las bacterias compartían el medio de cultivo, pero se encontraban espacialmente separadas por una membrana semipermeable (Figura 14 C). En este diseño se buscó permitir el intercambio de señales entre simbiosis sin que ocurra el contacto directo y la colonización. La puesta a punto del sistema fue desafiante, desde la logística del experimento, la selección del material e incluso el método de esterilización. La manipulación en sí también fue muy engorrosa, el montaje del sistema en condiciones estériles, mantener el cultivo gnotobiótico bajo ese contexto y finalmente procesar las muestras sin alterar la esterilidad fue muy complejo. El mejor escenario que se logró tuvo un evento inesperado, al concluir el experimento la cepa de interés se encontró de ambos lados de la membrana.

Una vez realizado el experimento de 2D-DIGE y recolectadas las imágenes se observaron 674 *spots*, una cifra significativamente mayor que los experimentos anteriores. Esto puede deberse a que en los otros ensayos las fuentes de C y N tan específicas simplificaran las rutas metabólicas utilizadas por la bacteria. En cambio, los exudados radiculares de *M. pudica* contienen una diversidad de azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos y polialcoholes (Klonowska et al., 2018) que pueden reorganizar el metabolismo y fisiología bacteriana, ajustando sus funciones celulares. Finalmente, de los 37 *spots* que mostraron expresión diferencial, 17

proteínas fueron las que se lograron identificar una vez realizado todo el procesamiento y análisis de los datos.

En este experimento, se esperaba que en los primeros pasos de la interacción, *Cupriavidus* sp. UYMMa02A sea capaz de captar y metabolizar los compuestos exudados por la planta ya sea como fuente nutricional o como señales. Dentro del metabolismo de C, se observaron diferencias de expresión de la enzima aspartato-4-decarboxilasa, que ya fuera encontrada sobreexpresada frente a flavonoides (sección 4.7.2). Sin embargo, en presencia de la planta, su expresión está disminuida, lo cual se podría explicar porque los exudados del hospedero contienen alanina y ácido aspártico (Klonowska et al., 2018), siendo estos compuestos los responsables de inhibir la expresión de esta enzima.

En presencia de flavonoides se observó que la luteolina aumentaba la expresión de ALDH, enzima participante en la biosíntesis de glicerolípidos junto con la alcohol deshidrogenasa (ADH) NAD dependiente (E.C. 1.1.1.1). En este experimento se encontró que los niveles de expresión de la enzima alcohol deshidrogenasa quinona dependiente (EC 1.1.99.8) son menores en condiciones de co-cultivo que cuando la bacteria crece sola. Posiblemente, lo que esté ocurriendo es que *Cupriavidus* sp. UYMMa02A esté utilizando una vía alternativa para la síntesis de glicerolípidos, por ejemplo, la que contiene a ADH-NAD dependiente (ADH de uso más frecuente), aunque no fue detectado por este análisis. Dos proteínas más implicadas en el metabolismo de ácidos grasos se encontraron sobreexpresadas en este análisis, enoyl-CoA hidratasa (ECH) y enoyl-ACP reductasa, si bien la última no cumple con las exigencias estadísticas en cuanto a la tasa de cambio (Tabla 14), se consideró interesante agregarla para enriquecer el análisis. La enzima ECH también se encontró sobreexpresada en presencia de apigenina (sección 4.7.2) mientras que Klonowska y colaboradores encontraron a la enzima enoyl-ACP reductasa sobreexpresada en cepas de *R. leguminosarum* y *B. phymatum* en presencia de exudados radiculares de *M. pudica* (Klonowska et al., 2018). Ambas enzimas participan en la lipogénesis y su aumento en la expresión puede estar relacionado a un cambio en el perfil lipídico de la bacteria, necesario para la interacción con la planta tal como se mencionó en la sección 4.7.2.

Dentro de las cinco grandes superfamilias de transportadores descritos en procariotas, en este trabajo, se identificaron dos con expresión aumentada durante la interacción. Por un lado, de la familia de transportadores ABC, se observó la sobreexpresión del transportador ABC para xilosa. La xilosa está presente en los exudados radiculares de *M. pudica* (Klonowska et al., 2018), y datos obtenidos por nuestro grupo de trabajo indican que *Cupriavidus* sp. UYMMa02A es capaz de crecer utilizando xilosa como fuente de C (Sandes y Garabato en preparación, (Garabato, 2018)), por lo que este resultado indicaría que la cepa activa este transportador para poder usar la xilosa liberada por la planta como fuente de C. Por otro lado, se encontró sobreexpresado un transportador de metales pesados (cobalto, zinc y cadmio; HME-RND) específico de bacterias Gram negativas perteneciente a la familia de transportadores RND (*resistance-nodulation-division*). Este tipo de

transportadores forma parte de un complejo tripartita que se expande a través de las dos membranas bacterianas (Blanco et al., 2016). Von Rozycki y colaboradores compararon los genomas de siete especies de β -proteobacterias distintas y encontraron que todas presentan los genes que codifican para estos transportadores, siendo *C. metallidurans* la que posee mayor número de copias (von Rozycki and Nies, 2009). Se ha reportado que las bombas de eflujo RND intervienen en la resistencia a compuestos tóxicos, en la especificidad de hospedero y en el tráfico de señales inter-especie. Los exudados vegetales contienen varios compuestos con efecto antibacterial y se ha postulado que las bombas de eflujo del tipo RND son requeridas en los primeros pasos de la colonización para sobrevivir en el tejido vegetal (Alvarez-Ortega et al., 2013). Mutantes *knockout* en la bomba de eflujo RmrAB en *Rhizobium etli* forman menos nódulos en su hospedero que la cepa salvaje. A su vez, la bomba de eflujo SmeAB juega un rol importante en la competitividad de nodulación en *S. meliloti*. Todos los trabajos mencionados concuerdan en que la habilidad para lidiar con compuestos tóxicos es una característica clave para sobrevivir en la rizósfera y la colonización radicular (Blanco et al., 2016). Por lo tanto, de acuerdo a lo observado, se infiere que la bomba de eflujo RND de *Cupriavidus* sp. UYMMa02A tendría un papel importante en la interacción *Cupriavidus-Mimosa*.

Una de las proteínas con mayor tasa de cambio es la acetoin oxidorreductasa (E1), enzima que forma parte del complejo enzimático acetoin deshidrogenasa, que cuenta con tres enzimas participantes: dihidrolipoamida acetiltransferasa (E2), dihidrolipoil deshidrogenasa (E3) y la proteína identificada en este análisis con su expresión aumentada. Este complejo enzimático cataliza la formación de acetoina, también conocida como 3-hidroxibutanona, a partir de diacetilo y participa en la posterior formación de 2,3-butanodiol. Ambas moléculas son compuestos orgánicos volátiles producidos por la mayoría de las especies dentro de las Proteobacterias en condiciones limitantes de oxígeno (Bruijn, 2015). Se ha reportado que estos compuestos son capaces de inducir la resistencia sistémica inducida de la planta y además están implicados en el desarrollo radicular, por lo que son considerados compuestos involucrados en la promoción de crecimiento vegetal (Gutiérrez-Luna et al., 2010; Ryu et al., 2003). Se podría especular que la expresión aumentada de E1 indica que esta ruta metabólica se encuentre sobreexpresada en *Cupriavidus* sp. UYMMa02A en presencia de la planta. En este caso podríamos postular que en presencia de su par hospedero, *Cupriavidus* sp. UYMMa02A activa mecanismos de promoción del crecimiento vegetal, en particular una estimulación del desarrollo radicular aumentaría la superficie de interacción y la oportunidad de colonización por el simbionte microbiano.

Por otro lado, según la base de datos del NCBI, el complejo enzimático acetoin deshidrogenasa es homólogo al complejo piruvato deshidrogenasa (PDH). Este complejo enzimático cataliza la formación de acetyl-CoA y CO_2 a partir de piruvato. En este caso, la sobreexpresión de PDH estaría reflejando la necesidad de la bacteria de producir acetyl-CoA, intermediario que participa en la síntesis de lisina, ácidos grasos y PHB (polímero de reserva de C que se acumula como gránulos

intracelulares en respuesta al estrés ambiental o desbalances nutricionales (Cooper et al., 2018; Nikel et al., 2006))(Cooper et al., 2018). Este resultado concuerda con lo observado en presencia de flavonoides, en donde la lipogénesis se encontró estimulada, reflejando posiblemente las modificaciones en el perfil lipídico de la bacteria que son necesarias para la interacción con la planta. Estos resultados sugieren que además de los cambios observados en el metabolismo de ácidos grasos, la lipogénesis, implicada tanto en la modificación de la membrana bacteriana como en la síntesis de los Factores Nod, sería una de las principales vías metabólicas afectadas durante los primeros pasos de la interacción simbiótica.

Las proteínas de membrana están implicadas en varias funciones importantes tales como el transporte de metabolitos hacia el interior y exterior celular, la interacción célula-célula y la adhesión a superficies. En las condiciones de co-cultivo estudiadas se observó que una proteína de membrana del tipo porina se encontraba sobreexpresada. Las porinas actúan como tamices moleculares, que permiten la difusión de solutos a través de la membrana externa (Olsson-Francis et al., 2010). Al investigar su contexto genómico, se encontró que el gen que codifica para esta porina se localiza junto al operón *tatABC* que codifica para el complejo proteico de translocación de la arginina gemela (Tat, de sus siglas en inglés). El sistema Tat tiene la funcionalidad de exportar las proteínas hacia el periplasma y luego la translocación a través de la membrana externa se da por los sistemas de secreción convencionales, los que por su parte también exportan proteínas, pero en un solo paso (Nuñez et al., 2012; Tseng et al., 2009). Por lo tanto, se podría especular que durante el co-cultivo con *Mimosa pudica*, *Cupriavidus* sp. UYMMa02A expresa una ruta de exportación de proteínas que estaría implicada en la interacción planta-bacteria. Las proteínas secretadas juegan un rol importante en la comunicación entre planta y microorganismo, en particular algunas actúan aumentando la nodulación o disminuyéndola debido al reconocimiento del sistema de defensa de la planta (Nelson and Sadowsky, 2015). En *S. meliloti* se encontraron tres proteínas de membrana externa tipo porina expresadas tanto en bacterias en vida libre como dentro de los nódulos, su función es desconocida pero los investigadores sugieren que juegan un rol importante en la supervivencia bacteriana (Djordjevic, 2004).

El censado y transducción de señales es fundamental para la adaptación bacteriana a cambios ambientales. En esta sección se analizan las proteínas implicadas en esta categoría junto con proteínas tipo chaperonas y algunas particularmente relacionadas al estrés. La proteína nucleasa disfosfato quinasa (Ndk) es una enzima muy conservada presente en eucariotas y procariotas. Su función principal es el mantenimiento de los niveles de nucleósidos trifosfato, transfiriendo reversiblemente un fosfato de NTPs a NDPs. Además, Ndk tiene un rol en la fosforilación de proteínas, la regulación de la transcripción de genes, la reparación del ADN y varios estudios han reportado su implicancia en la regulación de la virulencia bacteriana ya que regula la activación de sistemas de secreción tipo tres (TSS3) y la modulación positiva del *quorum sensing* en *P. aeruginosa*. Además, regula la respuesta adaptativa bacteriana, suprimiendo mecanismo de respuesta del huésped tales como la generación de ROS, entre otras (Yu et al., 2017). Esta enzima

ha sido muy estudiada en bacterias patógenas, pero no se conoce su función en bacterias promotoras del crecimiento vegetal. El hecho de encontrar a la proteína Ndk de *Cupriavidus* sp. UYMMa02A sobreexpresada durante el ensayo de co-cultivo, sugiere que esta proteína podría estar implicada también en interacciones mutualistas. Los resultados obtenidos no permiten discernir cuál sería su rol en la interacción planta-bacteria, pero sería muy interesante profundizar en el estudio de su función en este sistema. En este sentido se sabe que los T3SS desempeñan un papel importante en las interacciones simbióticas entre rizobios y leguminosas (Masson-Boivin and Sachs, 2018; Okazaki et al., 2013), en particular en *Cupriavidus* se ha visto que este sistema de secreción es importante en la selección del hospedero (Saad et al., 2012). Por otro lado, la modulación de la respuesta del hospedero a la infección microbiana es fundamental en el control de la nodulación. Las ROS tienen un rol importante durante los pasos de colonización, formación del hilo de infección y desarrollo del nódulo por lo que determinar el rol de Ndk de *Cupriavidus* sp. UYMMa02A en la interacción resultaría muy interesante.

