

# Estudio de la proteostasis durante el establecimiento de la simbiosis entre un $\beta$ -rizobio y su leguminosa hospedera

**Lic. Florencia Garabato**

Tutor: Dr. Raúl Platero

Co-Tutor: Dr. José Sotelo

Tribunal:

Dra. Vanessa Amarelle

PhD. Luisa Berná

Dra. M<sup>a</sup> Marta Sainz



## *Agradecimientos*

Quiero empezar agradeciendo a todas las personas cuya ayuda y apoyo fue fundamental para alcanzar esta meta.

En primer lugar quiero agradecerle a Rufo, por abrirme las puertas, por los años que hemos compartido y por su paciencia, disposición y dedicación durante todo el proceso.

A José, Coya como le decimos todos, que desde un principio aportó no solo su conocimiento sino también su carisma y apoyo siempre con la mejor voluntad.

También a Guille, sin quien esto no hubiera sido posible, te agradezco todo lo que me enseñaste, las horas de laboratorio, la ayuda con los análisis y sobretodo tu disposición aún estando lejos, siempre ofreciendo dar una mano.

Mención especial a Eliana que desde Colombia sigue mandando sus cariños y acordándose de todos nosotros.

A Analía que me abrió las puertas de su laboratorio y se tomó el tiempo de acompañarme y enseñarme un montón de cosas e incluso con la escritura siempre estuvo presente.

A nuestro querido grupo de investigación y a todos los del laboratorio, por el lindo ambiente que generamos, el compañerismo, el sostén y sobretodo las amistades que me llevo.

En especial quiero agradecer a mis amigas y amigos que una vez más demostraron ser incondicionales. Gracias por bancarme y por levantarme el ánimo un más de un millón de veces. En especial a Lu, que estuvo al firme durante todo el proceso y en incontables cosas más, no hace falta entrar en detalles ya lo sabés. Juntas empezamos y juntas terminamos. Espero que todos sepan lo mucho que los quiero y lo agradecida que estoy de su amistad.

A Juani por una vez más ser mi soporte, por tu infinita paciencia, apoyo y compañía y por siempre encontrar la forma de hacerme reír.

Por ultimo a mi familia, por siempre apoyarme en todos mis desafíos con mucho cariño y por hacerme la persona que soy. Gracias por tener más fé en mí que yo misma y por siempre tener las palabras justas. Los quiero un montón!

# CONTENIDO

CONTENIDO .....	3
CONTENIDO DE FIGURAS .....	6
Figuras suplementarias .....	6
CONTENIDO DE TABLAS .....	7
Tablas suplementarias.....	7
1 RESUMEN .....	8
2 INTRODUCCIÓN .....	10
2.1 Fijación Biológica de Nitrógeno.....	10
2.2 Rizobios y su diversidad .....	12
2.3 Leguminosas.....	15
2.3.1 Mimosas .....	17
2.4 Interacción Planta - Bacteria .....	18
2.5 Interacción Rizobio - Leguminosa .....	18
2.5.1 Flavonoides y factores Nod, compuestos quimioatrayentes .....	19
2.5.2 Adhesión de los rizobios a la superficie radicular .....	22
2.5.3 Formación del nódulo .....	23
2.6 Técnicas utilizadas.....	24
2.6.1 Secuenciación del transcriptoma por RNA-seq.....	24
2.6.2 Estudio del traductoma por <i>Ribosome profiling</i> .....	25
2.6.3 Estudio del proteoma por <i>Shotgun proteomics</i> .....	27
3 ANTECEDENTES .....	28
4 HIPÓTESIS .....	30
5 OBJETIVO GENERAL.....	30
5.1 Objetivos específicos.....	30
6 MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
6.1 Estrategia experimental .....	30
6.2 Cepas, condiciones de cultivo y plásmidos. ....	31
6.3 Obtención de exudados radiculares de <i>Mimosa pudica</i> . ....	32
6.3.1 Esterilización superficial de semillas y germinación. ....	32
6.3.2 Recolección de exudados radiculares. ....	32
6.4 Capacidad de inducción de exudados de <i>M. pudica</i> sobre cepas del género <i>Cupriavidus</i> .....	33
6.5 Obtención de extractos celulares.....	34
6.6 RNAseq - Transcriptómica .....	34

6.6.1	Extracción de ARN total y evaluación de la calidad del mismo.....	34
6.6.2	Análisis bioinformático del transcriptoma .....	35
6.7	<i>Ribosome Profiling</i> – Traductómica .....	35
6.7.1	Obtención de huellas ribosomales.....	36
6.7.2	Análisis bioinformático del traductoma. ....	37
6.8	<i>Shotgun proteomics</i> - Proteómica.....	38
6.8.1	Obtención de proteínas totales, cuantificación y determinación de la calidad de las mismas. ....	38
6.8.2	Pre-tratamiento de las muestras para nano-LC MS/MS. ....	38
6.8.3	Análisis por nano-LC MS/MS. ....	39
6.8.4	Análisis informático de los espectros.....	40
6.9	Análisis funcionales .....	41
7	RESULTADOS.....	42
7.1	Análisis de la capacidad de inducción de exudados de <i>M. pudica</i> sobre cepas del género <i>Cupriavidus</i> .....	42
7.2	Respuesta transcripcional de UYMMa02A frente a exudados radiculares de <i>M. pudica</i> .43	
7.2.1	Obtención del ARN total y secuenciación masiva del mismo .....	44
7.2.2	Análisis de los genes diferenciales identificados a partir del transcriptoma secuenciado.....	45
7.3	Respuesta traduccional de UYMMa02A al inducirla con exudados de <i>M. pudica</i> .....	47
7.3.1	Puesta a punto de la técnica <i>Ribosome Profiling</i> para <i>Cupriavidus</i> . ....	47
7.3.2	Obtención de huellas ribosomales y secuenciación masiva de las mismas.....	50
7.3.3	Análisis del traductoma secuenciado.....	52
7.3.4	Eficiencia traduccional.....	54
7.4	Respuesta del proteoma de <i>Cupriavidus sp.</i> UYMMa02A frente a exudados radiculares de <i>M. pudica</i> .....	56
7.4.1	Calidad y concentración de las proteínas totales obtenidas.....	56
7.4.2	Shotgun. Análisis proteómico por nano LC-MS/MS y conteo de espectros.....	56
8	DISCUSIÓN .....	60
8.1	Elección de las técnicas .....	61
8.2	Capacidad inductora de los exudados de <i>Mimosa pudica</i> .....	63
8.3	Respuesta de UYMMa02A a exudados radiculares de <i>M. pudica</i> .....	64
8.3.1	Respuesta transcripómica.....	64
8.3.2	Respuesta Traductómica. ....	74
8.3.3	Respuesta proteómica.....	81

9	CONCLUSIONES .....	84
10	PERSPECTIVAS .....	85
11	ANEXO .....	87
11.1	Medios de cultivo y soluciones .....	87
11.1.1	Medio mínimo M9.....	87
11.1.2	Medio Triptona – Extracto de levadura (TY) .....	87
11.1.3	Medio Luria – Bertani (LB).....	87
11.1.4	Buffer Tris-Borato-EDTA (TBE) 5X.....	88
11.1.5	Buffer Z.....	88
11.2	Tablas suplementarias.....	89
11.3	Figuras suplementarias .....	97
11.3.1	ARN total .....	97
11.3.2	Huellas ribosomales .....	100
12	BIBLIOGRAFÍA .....	103

## CONTENIDO DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo del nitrógeno. ....	11
Figura 2. Árbol filogenético de bacterias capaces de nodular raíces de leguminosas.....	14
Figura 3. Filogena de la familia <i>Leguminosae</i> . ....	16
Figura 4. Estructura de flavonoides relacionados con la nodulación de leguminosas.....	20
Figura 5. Diversidad de factores Nod. ....	21
Figura 6. Proceso de infección radicular. ....	24
Figura 7. Protocolo de Ribosome Profiling.....	26
Figura 8. Sistema de recolección de exudados radiculares.....	32
Figura 9. Arreglo de genes simbióticos en distintas cepas de rizobio del género <i>Cupriavidus</i> ...	42
Figura 10. Efecto de exudados radiculares de <i>M. púdica</i> sobre la expresión de <i>pnodB<sub>LMG19424</sub></i> en las cepas UYMMa02A, UYPR2.512 y LMG19424. ....	43
Figura 11. Calidad y concentración del ARN total obtenido. ....	44
Figura 12. Clasificación de genes diferenciales identificados por transcriptómica en categorías COG. ....	46
Figura 13. Perfil de digestión de fracción polisomal. ....	48
Figura 14. Perfil de digestión de fracción polisomal con cantidades crecientes de enzima.....	49
Figura 15. Perfil de digestión de fracción polisomal con cantidades decrecientes de enzima... 49	
Figura 16. Protocolo general. ....	50
Figura 17. Calidad y concentración de las huellas ribosomales obtenidas. ....	51
Figura 18. Clasificación de genes identificados por traductómica en categorías COG. ....	53
Figura 19. Eficiencia traduccional.....	55
Figura 20. Análisis de componentes principales. ....	57
Figura 21. Proteínas expresadas diferencialmente en presencia y ausencia de exudados radiculares.....	58
Figura 22. Clasificación de proteínas diferenciales en categorías COG. ....	59
Figura 23. Correlación entre el transcriptoma y traductoma de UYMMa02A. ....	75
Figura 24. Causas y consecuencias del desacoplamiento. ....	77
Figura 25. Inducción transcripcional e Inducción traduccional.....	78
Figura 26. Correlación entre el transcriptoma, traductoma y proteoma de UYMMa02A.....	82

## Figuras suplementarias

Figura S 1. ARN total aislado de Muestra 1.....	97
Figura S 2. ARN total aislado de Muestra 2.....	98
Figura S 3. ARN total aislado de Muestra 3.....	99
Figura S 4. Huellas ribosomales aisladas de Muestra 1.....	100
Figura S 5. Huellas ribosomales aisladas de Muestra 2.....	101
Figura S 6. Huellas ribosomales aisladas de Muestra 3.....	102

## CONTENIDO DE TABLAS

Tabla 1. Cepas utilizadas en este trabajo. ....	31
Tabla 2. Vectores plasmídicos utilizados en este trabajo. ....	31
Tabla 3. Concentración y calidad del ARN total obtenido. ....	44
Tabla 4. Resumen de los datos obtenidos mediante RNA-seq. ....	45
Tabla 5. Clasificación de los genes diferenciales identificados por transcriptómica en vías metabólicas KEGG. ....	47
Tabla 6. Concentración de las huellas ribosomales obtenidas. ....	51
Tabla 7. Secuenciación de huellas ribosomales. ....	52
Tabla 8. Clasificación de los genes diferenciales obtenidos por traductómica en vías metabólicas KEGG. ....	54
Tabla 9. Eficiencia traduccional. ....	55
Tabla 10. Concentración de proteínas totales en extracto celular. ....	56
Tabla 11. Distribución de los genes expresados diferencialmente frente a exudados radiculares en los replicones de UYMMa02A. ....	65

## Tablas suplementarias

Tabla S 1. Características generales de los genes transcritos diferencialmente. ....	89
Tabla S 2. Características generales de los genes transcritos diferencialmente. ....	91
Tabla S 3. Características generales de los genes traducidos diferencialmente. ....	92
Tabla S 4. Características generales de los genes traducidos diferencialmente. ....	93
Tabla S 5. Proteínas expresadas exclusivamente en presencia o ausencia de exudados radiculares. ....	93
Tabla S 6. Proteínas de expresión diferencial en UYMMa02A expuesta a exudados radiculares. ....	95

# 1 RESUMEN

El establecimiento de la simbiosis entre rizobios y sus leguminosas hospederas se encuentra finamente regulado, exigiendo una expresión génica coordinada entre ambos organismos. Este intercambio recíproco de señales, que llamamos dialogo molecular, abarca desde el reconocimiento mutuo entre ambos simbioses por medio de señales en el ambiente de la rizósfera, hasta la formación de órganos especializados (nódulos) en las raíces de la planta hospedera. En dichos nódulos es donde las bacterias llevan a cabo el proceso de fijación biológica de nitrógeno; proceso ecológico de capital importancia.

Distintos factores moleculares, dentro de este intrincado diálogo, se han asociado a la nodulación de leguminosas por rizobios. Ejemplos de esto son el conjunto de genes *nod*, que permiten la síntesis y secreción de los factores de nodulación, los genes implicados en la movilidad de la bacteria, el remodelado de distintos componentes de la superficie celular bacteriana, su capacidad de adherirse específicamente y colonizar las raíces de la planta hospedera, la expresión de sistemas de secreción, entre otros. Sin embargo hasta el momento, la mayor parte del conocimiento que se tiene sobre este proceso involucra el estudio de rizobios pertenecientes a las alfa-proteobacterias (alfa-rizobios), lo que deja mucho que investigar sobre lo que ocurre en beta-rizobios y sus adaptaciones específicas. En nuestro país existen beta-rizobios asociados a diversas leguminosas nativas. Considerando la escasa información disponible y la relevancia ecológica de este modelo, consideramos importante estudiar los mecanismos moleculares implicados en la interacción entre beta-rizobios y sus leguminosas hospederas.

El objetivo principal de este trabajo consistió en analizar los cambios adaptativos que ocurren en el beta-rizobio *Cupriavidus sp.* UYMMa02A durante los primeros pasos de interacción con la planta hospedera *Mimosa pudica*. Para esto decidimos enfrentar la bacteria a exudados radiculares de la planta hospedera y estudiar su respuesta a nivel de su transcriptoma, de su traductoma y su proteoma mediante tres técnicas ómicas complementarias entre sí: RNA-seq, Ribosome Profiling y Shotgun proteomics.

Los resultados obtenidos indicaron que la bacteria responde al estímulo activando transportadores relacionados con la adquisición de aminoácidos y la extrusión de compuestos tóxicos; activando la resistencia a distintos metales como el cobre y el arsénico, sobreexpresando genes relacionados a la producción de energía, la síntesis de exopolisacáridos (EPS) y lipopolisacáridos (LPS) así como la síntesis de aminoácidos de cadena ramificada. A su vez se ven reprimidos aquellos procesos que en un ambiente rico en nutrientes, como los que proporcionan los exudados radiculares,

dejan de ser necesarios, siendo ejemplos la síntesis de algunos aminoácidos e incluso la necesidad de moverse en busca de un ambiente favorable (quimiotaxis).

Complementariamente se abordó la comparación entre las tres técnicas, observándose un gran acoplamiento entre los datos de transcriptómica y traductómica y a la vez un gran desacoplamiento entre estos y los datos de proteómica.

De acuerdo a estos resultados se podría afirmar que UYMMa02A adapta su metabolismo sacando provecho de los nutrientes que ofrecen los exudados radiculares, a la vez que se prepara para la interacción activando mecanismos de defensa frente a distintos tipos de estrés, cambiando su perfil lipídico y modificando su comportamiento en cuanto al gasto energético y la búsqueda de su hospedero.

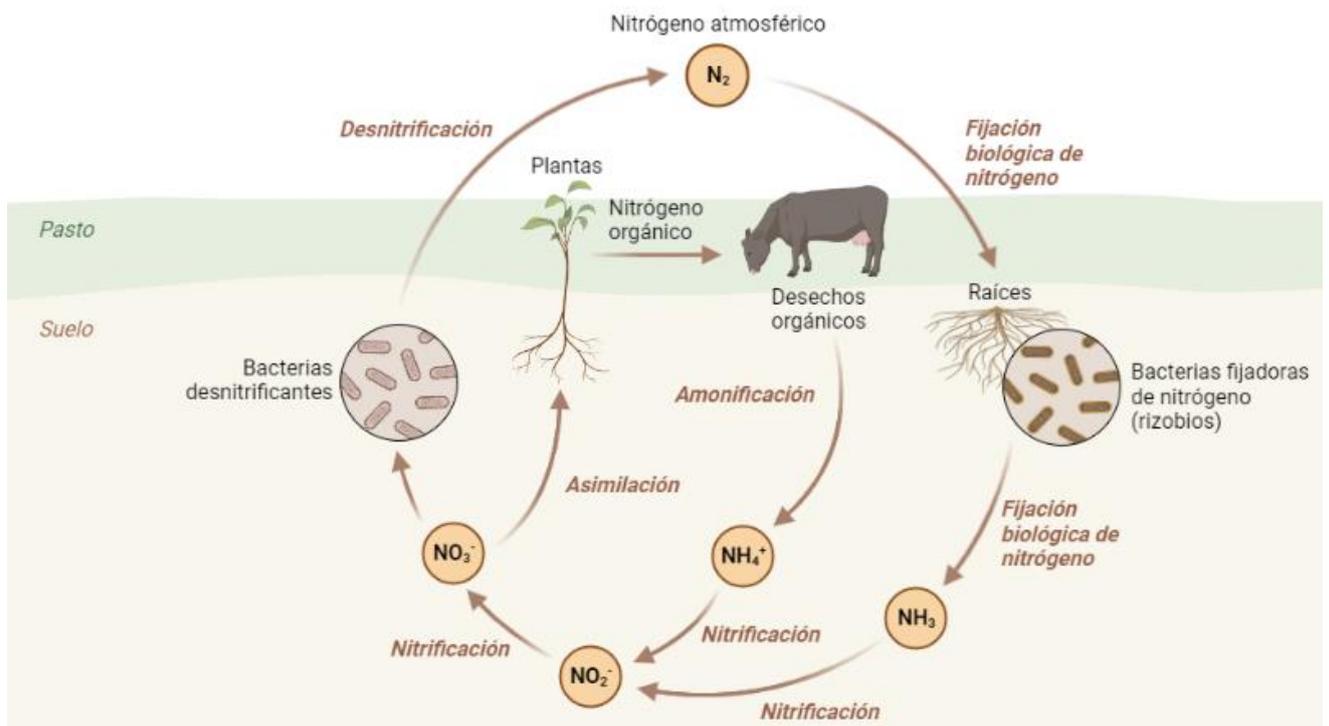
## 2 INTRODUCCIÓN

### 2.1 Fijación Biológica de Nitrógeno

Se estima que para 2050 la población mundial llegará a 9600 millones de habitantes y deberá enfrentar desafíos como lograr la seguridad alimentaria, reducir el impacto del cambio climático y satisfacer la creciente demanda de energía. En particular, el impacto del cambio climático y el asociado estrés biótico y abiótico sobre los sistemas de cultivo, plantean graves consecuencias para la producción mundial de alimentos<sup>1</sup>. A lo largo del siglo 20 los agricultores de alrededor del mundo han incorporado cada vez más la utilización de fertilizantes nitrogenados, los cuales están 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<sup>2</sup>. En este contexto es que es urgente favorecer modelos productivos en los que se valoricen y utilicen racionalmente los recursos naturales disponibles.

El nitrógeno es necesario para el desarrollo de todos los seres vivos y en particular, en las plantas representa el cuarto elemento más abundante, siendo esencial para el crecimiento y desarrollo de las mismas. Forma parte de moléculas vitales como lo son los aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, hormonas y clorofilas<sup>3</sup>. A pesar de que el nitrógeno es uno de los elementos más abundantes de la naturaleza, representando aproximadamente el 78% de la atmósfera, en muchos ambientes se encuentra poco biodisponible. Mientras en la atmósfera este elemento se encuentra como  $N_2$ , estado muy poco reactivo y que la mayoría de los seres vivos no pueden utilizarlo, en el suelo la acción de diversos microorganismos lo hacen disponible en diferentes estados de oxidación, siendo el nitrato ( $NO_3^-$ ) y el amonio ( $NH_4^+$ ) las principales formas en que las plantas pueden absorberlo y asimilarlo<sup>4</sup>. En conjunto, microorganismos, plantas y animales son responsables de conectar los distintos estados de oxidación del nitrógeno que conforman el ciclo de este elemento (**Figura 1**).

Sin embargo la principal entrada al pool de nitrógeno en los ecosistemas naturales es a través de la reducción del nitrógeno atmosférico ( $N_2$ ) hasta amonio, proceso que se conoce como fijación biológica de nitrógeno (FBN)<sup>5</sup>. Se estima que la cantidad de nitrógeno incorporado al suelo por año es de unas 275 millones de toneladas a nivel mundial. De esta suma, 30 millones son fijadas por causas naturales (oxidación del  $N_2$  a ácido nítrico provocada por las descargas eléctricas de las tormentas), 70 millones se deben al proceso industrial de Harber-Bosch y unas 175 millones de toneladas de nitrógeno son incorporadas a los ecosistemas mediante FBN<sup>3</sup>.



**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 (<https://app.biorender.com>)

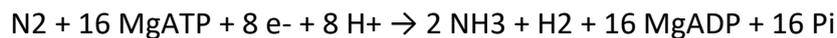
La capacidad de realizar el proceso de FBN es exclusiva de los organismos procariontes, entre los que encontramos bacterias y archaeas<sup>5,6</sup>. Estos microorganismos se denominan diazótrofos (diazó= Nitrógeno, trofo= comida) y se encuentran ampliamente distribuidos en grupos con estilos de vida y metabolismos muy diversos incluyendo organismos anaerobios, aerobios, autótrofos, heterótrofos, metanótrofos, que se desarrollan como células individuales o filamentos, en vida libre y en simbiosis<sup>7</sup>.

La FBN es posible gracias al complejo enzimático de la nitrogenasa que con un gasto de 16 ATPs es capaz de reducir el triple enlace de una molécula de dinitrógeno ( $N_2$ ) a  $NH_3$  y  $H_2$ , llevando a cabo uno de los procesos metabólicos con mayor demanda de energía<sup>6</sup>. Este complejo enzimático está formado por dos metaloproteínas: la MoFe proteína (también denominada dinitrogenasa o componente I) y la Fe proteína (también llamada dinitrogenasa reductasa o componente II). La MoFe proteína es un heterotetrámero  $\alpha_2\beta_2$ , codificado por los genes *nifDK*, y contiene dos grupos metálicos: el cofactor hierro-molibdeno (FeMo-co) proveedor del sitio activo para la unión y reducción del sustrato y un grupo de hierro involucrado en la transferencia de electrones desde la Fe proteína hasta el FeMo-co. Por otro lado, la Fe proteína es un  $\gamma_2$  homodímero, codificado por el gen *nifH*, que contiene 4 átomos de Fe organizados en un grupo  $Fe_2S_4$  que participan en las reacciones redox implicadas en la catálisis<sup>8,9</sup>.

La fijación de nitrógeno es un proceso altamente complejo que aún no está del todo elucidado. La reducción del  $N_2$  por la nitrogenasa requiere de un dador de electrones,

magnesio, ATP y una concentración de oxígeno sumamente baja debido a que los componentes del complejo son inactivados irreversiblemente en presencia del mismo<sup>3</sup>.

La MoFe proteína contiene el sitio activo donde se une el nitrógeno, mientras que la Fe proteína cede electrones a esta, en una reacción acoplada con la hidrólisis de Mg-ATP. Esta reacción también involucra la reducción de dos protones para formar H<sub>2</sub>, por lo cual se necesitan 8 protones, 8 electrones y la hidrólisis de 16 Mg-ATP para llevar a cabo la reducción de una molécula de N<sub>2</sub> (ver ecuación). El hecho por el cual la nitrogenasa genera H<sub>2</sub> durante la reacción aún no es bien entendido<sup>5,8,10</sup>.



Si bien la nitrogenasa descrita es la más común en la naturaleza y la más eficiente energéticamente, existen también nitrogenasas alternativas que sustituyen el cofactor Mo del sitio catalítico por otros metales como el vanadio (V) o hierro (Fe), codificadas por los genes *vnf* y *anf* respectivamente (V-Fe o Fe-Fe nitrogenasas)<sup>11,12</sup>. Los tres tipos de nitrogenasa no se encuentran igualmente distribuidas en la naturaleza, mientras que todos los diazótrofos conocidos presentan la Mo-nitrogenasa, algunos también pueden producir a la Fe-nitrogenasa, la V-nitrogenasa o ambas<sup>13</sup>. Organismos como *Azotobater variabilis* contienen los tres tipos de la enzima, otros como *Rhodobacter capsulatus* y *Rhodospirillum rubrum* presentan sólo la forma canónica (Mo-nitrogenasa) y la variable Fe-nitrogenasa, mientras que organismos como *Anabeana variabilis* contienen adicionalmente a la V-nitrogenasa. Finalmente la mayoría de los rizobios y otros organismos como *Klebsiella pneumoniae* poseen solamente a la Mo-nitrogenasa<sup>12</sup>.

Estas nitrogenasas alternativas son típicamente consideradas como enzimas de respaldo, utilizadas solamente cuando el Mo no se encuentra disponible, sin embargo las condiciones exactas bajo las cuales estas enzimas son utilizadas en el ambiente no se conocen en la mayoría de los casos<sup>13,11</sup>.

## 2.2 Rizobios y su diversidad

Las bacterias diazótroficas conocidas se distribuyen en 6 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 y en la cual se encuentran los rizobios<sup>7</sup>.

Los rizobios son bacterias del suelo, con morfología normalmente bacilar, Gram negativas y no formadoras de esporas. Son móviles ya que presentan un flagelo polar o sub polar o dos a seis flagelos peritricos. Su metabolismo es aerobio y tienen la capacidad de utilizar una gran variedad de azúcares como fuente de carbono<sup>3,14</sup>. Una de las características que destaca a estos microorganismos es su capacidad de asociarse simbióticamente con plantas de la familia de las leguminosas y excepcionalmente con una no leguminosa, *Parasponia* sp.<sup>5,15,16</sup>. Esta interacción es la

asociación simbiótica más estudiada hasta el momento y se considera de las más importantes desde el punto de vista ambiental y agrícola<sup>17</sup>.

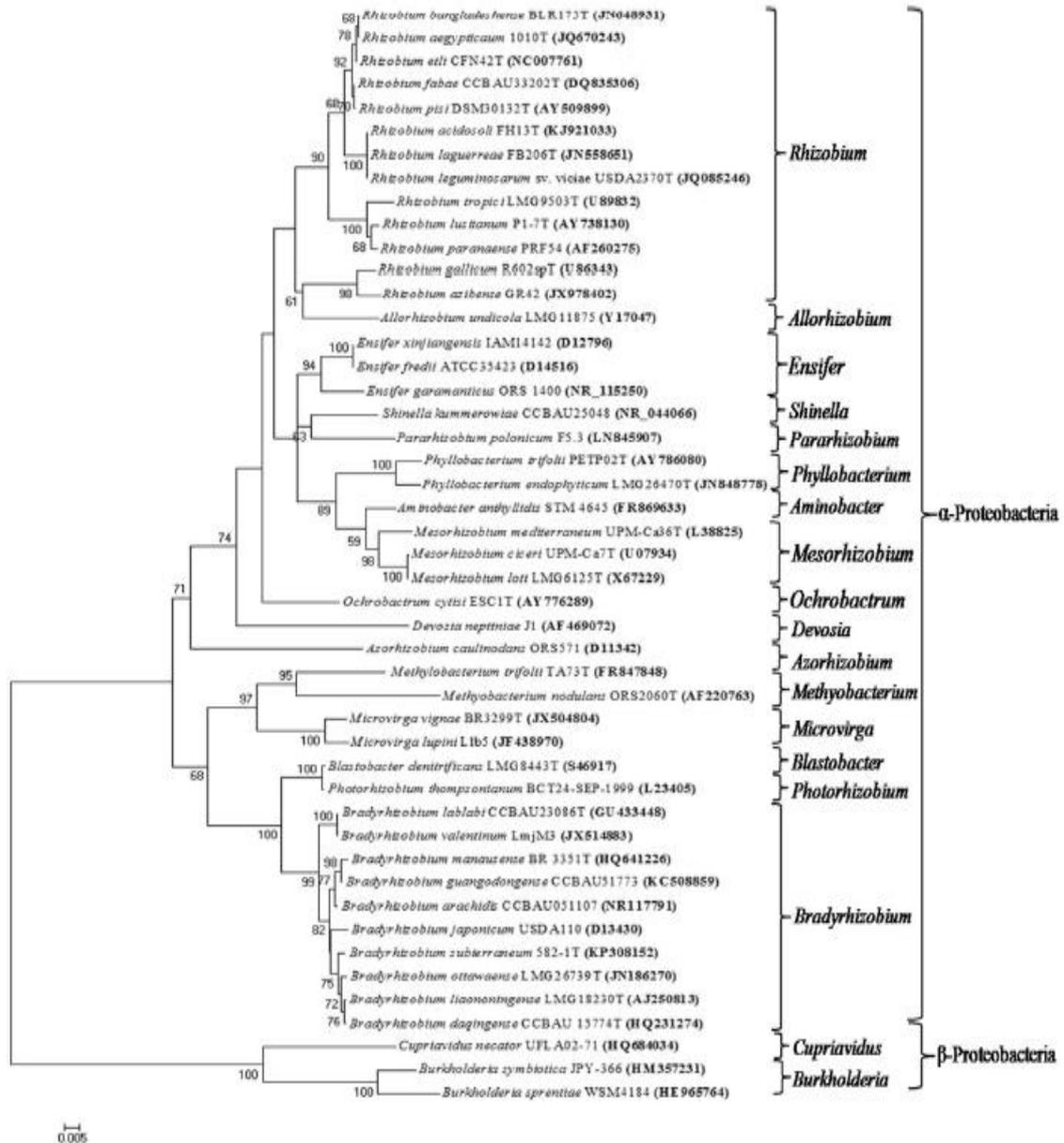
La simbiosis planta-bacteria se manifiesta a través de la formación de órganos especializados en el córtex radicular (y ocasionalmente en tallos ej. *Sesbania rostrata*<sup>18</sup> y *Aeschynomene* spp<sup>19</sup>) de la planta hospedera llamados nódulos, donde las bacterias se alojan y llevan a cabo el proceso de FBN. Dentro del nódulo las bacterias encuentran un ambiente propicio para la FBN y reciben compuestos carbonados y otros nutrientes de la planta, a cambio, los rizobios le aportan amonio a su huésped, el cual es incorporado en distintas rutas metabólicas para la formación de proteínas, ácidos nucleicos, clorofilas y otras moléculas esenciales para su crecimiento y desarrollo<sup>20</sup>.

La taxonomía de rizobios se encuentra continuamente cambiando, en gran parte debido al rápido desarrollo de nuevas y más refinadas técnicas moleculares y gracias al muestreo de nódulos de plantas y regiones del planeta anteriormente poco exploradas. Las especies descritas hasta el momento fueron clasificadas en su mayoría en base a una taxonomía polifásica, incluyendo análisis del gen *rrs* que codifica para la subunidad 16S del ARN ribosomal (capaz de clasificar a estas bacterias a nivel de género), análisis multilocus empleando genes conservados y simbióticos y la caracterización de propiedades bioquímicas y fenotípicas<sup>21</sup>. Más recientemente, con el aumento en el número de genomas de rizobios secuenciados, se ha propuesto una aproximación basada en las diferencias en la identidad media de nucleótidos (ANI-Average Nucleotide Identity) y en el rango de hospedero de nodulación, como forma alternativa para identificar nuevas especies de rizobios<sup>22,23</sup>. Actualmente hay alrededor de 238 especies de rizobio descritas en el mundo, las cuales se distribuyen en 18 géneros incluidos en las clases  $\alpha$  y  $\beta$  de las proteobacterias llevando a la propuesta de denominarlos comúnmente alfa y beta rizobios para distinguir ambas clases de simbioses<sup>24</sup> **Figura 2.**

Los  $\alpha$ -rizobios fueron los primeros en describirse y hasta el momento son los más estudiados, clasificándose en 6 familias (*Rhizobiaceae*, *Phyllobacteriaceae*, *Bradyrhizobiaceae*, *Hyphomicrobiaceae*, *Methylobacteriaceae* y *Brucellaceae*) y 16 géneros. En cambio, los  $\beta$ -rizobios fueron descritos por primera vez en 2001 y actualmente se incluyen en una única familia *Burkholderiales* y comprenden solamente 3 géneros, *Cupriavidus*, *Paraburkholderia* y el más recientemente postulado, *Trinickia*<sup>24,21,25</sup>.

La primer  $\beta$ -proteobacteria capaz de colonizar, formar nódulos y fijar nitrógeno en una leguminosa fue descrita por Chen y colaboradores en 2001, quienes clasificaron aislamientos obtenidos de nódulos de *Mimosa pudica* y *Mimosa diplotricha* como la especie novedosa *Ralstonia taiwanensis*<sup>26</sup>, posteriormente renombrada *Cupriavidus taiwanensis*<sup>27</sup>. En paralelo, también en dicho año, Moulin y colaboradores reportaron las cepas pertenecientes al género *Burkholderia*: *Burkholderia tuberum* y *Burkholderia phymatum*, aisladas de nódulos de *Aspalatus carnosa* y *Machaerium lunatum* (ambas

leguminosas de la subfamilia *Papilionoideae*) en Sudamerica y la Guayana francesa respectivamente<sup>28,29</sup>. Posteriormente, varias especies del género *Burkholderia*, entre las cuales se encuentran la mayoría de los  $\beta$ -rizobios, fueron reclasificadas en un nuevo género denominado *Paraburkholderia*<sup>30</sup>.



**Figura 2. Árbol filogenético de bacterias capaces de nodular raíces de leguminosas.**

Se presenta la relación filogenética, en base al método *Neighbor-Joining*, de la secuencia del ARNr 16S de 47 especies representativas de los 18 géneros de proteobacterias capaces de nodular leguminosas. Se indican los valores de *bootstrap* mayores a 50%. Obtenido de Shamseldin 2016<sup>24</sup>.

A pesar de su controversia al ser descubiertos, hoy en día es bien sabido que las especies del género *Paraburkholderia* son los principales simbioses de varias especies endémicas de leguminosas (pertenecientes a la subfamilia *Papilionoideae* y al clado *Mimosoide*) en Brasil y Sudáfrica; mientras que simbioses pertenecientes al género *Cupriavidus* son aislados principalmente a partir de especies de *Mimosa* en distintas partes de América y en Asia, incluidas especies nativas de *Mimosa* y *Parapitadenia* en

Uruguay<sup>31</sup>. El descubrimiento de los beta rizobios trajo consigo innumerables incógnitas sobre el origen de esta simbiosis y el desempeño de estos nuevos simbiontes en comparación con los alfa rizobios.

Estudios de diversidad en alfa rizobios, teniendo en cuenta relaciones filogenéticas de genes conservados y de los genes de nodulación (genes *nod*), demostraron que los distintos linajes de estos rizobios se diversificaron antes de la aparición de las leguminosas; por lo que la capacidad de nodulación tuvo que ser adquirida luego de la diversificación de rizobios en uno o varios linajes y luego se esparció mediante transferencia horizontal de genes entre los distintos géneros y especies<sup>32,33</sup>. Por otro lado, en *Paraburkholderia* existe la hipótesis de que los genes de nodulación fueron transferidos tempranamente en la evolución, originando al primer simbionte de este género, seguido de transferencia vertical de genes y coevolución de estos rizobios con sus hospederos endémicos<sup>34</sup>. Finalmente en el caso de *Cupriavidus*, en base a análisis filogenéticos y genómicos, se ha propuesto que las especies nodulantes aparecieron más recientemente en comparación con *Paraburkholderia*<sup>35</sup>. Sin embargo su origen y evolución es compleja y no se encuentra del todo resuelta.

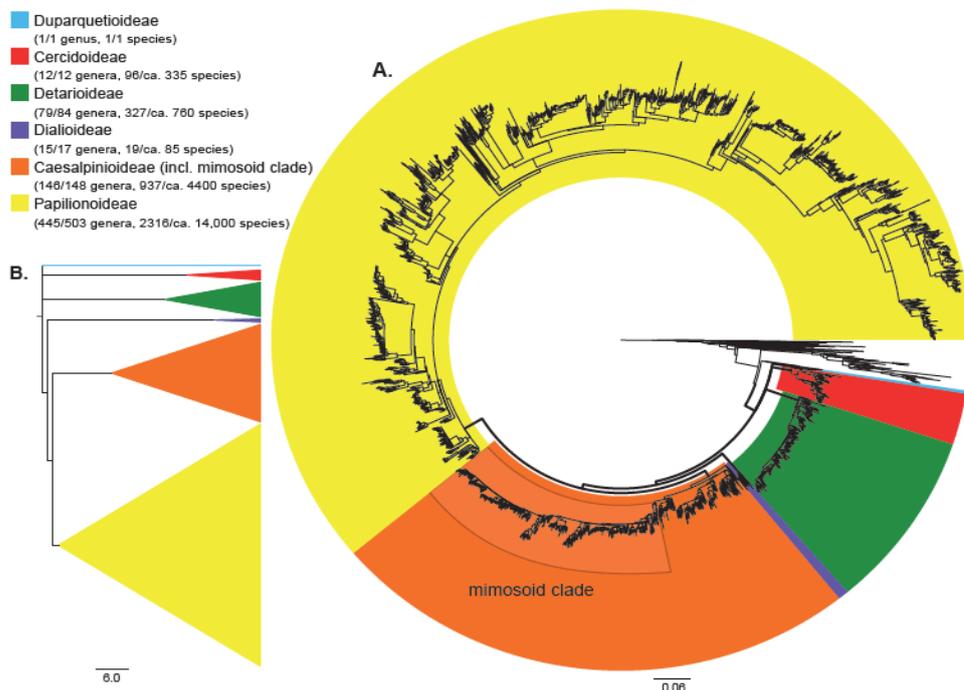
## 2.3 Leguminosas

Las leguminosas son un extenso conjunto de plantas pertenecientes a la familia *Fabaceae*, que comprenden alrededor de 770 géneros y más de 19500 especies. Representan la tercera familia de angiospermas con mayor riqueza de especies con flor luego de *Orchidaceae* y *Asteraceae*, y la segunda más importante económicamente luego de *Poaceae*<sup>36,37</sup>.

Estas plantas son cosmopolitas en su distribución encontrándose en casi todos los biomas del mundo, incluso en los más extremos. Tanto en términos de diversidad como de abundancia de especies, contribuyen significativamente en los bosques tropicales húmedos de África, Asia y América del Sur y dominan los bosques secos y sabanas en los trópicos. También se encuentran en regiones desiertas y templadas del Mediterráneo y en latitudes altas. Incluyen desde grandes árboles hasta pequeñas especies rastreras anuales<sup>37</sup>.

Las leguminosas constituyen el segundo alimento más importante para el hombre proporcionando fuentes altamente nutritivas de proteínas y micronutrientes. Además son especialmente importantes como especies forrajeras y abonos verdes, así como especies pioneras en la regeneración de suelos pobres o degradados, tanto en regiones templadas como tropicales. También se utilizan por su madera, taninos, aceites y resinas. A grandes rasgos, esta familia es excepcionalmente diversa morfológica, fisiológica y ecológicamente, representando un gran ejemplo de la diversificación evolutiva en plantas<sup>38,36</sup>.

Recientemente las leguminosas han sido el foco de numerosos análisis filogenéticos a nivel de subfamilias, tribus y grupos genéricos. En base a esto, el *Legume Phylogeny Working Group* indicó que la actualmente aceptada clasificación de esta familia en tres subfamilias: *Caesalpinioideae*, *Mimosoideae* y *Papilionoideae*, se encuentra desactualizada y no refleja el conocimiento actual de las relaciones filogenéticas en la familia. Por este motivo, se propone una nueva clasificación que utiliza como marco el análisis filogenético de la secuencia del gen *matK* y que incluye un muestreo casi completo de los géneros de leguminosas actualmente conocidos (698 de los 765 géneros reconocidos hasta la fecha) y cerca del 20% de las especies conocidas (3696). El gen *matK* ha sido el más secuenciado entre las leguminosas y en la mayoría de los linajes, esta región genética es suficientemente variable para producir clados con buen soporte estadístico<sup>37</sup>. Esta nueva clasificación divide a la familia *Leguminosae* en seis subfamilias *Cercidoideae*, *Detarioideae*, *Duparquetioideae*, *Dialioideae*, *Caesalpinioideae* y *Papilionoideae* **Figura 3**. Uno de los mayores cambios es que la tradicionalmente conocida subfamilia *Mimosoideae* es ahora parte de la subfamilia *Caesalpinioideae*. 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 informalmente<sup>37,21</sup>.



**Figura 3. Filogenia de la familia *Leguminosae*.**

A: Árbol filogenético consenso en base a 3842 secuencias del gen *matK*, representando 698 de los 765 géneros conocidos de Leguminosas y aproximadamente el 20% de las especies (3696 especies de 19500). Dentro de la subfamilia *Caesalpinioideae* se destaca al clado mimosoide. El largo de las ramas es proporcional al número de sustituciones de *matK* y todas las subfamilias tienen un soporte de *bootstrap* de 100% basado en el método de Máxima Verosimilitud (líneas gruesas). B: Filogenia esquemática basada en el análisis Bayesiano del gen *matK*. Se muestra la clasificación en 6 subfamilias de las Leguminosas, con clados de tamaño proporcional al número de especies dentro de los mismos. Tomado de Azani, 2017<sup>37</sup>.

La subfamilia *Papilionoideae*, se destaca debido a que las semillas y legumbres de muchas de sus especies son alimentos esenciales para el hombre y el ganado (poroto, maní, soja, habas, garbanzo, arvejas, lentejas, etc). Esta subfamilia cuenta con más de 12.000 especies descritas hasta el momento y se encuentra ampliamente distribuida geográficamente. La amplia mayoría de las especies analizadas dentro de esta subfamilia son capaces de formar asociaciones simbióticas con rizobios y realizar FBN<sup>39</sup>.

Dada la creciente preocupación sobre la salud ambiental, el potencial de las leguminosas en asociación simbiótica con rizobios y su rol como fuente de nitrógeno en los sistemas de cultivo, es cada vez más explotado<sup>40</sup>. Se ha estudiado la capacidad de nodular de unas 3400 especies aproximadamente, las cuales representan el 57% de los géneros de leguminosas. La utilización de este recurso natural para adquirir nitrógeno, disminuye el uso de fertilizantes químicos y la pérdida de este elemento en el suelo, así como el consecuente gasto de compuestos orgánicos altamente energéticos como el petróleo, necesarios para la producción de los mismos<sup>41, 42</sup>. Es por estas razones que la FBN y la incorporación de leguminosas a sistemas de rotación con otros cultivos ofrecen una práctica de agricultura más sustentable y amigable con el medio ambiente<sup>43</sup>.

### 2.3.1 Mimosas

*Mimosa* es uno de los géneros más grandes dentro de las leguminosas, pertenecen a la subfamilia *Caesalpinioideae* (clado mimosoide) con mas de 522 especies distribuidas en una amplia gama de hábitats. La mayoría de las especies se encuentran en América, siendo las regiones centrales de Brasil y México, así como las regiones sub-tropicales de Sudamérica (Paraguay, sur de Brasil, Argentina y Uruguay) los principales centros de diversificación. Los Andes, el Caribe y Madagascar se consideran *clusters* secundarios de diversificación de estas plantas<sup>44</sup>. En particular, en Uruguay se pueden encontrar alrededor de 50 entidades de *Mimosa* las cuales se distribuyen principalmente en el hábitat serrano y ribereño, formando matorrales densos en el bosque y sus bordes o en forma de arbustos y pequeños árboles respectivamente<sup>39</sup>.

Este género tiene la particularidad de formar asociaciones simbióticas tanto con rizobios pertenecientes a las  $\alpha$ -proteobacterias como a las  $\beta$ -proteobacterias. Se ha postulado que la preferencia de las *Mimosas* a ser noduladas por rizobios de una u otra clase podría estar determinada por la ubicación geográfica, el ambiente y su taxonomía<sup>45</sup>. Es así que en los biomas de Cerrado y Caatinga en Brasil, la mayoría de las especies se encuentran noduladas por rizobios del género *Paraburkholderia*, en México predominan las asociaciones simbióticas con  $\alpha$ -rizobios, particularmente con los géneros *Rhizobium* y *Ensifer* y en Uruguay se destacan las asociaciones con *Cupriavidus*<sup>46,47</sup>.

En Uruguay en particular, un estudio realizado en la Sierra del Abra de Zabaleta (en el departamento de Lavalleja) demostró que la alta incidencia de *Cupriavidus* como simbiontes de las mimosas nativas de la zona, se relaciona con la presencia de metales pesados como Cu, Zn, Co, Ni y Fe en el suelo; metales contra los cuales este género se destaca por su tolerancia<sup>45</sup>.

Finalmente, en cuanto a la taxonomía del hospedero, estudios de inoculación cruzada evidenciaron la preferencia de las *Mimosas* spp. Uruguayas por cepas de *Cupriavidus* sobre *Paraburkholderia*<sup>45,48</sup>. Esto lleva a la conclusión de que las *Mimosas* nativas de nuestro país han seleccionado como simbiontes especies de *Cupriavidus*, obteniéndose asociaciones altamente específicas, patrón que también se ha observado en *Mimosas* de Brasil y México pero con simbiontes de los géneros *Paraburkholderia* y *Rhizobium/Ensifer* respectivamente y que esto podría deberse a la historia co-evolutiva de la planta con los simbiontes locales<sup>46,47</sup>.

## 2.4 Interacción Planta - Bacteria

Muchas especies de plantas promueven asociaciones con un amplio rango de microorganismos que resultan en interacciones benéficas para ambas partes. Una característica común de estas asociaciones simbióticas es la habilidad de los microorganismos de capturar y producir nutrientes que limitan el crecimiento vegetal e intercambiarlos con la planta a cambio de compuestos carbonados derivados de la fotosíntesis. Además de estas asociaciones benéficas, en la rizósfera también ocurren asociaciones patógenas y parasitarias en las que el microorganismo genera daño activa o pasivamente al hospedero para su propio beneficio<sup>49</sup>.

Debido a su naturaleza sésil, las plantas se comunican con otros organismos liberando un amplio espectro de señales químicas. El sistema de raíces, que tradicionalmente se pensaba que proveía anclaje y absorción de nutrientes y agua, es en realidad una fábrica de químicos que media numerosas interacciones en el ambiente de la rizósfera, combatiendo microorganismos patógenos y atrayendo a aquellos benéficos<sup>50</sup>. Una de las asociaciones simbióticas más estudiadas es la que se da entre rizobios y leguminosas, lograda en gracias a un complejo “diálogo molecular” entre ambos simbiontes.

