



Ministerio  
de Educación y Cultura



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

Tesina para optar al título de Licenciada en Ciencias Biológicas

---

# Desarrollo de vectores para la sobreexpresión de genes posiblemente implicados en la interacción *Cupriavidus-Mimosa*

---

Verónica Alonso

Tutor: Dr. Raúl Platero

Departamento de Bioquímica y Genómica Microbianas

Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

Montevideo, Uruguay

2025

# Índice de contenidos

<b>Resumen</b>	<b>3</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>4</b>
1.1 Fijación Biológica de Nitrógeno	4
1.2 Diazótrofos: rizobios	5
1.3 Leguminosas	6
1.4 Interacción rizobio-leguminosa	7
1.5 <i>Cupriavidus</i> como modelo de investigación	10
1.6 Vectores de amplio rango de hospedero para el estudio de bacterias no modelo	11
<b>2. Antecedentes</b>	<b>13</b>
<b>3. Objetivos</b>	<b>15</b>
3.1 Objetivo general	15
3.2 Objetivos específicos	15
<b>4. Materiales y métodos</b>	<b>17</b>
4.1 Construcción de vectores para la sobreexpresión de genes de interés en UYMMa02A	17
Cepas bacterianas y condiciones de cultivo	17
Diseño de cebadores	17
Manipulación del ADN	19
Vector y plásmidos recombinantes construidos en este trabajo	20
Obtención de células competentes	21
Mecanismos de adquisición de ADN foráneo	22
4.2 Caracterización fenotípica de las cepas de UYMMa02A portadoras de los plásmidos recombinantes	23
Inducción de la transcripción de los genes clonados	23
Curvas de crecimiento	23
Ensayos de movilidad	24
Resistencia al estrés oxidativo	24
Síntesis de sideróforos	24
Análisis estadístico	25
<b>5. Resultados</b>	<b>26</b>
5.1 Construcción de vectores para la sobreexpresión de los genes de interés	26
Diseño de los cebadores y amplificación de los genes de interés	26
Clonado de los genes de interés	27
5.2 Análisis de la sobreexpresión de los genes de interés en UYMMa02A	29
Crecimiento de las cepas portadoras de los plásmidos recombinantes	29
Movilidad de tipo swimming	32
Resistencia al estrés oxidativo	33
Síntesis de sideróforos	34
Análisis de la resistencia al arsénico	35
<b>6. Discusión</b>	<b>36</b>
<b>7. Conclusión</b>	<b>41</b>
<b>8. Referencias bibliográficas</b>	<b>42</b>
<b>Anexo</b>	<b>49</b>

## Resumen

Los rizobios pertenecientes a la familia Burkholderiaceae son un grupo de rizobios aún poco estudiados, que han adquirido interés por su capacidad de asociarse simbióticamente con leguminosas de la subfamilia *Mimosoideae*, utilizadas como abono verde y para la restauración de suelos contaminados. En nuestro país, la mayoría de las especies de *Mimosa* estudiadas se encuentran asociadas simbióticamente a  $\beta$ -rizobios pertenecientes al género *Cupriavidus*. En este sentido, a partir de nódulos colectados de raíces de *Mimosa magentea*, una leguminosa nativa, se aisló la cepa UYMMa02A, la cual luego de su identificación resultó ser una nueva especie de rizobio perteneciente al género *Cupriavidus*. Esta nueva especie ha sido propuesta bajo el nombre *C. ariasiae*, la cual no ha sido aún formalmente validada. Estudios realizados en el Laboratorio de Microbiología Ambiental del IIBCE permitieron identificar genes y proteínas de *C. ariasiae* UYMMa02A expresados diferencialmente en respuesta a flavonoides, exudados radiculares o a la presencia de la planta hospedera *M. pudica*.

En el presente trabajo nos propusimos dilucidar el rol de algunos de estos genes sobre distintos parámetros fisiológicos del simbiote bacteriano (crecimiento, movilidad, producción de sideróforos y resistencia a metales y a estrés oxidativo).

De once genes inicialmente seleccionados, se logró clonar cinco bajo el control del sistema de expresión *XylS/Pm*, el cual permite inducir la expresión génica en presencia de 3 metil-benzoato.