La proteína RidA es una proteína que pertenece a la superfamilia Rid (YER057c/UK114), un grupo de proteínas de tamaño pequeño que se divide en ocho subfamilias según análisis bioinformáticos. De las subfamilias Rid1 a 7 se encuentran en procariotas y a menudo los genomas bacterianos codifican para múltiples miembros de esta superfamilia (Müller et al., 2014; Niehaus et al., 2015). Su función es muy diversa, dependiendo en que organismo se encuentre. Por ejemplo, en *E. coli* RidA actúa como chaperona que protege a la bacteria contra el estrés frente a la exposición al cloro (HOCL) (Müller et al., 2014; Voth and Jakob, 2017). En *Salmonella enterica* se describe a RidA como una enamina/imina desaminasa jugando un rol crucial en la síntesis de aminoácidos de cadena larga, y participa en la síntesis de piruvato como se muestra en la Figura 27. Cepas mutantes *knockout* en el gen *ridA* acumulan al intermediario enamina/imina e inactivan enzimas dependientes de piridoxal 5'fosfato (Hodge-Hanson and Downs, 2017). En las condiciones ensayadas, la proteína RidA de *Cupriavidus* sp. UYMMa02A se encontró sobreexpresada en presencia de la planta, por lo que se puede especular que su rol podría estar involucrado en su función como chaperona o indirectamente en la síntesis de aá de cadena ramificada, compuestos relevantes en la interacción planta-microorganismo como se menciona anteriormente. En relación con la posible actividad de RidA como chaperona, en este ensayo, al igual que como fue observado en presencia de flavonoides, se encontró una disminución en la expresión de la chaperona GroEL. Conjuntamente, se observó un aumento en la expresión de otra proteína con actividad tipo chaperona durante la interacción *Cupriavidus* - *Mimosa*; la peptidilprolil-isomerasa B (PpiB). Esta enzima cataliza la cis-trans isomeración del enlace imino de la prolina. Muchos procesos biológicos a nivel molecular implican transiciones moleculares reguladas por interacciones proteína-proteína. La prolil-isomerización es una de ellas, y es importante en el plegado y maduración de proteínas. Sin embargo, se observó que cuando se elimina o se interrumpe el dominio Ppiasa de PpiB, la enzima actúa como chaperona o componente accesorio en regulación a nivel transcripcional y transduccional (Skagia et al., 2017, 2016). En este trabajo se observó que *Cupriavidus* sp. UYMMa02A aumenta su expresión

durante la interacción con la planta, por lo que se podría postular que posiblemente PpiB y/o RidA estén cumpliendo una función de chaperona complementando o sustituyendo la función de otras chaperonas como GroEL.

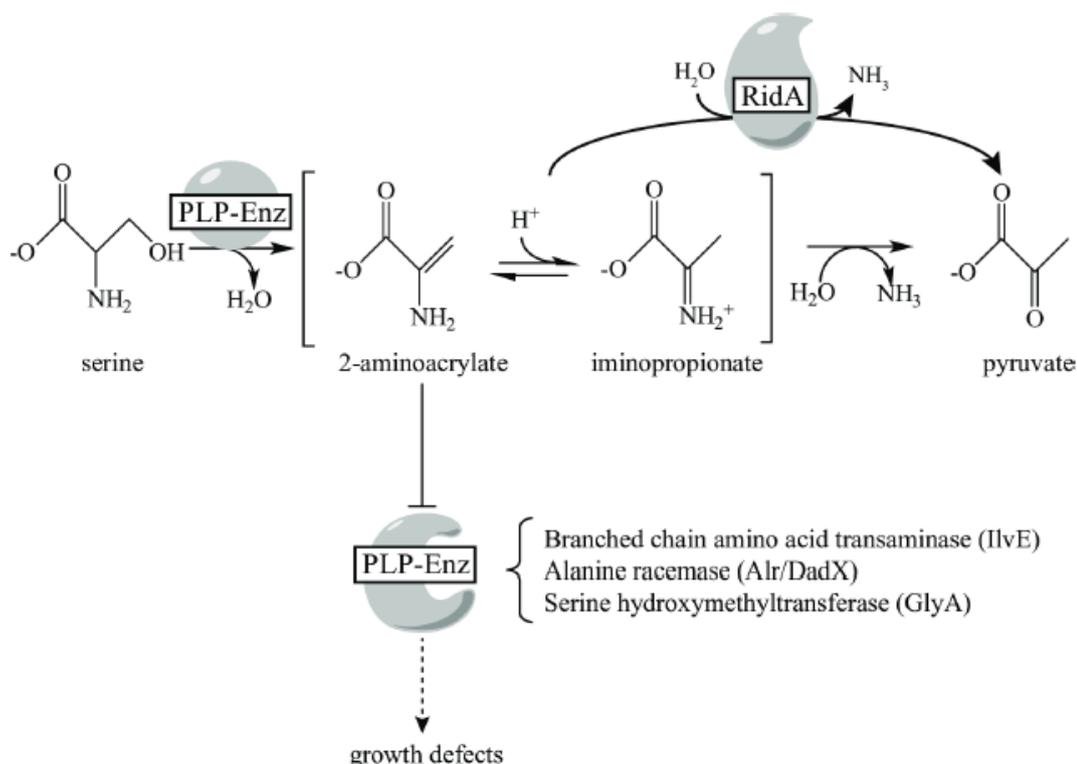


Figura 27. Participación de RidA en la síntesis de piruvato. Esquema de la ruta metabólica de la producción de piruvato a partir de serina en *S. entérica* (Tomado de Hodge-Hanson 2017).

Durante los primeros pasos en la interacción, la planta es capaz de producir especies reactivas del oxígeno tanto en respuesta a la percepción de potenciales patógenos como durante las interacciones benéficas. Las ROS producen daño a fosfolípidos, ácidos nucleicos y proteínas, entre otras moléculas bacterianas. Por su lado las bacterias responden al estrés oxidativos con enzimas como alquil-hidroperóxido reductasa C (AhpC), proteína de estrés universal (UspA), proteína serin-quinasa (PkrA), entre otras. Todas estas proteínas se encontraron sobreexpresadas en condiciones de co-cultivo y están involucradas en la homeostasis celular y respuesta a estrés redox. Incluso, las dos primeras comparten contexto genómico por lo que se podría especular que actúan en conjunto. Mientras que las dos últimas se identificaron cada una en dos *spots*, aunque las UspA presentan diferente secuencia aminoacídica, lo cual sugiere que son dos proteínas distintas pertenecientes a una misma familia. AhpC es la subunidad catalítica de una peroxirredoxina que responde ante un amplio rango de sustratos (H₂O₂, peróxidos orgánicos, peroxinitrito, entre otros) (Wang et al., 2013). La sobreexpresión de esta enzima también se observó en

B. phymatum en presencia de exudados radiculares de *M. pudica* (Klonowska et al., 2018) y en *B. phytofirmans* cuando es inoculada en plantas de papa estresadas por falta de agua (Sheibani-Tezerji et al., 2015). Con respecto a UspA, en distintos estudios transcriptómicos se encontraron inducidos, en los primeros pasos de la interacción planta-microorganismo, genes que codifican para esta familia de proteínas en alfa (Ramachandran et al., 2011) y β -rizobios (Klonowska et al., 2018), resaltando su importancia en las interacciones simbióticas. Por otra parte, PrkA es una proteína del tipo serina/treonina quinasa muy conservada y ampliamente distribuida en bacterias y archeas. En rizobios, hay múltiples quinastas que están involucradas en la nodulación. Específicamente su participación en diversas cascadas de fosforilaciones son cruciales tanto para la infección del rizobio, como para la formación y desarrollo del nódulo (Zhang et al., 2019). Si bien también está relacionada con el estrés, Liu y colaboradores reportaron que la habilidad de sobrevivir de *Mesorhizobium alhagi* frente a estreses abióticos aumenta al eliminar el gen *prkA*. Incluso un aumento en su expresión vuelve a *M. alhagi* más vulnerable a altas concentraciones de salinidad (Liu and Murray, 2016). A su vez se reportó que en una cepa de *P. aeruginosa prkA* está implicada en el ensamblaje, activación y en la regulación postraduccional del sistema de secreción tipo VI, sistema que tiene la capacidad de excretar proteínas directamente al citoplasma de las células huésped y que se ha visto en los α -rizobios *Mesorhizobium loti* y *Rhizobium leguminosarum* (Tseng et al., 2009). De acuerdo con esta información podemos concluir que los sistemas de respuesta a especies reactivas a de oxígeno y mecanismos de respuestas generales a estrés son importantes en la interacción *Cupriavidus-Mimosa*.

En este ensayo la bacteria se mantuvo durante cinco días en co-cultivo, dependiendo en todo momento de los nutrientes y señales secretados por la planta, por lo que es posible que el propio sistema provoque estrés nutricional en la bacteria. Aún así la expresión aumentada de estas proteínas frente al grupo control (que también fue incubado cinco días, pero en un medio suplementado con dosis mínimas de nitrógeno y carbono) sugiere la participación de estas vías metabólicas en la interacción *Cupriavidus-Mimosa*.

Es importante también resaltar la implicancia de la logística y la puesta a punto de los experimentos. Los ensayos *in vitro* buscan simplificar la realidad de los sistemas y limitar la influencia de factores externos, pero a su vez generan ambientes artificiales que pueden influir en los resultados tales como el estrés que le ocasiona al par hospedero estar en un medio acuoso en el que no ocurre naturalmente la simbiosis, o el exceso de oxígeno a causa de la agitación en los cultivos líquidos.

Utilización de herramientas moleculares para la generación de cepas mutantes de *Cupriavidus* sp. UYMMa02A

Una vez concluidos los estudios proteómicos se cuenta con una lista de proteínas cuya función exacta en este modelo de estudio es desconocida. Para intentar profundizar en la función e importancia de algunas de estas proteínas se decidió construir mutantes puntuales en genes seleccionados. Para esto se puso a punto un sistema de mutagénesis dirigida en la cepa de interés a partir del método que

desarrollaron Martínez-García & de Lorenzo (Martínez-García, E & de Lorenzo, 2012). Como ya se mencionó en la introducción, este método tiene como ventajas: i) utilizar la recombinación y reparación del ADN y no dejar marcas en el genoma modificado; ii) y que fue desarrollado en bacterias Gram negativas ambientales, específicamente para el género *Pseudomonas*. De todos modos, en este trabajo fue necesario poner a punto esta metodología para *Cupriavidus*, tarea que resultó menos sencilla de lo originalmente previsto.

En base a los resultados obtenidos por proteómica, se seleccionaron dos genes para la construcción de mutantes; por un lado, se seleccionó el gen *prkA*, el cual codifica para una Protein-quinasa de serinas/treoninas, proteína que se encontró sobreexpresada en condiciones de co-cultivo. La fosforilación de proteínas es una estrategia de modificación postraduccional ampliamente utilizada en los seres vivos para la regulación de diversos procesos biológicos. Se ha demostrado que homólogos a esta proteína en particular, participan en cascadas de fosforilaciones que regulan procesos como la infección del rizobio, la formación y el desarrollo del nódulo (Zhang et al., 2019). Por lo tanto, profundizar en la funcionalidad de esta proteína quizás permita una mayor comprensión sobre la fina regulación que ocurre en el establecimiento de la simbiosis entre *Cupriavidus sp.* UYMMa02A y su leguminosa hospedera. Complementariamente se seleccionó al gen *nodD*, gen que codifica para el regulador transcripcional NodD, proteína que en la mayoría de los rizobios está implicada en el reconocimiento de los flavonoides específicos provenientes de los exudados radiculares de leguminosas hospederas y regula la expresión de otros genes implicados en la nodulación tales como los genes *nod*, *nol* y *noe* (Lindström and Mousavi, 2019).