## 2.5 Interacción Rizobio - Leguminosa

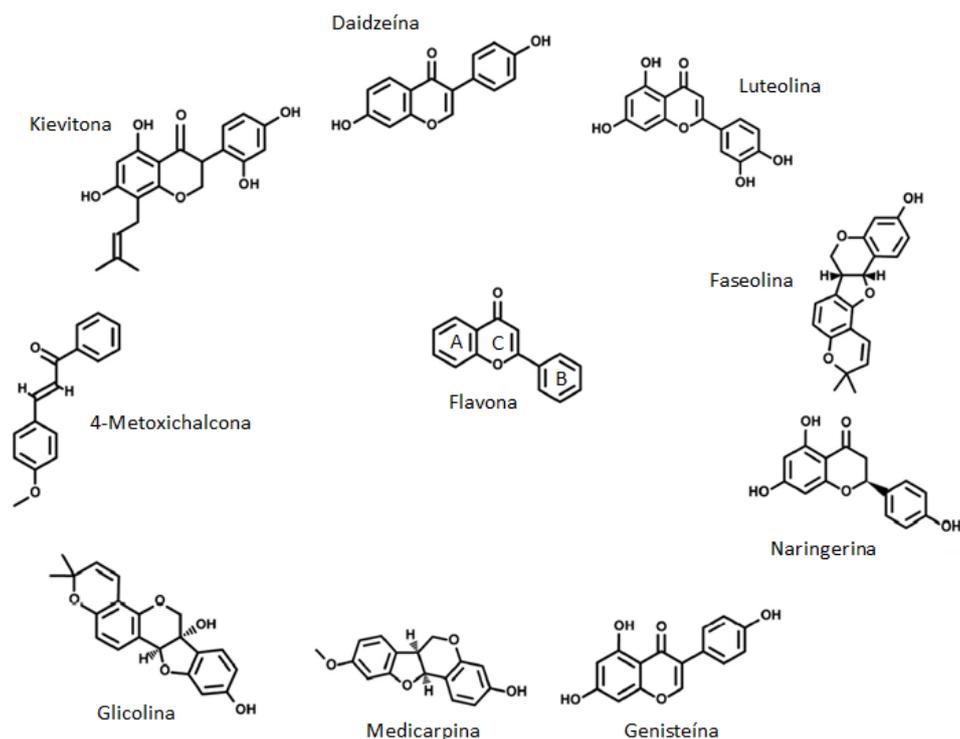
Los rizobios tienen dos formas de vida que difieren en su morfología y metabolismo: en vida libre como saprófitos en el ambiente de la rizósfera o en el interior de los nódulos una vez que colonizan a su hospedero donde se diferencian a bacteroides. Mientras que en vida libre estas bacterias son bacilos móviles, no fijadoras de N<sub>2</sub> y capaces de utilizar una gran variedad de fuentes de carbono, como bacteroides son inmóviles, de formas irregulares, capaces de fijar N<sub>2</sub> y solamente utilizan ácidos dicarboxílicos como fuente de carbono<sup>51</sup>.

A pesar de que la simbiosis rizobio – leguminosa no es obligatoria, en condiciones limitantes de nitrógeno estos simbioses se buscan uno a otro mediante un elaborado intercambio de señales. Este dialogo molecular implica la activación de genes específicos tanto en el hospedero como en el microsimbionte<sup>52</sup>. La interacción comienza cuando la planta mediante sus exudados radiculares (aminoácidos, proteínas, azúcares, carbohidratos complejos, flavonoides, alcoholes, vitaminas y ácidos orgánicos) produce cambios en la composición química de la rizósfera, generando un ambiente rico en nutrientes propicio para el crecimiento de las poblaciones microbianas del suelo. En este contexto los rizobios deben competir con otros microorganismos y colonizar la rizósfera. Para que el proceso de infección comience, los rizobios también deben ser capaces de unirse a la raíz de su hospedero, proceso que depende de múltiples factores tanto de la bacteria (polisacáridos y proteínas superficiales, microfibrillas de celulosa, fimbrias), la planta (exudados radiculares, estructura de la superficie radicular) y el ambiente (pH, temperatura, cationes divalentes, humedad, presencia de otros microorganismos competidores)<sup>51,50</sup>.

### 2.5.1 Flavonoides y factores Nod, compuestos quimioatrayentes

Las raíces de las plantas liberan un amplio rango de compuestos involucrados en atraer microorganismos benéficos y formar asociaciones mutualistas en la rizósfera. Los flavonoides son metabolitos secundarios biológicamente activos que debido a sus propiedades físicas y bioquímicas interactúan con distintos blancos celulares provocando diversas acciones en microorganismos, plantas y animales. Se han identificado más de 10000 variantes estructurales, muchas de ellas detectadas en los exudados radiculares de leguminosas<sup>53</sup>. Estos compuestos polifenólicos de bajo peso molecular consisten en dos anillos de benceno unidos mediante un anillo heterocíclico de pirano o pirona, sustituciones específicas sobre el anillo producen flavonas, flavononas e isoflavonoides<sup>54,16</sup> (**Figura 4**).

Las distintas especies de leguminosas exudan diferentes combinaciones de flavonoides. El reconocimiento de un perfil específico de flavonoides es lo que induce a los rizobios a intercambiar señales recíprocas para establecer la simbiosis en el contexto de un hospedero compatible. Además, algunos de estos compuestos presentan actividad antimicrobiana, mecanismo utilizado por la planta para asegurar la selección del simbiote correcto, por lo cual la resistencia de las cepas microbianas compatibles frente a estos flavonoides con actividad antibiótica genera un nicho en la rizósfera donde los simbioses adecuados pueden replicarse en un ambiente de competencia reducida<sup>32</sup>. Por tanto, los flavonoides sirven como un primer mecanismo tanto para el huésped como para los rizobios para reconocer a su par simbiótico compatible. Este mecanismo puede ser reforzado por la producción de fitoalexinas, compuestos de bajo peso molecular con actividad antimicrobiana producidos por la planta hospedera en respuesta a estrés biótico y abiótico capaces de suprimir el crecimiento de rizobios menos compatibles<sup>55,56</sup>.



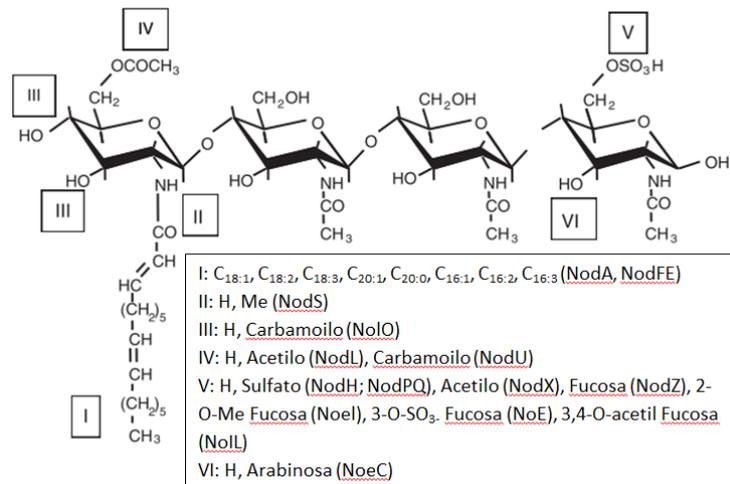
**Figura 4. Estructura de flavonoides relacionados con la nodulación de leguminosas.**

En el centro se representa la estructura general de un flavonoide con dos anillos de benceno (A y B) y un anillo heterocíclico de pirano o pirona (C). Sustituciones sobre los mismos producen , flavonas (Luteolina), flavononas (Naringerina) o isoflavonoides (Kievitona, Daidzeina, Faseolina, Genisteina, Glicolina). Adaptado de Walker, 2020 <sup>56</sup>.

Además de estimular la proliferación y la quimiotaxis de los rizobios hacia la raíz de la planta, los flavonoides desencadenan la activación de genes específicos en el microorganismo involucrados en la nodulación llamados genes *nod*. Esta activación ocurre a través de la proteína NodD, un regulador transcripcional del tipo LysR, que al interactuar con flavonoides específicos, induce la transcripción de otros genes *nod* al unirse a una secuencia altamente conservada (“caja nod”) presente en la región promotora de todos los operones *nod*. Estos genes codifican para aproximadamente 25 proteínas, requeridas en la síntesis y exportación de moléculas señal llamadas factores Nod<sup>52,54</sup>. La activación de la proteína NodD por parte de los flavonoides producidos por la planta hospedera es otro paso que contribuye a la especificidad de la interacción. Por ejemplo la Daidzeina y Genisteina son responsables de la activación *nodD* en la simbiosis *Glycine max* (Soja)/*Bradyrhizobium japonicum* pero inhiben la expresión de los genes *nod* en *S. meliloti*; mientras que en este rizobio, es la Medicarpina producida por *M. truncatula* la cual activa a la proteína *nodD*<sup>56</sup>.

Los factores Nod son lipo-quito-oligosacáridos, consisten en un tetra o pentasacárido de N-acetil-β-D-glucosamina sustituido en el C2 de su extremo no reductor por una cadena de ácido graso insaturado, **Figura 5**. Las distintas especies de rizobios producen 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<sup>50</sup>. La especificidad con la

planta hospedera se encuentra determinada por las distintas “decoraciones” de los factores Nod. La cadena N-acyl puede variar entre sustituyentes acetilo, carbamoilo, metilo y sulfurilo que se pueden unir a la N-acetil-glucosamina generando una gran variedad de factores. Adicionalmente azúcares como la fucosa y arabinosa también pueden agregarse en distintas posiciones y a su vez, estos azúcares pueden complementarse con distintos sustituyentes contribuyendo aún más a la especificidad de la señalización<sup>57</sup>.



**Figura 5. Diversidad de factores Nod.**

Los principales sitios de sustitución para las diferentes decoraciones sobre el esqueleto base de los factores Nod se indican como I – IV y se describen en el recuadro. Entre paréntesis se indica el producto del gen *nod* responsable. Modificado de Downie, 2010<sup>57</sup>

Los genes involucrados en la biosíntesis y ensamblaje de las unidades de N-acetil-β-D-glucosamina y la unión de la cadena de ácido graso, *nodABC*, son comunes en todos los rizobios, mientras que los genes específicos que codifican para enzimas que catalizan el agregado de los diferentes sustituyentes en los factores Nod (*nod*, *nol* y *noe*) difieren entre las distintas especies de rizobio<sup>51,21</sup>. La percepción de los factores Nod por la planta hospedera activa múltiples señales que inician el proceso de infección radicular y la formación del nódulo. Esta respuesta puede ser inducida a concentraciones asombrosamente bajas de factores Nod, por ejemplo en el par simbiótico *Sinorhizobium meliloti*- *Medicago truncatula* con tan solo 10<sup>-13</sup> M de factor Nod, ocurre la deformación del pelo radicular y las oscilaciones de calcio en la planta<sup>57</sup>.

Los flavonoides no son los únicos compuestos capaces de inducir la biosíntesis de factores Nod, otros compuestos como las xantonas, vanilina, isovanilina, betaínas y algunos ácidos aldónicos también tienen esta capacidad pero se requieren en concentraciones mucho mayores (orden mM) que las de los flavonoides (orden μM)<sup>50</sup>. Además, en los exudados radiculares existen muchos otros compuestos implicados en el establecimiento de la simbiosis, los cuales resultan quimioatrayentes para los rizobios. Entre estos se encuentran aminoácidos, azúcares, ácidos dicarboxílicos como

el fumarato, malato y succinato y compuestos aromáticos como el protocatecuato, catecol, acetosiringona, entre otros<sup>58,59</sup>.

Durante mucho tiempo, se asumió que este diálogo molecular que involucra factores Nod era un paradigma universal para todas las interacciones rizobio-leguminosa. Sin embargo en 2007 se demostró que algunas cepas fotosintéticas de *Bradyrhizobium*, que carecen de los genes canónicos *nodABC*, son capaces de inducir nódulos fijadores de nitrógeno en especies de *Aeschynomene*<sup>60</sup>. Este hecho indicó por primera vez, que es posible una interacción simbiótica alternativa, independiente de factores Nod, entre una leguminosa y una cepa de rizobio. Poco se sabe sobre esta interacción alternativa pero existe evidencia de que señales basadas en purinas pueden estar involucradas en esta vía<sup>57</sup>. La hormona vegetal citoquinina, se encuentra implicada en la regulación de distintos procesos fisiológicos durante el desarrollo de las plantas y su adaptación a las condiciones ambientales. En particular regula la arquitectura y desarrollo de las raíces. Gonzalez-Rizzo y colaboradores demostraron que la aplicación externa de citoquinina en raíces de leguminosas, induce una respuesta similar a la generada por los factores Nod producidos por rizobios<sup>61</sup>. Debido a que las citoquininas están estrechamente relacionadas a las purinas (la síntesis de citoquininas requiere de la base adenosina y utiliza enzimas del metabolismo general de purinas<sup>52</sup>), se ha especulado que algunos rizobios han adquirido la habilidad de “saltar” la señalización mediante factores Nod, activando la morfogénesis del nódulo a nivel de citoquininas. Se ha demostrado que el precursor de purinas aminoimidazole carbox- amide ribonucleotide juega un papel en la infección de leguminosas por rizobios<sup>57,62</sup>.

### 2.5.2 Adhesión de los rizobios a la superficie radicular

La adhesión de los rizobios a las raíces y pelos radiculares es un paso crucial para el inicio de la colonización de la planta y provee un nicho excelente para el crecimiento bacteriano. Varios mecanismos y distintas moléculas de superficie tanto de la planta como de la bacteria están involucrados en este proceso<sup>57</sup>. Dentro de los distintos factores de la planta, se ha aceptado que en particular las lectinas pueden jugar un rol importante en la interacción con la bacteria ya que actúan como receptores de los polisacáridos de la superficie bacteriana a los cuales se unen reversiblemente<sup>63</sup>.

Por otro lado, en cuanto a la bacteria, las proteínas secretadas, en particular la proteína de unión a  $\text{Ca}^+$  ricadesina, la cual fue identificada en *R. leguminosarum*, promueven la adhesión a la raíz particularmente a pH alcalino. Se ha demostrado que en condiciones de concentraciones bajas de  $\text{Ca}^{2+}$ , *R. leguminosarum* *bv. viciae* muestra una capacidad reducida de adherirse a la raíz de *Pisum sativum*. El calcio no está involucrado en la unión de la ricadesina a la superficie radicular, sino que se encarga del anclaje de esta proteína a la superficie bacteriana, cuando las concentraciones de calcio son bajas, la ricadesina se libera de la superficie bacteriana al medio<sup>63</sup>. A pesar de que esta proteína ha sido purificada de *R. leguminosarum*, el gen que codifica para

la misma aún no se ha identificado, sin embargo una proteína similar se ha identificado en *Bradyrhizobium spp.* Estas proteínas se secretan a través de la membrana interna y externa mediante un sistema de secreción Tipo I codificado por los genes *prsD* y *prsE*<sup>57</sup>.

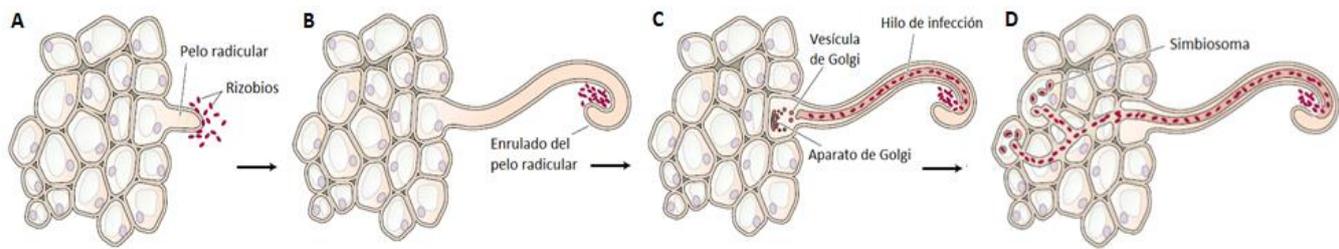
En adición a la ricadesina y las lectinas de las plantas, los polisacáridos de la superficie bacteriana también están involucrados en el primer paso de adhesión a la raíz. Por lo menos cuatro polisacáridos distintos juegan un rol en la simbiosis: 1- glucanos cíclicos, que se encuentran en el espacio periplásmico y están involucrados en la adaptación osmótica de la bacteria; 2- exopolisacáridos asociados débilmente a la membrana externa o totalmente secretados al medio extracelular; 3- lipopolisacáridos que son componentes estructurales de la membrana externa y 4- polisacáridos capsulares usualmente unidos a la membrana externa<sup>63,64</sup>. Estos cumplen 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.

### 2.5.3 Formación del nódulo

Los factores Nod son reconocidos por receptores específicos de las células vegetales activando una serie de cambios en el desarrollo de la planta hospedera que incluyen, la deformación de los pelos radiculares, oscilaciones de calcio intracelular, despolarización de la membrana celular y la división de las células corticales de la raíz<sup>51</sup>.

El proceso de infección de la raíz comienza con la inhibición localizada del crecimiento de las células ubicadas en la punta del pelo radicular, causando que el mismo se curve y se enrule formando un “bolsillo” donde los rizobios quedan atrapados. En este punto, las bacterias penetran el pelo radicular formando lo que se conoce como hilo de infección, el cual crece longitudinalmente por la degradación de la pared celular vegetal y la invaginación de la membrana plasmática, hasta alcanzar las células subcorticales de la raíz. A medida que el hilo de infección se extiende, los rizobios en su interior crecen y se dividen invadiéndolo<sup>56</sup>. Finalmente los rizobios colonizan las células corticales del nódulo en formación mediante un proceso similar a la endocitosis donde las bacterias quedan envueltas en una membrana de origen vegetal llamada membrana peribacteroidal. Este proceso genera cuerpos distinguibles en el citoplasma de las células infectadas denominados simbiosomas, donde los rizobios se diferencian a bacteroides especializados en la fijación de nitrógeno y pierden la habilidad de replicarse<sup>56,65</sup>, **Figura 6**.

Existen dos tipos generales de nódulos inducidos por rizobios: indeterminados y determinados, los cuales se distinguen por la persistencia o no de actividad meristemática que genera nuevas células que son infectadas por rizobios continuamente<sup>56</sup>.



**Figura 6. Proceso de infección radicular.**

A: Rizobios adheridos a la superficie del pelo radicular; B: enrollado del pelo y "captura" de las bacterias en su interior; C: Degradación de la pared celular y formación del hilo de infección; D: endocitosis de las bacterias y simbiosomas en células infectadas. Adaptado de Taiz, 2010<sup>52</sup>

Los factores Nod pueden inducir la producción de especies reactivas del oxígeno en los pelos radiculares, por lo cual durante la simbiosis los rizobios, provistos de enzimas como catalasas y superóxido dismutasas, deben lidiar con el estrés oxidativo<sup>57</sup>.

La planta hospedera debe proveer soporte nutricional y un ambiente micro-aeróbico propicio para la FBN, ejerciendo un control sobre la supervivencia de los bacteroides. Las leguminosas, mediante mecanismos aún no del todo elucidados, pueden regular la cantidad de nódulos que pueden formarse. La FBN es energéticamente más costosa para la planta que la asimilación de nitrógeno del suelo (en forma de nitrato principalmente), por lo cual cuando la disponibilidad de este elemento es adecuada se inhibe la nodulación. Incluso cuando la FBN es necesaria, la leguminosa controla el número de nódulos que le permita obtener una buena provisión de nitrógeno<sup>56,66</sup>.

La permeabilidad de gases dentro del nódulo es controlada gracias a una hemoproteína capaz de unir oxígeno con una alta afinidad denominada leghemoglobina. Esta proteína se encuentra presente en altas concentraciones en el citoplasma de las células infectadas otorgándole un color rosado al interior de los nódulos maduros activos<sup>52</sup>. La función de dicha proteína es transportar el oxígeno hasta los bacteroides supliendo las necesidades respiratorias de los mismos, pero manteniendo la concentración de oxígeno lo suficientemente baja para que el mismo no interfiera con la actividad de la nitrogenasa<sup>67</sup>.

## 2.6 Técnicas utilizadas

### 2.6.1 Secuenciación del transcriptoma por RNA-seq.

El transcriptoma es el conjunto de todos los ARN transcritos de una célula, en un momento dado y bajo una condición fisiológica determinada. El estudio del transcriptoma es esencial para interpretar los elementos funcionales del genoma, permite entender la función de los genes así como establecer patrones de regulación génica coordinada frente a un estímulo o condición específica<sup>68,69</sup>.

La tecnología RNA-seq combina la secuenciación de alto rendimiento con métodos computacionales para capturar y cuantificar los transcritos presentes en un extracto

de ARN. Brevemente, esta técnica se basa en obtener el ARN total del organismo en estudio, fragmentarlo y convertirlo a ADN copia (ADNc) doble cadena para volverlo más estable. Luego este ADNc se secuencía utilizando métodos de alto rendimiento<sup>70</sup>. La fragmentación puede ser realizada sobre el ARN o el ADNc y pueden utilizarse enzimas de restricción, nebulización o sonicación. Generalmente el ADNc se genera mediante el uso de la enzima transcriptasa reversa, y al mismo se le ligan adaptadores de tal forma que cada fragmento generado contendrá un adaptador ligado en uno o ambos extremos. Cada molécula es luego secuenciada utilizando tecnologías de alto rendimiento como lo son *Illumina*, *Applied Biosystems SOLiD*, *Roche 454 Life Science*, *PacBio*, *Oxford Nanopore Technologies*, *ION Torrent*, entre otras. Finalmente las secuencias resultantes son alineadas contra un genoma de referencia o bien ensambladas *de novo* para producir un mapa transcriptómico, el cual contiene información sobre la estructura transcripcional y el nivel de expresión de cada gen<sup>69,70,68</sup>.

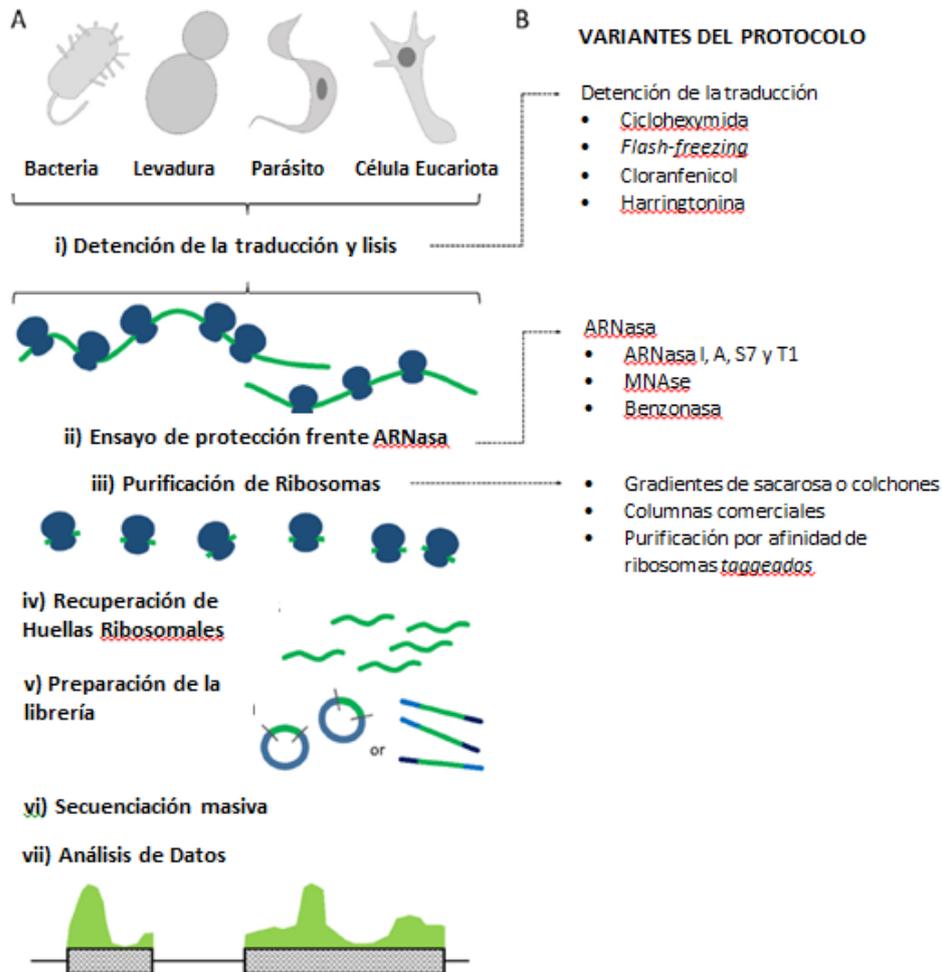
## 2.6.2 Estudio del traductoma por *Ribosome profiling*

En general los análisis de la expresión génica a nivel de genoma se focalizan en determinar la abundancia de especies de ARNm utilizando técnicas como *Microarrays* y *RNA-seq*<sup>71</sup>. Sin embargo estos enfoques no proporcionan información sobre la síntesis proteica y su regulación, que es el verdadero punto final de la expresión génica. En este contexto surge la técnica de *Ribosome Profiling*, la cual permite monitorear la traducción *in vivo*. Esta técnica fue descrita por primera vez en 2009 por Ingolia y colaboradores y se trata de una metodología capaz de determinar a escala genómica qué ARNm están siendo activamente traducidos en una célula en un momento dado<sup>72</sup>.

La misma se basa en la purificación y secuenciación de los fragmentos de ARNm que se encuentran asociados a ribosomas y por lo tanto que estaban siendo traducidos en el momento en que fueron aislados. Básicamente esta técnica consiste en obtener los polisomas activos de las células en un momento dado mediante la lisis celular y centrifugación diferencial. Luego la fracción conteniendo los polisomas, es sometido a una digestión por ARNasas y los monosomas liberados, son recuperados por ultracentrifugación. Finalmente los fragmentos de ARN que se encontraban en los ribosomas y por lo tanto fueron protegidos por ellos frente a la acción de las ARNasas, son purificados y utilizados para la construcción de bibliotecas de secuenciación masiva. Por estos motivos se le llama a los fragmentos de ARN protegidos, huellas ribosomales, **Figura 7**.

Con el objeto de evaluar simultáneamente cambios en traducción y transcripción, generalmente este tipo de análisis se acompaña en paralelo con un análisis de RNA-seq<sup>71</sup> o transcriptoma de la misma condición en estudio<sup>71,72</sup>.

Las huellas ribosomales denotan la posición exacta en la que se encontraba un ribosoma al momento de la traducción del ARNm, por lo cual permiten estudiar la traducción a nivel de codones. En eucariotas estas huellas tienen una longitud de aproximadamente 30 nt<sup>72</sup> mientras que en bacterias la literatura reporta un rango más variable de regiones protegidas de entre 15 y 40 nt<sup>73,74,75</sup>.



**Figura 7. Protocolo de Ribosome Profiling.**

A: Se representan los pasos principales del protocolo, descritos en el texto. B: Se describen posibles variantes del protocolo ligadas al paso donde serían aplicadas. (Adaptado de Eastman *et. al* 2018)<sup>76</sup>.

La secuencia de las huellas ribosomales indica que porciones del genoma están realmente siendo traducidas a proteínas. Cada huella corresponde a un ribosoma activo, por lo cual el número de huellas producidas a partir de un transcrito corresponde al número de ribosomas involucrados en la síntesis de la proteína codificada por el mismo. Por lo tanto, midiendo la densidad de huellas ribosomales sobre un transcrito se puede cuantificar el nivel de expresión de la proteína en cuestión<sup>71</sup>.

Además de cuantificar la expresión génica, esta técnica permite dilucidar mecanismos de regulación de la traducción, identificando los cambios en la expresión de proteínas que no pueden explicarse por los niveles de transcripción del ARNm. Así es que surge

el parámetro de eficiencia traduccional, el cual vincula el nivel de traducción de un ARNm con su nivel transcripcional, permitiendo distinguir entre una regulación transcripcional y una regulación traduccional. Este parámetro se calcula como el cociente entre el número de lecturas de huellas ribosomales (traductoma) y el número de lecturas en el transcriptoma para cada gen en cuestión. Es por este motivo que el protocolo de *Ribosome Profiling* implica realizar un control transcripcional mediante secuenciación del transcriptoma celular<sup>72,76</sup>.

Esta técnica ha sido aplicada en diversos organismos y tipos celulares como lo son levaduras<sup>72</sup>, bacterias<sup>77</sup>, células de mamíferos<sup>78</sup>, células embrionarias<sup>79</sup>, distintos tipo de parásitos<sup>80</sup> e incluso virus infectivos<sup>81</sup>. Esta diversidad de aplicaciones, fundamenta su aplicación en nuevos modelo de estudios, que busquen cuantificar niveles de expresión traduccional a escala ómica.

### 2.6.3 Estudio del proteoma por *Shotgun proteomics*

La proteómica tipo shotgun es una estrategia a gran escala para la identificación de proteínas en una muestra compleja. Involucra la pre-digestión de las proteínas seguido de la separación de los péptidos, su fragmentación en un espectrómetro de masas y la comparación en base de datos de los espectros obtenidos<sup>82</sup>. Esta técnica permite la identificación y la cuantificación de miles de proteínas en muestras biológicas complejas como lisados celulares, tejidos, fluidos biológicos, entre otros. Su nombre deriva de la estrategia de caracterizar proteínas indirectamente, mediante el análisis de los péptidos obtenidos por proteólisis, en analogía con la secuenciación genómica de shotgun<sup>82</sup>.

La técnica se basa en acoplar la nano-cromatografía líquida con un espectrómetro de masas, para de esta forma disociar los iones peptídicos y luego obtener sus masas para finalmente inferir y cuantificar a partir de estas, las proteínas de la mezcla compleja. En un experimento típico, los péptidos se fraccionan por cromatografía líquida en línea con un espectrómetro de masas y luego las proteínas se identifican comparando los espectros peptídicos obtenidos experimentalmente contra aquellos generados teóricamente a partir de una base de datos de secuencias<sup>83</sup>. Cientos de miles de espectros se generan comúnmente en un experimento por lo cual se requieren algoritmos bioinformaticos complejos como el del programa *PatternLab for proteomics*<sup>82</sup>, para su interpretación y la inferencia de proteínas. Además de identificar y cuantificar proteínas, la técnica permite estudiar la expresión diferencial de las mismas al comparar diferentes condiciones biológicas.

### 3 ANTECEDENTES

El Departamento de Bioquímica y Genómica Microbianas (BIOGEM) del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE), centra sus líneas de investigación en el estudio de bacterias del suelo, especialmente en aquellas con potencial para el mejoramiento del crecimiento de las plantas. En los últimos tiempos, el foco fue profundizar el conocimiento sobre las rizobacterias nativas. De esta forma surgieron trabajos como: la caracterización de rizobios nativos nodulantes de trébol y lotus<sup>84,85</sup>; el estudio de las estrategias empleadas por las bacterias simbióticas *Sinorhizobium meliloti* y *Herbaspirillum seropedicae* para mantener la homeostasis de hierro y otros metales<sup>86,87,88</sup>; el aislamiento y caracterización de bacterias endófitas de caña de azúcar, arroz, sorgo, canola y festuca<sup>89,90,91</sup>; entre otros.

Fue así que en base a uno de los trabajos enfocados en la descripción de rizobios asociados a leguminosas nativas, se identificaron por primera vez en nuestro país beta-rizobios de los géneros *Cupriavidus* y *Paraburkholderia* como simbiosomas de la leguminosa arbórea *Parapitadenia rigida* (Angico)<sup>92</sup>. A partir de este descubrimiento se profundizó en la búsqueda de beta-rizobios asociados a leguminosas nativas, en particular asociados a especies dentro del género *Mimosa*. Como resultado de estos estudios se logró generar una colección de más de 50 aislamientos de los géneros *Cupriavidus* y *Paraburkholderia*, provenientes de unas 15 especies de leguminosas nativas encontradas en distintos puntos del país<sup>45,93</sup>. Interesantemente y contrariamente a lo observado en Brasil, principal centro de diversidad de mimosas, la gran mayoría de las bacterias aisladas a partir de nódulos obtenidos de mimosas nativas pertenecen al género *Cupriavidus*<sup>45</sup>. Más aún ninguna de las cepas de *Cupriavidus* aisladas pertenece a la especie *C. taiwanensis* sino que estarían más emparentadas con otras especies del género *Cupriavidus* tales como *C. necator* y *C. basilensis*, sugiriendo que la diversidad de especies de *Cupriavidus* simbióticos sería mayor a la pensada y que nuestro país podría ser un sitio de origen de diversidad para este género bacteriano<sup>94</sup>.

Entre los aislamientos caracterizados, para el presente trabajo se seleccionó a la cepa UYMMa02A, la cual aparenta pertenecer a una nueva especie dentro del género *Cupriavidus* según lo obtenido de análisis filogenéticos de los genes *housekeeping rrs*, *recA* y *gyrB*<sup>94</sup>, así como análisis de genómica comparativa y el análisis de la identidad media de nucleótidos (ANI) entre distintos genomas de *Cupriavidus* (Garabato & Sandes, en preparación)<sup>95</sup>. Esta cepa fue aislada a partir de nódulos de *Mimosa magentea* y es capaz de formar asociaciones simbióticas eficientes con esta planta y varias especies de *Mimosa*, incluida la planta modelo *Mimosa pudica*<sup>45</sup>. UYMMa02A presenta una gran versatilidad metabólica, lo cual la hace atractiva para su estudio. Además de sus características promotoras del crecimiento vegetal (FBN, producción de sideróforos), esta es capaz de crecer en un amplio rango de pHs, utilizar gran variedad de fuentes de carbono e incluso es capaz de metabolizar compuestos aromáticos y

presenta alta resistencia a metales pesados, características que la hacen interesante biotecnológicamente<sup>94,45</sup>. 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<sup>96</sup>.

Por otro lado, como hospedero en el par simbiótico se eligió a *Mimosa pudica*. Esta leguminosa tiene la rara habilidad de ser nodulada tanto por alfa (*Rhizobium* spp.) como beta rizobios (*Cupriavidus*, *Paraburkholderia*) dependiendo principalmente de su ubicación geográfica. Por ejemplo, en la isla de Barro Colorado y en la Guayana Francesa esta planta se encuentra preferentemente nodulada por *Paraburkholderia*, mientras que en Costa Rica, China e India se encuentra nodulada tanto por *Paraburkholderia* como *Cupriavidus*. Finalmente *Cupriavidus* fue el simbiote predominante en nódulos de *M. pudica* en Taiwan y Nueva Caledonia<sup>31</sup>. Al ser de rápido crecimiento, tener un ciclo anual, contar con semillas comerciales y su genoma secuenciado, esta planta es considerada un buen modelo para el estudio de asociaciones simbióticas.

Distintos factores moleculares se han asociado a la nodulación de leguminosas por rizobios como lo son: el conjunto de genes de nodulación, la movilidad de los rizobios, características de la superficie bacteriana y su capacidad de adherirse específicamente y colonizar las raíces de la planta hospedera, la inducción de la expresión de sistemas de secreción tipo III o tipo IV, la inducción de los genes del plásmido simbiótico y la producción de aminoácidos ramificados, entre otros<sup>31</sup>. Sin embargo hasta el momento, estos estudios se han centrado principalmente en alfa-rizobios, lo que deja mucho que investigar sobre lo que ocurre en beta-rizobios y sus adaptaciones específicas.

Cabe destacar que dentro de nuestro grupo de investigación, la interacción de UYMMa02A - *Mimosa pudica* fue analizada preliminarmente desde el punto de vista proteómico, utilizando la técnica 2D-Dige. En dicho trabajo se creó un sistema de co-cultivo donde planta y bacteria fueron incubadas en el mismo medio permitiendo el intercambio de señales, pero sin dejar que exista un contacto directo entre ellos. De esta forma se identificaron 37 proteínas con expresión diferencial, dentro de las cuales se identificó la sobreexpresión de procesos como el metabolismo de aminoácidos, la biosíntesis de lípidos y respuestas relacionadas al estrés<sup>97</sup>.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, el presente trabajo propone profundizar en el estudio de los cambios moleculares que ocurren en nuestra bacteria, *Cupriavidus* sp. UYMMa02A, durante los primeros pasos de interacción con la planta hospedera *Mimosa pudica*. Para esto se enfrentó a la bacteria a los exudados radiculares de la planta y se realizó un abordaje desde el punto de vista ómico, utilizando técnicas complementarias entre sí como lo son el *RNA-seq*, *Ribosome Profiling* y *Shotgun proteomics*.

## 4 HIPÓTESIS

La interacción entre beta-rizobios y sus leguminosas hospederas tiene similitudes con el programa adaptativo descrito para alfa-rizobios, pero mantiene características únicas cuyo estudio nos ayudará a entender mejor los mecanismos subyacentes al establecimiento de simbiosis efectivas.

## 5 OBJETIVO GENERAL

El principal objetivo de este trabajo es estudiar las bases moleculares de la interacción entre beta-rizobios y sus leguminosas hospederas, utilizando como modelo de estudio al par simbiótico compuesto por *Cupriavidus sp.* UYMMa02A y *Mimosa pudica*.

### 5.1 Objetivos específicos

- I. Poner a punto las técnicas de RNA-seq, Ribosome Profiling y Shotgun proteomics en *Cupriavidus sp.* UYMMa02A.
- II. Generar un protocolo que integre las 3 técnicas mencionadas para el estudio en conjunto de la proteostasis en *Cupriavidus sp.* UYMMa02A.
- III. Identificar las principales adaptaciones que ocurren en la bacteria en los primeros pasos de interacción con la planta hospedera, cuando esta se enfrenta a los exudados radiculares.

## 6 MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Estrategia experimental

El presente trabajo se basó en el estudio de la cepa *Cupriavidus sp.* UYMMa02A<sup>98</sup> al ser enfrentada a los exudados radiculares de *Mimosa pudica*. Para esto Los exudados de la planta se recolectaron y fueron utilizados para preparar medio líquido M9 citrato suplementado (Anexo). A la condición de bacterias creciendo en este medio se le llamó condición de inducción y como condición control se utilizó medio M9 citrato sin suplementar.

Las bacterias se crecieron en cada condición hasta alcanzar la fase exponencial momento en el cual se cosecharon las células obteniéndose un extracto celular inducido o no. A partir de este extracto celular se tomaron alícuotas para llevar a cabo los 3 experimentos planteados: *RNA-seq*, *Ribosome profiling* y *Shotgun proteomics*. Cada experimento se realizó por triplicados biológicos. A grandes rasgos, las técnicas mencionadas consisten en la extracción de ARN total, polisomas y proteínas respectivamente, para luego proceder a la secuenciación masiva e identificación de las muestras obtenidas, **Figura 16**.

## 6.2 Cepas, condiciones de cultivo y plásmidos.

Este trabajo se llevó a cabo utilizando la cepa *Cupriavidus* sp. UYMMa02A, como cepa de estudio. Puntualmente se utilizaron además la cepa de referencia del género *Cupriavidus taiwanensis* LMG 19424 y una cepa de referencia interna de nuestra colección *Cupriavidus necator* UYPR2.512 **Tabla 1**.

Las cepas se mantuvieron en placas de TY Agar (Anexo) a 4 °C para su uso diario y se almacenan en glicerol 25% (v/v) a -80 °C. Para los distintos experimentos se utilizó el medio líquido, mínimo en nutrientes, M9 citrato o este mismo medio pero suplementado con exudados radiculares de *M. pudica* (Anexo). Para su crecimiento en estos medios, las cepas se incubaron a 30°C con agitación a 180 rpm hasta alcanzar la fase de crecimiento exponencial. Para determinar esta fase de crecimiento se midió la absorbancia de los cultivos a 600nm, un crecimiento exponencial tiene una DO<sub>600nm</sub> entre 0.6-0.8 y se alcanza entre las 12 y 16 horas para estos cultivos.

Además se utilizaron variantes de las 3 cepas mencionadas, transformadas con los vectores plasmídicos pCBM01 y pCZ388 **Tabla 2**. Cabe destacar que estas variantes no fueron obtenidas en este trabajo sino que forman parte de la colección interna del laboratorio<sup>99</sup>.

**Tabla 1. Cepas utilizadas en este trabajo.**

Cepa	Características	Uso	Referencia
<i>Cupriavidus</i> sp. UYMMa02A	Aislada de <i>Mimosa magentea</i> , Uruguay.	Cepa de estudio	Platero <i>et al.</i> 2016, Iriarte <i>et al.</i> 2016
<i>Cupriavidus taiwanensis</i> LMG 19424 <sup>T</sup>	Aislada de <i>Mimosa pudica</i> , Taiwán. Primer genoma de beta-rizobio secuenciado (2008).	Cepa de referencia del género	Chen <i>et al.</i> 2001, Amadou <i>et al.</i> 2008
<i>Cupriavidus necator</i> UYPR2.512	Aislada de <i>Parapitadenia rigida</i> , Uruguay. Secuenciada por Ion Torrent (2015) y PacBio (2021).	Cepa de referencia interna	Taulé <i>et al.</i> 2012, De Meyer <i>et al.</i> 2015, Rodríguez-Esperón <i>et al.</i> 2021

**Tabla 2. Vectores plasmídicos utilizados en este trabajo.**

Plásmido	Características	Referencia
pCBM01	Contiene 401 pb del promotor <i>nodB</i> de <i>C. Tawanensis</i> LMG 1944 fusionado al gen <i>lacZ</i> . Resistente a tetraciclina (Tc <sup>R</sup> ). Tamaño aproximado de 20 Kb.	Marchetti <i>et al.</i> 2010
pCZ388	Vector parental, contiene el gen <i>lacZ</i> pero sin ningún promotor. Resistente a tetraciclina (Tc <sup>R</sup> ). Tamaño aproximado de 20 Kb.	Cunnac <i>et al.</i> 2004

## 6.3 Obtención de exudados radiculares de *Mimosa pudica*.

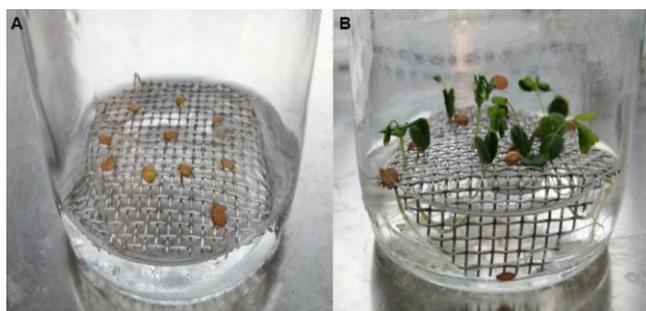
### 6.3.1 Esterilización superficial de semillas y germinación.

Se utilizaron semillas de *Mimosa pudica* comerciales (Outsidepride #F588). Las mismas en primer lugar fueron peladas manualmente y luego se las activó tratándolas con ácido sulfúrico concentrado durante 10 minutos y posteriormente lavándolas 6 veces con agua destilada. Finalmente en condiciones asépticas, se esterilizaron superficialmente con hipoclorito de sodio 4% durante 5 minutos y se realizaron 5 lavados de las mismas con agua destilada estéril. Se realizó un control de esterilización incubando dos de las semillas a 30°C en medio rico LB (Anexo). Las semillas se germinaron en placas de agar-agua 0,8% (p/v) incubándolas a 30°C durante 24 hs.

### 6.3.2 Recolección de exudados radiculares.

Se utilizaron frascos de vidrio de 500 ml con tapa rosca, conteniendo 40 ml de agua destilada y una rejilla de acero inoxidable de trama adecuada para retener las semillas. Una vez esterilizado el sistema durante 20 min a 121°C, se colocaron en cada frasco 10 semillas previamente esterilizadas superficialmente y germinadas (**Figura 8**). Los frascos se mantuvieron en cuarto de plantas con un fotoperíodo de 16/8 horas luz/oscuridad y a una temperatura de 26°C durante 10 días. Pasado este tiempo y en condiciones asépticas, se recolectó el agua de los frascos conteniendo los exudados y se filtró utilizando una bomba de vacío y filtros de 45 µm (Merck #HAWG047S6). Como control de esterilidad, se plaquearon 100 µl de los exudados ya filtrados en placas de LB las cuales se incubaron a 30°C durante 48 hs.

El agua conteniendo los exudados radiculares se utilizó para la preparación de medio mínimo M9 citrato suplementado (Anexo). Cabe destacar que para cada ensayo se preparó el medio M9 con exudados frescos inmediatamente antes de su utilización.



**Figura 8. Sistema de recolección de exudados radiculares**

A: semillas germinadas de 24hs, B: plántulas luego de 10 días.

## 6.4 Capacidad de inducción de exudados de *M. pudica* sobre cepas del género *Cupriavidus*

Para este ensayo se utilizaron las cepas *C. taiwanensis* LMG 19424, *Cupriavidus necator* UYPR2.512 y nuestra cepa modelo UYMMa02A (**Tabla 1**). Las mismas fueron previamente transformadas en el laboratorio con los plásmidos pCBM01 y pCZ388<sup>100,101</sup>. El plásmido pCBM01 contiene una fusión transcripcional entre la región promotora del gen *nodB* (pnodB<sub>19424</sub>), primer gen del operón *nod* en *C. taiwanensis*, y el gen *lacZ* que codifica para la enzima β-galactosidasa. El vector parental pCZ388 conteniendo al gen *lacZ* pero sin ningún promotor, se utilizó como control (**Tabla 2**).

La capacidad inductora de los exudados se determinó mediante el ensayo de Miller<sup>102</sup> midiendo la actividad β-galactosidasa. En rasgos generales, el ensayo de Miller se basa en la capacidad de la enzima β-galactosidasa de escindir el sustrato sintético orto-nitrofenil-β-D-galactopiranosido (ONPG) para producir galactosa y orto-nitrofenol (ONP). Uno de los productos de esta reacción, el ONP, presenta una coloración amarillenta, por lo cual midiendo su absorbancia a 420nm se puede determinar la actividad específica de la enzima, expresada en unidades de Miller (“Miller Units”). El experimento se realizó por triplicados biológicos y como control se utilizó medio M9 citrato sin exudados.

Se partió de un cultivo primario, inoculando las cepas con ambas construcciones en 5ml de medio M9 citrato, a 30°C, durante 16 horas y con agitación a 180 rpm. Finalizado este tiempo, se realizó una dilución 1/100 (v/v) en los medios M9 citrato suplementado con exudados radiculares y sin suplementar y se incubó este nuevo cultivo en las mismas condiciones. Luego se determinó la DO<sub>620nm</sub> y 2ml del cultivo se centrifugaron a 5000 g durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y el pellet celular se resuspendió en 1 ml de Buffer Z (Anexo). A partir de esta suspensión se tomó una alícuota de 100 μl a un nuevo tubo eppendorff y se les adicionó 500 μl de Buffer Z, 25 μl de SDS 0.1 % y 50 μl de cloroformo para la lisis celular, mezclando mediante vortex e incubándose 5 minutos a temperatura ambiente.