En general, la sobreexpresión de los genes seleccionados no alteró sustancialmente los parámetros fisiológicos ensayados. La excepción correspondió a los genes *acr3* y *arsR*, ambos vinculados a la resistencia a arsénico. En particular, la cepa que sobreexpresa *acr3* mostró mayor resistencia al arsénico. Esto sugiere que Acr3 confiere una ventaja adaptativa frente a este metaloide, en concordancia con su función como permeasa de expulsión de arseniato en otras bacterias. En contraste, la sobreexpresión de *arsR* afectó negativamente el crecimiento y la motilidad bacteriana, lo que podría deberse a efectos pleiotrópicos derivados de su posible rol como regulador transcripcional. Por otra parte, la ausencia de cambios fisiológicos claros frente a la sobreexpresión de genes asociados a la respuesta al estrés (*ppiB*, *uspA*) o a la biosíntesis de sideróforos (*pvsE*), sugiere que la expresión aislada de un único gen no es suficiente para alterar estas funciones complejas.

En conjunto, los resultados obtenidos constituyen la primera aproximación experimental al estudio funcional de genes de *C. ariasiae* UYMMa02A posiblemente involucrados en la simbiosis con mimosas. La información generada sienta las bases para estudios futuros orientados a profundizar en los mecanismos moleculares que regulan la interacción *Cupriavidus-Mimosa* y en el papel que cumplen estos genes durante las etapas iniciales de la simbiosis.

# 1. Introducción

## 1.1 Fijación Biológica de Nitrógeno

El nitrógeno (N) es uno de los elementos indispensables para el desarrollo de los seres vivos ya que es necesario para la elaboración de distintas biomoléculas como las proteínas y los ácidos nucleicos. Aunque el N es uno de los elementos más abundantes de la naturaleza, constituyendo el 78% de la atmósfera, en muchos ambientes su biodisponibilidad es limitante. Esto se debe a que la forma gaseosa ( $N_2$ ) no es asimilable por la mayoría de los seres vivos. Particularmente, las plantas pueden absorber el N por la raíz en sus formas inorgánicas, nitrato ( $NO_3^-$ ) y amonio ( $NH_4^+$ ), pero estos compuestos son escasos en los suelos y no logran cumplir con los requerimientos agrícolas (Miller & Cramer, 2005). Debido a esta limitante, durante el siglo 20 los agricultores han ido incrementando cada vez más el uso de fertilizantes nitrogenados. En los últimos años dichos fertilizantes se han asociado a numerosos problemas ambientales, ya que únicamente el 50% de los mismos son asimilados por la planta mientras que el resto se pierde por lixiviación, resultando en la eutrofización de ríos y mares, la contaminación de aguas subterráneas y la destrucción de la capa de ozono, contribuyendo al calentamiento global (Crews & Peoples, 2004; Santi et al., 2013).

La principal entrada al “pool” de N en los ecosistemas naturales ocurre por un proceso denominado fijación biológica de nitrógeno (FBN), el cual es realizado únicamente por ciertos microorganismos procariotas, conocidos como diazótrofos (de Bruijn, 2015). En este proceso se lleva a cabo la reducción de  $N_2$  en  $NH_4^+$ , forma asimilable por los seres vivos. La reducción del  $N_2$  es catalizada por la enzima nitrogenasa, siendo una reacción muy costosa energéticamente dado que se requieren 16 moléculas de ATP por cada molécula de  $N_2$  reducida (Peters et al., 1995).

Se calcula que cada año se incorporan a nivel mundial más de 300 millones de toneladas de N al suelo. De este total, 80 millones de toneladas derivan de la síntesis industrial mediante el proceso Haber-Bosch, que consiste en la reducción del  $N_2$  a  $NH_4^+$  bajo condiciones de elevada temperatura y presión, empleando un catalizador a base de hierro y mucha energía (Ertl, 2012). El resto del N recibido por el suelo ocurre por procesos naturales. Por un lado, alrededor de 30 millones de toneladas son incorporadas por la oxidación del  $N_2$  a ácido nítrico por descargas eléctricas durante eventos de tormenta. Por otro lado, 200 millones de toneladas de N son aportadas a los ecosistemas a través de la FBN (Azcón-Bieto & Talón,

2013). Esta última estrategia natural de obtención de N no solo contribuye a disminuir las pérdidas de este elemento en el suelo, sino que también reduce el uso de fertilizantes químicos y, en consecuencia, la demanda de recursos energéticos necesarios para su producción.