En lo que respecta a la construcción de la cepa mutante en el gen *prkA*, se presentaron algunas dificultades en el procedimiento. El primer paso fue la integración del plásmido al genoma de *Cupriavidus sp.* UYMMa02A, lo cual se evidencia por la amplificación de dos fragmentos utilizando los cebadores TS1F y TS2R; un fragmento de 548 pb, correspondiente al fragmento TS1-TS2 clonado en el plásmido y un producto de 2448 pb correspondiente al fragmento TS1-*prkA*-TS2 presente en el genoma de la cepa salvaje. Sin embargo, aún cuando se ajustaron las condiciones de la reacción de PCR, no fue posible obtener los dos fragmentos en una única reacción. Es posible que esto haya sucedido debido a una preferencia de la polimerasa de amplificar el producto de menor tamaño. Para poder comprobar que se contaba efectivamente con el co-integrado, se utilizaron cebadores alternativos (Tabla 6) que permitieron amplificar por un lado al gen *prkA* salvaje y por otros fragmentos híbridos entre este gen y el fragmento TS1-TS2 co-integrado (datos no mostrados). Una vez demostrada la correcta co-integración del plásmido pLSΔ*prkA* en el genoma de *Cupriavidus sp.* UYMMa02A, se pudo continuar con el procedimiento. El siguiente paso consistió en introducir un plásmido con el gen de la nucleasa I-SceI, necesaria para la resolución del co-integrado, lo cual fue otro punto de inflexión que tuvo la construcción de esta mutante. Fue necesario explorar el uso de 4 plásmidos distintos para lograr la inducción de la resolución del co-integrado. De acuerdo con Martínez-García & de Lorenzo, una vez que ocurre dicha

resolución, se pierde el plásmido y consecuentemente el marcador de resistencia a antibiótico, por lo que las colonias resultantes vuelven a ser sensibles a la kanamicina. En un contexto neutro, se espera que de las colonias Km-sensibles, una mitad corresponde a una reversión hacia el genotipo salvaje y la otra mitad correspondería a la mutante (Martínez-García, E & de Lorenzo, 2012). En cambio, cuando se logró inducir la resolución del cointegrado en la cepa UYMMa02A:pLSΔprkA, el 100% de las colonias Km sensibles analizadas mostraron un genotipo salvaje. Esto indicaría una presión selectiva hacia la cepa salvaje, por lo que se puede especular que la expresión de esta proteína es de vital relevancia para *Cupriavidus* sp. UYMMa02A y que su ausencia, al eliminar el gen que la codifica, no permite la supervivencia de la célula. También es posible que el porcentaje de colonias que se resuelvan a mutantes sea muy bajo para este gen y que sea necesario analizar un mayor número de colonias Km sensibles para lograr identificar una con el genotipo esperado para la cepa mutante, a pesar de haber analizado 300 colonias aproximadamente.

Contrariamente a lo ocurrido con el gen *prkA*, la construcción de la cepa mutante *Cupriavidus* sp. UYMMa02AΔnodD fue más fluida, seguramente se deba al tamaño del gen blanco. El gen *nodD* (887 pb) cuenta con 1000 pb menos aproximadamente que el gen *prkA* (1900 pb), esto hace que su manipulación genética sea más sencilla y es algo que se debe tener presente para futuras construcciones. Se logró de manera satisfactoria, poner a punto una técnica para obtener mutantes “sin cicatrices”. Como se mencionó en la introducción (sección x) muchas son las teorías con respecto al origen de los genes *nod* y ninguna ha sido confirmada, pero si los genes de nodulación de *Cupriavidus* llegaron por THG, se puede especular que la nodulación es una función accesoria, no es vital para la célula, por lo que la eliminación del gen *nodD* puede ocurrir sin comprometer la viabilidad de *Cupriavidus* sp. UYMMa02A.

Para evaluar el fenotipo de la cepa mutante *Cupriavidus* sp. UYMMa02AΔnodD, la misma fue inoculada en plantas de *M. pudica*. La hipótesis de partida fue que si la proteína NodD actuara como regulador transcripcional de los genes *nod* en esta cepa, tal como ocurre en muchos rizobios, una mutación en el gen que la codifica afectaría la expresión del operón *nod*. Esto a su vez provocaría que la cepa fuera incapaz de sintetizar factores Nod y por ende, defectuosa en la nodulación. En cambio, los resultados obtenidos mostraron que *Cupriavidus* sp. UYMMa02AΔnodD fue capaz de formar nódulos efectivos en las raíces de *M. pudica*, sugiriendo la existencia de estrategias alternativas al regulador para llevar a cabo la nodulación. Entre las posibles estrategias empleadas por la cepa modelo se encuentran: (i) la formación del nódulo ocurre independientemente de los Factores Nod; esto fue descrito hace aproximadamente una década en rizobios pertenecientes al género *Bradyrhizobium*, y existen a su vez, dos variantes. Una ocurre en la interacción entre *B. elkani* y *Glycine max* (soja) donde la bacteria utiliza el sistema de secreción tipo tres (T3SS, usualmente conocido como un introductor de factores de virulencia en animales y plantas) para propósitos simbióticos, brevemente, los flavonoides inducen la expresión de T3SS y la síntesis de proteínas efectoras capaces de activar

los componentes de la ruta común de señalización simbiótica y finalmente formar nódulos no/poco eficientes (Masson-Boivin and Sachs, 2018; Okazaki et al., 2013). El otro camino, si bien no se ha dilucidado enteramente el mecanismo de acción, consiste en que las bacterias de *Bradyrhizobium ORS278* penetran en plantas de *Aeschynomene evenia*, en las grietas que surgen cuando se da la emergencia de las raíces laterales. Se produce una muerte celular subepidérmica en la raíz que promueve la propagación de las bacterias y la posterior infección de las células corticales por endocitosis, desencadenando en la división celular y posterior desarrollo del nódulo funcional (Gully et al., 2018; Tang and Capela, 2020); (ii) Existen otros mecanismos para la activación de los genes implicados en la síntesis de los factores Nod. Gottfrent y colaboradores hallaron un regulador de dos componentes denominado NodVW en *B. diazoefficiens*. NodV es un sensor de membrana que responde a las señales de la planta y NodW regula los genes implicados en la nodulación mediante fosforilaciones (Gottfert et al., 1990; Loh et al., 1997).

Según la bibliografía y los resultados obtenidos, se podría concluir que la cepa *Cupriavidus* sp. UYMMa02A podría nodular plantas de *M. pudica* sin utilizar como intermediario a la proteína NodD, ya sea implementando otro regulador o un mecanismo independiente de los Factores Nod. En este sentido, cabe destacar que el genoma de UYMMa02A cuenta con genes que codifican para T3SS y para el sistema NodVW que podrían estar actuando como mecanismos alternativos en la nodulación.

7. CONCLUSIONES

En este trabajo se logró, por un lado, la puesta a punto de técnicas de extracción de proteínas, electroforesis en gel y 2D-DIGE para *Cupriavidus* sp. UYMMa02A, generando la posibilidad de adaptar estas metodologías a futuros estudios en otros modelos de interés pertenecientes al mismo género. En cuanto a la variación de la disponibilidad de nitrógeno, *Cupriavidus* sp. UYMMa02A presentó diferencias principalmente en el metabolismo de aminoácidos, modulando la presencia de aspartato y 2-OG, dos reguladores del metabolismo central de un amplio rango de microorganismos. Mientras que los flavonoides luteolina y apigenina generan cambios muy similares en el proteoma de *Cupriavidus* sp. UYMMa02A, el cual se adapta para el transporte y metabolismo de nutrientes; en co-cultivo con plántulas de *Mimosa pudica*, la cepa modelo adapta su metabolismo de nutrientes y transporte, y modula diferentes proteínas relacionadas al estrés y la interacción como consecuencia de la presencia de su hospedero.

Por otro lado, se obtuvo la construcción de la mutante *Cupriavidus* sp. UYMMa02A Δ nodD, la cual presentó un fenotipo inesperado al nodular de manera efectiva plantas de *M. pudica*, indicando que la cepa no utiliza la proteína NodD como intermediario. En lo que respecta al gen *prkA*, no fue posible su eliminación del genoma de *Cupriavidus* sp. UYMMa02A.

8. PERSPECTIVAS

Con respecto a los estudios de proteómica, es necesario validar los resultados obtenidos de expresión diferencial de las proteínas identificadas. Para esto se podría continuar con la construcción de cepas mutantes por delección de un gen que se realizó en la segunda parte de este trabajo o cepas mutantes que contengan un gen reportero asociado al promotor del gen de interés. También se podría utilizar la técnica qPCR y cuantificar la expresión mediante transcriptos. Se ensayarían las mismas condiciones que en el presente trabajo para su comparación. Adicionalmente, se podría observar el comportamiento de *Cupriavidus* sp. UYMMa02A frente a nuevas variables como: exudados radiculares, en condiciones de co-cultivo ya adheridas a la raíz o en el nódulo. A modo de complemento se podría cuantificar y analizar el perfil de metabolitos/señales secretadas por las raíces hacia la rizósfera durante el diálogo molecular planta – bacteria, utilizando cromatografía líquida o gaseosa acoplada a MS (LC-MS/GC-MS).

La ciencia y tecnología ha avanzado en los estudios de proteínas incorporando nuevas metodologías como secuenciación masiva de proteínas o *shotgun proteomic*. Esta técnica tiene la ventaja de requerir bajas cantidades de material de partida y una alta sensibilidad, además no es necesaria la separación previa de proteínas mediante electroforesis en gel (Carvalho et al., 2016; Eng et al., 1994; Liu et al., 2004; Lundgren H. et al., 2010). Por ejemplo, se podría utilizar *shotgun* complementado con nano LC-MS, un método de última generación independiente de gel. Es una técnica que da mayor robustez al estudio por la masividad de datos que arroja. Cabe destacar que esta proteómica de alto rendimiento y otras técnicas de secuenciación masiva como *RNA-seq* y *ribosome profiling* se están llevando a cabo por otros compañeros del grupo de trabajo en marco de sus proyectos de posgrado. Sin embargo, al momento de realizar este trabajo, algunas de estas tecnología aún no se encontraba disponible en nuestro país.

En cuanto al intento de eliminar el gen *prkA*, es necesario optimizar la metodología para este gen en particular y genes de mayor tamaño en general. Una alternativa sería utilizar otro método de mutagénesis dirigida o incorporar un gen reportero para conocer su función o al menos su implicancia en la interacción planta – bacteria y en la nodulación. En cuanto al trabajo futuro en relación a *Cupriavidus* sp. UYMMa02A Δ nodD sería interesante realizar una caracterización más profunda de la cepa mutante, estudiar los genes *nod* e intentar dilucidar cuál es el mecanismo de regulación implicado en la nodulación.

Finalmente, destacar una vez más el escaso conocimiento que hay sobre β -rizobios, en comparación a los α ; de hecho, un gran porcentaje de la bibliografía que soporta este trabajo son estudios en α -proteobacterias. Por esta razón, los datos generados en este trabajo contribuyen a incrementar el conocimiento sobre este clado de rizobios, particularmente sobre el género *Cupriavidus*, y sobre los mecanismos implicados en las interacciones benéficas entre los microorganismos simbióticos presentes en los suelos de nuestro territorio y su género hospedero.

9. ANEXO

9.1. Medios de cultivo, geles y soluciones

9.1.1. Medio de cultivo para bacterias

9.1.1.1. Triptona – extracto de levaduras (TY)

| Componente | Cantidad (1L) |
|-----------------------------------|----------------------|
| Triptona | 5,0 g |
| Extracto de levadura | 3,0 g |
| CaCl ₂ | 0,68 g |
| H ₂ O c. s. p. 1 litro | |

9.1.1.2. Luria – Bertani (LB)

| Componente | Cantidad (1L) |
|-----------------------------------|----------------------|
| Triptona | 10,0 g |
| Extracto de levadura | 5,0 g |
| NaCl | 5,0 g |
| H ₂ O c. s. p. 1 litro | |

9.1.1.3. Medio mínimo M9

| Componente | Cantidad (1L) |
|---|----------------------|
| Sales M9 5x * | 200 mL |
| MgSO ₄ 1M | 2 mL |
| Solución 20 % (p/v) de la fuente C | 20 mL |
| CaCl ₂ 1M | 0,1 mL |
| H ₂ O c. s. p. 1 litro | |
| Sales 5x * | |
| Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O | 64 g |
| KH ₂ PO ₄ | 15 g |
| NaCl | 2,5 g |
| NH ₄ Cl | 5,0 g |
| H ₂ O c. s. p. 1 litro | |

9.1.2. Medio de cultivo para plantas

9.1.2.1. Medio Howieson (Howieson et al., 1993)

| Componente | Cantidad (1L) |
|---|----------------------|
| K ₂ SO ₄ | 1,74 g |
| KH ₂ PO ₄ | 0,27 g |
| CaSO ₄ | 1,36 g |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 0,49 g |
| FeSO ₄ | 0,06 g |
| Sol. de micronutrientes* | 10,0 mL |
| H ₂ O c. s. p. 1 litro | |
| Sol. de micronutrientes* | |
| H ₃ BO ₃ | 1,85 g |
| Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O | 0,07 g |
| ZnSO ₄ .7H ₂ O | 2,87 g |
| MnSO ₄ .H ₂ O | 0,17 g |
| CuSO ₄ .5H ₂ O | 0,50 g |
| CoCl ₂ | 0,24 g |
| H ₂ O c. s. p. 1 litro | |

9.1.3. Soluciones

9.1.3.1. PBS

| Componente | Cantidad (1L) |
|-----------------------------------|----------------------|
| NaCl | 8 g |
| KCl | 0,2 g |
| Na ₂ HPO ₄ | 1,44 g |
| KH ₂ PO ₄ | 0,24 g |
| H ₂ O c. s. p. 1 litro | |

9.1.3.2. Solución de Bradford

Disolver 100 mg de Azul Comassie G-250 en 50 mL de EtOH 95 %. A continuación, agregar 100 mL de H₃PO₄ 85 % y agua destilada hasta 200 mL. Filtrar la solución 4-5 veces.