Para dar inicio a la reacción de Miller (t=0) se agregó 200 μl del sustrato ONPG (4 mg/ml) al lisado celular, se mezcló mediante vortex y se incubó a 37°C hasta observar una coloración amarillenta (t), momento en que se detuvo la reacción con el agregado de 500 μl de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1M. Finalmente se centrifugó la preparación durante 7 minutos a 8000 g y se determinó la absorbancia del sobrenadante a 420nm. La actividad enzimática específica se determinó mediante las unidades de Miller:

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

- $\Delta t$ : tiempo de reacción,
- $b$ : longitud de paso de la cubeta electroforética (cm)
- $\epsilon$ : coeficiente de extinción molar ( $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ )
- $FD$ : factor de dilución.

## 6.5 Obtención de extractos celulares.

Se realizó un cultivo primario de UYMMa02A, inoculando una ansada de la cepa en 5 ml de medio M9 citrato e incubándolo a 30° con agitación a 180 rpm durante 12 horas. A partir de 1 mL de este primario, se inocularon 150 ml del correspondiente medio (inducción y control) y se lo incubó en las mismas condiciones. Pasado este tiempo se determinó la densidad óptica del cultivo a 600nm ( $DO_{600nm}$ ) para confirmar que el mismo alcanzó la fase exponencial de crecimiento ( $DO_{600nm}$  entre 0,6 – 0,8). Alcanzada esta fase, se adicionó el inhibidor traduccional Cloranfenicol<sup>nota1</sup> a una concentración final de 100 µg/ml y se incubó el cultivo en las condiciones ya mencionadas, durante 20 minutos. Transcurrido este tiempo, se enfrió el cultivo con hielo y se centrifugaron las células a 5000 g durante 5 minutos a 4°C. 350 mg del pellet obtenido se suspendieron en 1,5 ml de *Buffer* Tris-HCl 20mM pH 7,6; MgCl<sub>2</sub> 50 mM; NH<sub>4</sub>Cl 150mM y se transfirieron a tubos de lisis comerciales de 2ml (MP Biomedicals Lysing Matrix Tubes # Matrix B). La lisis se llevó a cabo en el equipo *Fast Prep* (MP Biomedicals) utilizando un ciclo de 6,0 m/s durante 60 segundos. Finalmente se centrifugó el lisado a 10.000 g durante 20 min a 4°C y se colectó el sobrenadante (extracto celular), al cual se le adicionaron 2 µl de ADNasal (Thermo Fisher Scientific #EN0521). Cabe destacar que las muestras se mantuvieron refrigeradas a una temperatura menor a 4 °C durante todo el proceso.

*Nota 1:* El agregado de Cloranfenicol en el cultivo es un paso importante dentro del protocolo de *Ribosome profiling*. El lisado celular se debe obtener de forma que los complejos ribosoma-ARNm sean un reflejo preciso de la traducción *in vivo* y la posición de los ribosomas en ese momento. Es por esto que previo a la lisis los polisomas son estabilizados con el agregado de inhibidores de la traducción. Inhibidores como el Cloranfenicol en bacterias y Cicloheximida en eucariotas suprimen cambios en la traducción que pueden ocurrir durante el tiempo que lleva la cosecha de las células.<sup>103,104</sup>

*Nota 2:* Alternativamente a los tubos de lisis comerciales, se probó el método de lisis mediante prensa de French. Para esto luego del agregado de Cloranfenicol y la centrifugación de las células a 5000 g, el pellet resultante se resuspendió en 10 ml de *Buffer* Tris-HCl 20mM pH 7,6; MgCl<sub>2</sub> 50 mM; NH<sub>4</sub>Cl 150mM y toda la suspensión se inyectó en la prensa a 13.800 psi, pasándola varias veces durante 15 minutos.

## 6.6 RNAseq - Transcriptómica

### 6.6.1 Extracción de ARN total y evaluación de la calidad del mismo.

El ARN total de la bacteria en las dos condiciones ensayadas se obtuvo a partir de una alícuota de 100 µl del correspondiente extracto celular utilizando el Kit comercial *PureLink RNA Mini Kit* (Thermo Fisher Scientific #12183018A). Se procedió según las instrucciones del fabricante exceptuando los pasos de obtención del lisado celular.

Posteriormente se realizó sobre el ARN obtenido un tratamiento con ADNase I (Thermo Fisher Scientific #EN0521), con el fin de eliminar el ADN contaminante que puede haberse co-purificado durante la extracción. Nuevamente se procedió según las instrucciones del mencionado kit, tratando las muestras con 5 µl de enzima e incubándolas durante 5 minutos a 37°C.

Finalmente la calidad y concentración del ARN obtenido se evaluó mediante electroforesis capilar utilizando el equipo *2100 Agilent Bioanalyzer* disponible en el IIBCE y siguiendo las instrucciones del kit comercial *Agilent RNA 6000 Nano kit* (Agilent Technologies #5067- 1511). La calidad de las muestras se determinó según su valor de RIN (RNA Integrity Number, por sus siglas en inglés), dato aportado por el kit utilizado. Las muestras fueron enviadas a Macrogen (Macrogen Inc, Korea) para su secuenciación masiva, en promedio se enviaron 31 µg de ARN por cada muestra.

## 6.6.2 Análisis bioinformático del transcriptoma

El análisis bioinformático del transcriptoma secuenciado en Macrogen fue realizado por el Departamento de Genómica del IIBCE, donde se utilizaron protocolos estándar de análisis aplicando software y paquetes de análisis de uso libre.

En primer lugar la calidad de las secuencias obtenidas en cada condición (inducción y control) y triplicado biológico se evaluó utilizando la herramienta *FastQC*<sup>105</sup>. El puntaje de calidad promedio asignado por el programa para cada secuencia fue aproximadamente de 36, un alto valor de calidad que equivale a una probabilidad de error de  $2,5 \cdot 10^{-4}$ , por lo cual no fue necesario aplicar ningún filtro a las mismas. Luego utilizando *Bowtie2*<sup>106</sup>, se mapearon las secuencias contra el genoma de UYMMa02A utilizando parámetros por defecto. El conteo de lecturas sobre las secuencias codificantes se realizó con la herramienta *FeatureCounts*<sup>107</sup> y finalmente se realizó un análisis de expresión diferencial utilizando el programa *edgeR*<sup>108</sup> considerándose diferencialmente expresados entre una condición y otra aquellos genes que presentan un p valor ajustado  $<0.05$  y una tasa de cambio  $>2$ .

Las tablas de genes diferenciales generadas se utilizaron para los posteriores análisis funcionales (ver punto 6.9).

## 6.7 Ribosome Profiling – Traductómica .

De forma general, esta técnica técnica consiste en extraer y purificar los polisomas activos de las células en un momento dado mediante la lisis celular y la ultracentrifugación del extracto celular en un gradiente de sacarosa. Luego se realiza un ensayo de protección de ARNasas sobre el pellet enriquecido en polisomas y finalmente los fragmentos protegidos, las huellas ribosomales, son purificadas y utilizadas para la construcción de bibliotecas de secuenciación masiva y su análisis bioinformático.

### 6.7.1 Obtención de huellas ribosomales.

Partiendo de una alícuota de 1,5 ml del extracto celular obtenido según el punto 6.5 se continuó con los pasos siguientes del protocolo de *Ribosome profiling*:

Para la purificación de los polisomas activos, el extracto celular se cargó en tubos de ultracentrífuga (Beckman Open-Top Thinwall Ultra-Clear Tube #344060) conteniendo un colchón de sacarosa 12% / 33,5% p/v preparado en *buffer* con 20 mM Tris-HCl pH 7,6; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 150 mM NH<sub>4</sub>Cl y Cloranfenicol 100 µg/ml y la preparación se centrifugó a 217.874g durante 2 hs a 4°C usando un rotor SW40 Ti, en una ultracentrífuga Beckman L-100K clase S.

Para el ensayo de protección frente a ARNasas, luego de finalizada la corrida en la ultracentrífuga, el pellet enriquecido en polisomas se resuspendió en *buffer* Tris-HCl 20mM pH 7,6; MgCl<sub>2</sub> 50 mM; NH<sub>4</sub>Cl 150mM en presencia de Cloranfenicol y se digirió con 6 U de Benzonasa (Sigma-Aldrich #E1014) durante 10 minutos a temperatura ambiente. La detención de la digestión y la purificación de los fragmentos digeridos se realizó mediante el kit de extracción de ARN pequeños; *mirVana miRNA Isolation Kit* (Thermo Fisher Scientific #AM1560), según las instrucciones del fabricante (la digestión de los polisomas se detiene con el agregado del *Buffer de lisis* de este kit).

En la etapa de purificación de las huellas ribosomales, en primer lugar se procedió a la precipitación del ARN obtenido de las digestiones. Para esto se agregaron 2 µl de *Glicoblue* (Thermo Fisher Scientific #AM9516) a las muestras, 1:10 volúmenes de acetato de sodio 3M pH 5,2 y 4 volúmenes de etanol 100%. La mezcla se dejó precipitando toda la noche a -20°C y luego se centrifugó a 15.500 g durante 30 min a 4°C. Posteriormente se realizaron 2 lavados con etanol 80% y una vez retirado el sobrenadante se resuspendió el pellet de ARN en 5 µl de agua libre de ARNsas.

El siguiente paso consistió en la purificación de los fragmentos del tamaño esperado para las huellas ribosomales (15-40nt) mediante una electroforesis en un gel de poliacrilamida al 15% con urea 7M en *buffer* TBE 5X (Anexo). Una vez finalizada la electroforesis, se recortaron las bandas de interés.

*Nota:* Previo a la corrida electroforética, todo el material de electroforesis se trató durante 10 min con peróxido de hidrógeno 3% y se enjuagó con agua ultra pura (Milli-Q) tratada con DEPC (Sigma-Aldrich #D5758), con el fin de eliminar las ARNsas que pudieran estar presentes.

Para la electroforesis, a cada muestra de ARN conteniendo las huellas ribosomales a analizar, se le adicionó igual volumen (5 µl) de *buffer* desnaturante 2X (formamida 98% v/v con EDTA 10mM y 300 µg/ml de azul de bromofenol) y se las calentó a 80°C por 90 segundos antes de cargarlas en el gel. El mismo se corrió durante 60 min a 200V y posteriormente se reveló durante 3 minutos con el intercalante GelRed 1x (Olerup SSP GelRed #39K) en buffer TBE 1x con agitación suave y se escaneó en el equipo

FUJIFILM FLA-9000. Además de las muestras, se incluyeron en el gel, dos oligonucleótidos de ADN de 26 y 34 nt de largo, los cuales se utilizaron como referencia a la hora de cortar las bandas de interés del gel. Finalmente el ARN se recuperó de las bandas del gel según el protocolo descrito por Ingolia y colaboradores<sup>103</sup>. El mismo consiste en incubar los fragmentos de gel recortados en buffer de extracción (300 mM NaOAc pH 5.5, 1.0 mM EDTA, 0.25% SDS); con agitación circular durante toda la noche. Luego se traspasa el líquido a un nuevo tubo y se precipita el ARN con alcohol. De esta forma se logra purificar y concentrar los fragmentos de ARN de interés, las huellas ribosomales.

La calidad y concentración de las huellas ribosomales obtenidas se evaluó mediante electroforesis capilar utilizando el equipo *2100 Agilent Bioanalyzer* y el kit comercial *Small RNA kit* (Agilent Technologies #5067- 1548) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este kit permite resolver fragmentos de ARN pequeños y además de su concentración y calidad, brinda información precisa sobre su tamaño. Las muestras se enviaron a MacroGen (MacroGen Inc, Korea) para su secuenciación masiva, en promedio se enviaron 0.32 µg de huellas ribosomales por muestra.

#### 6.7.2 Análisis bioinformático del traductoma.

El análisis bioinformático del traductoma secuenciado en MacroGen también fue realizado por el Departamento de Genómica del IIBCE. Los pasos a seguir son similares al análisis del transcriptoma pero con algunas adiciones.

Nuevamente, se utilizó *FastQC*<sup>105</sup> para el control de calidad de las secuencias. El puntaje de calidad asignado fue muy bueno, de aproximadamente 38 por lectura, pero se detectó la presencia del adaptador 3', por lo cual se debió realizar un *Trimming* de adaptadores utilizando la herramienta *cutadapt*<sup>109</sup>, filtrando las secuencias obtenidas de manera de seleccionar aquellas entre 15 y 40 nucleótidos (tamaño esperado para las huellas ribosomales). Luego utilizando *Bowtie2*<sup>106</sup> las secuencias se mapearon contra el genoma de UYMMa02A con parámetros por defecto. El conteo de lecturas sobre las secuencias codificantes se realizó con la herramienta *FeatureCounts*<sup>107</sup> y finalmente se realizó un análisis de expresión diferencial utilizando el programa *edgeR*<sup>108</sup> considerándose diferencialmente expresados entre una condición y otra aquellos genes que presentan un p valor ajustado <0.05 y una tasa de cambio >2.

Para el cálculo de la eficiencia traduccional, parámetro que relaciona los datos de transcriptoma y traductoma, se corrió el programa *Xtail*<sup>110</sup> con parámetros por defecto. Nuevamente, se consideraron genes diferencialmente expresados aquellos en los cuales se observó una tasa de cambio >2 y un p-valor ajustado < 0.05.

Las tablas de genes diferenciales generadas se utilizaron para los posteriores análisis funcionales (ver punto 6.9).

## 6.8 *Shotgun proteomics* - Proteómica.

### 6.8.1 Obtención de proteínas totales, cuantificación y determinación de la calidad de las mismas.

Del extracto celular mencionado, 100  $\mu$ l se destinaron para la obtención de proteínas totales. Al mismo se le agregó el inhibidor de proteasas cOmplete ULTRA Tablets mini EDTA-free (Roche #5892791001) a una concentración final 1X, siguiendo las instrucciones del fabricante.

La calidad de las proteínas totales obtenidas en el extracto celular se evaluó por SDS-PAGE y la cuantificación de las mismas por densitometría de geles. Para esto, a 18  $\mu$ l de cada muestra se le adicionaron 6  $\mu$ l de *buffer* de carga 4 X (Tris-HCl 250 mM pH 6,8; SDS 8%; glicerol 40%; DTT 0,4M, azul de bromofenol 0,04%) y se las calentó a 100°C durante 10 min. Las muestras se cargaron en geles comerciales (NuPAGE™ 4 to 12%, Bis-Tris, 1.0mm, Mini Protein Gel, Invitrogen). Se incluyeron pocillos conteniendo 2,5 y 5  $\mu$ l del marcador de peso molecular LMW-SDS Marker kit (GE, Healthcare) el cual fue utilizado como estándar.

La corrida electroforética se llevó a cabo a 150 V, hasta que el frente de corrida alcanzó el final del gel. Posteriormente el gel se fijó con etanol/ ácido acético/ agua en relación 5:1:4 durante 30 min a temperatura ambiente con agitación suave y se tiñó con una solución de azul de Coomassie coloidal (sulfato de amonio 8%, ácido fosfórico 0,8%, Coomassie Blue G-250 0,08%, etanol 20%) durante toda la noche. Al otro día las muestras se destiñeron mediante sucesivos lavados con agua ultra pura a temperatura ambiente con agitación suave.

Se obtuvo una imagen del gel con el escáner UMAX Power-Look 1120 y el *software* LabScan 5.0. La cuantificación de proteínas se realizó mediante el módulo “1D analysis” del *software* ImageQuant TL (v8.1), utilizando el marcador de peso molecular como estándar.

### 6.8.2 Pre-tratamiento de las muestras para nano-LC MS/MS.

Las muestras obtenidas en el punto anterior fueron sometidas a un pre-tratamiento con el único fin de disminuir su complejidad previo a ser analizadas por nano-LC MS/MS. En primer lugar, 20  $\mu$ g de cada muestra fue separada mediante una corrida electroforética en un gel SDS-PAGE de acrilamida 12,5% a 20 mA hasta que el frente de corrida entró aproximadamente 1 cm en el gel separador. El gel se fijó con etanol/ácido acético 50:10 durante 30 minutos a temperatura ambiente y con agitación suave. Se tiñó durante toda la noche con azul de Coomassie coloidal (sulfato de amonio 8%, ácido fosfórico 0,8%, Coomassie Blue G-250 0,8% y etanol 20%) y destiñó mediante varios lavados con agua ultra pura a temperatura ambiente con agitación suave.

Los fragmentos del gel conteniendo a las proteínas se escindieron con un bisturí y se transfirieron a tubos limpios de plástico de 1.5mL (tipo *ependorf*). Las muestras se redujeron *in-gel*, con el agregado de una solución de DTT 10 mM en bicarbonato de amonio 0,2 M, incubándolas 45 minutos a temperatura ambiente, con agitación vigorosa y protegidas de la luz. Luego los fragmentos de gel se deshidrataron mediante dos incubaciones con acetonitrilo puro durante 5 minutos y agitación vigorosa y posteriormente se secaron bajo flujo laminar. Las muestras así procesadas, se digirieron también *in gel* con el agregado de 2 µg de tripsina (Promega, Sequence grade #V5111) en buffer bicarbonato de amonio 50mM pH 8, durante toda la noche, a 37°C. Al otro día, los péptidos fueron extraídos agregando una solución de acetonitrilo/ácido trifluoroacético 60:0.1 (hasta cubrir totalmente los fragmentos de gel) e incubándolos 1 hora a temperatura ambiente, con agitación vigorosa. El sobrenadante se recoge, se transfiere a un nuevo tubo tipo *ependorf* y se repite el proceso una vez más. Los péptidos extraídos se secaron por centrifugación con vacío (speedVac Labconco), se resuspendieron en 20 µl de ácido fórmico 0,1% (Fase A) y sonicaron en un baño de agua (Ultrasonic Branson 200) con una frecuencia operativa de 40 khz, a temperatura ambiente durante 15 minutos.

Finalmente, las muestras se desalaron 2 veces utilizando columnas de fase reversa (C18 micro-columns C18 OMIX, pipette tips, Agilent) y se eluyeron en viales para LC-MS/MS con 20 µl de ácido fórmico 0,1% en acetonitrilo (Fase B). Se eliminó el acetonitrilo secando las muestras en speedVac y se las resuspendió en 20 µl de fase A para posteriormente sonicarlas en baño de agua bajo las mismas condiciones mencionadas previamente.

### 6.8.3 Análisis por nano-LC MS/MS.

Las muestras obtenidas en el punto anterior se analizaron mediante nano-LC MS/MS utilizando una estrategia de tipo shotgun. Se inyectaron en un nano-HPLC (Ultimate 3000, Thermo Fisher Scientific) acoplado en línea a un espectrómetro de masa híbrido cuadrupolo-Orbitrap (Q-Orbitrap, Q-Exactive Plus, Thermo Fisher Scientific) a través de una fuente de spray (Easy-Spray Source, Thermo Fisher Scientific).

Para la separación por nano LC, se inyectaron 7 mg de la mezcla de péptidos en una columna nano-trap Acclaim PepMap™ 100 C18 (75 mm x 2 cm, 3 mm de tamaño de partícula, Thermo Fisher Scientific) y se separaron usando una columna analítica PepMap™ RSLC (75 mm x 50 cm, 2 mm de tamaño de partícula, Thermo Fisher Scientific). La columna se equilibró con 1% de fase móvil B y la elución de los péptidos se realizó utilizando el siguiente gradiente: Fase B de 1% a 50 % en un período de 150 min y una etapa final de 50% a 99% de fase B en 5 min. Se corrieron dos réplicas técnicas por cada réplica biológica.

El espectrómetro de masa se operó en modo positivo. El voltaje del spray de iones se fijó a 1.7 kV; la temperatura del capilar a 250 °C y el nivel de los S-lens RF a 50. El

análisis de masa se llevó a cabo de modo dependiente de datos (Data Dependent Acquisition, DDA) en dos pasos: i) adquisición del total de los escaneos de MS (full MS scan) en un rango de m/z de 200 a 2000; seguido de la fragmentación por HCD (high collision dissociation) de los 12 iones con mayor intensidad para cada segmento, usando una energía de colisión escalonada de 25, 30 y 35. El escaneo total de MS se adquirió a una resolución de 70000 a 200 m/z, un valor de AGC (accumulated gain control) de  $1 \times 10^6$  y un máximo de tiempo de inyección de 50 ms. Para la adquisición de los MS/MS la resolución se fijó de 17500 a 200 m/z, un valor de AGC de  $1 \times 10^5$  y un máximo de tiempo de inyección de 50 ms. Los iones precursores sin asignación, con una sola carga o con 5 o más cargas fueron excluidos de la fragmentación. Se fijó además un tiempo de exclusión dinámica de 30 segundos.

#### 6.8.4 Análisis informático de los espectros

Los espectros obtenidos fueron analizados mediante el programa *PatternLab for Proteomics* 4.0 (<http://www.patternlabforproteomics.org/>)<sup>111</sup>.

En primer lugar a partir del proteoma de nuestra cepa (depositado en Rast, *Rapid Annotation using Subsystems Technology* 2.0, <http://rast.theseed.org/FIG/rast.cgi>), se generó una base de datos del tipo target reverse en la cual se incluyeron además los 127 contaminantes más comunes en espectrometría de masa (Ej. BSA, queratina, etc.). Se realizó la identificación de los péptidos de las muestras comparando los datos obtenidos en el espectrómetro de masas contra esta base. Para este procedimiento se tuvieron en cuenta los siguientes parámetros: i- tripsina como enzima proteolítica con especificidad completa y con posibilidad de omisión de un corte, ii- oxidación de metioninas como modificación variable, iii- carbometilación de cisteínas como modificación fija y iv- tolerancia de masa del precursor: 40 ppm.

Utilizando la herramienta *Search Engine Processor* (SEPro), integrada en el software *PatternLab*, se filtraron las coincidencias de los espectros correspondientes a los péptidos con un valor aceptable de FDR (*False Discovery Rate*) de 1%. Se utilizó el módulo Buzios para realizar el análisis de componentes principales. El módulo *Approximately Area Proportional Venn Diagram* se usó para comparar las proteínas identificadas en las muestras control e inducidas y determinar cuáles de ellas fueron únicamente detectadas en una condición con un valor de probabilidad de 0,05. El módulo *T-Fold* se empleó para detectar aquellas proteínas presentes en ambas condiciones pero con un cambio significativo en su abundancia relativa basándose en el conteo de espectros, como criterio, se consideró diferencialmente expresadas, a aquellas proteínas que presentan una tasa de cambio  $>2$  con un p-valor  $<0.05$ . Las tablas de proteínas expresadas diferencialmente generadas se utilizaron para los posteriores análisis funcionales (ver punto 6.9).

## 6.9 Análisis funcionales

A partir del genoma de *Cupriavidus* sp. UYMMa02A 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 los genes y proteínas identificados y su ubicación (o de su secuencia génica en el caso de las proteínas) a nivel cromosomal, utilizando BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)<sup>112</sup>.

Además, utilizando la base de datos *eggNOG-mapper* (<http://eggno-mapper.embl.de/>)<sup>113</sup> todo el genoma se clasificó según las categorías funcionales COG (*Clusters of Orthologous Groups*) y las vías metabólicas KEGG. A partir de esta anotación se realizó un análisis de enriquecimiento funcional sobre los genes y proteínas expresados diferencialmente (identificados a partir de los datos de transcriptómica, traductómica y proteómica) utilizando el test exacto de Fisher<sup>114</sup> y considerando un enriquecimiento significativo un p-valor <0.05.

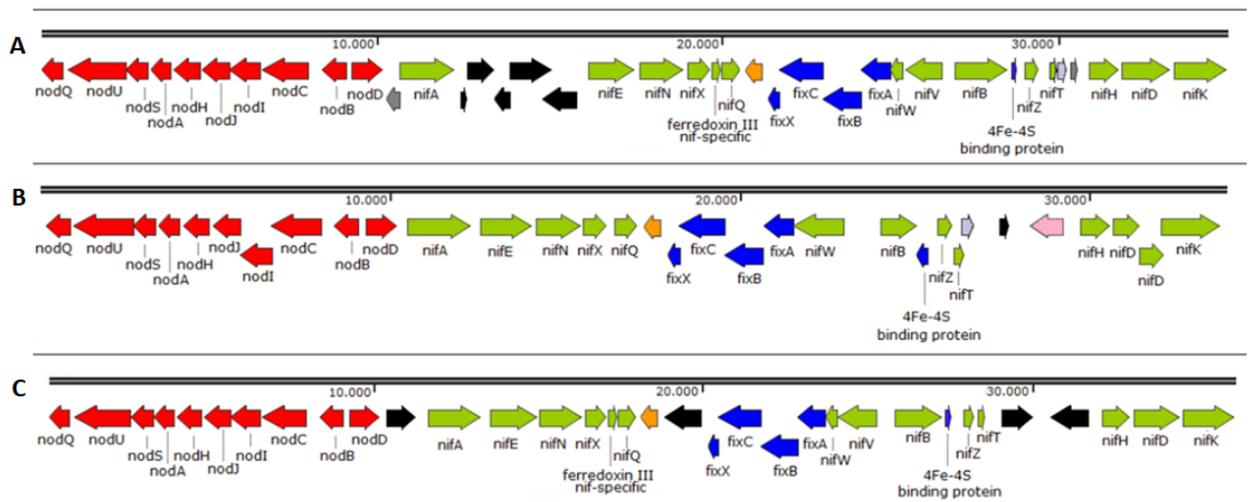
## 7 RESULTADOS

Para observar la respuesta de UYMMa02a en las primeras etapas de interacción con *M. pudica*, se la expuso a los exudados de esta planta durante 12 horas. En primer lugar se analizó el efecto de los exudados sobre la expresión de los genes *nod* y luego se hizo un análisis global de la expresión desde el punto de vista transcriptómico, traductómico y proteómico. Es importante destacar que las tres técnicas se realizaron sobre un mismo extracto celular.

### 7.1 Análisis de la capacidad de inducción de exudados de *M. pudica* sobre cepas del género *Cupriavidus*.

Como primer paso para el estudio de las adaptaciones de *Cupriavidus sp.* UYMMa02A durante la interacción simbiótica con *M. pudica*, se evaluó la capacidad de los exudados de la planta de inducir los genes de nodulación. Con este fin, nuestra cepa modelo se transformó con el plásmido pCBM01 el cual contiene la fusión entre el promotor *nodB* de *C. taiwanensis* LMG 19424 y el gen reportero *lacZ*<sup>100</sup>. Como controles se incluyeron en el ensayo otra cepa de nuestra colección, *Cupriavidus necator* UYPR2.512 y la cepa tipo *C. taiwanensis* LMG 19424. Las cepas con estas construcciones se enfrentaron al medio M9 suplementado con los exudados radiculares de *M. pudica*.

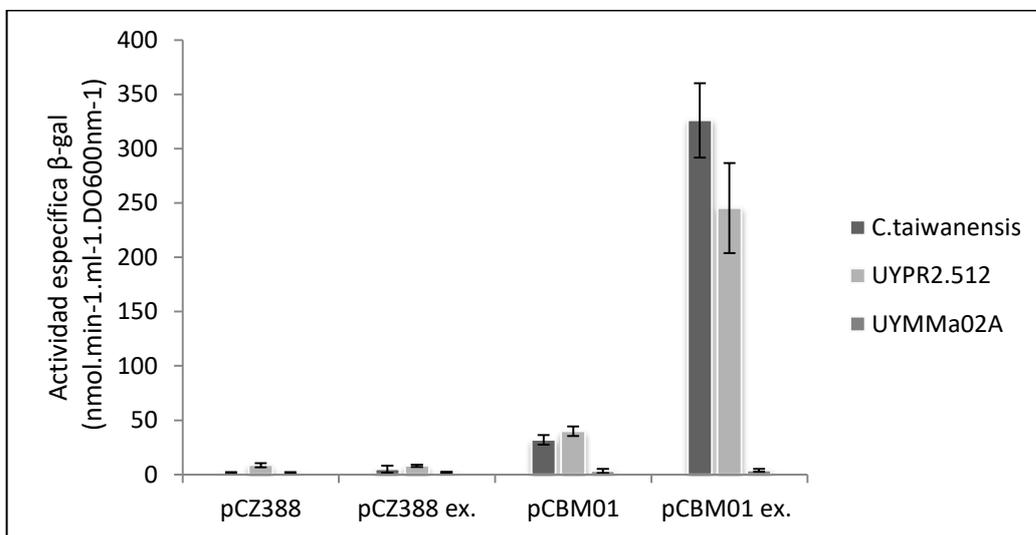
En un trabajo previo, Marchetti y colaboradores habían demostrado que los exudados de *Mimosa pudica* eran capaces de inducir la expresión de los genes de nodulación en la cepa modelo *C. taiwanensis* LMG 19424<sup>115</sup>. Dada la similitud genética entre el arreglo de genes *nod* de esta cepa<sup>35</sup> y UYMMa02A<sup>98</sup> (Figura 9), se espera que ambas cepas tengan una respuesta similar a la presencia de los exudados.



**Figura 9. Arreglo de genes simbióticos en distintas cepas de rizobio del género *Cupriavidus*.**

Se presenta el rearreglo de genes de la isla simbiótica en *C. taiwanensis* LMG 19424 (A), *Cupriavidus sp.* UYMMa02A (B) y *C. necator* UYPR2. 512 (C). En rojo se marcan los genes de nodulación *nod*, en verde los genes *nif* y en azul los genes *fix*. Otros colores representan genes que no forman parte de estos operones.

Como era de esperarse, en LMG 19424 se observó una clara inducción de los genes *nod*; (**Figura 10**). En presencia de exudados radiculares se observa un incremento en la actividad  $\beta$ -gal de esta cepa conteniendo el vector pCBM01. Esta inducción no es visible en el medio M9 sin exudados ni en la cepa que tiene el vector pCZ388, lo cual demuestra que efectivamente son los exudados de *M. pudica* los que contienen inductores de los genes *nod*, validándose su uso para ensayos posteriores. Siguiendo esta línea, al incubar a la cepa *C. necator* UYPR2.512 con los exudados, se observó un aumento de la actividad  $\beta$ -gal, indicando que los genes *nod* también se inducen en esta bacteria. Contrariamente, cuando se enfrentó a la cepa *Cupriavidus sp.* UYMMa02A conteniendo el plásmido pCBM01 a los exudados radiculares de *M. pudica*, no se observó un aumento en la actividad  $\beta$ -gal en ningún caso. La misma se mantuvo a niveles basales independientemente de la presencia de los exudados, indicando que en nuestra cepa modelo no ocurre la inducción de genes *nod* observada en las otras cepas.



**Figura 10. Efecto de exudados radiculares de *M. pudica* sobre la expresión de *pnodB*<sub>LMG19424</sub> en las cepas UYMMa02A, UYPR2.512 y LMG19424.**

Actividad  $\beta$ -galactosidasa en las cepas *C. taiwanensis* LMG19424, *C. necator* UYPR2.512 y *Cupriavidus sp.* UYMMa02A en presencia y ausencia de exudados radiculares de *M. pudica*. pCZ388: plásmido control en medio M9 citrato; pCZ388 ex.: plásmido control en medio M9 citrato suplementado con exudados; pCBM01: plásmido con inserto en medio M9 citrato; pCBM01 ex.: plásmido con inserto en medio M9 citrato suplementado con exudados. El ensayo se realizó por triplicado, las barras de error muestran el desvío estándar entre cada uno.

## 7.2 Respuesta transcripcional de UYMMa02A frente a exudados radiculares de *M. pudica*.

La ausencia de inducción de los genes *nod* en UYMMa02A sugiere la existencia de mecanismos alternativos para el establecimiento de la simbiosis con plantas hospedadoras. Como primer punto de vista para evaluar la respuesta de UYMMa02A ante la presencia de exudados radiculares de *M. pudica*, decidimos analizar los cambios ocurridos a nivel transcripcional frente a este estímulo. Para esto se aisló el ARN total

bacteriano luego de la inducción y mediante la técnica de *RNA-seq*, se identificaron los genes que se transcriben activamente en esta condición, comparándolos con aquellos transcritos en la condición control.

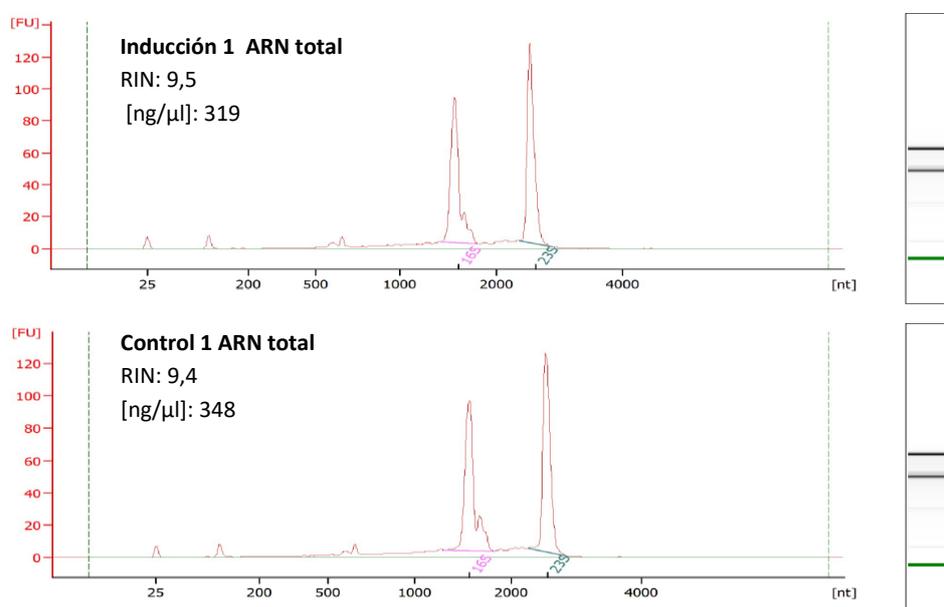
### 7.2.1 Obtención del ARN total y secuenciación masiva del mismo

A partir de los extractos celulares obtenidos, se logró purificar ARN total de alta calidad, evidenciada por los valores de integridad (RIN *RNA Integrity Number*) entre 9,9 y 9,3 y en una concentración adecuada para su posterior secuenciación (**Tabla3**). En la **Figura11** se muestra el perfil de ARN obtenido en una de las réplicas biológicas para las dos condiciones ensayadas (los triplicados se presentan en el Anexo, **Figuras S1, S2, S3**).

**Tabla 3. Concentración y calidad del ARN total obtenido.**

Muestra	ARN total (ng/μl)	RIN
Inducción 1	319	9,5
Inducción 2	288	9,8
Inducción 3	245	9,8
Control 1	348	9,4
Control 2	370	9,3
Control 3	306	9,8

Se presenta la concentración y calidad del ARN total obtenido a partir de las tres réplicas biológicas al exponer a UYMMa02A a exudados radiculares (inducción) y a la condición control. Datos determinados con el equipo 2100 *Agilent Bioanalyzer* y el kit *Agilent RNA 6000 Nano kit*.



**Figura 11. Calidad y concentración del ARN total obtenido.**

Se muestran los electroferogramas obtenidos con el equipo 2100 *Agilent Bioanalyzer* para la muestra 1 en las condiciones de inducción y control. Además se presenta la concentración y el valor de RIN para cada muestra.

El ARN obtenido fue enviado a Macrogen (Macrogen Inc, Corea del Sur) para su secuenciación masiva. En promedio se obtuvieron 31 millones de lecturas apareadas (*pair-end reads*) por muestra, de las cuales alrededor de un 98% mapearon contra el genoma de UYMMa02A y de estas, 87% alinearon contra regiones codificantes (CDS). (**Tabla 4**). La calidad de las secuencias, evaluada mediante *FastQC*, resultó muy buena, con un puntaje de calidad promedio (asignado por el programa) de aproximadamente 36 para cada secuencia, lo que equivale a una probabilidad de error de  $2,5 \times 10^{-4}$ .

**Tabla 4. Resumen de los datos obtenidos mediante RNA-seq.**

Muestra	Lecturas <i>pair-end</i>	Lecturas mapeadas	% de mapeo	% asignado a CDS
Inducción 1	31.258.344	30.815.919	98.58	87.3
Inducción 2	31.332.315	30.873.489	98.54	87.6
Inducción 3	31.377.241	31.325.104	99.83	87.2
Control 1	31.302.018	31.241.037	99.81	87.2
Control 2	31.217.726	31.157.788	99.81	87.5
Control 3	31.263.474	31.215.152	99.85	86.6

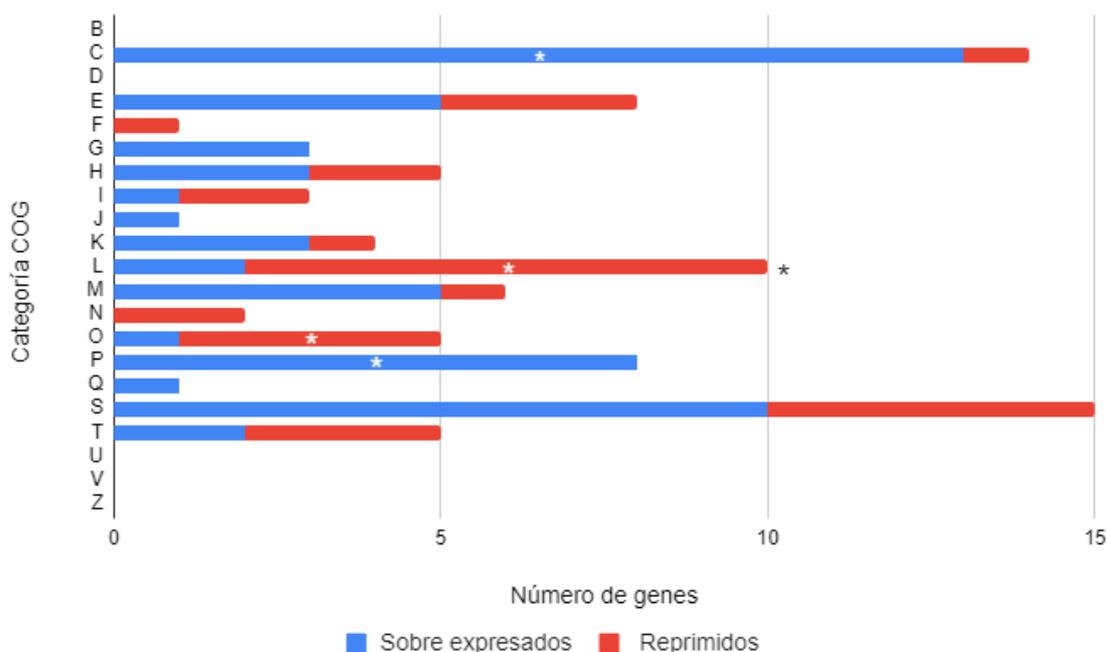
Resultado de la secuenciación del ARN total obtenido a partir de cultivos de UYMMa02A enfrentados (inducción) a exudados radiculares de *M. pudica* o no (control).

### 7.2.2 Análisis de los genes diferenciales identificados a partir del transcriptoma secuenciado

A partir de los datos secuenciados, en este experimento se lograron identificar un total de 101 genes expresados diferencialmente: 64 sobreexpresados (tasa de cambio  $>2$  y p-valor ajustado  $<0,05$ ) y 37 reprimidos (tasa de cambio  $<-2$  y p-valor ajustado  $<0,05$ ) presentados en las **Tablas suplementarias S1 y S2** del Anexo.

Con el objetivo de entender de forma globalizada el rol de los genes expresados diferencialmente, se utilizó la base de datos *eggNOG-mapper* (<http://eggno-mapper.embl.de/>) que permite su clasificación en categorías funcionales COG y su asignación a las vías metabólicas KEGG. Con esta herramienta fue posible categorizar el 84% y 89% de los genes sobreexpresados y reprimidos respectivamente (Tablas S1 y S2). A partir de esta clasificación, se realizó un análisis de enriquecimiento funcional en el cual se buscó detectar categorías y vías metabólicas afectadas por el tratamiento.

El análisis de las categorías COG mostró que los genes expresados diferencialmente se distribuyen en 17 de un total de 21 categorías. El análisis de enriquecimiento funcional indicó que en presencia de exudados radiculares, se ven enriquecidas las categorías C (producción y conversión de energía) y P (transporte y metabolismo de iones inorgánicos), mientras que considerando los genes reprimidos, las categorías enriquecidas fueron L (replicación y reparación) y O (modificaciones post-traduccionales, recambio proteico, funciones chaperonas). Cabe destacar que la categoría L también se vio enriquecida al considerar todos los genes diferenciales en el análisis (**Figura 12**).



**Figura 12. Clasificación de genes diferenciales identificados por transcriptómica en categorías COG.**

Se presentan las categorías COG asignadas a los genes expresados diferencialmente en presencia de exudados radiculares. En azul se representan los genes sobre expresados y en rojo los reprimidos. Las categorías que se encuentran estadísticamente enriquecidas (test exacto de Fisher,  $p$ -valor $<0.05$ ) se destacan con un asterisco (\*). Categorías: B- estructura de la cromatina; C- producción y conversión de energía; D- control del ciclo celular; E- metabolismo de aminoácidos; F- metabolismo de nucleótidos; G- metabolismo de carbohidratos; H- metabolismo co-enzimático; I- metabolismo lipídico; J-traducción; K- transcripción; L- replicación, recombinación y reparación, M- estructura y biogénesis de la envoltura celular y de la membrana externa; N- movilidad celular; O- modificaciones post-traduccionales, proteínas chaperonas; P- transporte y metabolismo de iones inorgánicos; Q- estructuras secundarias; S- función desconocida; T- transducción de señales; U- tráfico intracelular; V- mecanismos de defensa; Z- citoesqueleto.

Por otro lado, en cuanto a la clasificación de estos genes dentro de vías metabólicas KEGG (**Tabla 5**), al considerar los genes reprimidos solamente la vía relacionada al metabolismo de cofactores y vitaminas, en particular el metabolismo de biotina, se vio enriquecida según el test de Fisher. En lo que respecta a los genes sobreexpresados, se vieron enriquecidas vías metabólicas involucradas en el metabolismo energético (fosforilación oxidativa y metabolismo del nitrógeno) y en el metabolismo de carbohidratos (metabolismo de fructosa y manosa).

**Tabla 5. Clasificación de los genes diferenciales identificados por transcriptómica en vías metabólicas KEGG.**

KEGG ID	# genes diferenciales	# genes totales	p-valor	Ruta metabólica	Sub-clase	Clase
<b>Sobreexpresados</b>						
ko00190	6	94	3.0E-04	Fosforilación oxidativa	Metabolismo energético	Metabolismo
Ko00910	4	64	3.8E-03	Metabolismo del nitrógeno		
Ko00051	3	35	5.1E-03	Metabolismo de fructosa y manosa	Metabolismo de carbohidratos	
<b>Reprimidos</b>						
Ko00780	2	21	4.6E-03	Metabolismo de biotina	Metabolismo de cofactores y vitaminas	Metabolismo

Se presentan las vías metabólicas en las cuales están involucrados los genes de expresión diferencial en presencia de exudados radiculares. Para cada vía metabólica, se indica el número de genes diferenciales (#genes diferenciales) así como el número de genes totales en el genoma (#genes totales), asignados a la misma.

### 7.3 Respuesta traduccional de UYMMa02A al inducirla con exudados de *M. pudica*

Para conocer en mayor profundidad la interacción de UYMMa02A y *M. pudica*, además del análisis transcriptómico, se abordó el diálogo molecular entre los dos simbioses desde el punto de vista traductómico. Se analizó que genes se traducen activamente en la bacteria en presencia de exudados radiculares, utilizando la técnica de *Ribosome Profiling*.

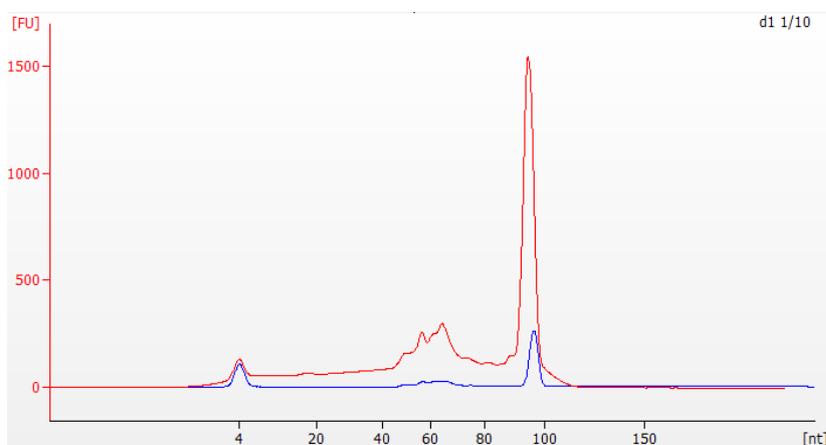
#### 7.3.1 Puesta a punto de la técnica *Ribosome Profiling* para *Cupriavidus*.

La puesta a punto de esta técnica en nuestro modelo de estudio fue uno de los objetivos más desafiantes del presente trabajo. A grandes rasgos, la técnica consiste en extraer y purificar los polisomas activos de las células a partir de un extracto celular, realizar un ensayo de protección de ARNsas sobre los mismos y purificar los fragmentos protegidos (huellas ribosomales) para su posterior secuenciación masiva y análisis bioinformático. Estas huellas ribosomales revelan la posición exacta en la que se encontraban los ribosomas al momento de la traducción<sup>72</sup>. En particular, en este trabajo puntos claves a optimizar fueron el método de obtención de los extractos celulares y el ensayo de protección frente a ARNsas.

Para la lisis y la obtención del extracto celular se probaron dos formas de lisis partiendo de 350 mg de células: Prensa de French y tubos de lisis comerciales. La primera experiencia se realizó lisando las células en la prensa de French, sin embargo, con este tipo de lisis no se logró obtener polisomas a partir del extracto celular resultante. La causa de este resultado negativo podría ser que debido al tiempo que lleva lisar las células y la imposibilidad de controlar la temperatura y de tratar el equipo contra ARNsas, los polisomas se degradaron durante el proceso. Por estos motivos se buscaron métodos alternativos para lograr una lisis celular eficaz, de forma limpia y en poco tiempo, sin perder el frío en la muestra. Se optó por los tubos de lisis comerciales

(MP Biomedicals) los cuales se utilizaron en el equipo *Fast prep*. De esta forma se logró obtener un extracto celular en apenas 60 segundos, del cual se recuperaron con éxito polisomas.