## 1.2 Diazótrofos: rizobios

En bacterias, la habilidad de fijar nitrógeno se distribuye en seis phyla: *Chlorobi* (bacterias verdes del azufre), *Firmicutes* (ej. *Clostridium*), *Actinobacteria* (ej. *Frankia*), *Cyanobacteria* (ej. *Anabaena*) y en todas las subdivisiones de las proteobacterias (ej.  $\alpha$ -proteobacteria) (Lloret & Martínez-Romero, 2005), siendo esta última la división bacteriana más abundante y en la cual se encuentran los rizobios. Los mismos son bacterias del suelo, bacilos Gram negativos, móviles, que presentan flagelo polar o subpolar, o dos a seis flagelos peritricos. La mayoría presenta un metabolismo aerobio heterótrofo y una gran versatilidad para utilizar diversos azúcares como fuente de carbono. Taxonómicamente, se encuentran distribuidos en distintos géneros pertenecientes a las clases  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ - proteobacteria (Rajkumari et al., 2022). Una característica distintiva de los rizobios es su capacidad para establecer asociaciones simbióticas mutualistas con plantas de la familia de las leguminosas. Esta simbiosis se reconoce como una de las más estudiadas y relevantes en términos agrícolas y ambientales. Durante esta asociación los rizobios inducen la formación de órganos especializados en las raíces y tallos de las plantas, denominados nódulos, donde se lleva a cabo el proceso de FBN, aportándole a la planta el N necesario para su desarrollo y recibiendo a cambio compuestos carbonados (Azcón-Bieto & Talón, 2013).

La taxonomía de los rizobios se encuentra en constante revisión gracias al desarrollo de técnicas moleculares cada vez más precisas y el muestreo de nuevas leguminosas. Hasta el momento, la mayoría de las especies han sido clasificadas mediante una aproximación polifásica que combina el análisis del gen *rrs*, que codifica para la subunidad 16S del ARN ribosomal, estudios multilocus basados en genes conservados, cada vez más basados en estudios de genomas completos, y la caracterización de propiedades fenotípicas y bioquímicas. Los primeros rizobios en ser descritos y los más estudiados hasta la fecha pertenecen a la subdivisión  $\alpha$ -proteobacteria, denominados  $\alpha$ -rizobios. Recién en el año 2001 se describieron los primeros representantes pertenecientes al grupo de las  $\beta$ -proteobacterias, llamados  $\beta$ -rizobios (Chen et al., 2001; Moulin et al., 2001). Mientras que los  $\alpha$ -rizobios comprenden más de 50 especies distribuidas en nueve géneros, hasta el momento se han

identificado solamente tres géneros de  $\beta$ -rizobios (*Paraburkholderia*, *Cupriavidus* y *Trinickia*) de los que se han descrito pocas especies (Mavima et al., 2025). La mayoría de los  $\beta$ -rizobios están asociados a leguminosas pertenecientes a las mimosoideas, sin embargo se han evidenciado asociaciones simbióticas efectivas con especies de importancia agronómica como poroto y soja (da Silva et al., 2012; Dall’Agnol et al., 2016; Talbi et al., 2010).

### 1.3 Leguminosas

Las leguminosas son plantas de la familia Fabaceae, que constituyen uno de los grupos de angiospermas más extensos y ecológicamente relevantes. Comprende más de 19.500 especies agrupadas en alrededor de 770 géneros presentes como hierbas, arbustos y árboles distribuidos en todo el mundo (Velazquez et al., 2010; Azani et al., 2017). Muchas de ellas poseen un gran valor económico por su uso en la alimentación humana y animal, la producción de forrajes y su capacidad de mejorar la fertilidad de los suelos mediante la FBN en simbiosis junto a los rizobios. Esta última característica les otorga un papel fundamental en los ecosistemas naturales y agrícolas, ya que permite reducir el uso de fertilizantes nitrogenados sintéticos y contribuye a la sostenibilidad de los sistemas productivos (Herridge et al., 2008).

Dentro de la familia Fabaceae se encuentran 6 subfamilias: Cercidoioideae, Detarioideae, Duparquetioideae, Dialioideae, Caesalpinioideae y Papilionoideae (Azani et al., 2017). Dentro de la subfamilia Papilionoideae se encuentran las leguminosas más conocidas por producir alimentos de suma importancia para el ser humano, como poroto, lenteja, garbanzo, maní, etc., así como las especies forrajeras, alfalfa, trébol o lotus, que se utilizan como alimento para el ganado. Además de su relevancia alimentaria, las leguminosas se utilizan frecuentemente como abono verde para la fertilización natural del suelo y como especies pioneras en la regeneración de suelos degradados, contribuyendo a mitigar la pérdida de biodiversidad y los efectos del cambio climático. Por estas razones, son consideradas especies soporte en sistemas de rotación de cultivos, donde favorecen el crecimiento de otras plantas de interés agrícola.