9.1.4. Geles

9.1.4.1. Gel concentrador 5 %

| Componente | Cantidad para un gel |
|--------------------------------------|-----------------------------|
| Agua desionizada | 2,1 mL |
| Acrilamida - Bisacrilamida 30% (p/v) | 0,5 mL |
| Tris - HCl 1 M (pH 6,8) | 0,38 mL |
| SDS 10 % (p/v) | 0,03 mL |
| Persulfato de amonio 10 % (p/v) | 0,03 mL |
| TEMED | 0,003 mL |

9.1.4.2. Gel separador 12 %

| Componente | Cantidad para un gel |
|--------------------------------------|-----------------------------|
| Agua desionizada | 1,6 mL |
| Acrilamida - Bisacrilamida 30% (p/v) | 2,0 mL |
| Tris - HCl 1,5 M (pH 8,8) | 1,3 mL |
| SDS 10 % (p/v) | 0,05 mL |
| Persulfato de amonio 10 % (p/v) | 0,05 mL |
| TEMED | 0,002 mL |

10. BIBLIOGRAFÍA

- Aebersold, R & Goodlett, D., 2001. Mass Spectrometry in Proteomics. *Chem. Rev.* 101, 269–295. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-38-0_35
- Aebersold, R., Mann, M., 2016. Mass-spectrometric exploration of proteome structure and function. *Nature* 537, 347–355. <https://doi.org/10.1038/nature19949>
- Ahmad, H., Sehgal, S., Mishra, A., Gupta, R., 2012. *Mimosa pudica* L. (Laajvanti): An overview. *Pharmacogn. Rev.* 6, 115–124. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.99945>
- Alvarez-Ortega, C., Olivares, J., Martínez, J.L., 2013. RND multidrug efflux pumps: What are they good for? *Front. Microbiol.* 4, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00007>
- Amadou, C., Mangenot, S., Glew, M., Bontemps, C., Capela, D., Dossat, C., Marchetti, M., Servin, B., Saad, M., Schenowitz, C., Batut, J., Masson-boivin, C., 2008. Genome sequence of the α -rhizobium *Cupriavidus taiwanensis* and comparative genomics of rhizobia. *Genome Res.* 1472–1483. <https://doi.org/10.1101/gr.076448.108.7>
- Amarelle, V., Koziol, U., Rosconi, F., Noya, F., O'Brian, M.R., Fabiano, E., 2010. A new small regulatory protein, HmuP, modulates haemin acquisition in *Sinorhizobium meliloti*. *Microbiology* 156, 1873–1882. <https://doi.org/10.1099/mic.0.037713-0>
- Amarelle, V., O'Brian, M.R., Fabiano, E., 2008. ShmR is essential for utilization of heme as a nutritional iron source in *Sinorhizobium meliloti*. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 6473–6475. <https://doi.org/10.1128/AEM.01590-08>
- Andrews, M., Andrews, M.E., 2017. Specificity in legume-rhizobia symbioses. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 1–39. <https://doi.org/10.3390/ijms18040705>
- Azani, N., Babineau, M., Bailey, C.D., Banks, H., Barbosa, A.R., Pinto, R.B., Boatwright, J.S., Borges, L.M., Brown, G.K., Bruneau, A., Candido, E., Cardoso, D., Chung, K.F., Clark, R.P., Conceição, A.D.S., Crisp, M., Cubas, P., Delgado-Salinas, A., Dexter, K.G., Doyle, J.J., Duminil, J., Egan, A.N., De La Estrella, M., Falcão, M.J., Filatov, D.A., Fortuna-Perez, A.P., Fortunato, R.H., Gagnon, E., Gasson, P., Rando, J.G., Tozzi, A.M.G. de A., Gunn, B., Harris, D., Haston, E., Hawkins, J.A., Herendeen, P.S., Hughes, C.E., Iganci, J.R.V., Javadi, F., Kanu, S.A., Kazempour-Osaloo, S., Kite, G.C., Klitgaard, B.B., Kochanovski, F.J., Koenen, E.J.M., Kovar, L., Lavin, M., Roux, M. Le, Lewis, G.P., De Lima, H.C., López-Roberts, M.C., Mackinder, B., Maia, V.H., Malécot, V., Mansano, V.F., Marazzi, B., Mattapha, S., Miller, J.T., Mitsuyuki, C., Moura, T., Murphy, D.J., Nageswara-Rao, M., Nevado, B., Neves, D., Ojeda, D.I., Toby Pennington, R., Prado, D.E., Prenner, G., De Queiroz, L.P., Ramos, G., Filardi, F.L.R., Ribeiro, P.G., Rico-Arce, M.D.L., Sanderson, M.J., Santos-Silva, J., São-Mateus, W.M.B., Silva, M.J.S., Simon, M.F., Sinou, C., Snak, C., de Souza, É.R., Sprent, J., Steele, K.P., Steier, J.E., Steeves, R., Stirton, C.H., Tagane, S., Torke, B.M.,

- Toyama, H., Da Cruz, D.T., Vatanparast, M., Wieringa, J.J., Wink, M., Wojciechowski, M.F., Yahara, T., Yi, T., Zimmerman, E., 2017. A new subfamily classification of the leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny. *Taxon* 66, 44–77. <https://doi.org/10.12705/661.3>
- Azcón-Bieto, J., Talón, M., 2003. *Fundamentos de fisiología vegetal*, 2ª. ed.
- Baldwin, M.A., 2004. Protein identification by mass spectrometry: Issues to be considered. *Mol. Cell. Proteomics* 3, 1–9. <https://doi.org/10.1074/mcp.R300012-MCP200>
- Barrett, C.F., Parker, M.A., 2006. Bacteria on two *Mimosa* spp. in Costa Rica 72, 1198–1206. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.2.1198>
- Battistoni, F., Duran, R., Cerven, C., Battistoni, J., Arias, A., Fabiano, E., 2002. Identification of an Iron-Regulated, Hemin-Binding Outer Membrane Protein in *Sinorhizobium meliloti*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 5877–5881. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.12.5877>
- Bhattacharjee, R.B., Singh, A., Mukhopadhyay, S.N., 2008. Use of nitrogen-fixing bacteria as biofertiliser for non-legumes: Prospects and challenges. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80, 199–209. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1567-2>
- Blanco, P., Hernando-Amado, S., Reales-Calderon, J., Corona, F., Lira, F., Alcalde-Rico, M., Bernardini, A., Sanchez, M., Martinez, J., 2016. Bacterial Multidrug Efflux Pumps: Much More Than Antibiotic Resistance Determinants. *Microorganisms* 4, 1–19. <https://doi.org/10.3390/microorganisms4010014>
- Bomfeti, C.A., Florentino, L.A., Guimarães, A.P., Cardoso, P.G., Guerreiro, M.C., Moreira, F.M. de S., 2011. Exopolysaccharides produced by the symbiotic nitrogen-fixing bacteria of leguminosae. *Rev. Bras. Ciência do Solo* 35, 657–671. <https://doi.org/10.1590/s0100-06832011000300001>
- Bonaldi, K., Gourion, B., Fardoux, J., Hannibal, L., Cartieaux, F., Boursot, M., Vallenet, D., Chaintreuil, C., Prin, Y., Nouwen, N., Giraud, E., 2010. Large-scale transposon mutagenesis of photosynthetic *Bradyrhizobium* sp. strain ORS278 reveals new genetic loci putatively important for nod-independent symbiosis with *Aeschynomene indica*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 23, 760–770. <https://doi.org/10.1094/MPMI-23-6-0760>
- Bontemps, C., Elliott, G.N., Simon, M.F., Dos Reis Júnior, F.B., Gross, E., Lawton, R.C., Neto, N.E., De Fátima Loureiro, M., De Faria, S.M., Sprent, J.I., James, E.K., Young, J.P.W., 2010. Burkholderia species are ancient symbionts of legumes. *Mol. Ecol.* 19, 44–52. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04458.x>
- Bontemps, C., Rogel, M.A., Wiechmann, A., Mussabekova, A., Moody, S., Simon, M.F., Moulin, L., Elliott, G.N., Lacercat-Didier, L., Dasilva, C., Grether, R., Camargo-Ricalde, S.L., Chen, W., Sprent, J.I., Martínez-Romero, E., Young, J.P.W., James, E.K., 2016. Endemic *Mimosa* species from Mexico prefer alphaproteobacterial rhizobial symbionts. *New Phytol.* 209, 319–333.

<https://doi.org/10.1111/nph.13573>

- Boyd, E.S., Hamilton, T.L., Peters, J.W., 2011. An alternative path for the evolution of biological nitrogen fixation 2, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00205>
- Brencic, A & Winans, S., 2005. Detection of and Response to Signals Involved in Host-Microbe Interactions by Plant-Associated Bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 69, 155–194. <https://doi.org/10.1128/MMBR.69.1.155>
- Bruijn, F.J. De, 2015. *Biological Nitrogen Fixation*. Springer.
- Carvalho, P.C., Lima, D.B., Leprevost, F. V, Santos, M.D.M., Fischer, J.S.G., Aquino, P.F., Moresco, J.J., Iii, J.R.Y., Valmir, C., 2016. PatternLab for proteomics 4.0: A one-stop shop for analyzing shotgun proteomic data. *Nat. Protoc.* 11, 102–117. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.133>.PatternLab
- Cesco, S., Mimmo, T., Tonon, G., Tomasi, N., Pinton, R., Terzano, R., Neumann, G., Weisskopf, L., Renella, G., Landi, L., Nannipieri, P., 2012. Plant-borne flavonoids released into the rhizosphere: Impact on soil bio-activities related to plant nutrition. A review. *Biol. Fertil. Soils* 48, 123–149. <https://doi.org/10.1007/s00374-011-0653-2>
- Chain, P.S.G., Denef, V.J., Konstantinidis, K.T., Vergez, L.M., Agulló, L., Reyes, V.L., Hauser, L., Córdova, M., Gómez, L., González, M., Land, M., Lao, V., Larimer, F., LiPuma, J.J., Mahenthiralingam, E., Malfatti, S.A., Marx, C.J., Parnell, J.J., Ramette, A., Richardson, P., Seeger, M., Smith, D., Spilker, T., Sul, W.J., Tsoi, T. V., Ulrich, L.E., Zhulin, I.B., Tiedje, J.M., 2006. *Burkholderia xenovorans* LB400 harbors a multi-replicon, 9.73-Mbp genome shaped for versatility. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 15280–15287. <https://doi.org/10.1073/pnas.0606924103>
- Chatterjee, A., Hazra, A.B., Abdelwahed, S., Hilmey, D.G., Begley, T.P., 2010. A Radical dance in thiamin biosynthesis: Mechanistic analysis of the bacterial hydroxymethylpyrimidine phosphate synthase. *Angew. Chemie - Int. Ed.* 49, 8653–8656. <https://doi.org/10.1002/anie.201003419>
- Chatterjee, A., Li, Y., Zhang, Y., Grove, T.L., Lee, M., Krebs, C., Booker, S.J., Begley, T.P., Ealick, S.E., 2008. Reconstitution of ThiC in thiamine pyrimidine biosynthesis expands the radical SAM superfamily. *Nat. Chem. Biol.* 4, 758–765. <https://doi.org/10.1038/nchembio.121>
- Chen, H., Higgins, J., Oresnik, I.J., Hynes, M.F., Natera, S., Djordjevic, M.A., Weinman, J.J., Rolfe, B.G., 2000. Proteome analysis demonstrates complex replicon and luteolin interactions in pSyma-cured derivatives of *Sinorhizobium meliloti* strain 2011. *Electrophoresis* 21, 3833–3842. [https://doi.org/10.1002/1522-2683\(200011\)21:17<3833::AID-ELPS3833>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/1522-2683(200011)21:17<3833::AID-ELPS3833>3.0.CO;2-I)
- 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. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-5-1729>