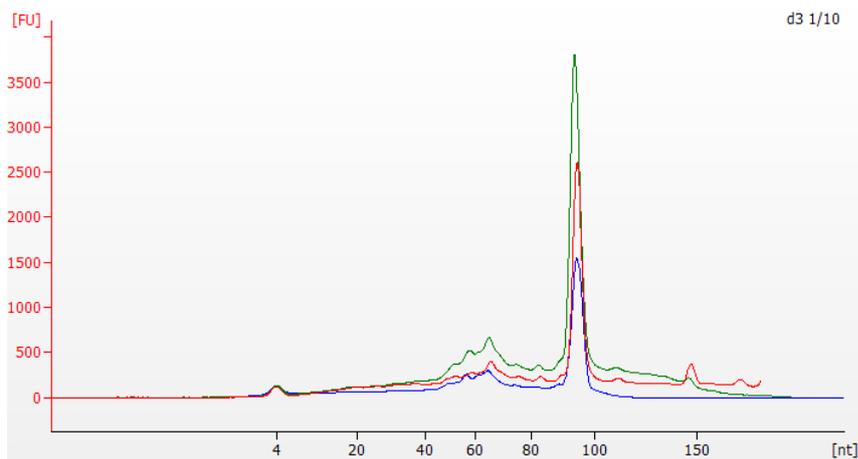
Por otro lado, en cuanto al ensayo de protección frente a ARNasas, se debió poner a punto la concentración de la nucleasa Benzonasa utilizada para digerir los fragmentos de ARN no protegidos por los ribosomas. En primer lugar se decidió optar por los protocolos ya establecidos por el Departamento de Genómica del IIBCE<sup>116</sup>, tratando los polisomas con 187.5 U de Benzonasa durante 10 min a temperatura ambiente. En estas condiciones el perfil de digestión obtenido no coincide con lo esperado según reportes de la literatura<sup>117,77,75</sup>. En la **Figura 13** se puede observar que no se logran obtener fragmentos definidos del tamaño esperado de entre 15 y 40 nt (región donde se encuentran las huellas ribosomales) y que el perfil de la digestión es muy similar al control sin digerir.



**Figura 13. Perfil de digestión de fracción polisomal.**

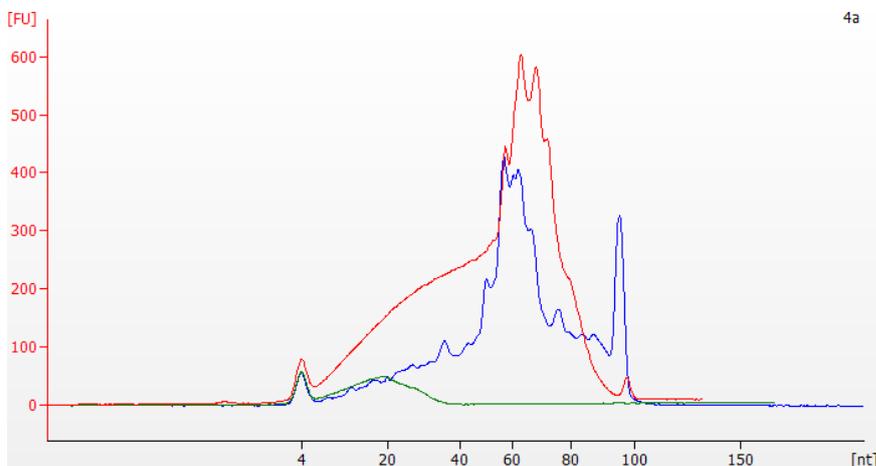
Se muestra el electroferograma obtenido con el equipo *2100 Agilent Bioanalyzer* correspondiente a la digestión de los polisomas con 187,5 U de Benzonasa en color rojo y al control sin digerir en color azul.

En base a este resultado se debieron optimizar las condiciones de digestión de los polisomas. Con este fin se decidió variar la cantidad de enzima, manteniendo las condiciones de tiempo y temperatura establecidas. En la **Figura 14**, se muestra el perfil de digestión obtenido aumentando la cantidad de Benzonasa a 375 U y 750 U. Como se puede observar, los perfiles obtenidos son muy similares entre sí y con el obtenido al usar 187.5 U (**Figura 13**), sin lograr un enriquecimiento de fragmentos en la región de interés (15 – 40 nt). Este resultado sugiere que las cantidades de enzima empleadas estarían digiriendo demasiado el ARN, degradando incluso los fragmentos que deberían estar protegidos por los ribosomas. Siguiendo este razonamiento, se ensayó la digestión de los polisomas disminuyendo la cantidad Benzonasa (24 U, 6 U y 2 U) empleada. Como se observa en la **Figura 15**, al disminuir la cantidad de enzima, sí se logró obtener un perfil distinto, observándose una mayor concentración de fragmentos de ARN en la región de 15 a 40 nt. En base a este resultado se decidió realizar las digestiones de los polisomas usando 6 U de Benzonasa.



**Figura 14. Perfil de digestión de fracción polisomal con cantidades crecientes de enzima.**

Se muestra el electroferograma obtenido con el equipo *2100 Agilent Bioanalyzer* correspondiente a la digestión de los polisomas con 187,5 U (azul), 375 U (verde) y 750 U (rojo) de Benzonasa.

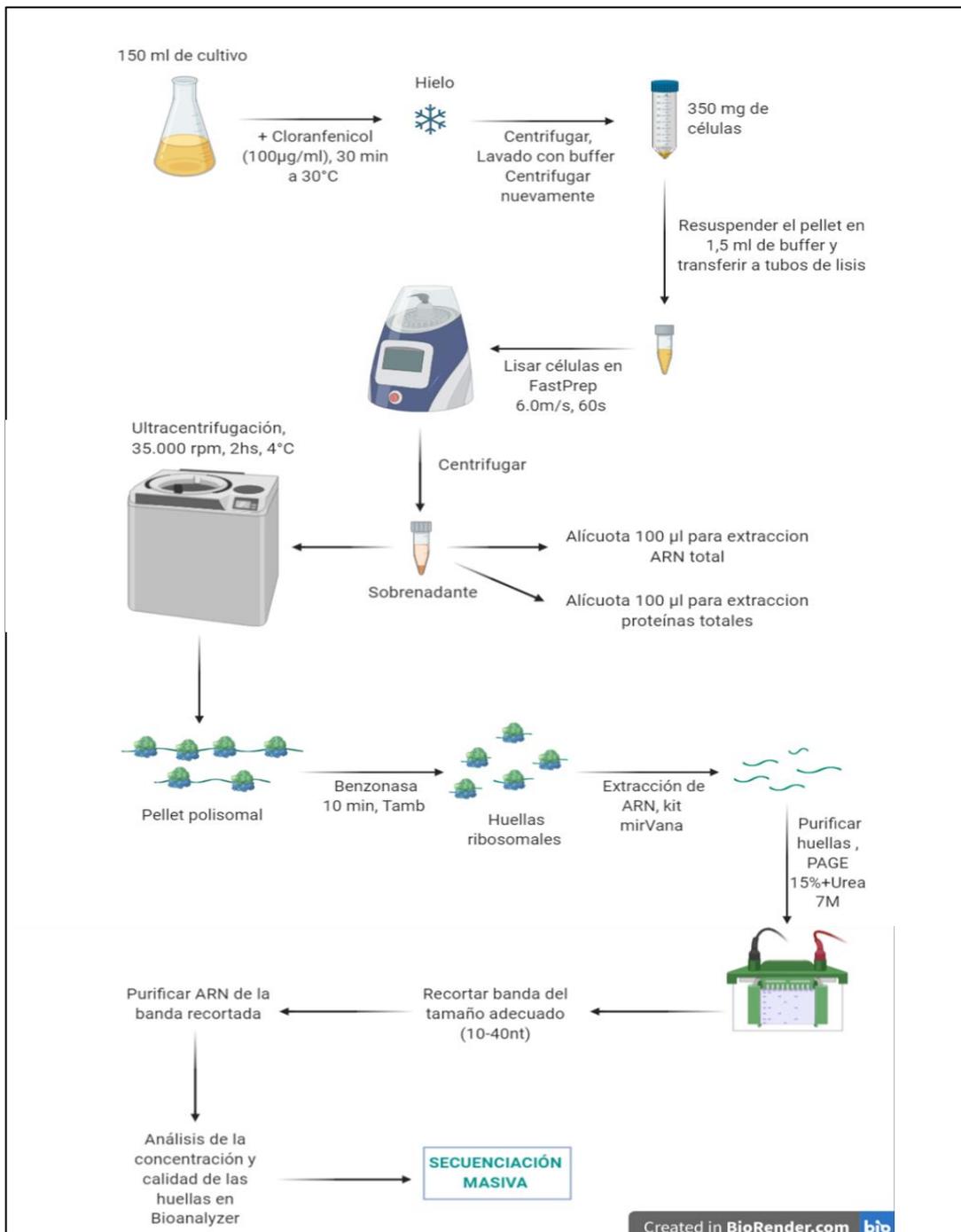


**Figura 15. Perfil de digestión de fracción polisomal con cantidades decrecientes de enzima.**

Se muestra el electroferograma obtenido con el equipo *2100 Agilent Bioanalyzer* correspondiente a la digestión de los polisomas con 24 U (verde), 6 U (rojo) y 2 U (azul) de Benzonasa.

Luego de la digestión con la mencionada enzima, las huellas ribosomales resultantes se purificaron mediante el kit *comercial mirVana miRNA Isolation Kit* y por electroforesis en gel de poliacrilamida (ver apartado de materiales y métodos).

En resumen se logró poner a punto el protocolo de *Ribosome Profiling* para bacterias del género *Cupriavidus*, determinándose el número de células de partida, el método de lisis y las condiciones de digestión de los polisomas para la obtención de huellas ribosomales en concentración y calidad necesarias para su secuenciación. En la **Figura 16**, se muestra en forma detallada el protocolo logrado. Cabe destacar que este protocolo además es compatible con la obtención de material de partida, ARN total y proteínas, necesario para las otras dos técnicas utilizadas en esta tesis.



**Figura 16. Protocolo general.**

Se presenta el protocolo logrado para la obtención de un extracto celular de UYMMa02A a partir del cual fue efectivo el aislamiento de huellas ribosomales, ARN total y proteínas totales.

### 7.3.2 Obtención de huellas ribosomales y secuenciación masiva de las mismas

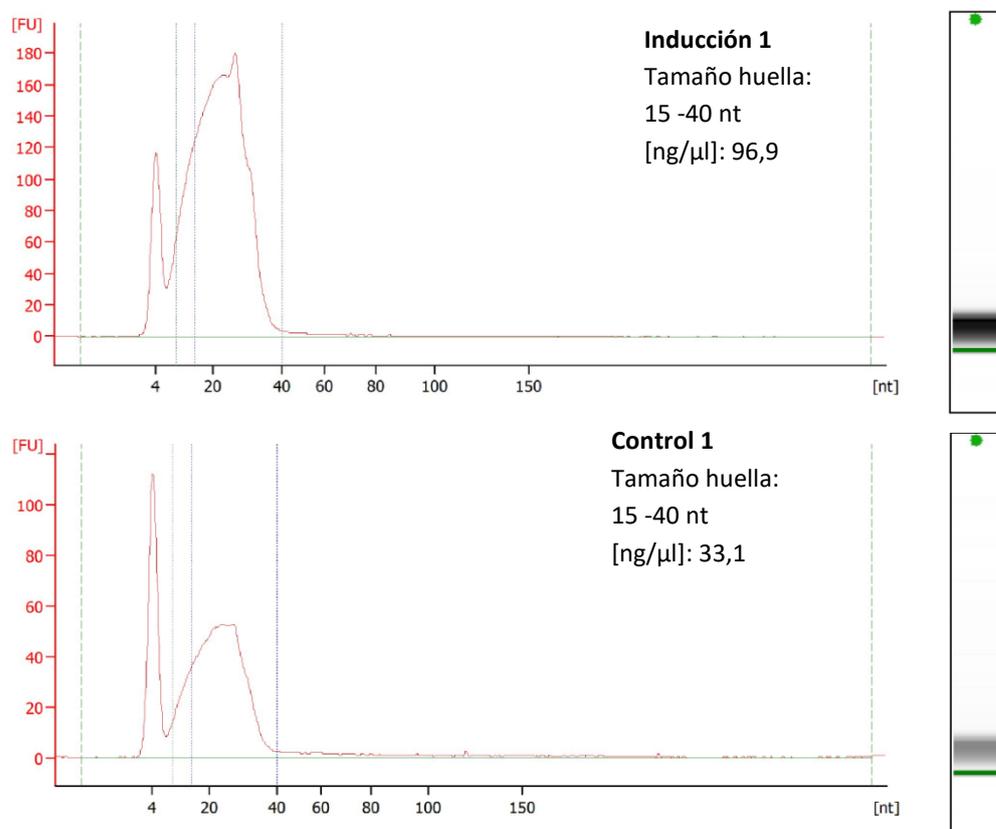
El protocolo puesto a punto se aplicó sobre cultivos de UYMMa02A crecidas en presencia o ausencia de exudados radiculares. Se logró obtener huellas ribosomales con el perfil de electroferograma esperado, es decir con un tamaño de entre 15 y 40 nt y a una concentración suficiente para realizar la construcción de bibliotecas de secuenciación masiva. En la **Figura 17** se muestra como ejemplo las huellas obtenidas en una de las réplicas biológicas para la condición de inducción con exudados

radiculares y su respectivo control (los triplicados se presentan en el Anexo **Figuras S4, S5, S6**). En la **Tabla 6** se presenta la concentración de huellas ribosomales obtenidas para las 3 réplicas biológicas y en las 2 condiciones ensayadas.

**Tabla 6. Concentración de las huellas ribosomales obtenidas.**

Muestra	ng/ $\mu$ l	ng totales
Inducción 1	96,9	484,5
Inducción 2	88,4	442,1
Inducción 3	58,9	294,8
Control 1	33,1	165,4
Control 2	86,5	432,5
Control 3	18,3	91,5

Se presenta la concentración de las huellas ribosomales obtenidas en las tres réplicas biológicas, al exponer a UYMMa02A a exudados radiculares (inducción) y a la condición control. Datos determinados con el equipo 2100 *Agilent Bioanalyzer* y el kit *Agilent Small RNA*.



**Figura 17. Calidad y concentración de las huellas ribosomales obtenidas.**

Se muestran los electroferogramas obtenidos con el equipo 2100 *Agilent Bioanalyzer* para la muestra 1 en las condiciones de inducción y control. Además se presenta rango de tamaño y la concentración de cada muestra determinada por el equipo dentro de ese rango (15-40 nt).

Las huellas ribosomales obtenidas se enviaron a Macrogen (Macrogen Inc, Korea) para su secuenciación masiva. La calidad de las bibliotecas secuenciadas nuevamente fue muy buena, con un puntaje asignado por el programa de control de calidad *FastQC*, de aproximadamente 36 por lectura, lo cual equivale a una probabilidad de error de  $2,6 \times 10^{-4}$ . Se obtuvieron en promedio 42 millones de lecturas por muestra, de las cuales alrededor de un 88% mapearon contra el genoma de UYMMa02A. En el mapeo

aproximadamente un 56% de las lecturas alinearon contra regiones codificantes (CDS) y solamente un 22% alinearon contra ARN ribosomal (ARNr) y ARN de transferencia (ARNt) (**Tabla 7**). Cabe destacar que este 22% se considera bajo ya que muchas veces la contaminación por ARNr puede llegar a ser hasta de un 85%. Esto implica que se pierde gran parte de la información contenida en las huellas, disminuyendo mucho la calidad de las secuencias obtenidas <sup>116,103</sup>.

**Tabla 7. Secuenciación de huellas ribosomales.**

Muestra	Lecturas <sup>a</sup>	Lecturas mapeadas	% de mapeo	% asignado a CDS	% asignado a ARNr & ARNt
Inducción 1	37.890.584	30.915.393	81.6	57.4	17.5
Inducción 2	41.853.669	36.433.311	87.1	58.8	18.3
Inducción 3	37.278.977	29.691.985	79.7	56.3	22.5
Control 1	48.855.001	43.057.579	88.1	55.1	23.3
Control 2	42.350.973	37.423.225	88.4	55.9	22.4
Control 3	44.084.037	39.052.573	88.6	56.6	22.8

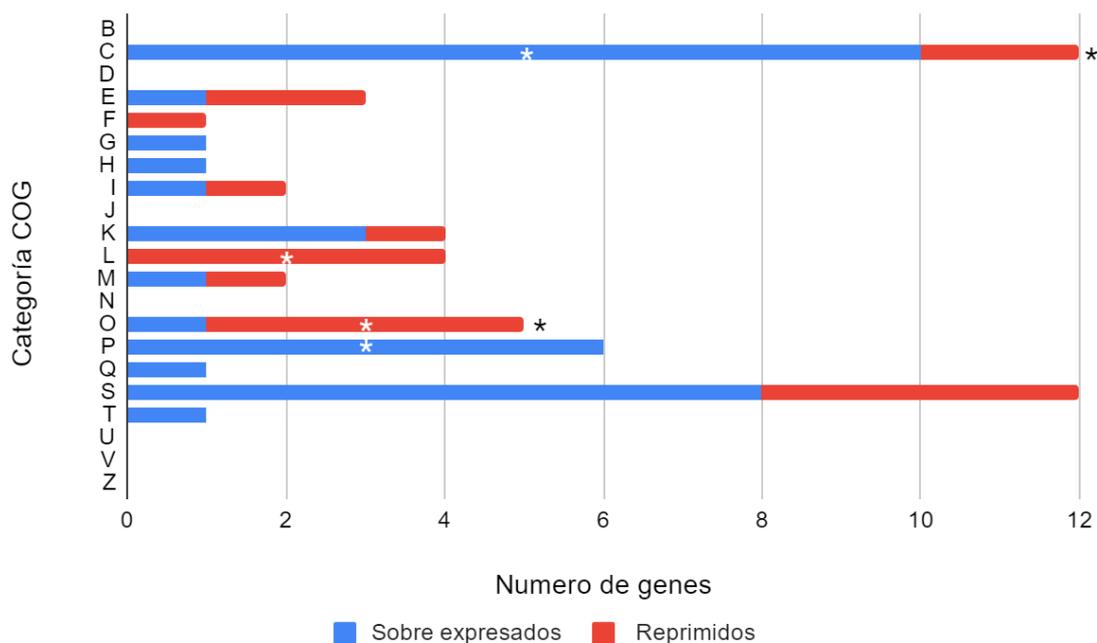
Se presenta el resultado de la secuenciación de las huellas ribosomales obtenidas a partir de cultivos de UYMMa02A enfrentados (inducción) a exudados radiculares de *M. pudica* o no (control). <sup>a</sup>Lecturas depletadas de secuencias de baja calidad.

### 7.3.3 Análisis del traductoma secuenciado.

En análisis del traductoma de UYMMa02A en respuesta a exudados de *M. pudica*, se logró identificar un total de 56 genes expresados diferencialmente: 38 sobreexpresados (tasa de cambio >2 y p-valor ajustado <0,05) y 18 reprimidos (tasa de cambio <-2 y p-valor ajustado <0,05). **Tablas suplementarias S3 y S4** del Anexo.

La anotación funcional de este set de datos también se realizó empleando la base de datos *eggNOG-mapper* con la cual fue posible categorizar, dentro de las categorías funcionales COG y las vías metabólicas KEGG, el 87% y 84% de los genes sobreexpresados y reprimidos respectivamente (Tablas S3 y S4). Sobre esta clasificación además se realizó un análisis de enriquecimiento funcional basado en el test exacto de Fisher, considerando un p-valor < 0.05 como un enriquecimiento significativo.

Los genes identificados se clasificaron en 14 categorías COG (de un total de 21). Considerandose el análisis de enriquecimiento funcional para los genes expresados diferencialmente, las categorías C (producción y conversión de energía) y P (transporte y metabolismo de iones inorgánicos) se vieron significativamente enriquecidas entre los genes sobreexpresados y las categorías L (replicación y reparación) y O (modificaciones post-traduccionales, recambio proteico, funciones chaperonas) en los genes reprimidos. Cabe destacar que las categorías C y O también se vieron enriquecidas al considerar todos los genes diferenciales en el análisis (**Figura18**). Este resultado es muy similar a los obtenidos del análisis funcional de genes diferenciales identificados mediante transcriptómica.



**Figura 18. Clasificación de genes identificados por traductómica en categorías COG.**

Se presentan las categorías COG asignadas a los genes expresados diferencialmente en presencia de exudados radiculares. En azul se representan los genes sobre expresados y en rojo los reprimidos. Las categorías que se encuentran estadísticamente enriquecidas (test exacto de Fisher,  $p\text{-valor} < 0.05$ ) se destacan con un asterisco (\*). Categorías: B- estructura de la cromatina; C- producción y conversión de energía; D- control del ciclo celular; E- metabolismo de aminoácidos; F- metabolismo de nucleótidos; G- metabolismo de carbohidratos; H- metabolismo co-enzimático; I- metabolismo lipídico; J-traducción; K- transcripción; L- replicación, recombinación y reparación, M- estructura y biogénesis de la envoltura celular y de la membrana externa; N- movilidad celular; O- modificaciones post-traduccionales, proteínas chaperonas; P- transporte y metabolismo de iones inorgánicos; Q- estructuras secundarias; S- función desconocida; T- transducción de señales; U- tráfico intracelular; V- mecanismos de defensa; Z- citoesqueleto.

Por otro lado, considerando la clasificación de estos genes diferenciales dentro de las vías metabólicas KEGG (**Tabla 8**), el análisis de enriquecimiento funcional indicó que al considerar los genes sobreexpresados se observa un enriquecimiento en el metabolismo energético, en particular en el metabolismo de nitrógeno y la fosforilación oxidativa. Interesantemente, también se observó un enriquecimiento en el procesamiento de información ambiental y en particular en el efecto de la bacteria sobre la vía de señalización MAPK de la planta hospedera. Por otro lado, en cuanto a las vías reprimidas en presencia de exudados radiculares, se vio un enriquecimiento en la ruta metabólica involucrada en el metabolismo del glutatión, un tripéptido constituido por los aminoácidos glutamato, cisteína y glicina (**Tabla 8**).

**Tabla 8. Clasificación de los genes diferenciales obtenidos por traductómica en vías metabólicas KEGG.**

KEGG ID	# genes diferenciales	# genes totales	p-valor	Ruta metabólica	Sub-clase	Clase
<b>Sobreexpresados</b>						
ko00190	4	94	1.56E-03	Fosforilación oxidativa	Metabolismo energético	Metabolismo
ko00910	4	64	3.61E-04	Metabolismo del nitrógeno		
ko04016	1	6	3.37E-02	Vía de señalización MAPK en la planta	Transducción de señales	Procesamiento de información ambiental
<b>Reprimidos</b>						
ko00480	2	36	1.55E-03	Metabolismo de glutatión	Metabolismo de otros aminoácidos	Metabolismo

Se presentan las vías metabólicas enriquecidas (test exacto de Fisher, p-valor < 0.05) en las cuales están involucrados los genes de expresión diferencial en presencia de exudados radiculares. Para cada vía metabólica, se indica el número de genes diferenciales (#genes diferenciales) así como el número de genes totales en el genoma (#genes totales), asignados a la misma.

#### 7.3.4 Eficiencia traduccional

El traductoma de UYMMa02A puede relacionarse con su transcriptoma a través del parámetro de eficiencia traduccional. Este concepto, introducido por Ingolia y colaboradores, refiere a la tasa de traducibilidad de cada ARNm considerando su nivel de expresión basal<sup>117</sup>. De esta manera, los niveles de expresión del traductoma son contrastados con los niveles de expresión del transcriptoma para el cálculo del valor de eficiencia traduccional. Puntualmente, este parámetro se calcula como el cociente entre el nivel de expresión obtenido en el traductoma sobre el nivel de expresión derivado del transcriptoma para cada ARNm. Así, los cambios en los valores de eficiencia traduccional permiten reconocer distintos escenarios de regulación que repercuten en la tasa traduccional y que podrían ser omitidos si solo se consideran cambios a nivel del traductoma o a nivel del transcriptoma.

En la **Figura 19** se grafica la tasa de cambio de cada ARNm identificado en UYMMa02A a nivel traduccional versus su tasa de cambio a nivel transcripcional, es decir la distribución global del parámetro de eficiencia traduccional. A nivel global, como es esperable se observa una buena correlación del tipo  $x=y$ , lo que indica que cambios en los niveles de expresión derivados del transcriptoma son acompañados de cambios en la misma dirección en los niveles de expresión del traductoma. Coloreados en amarillo y verde se resaltan aquellos genes en los que sí se observa un cambio estadísticamente significativo en su valor de eficiencia traduccional como resultado de enfrentar los cultivos bacterianos a los exudados radiculares. Puntualmente, en amarillo se representan los genes que disminuyen su eficiencia traduccional (con una tasa de cambio < -2 y un p-valor ajustado < 0.05) y en verde se representan los genes que aumentan su eficiencia traduccional (tasa de cambio > 2 y un p-valor ajustado < 0.05). Complementariamente, estos genes se listan en la **Tabla 9**.

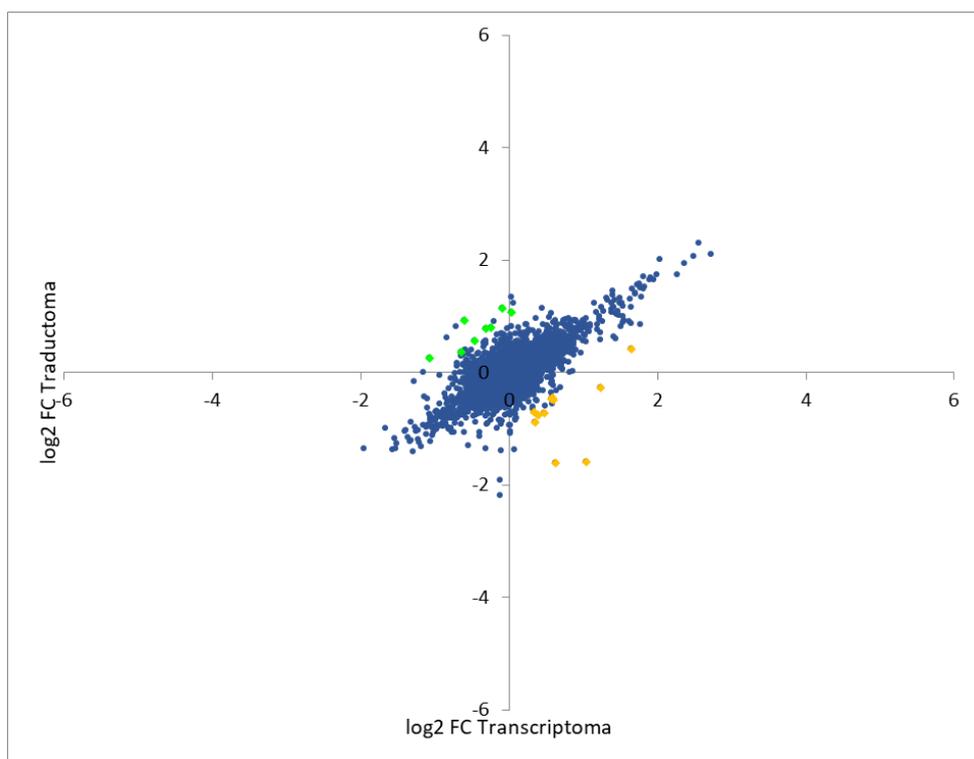


Figura 19. Eficiencia traduccional.

Se grafica el cambio traduccional en función del cambio transcripcional para todos los genes identificados por traductómica y transcriptómica. En verde y amarillo se representan aquellos genes que aumentan o disminuyen, respectivamente, su eficiencia traduccional de manera estadísticamente significativa al exponer UYMMa02A a exudados radiculares.

Tabla 9. Eficiencia traduccional.

Identificador <sup>a</sup>	Log2 Tasa de cambio ET <sup>b</sup>	p-valor	Descripción <sup>c</sup>	Cromosoma
<b>Genes que aumentan su eficiencia traduccional</b>				
2684	1.04	4.53E-13	hypothetical protein	chr1
3079	1.24	1.66E-02	hypothetical protein	chr1
3419	1.54	1.80E-04	hypothetical protein	chr2
5868	1.11	5.73E-03	hypothetical protein	chr2
5946	1.01	5.41E-04	Broad-specificity amino acid ABC transporter, permease protein 1	chr2
5964	1.05	1.31E-04	Iron-sulphur-binding reductase	chr2
6131	1.03	3.69E-04	hypothetical protein	chr2
7894	1.32	1.73E-04	hypothetical protein	chr2
<b>Genes que disminuyen su eficiencia traduccional</b>				
2614	-2.61	2.82E-05	hypothetical protein	chr1
5224	-2.22	3.71E-02	2-keto-3-deoxy gluconate kinase (EC 2.7.1.58)	chr2
5297	-1.04	5.00E-03	TPR repeat containing exported protein; Putative periplasmic protein contains a protein prenyltransferase domain	chr2
5818	-1.03	1.50E-03	hypothetical protein	chr2
7188	-1.08	3.46E-04	Flagellar protein FliJ	chr2
7540	-1.24	8.13E-03	RidA/YER057c/UK114 superfamily protein	chr2
8040	-1.22	2.18E-09	hypothetical protein	chr2

Se presentan los genes que aumentan y disminuyen diferencialmente su eficiencia traduccional al exponer a UYMMa02A a exudados radiculares de *M. pudica*.<sup>a</sup>Identificador del gen según la anotación del genoma de *Cupriavidus* sp. UYMMa02A en la base de datos Rast. <sup>b</sup>ET: Eficiencia Traduccional. <sup>c</sup>Descripción obtenida de Rast.

## 7.4 Respuesta del proteoma de *Cupriavidus sp.* UYMMa02A frente a exudados radiculares de *M. pudica*

Finalmente, como tercera aproximación para responder el objetivo principal de esta tesis, se empleó la técnica de *shotgun proteomics* para analizar el proteoma de UYMMa02A en respuesta a exudados radiculares. Como se mencionó anteriormente las proteínas se extrajeron a partir de los mismos extractos de los cuales se extrajo el ARN total y las huellas ribosomales.

### 7.4.1 Calidad y concentración de las proteínas totales obtenidas.

Con el objetivo de analizar la calidad, variaciones entre tratamientos y cuantificar las proteínas obtenidas en el extracto celular, las mismas se analizaron mediante SDS-PAGE y se cuantificaron por densitometría de geles.

A partir de la visualización del gel, no se observan diferencias entre los perfiles proteicos obtenidos para cada tratamiento, inducción y control. El resultado de la cuantificación de proteínas por densitometría se presenta en la **Tabla 10**.

**Tabla 10. Concentración de proteínas totales en extracto celular.**

Muestra	Concentración proteica (mg/ml)
Inducción 1	1,72
Inducción 2	1,53
Inducción 3	1,13
Control 1	1,61
Control 2	1,63
Control 3	1,47

Concentración de proteínas totales en los extractos proteicos de la cepa UYMMa02A en las condiciones ensayadas, determinada por densitometría.

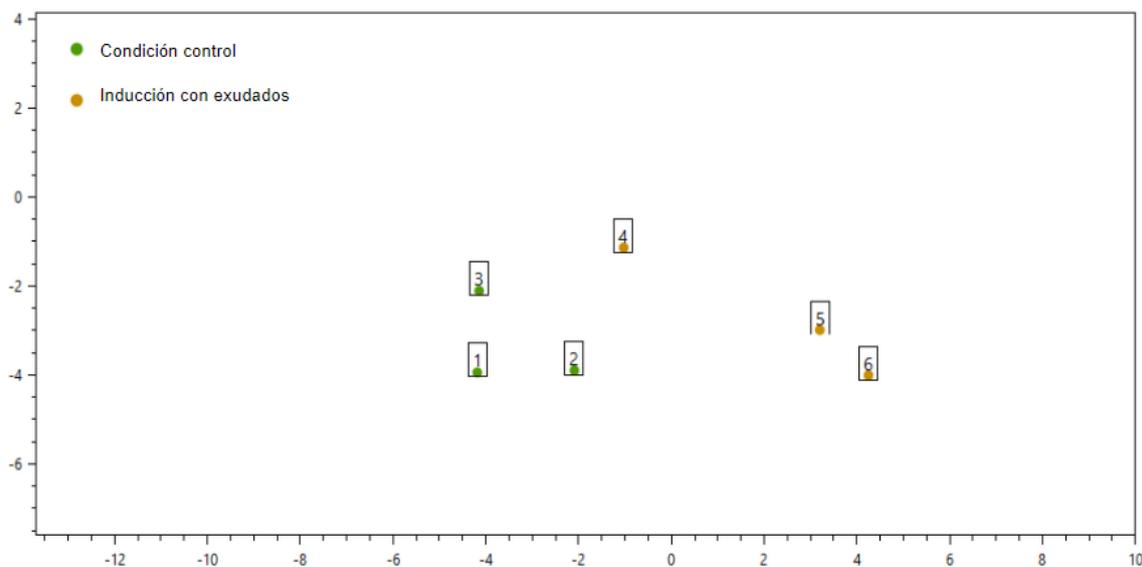
### 7.4.2 Shotgun. Análisis proteómico por nano LC-MS/MS y conteo de espectros

La técnica de *shotgun proteomics*, a grandes rasgos, se basa en fraccionar los péptidos de una muestra mediante una nano-cromatografía acoplada en línea con un espectrómetro de masas. La identificación de proteínas se logra comparando los espectros obtenidos experimentalmente con los generados teóricamente a partir de una base de datos de secuencias<sup>111</sup>. El análisis de los cientos de miles de espectros que se generan comúnmente en un experimento requiere de avanzados algoritmos bioinformáticos para dar sentido a todos los datos, en este caso se utilizó el programa *PatternLab for Proteomics 4.0*.

Con la estrategia empleada, se lograron identificar en las tres réplicas biológicas, 1656, 1509 y 1676 proteínas totales en la condición control y 1591, 1217 y 1210 en presencia de exudados radiculares de *M. pudica* respectivamente.

En primer lugar, utilizando el módulo Buzios, incluido en dicho programa, se realizó un análisis de tipo componentes principales (**Figura 20**) donde se observa que las réplicas biológicas se agruparían según la condición empleada (control o inducción). Para la comparación de las proteínas identificadas en los dos tratamientos se utilizó el módulo *Approximately Area Proportional Venn Diagram* con el cual se determinaron aquellas proteínas únicamente detectadas en una condición con un valor de probabilidad de 0,05. De esta forma, se identificaron 8 proteínas detectadas exclusivamente en

presencia de exudados y 71 en el control (**Tabla S5 Anexo**). Cabe destacar que se consideraron proteínas detectadas exclusivamente en una condición a aquellas presentes en al menos 2 de 3 réplicas biológicas y que estuviesen como máximo en 1 réplica de la condición contraria.

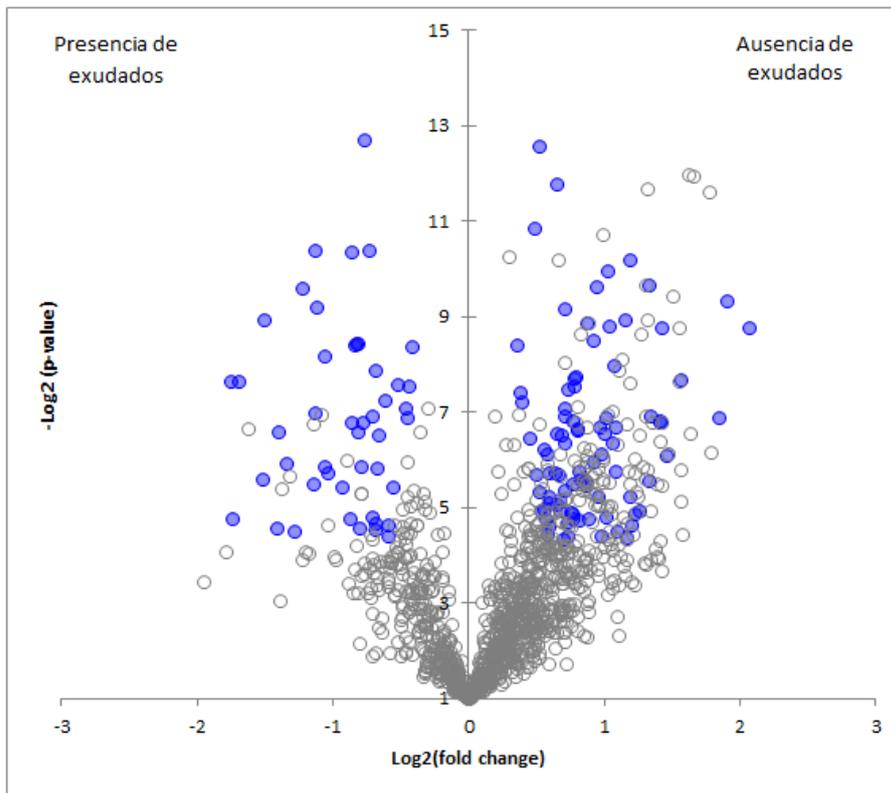


**Figura 20. Análisis de componentes principales.**

Se muestran las tres réplicas biológicas estudiadas para la condición control y la condición inducción.

Por otro lado, el módulo *T-Fold* se empleó para detectar aquellas proteínas presentes en ambas condiciones pero con un cambio significativo en su abundancia relativa (según el conteo de espectros), clasificándolas en base a la tasa de cambio y la significancia estadística de cada una (**Figura21**). Como criterio, se consideró diferencialmente expresadas, a aquellas proteínas que presentan una tasa de cambio  $>2$  con un p-valor  $<0.05$ . Del total de proteínas consideradas en el análisis, 1175 (puntos grises) se identificaron en ambas condiciones (inducción y control) de las cuales 41 (3,6%) presentan expresión diferencial (puntos azules), **Tabla S6 Anexo**. De estas, 14 se encuentran sobrerrepresentadas en presencia de exudados y 27, en ausencia de los mismos es decir en la condición control.

En suma, considerando tanto las proteínas de expresión única como las de expresión diferencial, obtuvimos que en presencia de exudados, 22 proteínas se encuentran sobrerrepresentadas y 98 subrepresentadas o reprimidas (condición control, ausencia de exudados). El mapeo contra el genoma de UYMMa02A mostró que los genes que codifican para estas proteínas se localizan principalmente en el cromosoma 1 (75% de las proteínas sobre expresadas y 73% de las proteínas reprimidas) y en el cromosoma 2 (17% de las sobreexpresadas y 20% de las reprimidas).

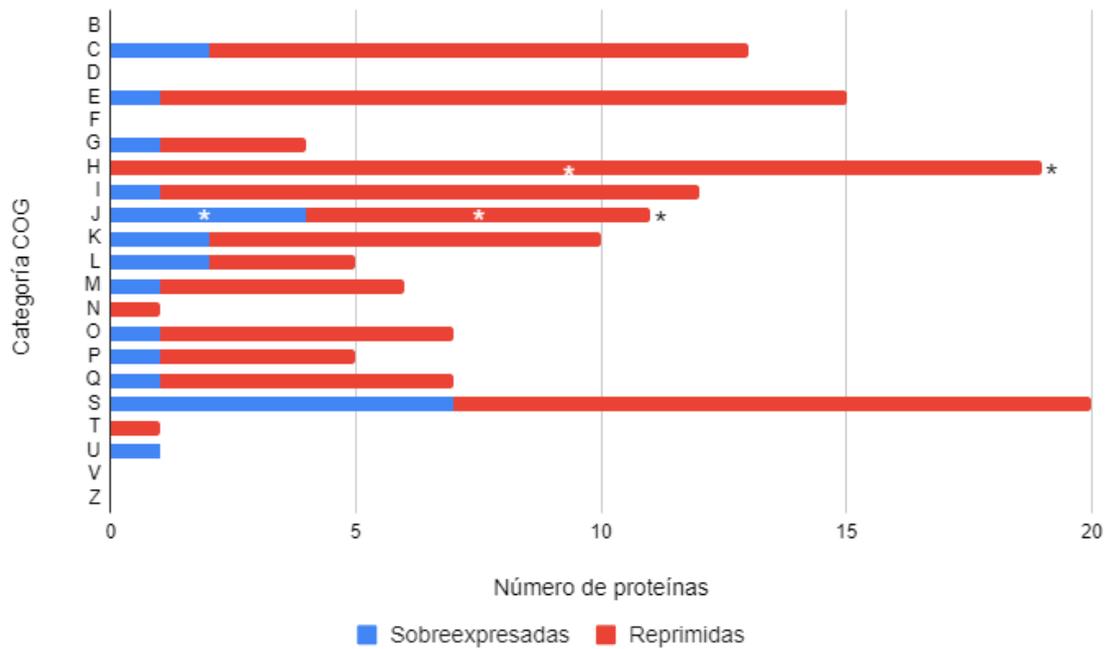


**Figura 21. Proteínas expresadas diferencialmente en presencia y ausencia de exudados radiculares**

En el diagrama de volcán se grafica la significancia estadística en función a la tasa de cambio para cada proteína. Puntos grises: proteínas que se detectan con el mismo nivel en ambas condiciones (no cambian su expresión); Puntos azules: proteínas diferencialmente expresadas, satisfacen el criterio estadístico y la tasa de cambio ( $p$ -valor  $< 0.05$ , Tasa de cambio  $> 2$ ).

Finalmente las proteínas diferenciales fueron analizadas con la base de datos *eggNog-mapper*, logrando clasificarlas dentro de las categorías funcionales COG. Sobre esta clasificación se realizó además un análisis de enriquecimiento funcional basado en el test exacto de Fisher, considerando un  $p$ -valor  $< 0.05$  como un enriquecimiento significativo. En la **Figura 22**, se observa que aquellas proteínas que en presencia de exudados radiculares aumentaron su expresión, están asociadas principalmente a la producción y conversión de energía (C), a los procesos de transcripción (K) y traducción (J) y al proceso de replicación, recombinación y reparación (L). Sin embargo la única categoría que se encuentra estadísticamente enriquecida es la de traducción.

En cuanto a aquellas proteínas que se encuentran subrepresentadas en presencia de exudados radiculares, se destacan los procesos de transporte y metabolismo de aminoácidos (E), la producción y conversión de energía (C), la traducción (J), el transporte y metabolismo de coenzimas (H) y el metabolismo de lípidos (I). Dentro de estas categorías, aquellas significativamente enriquecidas son la H y J.



**Figura 22. Clasificación de proteínas diferenciales en categorías COG.**

Se presentan las categorías COG asignadas a las proteínas expresadas diferencialmente en presencia de exudados radiculares. En azul se representan las proteínas sobre expresadas y en rojo las reprimidas. Las categorías que se encuentran estadísticamente enriquecidas (test exacto de Fisher,  $p$ -valor < 0.05) se destacan con un asterisco (\*). Categorías: B- estructura de la cromatina; C- producción y conversión de energía; D- control del ciclo celular; E- metabolismo de aminoácidos; F- metabolismo de nucleótidos; G- metabolismo de carbohidratos; H- metabolismo co-enzimático; I- metabolismo lipídico; J-traducción; K- transcripción; L- replicación, recombinación y reparación, M- estructura y biogénesis de la envoltura celular y de la membrana externa; N-movilidad celular; O- modificaciones post-traduccionales, proteínas chaperonas; P- transporte y metabolismo de iones inorgánicos; Q- estructuras secundarias; S- función desconocida; T- transducción de señales; U- tráfico intracelular; V- mecanismos de defensa; Z- citoesqueleto.

## 8 DISCUSIÓN

A pesar de que los beta-rizobios fueron descritos por primera vez hace ya 21 años<sup>26,28</sup>, hoy en día sigue siendo escasa la información sobre los mecanismos moleculares implicados en el establecimiento de simbiosis efectivas con sus leguminosas hospederas.

En particular al considerar el género *Cupriavidus*, el cual destaca en nuestro país como simbionte de leguminosas nativas, la cepa más estudiada es *C. taiwanensis* LMG19424<sup>T</sup>. Su genoma fue secuenciado por primera vez en 2008<sup>118</sup> y desde entonces se han identificado algunos de los mecanismos involucrados en la interacción con la leguminosa hospedera *M. pudica* como: la presencia de genes *nod*, *nif* y *fix* formando una de las islas simbióticas más compactas descritas hasta ahora, la sobreexpresión de genes *nod* y la producción de factores Nod sulfatados<sup>118</sup> en respuesta a flavonoides y exudados radiculares de plantas hospederas<sup>31</sup>. Además, se ha determinado la importancia de sistemas de secreción de tipo III<sup>119</sup> y la síntesis de aminoácidos ramificados<sup>120</sup> en dicha interacción.

Sin embargo, aunque los mencionados trabajos resultan muy interesantes, todos están enfocados en una única especie, *C. taiwanensis*, la cual no se ha aislado en nuestro país. Considerando la relevancia que tienen las asociaciones simbióticas entre *Cupriavidus* y leguminosas nativas en nuestros ecosistemas y que nuestro territorio podría ser un sitio de origen de diversidad para este género bacteriano, este trabajo propuso el estudio de un rizobio nativo, *Cupriavidus* sp. UYMMa02A.

La cepa UYMMa02A fue aislada a partir de nódulos de *Mimosa magentea* y es capaz de formar asociaciones simbióticas eficientes con esta planta y varias especies de *Mimosa*, incluida la planta modelo *Mimosa pudica*<sup>45</sup>. Estudios filogenéticos basados en la secuencia de los genes *housekeeping rrs*, *recA* y *gyrB*<sup>94</sup>, así como análisis de genómica comparativa basados en la identidad media de nucleótidos (ANI) entre genomas de distintos *Cupriavidus* demostraron que esta cepa no pertenece a la especie *C. taiwanensis* y sugieren que se trata de una nueva especie, lo cual la hace aún más atractiva para su estudio (Garabato & Sandes, en preparación)<sup>95</sup>.

La secuenciación del genoma de la cepa UYMMa02A mostró la presencia de una isla simbiótica altamente conservada, observada en la cepa tipo *C. taiwanensis* LMG19424 y otras cepas de rizobios secuenciadas<sup>121,122</sup>, conteniendo genes *nod* y *nif* implicados tanto en el establecimiento de la simbiosis como en la FBN<sup>96</sup>.

En este trabajo el foco se centró en identificar genes y proteínas de UYMMa02A cuya expresión se encontraba afectada frente al primer estímulo de interacción con *M. pudica*; cuando la bacteria encuentra los exudados radiculares de esta planta y una vez identificados, entender el rol de los mismos en el contexto interacción planta-bacteria.

## 8.1 Elección de las técnicas

Actualmente nos encontramos en el auge del desarrollo de las herramientas ómicas. Este tipo de aproximaciones se basan en estudiar las capacidades de un organismo mediante la generación de gran cantidad de datos y el uso de la bioinformática para interpretarlos.