La subfamilia Caesalpinioideae incluye a las especies del llamado “clado mimosoideo”, correspondiente a la anteriormente denominada subfamilia Mimosoideae. Dentro de este grupo, el género *Mimosa* es un grupo monofilético que incluye plantas herbáceas, arbustos y

árboles. Actualmente consta de más de 500 especies en todo el mundo, siendo capaz de crecer en una amplia variedad de hábitats, incluyendo selvas tropicales, sabanas, bosques secos tropicales y subtropicales, desiertos, praderas y humedales. Los principales centros de diversidad y endemismo de *Mimosa* se localizan en el centro de Brasil, América del Sur subtropical (que incluye Paraguay, Argentina, Uruguay y el sur de Brasil) y México, con núcleos secundarios en los Andes, el Caribe y Madagascar (Simon et al., 2011). Este género es capaz de asociarse simbióticamente tanto con rizobios pertenecientes a las  $\alpha$ -proteobacterias como a las  $\beta$ -proteobacterias, demostrando una gran plasticidad (Franchet et al., 2009). Una característica destacable de las mimosas es su capacidad para crecer en suelos ácidos, pobres en nutrientes o contaminados con metales pesados, lo que les confiere un valor ecológico importante en la restauración y recuperación de suelos degradados (Jach et al., 2022; Nascimento et al., 2022). En Sudamérica, y particularmente en Uruguay y Brasil, se ha observado que la mayoría de especies de *Mimosa* se asocian preferentemente con  $\beta$ -rizobios pertenecientes a los géneros *Cupriavidus* y *Burkholderia* (actualmente denominado *Paraburkholderia* (Sawana et al., 2014)), en contraste con las asociaciones típicas de las leguminosas con  $\alpha$ -rizobios (dos Reis Jr et al., 2010; Platero et al., 2016; Hassen et al., 2020).

#### 1.4 Interacción rizobio-leguminosa

Los rizobios presentan dos formas de vida, diferenciadas por su morfología y su metabolismo. Por un lado, en vida libre se comportan como bacterias saprófitas: bacilos móviles, no fijadores de  $N_2$  y con la capacidad de utilizar una amplia gama de compuestos orgánicos como fuente de energía. Por otro lado, en simbiosis se localizan en nódulos diferenciándose a bacteroides: pierden la motilidad, presentan morfologías irregulares, se especializan en la fijación de  $N_2$  y restringen su metabolismo al consumo de ácidos dicarboxílicos como fuente de carbono (Kereszt et al., 2011). Cabe destacar que la simbiosis rizobio-leguminosa no es de carácter obligatorio, no obstante, bajo condiciones limitantes de N se convierte en un proceso ventajoso para ambos organismos. Para que se lleve a cabo, se establece un elaborado diálogo molecular que desencadena la activación de genes específicos en la planta y en la bacteria (Taiz & Zeiger, 2003). Este proceso se inicia cuando la leguminosa libera exudados radiculares compuestos por aminoácidos, proteínas, azúcares, carbohidratos complejos, flavonoides, alcoholes, vitaminas y ácidos orgánicos (Badri et al., 2009). Dichos exudados no solo enriquecen la rizósfera, generando un ambiente favorable

para el crecimiento microbiano, sino que también funcionan como señales químicas clave para el reconocimiento y quimiotaxis del rizobio. En este contexto, los rizobios deben competir con otros microorganismos para lograr colonizar la rizósfera y adherirse a la raíz de la planta hospedera. Este proceso depende de diversos factores, tanto bacterianos (polisacáridos y proteínas de superficie, microfibrillas de celulosa, fimbrias) como vegetales (composición de exudados, estructura de la superficie radicular), así como de condiciones ambientales (pH, temperatura, humedad y presencia de microorganismos competidores).

Dentro de los compuestos exudados por las raíces de las leguminosas, algunos flavonoides son capaces de inducir en el simbiote la expresión de los genes responsables de la nodulación, denominados genes *nod*, mediante la activación de la proteína reguladora NodD (Hirsch et al., 2001). La proteína NodD pertenece a la familia de factores de transcripción LysR, cuyo extremo amino terminal es el que reconoce y se une específicamente a los flavonoides, mientras que su extremo carboxilo terminal es el dominio de unión al ADN. Una vez activa, NodD se une a una secuencia altamente conservada, llamada caja *nod*, presente en la región promotora de los operones *nod*, induciendo su expresión y resultando en la síntesis de los factores de nodulación o factores Nod (Schlaman et al., 1992; Gibson et al., 2008).