- Chen, W.M., Prell, J., James, E.K., Sheu, D.S., Sheu, S.Y., 2012. Biosynthesis of branched-chain amino acids is essential for effective symbioses between betarhizobia and *Mimosa pudica*. *Microbiol. (United Kingdom)* 158, 1758–1766. <https://doi.org/10.1099/mic.0.058370-0>
- Chen, W.X., Yan, G.H., Li, J.L., 1988. Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 38, 392–397. <https://doi.org/10.1099/00207713-38-4-392>
- Chiancone, E., Ceci, P., 2010. Role of Dps (DNA-binding proteins from starved cells) aggregation on DNA. *Front. Biosci.* 15, 122–131.
- Cooper, B., Campbell, K.B., Beard, H.S., Garrett, W.M., Mowery, J., Bauchan, G.R., Elia, P., 2018. A proteomic network for symbiotic nitrogen fixation efficiency in *Bradyrhizobium elkanii*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 31, 334–343. <https://doi.org/10.1094/MPMI-10-17-0243-R>
- Cooper, J.E., 2004. Multiple Responses of Rhizobia to Flavonoids During Legume Root Infection. *Adv. Bot. Res.* 41, 1–62. [https://doi.org/10.1016/S0065-2296\(04\)41001-5](https://doi.org/10.1016/S0065-2296(04)41001-5)
- Crews, T.E., Peoples, M.B., 2004. Legume versus fertilizer sources of nitrogen : ecological tradeoffs and human needs. *Agric. Ecosyst. Environ.* 102, 279–297. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2003.09.018>
- Croci, C., 2020. Dinámica de la expresión de los genes nod de rizobios pertenecientes al género *Cupriavidus*. Facultad de Ciencias, UdelaR.
- Čuklina, J., Hahn, J., Imakaev, M., Omasits, U., Förstner, K.U., Ljubimov, N., Goebel, M., Pessi, G., Fischer, H.M., Ahrens, C.H., Gelfand, M.S., Evgenieva-Hackenberg, E., 2016. Genome-wide transcription start site mapping of *Bradyrhizobium japonicum* grown free-living or in symbiosis - a rich resource to identify new transcripts, proteins and to study gene regulation. *BMC Genomics* 17, 1–19. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2602-9>
- D'Antuono, A.L., Casabuono, A., Couto, A., Ugalde, R.A., Lepek, V.C., 2005. Nodule development induced by *Mesorhizobium loti* mutant strains affected in polysaccharide synthesis. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 18, 446–457. <https://doi.org/10.1094/MPMI-18-0446>
- Da Silva, J.R., Alexandre, A., Brígido, C., Oliveira, S., 2017. Can stress response genes be used to improve the symbiotic performance of rhizobia? *AIMS Microbiol.* 3, 365–382. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2017.3.365>
- Day, D.A., Poole, P.S., Tyerman, S.D., Rosendahl, L., 2001. Ammonia and amino acid transport across symbiotic membranes in nitrogen-fixing legume nodules. *Cell. Mol. Life Sci.* 58, 61–71. <https://doi.org/10.1007/PL00000778>
- de los Santos, M.C., Taulé, C., Mareque, C., Beracochea, M., Battistoni, F., 2016. Identification and characterization of the part of the bacterial community

associated with field-grown tall fescue (*Festuca arundinacea*) cv. SFRO Don Tomás in Uruguay. *Ann. Microbiol.* 66, 329–342. <https://doi.org/10.1007/s13213-015-1113-2>

Diez, R., Herbstreith, M., Osorio, C., Alzate, O., 2010. 2-D Fluorescence Difference Gel Electrophoresis (DIGE) in Neuroproteomics, in: Alzate, O. (Ed.), *Neuroproteomics*.

Djordjevic, M.A., 2004. Sinorhizobium meliloti metabolism in the root nodule: A proteomic perspective. *Proteomics* 4, 1859–1872. <https://doi.org/10.1002/pmic.200300802>

Djordjevic, M.A., Chen, H.C., Natera, S., Van Noorden, G., Menzel, C., Taylor, S., Renard, C., Geiger, O., Galibert, F., Finan, T.M., Long, S.R., Puhler, A., Abola, P., Ampe, F., Barloy-Hubler, F., Barnett, M.J., Becker, A., Boistard, P., Bothe, G., Boutry, M., Bowser, L., Buhrmester, J., Cadieu, E., Capela, D., Chain, P., Cowie, A., Davis, R.W., Dreano, S., Federspiel, N.A., Fisher, R.F., Gloux, S., Godrie, T., Goffeau, A., Golding, B., Gouzy, G., Gurjal, M., Hernandez-Lucas, I., Hong, A., Huizar, L., Hyman, R.W., Jones, T., Kahn, D., Kahn, M.L., Kalman, S., Keating, D.H., Kiss, E., Komp, C., Lelaure, V., Masuy, D., Palm, C., Peck, M.C., Pohl, T.M., Portetelle, D., Purnelle, B., Ramsperger, U., Surzycki, R., Thébault, P., Vandenbol, M., Vorhölter, F.J., Weidner, S., Wells, D.H., Wong, K., Yeh, K.C., Batut, J., Weiller, G.F., 2003. A global analysis of protein expression profiles in *Sinorhizobium meliloti*: Discovery of new genes for nodule occupancy and stress adaptation. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 16, 508–524. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2003.16.6.508>

dos Reis, F., Simon, M., Gross, E., Boddey, R., Elliott, G., Neto, N., Loureiro, M., Queiroz, L., Scotti, M., Chen, W.M., Norén, A., Rubio, M., de Faria, S., Bontemps, C., Goi, S., Young, J., Sprent, J.I., James, E.K., 2010. Nodulation and nitrogen fixation by *Mimosa* spp. in the Cerrado and Caatinga biomes of Brazil. *New Phytol* 186, 934–946.

Downie, J.A., 2010. The roles of extracellular proteins, polysaccharides and signals in the interactions of rhizobia with legume roots. *FEMS Microbiol. Rev.* 34, 150–170. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00205.x>

Dunn, M.F., 2015. Key roles of microsymbiont amino acid metabolism in rhizobia-legume interactions. *Crit. Rev. Microbiol.* 41, 411–451. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2013.856854>

Elliott, G.N., Chen, W.M., Chou, J.H., Wang, H.C., Sheu, S.Y., Perin, L., Reis, V.M., Moulin, L., Simon, M.F., Bontemps, C., Sutherland, J.M., Bessi, R., De Faria, S.M., Trinick, M.J., Prescott, A.R., Sprent, J.I., James, E.K., 2006. *Burkholderia phymatum* is a highly effective nitrogen-fixing symbiont of *Mimosa* spp. and fixes nitrogen ex planta. *New Phytol.* 173, 168–180. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01894.x>

Eng, J.K., McCormack, A.L., Yates, J.R., 1994. An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 5, 976–989. <https://doi.org/10.1016/1044->

- Estrada-de los Santos, P., Palmer, M., Chávez-Ramírez, B., Beukes, C., Steenkamp, E.T., Briscoe, L., Khan, N., Maluk, M., Lafos, M., Humm, E., Arrabit, M., Crook, M., Gross, E., Simon, M.F., dos Reis Junior, F.B., Whitman, W.B., Shapiro, N., Poole, P.S., Hirsch, A.M., Venter, S.N., James, E.K., 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* (Basel). 9, 1–23. <https://doi.org/10.3390/genes9080389>
- Estrada de los Santos, P., Vacaseydel-aceves, N.B., Mart, L., Mendoza-herrera, A., Caballero-mellado, J., 2011. Cupriavidus and Burkholderia Species Associated with Agricultural Plants that Grow in Alkaline Soils 49, 867–876. <https://doi.org/10.1007/s12275-011-1127-9>
- Fabiano, E., Arias, A., 1990. Identification of inoculant strains and naturalized populations of Rhizobium leguminosarum bv trifolii using complementary methodologies. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 6, 121–126. <https://doi.org/10.1007/BF01200931>
- Fani, R., Gallo, R., Lio, P., 2000. Molecular Evolution of Nitrogen Fixation: The Evolutionary History of the nifD , nifK , nifE , and nifN Genes 51, 1–11. <https://doi.org/10.1007/s002390010061>
- Fasman, G., 1990. Practical handbook of bio- chemistry and molecular biology.
- Feng, Z., Zhang, J., Chen, G., Ge, Y., Zhang, X., Zhu, H., 2019. Extracellular Expression of L-Aspartate- α -Decarboxylase from Bacillus tequilensis and Its Application in the Biosynthesis of β -Alanine. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 189, 273–283. <https://doi.org/10.1007/s12010-019-03013-1>
- Fischer, H.M., Schneider, K., Babst, M., Hennecke, H., 1999. GroEL chaperonins are required for the formation of a functional nitrogenase in Bradyrhizobium japonicum. *Arch. Microbiol.* 171, 279–289. <https://doi.org/10.1007/s002030050711>
- Fischer, S.E., Miguel, M.J., Mori, G.B., 2003. Effect of root exudates on the exopolysaccharide composition and the lipopolysaccharide profile of Azospirillum brasilense Cd under saline stress. *FEMS Microbiol. Lett.* 219, 53–62. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(02\)01194-1](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(02)01194-1)
- Franche, C., Lindström, K., 2009. Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants 321, 35–59. <https://doi.org/10.1007/s11104-008-9833-8>
- Garabato, F., 2018. Descripción de nuevos rizobios asociados a leguminosas nativas. Facultad de Ciencias, Udelar.
- Gehlot, H.S., Tak, N., Kaushik, M., Mitra, S., Chen, W.M., Poweleit, N., Panwar, D., Poonar, N., Parihar, R., Tak, A., Sankhla, I.S., Ojha, A., Rao, S.R., Simon, M.F., Reis

- Junior, F.B. Dos, Perigolo, N., Tripathi, A.K., Sprent, J.I., Young, J.P.W., James, E.K., Gyaneshwar, P., 2013. An invasive *Mimosa* in India does not adopt the symbionts of its native relatives. *Ann. Bot.* 112, 179–196. <https://doi.org/10.1093/aob/mct112>
- Gescher, J., Zaar, A., Mohamed, M., Schägger, H., Fuchs, G., 2002. Genes coding for a new pathway of aerobic benzoate metabolism in *Azoarcus evansii*. *J. Bacteriol.* 184, 6301–6315. <https://doi.org/10.1128/JB.184.22.6301-6315.2002>
- Gibson, K.E., Kobayashi, H., Walker, G.C., 2008. Molecular Determinants of a Symbiotic Chronic Infection. *Annu. Rev. Genet.* 42, 413–441. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.42.110807.091427>
- Goris, J., De Vos, P., Coenye, T., Hoste, B., Jansses, D., Brim, H., Diels, L., Mergeay, M., Kersters, K., Vandamme, P., 2001. Classification of metal-resistant bacteria from industrial biotopes as *Ralstonia campinensis* sp. nov., *Ralstonia metallidurans* sp. nov. and *Ralstonia basilensis* Steinle et al. 1998 emend. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 1773–1782. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-5-1773>
- Gottfert, M., Grob, P., Hennecke, H., 1990. Proposed regulatory pathway encoded by the *nodV* and *nodW* genes, determinants of host specificity in *Bradyrhizobium japonicum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 2680–2684. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.7.2680>
- Griesmann, M., Chang, Y., Liu, X., Song, Y., Haberer, G., Crook, M.B., Billault-Penneteau, B., Laouressergues, D., Keller, J., Imanishi, L., Roswanjaya, Y.P., Kohlen, W., Pujic, P., Battenberg, K., Alloisio, N., Liang, Y., Hilhorst, H., Salgado, M.G., Hoher, V., Gherbi, H., Svistoonoff, S., Doyle, J.J., He, S., Xu, Y., Xu, S., Qu, J., Gao, Q., Fang, X., Fu, Y., Normand, P., Berry, A.M., Wall, L.G., Ané, J.M., Pawlowski, K., Xu, X., Yang, H., Spannagl, M., Mayer, K.F.X., Wong, G.K.S., Parniske, M., Delaux, P.M., Cheng, S., 2018. Phylogenomics reveals multiple losses of nitrogen-fixing root nodule symbiosis. *Science* (80-.). 361, 1–11. <https://doi.org/10.1126/science.aat1743>
- Guerreiro, N., Djordjevic, M.A., Rolfe, B.G., 1999. Proteome analysis of the model microsymbiont *Sinorhizobium meliloti*: isolation and characterisation of novel proteins. *From Genome to Proteome Adv. Pract. Appl. Proteomics* 20, 818–825. <https://doi.org/10.1002/9783527613489.ch30>
- Gully, D., Czernic, P., Cruveiller, S., Mahé, F., Longin, C., Vallenet, D., François, P., Nidelet, S., Rialle, S., Giraud, E., Arrighi, J.F., DasGupta, M., Cartieaux, F., 2018. Transcriptome Profiles of Nod Factor-independent Symbiosis in the Tropical Legume *Aeschynomene evenia*. *Sci. Rep.* 8, 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29301-0>
- Gutiérrez-Luna, F.M., López-Bucio, J., Altamirano-Hernández, J., Valencia-Cantero, E., De La Cruz, H.R., Macías-Rodríguez, L., 2010. Plant growth-promoting rhizobacteria modulate root-system architecture in *Arabidopsis thaliana* through volatile organic compound emission. *Symbiosis* 51, 75–83. <https://doi.org/10.1007/s13199-010-0066-2>
- Hassan, S., Mathesius, U., 2012. The role of flavonoids in root-rhizosphere signalling:

- Opportunities and challenges for improving plant-microbe interactions. *J. Exp. Bot.* 63, 3429–3444. <https://doi.org/10.1093/jxb/err430>
- Hayat, R., Ali, S., Amara, U., Khalid, R., Ahmed, I., 2010. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: A review. *Ann. Microbiol.* 60, 579–598. <https://doi.org/10.1007/s13213-010-0117-1>
- Herring, C.D., Glasner, J.D., Blattner, F.R., 2003. Gene replacement without selection: Regulated suppression of amber mutations in *Escherichia coli*. *Gene* 311, 153–163. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(03\)00585-7](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(03)00585-7)
- Higgins, C.F., Linton, K.J., 2004. The ATP switch model for ABC transporters. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11, 918–926. <https://doi.org/10.1038/nsmb836>
- Hodge-Hanson, K.M., Downs, D.M., 2017. Members of the Rid protein family have broad imine deaminase activity and can accelerate the *Pseudomonas aeruginosa* D-arginine dehydrogenase (DauA) reaction in vitro. *PLoS One* 12, 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185544>
- Howieson, J.G., Robson, A.D., Ewing, M.A., 1993. External phosphate and calcium concentrations, and Ph, but not the products of rhizobial nodulation genes, affect the attachment of rhizobium meliloti to roots of annual medics. *Soil Biol. Biochem.* 25, 567–573. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(93\)90195-H](https://doi.org/10.1016/0038-0717(93)90195-H)
- Huergo, L.F., Dixon, R., 2015. The Emergence of 2-Oxoglutarate as a Master Regulator Metabolite. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 79, 419–435. <https://doi.org/10.1128/membr.00038-15>
- 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, 4–5. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01258-16>
- Izaguirre, P., 2005. Uruguay y sus recursos fitogenéticos en leguminosas. *Agrociencias* 9, 77–83.
- Izaguirre, P., Beyhaut, R., 2009. Nuevas especies del género *Mimosa* de las subseries Axillares y Reptantes (*Mimosidae-Leguminosae*) en el distrito uruguayense de la región Neotropical. *Bol. Soc. Arg. Bot.* 44, 351–359.
- Izaguirre, P., Beyhaut, R., 2003a. Las leguminosas del Uruguay y regiones vecinas. Parte 1: Papilionoidea.
- Izaguirre, P., Beyhaut, R., 2003b. Las Leguminosas en Uruguay y Regiones Vecinas.
- Jenkins, S.T., Bennett, P.M., 1976. Effect of mutations in deoxyribonucleic acid repair pathways on the sensitivity of *Escherichia coli* K-12 strains to nitrofurantoin. *J. Bacteriol.* 125, 1214–1216. <https://doi.org/10.1128/jb.125.3.1214-1216.1976>
- Jordan, D.C., 1982. Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 32, 136–139.

<https://doi.org/10.1099/00207713-32-1-136>

- Karas, V.O., Westerlaken, I., Meyer, A.S., 2015. The DNA-binding protein from starved cells (Dps) utilizes dual functions to defend cells against multiple stresses. *J. Bacteriol.* 197, 3206–3215. <https://doi.org/10.1128/JB.00475-15>
- Karunakaran, R., Ebert, K., Harvey, S., Leonard, M.E., Ramachandran, V., Poole, P.S., 2006. Thiamine is synthesized by a salvage pathway in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* strain 3841. *J. Bacteriol.* 188, 6661–6668. <https://doi.org/10.1128/JB.00641-06>
- 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. *MGG Mol. Gen. Genet.* 233, 293–301. <https://doi.org/10.1007/BF00587591>
- Klonowska, A., Chaintreuil, C., Tisseyre, P., Miche, L., Melkonian, R., Ducouso, M., Laguerre, G., Brunel, Brigitte & Moulin, L., 2012. Biodiversity of *Mimosa pudica* rhizobial symbionts (*Cupriavidus taiwanensis*, *Rhizobium mesoamericanum*) in New Caledonia and their adaptation to heavy metal-rich soils. *Microb. Ecol.* 1–18. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2012.01393.x>
- Klonowska, A., Melkonian, R., Miché, L., Tisseyre, P., Moulin, L., 2018. Transcriptomic profiling of *Burkholderia phymatum* STM815, *Cupriavidus taiwanensis* LMG19424 and *Rhizobium mesoamericanum* STM3625 in response to *Mimosa pudica* root exudates illuminates the molecular basis of their nodulation competitiveness and symbiotic ev. *BMC Genomics* 19, 1–22. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4487-2>
- Klose, J., 1975. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues - A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Hum. Genet.* 26, 231–243. <https://doi.org/10.1007/BF00281458>
- Knief, C., Delmotte, N., Vorholt, J.A., 2011. Bacterial adaptation to life in association with plants - A proteomic perspective from culture to in situ conditions. *Proteomics* 11, 3086–3105. <https://doi.org/10.1002/pmic.201000818>
- Kumar, A., Verma, J.P., 2018. Does plant—Microbe interaction confer stress tolerance in plants: A review? *Microbiol. Res.* 207, 41–52. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.11.004>
- Kyungseok, P., Kloepper, J.W., Ryu, C.-M., 2008. Rhizobial exopolysaccharides elicit induced resistance on cucumber. *J. Microbiol. Biotechnol.* 18, 1095–1100.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Lagunas, B., Schäfer, P., Gifford, M.L., 2015. Housing helpful invaders: The

- evolutionary and molecular architecture underlying plant root-mutualist microbe interactions. *J. Exp. Bot.* 66, 2177–2186. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv038>
- Lammel, D.R., Cruz, L.M., Carrer, H., Cardoso, E.J.B.N., 2013. Diversity and symbiotic effectiveness of beta-rhizobia isolated from sub-tropical legumes of a Brazilian Araucaria Forest. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 29, 2335–2342. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1400-7>
- Ledbetter, R.N., Garcia Costas, A.M., Lubner, C.E., Mulder, D.W., Tokmina-Lukaszewska, M., Artz, J.H., Patterson, A., Magnuson, T.S., Jay, Z.J., Duan, H.D., Miller, J., Plunkett, M.H., Hoben, J.P., Barney, B.M., Carlson, R.P., Miller, A.F., Bothner, B., King, P.W., Peters, J.W., Seefeldt, L.C., 2017. The Electron Bifurcating FixABCX Protein Complex from *Azotobacter vinelandii*: Generation of Low-Potential Reducing Equivalents for Nitrogenase Catalysis. *Biochemistry* 56, 4177–4190. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.7b00389>
- Ledger, T., Zúñiga, A., Kraiser, T., Dasencich, P., Donoso, R., Pérez-Pantoja, D., González, B., 2012. Aromatic compounds degradation plays a role in colonization of *Arabidopsis thaliana* and *Acacia caven* by *Cupriavidus pinatubonensis* JMP134. *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* 101, 713–723. <https://doi.org/10.1007/s10482-011-9685-8>
- Lemaire, B., Chimphango, S.B.M., Stirton, C., Rafudeen, S., Honnay, O., Smets, E., Chen, W., 2016. from African Fynbos to Continental Scales. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 5099–5115. <https://doi.org/10.1128/AEM.00591-16>. Editor
- Lemaire, B., Dlodlo, O., Chimphango, S., Stirton, C., Schrire, B., Boatwright, J.S., Honnay, O., Smets, E., Sprent, J., James, E.K., Muasya, A.M., 2015. Symbiotic diversity, specificity and distribution of rhizobia in native legumes of the Core Cape Subregion (South Africa). *FEMS Microbiol. Ecol.* 91, 1–17. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiu024>
- Lindström, K., Mousavi, S.A., 2019. Effectiveness of nitrogen fixation in rhizobia. *Microb. Biotechnol.* 0, 1–22. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13517>
- Liu, A., Contador, C.A., Fan, K., Lam, H.M., 2018. Interaction and regulation of carbon, nitrogen, and phosphorus metabolisms in root nodules of legumes. *Front. Plant Sci.* 871, 1–18. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01860>
- Liu, C.W., Murray, J.D., 2016. The role of flavonoids in nodulation host-range specificity: An update. *Plants* 5, 4045–4053. <https://doi.org/10.3390/plants5030033>
- Liu, H., Sadygov, R.G., Yates, J.R., 2004. A model for random sampling and estimation of relative protein abundance in shotgun proteomics. *Anal. Chem.* 76, 4193–4201. <https://doi.org/10.1021/ac0498563>
- Loh, J., Garcia, M., Stacey, G., 1997. NodV and NodW, a second flavonoid recognition system regulating nod gene expression in *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.* 179, 3013–3020. <https://doi.org/10.1128/jb.179.9.3013-3020.1997>

- Luciński, R., Polcyn, W., Ratajczak, L., 2002. Nitrate reduction and nitrogen fixation in symbiotic association Rhizobium - Legumes. *Acta Biochim. Pol.* 49, 537–546. https://doi.org/10.18388/abp.2002_3813
- Lundgren H., D., Hwang, S.-I., Wu, L., Han K., D., 2010. Role of spectral counting in quantitative proteomics. *Expert Rev. Proteomics* 7, 39–53.
- Lykidis, A., Pérez-Pantoja, D., Ledger, T., Mavromatis, K., Anderson, I.J., Ivanova, N.N., Hooper, S.D., Lapidus, A., Lucas, S., González, B., Kyrpides, N.C., 2010. The complete multipartite genome sequence of *Cupriavidus necator* JMP134, a versatile pollutant degrader. *PLoS One* 5, 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009729>
- Makkar, N.S., Casida, L.E., 1987. *Cupriavidus necator* gen. nov., sp. nov.; a Nonobligate Bacterial Predator of Bacteria in Soil. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37, 323–326. <https://doi.org/10.1099/00207713-37-4-323>
- Mann, M., Hendrickson, R.C., Pandey, A., 2001. Analysis of Proteins and Proteomes By Mass Spectrometry. *Outlook* 70, 437–473.
- Marchetti, M., Capela, D., Glew, M., Cruveiller, S., Chane-Woon-Ming, B., Gris, C., Timmers, T., Poinso, V., Gilbert, L.B., Heeb, P., Médigue, C., Batut, J., Masson-Boivin, C., 2010. Experimental evolution of a plant pathogen into a legume symbiont. *PLoS Biol.* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000280>
- Mareque, C., Taulé, C., Beracochea, M., Battistoni, F., 2015. Isolation, characterization and plant growth promotion effects of putative bacterial endophytes associated with sweet sorghum (*Sorghum bicolor* (L) Moench). *Ann. Microbiol.* 65, 1057–1067. <https://doi.org/10.1007/s13213-014-0951-7>
- Martin, F.M., Uroz, S., Barker, D.G., 2017. Ancestral alliances: Plant mutualistic symbioses with fungi and bacteria. *Science* (80-.). 356, 1–9. <https://doi.org/10.1126/science.aad4501>
- Martinez-García, E & de Lorenzo, V., 2012. Transposon-Based and Plasmid-Based Genetic Tools for Editing Genomes of Gram-Negative Bacteria. *Synth. Gene Networks Methods Protoc. Methods Mol. Biol.* 813, 267–283. <https://doi.org/10.1002/9780470437988.ch15>
- Marx, H., Minogue, C.E., Jayaraman, D., Richards, A.L., Kwiecien, N.W., Siahpirani, A.F., Rajasekar, S., Maeda, J., Garcia, K., Del Valle-Echevarria, A.R., Volkening, J.D., Westphall, M.S., Roy, S., Sussman, M.R., Ané, J.M., Coon, J.J., 2016. A proteomic atlas of the legume *Medicago truncatula* and its nitrogen-fixing endosymbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Nat. Biotechnol.* 34, 1198–1205. <https://doi.org/10.1038/nbt.3681>
- Masson-Boivin, C., Giraud, E., Perret, X., Batut, J., 2009. Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes? *Trends Microbiol.* 17, 458–466. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2009.07.004>
- Masson-Boivin, C., Sachs, J.L., 2018. Symbiotic nitrogen fixation by rhizobia — the