Para llevar adelante el estudio de la interacción molecular entre UYMMa02A y *M. pudica*, se propuso un enfoque complementario utilizando 3 técnicas ómicas: transcriptómica (RNA-seq)<sup>68</sup>, traductómica (Ribosome profiling)<sup>72</sup> y proteómica de alto rendimiento (Shotgun proteomics)<sup>123</sup>. Las tres técnicas seleccionadas permiten estudiar lo que está ocurriendo en UYMMa02A en un momento dado pero a distintos niveles dentro del dogma central de la biología<sup>124,125</sup>. Partiendo del genoma secuenciado de nuestra cepa, un primer nivel serían los genes que se están transcribiendo a mensajeros, un segundo nivel, cuáles de estos mensajeros se están traduciendo y en un tercer nivel cuales son las proteínas presentes en ese momento. Para esto, el primer paso fue contar con un método reproducible para la obtención de extractos celulares de alta calidad a partir de los cuales se pueda obtener material para aplicar las tres técnicas. En este sentido, el paso limitante fue la puesta a punto de la técnica de *Ribosome profiling*. Aislar polisomas íntegros y en concentración necesaria para la obtención de huellas ribosomales fueron los grandes desafíos de este trabajo<sup>126,71</sup>. Superado esto, la obtención de ARN total para el ensayo de transcriptómica y la obtención de proteínas para el ensayo de proteómica no resultó un problema.

El material celular de partida es un punto clave ya que determina el rendimiento de la técnica de Ribosome profiling al definir la cantidad final que se obtiene de huellas ribosomales. Analizando el rendimiento de las huellas obtenidas según la cantidad inicial de células, se determinó que partir de 350 mg de células (centrifugando 150 ml de cultivo en medio M9 citrato suplementado o no con exudados radiculares y en fase exponencial) es una cantidad adecuada (resultados no mostrados). Para la obtención del extracto celular se probaron dos técnicas distintas de lisis mecánica: la prensa de French y rotura de las células mediante agitación en presencia de perlas disruptivas. La prensa de French, consiste en una bomba hidráulica que impulsa un pistón, el cual fuerza el pasaje de la muestra a alta presión a través de una pequeña válvula. A medida que la muestra pasa por esta válvula, las células experimentan una gran presión y luego una rápida descompresión lo cual causa que se rompan<sup>127</sup>. Este método tiene la ventaja de que se pueden procesar cantidades relativamente grandes de muestra. Por lo tanto fue nuestra primera elección, sin embargo empleando esta aproximación no fue posible aislar polisomas a partir del extracto celular obtenido. Entre las posibles causas de esto están el tiempo que lleva el procesamiento, el aumento de la temperatura de la muestra debido a que el equipo está a temperatura ambiente, y que es muy difícil lograr un pre-tratamiento efectivo del equipo para eliminar ARNasas. Sumada a esto debemos considerar la inestabilidad intrínseca de las moléculas de ARN y de los polisomas.

El segundo método elegido resultó más rápido, mas fácil de controlar y permitió mantener la temperatura de la muestra, evitando así su degradación. Se optó por el

uso de tubos de lisis conteniendo la matriz B comercializados por la marca MP. Estos tubos contienen pequeñas perlas de vidrio, acero o cerámica, las cuales mediante agitación a alta velocidad, utilizando un equipo Fast Prep disponible en el IIBCE, colisionan contra las células rompiendo su membrana<sup>128</sup>. De esta forma, en tan solo 60 segundos, se logró lisar las células, obteniendo extractos celulares con una alta reproducibilidad y a partir de los cuales fue posible aislar el material de partida necesario para cada una de las técnicas ómicas.

Una vez separados el ARN, las proteínas y los polisomas a partir del extracto celular, la siguiente limitante fue la puesta a punto del tratamiento enzimático de los polisomas para la obtención de huellas ribosomales. En este sentido, nos basamos en un protocolo publicado por Ingolia y colaboradores<sup>72</sup> pero implementando algunas modificaciones previamente desarrolladas en el Departamento de Genómica del IIBCE<sup>116</sup> para eucariotas. La primera diferencia con el protocolo de Ingolia es que estos realizan el ensayo de protección frente a RNasa sobre el extracto celular total y posteriormente purifican los monosomas (fragmentos de ARNm con un ribosoma). En este trabajo se optó primero por purificar la fracción polisomal (ARNm con varios ribosomas) a partir del extracto celular, para luego realizar la digestión y finalmente purificar los fragmentos protegidos por los ribosomas, lo que se conoce como huellas ribosomales. Partir de polisomas purificados permite obtener datos más verídicos sobre la población de ribosomas activos y los ARNm que están siendo traducidos en un momento dado ya que al purificar directamente las huellas de monosomas obtenidos del extracto celular, se pueden estar obteniendo huellas provenientes de ARNm cargados con un solo ribosoma que podrían no ser funcionales<sup>116</sup>.

Para la digestión de los polisomas, se eligió la enzima Benzonasa, la cual genera fragmentos con extremos ya reparados y listos para los subsecuentes pasos de la generación de las bibliotecas de secuenciación. Para esto se tuvo que optimizar en este trabajo la concentración de enzima y tiempo de digestión útiles para la generación de huellas ribosomales en nuestro modelo de estudio (ver sección 7.3.1 de Resultados). Cabe enfatizar la importancia de ajustar las condiciones de digestión en cada modelo de estudio ya que el tamaño esperado de las huellas ribosomales varía según el organismo. En Eucariotas, la literatura reporta que los ribosomas generan una huella de aproximadamente 30 nt<sup>117,126</sup>. Sin embargo, en bacterias varios trabajos reportan un perfil de huellas más variable de entre 15-40 nt<sup>73,74,75</sup>, patrón que se observó en esta tesis al realizar la digestión de los polisomas con 6U de Benzonasa.

En resumen, en esta primera etapa del trabajo se logró poner a punto un protocolo que permitió obtener extractos celulares de UYMMa02A de forma reproducible y apto para la purificación e identificación de las macromoléculas de nuestro interés. Partiendo de 350 mg de bacteria se lograron purificar en promedio por triplicado biológico y condición (inducción y control): 31.2 µg de ARN total (**Tabla 3**), 150 µg de proteínas (**Tabla 10**) y 7 µg de polisomas a partir de los cuales se obtuvieron 0.32 µg de huellas ribosomales (**Tabla 6**). Tanto la secuenciación de el ARN total (**Tabla 4**), como

de las huellas ribosomales (**Tabla 7**) y la identificación de proteínas fueron exitosas partiendo de estas cantidades de macromolécula.

Finalmente, cabe destacar que de las tres técnicas propuestas, solamente la aproximación de transcriptómica ha sido aplicada a otros *Cupriavidus*, como lo son *C. Taiwanensis* LMG 19424<sup>31</sup>, *C. necator* UYPR2.512<sup>129</sup>, *C. metallidurans* NA4<sup>130</sup> y *C. giraldii* CR3<sup>131</sup>. En cuanto a las técnicas de *Shotgun proteomics* y *Ribosome profiling* no se encontró literatura relacionada a la aplicación de las mismas en otros beta-rizobios. Sin embargo, cabe mencionar que la técnica de *Shotgun proteomics* ha sido aplicada a algunos alfa-rizobios como *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA110, *Bradyrhizobium* sp. ORS278, *Mesorhizobium loti* MAFF303099, *Rhizobium etli* CE3, *Sinorhizobium meliloti* 2011 y *Rhizobium leguminosarum* bv viciae 3841<sup>132</sup>.

## 8.2 Capacidad inductora de los exudados de *Mimosa pudica*

A través de sus raíces, las plantas son capaces de liberar a la rizósfera entre el 5% y el 21% del total de sus productos fotosintéticos<sup>133</sup>. Los exudados radiculares, compuestos principalmente por diversos azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos, flavonoides y polialcoholes, así como vitaminas, proteínas y macromoléculas nitrogenadas, son una importante fuente de carbono y nitrógeno para las bacterias del suelo, influenciando así la estructura, diversidad y comportamiento de la comunidad rizosférica<sup>115,133</sup>. Estos exudados no solo contienen compuestas estimulantes de la proliferación bacteriana, sino que también contienen diversas señales capaces de modular la interacción entre las bacterias y la planta. Entre ellas se encuentran compuestos quimioatrayentes o repelentes capaces de atraer a las bacterias hacia la superficie radicular<sup>134</sup>. Es por estos motivos que la capacidad de una bacteria de censar y metabolizar los compuestos exudados por una planta hospedera es el primer paso hacia una simbiosis efectiva.

En este sentido, como primer paso del estudio de las adaptaciones de *Cupriavidus* UYMMa02A durante la interacción con *M. pudica*, se evaluó la capacidad de los exudados de esta planta de inducir los genes de nodulación (genes *nod*) en nuestra bacteria. Para este ensayo, se ideó un sistema relativamente sencillo que permitió la recolección de los exudados radiculares de *M. pudica* en agua. Para determinar si estos exudados eran activos, se transformó a la cepa de estudio con el plásmido pCBM01 conteniendo una fusión transcripcional entre la región promotora del gen *nodB* de LMG 19424 y el gen *lacZ* el cual codifica para la enzima  $\beta$ -galactosidasa<sup>100</sup>. Empleando una aproximación similar, Klonowska y colaboradores demostraron que los exudados de *M. pudica* fueron efectivos en la activación de los genes *nod* de la cepa modelo *Cupriavidus taiwanensis* LMG 19424<sup>115</sup>. Dada la similitud genética entre el arreglo de genes *nod* de *C. taiwanensis* y UYMMa02A, era esperable que nuestra bacteria fuera capaz de responder a los exudados radiculares de manera similar.

Los exudados obtenidos fueron capaces de inducir los genes *nod* tanto en *C. taiwanensis* LMG 19424, como en la cepa *Cupriavidus necator* UYPR2.512 conteniendo el mismo plásmido. Por lo tanto podemos concluir que los exudados obtenidos,

siguiendo esta metodología, eran efectivos en la activación de la expresión de los genes *nod*. Sin embargo, contrariamente a lo esperado, en UYMMa02A no se observó un cambio en la actividad  $\beta$ -galactosidasa, es decir, no se observó una inducción del promotor *pnodB*<sup>19424</sup>. Este resultado no descarta que los exudados radiculares de *M. pudica* tengan efecto alguno sobre UYMMa02A, ya que igualmente este par es capaz de formar asociaciones simbióticas efectivas<sup>14,45</sup>, pero podría significar que nuestra cepa de estudio presenta otra vía de activación de los genes *nod* o incluso otra vía de nodulación independiente de genes *nod*. Otra opción es que exista cierta expresión basal de estos genes que no se encuentre regulada por la presencia de exudados radiculares. En todo caso la actividad  $\beta$ -galactosidasa de los cultivos de UYMMa02A conteniendo al plásmido pCBM01 siempre fueron menores a la actividad basal, indicando que en caso de existir, la expresión de los genes *nod* sería muy baja.

Si bien el modelo aceptado indica que la mayoría de las interacciones rizobio-leguminosa comienzan con el reconocimiento de flavonoides presentes en los exudados radiculares por parte de la bacteria, provocando la activación de los genes *nod* y la producción de factores de nodulación<sup>135</sup>, en *Cupriavidus* existen evidencias que sugieren la presencia de vías alternativas para la formación de la simbiosis<sup>136,118,98</sup>. Una de ellas es que mientras que en alfa rizobios se han reportado especies que contienen hasta 5 reguladores del tipo NodD y más de 200 genes regulados por ellos<sup>136</sup>, en los genomas de *Cupriavidus* analizados hasta el momento, se ha descrito un único gen *nodD* y solamente dos posibles sitios de unión del regulador en el genoma, ambos involucrados en la síntesis de factores Nod<sup>118,98</sup>. Debido a que el establecimiento de la simbiosis es un proceso que involucra la expresión de múltiples factores y no solo la regulación del operón *nod*, el estudio de nuevos modelos permitirá ampliar el conocimiento sobre los distintos programas existentes. Por lo tanto decidimos caracterizar en profundidad los cambios moleculares provocados en el modelo *Cupriavidus sp.* UYMMa02A por la presencia de los exudados radiculares producidos por uno de sus pares simbióticos, la leguminosa *Mimosa pudica*.

## 8.3 Respuesta de UYMMa02A a exudados radiculares de *M. pudica*

### 8.3.1 Respuesta transcriptómica

En respuesta a la presencia de exudados radiculares de *M. pudica*, se identificaron 101 genes expresados diferencialmente, de los cuales 64 aumentaron su expresión y 37 se vieron reprimidos frente a este estímulo.

El género *Cupriavidus* se caracteriza por presentar genomas típicamente multipartitos, característica que comparte con el género cercano *Paraburkholderia*<sup>137</sup>. Este tipo de genomas están compuestos por dos replicones grandes (cromosomas) y plásmidos accesorios incluido el plásmido simbiótico pSym. Se ha demostrado que los cromosomas se encuentran enriquecidos en genes que codifican para funciones básicas (*core genome*), conteniendo la mayoría de los genes *housekeeping*, mientras que los cromosomas secundarios, crómidos y plásmidos contienen genes relacionados al metabolismo secundario, el transporte y funciones regulatorias<sup>138,129,139</sup>.

El mapeo contra el genoma de UYMMa02A mostró que todos los genes expresados diferencialmente se localizan en los cromosomas 1 y 2 así como en el plásmido simbiótico pSym, sin embargo, se observa una asimetría entre la distribución de los mismos. Mientras los genes reprimidos se encuentran equitativamente distribuidos entre el cromosoma 1, el cromosoma 2 y el pSym (32,4%, 32,4% y 35,1% respectivamente), los genes sobreexpresados se localizan principalmente en el cromosoma 1 (70,3%) y en menor medida en el cromosoma 2 (23,4 %) y el pSym (6,3%).

Considerando el total de secuencias codificantes de cada replicón y el porcentaje que representan los genes expresados diferencialmente en los mismos (**Tabla 11**) se podría inferir que el plasmido simbiótico en UYMMa02A es mas bien reprimido por los exudados radiculares de *M. pudica*. Cabe destacar que Klonowska y colaboradores reportan que el pSym es poco estimulado en *C. taiwanensis* LMG 19424 por exudados radiculares de esta misma planta<sup>115</sup>. Sin embargo, en esta cepa modelo se reporta una expresión diferencial de los genes *nod* en presencia de dicho estímulo, hecho que en UYMMa02A no se observa. Estos resultados, apoyan el ensayo de  $\beta$ -galactosidasa sobre la determinación de la capacidad inductora de los exudados radiculares sobre los genes *nod*, pudiéndose concluir que efectivamente en UYMMa02A los genes *nod* no sufren una inducción en presencia de exudados radiculares de *M. pudica*, aunque no se descarta una posible expresión basal. Sumando las evidencias presentadas se podría decir que en UYMMa02A, el pSym contendría genes que serían importantes en la bacteria en vida libre y no durante la simbiosis, por lo cual este plásmido se ve reprimido.

**Tabla 11. Distribución de los genes expresados diferencialmente frente a exudados radiculares en los replicones de UYMMa02A.**

Replicón	N° de CDS	N° de genes sobreexpresados	N° de genes reprimidos	% genes sobreexpresados	% genes reprimidos
Cromosoma 1	3855	45	12	1.17	0.3
Cromosoma 2	2784	15	13	0.5	0.4
pSym	675	4	12	0.6	1.7

Se presenta para cada replicon el número total de genes, así como la representación de genes sobreexpresados y reprimidos en estos.

### 8.3.1.1 Genes sobreexpresados

Cuatro genes del plásmido simbiótico se vieron sobreexpresados en presencia de exudados radiculares de *M. pudica*, 3 de los cuales están involucrados en el metabolismo de aminoácidos (ID 3955, 3956 y 4228), mientras que el restante corresponde a una transposasa (ID 3957).

El gen *ilvB* (ID 3956) codifica para la enzima Acetohidroxiácido sintasa, la cual es clave en la biosíntesis de aminoácidos de cadena ramificada (BCAA por sus siglas en inglés) valina, leucina e isoleucina. Esta enzima es capaz de sintetizar 2-acetolactato, precursor de valina y leucina, a partir de dos moléculas de piruvato; así como aceto-2-hidroxiacetato, precursor de isoleucina, a partir de piruvato y 2-ketobutirato<sup>140</sup>. Chen y colaboradores demostraron que la síntesis de BCAAs es esencial para la formación de simbiosis efectivas entre beta-rizobios y *Mimosa pudica*. Mutantes en la vía

biosintética de los BCAAs en *B. phymatum* STM815 y *C. taiwanensis* LMG19424 se vieron afectados en su crecimiento en vida libre así como en su capacidad para formar nódulos fijadores de nitrógeno siendo deficientes en la FBN así como en la invasión del nódulo y la maduración de los bacteroides<sup>120</sup>. Se ha propuesto que la FBN requiere que exista un intercambio de aminoácidos entre la planta hospedera y los bacteroides. Adicionalmente Prell y colaboradores proponen que la planta hospedera controla el suministro de BCAAs a los bacteroides regulando así su desarrollo y persistencia en alfa-rizobios y nuevamente mutantes de *Rhizobium leguminosarum* deficientes en la biosíntesis de leucina, valina e isoleucina fueron incapaces de nodular a su planta hospedera o de fijar nitrógeno en los casos donde se llegó a la formación del nódulo<sup>141,142</sup>.

El siguiente gen sobreexpresado relacionado con el metabolismo de aminoácidos codifica para una posible histidinol fosfato aminotransferasa I (*hisC*) (ID 3955). Según la base de datos UniProt<sup>143</sup> (<https://www.uniprot.org>) esta enzima forma parte de la vía de síntesis de L- Histidina a partir de 5-fosfo-alfa-D-ribose 1-difosfato y además participa de la biosíntesis de los aminoácidos Fenilalanina y Tirosina. En su revisión sobre el metabolismo de aminoácidos en microsimbiontes y su rol en las interacciones leguminosas-rizobio, Dunn y colaboradores estudian distintos mutantes en el metabolismo de aminoácidos y determinan el rol de los mismos durante etapas específicas de la interacción<sup>144</sup>. Mutantes auxótrofos para histidina, tirosina o fenilalanina en *R. leguminosarum* desarrollaron un fenotipo capaz de formar nódulos (Nod<sup>+</sup>) pero que eran incapaces de fijar nitrógeno (Fix<sup>-</sup>) además el número de nódulos se vio disminuido en comparación con las cepas WT<sup>144</sup>. Finalmente, dentro de los genes sobreexpresados del *pSym*, se identificó un transportador del tipo ABC relacionado a la adquisición de aminoácidos polares (ID 4228). Los exudados radiculares de *M. pudica* son ricos en aminoácidos entre otros componentes<sup>115</sup>, por lo cual, este transportador estaría participando en la adquisición de dichos aminoácidos. Siguiendo esta línea cabe destacar que el metabolismo de aminoácidos fue una de las categorías COG (categoría E) en la que clasificaron estos genes. Tanto en vida libre, como formando asociaciones simbióticas, los rizobios utilizan los aminoácidos suministrados por la planta no solo para su incorporación a proteínas, sino también como fuentes de carbono, nitrógeno o sulfuro, como señales del balance del nitrógeno celular y como precursores de importantes metabolitos. El metabolismo de aminoácidos (biosíntesis, transporte y/o degradación) por parte del microsimbionte es generalmente crucial para el establecimiento y mantenimiento de una simbiosis efectiva y se encuentra íntimamente interconectado con el metabolismo de la planta<sup>144</sup>. Estos resultados sugieren que el transporte y metabolismo de aminoácidos sería importante en los primeros pasos de la interacción entre UYMMa02A y *M. pudica*.

En lo que respecta al cromosoma 1, 45 genes se vieron sobreexpresados en respuesta a los exudados radiculares de *M. pudica*. Interesantemente varios de estos genes están involucrados en el metabolismo de metales pesados. En particular se identificaron 8

genes relacionados con la resistencia y homeostasis del cobre (IDs 1235, 1236, 1237, 2270, 2271, 2272, 2273 y 2274). El cobre es un elemento esencial tanto para organismos procariotas como eucariotas, actúa como cofactor de varias enzimas involucradas en reacciones redox y el transporte de electrones. Sin embargo este elemento puede resultar altamente tóxico para las células incluso a bajas concentraciones, por lo cual procariotas y eucariotas han desarrollado varios sistemas para mantener la homeostasis del mismo, tales como bombas de eflujo, secuestro de cobre extracelular, bioacumulación y mecanismos de transporte<sup>145,146</sup>. En este trabajo se identificaron varios genes del operon *cop* (*copABCD*) relacionados con la resistencia al cobre, que codifican para las proteínas periplásmicas, CopA y CopC, una proteína de la membrana externa, CopB, y una proteína de la membrana interna, CopD. Juntas estas proteínas cumplen la función de secuestrar y compartimentalizar el cobre en el periplasma y la membrana externa<sup>147</sup>. En particular la proteína CopA es una ATPasa-translocadora de cobre ( $\text{Cu}^{2+}$  ATPasa)<sup>145</sup> y CopC es una proteína pequeña (10.5 kDa) con dos sitios de unión a cobre que son altamente específicos para  $\text{Cu}^+$  y  $\text{Cu}^{2+}$  que también está involucrada en el eflujo de este metal<sup>147</sup>. Asociadas a estas proteínas, también se vieron sobre expresados los genes *copZ* el cual codifica para una chaperona de cobre y se ha reportado que en *Listeria monocytogenes* modula el eflujo de  $\text{Cu}^{2+}$  mediado por ATPasas y *cueR* que codifica para un regulador transcripcional que en *E. coli* activa también el eflujo de cobre<sup>148,145,146</sup>. Esto sugiere que en UYMMa02A la homeostasis de cobre también estaría regulada por estos factores transcripcionales.

El género *Cupriavidus* se caracteriza por su gran adaptabilidad a ambientes con altas concentraciones de metales, en particular por su afinidad por el cobre. En este sentido *C. metallidurans* CH34 ha sido la cepa más estudiada y representa un modelo para el estudio de resistencia a distintos metales<sup>149</sup>, sin embargo las cepas *C. necator* UYPR2.512, *C. taiwanensis* LMG19424 y *Cupriavidus* sp. UYMMa02A también destacan por su capacidad de crecer en presencia de altas concentraciones de los mismos<sup>115,45,92</sup>. La inducción de genes relacionados con el eflujo y resistencia al cobre ha sido reportada como una adaptación a la rizósfera en alfa-rizobios y otros microorganismos rizoféricos como *Pseudomonas syringae* y *Pseudomonas fluorescens*<sup>115</sup>. La expresión de genes de resistencia al cobre en respuesta a exudados radiculares o flavonoides también ha sido reportada en trabajos previos en *C. taiwanensis* LMG19424<sup>115</sup> y *Cupriavidus* sp. UYPR2.512<sup>129</sup> respectivamente, sin embargo no se conoce el rol exacto de este mecanismo en la interacción simbiótica.

Siguiendo con la resistencia a metales, en el cromosoma I también se vieron sobreexpresados 6 genes, posiblemente formando un operón, involucrados en la homeostasis de arsénico<sup>150</sup> (IDs 1777, 1778, 1779, 1780, 1781 y 1782). La exposición continua de los microorganismos ambientales a agentes tóxicos, como lo son los metales, proporciona una presión selectiva para desarrollar genes de resistencia. En este sentido el operón *ars*, que contiene varios genes de resistencia al arsénico, se encuentra ampliamente distribuido en bacterias ambientales, tanto así que se ha

determinado que estos genes son incluso más comunes que los genes de la biosíntesis de triptófano<sup>151</sup>. Se ha postulado que la amplia distribución de genes de resistencia al arsénico es un reflejo de la presencia de este metal en la naturaleza, aunque estos genes también se han encontrado en microorganismos aislados de ambientes libres de arsénico<sup>151</sup>. El operón de resistencia al arsenito/arsenato inducido en UYMMa02A por los exudados radiculares de *M. pudica*, contiene los mismos genes que se ven presentes en *C. metallidurans*<sup>150</sup>: *arsR*, el cual codifica para un regulador transcripcional; *arsI* que codifica para una proteína de la familia de las glioxalinas; *arsC1* y *arsC2* los cuales codifican para dos reductasas de arsenato (la primera utiliza glutarredoxina y glutatión como fuente de electrones y la segunda utiliza tiorredoxina); *arsB* que codifica para una bomba de eflujo de arsenito que pertenece a la clase de permeasas ACR3 y finalmente *arsH* que codifica para una reductasa dependiente de NADPH<sup>150</sup>. Sin embargo, la causa de la inducción de la homeostasis de arsénico por exudados radiculares de *M. pudica* aún no es clara. Una posible explicación podría ser que algunos componentes de los exudados radiculares, como los flavonoides, pueden quelar distintos iones metálicos, lo cual podría causar en la bacteria una respuesta coordinada para la homeostasis de metales<sup>129</sup>. Análisis transcricptómicos en *C. metallidurans* CH34 demostraron que cuando esta bacteria es enfrentada a distintos metales como Cd<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup> y Pb<sup>2+</sup>, no solamente se inducen los genes de resistencia a dichos metales sino que se inducen multiples operones de resistencia, incluyendo el operón *ars*<sup>150,151</sup>.

Además de los operones y genes mencionados, observamos que en presencia de exudados radiculares de *M. pudica*, se activa la expresión de un transportador del tipo RND (resistance-nodulation-division) perteneciente a la familia de transportadores CzcABC (ID 5910). Estos codifican para una bomba de extrusión de metales tales como el zinc, el cadmio y el cobalto<sup>152,153</sup>. Se ha reportado que las bombas de eflujo RND cumplen un rol en la interacción planta-bacteria, mediando la respuesta a compuestos tóxicos, la especificidad con el hospedero, el tráfico de señales inter-especie y el censado poblacional<sup>154</sup>. Algunos compuestos producidos por la planta hospedera tienen efecto antibacteriano, por lo cual se ha descrito que este tipo de bombas de eflujo son necesarias en los primeros pasos de la colonización y en la supervivencia de la bacteria en los tejidos de la planta<sup>154,155</sup>. Incluso se ha reportado que los exudados radiculares actúan como efectores de las bombas RND, ya que algunos de estos metabolitos secundarios pueden unirse a reguladores transcripcionales de las mismas, como es el caso del represor TtgR que modula la expresión de la bomba TtgABC en *Pseudomonas putida*<sup>154</sup>. Se ha visto que el efecto de las bombas de eflujo en las interacciones planta-bacteria pueden ser específicas dependiendo del hospedero, como es el caso de la bomba BdeAB de *Bradyrhizobium japonicum*, la cual es necesaria para la nodulación en soja, pero no en otros hospederos, como frijol. Adicionalmente, en alfa-rizobios se ha demostrado que sistemas RND específicos pueden afectar el número de nódulos formados, los niveles de fijación de nitrógeno en los nódulos y la competitividad de los rizobios en la rizósfera<sup>154,115</sup>. De acuerdo con estos trabajos, se

puede postular que la bomba de eflujo RND expresada en UYMMa02A tendría un rol importante en la interacción con su hospedero, lidiando con compuestos tóxicos y mediando su comunicación.

Siguiendo con los transportadores, en este trabajo también se identificó un transportador de la superfamilia de transportadores ABC (ID 2690), cuya expresión se vio aumentada durante la interacción con los exudados radiculares. Se trata de un transportador involucrado en la adquisición de sulfuro a partir de alcanosulfonatos, codificado por el gen *ssuC*. Este transportador se expresa en condiciones de privación de sulfato y media el transporte activo del mismo. De esta forma UYMMa02A podría estar adquiriendo el sulfato necesario para la síntesis de aminoácidos (cisteína y metionina), cofactores que contienen sulfuro e incluso para la síntesis de Factores Nod con sustituciones sulfatadas, a partir de la cisteína presente en los exudados radiculares de *M. pudica*<sup>129,156</sup>.

Por otro lado, al ser enfrentada a exudados radiculares la bacteria realiza un reajuste en su metabolismo en respuesta a las señales y nutrientes que está recibiendo y se prepara para la infección de la planta, lo cual requiere un gran gasto energético. Se identificó la sobreexpresión de siete genes (*nuoHIJKLMN*) relacionados a la producción de energía (IDs 2396, 2397, 2398, 2399, 2400, 2401 y 2403), los cuales codifican para las distintas subunidades del complejo de la NADH-ubiquinona-oxidoreductasa, también llamada complejo I. Este complejo juega un rol central en la producción de energía celular, cataliza la transferencia de electrones a partir NADH hacia una quinona, proceso que tiene acoplado la translocación de protones a través de la membrana citoplasmática<sup>157</sup>. De esta forma se genera la energía protón motriz necesaria para la síntesis de ATP, el transporte activo de varios nutrientes y la movilidad de la bacteria (rotación dependiente de ATP del flagelo)<sup>115</sup>. Interesantemente, dentro del contexto genómico del complejo I, también se encuentra sobreexpresado un operón de 5 genes (IDs 3150, 3151, 3152, 3153 y 3154) encargado de la síntesis de Pirroloquinolina quinona (PQQ): *pqqABCDE*. La PQQ es una pequeña molécula redox, que actúa como cofactor de numerosas deshidrogenasas (en su mayoría glucosa y alcohol deshidrogenasas) y oxidasas bacterianas<sup>158</sup>. Las enzimas dependientes de PQQ, llamadas comúnmente quinoproteínas, catalizan la oxidación de una amplia variedad de alcoholes primarios y secundarios así como el catabolismo de terpenos acíclicos y están involucradas en funciones esenciales como la respiración bacteriana, el metabolismo oxidativo y el crecimiento. Algunas de estas quinoproteínas, además de utilizar PQQ como cofactor, contienen un grupo prostético adicional, hemo c, y son denominadas quinohemoproteínas<sup>159</sup>. En este sentido, en el contexto genómico del operón de síntesis de PQQ, también se encontró sobreexpresada la quinohemoproteína alcohol deshidrogenasa (ADH) dependiente de PQQ (ID 3148). Contrario a la ADH dependiente de NAD(P) presente en el citoplasma, las ADHs dependientes de PQQ son menos comunes y se encuentran solamente en un estrecho rango de proteobacterias. Las mismas se ubican en el periplasma, donde en

conjunto con la cadena respiratoria unida a la membrana, forman el “sistema alcohol oxidasa periplásmico” y actúan como deshidrogenasas primarias que transfieren los equivalentes reductores directamente a la cadena respiratoria bacteriana<sup>159</sup>. De esta forma UYMMa02A podría estar obteniendo energía de los polialcoholes presentes en los exudados radiculares. Estos datos, junto con la sobreexpresión del complejo I ya mencionada, estarían indicando que los exudados radiculares de *M. pudica*, activan el metabolismo energético de UYMMa02A. Esto ayudaría a explicar por qué una de las categorías COG que se vio enriquecida fue la categoría C (producción y conversión de energía) y dentro de la clasificación de vías KEGG, el metabolismo energético (en particular la fosforilación oxidativa) también se vio enriquecido.

Por otro lado, la PQQ también participa en la interacción planta-bacteria de forma más directa. Durante la interacción, la planta produce especies reactivas del oxígeno, entre otros compuestos, que resultan nocivos para la bacteria. Se ha propuesto que PQQ podría estar libre en la célula en su forma reducida (PQQH<sub>2</sub>) actuando como un potente antioxidante (más potente que la vitamina C, el ácido úrico y el glutatión) directamente neutralizando las especies reactivas<sup>160,158</sup>. Además en *E. coli* se ha reportado que la síntesis de PQQ estimula la expresión de enzimas antioxidantes como la catalasa y la superóxido dismutasa<sup>160</sup>. En este sentido se postula que UYMMa02A induce la expresión de PQQ en respuesta a los exudados radiculares como forma de protegerse ante el estrés oxidativo que se da durante la interacción<sup>161</sup>.

Terminando con los genes sobreexpresados en el cromosoma I cabe destacar que se identificaron 3 genes de la vía de síntesis de GDP-L-fucosa. La GDP-L-Fucosa es un importante precursor para la síntesis de exopolisacáridos (EPS) y lipopolisacáridos (LPS). Puede sintetizarse *de novo* (a partir de GDP-manosa) o mediante la vía de salvataje de Fucosa (a partir de LPS y EPS) que es raramente encontrada en procariontes<sup>162</sup>. A causa del estímulo de los exudados radiculares, se vieron sobreexpresados en UYMMa02A, 3 genes codificantes para enzimas involucradas en la síntesis *de novo* de GDP-L-fucosa: en primer lugar la enzima Mannose-1-phosphate guanylyltransferase (EC 2.7.7.13) (ID 2062) estaría encargada de interconvertir la manosa presente en los exudados radiculares en GDP-manosa; luego la GDP-mannose 4,6-dehydratase (EC 4.2.1.47) (ID 2064) convertiría la GDP-manosa en GDP-4-keto-6-deoxymanosa (paso crucial para la síntesis de GDP-fucosa) y finalmente la GDP-L-fucose synthetase (EC 1.1.1.271) (ID 2063) utilizaría el sustrato anterior para generar GDP-L-fucosa<sup>163,118</sup>. La vía de síntesis *de novo* de GDP-fucosa, fue recientemente reportada por primera vez por Gutschmann y colaboradores en *Cupriavidus necator* (también conocida como *Ralstonia eutropha*)<sup>162</sup>. En el contexto de la interacción planta-bacteria, los EPS son de gran importancia en los procesos de adhesión e invasión de la raíz y en la formación e infección de los nódulos<sup>63,164,165</sup>. Los LPS por otra parte se relacionan con la adaptación de los rizobios a las distintas condiciones ambientales y además cumplen un rol de “enmascare” de la bacteria, evitando la activación de la respuesta de defensa en la planta durante el establecimiento de la simbiosis<sup>166,167</sup>. La GDP-L-fucosa a demás de ser precursor de estos polisacáridos de

superficie, también forma parte de los sustituyentes de los factores Nod, contribuyendo con la especificidad bacteria-hospedero<sup>164</sup>.

En lo que respecta al cromosoma 2, 15 genes se vieron sobreexpresados, sin embargo, 5 de ellos resultaron en proteínas hipotéticas cuya función es desconocida, por lo cual la lista se reduce a 10 genes. Se identificaron 2 genes relacionados al metabolismo de lípidos que se encuentran en el mismo operón: *aldA* (ID 6154) y *adhA* (ID 6155) que codifican para las enzimas aldehído deshidrogenasa y alcohol deshidrogenasa respectivamente. A diferencia de la ADH dependiente de PQQ ya mencionada, en este caso la ADH sobreexpresada es dependiente de NAD(P) y su ubicación es citoplasmática<sup>159,168</sup>. Según la plataforma RAST estas dos enzimas al expresarse en conjunto comparten el subsistema biosíntesis de glicerolípidos, incluso en este mismo contexto genómico, también se vio sobreexpresado el gen con ID: 7311 que codifica para una posible lipoproteína. La enzima ALDH cataliza el segundo paso de la biosíntesis de glicerolípidos, formando D-gliceraldehído a partir de D-glicerato<sup>168</sup>. Este resultado sugiere que los exudados radiculares están estimulando en UYMMa02A la síntesis de ácidos grasos, lo cual, desde el punto de vista interacción rizobio-leguminosa, podría estar relacionado con cambios en la membrana, particularmente con la síntesis de LPS.

Por otro lado, se encontró sobreexpresado el gen *mobB* (ID 7312), cuyo producto participa en la vía de síntesis del cofactor Molibdeno (Moco, por *Molybdenum cofactor* en inglés). El elemento de transición molibdeno es de primordial importancia en los sistemas biológicos ya que se requiere como cofactor de enzimas que catalizan reacciones claves en el metabolismo de carbono, sulfuro y nitrógeno. Para obtener actividad biológica, el molibdeno debe ser acomplexado con una molécula de piranopterina (PPT), previamente llamada molibdopterina, en su sitio catalítico. En este proceso es que participa el producto del gen *mobB*<sup>169,170</sup>. Interesantemente el gen *mobB* se encuentra sobreexpresado junto con tres genes (IDs 7315, 7316 y 7317) que codifican para una nitrato reductasa respiratoria (la cual utiliza el cofactor molibdeno) formando un mismo operón. La enzima nitrato reductasa forma parte del ciclo del nitrógeno, en el proceso de desnitrificación, que consiste en la reducción secuencial de nitrato (NO<sub>3</sub>) a nitrito (NO<sub>2</sub>), óxido nítrico (NO), óxido nitroso (N<sub>2</sub>O) y finalmente di nitrógeno (N<sub>2</sub>). Las nitrato reductasas participan en el primer paso de reducción de nitrato a nitrito<sup>171</sup>. Durante este proceso se produce óxido nítrico, un gas que actúa como molécula señal con un amplio espectro de funciones regulatorias en el crecimiento y desarrollo de las plantas. Durante la última década se han reportado numerosas evidencias del rol del NO en la simbiosis rizobio-leguminosa desde los primeros pasos de esta interacción hasta la fijación de nitrógeno en los nódulos maduros<sup>171,172</sup>. A nivel de la planta se ha propuesto que el NO estimula la expresión de genes relacionados a la biosíntesis de flavonoides, el metabolismo de carbono, las respuestas redox, la formación del hilo de infección en los pelos radiculares y finalmente la formación del nódulo. En este sentido, se plantea que los exudados

radiculares de *M. pudica* estimulan en UYMMa02A la producción de esta molécula señal que activarían en la planta hospedera la expresión de genes relacionados a la respuesta simbiótica<sup>171</sup>. También a nivel del rizobio, en *S. meliloti* (simbionte de alfalfa) se ha demostrado que el NO en bajas concentraciones podría actuar como molécula señal en el microsimbionte<sup>171</sup>. Por otro lado, la capacidad de realizar el proceso de desnitrificación le permite a la bacteria producir ATP en condiciones de microaerofilia utilizando óxidos de nitrógeno como aceptores de electrones en lugar de oxígeno. Este proceso es de especial utilidad dentro del nódulo donde los niveles de oxígeno son muy bajos y finamente regulados para evitar la inactivación de la nitrogenasa<sup>171,173,172</sup>. En este sentido, la respuesta observada en UYMMa02A podría estar preparando a la bacteria para el siguiente paso de la interacción, cuando la misma se encontrará dentro del nódulo.

### 8.3.1.2 Genes reprimidos

A diferencia de los genes sobreexpresados, donde se vieron operones enteros afectados por el estímulo de los exudados radiculares y fue posible relacionarlos con el modelo simbiótico de estudio, en los genes reprimidos identificados, la relación no es tan clara. Se obtuvieron varios genes codificantes para elementos móviles, proteínas hipotéticas, poco caracterizadas o cuya función es muy genérica por lo cual es difícil atribuirles a una vía en particular. Sin embargo se identificaron algunos genes reprimidos interesantes implicados en mecanismos de detoxificación, síntesis de biotina, metabolismo de aminoácidos y quimiotaxis.

Considerando el cromosoma 1, se identificaron dos genes (IDs 1414 y 3444) reprimidos que codifican para enzimas con actividad Glutación-S-transferasas (GSTs). Las GSTs bacterianas son parte de una superfamilia de enzimas que juegan un rol importante en la detoxificación celular. Están implicadas en procesos como la degradación de xenobioticos, la protección contra el estrés químico y oxidativo y la resistencia a agentes antimicrobianos. Además las GSTs están involucradas en una gran variedad de procesos metabólicos en los que se incluye la degradación de la lignina, polímero fenólico que forma parte de la pared celular de las plantas<sup>174</sup>. Estudios In vitro han demostrado que ciertos flavonoides producidos por las plantas, en especial del grupo de los flavonoles, flavonas e isoflavonas (como por ejemplo quercetina, luteolina, kaempferol, genisteína) tienen un efecto inhibitorio sobre las Glutacion-S-transferasas. Los mecanismos de inhibición dependen del tipo de flavonoide e incluyen la interacción no covalente en el sitio de unión al sustrato, la unión al sitio alostérico ocasionando un cambio conformacional que afecta el sitio activo y la unión covalente al sitio activo de la enzima<sup>175,176</sup>. La represión de los genes codificantes para estas enzimas en UYMMa02A, podría ser otro mecanismo de inhibición ocasionada por los flavonoides de los exudados radiculares de *M. pudica*. Esto podría estar relacionado con los mecanismos de defensa de la planta hospedera que ocurren durante la primera etapa de la interacción simbiótica<sup>177,178</sup>.

Al clasificarse los genes diferenciales dentro de las vías metabólicas KEGG, la única vía que se vio reprimida fue el metabolismo de cofactores y vitaminas. Se encontraron dos genes reprimidos, *bioA* (ID 1517) y *bioF* (ID 1518), los cuales participan en la biosíntesis de *novo* de la vitamina Biotina. La biotina consiste en un anillo ureido fusionado con un anillo tetrahidrotiofeno que tiene como sustituto un ácido valerico. Los últimos pasos de síntesis de esta vitamina, donde participan los productos de los genes *bioA* y *bioF* se encuentran bien conservados entre distintas especies de bacterias. La síntesis de Biotina tiene un gasto energético muy alto ya que son necesarias 20 moléculas de ATP y es por esto que es estrictamente regulada<sup>179</sup>. Los exudados radiculares de las plantas, entre otros componentes son ricos en vitaminas, entre ellas la biotina. Se puede hipotetizar que UYMMa02A podría estar obteniéndola de los exudados de *M. pudica* y por esto su síntesis se vería reprimida. Esta vitamina es esencial ya que actúa como cofactor en las reacciones de carboxilación implicadas en la síntesis de aminoácidos, purinas y ácidos grasos<sup>180</sup>.

Siguiendo esta línea, el metabolismo de aminoácidos fue una de las categorías COG que se vio tanto sobreexpresada como reprimida. Al recibir los exudados radiculares, UYMMa02A por un lado activa los mecanismos de adquisición de aminoácidos así como la síntesis de aquellos que son cruciales para la interacción (por ejemplo los BCAAs) y por otro reprime la síntesis de aquellos que puede obtener de los exudados. Se encontró reprimido el gen *cisK* (ID 7578) que codifica para la enzima cisteína sintasa que participa en el segundo paso de la síntesis de cisteína a partir de L-serina. La cisteína es un aminoácido polar que representa una fuente importante de azufre para la síntesis de los grupos metalo-sulfurados presentes en la nitrogenasa y otras proteínas, por lo cual es un aminoácido esencial para la bacteria<sup>144</sup>. La represión de la cisteína sintasa y la sobreexpresión del ya mencionado transportador de aminoácidos polares son evidencias que indican que UYMMa02A estaría obteniendo este aminoácido que está presente en los exudados de *M. pudica*. Por otro lado también se vio reprimido el gen *rocF* (ID 8143) codificante para una arginasa. Esta enzima cataliza la hidrólisis de arginina a urea y ornitina. La urea producida puede ser luego hidrolizada para producir CO<sub>2</sub> y NH<sub>3</sub>, una de las fuentes de nitrógeno preferidas por las bacterias<sup>144</sup>. Dado que los aminoácidos presentes en los exudados pueden actuar como fuente de nitrógeno y que el medio mínimo M9 contiene NH<sub>3</sub>, la hidrólisis de arginina no sería necesaria en estas condiciones, lo que explicaría esta represión.

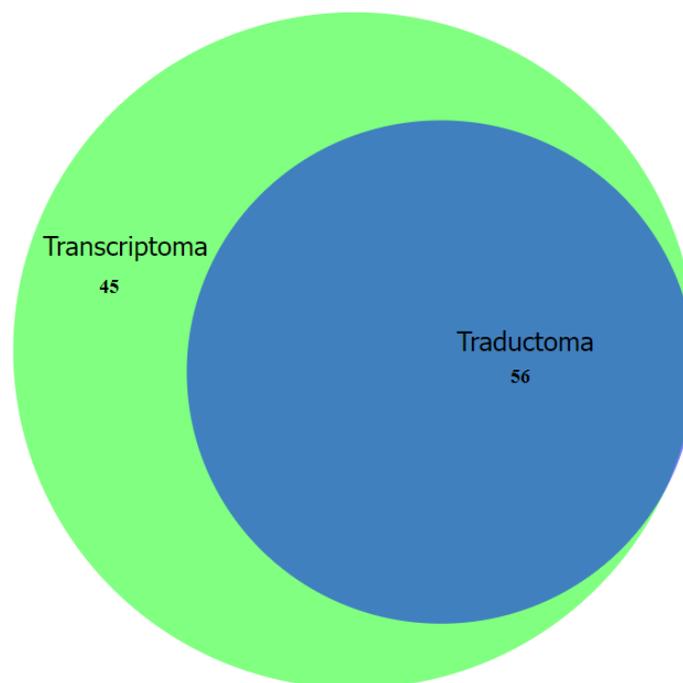
Interesantemente se encontraron reprimidos dos genes (IDs 2312 y 8145) codificantes para proteínas sensoras de compuestos quimioactivos, MCPs por su nombre en inglés (Methyl-accepting chemotaxis proteins) ubicados en el cromosoma 1 y 2. La quimiotaxis es la motilidad dirigida que permite a los microorganismos percibir señales ambientales y en respuesta moverse hacia aquellos factores que favorecen su supervivencia y alejarse de aquellos que resultan tóxicos. Los microorganismos presentan diversos tipos de quimiorreceptores que detectan señales intracelulares y ambientales y desencadenan cascadas de señalización en el citoplasma<sup>134</sup>. Las MCPs

son el tipo de quimiorreceptores predominantes en bacterias y arqueas. Estos receptores juegan un importante rol en las interacciones planta-bacteria y en la colonización de la rizósfera, participando en la regulación de diversas actividades celulares como la formación de biofilms, la degradación de xenobióticos, la producción de exopolisacáridos y la producción de toxinas entre otros<sup>181,134</sup>. Las bacterias ambientales y en particular, aquellas que viven asociadas a las plantas comúnmente presentan múltiples genes codificante para MCPs en su genoma. Por ejemplo *Sinorhizobium meliloti*, simbiote de alfalfa, presenta 9 genes de MCPs mientras que *Azospirillum* sp. B510 simbiote de *Oryza sativa*, contiene en su genoma 89 genes codificantes para MCPs<sup>181</sup>. Según la anotación en la plataforma RAST, UYMMa02A presenta en total 12 genes codificantes para MCPs, diez ubicados en su cromosoma 2 y dos en su cromosoma 1. El hecho de que este tipo de receptores, tan cruciales en la interacción, se encuentre reprimido en UYMMa02A en respuesta a los exudados radiculares puede resultar extraño al principio. Sin embargo, dada la complejidad en la composición de los exudados, el comportamiento en respuesta a estos es altamente multifactorial y representa la suma de actividades de diferentes quimioactivos y MCPs que median respuestas con diferentes magnitudes. Además en la rizósfera la concentración de exudados varía según la distancia a la raíz y esta variación en su concentración suma complejidad a la quimiotaxis<sup>134</sup>. En su estudio sobre el efecto de la concentración de los exudados radiculares sobre los quimiorreceptores de *Pseudomonas putida*, López-Farfán y colaboradores demuestran que los niveles de transcritos de MCPs aumentan a bajas concentraciones de exudados radiculares (lo que la bacteria percibe a distancia de la raíz de la planta), pero disminuyen a concentraciones más altas (en la vecindad de la raíz). Es decir, que la bacteria induce los sistemas de quimiotaxis a bajas concentraciones de exudados pero los inhibe a concentraciones altas<sup>182</sup>. Esto nos lleva a proponer que a la concentración de exudados a la que fue enfrentada UYMMa02A, la bacteria estaría censando que se encuentra cerca de la raíz y por lo tanto los sistemas de quimiotaxis se verían reprimidos.