Los genes *nod* codifican para aproximadamente 25 proteínas requeridas para la síntesis y exportación de los factores Nod (Gage, 2004). Dichos factores son moléculas del tipo lipo-quito-oligosacáridos (LCOs), que consisten en un tetra a pentasacárido de N-acetil-D-glucosamina sustituido en el C-2 de su extremo no reductor por una cadena de ácido graso insaturado (Figura 1) (D'Haeze & Holsters, 2002). Los genes *nodABC*, responsables de la síntesis y el ensamblaje de las unidades de N-acetil-D-glucosamina y de la unión de la cadena de ácido graso, son comunes a todos los rizobios. En cambio, los genes que codifican las enzimas encargadas de agregar los distintos sustituyentes a los factores Nod (*nod*, *nol* y *noe*) varían entre las diferentes especies de rizobios. Estas modificaciones, como la adición de grupos acetato, sulfato o carbamoilo, o la incorporación de distintos azúcares, son los responsables de la especificidad de la simbiosis. La combinación de estas modificaciones da origen a un factor Nod con una estructura que es reconocida únicamente por la planta hospedera (Hirsch et al., 2001).



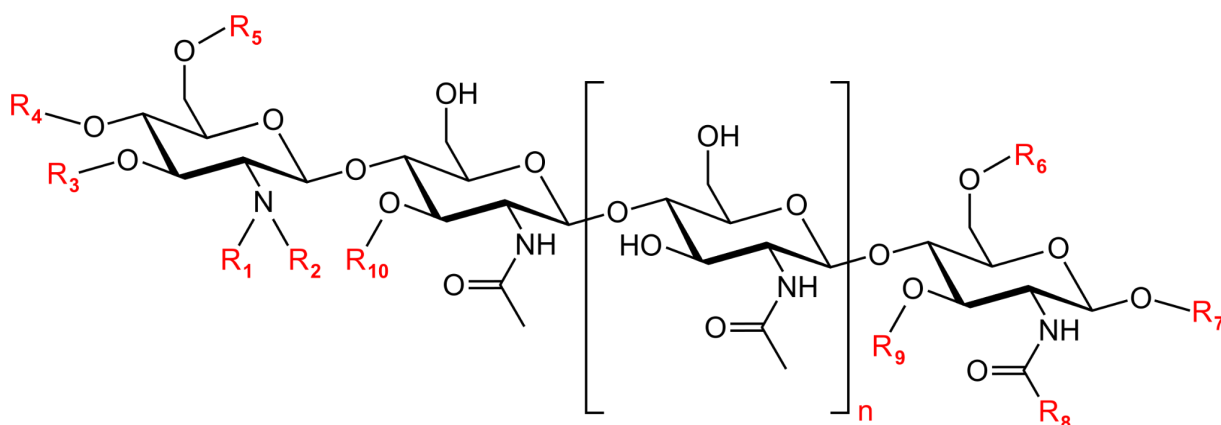


Figura 1. **Estructura general de los factores Nod.** Los grupos variables  $R_1$  a  $R_{10}$  se indican en rojo.  $R_1$  siempre indica una cadena de ácido graso y  $n$  indica el número de repetidos. Modificado de D'Haeze & Holsters, 2002.

Durante mucho tiempo se consideró que el diálogo molecular mediado por los factores Nod era universal a todas las interacciones rizobio-leguminosa. Sin embargo, con el tiempo se ha demostrado que existen mecanismos alternativos de simbiosis que no dependen exclusivamente de estos factores. Si bien la estrategia dependiente de los factores Nod ha sido la más exitosa, ya que es utilizada por la mayoría de los rizobios estudiados hasta el momento, se han identificado otras vías. Estas estrategias no se basan únicamente en los genes *nod*, sino que pueden involucrar otras moléculas o incluso prescindir completamente de dichos genes. Por ejemplo, en algunos casos interviene el sistema de secreción de tipo III (T3SS), generalmente regulado por el gen *nodD*, lo que sugiere que este sistema fue empleado por los rizobios con fines simbióticos durante la evolución (Okazaki et al., 2016; Masson-Boivin & Sachs, 2018). Un caso interesante es el de ciertas cepas fotosintéticas de *Bradyrhizobium*, las cuales carecen de los genes canónicos *nodABC* y aun así son capaces de inducir la formación de nódulos en especies del género *Aeschynomene* (Giraud et al., 2007; Fabre et al., 2015) y en *Arachis hypogaea* (Guha et al., 2022). Este hallazgo reveló por primera vez la existencia de una interacción simbiótica alternativa independiente de los factores Nod.