- roots of a success story. *Curr. Opin. Plant Biol.* 44, 7–15. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2017.12.001>
- Melkonian, R., Moulin, L., Béna, G., Tisseyre, P., Chaintreuil, C., Heulin, K., Rezkallah, N., Klonowska, A., Gonzalez, S., Simon, M., Chen, W.M., James, E.K., Laguerre, G., 2014. The geographical patterns of symbiont diversity in the invasive legume *Mimosa pudica* can be explained by the competitiveness of its symbionts and by the host genotype. *Environ. Microbiol.* 16, 2099–2111. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12286>
- Meneses, N., Mendoza-Hernández, G., Encarnación, S., 2010. The extracellular proteome of *Rhizobium etli* CE3 in exponential and stationary growth phase. *Proteome Sci.* 8, 1–11. <https://doi.org/10.1186/1477-5956-8-51>
- Miranda-Ríos, J., Morera, C., Taboada, H., Dávalos, A., Encarnación, S., Mora, J., Soberón, M., 1997. Expression of thiamin biosynthetic genes (*thiCOGE*) and production of symbiotic terminal oxidase *cbb3* in *Rhizobium etli*. *J. Bacteriol.* 179, 6887–6893. <https://doi.org/10.1128/jb.179.22.6887-6893.1997>
- Mishra, R.P.N., Tisseyre, P., Melkonian, R., Chaintreuil, C., Miché, L., Klonowska, A., Gonzalez, S., Bena, G., Laguerre, G., Moulin, L., 2012. Genetic diversity of *Mimosa pudica* rhizobial symbionts in soils of French Guiana: Investigating the origin and diversity of *Burkholderia phymatum* and other beta-rhizobia. *FEMS Microbiol. Ecol.* 79, 487–503. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01235.x>
- Monza, J., Fabiano, E., Arias, A., 1992. Characterization of an indigenous population of rhizobia nodulating *Lotus corniculatus*. *Soil Biol. Biochem.* 24, 241–247. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(92\)90225-M](https://doi.org/10.1016/0038-0717(92)90225-M)
- Monza, J., Márquez, A., 2004. *El Metabolismo del nitrógeno en las plantas, Agricultura y ganadería. Colección Agricultura y Ganadería Almuzara.*
- Morel, M., Castro-Sowinski, S., 2013. Plant microbe symbiosis: Fundamentals and advances, in: N.K. Arora (Ed.), *Plant Microbe Symbiosis: Fundamentals and Advances.* pp. 169–199. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-1287-4>
- Moulin, L., Munive, A., Dreyfus, B., Boivin-masson, C., 2001. Nodulation of legumes by members of the β -subclass of Proteobacteria 411, 948–950.
- Müller, A., Langklotz, S., Lupilova, N., Kuhlmann, K., Bandow, J.E., Leichert, L.I.O., 2014. Activation of *RidA* chaperone function by N-chlorination. *Nat. Commun.* 5, 1–14. <https://doi.org/10.1038/ncomms6804>
- Mulley, G., White, J.P., Karunakaran, R., Prell, J., Bourdes, A., Bunnell, S., Hill, L., Poole, P.S., 2011. Mutation of *GOGAT* prevents pea bacteroid formation and N_2 fixation by globally downregulating transport of organic nitrogen sources. *Mol. Microbiol.* 80, 149–167. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07565.x>
- Nelson, M.S., Sadowsky, M.J., 2015. Secretion systems and signal exchange between nitrogen-fixing rhizobia and legumes. *Front. Plant Sci.* 6, 1–11.

<https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00491>

- Newton, A.C., Fitt, B.D.L., Atkins, S.D., Walters, D.R., Daniell, T.J., 2010. Pathogenesis, parasitism and mutualism in the trophic space of microbe-plant interactions. *Trends Microbiol.* 18, 365–373. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2010.06.002>
- Niehaus, T.D., Gerdes, S., Hodge-Hanson, K., Zhukov, A., Cooper, A.J.L., ElBadawi-Sidhu, M., Fiehn, O., Downs, D.M., Hanson, A.D., 2015. Genomic and experimental evidence for multiple metabolic functions in the RidA/YjgF/YER057c/UK114 (Rid) protein family. *BMC Genomics* 16, 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1584-3>
- Nikel, P.I., De Almeida, A., Melillo, E.C., Galvagno, M.A., Pettinari, M.J., 2006. New recombinant *Escherichia coli* strain tailored for the production of poly(3-hydroxybutyrate) from agroindustrial by-products. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 3949–3954. <https://doi.org/10.1128/AEM.00044-06>
- Nishimura, J.S., 1986. Succinyl-CoA synthetase structure-function relationships and other considerations. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 58, 141–172. <https://doi.org/10.1002/9780470123041.ch4>
- Núñez, P.A., Soria, M., Farber, M.D., 2012. The twin-arginine translocation pathway in α -proteobacteria is functionally preserved irrespective of genomic and regulatory divergence. *PLoS One* 7, 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033605>
- Okazaki, S., Kaneko, T., Sato, S., Saeki, K., 2013. Hijacking of leguminous nodulation signaling by the rhizobial type III secretion system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 17131–17136. <https://doi.org/10.1073/pnas.1302360110>
- Oldroyd, G.E.D., 2013. Speak, friend, and enter: Signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 252–263. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2990>
- Oldroyd, G.E.D., Murray, J.D., Poole, P.S., Downie, J.A., 2011. The Rules of Engagement in the Legume-Rhizobial Symbiosis. *Annu. Rev. Genet.* 45, 119–144. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110410-132549>
- Olsson-Francis, K., Van Houdt, R., Mergeay, M., Leys, N., Cockell, C.S., 2010. Microarray analysis of a microbe-mineral interaction. *Geobiology* 8, 446–456. <https://doi.org/10.1111/j.1472-4669.2010.00253.x>
- Omasits, U., Varadarajan, A.R., Schmid, M., Goetze, S., Melidis, D., Bourqui, M., Nikolayeva, O., Québatte, M., Patrignani, A., Dehio, C., Frey, J.E., Robinson, M.D., Wollscheid, B., Ahrens, C.H., 2017. An integrative strategy to identify the entire protein coding potential of prokaryotic genomes by proteogenomics. *Genome Res.* 27, 2083–2095. <https://doi.org/10.1101/gr.218255.116>
- Ott, T., Van Dongen, J.T., Günther, C., Krusell, L., Desbrosses, G., Vigeolas, H., Bock, V., Czechowski, T., Geigenberger, P., Udvardi, M.K., 2005. Symbiotic leghemoglobins are crucial for nitrogen fixation in legume root nodules but not

- for general plant growth and development. *Curr. Biol.* 15, 531–535. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.01.042>
- Peralta, H., Aguilar, A., Díaz, R., Mora, Y., Martínez-Batallar, G., Salazar, E., Vargas-Lagunas, C., Martínez, E., Encarnación, S., Girard, L., Mora, J., 2016. Genomic studies of nitrogen-fixing rhizobial strains from *Phaseolus vulgaris* seeds and nodules. *BMC Genomics* 17, 1. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3053-z>
- Pereira-Gómez, M., Ríos, C., Zabaleta, M., Lagurara, P., Galvalisi, U., Iccardi, P., Azziz, G., Battistoni, F., Platero, R., Fabiano, E., 2020. Native legumes of the Farrapos protected area in Uruguay establish selective associations with rhizobia in their natural habitat. *Soil Biol. Biochem.* <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2020.107854>
- Pérez-Pantoja, D., De La Iglesia, R., Pieper, D.H., González, B., 2008. Metabolic reconstruction of aromatic compounds degradation from the genome of the amazing pollutant-degrading bacterium *Cupriavidus necator* JMP134, *FEMS Microbiology Reviews*. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00122.x>
- Perret, X., Staehelin, C., Broughton, W.J., 2000. Molecular Basis of Symbiotic Promiscuity. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 180–201. <https://doi.org/10.1128/MMBR.64.1.180-201.2000>. Updated
- 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. <https://doi.org/10.1128/AEM.04142-15>
- Platero, R., Peixoto, L., O'Brian, M.R., Fabiano, E., 2004. Fur is involved in manganese-dependent regulation of *mntA* (*sitA*) expression in *Sinorhizobium meliloti*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 4349–4355. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.7.4349-4355.2004>
- Prell, J., Bourdès, A., Kumar, S., Ludwig, E., Hosie, A., Kinghorn, S., White, J., Poole, P., 2010. Role of symbiotic auxotrophy in the *Rhizobium*-legume symbioses. *PLoS One* 5, 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013933>
- Prell, J., White, J.P., Bourdes, A., Bunnewell, S., Bongaerts, R.J., Poole, P.S., 2009. Legumes regulate *Rhizobium* bacteroid development and persistence by the supply of branched-chain amino acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 12477–12482. <https://doi.org/10.1073/pnas.0903653106>
- Price, M.N., Zane, G.M., Kuehl, J. V., Melnyk, R.A., Wall, J.D., Deutschbauer, A.M., Arkin, A.P., 2018. Filling gaps in bacterial amino acid biosynthesis pathways with high-throughput genetics. *PLoS Genet.* 14, 1–23. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007147>
- Qurashi, A.W., Sabri, A.N., 2012. Bacterial exopolysaccharide and biofilm formation stimulate chickpea growth and soil aggregation under salt stress. *Brazilian J. Microbiol.* 43, 1183–1191. <https://doi.org/10.1590/S1517->

- Ramachandran, V.K., East, A.K., Karunakaran, R., Downie, J.A., Poole, P.S., 2011. Adaptation of *Rhizobium leguminosarum* to pea, alfalfa and sugar beet rhizospheres investigated by comparative transcriptomics. *Genome Biol.* 12, 1–12. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-10-r106>
- Rao, J.R., Cooper, J.E., 1994. Rhizobia catabolize nod gene-inducing flavonoids via C-ring fission mechanisms. *J. Bacteriol.* 176, 5409–5413. <https://doi.org/10.1128/jb.176.17.5409-5413.1994>
- Raymond, J., Siefert, J.L., Staples, C.R., Blankenship, R.E., 2001. The Natural History of Nitrogen Fixation 21, 541–554. <https://doi.org/10.1093/molbev/msh047>
- Rees, D.C., Tezcan, F.A., Haynes, C.A., Walton, M.Y., Andrade, S., Einsle, O., Howard, J.B., 2005. Structural basis of biological nitrogen fixation. *Philos. Trans. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.* 363, 971–984. <https://doi.org/10.1098/rsta.2004.1539>
- Remigi, P., Zhu, J., Young, J.P.W., Masson-Boivin, C., 2016. Symbiosis within Symbiosis: Evolving Nitrogen-Fixing Legume Symbionts. *Trends Microbiol.* 24, 63–75. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.10.007>
- Ricoult, C., Echeverria, L.O., Cliquet, J.B., Limami, A.M., 2006. Characterization of alanine aminotransferase (AlaAT) multigene family and hypoxic response in young seedlings of the model legume *Medicago truncatula*. *J. Exp. Bot.* 57, 3079–3089. <https://doi.org/10.1093/jxb/erl069>
- Riveros-Rosas, H., Julián-Sánchez, A., Moreno-Hagelsieb, G., Muñoz-Clares, R.A., 2019. Aldehyde dehydrogenase diversity in bacteria of the *Pseudomonas* genus. *Chem. Biol. Interact.* 304, 83–87. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2019.03.006>
- Roesch, L., de Quadros, P., Camargo, F., Triplett, E., 2007. Screening of diazotrophic bacteria *Azospirillum* spp. for nitrogen fixation and auxin production in multiple field sites in southern Brazil. *W. J. Microbiol. Biotechnol* 23, 1377–1383.
- Rosconi, F., Davyt, D., Martínez, V., Martínez, M., Abin-Carriquiry, J.A., Zane, H., Butler, A., de Souza, E.M., Fabiano, E., 2013. Identification and structural characterization of serobactins, a suite of lipopeptide siderophores produced by the grass endophyte *Herbaspirillum seropedicae*. *Environ. Microbiol.* 15, 916–927. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12075>
- Rubiales, D., Mikic, A., 2015. Introduction: Legumes in Sustainable Agriculture. *CRC. Crit. Rev. Plant Sci.* 34, 2–3. <https://doi.org/10.1080/07352689.2014.897896>
- Rutten, P.J., Poole, P.S., 2019. Oxygen regulatory mechanisms of nitrogen fixation in rhizobia, *Advances in Microbial Physiology.* Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/bs.ampbs.2019.08.001>
- Ryu, C.M., Faragt, M.A., Hu, C.H., Reddy, M.S., Wei, H.X., Paré, P.W., Kloepper, J.W., 2003. Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*