### 8.3.2 Respuesta Traductómica.

A pesar de representar un desafío, el experimento de Ribosome Profiling fue exitoso. Prueba de esto es que a partir del protocolo puesto a punto fue posible la obtención de 0,31 µg de huellas ribosomales, cantidad que resultó suficiente para la construcción de bibliotecas de secuenciación de muy buena calidad. Con este protocolo, se superó uno de los problemas mas comunes en este tipo de experimentos, que es la contaminación de las bibliotecas de secuenciación con ARNs no codificantes (ARNr y ARNt), los cuales pueden llegar a ocupar hasta un 85% de las secuencias obtenidas<sup>72,116</sup>. En este caso, mediante la puesta a punto de la técnica en nuestro modelo se logró que solamente un 21% de las secuencias alinearon contra ARNr y ARNt, mientras que un 57% alinearon contra regiones codificantes (CDS), por lo que se puede afirmar que se obtuvieron bibliotecas de huellas de muy buena calidad y con baja contaminación (**Tabla 7**).

El análisis de la respuesta traductómica de UYMMa02A a la presencia de exudados permitió identificar 56 genes expresados diferencialmente, siendo 38 los sobreexpresados y 18 los reprimidos. La distribución de estos genes entre los replicones indica que los genes reprimidos se distribuyen equitativamente entre los cromosomas 1 y 2 y el plásmido simbiótico pSym (36%, 28% y 36% respectivamente), mientras que los genes sobreexpresados se localizan principalmente en el cromosoma 1 (77%) y en menor medida en el cromosoma 2 (23%), no observándose genes inducidos diferencialmente que pertenezcan al *pSym*. Resulta evidente que esta distribución es muy similar a la observada en el experimento de transcriptómica. De hecho la lista de genes identificados por este experimento es altamente concordante con los identificados por transcriptómica. En la **Figura 23**, se observa como un set de datos queda totalmente incluido dentro del otro. Como corolario de este efecto se puede observar que también las COG sobrerepresentadas (Categoría C y P) y subrepresentadas (L y O), se superponen **Figuras 12 y 18**.

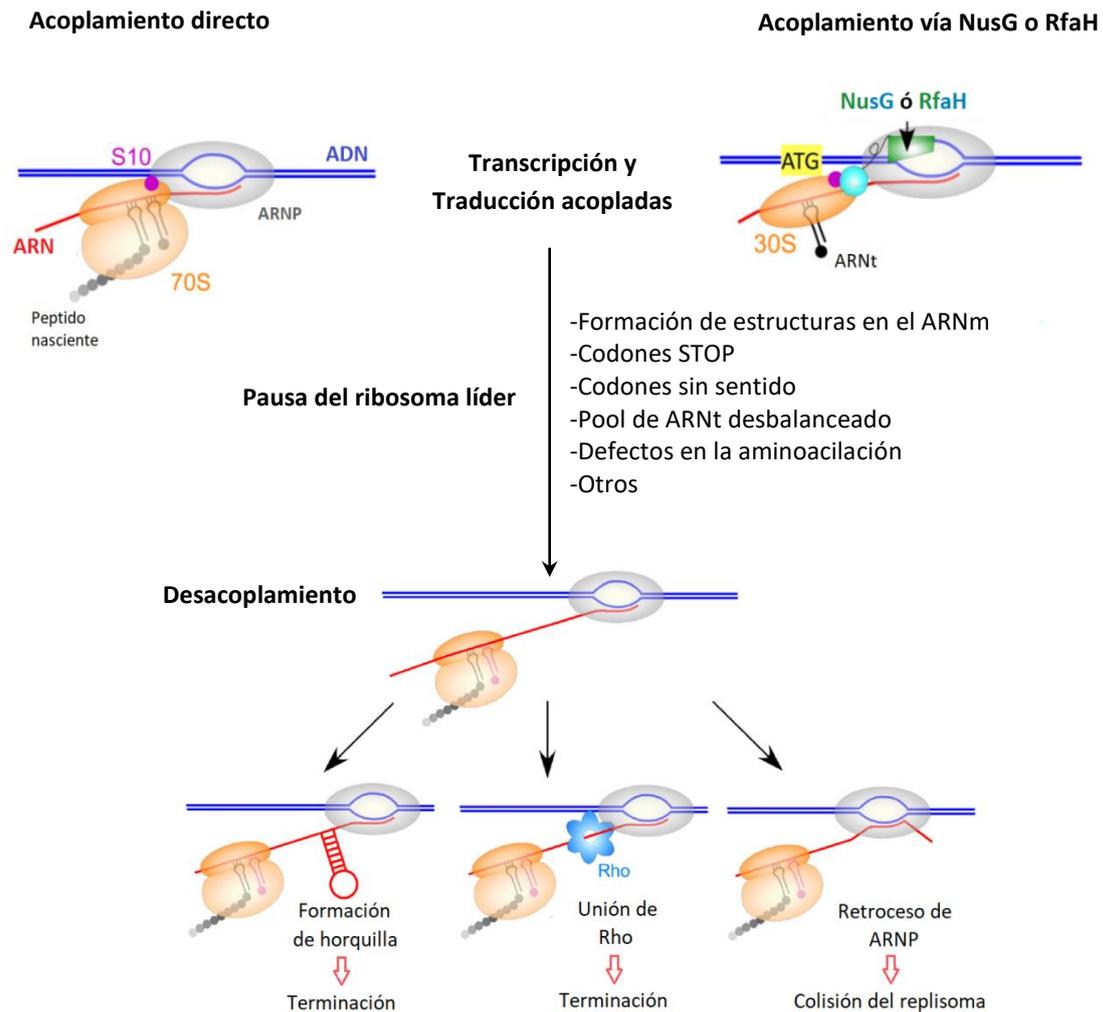


**Figura 23. Correlación entre el transcriptoma y traductoma de UYMMa02A.**

Se presenta un diagrama de Venn construido a partir de los genes expresados diferencialmente en UYMMa02A frente a la condición de exudados radiculares. En verde se muestran los genes diferenciales identificados a partir del transcriptoma (101 genes en total) y en azul aquellos identificados a partir del traductoma (56).

Este hecho puede explicarse por el fenómeno de acoplamiento entre transcripción y traducción. Al carecer de membrana nuclear, en las células procariotas estos dos procesos ocurren simultáneamente y están coordinados entre sí, la traducción de un ARNm puede comenzar tan pronto como el sitio de unión al ribosoma (RBS por sus siglas en inglés) emerge de la ARN polimerasa (ARNP) que lo está transcribiendo y el

ribosoma que se une (ribosoma líder) coordina su movimiento con la RNAP durante la primera ronda de traducción<sup>183,184</sup>. Se ha demostrado que la región que abarca el canal de salida del ARN desde la ARNP puede interactuar directamente con la subunidad 30S del ribosoma, permitiendo la unión a la RBS y a la secuencia Shine-Dalgrano del ARNm naciente. Además la ARNP y el ribosoma líder pueden acoplarse vía factores de transcripción como lo son NusG (presente en UYMMa02A, Rast ID: 1055) y su parólogo RfaH. Los dominios N-terminales de estos factores interactúan con la ARNP mientras que su dominio C-terminal interactúa con la subunidad 30S del ribosoma<sup>185</sup>. El acoplamiento entre la transcripción y la traducción juega un rol central en el control de la expresión génica permitiendo el monitoreo de la calidad del ARNm y determinando si las condiciones celulares son favorables para la traducción. La unión de los ribosomas al ARNm emergente puede prevenir la formación de horquillas de terminación, ocluir la unión del factor de terminación de la transcripción Rho y asegurar la síntesis continua del ARNm. En cambio, cuando el ribosoma hace una pausa y la traducción se ralentiza desacoplándose de la transcripción (por ejemplo debido a un codón sin sentido o a un codón que codifica para un ARNt aminoacilado que no se encuentra disponible en la célula, etc. ) el ARNm defectuoso se vuelve susceptible al factor de terminación Rho, liberándose de la ARNP y degradándose<sup>183,186</sup> (**Figura 24**).



**Figura 24. Causas y consecuencias del desacoplamiento.**

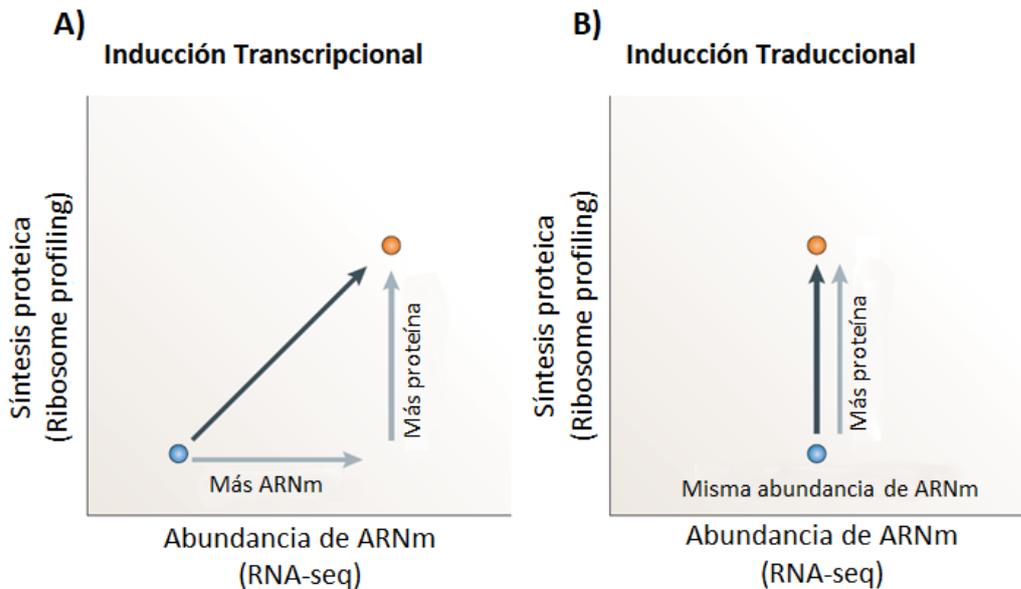
La transcripción y traducción pueden acoplarse mediante contactos directos entre la ARNP y el ribosoma líder (izquierda) o por proteínas accesorias como NusG o RfaH (derecha). Eventos que entorpecen o pausan al ribosoma líder o aceleran a la ARNP conducen al desacoplamiento (algunos ejemplos se listan en viñetas) lo que puede causar la terminación prematura de la traducción debido a la formación de estructuras secundarias en el ARN o el reclutamiento de factores de terminación. Además en la ausencia del ribosoma líder, la ARNP puede retroceder bloqueándose la replicación<sup>186</sup>. (Adaptado de Artsimovitch, 2019)<sup>186</sup>.

A pesar de que el acoplamiento es un fenómeno ampliamente observado y demostrado en los organismos procariontes, no todas las especies dependen del mismo, por ejemplo en *Bacillus subtilis* la tasa de transcripción supera ampliamente la de traducción y consecuentemente el acoplamiento no ocurre<sup>187</sup>. En UYMMa02A, basándose en los resultados obtenidos, está claro que el acoplamiento sí ocurre, al menos en la condición observada en este experimento.

Otra forma de correlacionar los datos del transcriptoma y traductoma es a través del parámetro de eficiencia traduccional (ET) el cual permite observar el grado de traducibilidad de un ARNm y distinguir formas alternativas de regulación en la expresión génica. Las huellas ribosomales son fragmentos de ARN que se encuentran protegidos por ribosomas y por lo tanto representan aquellos ARNm que estaban

siendo activamente traducidos en un momento dado. Por lo cual, si comparamos la abundancia de ARNm que se encontraba en las huellas ribosomales con la abundancia total del mismo ARNm en la célula, podemos determinar si ocurre algún fenómeno de regulación que repercuta en su tasa traduccional.

Una inducción transcripcional da como resultado un aumento correlativo entre la abundancia de un ARNm y la abundancia de huellas ribosomales obtenidas sobre ese ARNm, como se observa en la **Figura 25<sup>A</sup>**. Sin embargo una inducción traduccional se manifiesta como un aumento en los niveles de huellas ribosomales sobre un ARNm sin un cambio correspondiente en la abundancia del ARNm<sup>71</sup> (**Figura 25<sup>B</sup>**).



**Figura 25. Inducción transcripcional e Inducción traduccional.**

La comparación de los datos obtenidos mediante ribosome profiling y RNA-seq permite distinguir formas alternativas de regulación de la expresión génica. Adaptado de (Ingolia, 2014)<sup>71</sup>

En los datos, el parámetro de eficiencia traduccional se calcula como el cociente entre el conteo de lecturas de un ARNm en el traductoma, sobre el conteo de lecturas en el transcriptoma<sup>71</sup>.

La regulación transcripcional y traduccional ejercida sobre los genes de UYMMa02A frente al estímulo de los exudados radiculares se puede visualizar en la **Figura 19** del apartado de Resultados. En esta figura se grafica la tasa de cambio de cada ARNm a nivel traduccional vs su tasa de cambio a nivel transcripcional, es decir la distribución global del parámetro de eficiencia traduccional. En primer lugar, se puede observar una clara correlación lineal (puntos en azul) entre ambas tasas de cambio, lo que implica que la gran mayoría de genes identificados en este experimento y estas condiciones, presentan niveles de expresión a nivel traduccional que acompañan su expresión a nivel transcripcional, caso homólogo al que se observa en la **Figura 25<sup>A</sup>**. Este resultado apoya la hipótesis de que en UYMMa02A hay un fuerte acoplamiento entre transcripción y traducción. Sin embargo, los puntos coloreados en verde y amarillo, representan aquellos genes para los que sí se observa un cambio diferencial (tomando como criterio una tasa de cambio >2 y un p-valor <0.05) a nivel de la

eficiencia traduccional. En amarillo se representan aquellos genes en los que su eficiencia traduccional se ve disminuída, y en verde se representan aquellos genes con una eficiencia traduccional aumentada.

Entre los genes con eficiencia traduccional aumentada (**Tabla 9**) se identificaron 6 genes cuya función no fue posible determinar ya que codificarían para proteínas hipotéticas. Los restantes dos genes identificados codifican para un transportador del tipo ABC para aminoácidos (ID 5946) y para una reductasa de centros hierro-azufre (ID 5964). Además de los sistemas de transporte específicos para aminoácidos, muchos rizobios codifican para transportadores de la familia ABC con baja especificidad, permitiendo el transporte de distintos aminoácidos. En particular, los transportadores del tipo Bra están encargado del transporte de aminoácidos de cadena ramificada, mientras que los transportadores del tipo Aap, conocido también como el transportador general de aminoácidos, permite el transporte de una amplia variedad de aminoácidos. De hecho la adquisición de algunos aminoácidos, al carecer de transportadores específicos, depende enteramente de los sistemas Aap y/o Bra<sup>144</sup>. Como ya se ha discutido previamente, el transporte y metabolismo de aminoácidos es un proceso que se ve claramente influenciado por los exudados de *M. pudica* en UYMMa02A. La sobreexpresión traduccional de este transportador ABC acompaña la ya discutida inducción transcripcional del transportador de aminoácidos polares del tipo ABC y la inducción de la síntesis de aminoácidos de cadena ramificada (discutidos en la sección respuesta transcriptómica). Estos resultados apoyan la hipótesis de que al igual que ocurre en otro tipo de interacciones simbióticas, el transporte y biosíntesis de aminoácidos es importante para el establecimiento de la simbiosis entre *Cupriavidus sp.* UYMMa02A y la planta hospedera *Mimosa pudica*.

Por su lado, los centros de hierro azufre son reconocidos como cofactores versátiles y esenciales de distintas proteínas involucradas en numerosos procesos de catálisis, transporte de electrones y el censado de las condiciones redox ambientales. Estos centros comúnmente se presentan en los arreglos [2Fe–2S] y [4Fe–4S] conteniendo Fe<sup>2+/3+</sup> y S<sup>2-</sup> y se integran a las proteínas generalmente mediante la coordinación de los iones de hierro con residuos de cisteína o histidina. Estos centros ferro-sulfurados actúan como excelentes dadores y aceptores de electrones en una gran variedad de reacciones biológicas. Forman parte de los complejos respiratorios I y II, ferredoxinas, hidrogenasas y tienen un rol central en el complejo de la Nitrogenasa formando la Fe proteína<sup>188</sup>. Al ser tan amplia su función no resulta extraño encontrar sobreexpresada una proteína reductora de los mismos. Además, el ensamblado de proteínas ferro-sulfuradas ha sido ampliamente estudiada en *E. coli* y en la bacteria fijadora de nitrógeno *Azotobacter vinelandii*, reportándose que la biogénesis de estas proteínas se ve potenciada en condiciones de estrés oxidativo<sup>188</sup>. Estos centros ferro-sulfurados son sensibles a las especies reactivas del oxígeno, por lo cual la sobreexpresión de reductasas de los mismos podría interpretarse como una evidencia del estrés oxidativo que se estaría dando en la interacción UYMMa02A-*M. pudica*.

En cuanto a los genes reprimidos traduccionalmente, a pesar de que se identificaron siete, tres de ellos codifican para proteínas hipotéticas y tres codifican para proteínas cuya función es muy genérica por lo cual es difícil atribuirles a una vía en particular. Este es el caso de la posible proteína periplásmica que contiene un dominio TPR (ID 5297), la proteína RidA (ID 7540) y la enzima 2-keto-3-deoxygluconato kinasa (ID 5224). El dominio TPR que presenta la primera proteína, se encuentra presente en una amplia variedad de proteínas tanto procariontas como eucariotas y su función es mediar las interacciones proteína-proteína de forma no específica, UYMMa02A presenta 4 genes distintos que codifican para este motivo. Por otro lado, RidA es una proteína que pertenece a la superfamilia Rid (YER057c/UK114), un grupo de proteínas de bajo peso molecular que se divide en ocho subfamilias, siendo las subfamilias 1-7 las presentes en procariontas<sup>189</sup>. Su función es muy diversa y a menudo los genomas bacterianos codifican para múltiples miembros de esta familia, en particular UYMMa02A presenta 6 genes codificantes para esta familia. Dependiendo del organismo en que se encuentre sus funciones van desde chaperona involucrada en la protección frente a la exposición a HOCl, como es el caso en *E. coli*<sup>189,190</sup>, o como una enamina/imina desaminasa que participa en la síntesis de aminoácidos de cadena larga, como ocurre en *Salmonella entérica*<sup>191</sup>. Finalmente la enzima 2-keto-3-deoxygluconato kinasa forma parte del catabolismo de glucosa y galactosa en la vía alternativa Entner-Doudoroff (ED) (según la plataforma BRENDA), la represión de la misma en UYMMa02A podría ser reflejo del cambio en la disponibilidad de nutrientes, en particular compuestos carbonados, cuando se le proporciona exudados radiculares. Por estos motivos resulta interesante discutir solamente sobre uno de los genes reprimidos a nivel de su eficiencia traduccional. Este es el caso del gen *fliJ* (ID que codifica para la proteína flagelar FliJ. El hecho de que una proteína flagelar se vea reprimida frente al estímulo de los exudados puede resultar extraño ya que es sabido que los exudados radiculares estimulan la quimiotaxis y movimiento de la bacteria. Sin embargo en este caso se refuerza la hipótesis de que a la concentración de exudados que se trabajó en este experimento, los sistemas de quimiotaxis se encontrarían reprimidos, tal como observan López-Farfán y colaboradores en *P. putida*<sup>182</sup>. En línea con esta hipótesis, también estaría reprimida la síntesis del flagelo y por ende el movimiento de la bacteria. Además se ha postulado que la represión de genes vinculados a la síntesis del flagelo en bacterias que se asocian a plantas sería una estrategia para disminuir las respuestas de defensa del hospedero<sup>192,193</sup>.

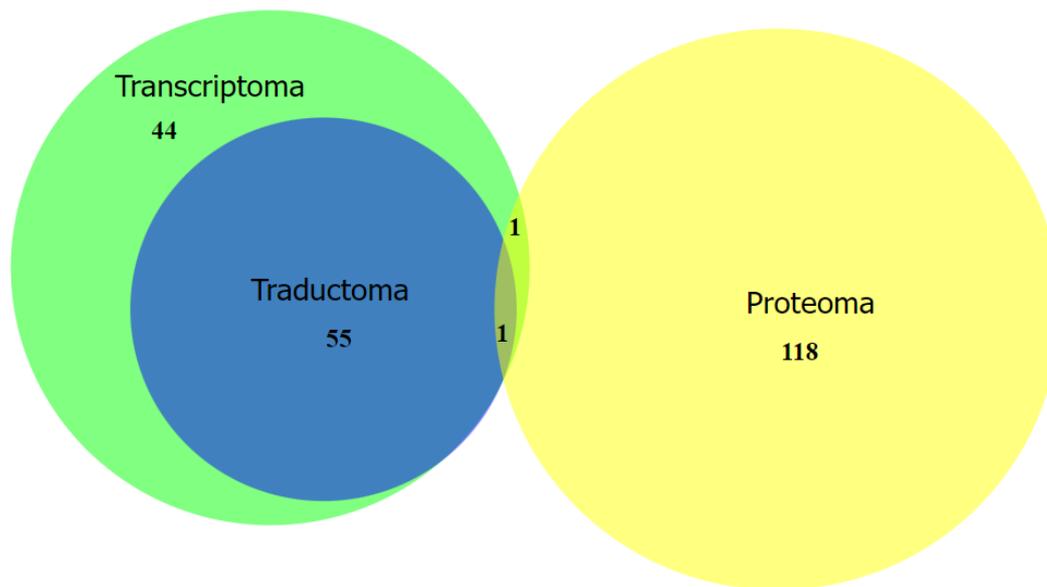
Siguiendo con las defensas de la planta, cabe destacar que una de las vías metabólicas KEGG que se vio enriquecida al considerar los genes sobreexpresados en el traductoma de UYMMa02A frente a exudados radiculares, fue la vía de procesamiento de información ambiental y en particular el efecto de la bacteria sobre la vía de señalización MAPK de la planta hospedera (**Tabla 8**). Las cascadas de señalización proteína-quinasa activadas por mitógenos (MAPK por sus siglas en inglés, *mitogen-activated protein kinase signaling cascades*) tienen un rol en la activación de la

respuesta inmune de la planta y se ha visto que ciertas señales de los rizobios pueden inducir la supresión de esta vía en su planta hospedera, facilitando así la colonización de la misma<sup>194</sup>.

### 8.3.3 Respuesta proteomica

Hasta el momento se ha discutido sobre los genes sobreexpresados o reprimidos y cuáles de esos transcritos se están traduciendo y con qué eficiencia. Finalmente resta discutir el tercer enfoque de este trabajo: las proteínas presentes en UYMMA02A durante la interacción con los exudados y su relación con el transcriptoma y traductoma. La técnica seleccionada, *shotgun proteomics*, es de las más sensibles para la identificación de la población de proteínas presentes en una muestra dada<sup>123</sup>. Sin embargo la interpretación del proteoma identificado, en comparación con el genoma, representa una mayor complejidad debido principalmente a las numerosas modificaciones o variaciones postraduccionales que las proteínas pueden presentar. La técnica permitió identificar 1175 proteínas en promedio, de las cuales 120 presentaron un cambio significativon en su abundancia relativa, siendo 22 las sobreexpresadas y 98 las reprimidas.

Mientras que la comparación entre el transcriptoma y traductoma arrojó una gran similitud, al cruzar estos datos con los obtenidos por proteómica, se observa que estos últimos quedan desacoplados (**Figura 26**). Esto nos resultó sorprendente, ya que el análisis del transcriptoma, traductoma y proteoma se realizó a partir de los mismos extractos celulares. Sin embargo, debemos considerar que en el extracto obtenido, los procesos que se observan a nivel genómico, como lo es la inducción o represión de genes, no tienen porque observarse a nivel de la población de proteínas de ese momento determinado.



**Figura 26. Correlación entre el transcriptoma, traductoma y proteoma de UYMMa02A.**

Se presenta un diagrama de Venn construido a partir de los genes expresados diferencialmente en UYMMa02A frente a la condición de exudados radiculares. En verde se muestran los genes diferenciales identificados a partir del transcriptoma (101 genes en total), en azul aquellos identificados a partir del traductoma (56) y en amarillo aquellos identificados a partir del proteoma (120).

Se decidió abordar la comparación entre transcriptoma, traductoma y proteoma de forma global, basándose no en la comparación entre los genes específicos que se identificaron en cada compartimiento, sino en los procesos y categorías en los que se clasificaron estos datos. Considerando la clasificación de los genes y proteínas con expresión diferencial, dentro de las categorías COG, en primer lugar se destaca que los genes identificados por transcriptómica, traductómica y proteómica se distribuyen en 17, 14 y 16 de un total de 21 categorías COG respectivamente. Esto indica el amplio efecto que tienen los exudados de *M. pudica* sobre los procesos celulares de UYMMa02A. Sin embargo la distribución de genes dentro de estas categorías es muy diferente para los 3 puntos de vista estudiados, por ejemplo categorías como C y P que se vieron enriquecidas entre los genes sobreexpresados en transcriptómica y traductómica, en proteómica se ven enriquecidas entre los genes reprimidos. Cabe destacar que en el enfoque proteómico se identificaron mayor cantidad de proteínas reprimidas que sobreexpresadas (contrario a lo que ocurre con los otros dos compartimientos). Dentro de los procesos sobreexpresados no se observa homología entre los distintos compartimientos estudiados, sin embargo en la represión si se comparten algunas características. Por ejemplo, llama la atención que en proteómica se identificaron gran cantidad de proteínas reprimidas involucradas en el metabolismo de aminoácidos, categoría E, lo cual es otra evidencia de que UYMMa02A activa los transportadores de aminoácidos para obtenerlos a partir de los exudados y reprime la síntesis de los mismos. Por otro lado, procesos como la síntesis de biotina, la quimiotaxis y la síntesis de glutatión S-transferasas también se vieron reprimidos en proteómica.

¿Por qué el proteoma de UYMMa02A se encuentra desacoplado de su transcriptoma y traductoma? La producción y mantenimiento de las proteínas celulares requiere un conjunto de procesos abarcando desde la transcripción, procesamiento y degradación de los ARNm, hasta la traducción, localización, modificación y destrucción programada de las proteínas. La abundancia de proteínas en un momento dado en la célula, refleja el equilibrio dinámico de estos procesos. Asumir que la abundancia de transcritos es el determinante principal de la abundancia de una determinada proteína es una práctica comúnmente utilizada. Sin embargo las tecnologías actuales, en particular la técnica de *Shotgun proteomics* que permiten la determinación a gran escala del proteoma de una célula, así como las técnicas de secuenciación masiva que permiten la cuantificación de la abundancia de ARN en cualquier organismo y el análisis de las huellas ribosomales, que dan información sobre la eficiencia traduccional, están cambiando esta visión. Hoy en día es ampliamente aceptado que en estado estacionario, la abundancia de transcritos solo predice débilmente la abundancia de proteínas<sup>195,196,197</sup>. En general tanto en bacterias como en eucariotas las concentraciones celulares de proteínas se correlacionan con la abundancia de sus correspondientes ARNms solamente en un 40%, en estado estacionario. Es decir que solamente el 40% de la variación en la concentración de proteínas puede ser explicada sabiendo la abundancia de ARNm. Incluso en condiciones perturbadas, como sería pasar del medio mínimo M9 a un medio rico en exudados radiculares, se ha visto que esta correlación es aún menor y dependiente del momento en que se detenga el experimento<sup>195</sup>.

En su trabajo con levaduras, Lee M.V y colaboradores sometieron al microorganismo a estrés osmótico y midieron los cambios en la expresión génica a distintos tiempos<sup>198</sup>. Los autores determinaron en primera instancia que para los genes sobreexpresados, las concentraciones máximas de ARNm y proteína estaban bien correlacionadas, mientras que esto no ocurría para los genes reprimidos. Sin embargo, al repetir el experimento en otra línea de tiempo la levadura no mostró este comportamiento, por más que se observó una regulación de una gran fracción de genes a nivel post-transcripcional, esta fue independiente de la sobreexpresión o represión de los mismos y la correlación entre ARNm y proteína fue muy pobre. Lo mismo parece ser cierto para las bacterias en las que los análisis a distintos tiempos de sistemas perturbados revelaron grandes diferencias entre la abundancia de proteínas y la de ARNm<sup>196,197</sup>.

Estos ejemplos quizás podrían explicar lo que ocurre con el aparente desacoplamiento observado entre el proteoma y el resto de los datos en UYMMa02A, claramente, nuestra comprensión de los sistemas perturbados aún es incompleta y requiere más profundidad.

## 9 CONCLUSIONES

El objetivo de este trabajo fue intentar decifrar los cambios moleculares que existen en el beta-rizobio *Cupriavidus sp.* UYMMa02A durante los primeros pasos de la interacción simbiótica con la planta hospedera *Mimosa pudica*. Para esto se decidió abordar el estudio de los cambios mediante el uso de 3 técnicas omicas complementarias que nunca habían sido utilizadas en este modelo.

En un primer momento, se logró poner a punto un método reproducible para la obtención de extractos celulares de alta calidad. A partir de los mismos, fue posible el aislamiento de fracciones conteniendo las moléculas a estudiar: el ARN total, los polisomas y las proteínas. Este método podrá ser aplicado en futuros estudios en otros modelos de interés pertenecientes al género *Cupriavidus*.

En una segunda etapa se logró poner a punto la técnica de Ribosome profiling en nuestro modelo bacteriano, lo cual también permitirá su empleo en futuros estudios. La disponibilidad del protocolo generado también permitirá ampliar los estudios de regulación traduccional a organismos no modelo, ampliando el conocimiento sobre este importante proceso celular.

En tercer lugar avanzamos en el conocimiento de la interacción específica entre UYMMa02A y *M. pudica*, mediante el análisis en profundidad de los resultados obtenidos mediante transcriptómica. Estos resultados indican que durante los primeros pasos de la interacción, la bacteria responde al estímulo de los exudados radiculares de la planta activando la expresión de genes relacionados a la síntesis de aminoácidos de cadena ramificada, a la remodelación de su perfil lipídico (síntesis de expolisacáridos y lipopolisacáridos) y a la producción de energía. Interesantemente también se ven activos procesos relacionados a la protección frente al estrés oxidativo generado durante la interacción, a la extrusión de compuestos tóxicos mediante bombas de eflujo del tipo RND y a la resistencia a metales como el cobre y el arsénico. Además ante un aumento en la oferta de nutrientes ofrecidos por los exudados radiculares, la bacteria realiza un reajuste en su metabolismo para adquirirlos. Esto se ve reflejado a través de la activación de transportadores de aminoácidos así como en la represión de procesos que en este ambiente rico dejan de ser necesarios y representan un gasto energético. Entre otros procesos se observó la represión de genes implicados en la síntesis de aminoácidos, la síntesis de vitaminas como la biotina e incluso la síntesis de sensores de quimiotaxis y de proteínas flagelares, sugiriendo que la bacteria no tiene necesidad de moverse en busca de un ambiente más favorable.

Finalmente el análisis en conjunto de los resultados obtenidos muestra que ver un mismo proceso mediante tres puntos de vista distintos, permitió determinar que en nuestra bacteria existe un gran acoplamiento entre la transcripción y la traducción, observándose muy poca regulación post-transcripcional. En otras palabras, se vio que los niveles de expresión y represión de los genes identificados se acompañan durante la transcripción y traducción de los mismos. Contrariamente, en cuanto a las proteínas identificadas en este momento, se observó un gran desacoplamiento en comparación a las otras dos técnicas, aportando información a la teoría cada vez más aceptada de que la abundancia de transcriptos solo predice débilmente la abundancia de proteínas.

## 10 PERSPECTIVAS

En primer lugar, considerando que el ensayo de inducción de los genes *nod* mediante el plasmido reportero pCBM01 fue negativo para UYMMa02A y que con ninguna de las aproximaciones en esta tesis se vio una expresión diferencial de estos genes en particular frente al estímulo de los exudados radiculares; se puede inferir que UYMMa02A presenta otra vía de activación de los genes *nod* independiente de *nodD* o que existe cierta expresión basal de estos genes que no se encuentre regulada por la presencia de exudados radiculares de *M. pudica*. Para profundizar en esto se podría utilizar las muestras de ARN total ya obtenidas (las cuales se encuentran preservadas a -80°C en nuestro laboratorio) y realizar una qPCR, de modo de cuantificar los niveles de ARNm de los genes *nod* en presencia y ausencia de exudados.

Por otro lado, dado que se generó un protocolo reproducible, el mismo se podría aplicar en UYMMa02A frente a exudados radiculares, pero cosechando las células a distintos tiempos. En esta tesis se enfrentó la bacteria a los exudados durante 12 horas, sería interesante estudiar los cambios que suceden a tiempos menores o mayores ya que se podrían ver otros fenómenos de regulación en la respuesta. Este tipo de análisis podría ayudar a interpretar el desacoplamiento observado entre los datos de proteómica y las otras dos aproximaciones ya que otros autores han reportado que este fenómeno depende del momento en el que se realiza el análisis. Aplicando los protocolos generados a las distintas fases de la interacción, se podría ahondar en los mecanismos involucrados en la adhesión a la raíz o incluso en la diferenciación a bacteroides que ocurre dentro del nódulo. Para esto igualmente se debería resolver la limitante de recuperar cantidades suficientes de polisomas, a partir de un menor número de células.

Sin realizar nuevos experimentos, existe aún mucha información para extraer de los datos ya generados. Por ejemplo se podría estudiar la periodicidad de las huellas ribosomales, es decir se puede mapear el lugar exacto donde caen estas huellas dentro de la región codificante de cada gen y monitorear el marco de lectura que está siendo traducido, codón a codón, contribuyendo a describir los fenómenos de traducción en *Cupriavidus*. También debe considerarse que por falta de tiempo y espacio, en esta tesis, no se analizó en profundidad la importancia biológica de las proteínas identificadas, lo cual queda como legado para futuros estudios. Complementariamente, ya que en este trabajo se encontraron varios operones expresados diferencialmente, se podrían identificar las secuencias promotoras y los potenciales reguladores transcripcionales asociados para proponer nuevos reguladores de la interacción simbiótica entre beta-rizobios y leguminosas hospederas.

Finalmente, cabe destacar una vez más el escaso conocimiento que hay a la fecha sobre  $\beta$ -rizobios, de hecho un gran porcentaje de la bibliografía que soporta este trabajo representa estudios realizados en  $\alpha$ -rizobios. Por esta razón es que los datos generados en esta tesis (los cuales serán depositados en plataformas como NCBI o

repositorios similares) son un aporte valioso al conocimiento de este tipo de rizobios y en particular al genero *Cupriavidus* y al estudio de microorganismos nativos del suelo de nuestro país.

## 11 ANEXO

### 11.1 Medios de cultivo y soluciones

#### 11.1.1 Medio mínimo M9

Componente	Cantidad por litro
Sales M9 5x *	200 ml
MgSO <sub>4</sub> 1M	2 ml
Solución 20 % (p/v) de la fuente de carbono	20 ml
CaCl <sub>2</sub> 1M	0,1 ml
H <sub>2</sub> O c.s.p 1 litro	
<b>Sales 5x *</b>	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	64 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	15 g
NaCl	2,5 g
NH <sub>4</sub> Cl	5,0 g
H <sub>2</sub> O c.s.p 1 litro	

\*Las sales y el resto de los componentes se esterilizan por separado y luego se arma el medio. Para el medio sólido se agrega agar 18 g/L. Como fuente de carbono se utilizó en una concentración de 14mM, citrato de sodio tribásico dihidratado (SIGMA #087K0055).

**Nota:** El **medio mínimo M9 Suplementado** corresponde a la misma preparación pero en lugar de utilizarse agua destilada, se utiliza el agua recolectada según 6.3.2 conteniendo los exudados radiculares de *M. pudica*, previamente esterilizada por filtración con filtro de 45 µm.

#### 11.1.2 Medio Triptona - Extracto de levadura (TY)

Componente	Cantidad por litro
Triptona	5 g
Extracto de levadura	3 g
CaCl <sub>2</sub> 2,5%	2 ml
Agar	18 g
H <sub>2</sub> O c.s.p 1 litro	

#### 11.1.3 Medio Luria - Bertani (LB)

Componente	Cantidad por litro
Triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl <sub>2</sub>	5 ml
Agar	18 g
H <sub>2</sub> O c.s.p 1 litro	

#### 11.1.4 Buffer Tris-Borato-EDTA (TBE) 5X

<b>Componente</b>	<b>Cantidad por litro</b>
Tris Base	54 g
Ácido Bórico	27,5 g
EDTA 0,5 M	20 ml
H <sub>2</sub> O c.s.p 1 litro	

#### 11.1.5 Buffer Z

<b>Componente</b>	<b>Cantidad por litro</b>
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O 60mM	10,7 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O 40mM	5,5 g
KCl 10mM	0,75 g
MgSO <sub>4</sub> 1mM	0,24 g
H <sub>2</sub> O c.s.p 1 litro	

## 11.2 Tablas suplementarias

**Tabla S 1. Características generales de los genes transcritos diferencialmente.**

Se presentan los genes sobreexpresados en respuesta a la presencia de exudados radiculares de *M. pudica*.

Identificador <sup>a</sup>	Log Tasa de cambio	p-valor ajustado	Descripción <sup>b</sup>	Nombre consenso <sup>c</sup>	Cromosoma	Categoría <sup>d</sup> COG
<b>Genes sobreexpresados</b>						
1181	1.4385	7.81E-03	hypothetical protein	-	chr1	-
1234	1.3935	3.62E-05	Lysophospholipase (EC 3.1.1.5); Monoglyceride lipase (EC 3.1.1.23)	ytpA	chr1	I
1235	1.6187	3.69E-09	Cu(I)-responsive transcriptional regulator	cueR	chr1	K
1236	1.3031	7.70E-07	Lead, cadmium, zinc and mercury transporting ATPase (EC 3.6.3.3) (EC 3.6.3.5); Copper-translocating P-type ATPase (EC 3.6.3.4)	copA	chr1	P
1237	1.6139	3.06E-08	Copper(I) chaperone CopZ	copZ	chr1	P
1488	1.4045	1.18E-02	hypothetical protein	-	chr1	-
1777	2.2578	4.04E-13	Arsenic resistance protein ArsH	arsH	chr1	P
1778	2.7166	2.37E-23	Arsenate reductase (EC 1.20.4.1) glutaredoxin-coupled, glutaredoxin-like family	arsC1	chr1	C
1779	2.5487	5.29E-49	Arsenical-resistance protein ACR3	arsB	chr1	P
1780	2.4789	2.60E-62	Arsenate reductase (EC 1.20.4.4) thioredoxin-coupled, LMWP family	arsC2	chr1	T
1781	2.3644	6.97E-63	Glyoxalase family protein	arsI	chr1	E
1782	2.0223	2.73E-24	Arsenical resistance operon repressor	arsR	chr1	K
2062	1.0882	9.92E-03	Mannose-1-phosphate guanylyltransferase (EC 2.7.7.13) / Mannose-6-phosphate isomerase (EC 5.3.1.8)	cpsB	chr1	GM
2063	1.3739	4.84E-03	GDP-L-fucose synthetase (EC 1.1.1.271)	fcl	chr1	GM
2064	1.5197	8.49E-03	GDP-mannose 4,6-dehydratase (EC 4.2.1.47)	gmd	chr1	M
2066	1.2598	4.36E-02	hypothetical protein	-	chr1	-
2268	1.3215	1.27E-04	hypothetical protein	-	chr1	K
2270	1.8895	5.04E-06	Multicopper oxidase	copA	chr1	Q
2271	1.9399	2.33E-08	Copper resistance protein B	copB	chr1	P
2272	1.7833	1.78E-08	Copper resistance protein CopC	copC	chr1	S
2273	1.8032	2.04E-07	Copper resistance protein CopD	copD	chr1	P
2274	1.8093	1.67E-06	CopG protein	-	chr1	S
2275	1.8985	2.04E-07	Putative carbamoylphosphate synthase large subunit, short form	-	chr1	S
2276	1.6344	2.04E-06	Lipid carrier : UDP-N-acetylgalactosaminyltransferase (EC 2.4.1.-)	epsL	chr1	M
2277	1.5152	1.08E-04	hypothetical protein	-	chr1	-
2396	1.3988	2.02E-02	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain H (EC 1.6.5.3)	nuoH	chr1	C
2397	1.3687	2.49E-02	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain I (EC 1.6.5.3)	nuoI	chr1	C
2398	1.6344	8.55E-03	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain J (EC 1.6.5.3)	nuoJ	chr1	C
2399	1.7146	5.28E-03	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain K (EC 1.6.5.3)	nuoK	chr1	C
2400	1.4514	8.33E-03	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain L (EC 1.6.5.3)	nuoL	chr1	C
2401	1.0441	2.63E-02	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain M (EC 1.6.5.3)	nuoM	chr1	C
2403	1.2262	1.52E-02	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain N (EC 1.6.5.3)	nuoN	chr1	S
2404	1.1818	4.31E-03	FIG003089: Probable transmembrane protein	nudF	chr1	L
2613	1.4385	1.66E-02	Cell division protein ZapE	zapE	chr1	S

**Tabla S 1. Continuación**

Identificador <sup>a</sup>	Log Tasa de cambio	p-valor ajustado	Descripción <sup>b</sup>	Nombre consenso <sup>c</sup>	Cromosoma	Categoría <sup>d</sup> COG
2690	1.0548	1.76E-02	Alkanesulfonate ABC transporter permease protein SsuC	ssuC	chr1	P
2699	1.3809	4.68E-02	hypothetical protein	-	chr1	-
2889	1.5194	1.41E-02	Ribosomal protein L3 N(5)-glutamine methyltransferase (EC 2.1.1.298)	prmB	chr1	J
3148	1.042	1.31E-03	Quino(hemo)protein alcohol dehydrogenase, PQQ-dependent (EC 1.1.2.8)	exaA	chr1	G
3149	1.5513	7.13E-10	Cytochrome c551/c552	-	chr1	C
3150	1.4276	1.81E-09	Coenzyme PQQ synthesis protein E	pqqE	chr1	S
3151	1.7625	5.15E-11	Coenzyme PQQ synthesis protein D	pqqD	chr1	S
3152	1.4959	1.88E-08	Pyrrroloquinoline-quinone synthase (EC 1.3.3.11)	pqqC	chr1	H
3153	1.5369	3.27E-11	Coenzyme PQQ synthesis protein B	pqqB	chr1	S
3154	1.4718	5.08E-09	Coenzyme PQQ synthesis protein A	pqqA	chr1	-
3155	1.217	2.54E-04	Proline iminopeptidase (EC 3.4.11.5)	pip	chr1	E
3955	1.0116	4.87E-03	Histidinol-phosphate aminotransferase	-	pSym	E
3956	1.1833	1.29E-02	Acetohydroxy acid synthase	ilvB	pSym	EH
3957	1.6866	2.67E-02	Transposase	-	pSym	L
4228	1.0772	1.87E-02	Aminoacid/amide ABC transporter	ehuB	pSym	ET
5910	1.2213	2.94E-03	CzcABC family efflux RND transporter, membrane fusion protein	cusB	crh2	M
6154	1.4956	3.06E-08	Aldehyde dehydrogenase (EC 1.2.1.3)	aldA	crh2	C
6155	1.2416	3.29E-07	Alcohol dehydrogenase (EC 1.1.1.1)	adhA	crh2	C
6156	1.1451	1.06E-05	hypothetical protein	-	crh2	S
7311	1.386	1.54E-02	putative lipoprotein	-	crh2	S
7312	1.7561	6.28E-03	Molybdopterin-guanine dinucleotide biosynthesis protein MobB	mobB	crh2	H
7313	1.9765	1.92E-03	Carbonic anhydrase, beta class (EC 4.2.1.1)	cynT	crh2	P
7314	1.6553	5.52E-03	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase PpiD (EC 5.2.1.8)	ppiD	crh2	O
7315	1.7451	6.25E-03	Respiratory nitrate reductase gamma chain (EC 1.7.99.4)	narI	crh2	C
7316	1.6961	5.77E-03	Respiratory nitrate reductase delta chain (EC 1.7.99.4)	narJ	crh2	C
7317	1.8142	3.83E-03	Respiratory nitrate reductase beta chain (EC 1.7.99.4)	narH	crh2	C
7655	1.426	3.59E-02	hypothetical protein	-	crh2	-
7670	1.023	4.07E-02	hypothetical protein	-	crh2	-
8040	1.6415	5.59E-05	hypothetical protein	-	crh2	-
8188	1.2198	5.74E-07	hypothetical protein	-	crh2	-

<sup>a</sup>Identificador del gen según la anotación del genoma de *Cupriavidus* sp. UYMMa02A en la base de datos Rast.

<sup>b</sup>Descripción obtenida de Rast. <sup>c</sup>Nombre consenso del gen según la base de *datos eggNOG-mapper*.

<sup>d</sup>Categorías COG: C- producción y conversión de energía; E- transporte y metabolismo de aminoácidos; ; G- transporte y metabolismo de carbohidratos; H- metabolismo co-enzimático; I- metabolismo lipídico; J- traducción; K- transcripción; L- replicación, recombinación y reparación, M- estructura y biogénesis de la envoltura celular y de la membrana externa; O- modificaciones post-traduccionales, proteínas chaperonas; P- transporte y metabolismo de iones inorgánicos; Q- estructuras secundarias; S- función desconocida; T- transducción de señales.

**Tabla S 2. Características generales de los genes transcritos diferencialmente.**

Se presentan los genes sub expresados o reprimidos en respuesta a la presencia de exudados radiculares de *M. pudica*.