## 1.5 *Cupriavidus* como modelo de investigación

El género *Cupriavidus* surge en 1987, cuando Makkar & Casida describieron a la especie *Cupriavidus necator* como una bacteria del suelo Gram negativa, predadora no-obligatoria de bacterias Gram positivas y Gram negativas. Los autores determinaron también que esta especie es altamente resistente al cobre, incluso detectaron que su crecimiento inicial se ve estimulado por la presencia de este metal, derivando en su nombre (Cupria=cobre, vidus=amantes) (Makkar & Casida, 1987). La resistencia a metales y la degradación de compuestos aromáticos son dos características ampliamente distribuidas en las distintas cepas del género. En el año 2001 se registró en Taiwán una especie capaz de nodular las raíces de *M. pudica* y *M. pigra*. Inicialmente fue nombrada como *Ralstonia taiwanensis* (Chen et al., 2001) pero fue luego realojada en el género *Cupriavidus* (Vandamme & Coenye, 2004) y denominada *C. taiwanensis*. En el año 2012, da Silva y colaboradores describieron a *C. necator* como una especie nodulante tras recuperar varios aislamientos desde nódulos de *Phaseolus vulgaris* y demostrar su capacidad de reinfectar y fijar N en asociación con otras especies de leguminosas (da Silva et al., 2012).

En Uruguay, se ha reportado la existencia de  $\alpha$  y  $\beta$ -rizobios asociados a nódulos presentes en las raíces de diversas leguminosas nativas pertenecientes al clado *Mimosoideae* (Pereira-Gómez et al., 2020; Platero et al., 2016; Taulé et al., 2012), revelando un predominio del género *Cupriavidus*, lo que sugiere que la región podría ser un centro de diversidad de  $\beta$ -rizobios. La cepa en la que se centra este trabajo, *Cupriavidus* sp. UYMMa02A, fue aislada a partir de nódulos de una población natural de la leguminosa nativa *M. magentea* presente en el Departamento de Lavalleja (Platero et al., 2016). Análisis filogenéticos de distintos genes “housekeeping” (*gyrB*, *recA* y el gen codificante para el ARNr 16S) determinaron que UYMMa02A no pertenecía a ninguna de las especies de *Cupriavidus* descritas hasta el momento (Platero et al., 2016), también se ha evidenciado mediante la comparación de genomas completos, al disponerse del genoma de UYMMa02A secuenciado (Iriarte et al., 2016). Es así que se ha propuesto nombrarla *Cupriavidus ariasiae* (manuscrito en preparación), aunque aún no ha sido formalmente validado, en el resto del trabajo se utilizará este nombre para referirse a la especie de esta cepa. Asimismo, se demostró que esta cepa es capaz de formar nódulos en las raíces de distintas *Mimosas* como *M. ramulosa*, *M. uragüensis*, *M. pudica* y *M. polycarpa* (Ríos, 2014; Sandes, 2015). Un aspecto particularmente interesante de UYMMa02A es que presenta una estrategia de nodulación que no depende de la inducción clásica de los genes *nod*. Estudios transcriptómicos y proteómicos

revelaron que la cepa puede desencadenar la formación de nódulos sin requerir la inducción de los genes *nod* por flavonoides o exudados radiculares de *Mimosa* spp., lo que sugiere la existencia de un mecanismo alternativo de reconocimiento y señalización simbiótica (Rodríguez-Esperrón et al., 2023). Este tipo de interacción independiente de los factores Nod refuerza la idea de que los  $\beta$ -rizobios han desarrollado rutas moleculares alternativas para el establecimiento de la simbiosis, posiblemente empleando otros sistemas de señalización para cumplir funciones equivalentes a las de dichos factores en  $\alpha$ -rizobios. Esta característica posiciona a UYMMa02A como un modelo interesante para investigar mecanismos simbióticos no convencionales.