- U. S. A. 100, 4927–4932. <https://doi.org/10.1073/pnas.0730845100>
- Ryu, H., Laffont, C., Frugier, F., Hwang, I., 2017. Map kinase-mediated negative regulation of symbiotic nodule formation in *Medicago truncatula*. *Mol. Cells* 40, 17–23. <https://doi.org/10.14348/molcells.2017.2211>
- Saad, M.M., Crèvecoeur, M., Masson-Boivin, C., Perret, X., 2012. The type 3 protein secretion system of *Cupriavidus taiwanensis* strain LMG19424 compromises symbiosis with *Leucaena leucocephala*. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 7476–7479. <https://doi.org/10.1128/AEM.01691-12>
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual* (N° 2). Cold Spring harbor laboratory press.
- Sandes, L., 2015. Análisis de *Cupriavidus* aislados de mimosas nativas de Uruguay.
- Sawana, A., Adeolu, M., Gupta, R.S., 2014. Molecular signatures and phylogenomic analysis of the genus *burkholderia*: Proposal for division of this genus into the emended genus *burkholderia* containing pathogenic organisms and a new genus *paraburkholderia* gen. nov. harboring environmental species. *Front. Genet.* 5, 1–22. <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00429>
- Schrire, B.D., Lavin, M., Lewis, G.P., 2005. Global distribution patterns of the Leguminosae: insights from recent phylogenies, in: *Plant Diversity and Complexity Patterns : Local, Regional and Global Dimensions*. pp. 375–422.
- Seabra, A.R., Vieira, C.P., Cullimore, J. V., Carvalho, H.G., 2010. *Medicago truncatula* contains a second gene encoding a plastid located glutamine synthetase exclusively expressed in developing seeds. *BMC Plant Biol.* 10, 1–16. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-183>
- Shamseldin, A., Abdelkhalek, A., Sadowsky, M.J., 2017. Recent changes to the classification of symbiotic, nitrogen-fixing, legume-associating bacteria: a review. *Symbiosis* 71, 91–109. <https://doi.org/10.1007/s13199-016-0462-3>
- Sheibani-Tezerji, R., Rattei, T., Sessitsch, A., Trognitz, F., Mitter, B., 2015. Transcriptome profiling of the endophyte *burkholderia phytofirmans psjn* indicates sensing of the plant environment and drought stress. *MBio* 6, 1–11. <https://doi.org/10.1128/mBio.00621-15>
- Silva-Rocha, R., Martínez-García, E., Calles, B., Chavarría, M., Arce-Rodríguez, A., De Las Heras, A., Páez-Espino, A.D., Durante-Rodríguez, G., Kim, J., Nikel, P.I., Platero, R., De Lorenzo, V., 2013. The Standard European Vector Architecture (SEVA): A coherent platform for the analysis and deployment of complex prokaryotic phenotypes. *Nucleic Acids Res.* 41, 666–675. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1119>
- Simon, M.F., Grether, R., Queiroz, L.P. De, Tiina, E.S., Dutra, F., Hughes, C.E., 2011. THE EVOLUTIONARY HISTORY OF MIMOSA (LEGUMINOSAE): toward a phylogeny of the sensitive plants 98, 1201–1221. <https://doi.org/10.3732/ajb.1000520>

- Skagia, A., Zografou, C., Venieraki, A., Fasseas, C., Katinakis, P., Dimou, M., 2017. Functional analysis of the cyclophilin PpiB role in bacterial cell division. *Genes to Cells* 22, 810–824. <https://doi.org/10.1111/gtc.12514>
- Skagia, A., Zografou, C., Vezyri, E., Venieraki, A., Katinakis, P., Dimou, M., 2016. Cyclophilin PpiB is involved in motility and biofilm formation via its functional association with certain proteins. *Genes to Cells* 21, 833–851. <https://doi.org/10.1111/gtc.12383>
- Soltis, D.E., Soltis, P.S., Morgan, D.R., Swensen, S.M., Mullin, B.C., Dowd, J.M., Martin, P.G., 1995. Chloroplast gene sequence data suggest a single origin of the predisposition for symbiotic nitrogen fixation in angiosperms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 2647–2651. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.7.2647>
- Sprent, J.I., 2008. 60Ma of legume nodulation. What's new? What's changing? *J. Exp. Bot.* 59, 1081–1084. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm286>
- Sprent, J.I., Ardley, J.K., James, E.K., 2013. From North to South: A latitudinal look at legume nodulation processes. *South African J. Bot.* 89, 31–41. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2013.06.011>
- Stekhoven, D.J., Omasits, U., Quebatte, M., Dehio, C., Ahrens, C.H., 2014. Proteome-wide identification of predominant subcellular protein localizations in a bacterial model organism. *J. Proteomics* 99, 123–137. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.01.015>
- Streeter, J., Wong, P.P., 1988. Inhibition of legume nodule formation and N₂ fixation by nitrate. *CRC. Crit. Rev. Plant Sci.* 7, 1–23. <https://doi.org/10.1080/07352688809382257>
- Sulieman, S., Tran, L.S.P., 2013. Asparagine: An amide of particular distinction in the regulation of symbiotic nitrogen fixation of legumes. *Crit. Rev. Biotechnol.* 33, 309–327. <https://doi.org/10.3109/07388551.2012.695770>
- Suvorova, I.A., Gelfand, M.S., 2019. Comparative genomic analysis of the regulation of aromatic metabolism in betaproteobacteria. *Front. Microbiol.* 10, 1–18. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00642>
- Taiz, L & Zeiger, E., 2006. *Fisiología vegetal*, 3rd ed. <https://doi.org/10.2307/4115602>
- Tang, M., Capela, D., 2020. Rhizobium diversity in the light of evolution, *Advances in Botanical Research*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/bs.abr.2019.09.006>
- Tannu, N., Hemby, S., 2007. Two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis for comparative proteomics profiling. *Nat. Protoc.* 1, 1732–1742.
- Taulé, C., 2018. Descifrando las bases de la interacción entre las cepas endófitas *Kosakonia* sp. UYSO10 y *Rhizobium* sp. UYSO24 y plantas de caña de azúcar. PEDECIBA-Biología.

- Taulé, C., Luizzi, H., Beracochea, M., Mareque, C., Platero, R., Battistoni, F., 2019. The Mo- and Fe-nitrogenases of the endophyte *Kosakonia* sp. UYSO10 are necessary for growth promotion of sugarcane. *Ann. Microbiol.* 69, 741–750. <https://doi.org/10.1007/s13213-019-01466-7>
- Taulé, C., Mareque, C., Barlocco, C., Hackembruch, F., Reis, V.M., Sicardi, M., Battistoni, F., 2011. The contribution of nitrogen fixation to sugarcane (*Saccharum officinarum* L.), and the identification and characterization of part of the associated diazotrophic bacterial community. *Plant Soil* 356, 35–49. <https://doi.org/10.1007/s11104-011-1023-4>
- Taulé, C., Zabaleta, M., Mareque, C., Platero, R., Sanjurjo, L., Sicardi, M., Frioni, L., Fabiano, E., Parapiptadenia, N., 2012. New Betaproteobacterial *Rhizobium* Strains Able To Efficiently Nodulate *Parapiptadenia rigida* (Benth.) Brenan. *Appl. Environ. Microbiol.* 78(6), 1692–700. <https://doi.org/10.1128/AEM.06215-11>
- Trovero, M.F., Scavone, P., Platero, R., de Souza, E.M., Fabiano, E., Rosconi, F., 2018. *Herbaspirillum seropedicae* differentially expressed genes in response to iron availability. *Front. Microbiol.* 9, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01430>
- Tseng, T.T., Tyler, B.M., Setubal, J.C., 2009. Protein secretion systems in bacterial-host associations, and their description in the Gene Ontology. *BMC Microbiol.* 9, 1–9. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-S1-S2>
- Uden, G., Wörner, S., Monzel, C., 2016. Cooperation of Secondary Transporters and Sensor Kinases in Transmembrane Signalling: The DctA/DcuS and DcuB/DcuS Sensor Complexes of *Escherichia coli*. *Adv. Microb. Physiol.* 68, 139–167. <https://doi.org/10.1016/bs.ampbs.2016.02.003>
- Upadhyay, S.K., Singh, J.S., Saxena, A.K., Singh, D.P., 2012. Impact of PGPR inoculation on growth and antioxidant status of wheat under saline conditions. *Plant Biol.* 14, 605–611. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2011.00533.x>
- Vandamme, P., Coenye, T., 2004. Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: A tale of lost and found. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54, 2285–2289. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63247-0>
- Vandamme, P., Goris, J., Chen, W.-M., de Vos, P., Willems, A., 2002. *Burkholderia tuberum* sp. nov. and *Burkholderia phymatum* sp. nov., nodulate the roots of tropical legumes. *Syst. Appl. Microbiol.* 25, 507–512. <https://doi.org/10.1078/07232020260517634>
- von Rozycki, T., Nies, D.H., 2009. *Cupriavidus metallidurans*: Evolution of a metal-resistant bacterium. *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* 96, 115–139. <https://doi.org/10.1007/s10482-008-9284-5>
- Voth, W., Jakob, U., 2017. Stress-Activated Chaperones: A First Line of Defense. *Trends Biochem. Sci.* 42, 899–913. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2017.08.006>
- Wang, H.W., Chung, C.H., Ma, T.Y., Wong, H.C., 2013. Roles of alkyl hydroperoxide

- reductase subunit C (AhpC) in viable but nonculturable vibrio parahaemolyticus. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 3734–3743. <https://doi.org/10.1128/AEM.00560-13>
- Wang, N.C., Lee, C.Y., 2006. Molecular cloning of the aspartate 4-decarboxylase gene from *Pseudomonas* sp. ATCC 19121 and characterization of the bifunctional recombinant enzyme. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 73, 339–348. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0475-6>
- Westermeier, R., Scheibe, B., 2008. Difference gel electrophoresis based on lys/cys tagging. *Methods Mol. Biol.* 424, 73–85. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-064-9_7
- Weston, L.A., Mathesius, U., 2013. Flavonoids: Their Structure, Biosynthesis and Role in the Rhizosphere, Including Allelopathy. *J. Chem. Ecol.* 39, 283–297. <https://doi.org/10.1007/s10886-013-0248-5>
- White, J., Prell, J., James, E.K., Poole, P., 2007. Nutrient sharing between symbionts. *Plant Physiol.* 144, 604–614. <https://doi.org/10.1104/pp.107.097741>
- Xu, Z., Ma, J., Qu, C., Hu, Y., Hao, B., Sun, Y., Liu, Z., Yang, H., Yang, C., Wang, H., Li, Y., Liu, G., 2017. Identification and expression analyses of the alanine aminotransferase (AlaAT) gene family in poplar seedlings. *Sci. Rep.* 7, 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep45933>
- Young, J.P.W., 1992. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. *Biol. nitrogen Fixat.* 1544, 43–86.
- Yu, H., Rao, X., Zhang, K., 2017. Nucleoside diphosphate kinase (Ndk): A pleiotropic effector manipulating bacterial virulence and adaptive responses. *Microbiol. Res.* 205, 125–134. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.09.001>
- Yurgel, S.N., Kahn, M.L., 2004. Dicarboxylate transport by rhizobia. *FEMS Microbiol. Rev.* 28, 489–501. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.04.002>
- Zhang, Z., Ke, D., Hu, M., Zhang, C., Deng, L., Li, Y., Li, J., Zhao, H., Cheng, L., Wang, L., Yuan, H., 2019. Quantitative phosphoproteomic analyses provide evidence for extensive phosphorylation of regulatory proteins in the rhizobia–legume symbiosis. *Plant Mol. Biol.* 100, 265–283. <https://doi.org/10.1007/s11103-019-00857-3>
- Zheng, J., Wang, R., Liu, R., Chen, J., Wei, Q., Wu, X., Pang, X., James, E.K., Liu, X., 2017. The Structure and Evolution of Beta-Rhizobial Symbiotic Genes Deduced from Their Complete Genomes. *Immunome Res.* 13, 1–12. <https://doi.org/10.4172/1745-7580.10000131>