Identificador <sup>a</sup>	Log Tasa de cambio	p-valor ajustado	Descripción <sup>b</sup>	Nombre consenso <sup>c</sup>	Cromosoma	Categoría <sup>d</sup> COG
<b>Genes sub expresados / reprimidos</b>						
1294	-1.08	3.06E-03	Putative transmembrane protein	-	chr1	S
1414	-1.30	2.69E-03	Glutathione S-transferase (EC 2.5.1.18)	attY	chr1	O
1415	-1.52	3.09E-08	Hydantoin racemase (EC 5.1.99.5)	-	chr1	E
1517	-1.27	4.35E-09	Adenosylmethionine-8-amino-7-oxonanoate aminotransferase (EC 2.6.1.62)	bioA	chr1	H
1518	-1.34	5.92E-11	8-amino-7-oxonanoate synthase (EC 2.3.1.47)	bioF	chr1	H
2140	-1.23	5.00E-05	FIG110192: hypothetical protein	MA20_36195	chr1	S
2312	-1.06	1.08E-04	Methyl-accepting chemotaxis sensor/transducer protein	aer_1	chr1	NT
2313	-1.06	2.80E-05	hypothetical protein	-	chr1	I
2707	-1.23	1.40E-04	FIG045511: hypothetical antitoxin (to FIG022160: hypothetical toxin)	-	chr1	K
3443	-1.11	9.77E-05	Probable acyltransferase PA0834	yihG	chr1	I
3444	-1.40	8.51E-09	Glutathione S-transferase, omega (EC 2.5.1.18)	yqjG	chr1	O
3635	-1.06	1.13E-03	Acetyl-CoA hydrolase	cat1	chr1	C
4268	-1.15	1.46E-04	Mobile element protein	-	pSym	L
4291	-1.02	1.33E-02	hypothetical protein	-	pSym	L
4292	-1.34	2.69E-03	Mobile element protein	-	pSym	L
4293	-1.26	1.93E-03	Mobile element protein	-	pSym	L
4294	-1.55	1.14E-07	hypothetical protein	-	pSym	-
4295	-1.19	3.58E-06	hypothetical protein	-	pSym	-
4298	-1.11	2.30E-02	hypothetical protein	-	pSym	-
4344	-1.12	2.16E-06	Cold shock protein of CSP family	-	pSym	L
4345	-1.07	5.06E-07	Mobile element protein	-	pSym	L
4365	-1.06	1.00E-03	Mobile element protein	-	pSym	L
4366	-1.05	2.21E-04	Mobile element protein	-	pSym	-
4427	-1.11	1.81E-03	Mobile element protein	-	pSym	L
6031	-1.01	6.89E-03	1,2-phenylacetyl-CoA epoxidase, subunit C (EC 1.14.13.149)	paaC	chr2	S
6064	-1.33	6.16E-04	HlyD-like membrane fusion protein Yhil	-	chr2	M
6867	-1.36	4.06E-04	AMP nucleosidase (EC 3.2.2.4)	amn	chr2	F
7238	-1.54	4.57E-06	Repair of Iron Centers di-iron protein	-	chr2	S
7239	-1.96	4.04E-13	Putative transmembrane protein	-	chr2	-
7240	-1.67	2.59E-11	Putative transmembrane protein	-	chr2	-
7241	-1.11	2.05E-06	putative oxidoreductase, nitronate monooxygenase family	npd	chr2	S
7242	-1.58	1.11E-05	Uncharacterized protease YhbU	yhbU	chr2	O
7243	-1.40	1.21E-09	Putative protease	yhbV	chr2	O
7577	-1.16	2.02E-03	Universal stress protein family, tandem domain	-	chr2	T
7578	-1.04	8.15E-04	Cysteine synthase (EC 2.5.1.47)	cysK	chr2	E
8143	-1.05	6.49E-04	Arginase (EC 3.5.3.1)	rocF	chr2	E
8145	-1.04	1.31E-05	Methyl-accepting chemotaxis sensor/transducer protein	-	chr2	NT

<sup>a</sup>Identificador del gen según la anotación del genoma de *Cupriavidus* sp. UYMMa02A en la base de datos Rast.

<sup>b</sup>Descripción obtenida de Rast. <sup>c</sup>Nombre consenso del gen según la base de datos *eggNOG-mapper*.

<sup>d</sup>Categorías COG: C- producción y conversión de energía; E- transporte y metabolismo de aminoácidos; F- metabolismo y transporte de nucleótidos; H- metabolismo co-enzimático; I- metabolismo lipídico; K- transcripción; L- replicación, recombinación y reparación, M- estructura y biogénesis de la envoltura celular y de la membrana externa; N- movilidad celular; O- modificaciones post-traduccionales, proteínas chaperonas; S- función desconocida; T- transducción de señales.

**Tabla S 3. Características generales de los genes traducidos diferencialmente.**

Se presentan los genes sobreexpresados en respuesta a la presencia de exudados radiculares de *M. pudica*.

Identificador <sup>a</sup>	Log Tasa de cambio	p-valor ajustado	Descripción <sup>b</sup>	Nombre consenso <sup>c</sup>	Cromosoma	Categoría <sup>d</sup> COG
<b>Genes sobreexpresados</b>						
1181	1.06	1.15E-02	hypothetical protein	-	chr1	-
1234	1.37	2.09E-05	Lysophospholipase (EC 3.1.1.5); Monoglyceride lipase (EC 3.1.1.23)	ytpA	chr1	I
1235	1.30	2.87E-09	Cu(I)-responsive transcriptional regulator	cueR	chr1	K
1236	1.32	1.09E-07	Lead, cadmium, zinc and mercury transporting ATPase (EC 3.6.3.3) (EC 3.6.3.5); Copper-translocating P-type ATPase (EC 3.6.3.4)	copA	chr1	P
1777	1.73	7.98E-11	Arsenic resistance protein ArsH	arsH	chr1	P
1778	2.10	1.07E-14	Arsenate reductase (EC 1.20.4.1) glutaredoxin-coupled, glutaredoxin-like family	arsC	chr1	C
1779	2.30	1.01E-34	Arsenical-resistance protein ACR3	arsB	chr1	P
1780	2.06	1.01E-34	Arsenate reductase (EC 1.20.4.4) thioredoxin-coupled, LMWP family	arsC2	chr1	T
1781	1.94	5.64E-31	Glyoxalase family protein	arsI	chr1	E
1782	2.00	8.51E-30	Arsenical resistance operon repressor	cadC	chr1	K
2063	1.07	1.38E-02	GDP-L-fucose synthetase (EC 1.1.1.271)	fcl	chr1	GM
2066	1.09	1.43E-02	hypothetical protein	-	chr1	-
2268	1.29	2.30E-08	hypothetical protein	-	chr1	K
2270	1.65	3.44E-06	Multicopper oxidase	copA	chr1	Q
2271	1.65	8.17E-08	Copper resistance protein B	copB	chr1	P
2272	1.35	5.14E-08	Copper resistance protein CopC	copC	chr1	S
2273	1.71	5.14E-08	Copper resistance protein CopD	copD	chr1	P
2274	1.48	2.38E-06	CopG protein	-	chr1	S
2275	1.68	3.07E-05	Putative carbamoylphosphate synthase large subunit, short form	-	chr1	S
2277	1.24	2.85E-02	hypothetical protein	-	chr1	-
2396	1.16	4.33E-02	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain H (EC 1.6.5.3)	nuoH	chr1	C
2398	1.17	2.88E-02	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain J (EC 1.6.5.3)	nuoJ	chr1	C
2399	1.56	1.99E-02	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain K (EC 1.6.5.3)	nuoK	chr1	C
2400	1.08	4.12E-02	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain L (EC 1.6.5.3)	nuoL	chr1	C
3150	1.28	9.95E-08	Coenzyme PQQ synthesis protein E	pqqE	chr1	S
3151	1.49	2.88E-07	Coenzyme PQQ synthesis protein D	pqqD	chr1	S
3152	1.33	1.39E-06	Pyroloquinoline-quinone synthase (EC 1.3.3.11)	pqqC	chr1	H
3153	1.18	8.13E-06	Coenzyme PQQ synthesis protein B	pqqB	chr1	S
3154	1.01	4.16E-02	Coenzyme PQQ synthesis protein A	-	chr1	S
6154	1.23	8.17E-08	Aldehyde dehydrogenase (EC 1.2.1.3)	aldA	chr2	C
6155	1.17	1.09E-07	Alcohol dehydrogenase (EC 1.1.1.1)	adhA	chr2	C
6156	1.24	4.11E-08	hypothetical protein	-	chr2	S
7311	1.44	3.92E-02	putative lipoprotein	-	chr2	S
7313	1.74	4.75E-03	Carbonic anhydrase, beta class (EC 4.2.1.1)	cynT	chr2	P
7314	1.49	1.34E-03	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase PpiD (EC 5.2.1.8)	ppiD	chr2	O
7315	1.57	2.02E-02	Respiratory nitrate reductase gamma chain (EC 1.7.99.4)	narI	chr2	C
7316	1.41	8.76E-03	Respiratory nitrate reductase delta chain (EC 1.7.99.4)	narJ	chr2	C
7317	1.53	4.38E-03	Respiratory nitrate reductase beta chain (EC 1.7.99.4)	narH	chr2	C

<sup>a</sup>Identificador del gen según la anotación del genoma de *Cupriavidus* sp. UYMMa02A en la base de datos Rast.

<sup>b</sup>Descripción obtenida de Rast. <sup>c</sup>Nombre consenso del gen según la base de datos *eggNOG-mapper*.

<sup>d</sup>Categorías COG: C- producción y conversión de energía; E- transporte y metabolismo de aminoácidos; H- metabolismo co-enzimático; I- metabolismo lipídico; K- transcripción; M- estructura y biogénesis de la envoltura celular y de la membrana externa; O- modificaciones post-traduccionales, proteínas chaperonas; P- transporte y metabolismo de iones inorgánicos; Q- estructuras secundarias; S- función desconocida; T- transducción de señales.

**Tabla S 4. Características generales de los genes traducidos diferencialmente.**

Se presentan los genes sub expresados o reprimidos en respuesta a la presencia de exudados radiculares de *M. pudica*.

Identificador <sup>a</sup>	Log Tasa de cambio	p-valor ajustado	Descripción <sup>b</sup>	Nombre consenso <sup>c</sup>	Cromosoma	Categoría <sup>d</sup> COG
<b>Genes sub expresados / reprimidos</b>						
1414	-1.41	2.67E-03	Glutathione S-transferase (EC 2.5.1.18)	attY	chr1	O
1415	-1.27	2.82E-06	Hydantoin racemase (EC 5.1.99.5)	-	chr1	E
2140	-1.19	1.15E-04	FIG110192: hypothetical protein	MA20_36195	chr1	S
2707	-1.02	6.21E-05	FIG045511: hypothetical antitoxin (to FIG022160: hypothetical toxin)	-	chr1	K
3443	-1.10	3.61E-06	Probable acyltransferase PA0834	yihG	chr1	I
3444	-1.04	3.23E-08	Glutathione S-transferase, omega (EC 2.5.1.18)	yqjG	chr1	O
4291	-1.07	4.43E-03	hypothetical protein	-	pSym	L
4292	-1.23	2.33E-06	Mobile element protein	-	pSym	L
4293	-1.05	8.16E-05	Mobile element protein	-	pSym	L
4294	-1.18	4.04E-08	hypothetical protein	-	pSym	-
4295	-1.32	9.31E-03	hypothetical protein	-	pSym	-
6064	-1.21	9.49E-04	HlyD-like membrane fusion protein Yhil	-	chr2	M
6867	-1.16	5.10E-05	AMP nucleosidase (EC 3.2.2.4)	amn	chr2	F
7238	-1.36	1.49E-03	Repair of Iron Centers di-iron protein	-	chr2	S
7239	-1.35	7.24E-07	Putative transmembrane protein	-	chr2	-
7242	-1.38	7.21E-06	Uncharacterized protease YhbU	yhbU	chr2	O
7243	-1.03	2.37E-05	Putative protease	yhbV	chr2	O
7578	-1.12	1.02E-03	Cysteine synthase (EC 2.5.1.47)	cysK	chr2	E

<sup>a</sup>Identificador del gen según la anotación del genoma de *Cupriavidus* sp. UYMMa02A en la base de datos Rast.

<sup>b</sup>Descripción obtenida de Rast. <sup>c</sup>Nombre consenso del gen según la base de *datos eggNOG-mapper*.

<sup>d</sup>Categorías COG: C- producción y conversión de energía; E- transporte y metabolismo de aminoácidos; F- metabolismo y transporte de nucleótidos; I- metabolismo lipídico; K- transcripción; L- replicación, recombinación y reparación, M- estructura y biogénesis de la envoltura celular y de la membrana externa; O- modificaciones post-traduccionales, proteínas chaperonas; S- función desconocida.

**Tabla S 5. Proteínas expresadas exclusivamente en presencia o ausencia de exudados radiculares.**

Identificador <sup>a</sup>	Nº de réplicas	Señal total	Descripción <sup>b</sup>	Nombre consenso <sup>c</sup>	Cromosoma	Categoría <sup>d</sup> COG
<b>Únicas en presencia de exudados</b>						
955	3	6	Twin-arginine translocation protein TatA	tatA	chr1	U
958	2	7	Phosphoribosyl-ATP pyrophosphatase (EC 3.6.1.31)	hisE	chr1	E
1665	3	12	FIG005902: hypothetical protein	yqiC	chr1	S
1890	3	6	DNA-binding protein Fis	fis	chr1	KL
3570	3	8	Ribosomal large subunit pseudouridine synthase D (EC 5.4.99.23)	rIuD	chr1	J
6737	3	6	SAM-dependent methyltransferase	-	chr2	Q
7688	3	9	Transcriptional regulator, GntR family	-	chr2	K
8041	3	6	hypothetical protein	-	chr2	S
<b>Únicas en condición control</b>						
22	3	11	D-alanine aminotransferase (EC 2.6.1.21)	dat	chr1	EH
66	3	9	LSU ribosomal protein L32p @ LSU ribosomal protein L32p, zinc-independent	rpmF	chr1	J
77	3	6	Molybdenum cofactor guanylyltransferase (EC 2.7.7.77)	mobA	chr1	H
136	3	11	Succinate dehydrogenase cytochrome b-556 subunit	sdhC	chr1	C
156	3	9	Riboflavin-specific deaminase	-	chr1	E
295	3	8	CAIB/BAIF family protein	caiB	chr1	C
342	3	15	Ribonucleotide reductase transcriptional regulator NrdR	nrdR	chr1	K
358	3	8	Valine--pyruvate aminotransferase (EC 2.6.1.66)	aspB	chr1	E
369	3	9	hypothetical protein	rfaJ	chr1	M
449	2	7	Iron-sulfur cluster-binding protein	qmoA	chr1	C

**Tabla S 5. Continuación.**

Identificador <sup>a</sup>	N° de réplicas	Señal total	Descripción <sup>b</sup>	Nombre consenso <sup>c</sup>	Cromosoma	Categoría <sup>d</sup> COG
<b>Únicas en condición control</b>						
465	3	9	Adenosylcobinamide kinase (EC 2.7.1.156) / Adenosylcobinamide-phosphate guanylyltransferase (EC 2.7.7.62)	cobU	chr1	H
546	2	7	Branched-chain amino acid transport ATP-binding protein LivF (TC 3.A.1.4.1)	livF	chr1	E
759	2	8	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase (EC 1.1.1.95)	-	chr1	EH
1003	3	8	"Orf21	MA20_31645	chr1	S
1110	3	12	Hemin transport protein HmuS	hmuS	chr1	P
1182	3	8	YpfJ protein, zinc metalloprotease superfamily	ypfJ	chr1	S
1306	3	9	Transcriptional regulator, AcrR family	acrR	chr1	K
1410	2	8	CBS domain protein	-	chr1	S
1483	2	8	Hydrolase, alpha/beta fold family	-	chr1	E
1499	3	9	ABC-type Fe3+-hydroxamate transport system, periplasmic component	fecB	chr1	P
1516	3	16	Adenosylmethionine-8-amino-7-oxononanoate aminotransferase (EC 2.6.1.62)	bioA	chr1	H
1517	3	26	Adenosylmethionine-8-amino-7-oxononanoate aminotransferase (EC 2.6.1.62)	bioA	chr1	H
1519	3	19	Dethiobiotin synthetase (EC 6.3.3.3)	bioD	chr1	H
1558	2	7	Zn-dependent protease with chaperone function PA4632	-	chr1	O
1576	2	10	Thiazole synthase (EC 2.8.1.10)	thiG	chr1	H
1593	2	8	SAM-dependent methyltransferase, MidA	-	chr1	S
1595	3	14	Dihydroneopterin aldolase (EC 4.1.2.25)	folB	chr1	H
1679	2	7	Molybdopterin-synthase adenyltransferase (EC 2.7.7.80)	moeB	chr1	H
1699	3	6	Hypothetical protein in cytochrome oxidase biogenesis cluster	VVA1110	chr1	S
1737	2	8	Lipopolysaccharide ABC transporter, ATP-binding protein LptB	lptB	chr1	S
1822	3	19	Aerobic carbon monoxide dehydrogenase (quinone), medium chain (EC 1.2.5.3)	coxM	chr1	C
1845	3	15	Molybdopterin-guanine dinucleotide biosynthesis protein MobB	mobB	chr1	H
1852	3	11	Enoyl-CoA hydratase (EC 4.2.1.17)	paaF_1	chr1	I
2092	2	12	Pyruvate carboxylase (EC 6.4.1.1)	pyc	chr1	C
2170	3	7	hypothetical protein	-	chr1	
2217	2	7	tRNA (guanine(37)-N(1))-methyltransferase (EC 2.1.1.228)	trmD	chr1	J
2229	3	12	23S rRNA (pseudouridine(1915)-N(3))-methyltransferase (EC 2.1.1.177)	rlmH	chr1	J
2306	3	19	SAM-dependent methyltransferase	pcm	chr1	O
2451	3	11	N-acetylglutamate synthase related protein	-	chr1	J
2453	3	11	Putative periplasmic cytochrome type-C oxidoreductase signal peptide protein (EC 1.-.-.-)	cytC2	chr1	C
2495	3	7	Chaperone protein HscB	hscB	chr1	O
2497	3	13	Ferredoxin, 2Fe-2S	fdx	chr1	C
2522	2	7	hypothetical protein	flgK	chr1	N
2553	3	15	ABC transporter, ATP-binding protein (cluster 10, nitrate/sulfonate/bicarbonate)	-	chr1	P
2680	3	8	Molybdopterin synthase catalytic subunit MoaE (EC 2.8.1.12)	moaE	chr1	H
2953	3	9	tmRNA-binding protein SmpB	smpB	chr1	J
3019	3	13	BUG/TctC family periplasmic protein	-	chr1	S
3135	3	9	RNA polymerase sigma factor RpoD	rpoD	chr1	K
3202	3	7	hypothetical protein	-	chr1	K
3453	3	14	Alkylhydroperoxidase AhpD domain protein	-	chr1	O
3736	3	12	FIG00031715: Predicted metal-dependent phosphoesterases (PHP family)	trpH	chr1	S
3739	3	9	Acetyl-CoA synthetase (EC 6.2.1.1)	bclA_2	chr1	I
3824	3	7	Ribonuclease HI (EC 3.1.26.4)	rnhA	chr1	L

**Tabla S 5. Continuación.**

Identificador <sup>a</sup>	N° de réplicas	Señal total	Descripción <sup>b</sup>	Nombre consenso <sup>c</sup>	Cromosoma	Categoría COG <sup>d</sup>
<b>Únicas en condición control</b>						
3846	3	12	D-alanine aminotransferase (EC 2.6.1.21); Additional IDs concatenated into MaxParsimony group: 22	dat	chr1	EH
5546	3	9	Vanillate O-demethylase oxygenase subunit (EC 1.14.13.82)	vanA	chr2	P
5609	3	9	MBL-fold metallo-hydrolase superfamily	MA20_39390	chr2	S
5637	3	9	Excinuclease ABC subunit A, dimeric form	uvrA2	chr2	L
5716	3	14	Mannose-6-phosphate isomerase (EC 5.3.1.8)	pmi	chr2	G
6098	3	12	5-dehydro-4-deoxyglucarate dehydratase (EC 4.2.1.41)	kdgD	chr2	EM
6416	2	9	PhnB protein	-	chr2	S
6547	3	11	Chemotaxis regulator - transmits chemoreceptor signals to flagellar motor components CheY	-	chr2	T
6768	3	20	Acyl dehydratase	maoC	chr2	I
6808	3	10	Enoyl-CoA hydratase	MA20_18780	chr2	I
7068	3	17	Non-heme chloroperoxidase	cpo	chr2	I
7531	3	18	L-threonine 3-dehydrogenase (EC 1.1.1.103)	tdh	chr2	M
7560	3	7	Transcriptional regulator, LysR family	-	chr2	K
7679	2	7	"structural elements	xpsR	chr2	K
7752	2	9	BUG/TctC family periplasmic protein	-	chr2	S
7814	2	11	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (EC 1.13.11.27)	lly	chr2	C
8023	2	7	Dihydroxy-acid dehydratase (EC 4.2.1.9)	ilvD4	chr2	EG
8134	3	10	Arylamine N-acetyltransferase (EC 2.3.1.5)	nhoA	chr2	Q

<sup>a</sup>Identificador del gen según la anotación del genoma de *Cupriavidus* sp. UYMMa02A en la base de datos Rast.

<sup>b</sup>Descripción obtenida de Rast. <sup>c</sup>Nombre consenso del gen según la base de *datos eggNOG-mapper*.

<sup>d</sup>Categorías COG: C- producción y conversión de energía; E- transporte y metabolismo de aminoácidos; G- transporte y metabolismo de carbohidratos; H- metabolismo co-enzimático; I- metabolismo lipídico; J- traducción; K- transcripción; L- replicación, recombinación y reparación, M- estructura y biogénesis de la envoltura celular y de la membrana externa; N- movilidad celular; O- modificaciones post-traduccionales, proteínas chaperonas; P- transporte y metabolismo de iones inorgánicos; Q- estructuras secundarias; S- función desconocida; T- transducción de señales.

**Tabla S 6. Proteínas de expresión diferencial en UYMMa02A expuesta a exudados radiculares.**

Identificador <sup>a</sup>	Tasa de cambio	p-valor	Descripción <sup>b</sup>	Nombre consenso <sup>c</sup>	Cromosoma	Categoría COG <sup>d</sup>
<b>Sobre expresadas en presencia de exudados</b>						
621	3,23	5,07E-03	Glyoxalase family protein	-	chr1	S
642	2,85	2,10E-02	hypothetical protein	-	chr1	S
1038	2,67	4,20E-02	LSU ribosomal protein L23p (L23Ae)	rplW	chr1	J
1039	2,21	2,24E-02	LSU ribosomal protein L4p (L1e)	rplD	chr1	J
1124	3,33	3,67E-02	Sulfite dehydrogenase cytochrome subunit SoxD	-	chr1	C
1884	2,43	4,47E-02	hypothetical protein	-	chr1	-
2175	2,08	1,72E-02	hypothetical protein	-	chr1	S
2215	2,53	1,64E-02	SSU ribosomal protein S16p	rpsP	chr1	J
2310	2,19	7,51E-04	Ligand-binding SRPBCC domain protein family	-	chr1	S
2538	2,85	2,04E-03	Thioredoxin	trxA	chr1	O
3565	2,34	1,31E-03	Acetyl-CoA acetyltransferase (EC 2.3.1.9)	phbA	chr1	I
3600	2,19	8,02E-03	ABC transporter, substrate-binding protein PA3836	-	chr1	S
3727	2,05	1,88E-02	FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase SlyD (EC 5.2.1.8)	slyD	chr1	G
6154	2,65	1,05E-02	Aldehyde dehydrogenase (EC 1.2.1.3)	aldA	chr2	C
<b>Sub expresadas/ reprimidas en presencia de exudados</b>						
46	2,75	1,47E-02	beta-N-acetylglucosaminidase (EC 3.2.1.52)	nagZ	chr1	G
60	2,10	4,01E-03	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase, KASII (EC 2.3.1.179)	fabF	chr1	I
413	2,28	2,66E-02	Glucose-1-phosphate thymidyltransferase (EC 2.7.7.24)	rfbA	chr1	H
415	2,51	1,25E-03	dTDP-glucose 4,6-dehydratase (EC 4.2.1.46)	rfbB	chr1	M
438	2,12	9,70E-03	Arginine decarboxylase (EC 4.1.1.19)	adiA	chr1	E

**Tabla S 6. Continuación**

Identificador <sup>a</sup>	Tasa de cambio	p-valor	Descripción <sup>b</sup>	Nombre consenso <sup>c</sup>	Cromosoma	Categoría <sup>d</sup> COG
<b>Sub expresadas/ reprimidas en presencia de exudados</b>						
557	2,01	3,63E-02	L-aspartate oxidase (EC 1.4.3.16)	nadB	chr1	H
692	2,53	8,30E-03	UDP-N-acetylmuramate:L-alanyl-gamma-D-glutamyl-meso-diaminopimelate ligase (EC 6.3.2.-)	murC	chr1	M
998	2,11	1,85E-02	Diaminopimelate decarboxylase (EC 4.1.1.20)	lysA	chr1	E
1197	2,24	4,88E-02	Transcriptional repressor of PutA and PutP / Proline dehydrogenase (EC 1.5.5.2) / Delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase (EC 1.2.1.88)	putA	chr1	C
1440	2,66	9,02E-03	Aspartyl-tRNA(Asn) amidotransferase subunit A (EC 6.3.5.6)	gatA	chr1	J
1520	3,60	8,51E-03	Glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase subunit A (EC 6.3.5.7)	bioB	chr1	H
1549	2,22	2,05E-03	Biotin synthase (EC 2.8.1.6)	argB	chr1	F
1590	2,66	8,87E-03	Acetylglutamate kinase (EC 2.7.2.8)	gst1	chr1	O
1594	3,75	1,56E-03	Glutathione S-transferase	-	chr1	IQ
1713	2,97	4,94E-03	FoIM Alternative dihydrofolate reductase 1	MA20_0565	chr1	S
2430	2,04	1,00E-03	FIG015547: peptidase, M16 family	5	chr1	O
2461	2,34	3,45E-02	Glutathione S-transferase (EC 2.5.1.18)	gstI	chr1	H
2532	2,69	2,31E-03	Glutamate-ammonia-ligase adenyltransferase (EC 2.7.7.42)	glnE	chr1	J
2789	2,28	8,50E-04	Glutamyl-tRNA synthetase (EC 6.1.1.17)	gltX	chr1	E
3664	2,02	8,40E-03	Oligopeptide transport substrate-binding protein @ Glutathione ABC transporter substrate-binding protein GsiB	gsiB	chr1	IQ
3673	4,21	2,32E-03	2-dehydro-3-deoxy-D-gluconate 5-dehydrogenase (EC 1.1.1.127) 2-deoxy-D-gluconate 3-dehydrogenase (EC 1.1.1.125)	-	chr1	E
3819	2,40	3,32E-02	O-acetylhomoserine sulfhydrylase (EC 2.5.1.49) / O-succinylhomoserine sulfhydrylase (EC 2.5.1.48)	cysD	chr1	I
4318	2,05	2,27E-03	Propionate--CoA ligase (EC 6.2.1.17)	prpE	chr1	L
6305	2,52	2,14E-02	Mobile element protein	insC	psym	CH
6584	2,09	1,23E-02	Putative n-hydroxybenzoate hydroxylase	-	chr2	Q
7041	2,14	4,46E-02	Dienelactone hydrolase family protein	clcD	chr2	E
7432	2,30	3,99E-02	Argininosuccinate synthase (EC 6.3.4.5)	argG	chr2	K
			Cold shock protein of CSP family	capB	chr2	

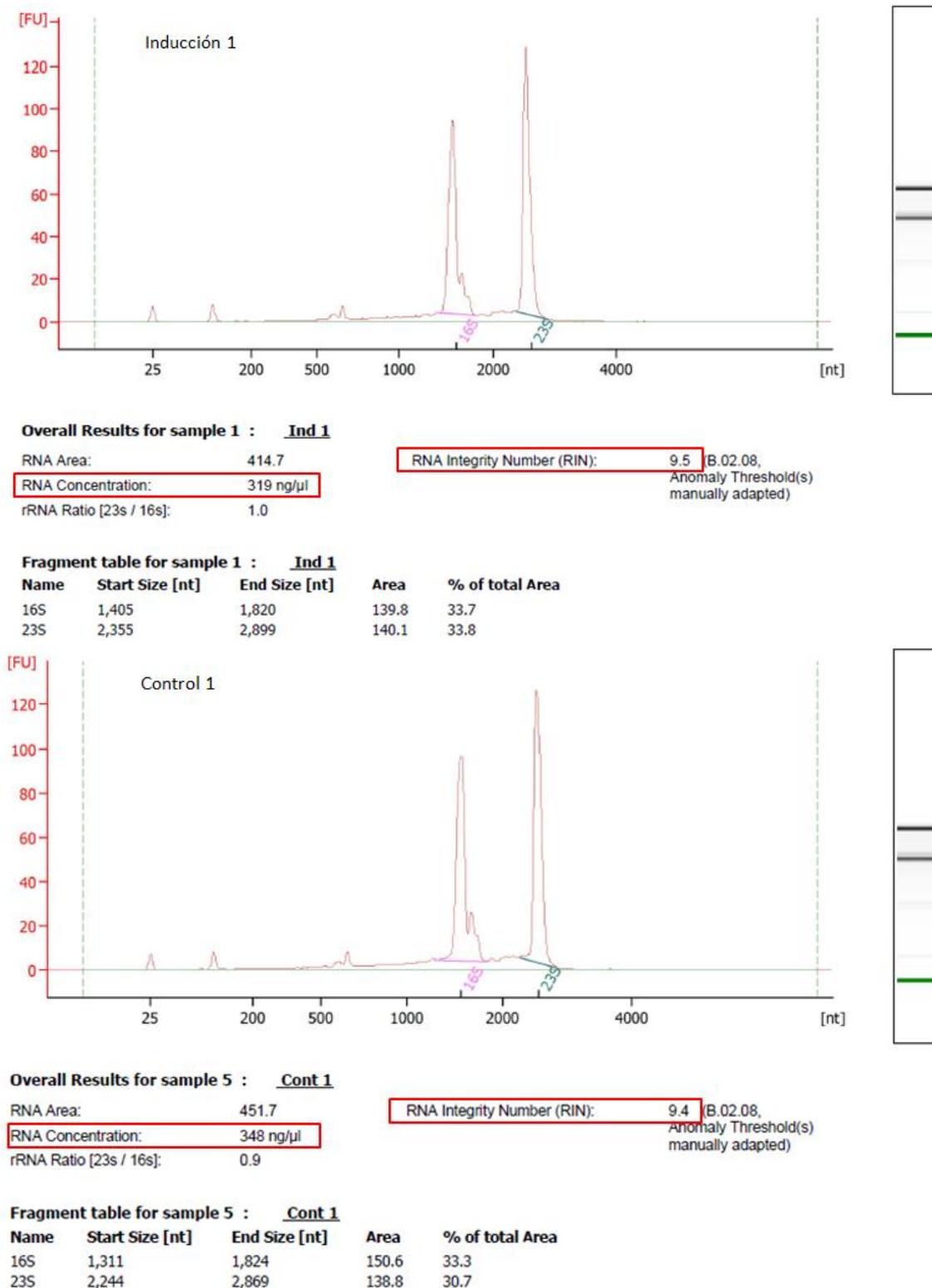
<sup>a</sup>Identificador del gen según la anotación del genoma de *Cupriavidus* sp. UYMMa02A en la base de datos Rast.

<sup>b</sup>Descripción obtenida de Rast. <sup>c</sup>Nombre consenso del gen según la base de datos *eggNOG-mapper*.

<sup>d</sup>Categorías COG: C- producción y conversión de energía; E- transporte y metabolismo de aminoácidos; G- transporte y metabolismo de carbohidratos; H- metabolismo co-enzimático; I- metabolismo lipídico; J- traducción; K- transcripción; L- replicación, recombinación y reparación, M- estructura y biogénesis de la envoltura celular y de la membrana externa; N- movilidad celular; O- modificaciones post-traduccionales, proteínas chaperonas; P- transporte y metabolismo de iones inorgánicos; Q- estructuras secundarias; S- función desconocida; T- transducción de señales.

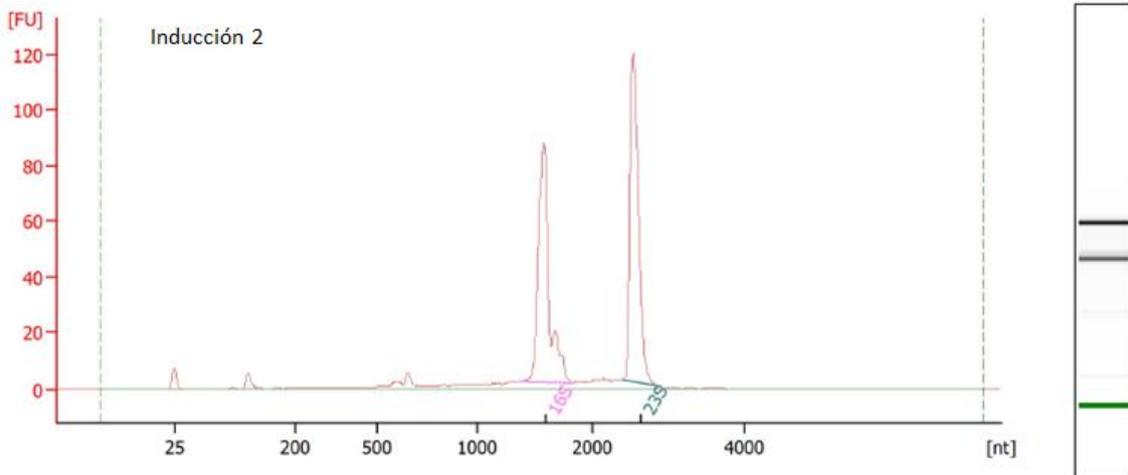
## 11.3 Figuras suplementarias

### 11.3.1 ARN total



**Figura S 1. ARN total aislado de Muestra 1**

Se muestran los electroferogramas obtenidos con el equipo *2100 Agilent Bioanalyzer* para el ARN total aislado a partir de la muestra 1 en las condiciones de inducción y control. Además se recuadra la concentración y calidad (el valor de RIN) de la misma.



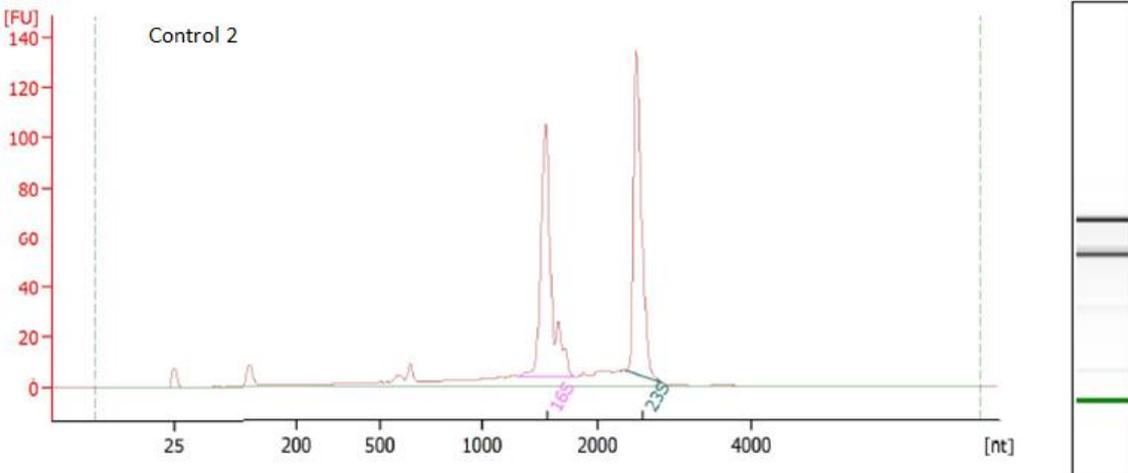
**Overall Results for sample 2 : Ind 2**

RNA Area: 374.1  
 RNA Concentration: 288 ng/µl  
 rRNA Ratio [23s / 16s]: 1.0

RNA Integrity Number (RIN): 9.8 (B.02.08, Anomaly Threshold(s) manually adapted)

**Fragment table for sample 2 : Ind 2**

Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
16S	1,362	1,821	132.9	35.5
23S	2,388	2,893	130.7	34.9



**Overall Results for sample 6 : Cont 2**

RNA Area: 479.9  
 RNA Concentration: 370 ng/µl  
 rRNA Ratio [23s / 16s]: 0.9

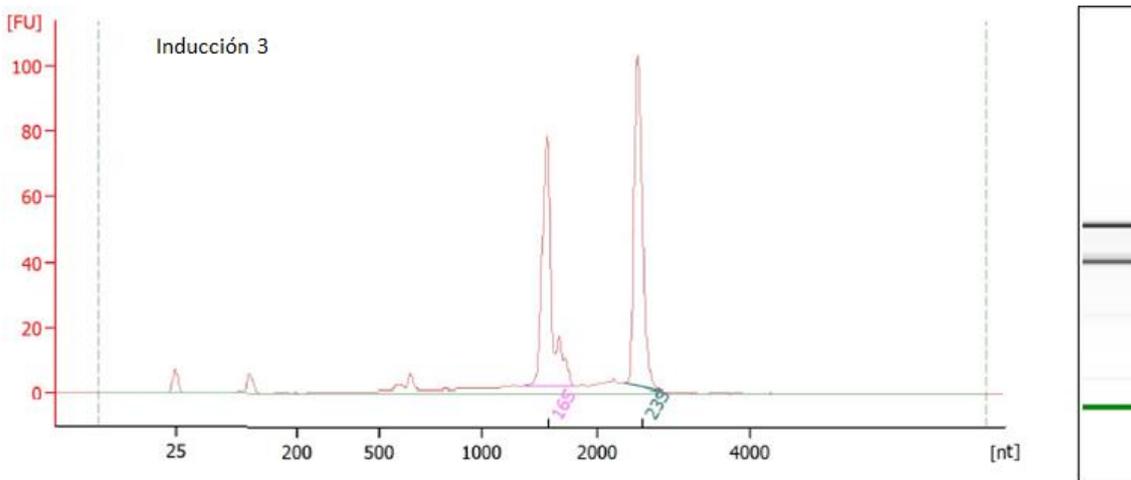
RNA Integrity Number (RIN): 9.3 (B.02.08, Anomaly Threshold(s) manually adapted)

**Fragment table for sample 6 : Cont 2**

Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
16S	1,316	1,816	158.2	33.0
23S	2,350	2,850	142.3	29.7

**Figura S 2. ARN total aislado de Muestra 2.**

Se muestran los electroferogramas obtenidos con el equipo 2100 Agilent Bioanalyzer para el ARN total aislado a partir de la muestra 2 en las condiciones de inducción y control. Además se recuadra la concentración y calidad (el valor de RIN) de la misma.



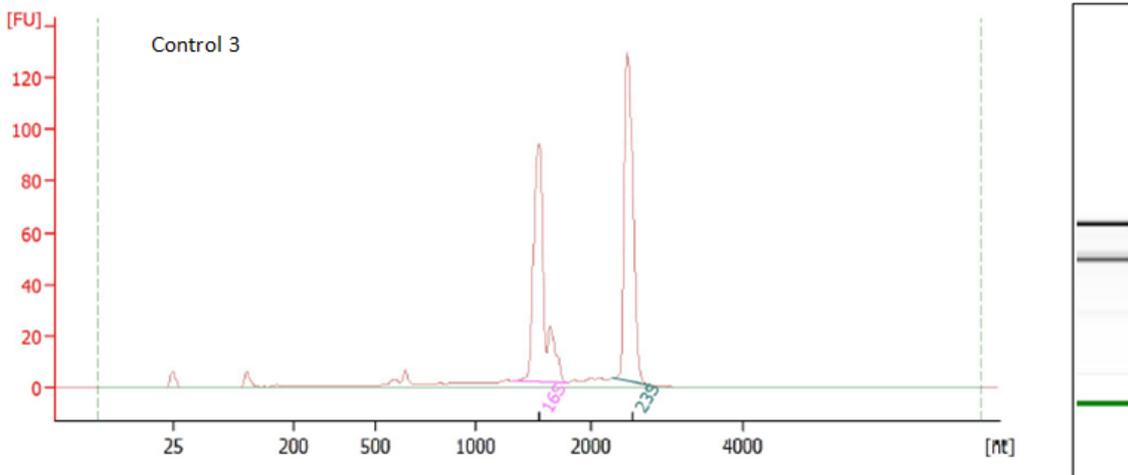
**Overall Results for sample 3 : Ind 3**

RNA Area: 317.6  
 RNA Concentration: 245 ng/ul  
 rRNA Ratio [23s / 16s]: 1.0

RNA Integrity Number (RIN): 9.8 (B.02.08,  
 Anomaly Threshold(s)  
 manually adapted)

**Fragment table for sample 3 : Ind 3**

Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
16S	1,357	1,814	112.8	35.5
23S	2,351	2,855	111.8	35.2



**Overall Results for sample 8 : Cont 4**

RNA Area: 396.9  
 RNA Concentration: 306 ng/ul  
 rRNA Ratio [23s / 16s]: 1.0

RNA Integrity Number (RIN): 9.8 (B.02.08,  
 Anomaly Threshold(s)  
 manually adapted)

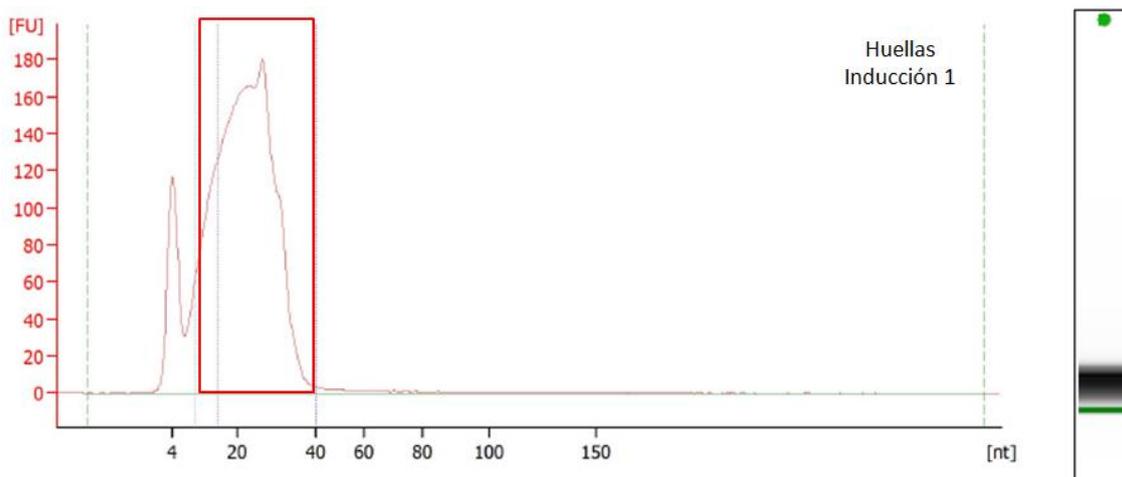
**Fragment table for sample 8 : Cont 4**

Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
16S	1,316	1,798	144.4	36.4
23S	2,282	2,811	142.2	35.8

**Figura S 3. ARN total aislado de Muestra 3.**

Se muestran los electroferogramas obtenidos con el equipo 2100 Agilent Bioanalyzer para el ARN total aislado a partir de la muestra 3 en las condiciones de inducción y control. Además se recuadra la concentración y calidad (el valor de RIN) de la misma.

### 11.3.2 Huellas ribosomales



**Overall Results for sample 3 : huella ind 1 1/10**

Small RNA Concentration [pg/μl]: 10,048.9

miRNA Concentration [pg/μl]: 9,689.5

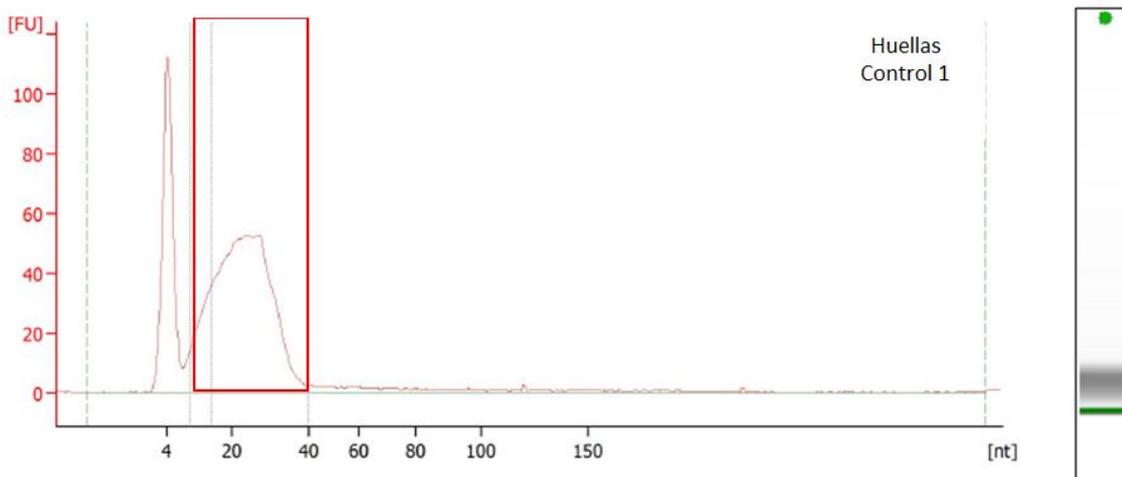
miRNA / Small RNA Ratio [%]: 96

Result Flagging Color:



Result Flagging Label:

96 % miRNA;  
Concentration:  
9689.50 pg/μl



**Overall Results for sample 7 : huella cont 1 1/10**

Small RNA Concentration [pg/μl]: 3,612.6

miRNA Concentration [pg/μl]: 3,308.5

miRNA / Small RNA Ratio [%]: 92

Result Flagging Color:

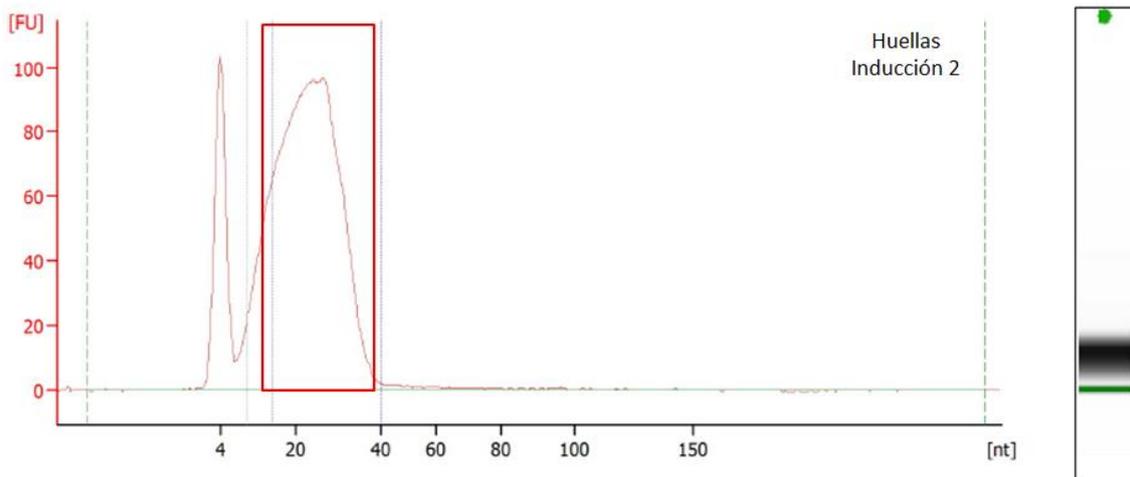


Result Flagging Label:

92 % miRNA;  
Concentration:  
3308.50 pg/μl

**Figura S 4. Huellas ribosomales aisladas de Muestra 1.**

Se muestran los electroferogramas obtenidos con el equipo 2100 Agilent Bioanalyzer para las huellas ribosomales aisladas a partir de la muestra 1 en las condiciones de inducción y control. Además se recuadra la región del gráfico que corresponde a las huellas y la concentración de las mismas.