## 1.6 Vectores de amplio rango de hospedero para el estudio de bacterias no modelo

El estudio de bacterias ambientales y en particular  $\beta$ -rizobios presenta dificultades metodológicas, ya que la mayoría de las herramientas moleculares disponibles fueron desarrolladas para microorganismos modelo, tales como *Escherichia coli* o *Bacillus subtilis*. Sin embargo, en los últimos años se ha avanzado en el diseño de distintas alternativas para el estudio de bacterias no modelo. En este contexto, los plásmidos de amplio rango de hospedero (BHR, broad-host-range plasmids) constituyen una herramienta fundamental, ya que pueden mantenerse en diferentes géneros bacterianos, permitiendo la manipulación genética de organismos aún poco caracterizados. Esta capacidad se debe a la presencia de sistemas de replicación con baja dependencia de factores específicos del hospedador, lo que les confiere la posibilidad de perpetuarse en diversos taxones (del Solar et al., 1996; Jain & Srivastava, 2013). Si bien existen numerosos replicones naturales con estas propiedades, solo algunos han sido adaptados y ampliamente utilizados en enfoques biotecnológicos para la construcción de vectores, destacando los pertenecientes a los grupos IncQ, IncW, IncP y pBBR1. Todos ellos son capaces de replicarse y mantenerse en *E. coli*, organismo que se emplea como hospedador intermediario en las etapas de clonación y manipulación del ADN, previo a la transferencia de las construcciones a las bacterias de interés (Lale et al., 2011).

El desarrollo de vectores modulares basados en estos replicones ha permitido estandarizar la manipulación genética en diferentes microorganismos. Dentro de estos vectores se destaca la colección SEVA (Standard European Vector Architecture) (Silva-Rocha et al., 2013). Esta colección organiza los plásmidos en módulos intercambiables que cumplen funciones bien

definidas: (i) un origen de replicación, que determina el rango de hospedador y el número característico de copias por cromosoma; (ii) un marcador de resistencia antibiótica, que permite la selección de los clones transformantes y el mantenimiento del plásmido; y (iii) un cargo, que le confiere la función deseada al vector. Además, todos los vectores SEVA incluyen un origen de transferencia (*oriT*), que permite su movilización hacia otras bacterias mediante conjugación (Figura 2). Gracias a esta arquitectura modular, los vectores SEVA pueden adaptarse a distintos contextos experimentales, ofreciendo la posibilidad de diseñar construcciones a medida según la función que se desee evaluar, y permitiendo además su uso en un amplio rango de hospedadores bacterianos. La versatilidad de estos vectores no solo radica en su estabilidad y compatibilidad entre hospederos, sino también en la posibilidad de incorporar distintos cargos, como sistemas de expresión regulables que permitan controlar el nivel de transcripción de los genes clonados.

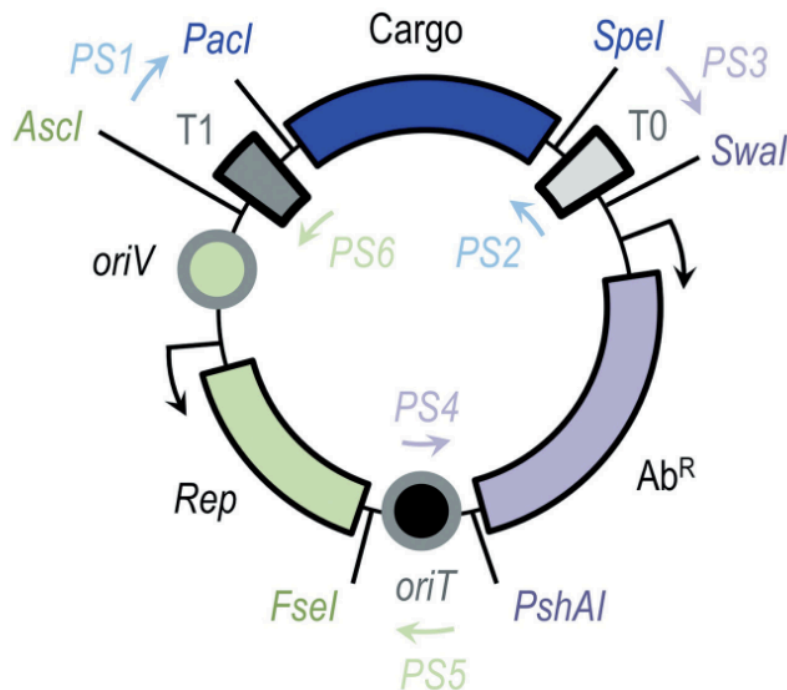


Figura 2. **Estructura de un vector de la colección Standard European Vector Architecture.** Estos vectores están formados por tres módulos variables: un cargo (azul), el replicón básico: origen de replicación (*oriV*) y proteína iniciadora de la replicación (*Rep*) (verde), y un gen que codifica para un marcador de resistencia antibiótica (violeta). Las enzimas utilizadas para cambiar los segmentos de ADN funcionales se muestran en el mismo código de colores. Estos módulos están separados por tres regiones que son comunes a todos los vectores: los terminadores de transcripción T0 y T1, y el *oriT*, origen de transferencia conjugativa. Los cebadores del sistema SEVA (PS1–PS6) se encuentran dentro del esqueleto invariable y se utilizan para secuenciar y verificar los módulos variables. Tomado de Silva-Rocha et al., (2013).