**Overall Results for sample 2 : huella ind 2 1/10**

Small RNA Concentration [pg/μl]: 8,979.7

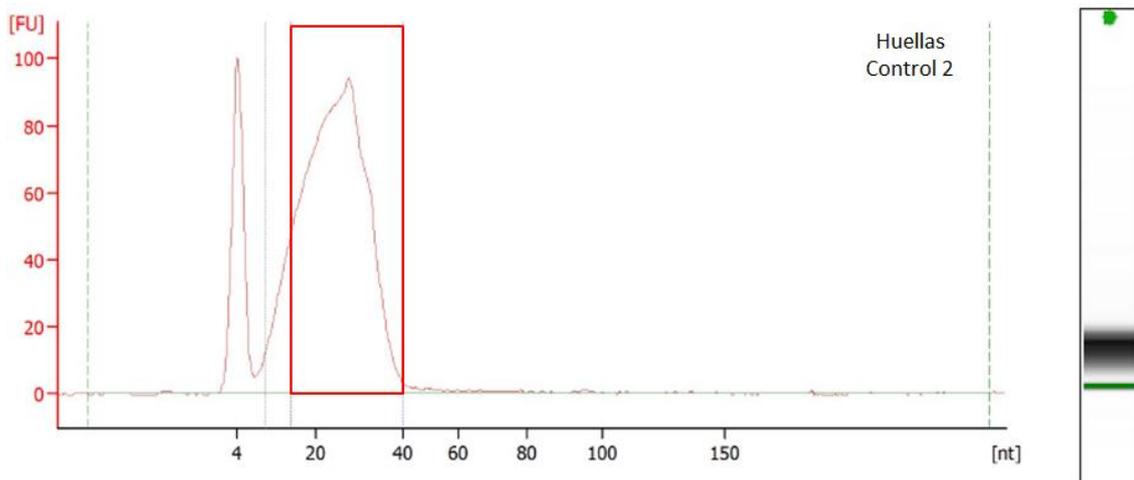
miRNA Concentration [pg/μl]: 8,842.1

miRNA / Small RNA Ratio [%]: 98

Result Flagging Color:  

Result Flagging Label:

98 % miRNA;  
Concentration:  
8842.10 pg/μl



**Overall Results for sample 4 : huella cont 2 1/10**

Small RNA Concentration [pg/μl]: 8,798.1

miRNA Concentration [pg/μl]: 8,651.8

miRNA / Small RNA Ratio [%]: 98

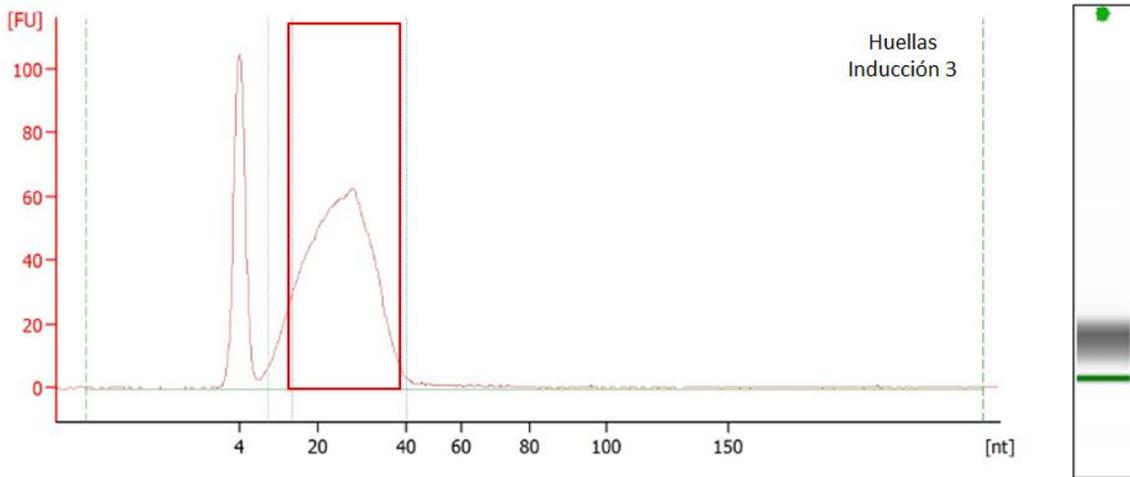
Result Flagging Color:  

Result Flagging Label:

98 % miRNA;  
Concentration:  
8651.80 pg/μl

**Figura S 5. Huellas ribosomales aisladas de Muestra 2.**

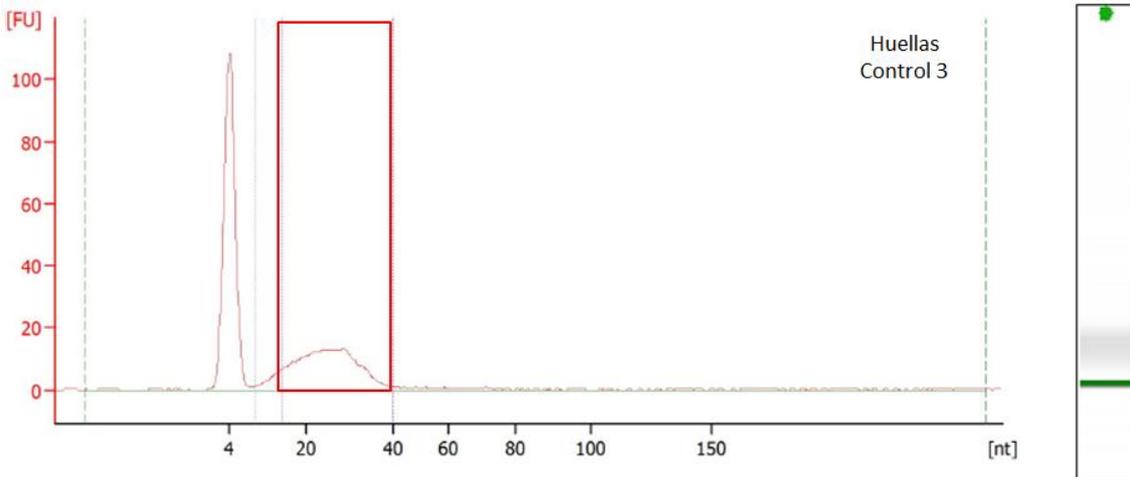
Se muestran los electroferogramas obtenidos con el equipo *2100 Agilent Bioanalyzer* para las huellas ribosomales aisladas a partir de la muestra 2 en las condiciones de inducción y control. Además se recuadra la región del gráfico que corresponde a las huellas y la concentración de las mismas.



**Overall Results for sample 6 : huella ind 3 1/10**

Small RNA Concentration [pg/μl]: 6,006.3  
 miRNA Concentration [pg/μl]: 5,895.8  
 miRNA / Small RNA Ratio [%]: 98

Result Flagging Color:    
 Result Flagging Label: 98 % miRNA;  
 Concentration: 5895.80 pg/μl



**Overall Results for sample 8 : huella cont 3 1/10**

Small RNA Concentration [pg/μl]: 1,228.4  
 miRNA Concentration [pg/μl]: 1,187.0  
 miRNA / Small RNA Ratio [%]: 97

Result Flagging Color:    
 Result Flagging Label: 97 % miRNA;  
 Concentration: 1187 pg/μl

**Figura S 6. Huellas ribosomales aisladas de Muestra 3.**

Se muestran los electroferogramas obtenidos con el equipo 2100 Agilent Bioanalyzer para las huellas ribosomales aisladas a partir de la muestra 3 en las condiciones de inducción y control. Además se recuadra la región del gráfico que corresponde a las huellas y la concentración de las mismas.

## 12 BIBLIOGRAFÍA

1. Food and Agriculture Organization of the United Nations. *The future of food and agriculture Trends and challenges*. (2017).
2. Crews, T. E. & Peoples, M. B. Legume versus fertilizer sources of nitrogen: Ecological tradeoffs and human needs. *Agric. Ecosyst. Environ.* **102**, 279–297 (2004).
3. Azcón-Bieto, J. & Talón, M. *Fundamentos de fisiología vegetal*. McGrawHill (2003). doi:10.1017/CBO9781107415324.004
4. Miller, A. J. & Cramer, M. D. *Root nitrogen acquisition and assimilation*. *Plant and Soil* **274**, (2005).
5. Buchanan, B. B., Gruissem, W. & Jones, R. L. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. (2015). doi:10.15713/ins.mmj.3
6. Raymond, J., Siefert, J. L., Staples, C. R. & Blankenship, R. E. The Natural History of Nitrogen Fixation. *Mol. Biol. Evol.* **21**, 541–554 (2004).
7. Lloret, L. & Martínez-Romero, E. Evolución y filogenia de Rhizobium. *Rev. Latinoam. Microbiol.* **47**, 43–60 (2005).
8. Hoffman, B. M., Lukyanov, D., Yang, Z. Y., Dean, D. R. & Seefeldt, L. C. Mechanism of nitrogen fixation by nitrogenase: The next stage. *Chem. Rev.* **114**, 4041–4062 (2014).
9. Peters, J. W., Fisher, K. & Dean, D. R. Nitrogenase structure and function: a biochemical-genetic perspective. *Annu. Rev. Microbiol.* **49**, 335–366 (1995).
10. Hoffman, B. M., Lukyanov, D., Dean, D. R. & Seefeldt, L. C. Nitrogenase: A draft mechanism. *Acc. Chem. Res.* **46**, 587–595 (2013).
11. Bruijn, F. J. De. Biological Nitrogen Fixation. in 215–224 (2015). doi:10.1007/978-3-319-08575-3
12. Rubio, L. M. & Ludden, P. W. Maturation of nitrogenase: A biochemical puzzle. *J. Bacteriol.* **187**, 405–414 (2005).
13. McRose, D. L., Zhang, X., Kraepiel, A. M. L. & Morel, F. M. M. Diversity and activity of alternative nitrogenases in sequenced genomes and coastal environments. *Front. Microbiol.* **8**, 1–13 (2017).
14. Sandes, L. Facultad de Ciencias - UdelaR Licenciatura en Bioquímica Análisis de Cupriavidus aislados de mimosas nativas de Uruguay Laura Sandes Bufano Tutora : Elena Fabiano Cotutor : Raúl Platero. (2015).
15. Franche, C., Lindström, K. & Elmerich, C. Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant Soil* **321**, 35–59 (2009).
16. Mckhann, H. *et al.* Does Rhizobium Avoid the Host Response ? What Makes the Rhizobia-Legume Symbiosis So Special ? 1. 1484–1492 (1994). doi:10.1104/pp.010866.1484
17. Hayat, R., Ali, S. & Amara, U. *Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion : a review*. (2010). doi:10.1007/s13213-010-0117-1
18. Dreyfus, B., Garcia, J. L. & Gills, M. Stem-Nodulating Nitrogen-Fixing Bacterium Isolated from Sesbania rostrata. **98**, 89–98 (1988).
19. Alazard, D. Stem and Root Nodulation in *Aeschynomene* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**, 732–734 (1985).
20. Angeles, L., Evolution, M., Evolu-, M. & Interactions, S. Insights into the history of the legume- betaproteobacterial symbiosis. 28–30 (2010).
21. Andrews, M. & Andrews, M. E. Specificity in Legume-Rhizobia Symbioses. *Int. J. Mol. Sci.* (2017). doi:10.3390/ijms18040705
22. Ormeño-Orillo, E. *et al.* Taxonomy of rhizobia and agrobacteria from the Rhizobiaceae family in light of genomics. **38**, 287–291 (2015).
23. Gonzalez, V. *et al.* Phylogenomic Rhizobium species are structured by a continuum of diversity and genomic clusters. *Front. Microbiol.* (2019). doi:10.3389/fmicb.2019.00910
24. Shamseldin, A., Abdelkhalek, A. & Sadowsky, M. J. *Recent changes to the classification of symbiotic , nitrogen-fixing , legume-associating bacteria : a*

- review. *Symbiosis* (Symbiosis, 2016). doi:10.1007/s13199-016-0462-3
25. Estrada, P. *et al.* *Trinickia dabaoshanensis* sp. nov., a new name for a lost species. *Arch. Microbiol.* 1–4 (2019). doi:10.1007/s00203-019-01703-2
  26. Chen, W. M. *et al.* *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 (2001).
  27. Vandamme, P. & Coenye, T. Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: A tale of lost and found. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**, 2285–2289 (2004).
  28. Moulin, L., Munive, A., Dreyfus, B. & Boivin-Masson, C. Nodulation of legumes by members of the beta-subclass of Proteobacteria (vol 411, pg 948, 2001). *Nature* **412**, 926-U17 (2001).
  29. Vandamme, P., Goris, J. & Chen, W-M., de Vos, P., and Willems, A. *Burkholderia tuberum* sp. nov. and *Burkholderia phymatum* sp. nov., nodulate the roots of tropical legumes. *Syst Appl Microbiol* **25**, 507–12 (2002).
  30. Sawana, A., Adeolu, M., Gupta, R. S., Nierman, W. C. & Craig, J. 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. **5**, 1–22 (2014).
  31. Klonowska, A., Melkonian, R., Miché, L., Tisseyre, P. & Moulin, L. 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 t. *BMC Genomics* **19**, 1–22 (2018).
  32. Hirsch, A. M., Lum, M. R., Downie, J. A., Fred, E. W. & Baldwin, I. L. What Makes the Rhizobia-Legume Symbiosis So Special? **1**. **127**, 1484–1492 (2001).
  33. Moulin, L. & Gilles, B. Phylogenetic analyses of symbiotic nodulation genes support vertical and lateral gene co-transfer within the *Bradyrhizobium* genus. **30**, 720–732 (2004).
  34. Bontemps, C., Elliott, G. N. & Simon, M. F. *Burkholderia* species are ancient symbionts of legumes. 44–52 (2010). doi:10.1111/j.1365-294X.2009.04458.x
  35. Amadou, C. *et al.* comparative genomics of rhizobia Genome sequence of the *-rhizobium Cupriavidus taiwanensis* and comparative genomics of rhizobia. 1472–1483 (2008). doi:10.1101/gr.076448.108
  36. Velazquez, E., R. Silva, L. & Peix, A. Legumes: A Healthy and Ecological Source of Flavonoids. *Curr. Nutr. Food Sci.* **6**, 109–144 (2010).
  37. Legume, T. *et al.* A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny. **66**, 44–77 (2017).
  38. Peix, A., Ramírez-Bahena, M. H., Velázquez, E. & Bedmar, E. J. Bacterial Associations with Legumes. *CRC. Crit. Rev. Plant Sci.* **34**, 17–42 (2015).
  39. Izaguirre, P. & Beyhaut, R. *Las leguminosas en Uruguay y regiones vecinas. Parte 1: Papilionoideae.* (2003).
  40. Rubiales, D. & Mikic, A. Legumes in Sustainable Agriculture. *CRC. Crit. Rev. Plant Sci.* **34**, 2–3 (2015).
  41. Rees, D. C. *et al.* Structural basis of biological nitrogen fixation. *Philos. Trans. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.* **363**, 971–984 (2005).
  42. Mercedes Fernandez, P. Fijacion Biológica de nitrógeno: Factores limitantes. *Cienc. y Medio Ambient.* 2002 (2002).
  43. Sprent, J. I., Ardley, J. K. & James, E. K. South African Journal of Botany From North to South : A latitudinal look at legume nodulation processes ☆. *South African J. Bot.* **89**, 31–41 (2013).
  44. Simon, M. F. *et al.* THE EVOLUTIONARY HISTORY OF MIMOSA (LEGUMINOSAE): **98**, 1201–1221 (2011).
  45. Platero, R. *et al.* Novel *Cupriavidus* strains isolated from root nodules of native Uruguayan *Mimosa* species. *Appl. Environ. Microbiol.* **82**, 3150–3164 (2016).

46. Bueno dos Reis, F. *et al.* Nodulation and nitrogen fixation by *Mimosa* spp. in the Cerrado and Caatinga biomes of Brazil. *New Phytol.* **186**, 934–946 (2010).
47. Bontemps, C. *et al.* Endemic *Mimosa* species from Mexico prefer alphaproteobacterial rhizobial symbionts. *New Phytol.* **209**, 319–333 (2016).
48. Eastman, I. Efecto del tipo de suelo en la seleccion de rizobios simbiotes por *Mimosa* spp. del Uruguay. (Facultad de Ciencias, UdeLaR, 2020).
49. Oldroyd, G. E. D. Speak , friend , and enter : signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nat. Publ. Gr.* **11**, 252–263 (2013).
50. Badri, D. V, Weir, T. L., Lelie, D. Van Der & Vivanco, J. M. Rhizosphere chemical dialogues : plant – microbe interactions. 642–650 (2009). doi:10.1016/j.copbio.2009.09.014
51. Lodeiro, A. R., López García, S., Mongiardini, E., Quelas, J. I. & Petricari, A. *Los rizobios y la inoculación de las leguminosas para la fijación simbiótica de nitrógeno.* (2003).
52. Taiz, L. & Zeiger, E. *Plant Physiology.* (2010).
53. Flavonoids : Their Structure , Biosynthesis and Role in the Rhizosphere , Including Allelopathy. 283–297 (2013). doi:10.1007/s10886-013-0248-5
54. Gage, D. J. Infection and Invasion of Roots by Symbiotic, Nitrogen-Fixing Rhizobia during Nodulation of Temperate Legumes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**, 280–300 (2004).
55. Jeandet, P. Phytoalexins: Current Progress and Future Prospects. *Molecules* **5**, 2770–4 (2015).
56. Walker, L., Lagunas, B., Gifford, M. L., Gerardo, N. M. & Gifford, M. L. Determinants of Host Range Specificity in Legume-Rhizobia Symbiosis. **11**, 1–13 (2020).
57. Downie, J. A. The roles of extracellular proteins, polysaccharides and signals in the interactions of rhizobia with legume roots. **34**, 150–170 (2010).
58. Brencic, A., Winans, S. C. & Colonization, P. Detection of and Response to Signals Involved in Host-Microbe Interactions by Plant-Associated Bacteria. **69**, 155–194 (2005).
59. Cesco, S., Mimmo, T., Tonon, G. & Tomasi, N. Plant-borne flavonoids released into the rhizosphere : impact on soil bio-activities related to plant nutrition . A review. 123–149 (2012). doi:10.1007/s00374-011-0653-2
60. Giraud, E. *et al.* Legumes Symbioses : Absence of Nod Genes in Photosynthetic Bradyrhizobia. **316**, 1307–1312 (2007).
61. Gonzalez-Rizzo, S., Crespi, M. & Frugier, F. The *Medicago truncatula* CRE1 cytokinin receptor regulates lateral root development and early symbiotic interaction with *Sinorhizobium meliloti*. *Plant Cell* **10**, 2680–93 (2006).
62. Okazaki, S. *et al.* Rhizobium – legume symbiosis in the absence of Nod factors : two possible scenarios with or without the T3SS. 64–74 (2016). doi:10.1038/ismej.2015.103
63. Ru, E. & Rodr, D. N. Attachment of bacteria to the roots of higher plants . (2007). doi:10.1111/j.1574-6968.2007.00761.x
64. Rinaudi, L. V & Giordano, W. An integrated view of bio  $\zeta$  lm formation in rhizobia. (2009). doi:10.1111/j.1574-6968.2009.01840.x
65. Jones, K. M., Kobayashi, H., Davies, B. W., Taga, M. E. & Graham, C. How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium-Medicago* model. *October* **5**, 619–633 (2009).
66. Ludwig, E. & Poole, P. Metabolism of Rhizobium bacteroids. *CRC. Crit. Rev. Plant Sci.* **22**, 37–78 (2003).
67. White, J., Prell, J., James, E. K. & Poole, P. Nutrient Sharing between Symbionts. *Plant Physiol.* **144**, 604–614 (2007).
68. Nagalakshmi, U., Waern, K. & Snyder, M. RNA-Seq : A Method for Comprehensive Transcriptome Analysis. 1–13 (2010). doi:10.1002/0471142727.mb0411s89
69. Wang, Z., Gerstein, M. & Snyder, M. RNA-Seq : a revolutionary tool for transcriptomics. **10**, 57–63 (2010).

70. Lowe, R., Shirley, N., Bleackley, M., Dolan, S. & Shafee, T. Transcriptomics technologies. 1–23 (2017).
71. Ingolia, N. T. Ribosome profiling: new views of translation, from single codons to genome scale. *Nat. Publ. Gr.* 1–9 (2014). doi:10.1038/nrg3645
72. Ingolia, N. T., Ghaemmaghami, S., Newman, J. R. S. & Weissman, J. S. Genome-Wide Analysis in Vivo of Translation with Nucleotide Resolution Using Ribosome Profiling. **324**, 218–223 (2009).
73. Mohammad, F., Green, R. & Buskirk, A. R. A systematically-revised ribosome profiling method for bacteria reveals pauses at single-codon resolution. 1–25 (2019).
74. Buskirk, A. R., Green, R. & Green, R. Ribosome pausing , arrest and rescue in bacteria and eukaryotes. (2017).
75. Mohammad, F., Woolstenhulme, C. J., Green, R. & Buskirk, A. R. Clarifying the translational pausing landscape in bacteria by ribosome profiling. **14**, 686–694 (2016).
76. Eastman, G., Smircich, P. & Sotelo-silveira, J. R. Following Ribosome Footprints to Understand Translation at a Genome Wide Level. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **16**, 167–176 (2018).
77. Li, G., Oh, E. & Weissman, J. S. The anti-Shine-Dalgarno sequence drives translational pausing and codon choice in bacteria. *Nature* **484**, 538–541 (2012).
78. Guo M, Feng H, Zhang J, Wang W, Wang Y, Li Y, Gao C, Chen H, Feng Y, H. Z. Dissecting transcription regulatory pathways through a new bacterial one-hybrid reporter system. *Genome Res.* **19**, 1301–8 (2009).
79. Ingolia NT, Lareau LF, W. J. Ribosome profiling of mouse embryonic stem cells reveals the complexity and dynamics of mammalian proteomes. *Cell* **147**, 789–802 (2011).
80. Juan-José Vasquez , Chung-Chau Hon, Jens T Vanselow, Andreas Schlosser, T. N. S. Comparative ribosome profiling reveals extensive translational complexity in different Trypanosoma brucei life cycle stages. *Nucleic Acids Res.* **42**, 3623–37 (2014).
81. Stern-Ginossar N, Weisburd B, Michalski A, Le VT, Hein MY, Huang SX, Ma M, Shen B, Qian SB, Hengel H, Mann M, Ingolia NT, W. J. Decoding human cytomegalovirus. *Science (80- )*. **23**, 1088–93 (2012).
82. Carvalho, P. C., Fischer, J. S. G., Chen, E. I., Iii, J. R. Y. & Barbosa, V. C. PatternLab for proteomics : a tool for differential shotgun proteomics. **14**, 1–14 (2008).
83. Carvalho, P. C. *et al.* shotgun proteomic data. **11**, 102–117 (2017).
84. Fabiano, E. & Arias, A. Identification of inoculant strains and naturalized populations of Rhizobium leguminosarum bv trifolii using complementary methodologies. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **6**, 121–126 (1990).
85. Monza, J., Fabiano, E. & Arias, A. Characterization of an indigenous population of rhizobia nodulating Lotus corniculatus. *Soil Biol. Biochem.* **24**, 241–247 (1992).
86. Amarelle, V. *et al.* A new small regulatory protein, HmuP, modulates haemin acquisition in Sinorhizobium meliloti. *Microbiology* **156**, 1873–1882 (2010).
87. Rosconi, F. *et al.* Identification and structural characterization of serobactins, a suite of lipopeptide siderophores produced by the grass endophyte Herbaspirillum seropedicae. *Environ. Microbiol.* **15**, 916–927 (2013).
88. Platero, R., De Lorenzo, V., Garat, B. & Fabiano, E. Sinorhizobium meliloti fur-like (Mur) protein binds a fur box-like sequence present in the mntA promoter in a manganese-responsive manner. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 4832–4838 (2007).
89. Taulé, C. *et al.* 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 (2012).
90. Mareque, C., Taulé, C., Beracochea, M. & Battistoni, F. Isolation, characterization and plant growth promotion effects of putative bacterial

- endophytes associated with sweet sorghum (*Sorghum bicolor* (L) Moench). *Ann. Microbiol.* **65**, 1057–1067 (2015).
91. Krause, A., Bischoff, B., Miché, L., Battistoni, F. & Reinhold-Hurek, B. Exploring the Function of Alcohol Dehydrogenases During the Endophytic Life of *Azoarcus* Sp. Strain BH72. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **24**, 1325–1332 (2011).
  92. Taulé, C. *et al.* New betaproteobacterial *Rhizobium* strains able to efficiently nodulate *Parapiptadenia rigida* (Benth.) Brenan. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 1692–1700 (2012).
  93. Pereira-Gómez, M. R. *et al.* Native legumes of the Farrapos protected area in Uruguay establish selective associations with rhizobia in their natural habitat. *Soil Biol. Biochem.* **148**, (2020).
  94. Garabato, F. Descripción de nuevos rizobios asociados a leguminosas nativas. (Facultad de Ciencias, UdeLaR, 2018).
  95. Garabato, F. *et al.* Especies nativas de Mimosa (Leguminosae) como reservorio de nuevos rizobios con posibles aplicaciones ambientales. (2019).
  96. Iriarte, A. *et al.* Insight into the evolution of symbiosis in the *Cupriavidus* genus. (2016).
  97. Sandes, L. Bases moleculares de la interacción *Cupriavidus* –Mimosa: una aproximación proteómica. (Facultad de Ciencias, UdeLaR, 2020).
  98. Iriarte, A., Platero, R., Romero, V., Fabiano, E. & Sotelo-silveira, J. R. Draft Genome Sequence of *Cupriavidus* UYMMa02A , a Novel Beta-Rhizobium Species. **4**, 4–5 (2016).
  99. Croci, C. Dinámica de la expresión de los genes nod de rizobios pertenecientes al género *Cupriavidus*. (Facultad de Ciencias, UdeLaR, 2020).
  100. Marchetti, M. *et al.* Experimental Evolution of a Plant Pathogen into a Legume Symbiont. **8**, (2010).
  101. Cunnac, S., Boucher, C. & Genin, S. Characterization of the cis-Acting Regulatory Element Controlling HrpB-Mediated Activation of the Type III Secretion System and Effector Genes in *Ralstonia solanacearum*. *J. Bacteriol.* **186**, 2309–2318 (2004).
  102. Miller, J. H. Experiments in Molecular Genetics. *Cold Spring Harb. Lab. Press. Cold Spring Harb. NY.* (1972).
  103. Ingolia, N. T., Brar, G., Rouskin, S., McGeachy, A. & Weissman, J. The ribosome profiling strategy for monitoring translation in vivo by deep sequencing of ribosome-protected mRNA fragments. *Nat. Methods* **26**, 1534–50 (2012).
  104. Latif, H. *et al.* A streamlined ribosome profiling protocol for the characterization of microorganisms. 1–13 (2015). doi:10.2144/000114302
  105. Andrews, S. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. (2014).
  106. Langmead, B. & Salzberg, S. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat. Methods* **9**, 357–9 (2012).
  107. Liao, Y., Smyth, G. & Shi, W. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics* **30**, 923–30 (2014).
  108. Robinson, M., McCarthy, D. & Smyth, G. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* **26**, 139–40 (2010).
  109. Martin, M. Cutadapt Removes Adapter Sequences From High-Throughput Sequencing Reads. (2011). doi:https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200
  110. Xiao, Z., Zou, Q., Liu, Y. & Yang, X. Genome-wide assessment of differential translations with ribosome profiling data. *Nat commun* **7**, 11194 (2016).
  111. Carvalho, P. *et al.* PatternLab for proteomics 4.0: A one-stop shop for analyzing shotgun proteomic data. *Nat Protoc* **11**, 102–17 (2016).
  112. Altschul, S., Gish, W., Miller, W., Myers, E. & Lipman, D. Basic local alignment search tool. *Mol. Biol.* **October 5**, 403–10 (1990).
  113. Huerta-cepas, J. *et al.* eggNOG 5 . 0 : a hierarchical , functionally and phylogenetically annotated orthology resource based on 5090 organisms and

- 2502 viruses. **47**, 309–314 (2019).
114. Fisher, R. *Statistical methods for research workers*. (1934).
  115. Klonowska, A., Melkonian, R., Miché, L., Tisseyre, P. & Moulin, L. 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 evolutionary history. 1–22 (2018). doi:10.1186/s12864-018-4487-2
  116. Eastman, G. Análisis del efecto traduccional de PDCD4 en células neuronales mediante secuenciación masiva de huellas polisomales. (Facultad de Ciencias, UdeLaR, 2016).
  117. Ingolia, N. T. *et al.* Supporting material for : Genome-wide in vivo analysis of translation with sub-codon resolution by ribosome profiling. (2009). doi:10.1126/science.1168978
  118. Amadou, C. *et al.* Genome sequence of the  $\beta$ -rhizobium Cupriavidus taiwanensis and comparative genomics of rhizobia. 1472–1483 (2008). doi:10.1101/gr.076448.108.7
  119. Saad, M. ., Crèvecoeur, M., Masson-Boivin, C. & Perret, X. The type 3 protein secretion system of Cupriavidus taiwanensis strain LMG19424 compromises 117 symbiosis with Leucaena leucocephala. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 7476–7479 (2012).
  120. Chen, W., Prell, J., James, E. K., Sheu, D. & Sheu, S. Biosynthesis of branched-chain amino acids is essential for effective symbioses between betarhizobia and Mimosa pudica. 1758–1766 (2012). doi:10.1099/mic.0.058370-0
  121. De Meyer, S. E. *et al.* High-quality permanent draft genome sequence of the parapiptadenia rigida-nodulating cupriavidus sp. Strain UYPR2.512. *Stand. Genomic Sci.* **10**, 1–8 (2015).
  122. Clerissi, C. *et al.* Parallels between experimental and natural evolution of legume symbionts. *Nat commun* **9**, (2018).
  123. Wu, C. C. & Maccoss, M. J. Shotgun proteomics : Tools for the analysis of complex biological systems. 242–250 (2002).
  124. Crick, F. Central Dogma of Molecular Biology. *Nature* **227**, 561–563 (1970).
  125. Cobb, M. 60 years ago, Francis Crick changed the logic of biology. *PLoS Biol* **15**, (2017).
  126. Ingolia, N. T. *Genome-Wide Translational Profiling by Ribosome Footprinting. Guide to Yeast Genetics: Functional Genomics, Proteomics, and Other Systems Analysis* **470**, (Elsevier Inc., 2010).
  127. Geciova, J., Bury, D. & Jelen, P. Methods for disruption of microbial cells for potential use in the dairy industry F a review. **12**, 541–553 (2002).
  128. Islam, M. S., Aryasomayajula, A. & Selvaganapathy, P. R. A Review on Macroscale and Microscale Cell Lysis Methods. (2017). doi:10.3390/mi8030083
  129. Rodríguez-Espéron, M. C. *et al.* Genomics and transcriptomics insights into luteolin effects on the beta-rhizobial strain Cupriavidus necator. *Environ. Microbiol.* **00**, (2021).
  130. Rogiers, T. *et al.* Cupriavidus metallidurans NA4 actively forms polyhydroxybutyrate-associated uranium-phosphate precipitates. *J. Hazard. Mater.* **421**, 126737 (2022).
  131. Huang, N. Responses to copper stress in the metal - resistant bacterium Cupriavidus gilardii CR3 : a whole - transcriptome analysis. 446–457 (2019). doi:10.1002/jobm.201800693
  132. Lardi, M. & Pessi, G. Functional Genomics Approaches to Studying Symbioses between Legumes and Nitrogen-Fixing Rhizobia. *High Throughput* **7**, (2018).
  133. Haichar, Z., Santaella, C. & Heulin, T. Root exudates mediated interactions belowground Soil Biology & Biochemistry Root exudates mediated interactions belowground. *Soil Biol. Biochem.* **77**, 69–80 (2014).
  134. Feng, H. *et al.* Chemotaxis of Beneficial Rhizobacteria to Root Exudates : The

- First Step towards Root – Microbe Rhizosphere Interactions. *Int. J. Mol. Sci.* (2021).
135. Masson- Boivin, C., Giraud, E., Perret, X. & Batut, J. Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes? *Trends Microbiol.* **Oct;17**, 458–66 (2009).
  136. Perret, X., Staehelin, C. & Broughton, W. J. Molecular Basis of Symbiotic Promiscuity. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**, 180–201 (2000).
  137. Lykidis, A. *et al.* The complete multipartite genome sequence of *Cupriavidus necator* JMP134, a versatile pollutant degrader. *PLoS One* **5**, e9729 (2010).
  138. Patrick S. G. Chain, Vincent J. Deneff, Konstantinos T. Konstantinidis, Lisa M. Vergez, Loreine Agulló, Valeria Latorre Reyes, Loren Hauser, Macarena Córdova, Luis Gómez, Myriam González, Miriam Land, Victoria Lao, Frank Larimer, John J. LiPuma, Eshwar Mah, J. M. T. Burkholderia xenovorans LB400 harbors a multi-replicon, 9.73-Mbp genome shaped for versatility. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 15280–15287 (2006).
  139. diCenzo GC, Zamani M, Checucci A, Fondi M, Griffiths JS, Finan TM, M. A. Multidisciplinary approaches for studying rhizobium-legume symbioses. *Can. J. Microbiol.* **65**, 1–33 (2019).
  140. Lu, J., Brigham, C. J., Plassmeier, J. K. & Sinskey, A. J. Characterization and modification of enzymes in the 2-ketoisovalerate biosynthesis pathway of *Ralstonia eutropha* H16. 761–774 (2015). doi:10.1007/s00253-014-5965-3
  141. Prell, J. *et al.* Legumes regulate *Rhizobium* bacteroid development and persistence by the supply of branched-chain amino acids. **106**, 12477–12482 (2009).
  142. Kumar, S. *et al.* Role of Symbiotic Auxotrophy in the *Rhizobium*-Legume Symbioses. **5**, (2010).
  143. Consortium, T. U. UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res.* **45**, D158–D169 (2017).
  144. Dunn, M. F. Key roles of microsymbiont amino acid metabolism in rhizobia-legume interactions. **7828**, 1–41 (2014).
  145. Yamamoto, K. & Ishihama, A. Transcriptional response of *Escherichia coli* to external copper. **56**, 215–227 (2005).
  146. Huang, N., Mao, J., Zhao, Y., Hu, M. & Wang, X. Multiple Transcriptional Mechanisms Collectively Mediate Copper Resistance in *Cupriavidus gilardii* CR3. *Environ. Sci. Technol.* **53**, 4609–4618 (2019).
  147. Cooksey, D. A. Molecular mechanisms of copper resistance and accumulation in bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* **14**, 381–386 (1994).
  148. Corbett, D. *et al.* The combined actions of the copper-responsive repressor CsoR and copper-metallochaperone CopZ modulate CopA-mediated copper efflux in the intracellular pathogen *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* **81**, 457–72 (2011).
  149. Klonowska, A. *et al.* Novel heavy metal resistance gene clusters are present in the genome of *Cupriavidus neocaledonicus* STM 6070 , a new species of *Mimosa pudica* microsymbiont isolated from heavy-metal-rich mining site soil. 1–18 (2020).
  150. Zhang, Y.-B. *et al.* ArsR arsenic-resistance regulatory protein from *Cupriavidus metallidurans* CH34. **34**, 161–170 (2009).
  151. Fekih, I. Ben, Zhang, C., Li, Y. P. & Zhao, Y. Distribution of Arsenic Resistance Genes in Prokaryotes. **9**, 1–11 (2018).
  152. Godoy, P., Molina-henares, A. J., Torre, J. De, Duque, E. & Ramos, J. L. Characterization of the RND family of multidrug efflux pumps : in silico to in vivo confirmation of four. **3**, 691–700 (2010).
  153. Kim, E., Nies, D. H., Mcevoy, M. M. & Rensing, C. Switch or Funnel : How RND-Type Transport Systems Control Periplasmic Metal Homeostasis □ . **193**, 2381–2387 (2011).
  154. Alvarez-Ortega, C., Olivares, J. & Martinez, J. L. RND multidrug efflux pumps: what are they good for? *Front. Microbiol.* **4**, (2013).

155. Blanco, P. *et al.* Bacterial Multidrug Efflux Pumps : Much More Than Antibiotic Resistance Determinants. 1–19 (2016). doi:10.3390/microorganisms4010014
156. Kertesz, M. A. Bacterial transporters for sulfate and organosulfur compounds. *Res. Microbiol.* **152**, 279–290 (2001).
157. Berrisford, J. M., Baradaran, R. & Sazanov, L. Structure of bacterial respiratory complex I. *Biochim Biophys Acta.* **1857**, 892–901 (2016).
158. Jonscher, K. R., Chohanadisai, W. & Rucker, R. B. Pyrroloquinoline-Quinone Is More Than an Antioxidant : A Vitamin-like Accessory Factor Important in Health and Disease Prevention. (2021).
159. Toyama, H., Mathews, F. S., Adachi, O. & Matsushita, K. Quinohemoprotein alcohol dehydrogenases: structure, function, and physiology. **428**, 10–21 (2004).
160. Carreño-Lopez, R., Alatorre-Cruz, J. . & Marín-Cevada, V. Pyrroloquinoline quinone (PQQ): Role in Plant-Microbe Interactions. (2019). doi:10.1007/978-981-13-5862-3
161. Chang, C., Damiani, I., Puppo, A. & Frendo, P. Redox Changes during the Legume–Rhizobium Symbiosis. *Mol. Plant* **2**, 370–377 (2009).
162. Gutschmann, B. *et al.* Untargeted metabolomics analysis of *Ralstonia eutropha* during plant oil cultivations reveals the presence of a fucose salvage pathway. *Sci. Rep.* 1–12 (2021). doi:10.1038/s41598-021-93720-9
163. Mergaert, P., Montagu, M. Van & Holsters, M. The nodulation gene *noK* of *Azorhizobium caulinodans* is involved in the formation of GDP-fucose from GDP-mannose. *FEBS Lett.* **409**, 312–316 (1997).
164. Wang, D., Couderc, F., Tian, C. F., Gu, W. & Liu, L. X. Conserved Composition of Nod Factors and Exopolysaccharides Produced by Different Phylogenetic Lineage Sinorhizobium Strains Nodulating Soybean. **9**, 1–14 (2018).
165. Liu, Y. *et al.* The Exopolysaccharide Cepacian Plays a Role in the Establishment of the *Paraburkholderia phymatum* – *Phaseolus vulgaris* Symbiosis. **11**, 1–13 (2020).
166. Qurashi, A. . & A.N, S. Bacterial exopolysaccharide and biofilm formation stimulate chickpea growth and soil aggregation under salt stress. *Brazilian J. Microbiol.* 1183–1191 (2012). doi:10.1590/S1517- 83822012000300046
167. Morel, M. & Castro-Sowinski, S. *Plant Microbe Symbiosis: Fundamentals and Advances.* (2013). doi:10.1007/978-81-322-1287-4
168. Riveros-Rosas, H., Julián-Sánchez, A., Moreno-Hagelsieb, G. & Muñoz-Clares, R. . Aldehyde dehydrogenase diversity in bacteria of the *Pseudomonas* genus. *Chem. Biol. Interact* **304**, 83–87 (2019).
169. Magalon, A. & Mendel, R. R. Biosynthesis and Insertion of the Molybdenum Cofactor. (2015). doi:10.1128/ecosalplus.ESP-0006-2013
170. Iobbi-nivol, C. & Leimkühler, S. Molybdenum enzymes , their maturation and molybdenum cofactor biosynthesis in *Escherichia coli*. *BBA - Bioenerg.* **1827**, 1086–1101 (2013).
171. Meilhoc, E., Boscari, A., Bruand, C., Puppo, A. & Brouquisse, R. Nitric oxide in legume – rhizobium symbiosis. **181**, 573–581 (2011).
172. Delgado, M. J., Casella, S. & Bedmar, E. J. Denitrification in Rhizobia-Legume Symbiosis. in *Biology of the nitrogen cycle* (2007).
173. Berger, A., Boscari, A., Puppo, A. & Brouquisse, R. Nitrate reductases and hemoglobins control nitrogen-fixing symbiosis by regulating nitric oxide accumulation. **72**, 873–884 (2021).
174. Allocati, N., Federici, L., Masulli, M. & Ilio, C. Di. Glutathione transferases in bacteria. **276**, 58–75 (2009).
175. Boušová, I., Hájek, J., Dršata, J. & Skálová, L. Naturally occurring flavonoids as inhibitors of purified cytosolic glutathione S -transferase. 1–8 (2012). doi:10.3109/00498254.2012.670737
176. Mathew, N., Kalyanasundaram, M. & Balaraman, K. Glutathione S -transferase ( GST ) inhibitors. 431–444 (2006).
177. Gourion, B., Berrabah, F., Ratet, P. & Stacey, G. Rhizobium–legume symbioses: the crucial role of plant immunity. *Cell Press* **20**, 186–198 (2015).

178. Mithöfer, A. Suppression of plant defence in rhizobia–legume symbiosis. *Cell Press* **7**, 440–444 (2002).
179. Eggers, J., Strittmatter, S., Küsters, K. & Biller, E. Biotin Synthesis in *Ralstonia eutropha* H16 Utilizes Pimeloyl Coenzyme A and Can Be Regulated by the Amount of Acceptor Protein. *Appl. Environ. Microbiol.* (2020). doi: <https://doi.org/10.1128/AEM.01512-20>
180. Encarnacio, S., Dunn, M. F. & Guille, K. Biotin biosynthesis, transport and utilization in rhizobia. **246**, 159–165 (2005).
181. Iftiaf, A., Ud, S. & Anna, D. Methyl-accepting chemotaxis proteins: a core sensing element in prokaryotes and archaea. *Cell. Mol. Life Sci.* **0**, 0 (2017).
182. López-Farfán, D., Reyes-Darias, J., Matilla, M. & Krell, T. Concentration Dependent Effect of Plant Root Exudates on the Chemosensory Systems of *Pseudomonas putida* KT2440. *Front. Microbiol.* **30**, 10–78 (2019).
183. Elgamal, S., Artsimovitch, I. & Ibba, M. Maintenance of Transcription-Translation Coupling by Elongation Factor P. (2016). doi:10.1128/mBio.01373-16.
184. Irastortza-olaziregi, M., Amster-choder, O. & Irastortza-olaziregi, M. Coupled Transcription-Translation in Prokaryotes: An Old Couple With New Surprises. **11**, (2021).
185. Chatterjee, S., Chauvier, A., Dandpat, S. S., Artsimovitch, I. & Walter, N. G. A translational riboswitch coordinates nascent transcription – translation coupling. **118**, (2021).
186. Artsimovitch, I. Rebuilding the bridge between transcription and translation. **108**, 467–472 (2019).
187. Johnson, G. E., Peters, M. L. & Li, G. Functionally uncoupled transcription-translation in *Bacillus subtilis* Grace. *Nature* **585**, 124–128 (2020).
188. Lill, R. Function and biogenesis of iron – sulphur proteins. *Nature* **460**, 831–838 (2009).
189. Langklotz, S. *et al.* Activation of RidA chaperone function by N-chlorination. *Nat commun* **5**, 1–14 (2014).
190. Voth, W., Jakob, U., Arbor, A. & Arbor, A. Stress-Activated Chaperones: A First Line of Defense. **42**, 899–913 (2018).
191. Hodge-hanson, K. M. & Downs, D. M. Members of the Rid protein family have broad imine deaminase activity and can accelerate the *Pseudomonas aeruginosa* D-arginine dehydrogenase (DauA) reaction in vitro. 1–17 (2017).
192. Mark, G. L. *et al.* Transcriptome profiling of bacterial responses to root exudates identifies genes involved in microbe – plant interactions. (2005).
193. Cheng, Z., Duan, J., Hao, Y., McConkey, B. & Glick, B. Identification of bacterial proteins mediating the interactions between *Pseudomonas putida* UW4 and *Brassica napus* (Canola). *Mol. Plant-Microbe Interact.* **6**, 686–94 (2009).
194. Ryu, H., Cho, H., Choi, D. & Hwang, I. Plant Hormonal Regulation of Nitrogen-Fixing Nodule Organogenesis. 1–10 (2012). doi:10.1007/s10059-012-0131-1
195. Vogel, C. & Marcotte, E. M. Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nat. Publ. Gr.* **13**, 227–232 (2012).
196. Jayapal, K. P. *et al.* Uncovering Genes with Divergent mRNA-Protein Dynamics in *Streptomyces coelicolor*. **3**, (2008).
197. Ku, S., Gavin, A., Aebersold, R. & Serrano, L. Quantification of mRNA and protein and integration with protein turnover in a bacterium. 1–12 (2011). doi:10.1038/msb.2011.38
198. Lee, M. V. *et al.* A dynamic model of proteome changes reveals new roles for transcript alteration in yeast. *Mol. Syst. Biol.* **7**, 1–12 (2011).