## 2. Antecedentes

Los rizobios pertenecientes al género *Cupriavidus* han sido objeto de varios estudios por parte del Laboratorio de Microbiología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable. En estos trabajos se utilizaron aproximaciones ómicas para caracterizar la respuesta del simbiote frente a exudados de la planta hospedera *M. pudica* y a posibles inductores de los genes *nod*, con el fin de dilucidar los diálogos moleculares que ocurren durante las primeras etapas de la asociación simbiótica e identificar las vías metabólicas relevantes para el establecimiento de la simbiosis entre rizobios de este género y sus leguminosas hospederas. En primera instancia, se estudió la respuesta de la cepa *C. necator* UYPR2.512 frente al flavonoide luteolina, molécula que previamente se había demostrado que es capaz de inducir la síntesis de factores Nod en *C. taiwanensis* (Amadou et al., 2008). Los resultados de este estudio determinaron que, en respuesta a luteolina, *C. necator* UYPR2.512 reorganiza su metabolismo para prepararse para la interacción simbiótica, induciendo el operón *nod* y genes implicados en la biosíntesis de exopolisacáridos y flagelos, así como varios genes involucrados en el metabolismo del hierro, cobre y otros metales pesados. A su vez, se vieron reprimidos genes relacionados con el metabolismo basal del carbono y del nitrógeno (Rodríguez-Esperón, 2023; Rodríguez-Esperón et al., 2022). Posteriormente, se abordó el análisis proteómico de otra cepa del género, UYMMa02A, bajo diferentes condiciones, incluyendo variaciones en la disponibilidad de nitrógeno, presencia de inductores de los genes *nod*, y en co-cultivo con la planta *M. pudica*. Los resultados obtenidos mostraron que las proteínas que se sobreexpresaron fueron mayoritariamente las pertenecientes al metabolismo de aminoácidos, la biosíntesis de lípidos y las relacionadas al estrés, sugiriendo la implicancia de estas vías en la interacción entre los simbioses (Sandes, 2020; Rodríguez-Esperón et al., 2023). Posteriormente, se integraron tres niveles de análisis: transcriptómica (RNA-seq), traductómica (Ribosome profiling) y proteómica (Shotgun proteomics), con el fin de evaluar la respuesta global de UYMMa02A a exudados radiculares de *M. pudica*. Los resultados mostraron que el simbiote bacteriano activa transportadores de aminoácidos y sistemas de secreción de compuestos tóxicos, induciendo la resistencia a distintos metales como el cobre y el arsénico y sobreexpresa genes relacionados a la producción de energía y la síntesis de exopolisacáridos, lipopolisacáridos y aminoácidos de cadena ramificada. A su vez se vieron reprimidos aquellos procesos que en un ambiente rico en nutrientes dejan de ser necesarios, como la quimiotaxis y la síntesis de algunos

aminoácidos, en concordancia con la disponibilidad de nutrientes brindados por los exudados de la planta hospedera (Garabato, 2022).

Gracias a estas aproximaciones se identificaron múltiples genes cuya función específica en la simbiosis aún no ha sido determinada. Es así que se eligieron determinantes genéticos involucrados en diversas funciones celulares, como resistencia a metales, motilidad, plegado de proteínas, metabolismo y respuesta al estrés, para avanzar en su caracterización. Para ello, se planteó como estrategia la generación de mutantes nulos para dichos genes y la evaluación de los efectos de las mutaciones tanto en la vida libre de la bacteria como en las distintas etapas del establecimiento de la simbiosis. Sin embargo, se encontraron dificultades en la generación de las cepas mutantes de UYMMa02A, impidiendo que se avanzara en esa dirección. En este marco, en el presente trabajo se propuso la construcción de vectores que permitieran la sobreexpresión de los genes seleccionados en el contexto de *C. ariasiae* UYMMa02A con el fin de evaluar su posible contribución en el establecimiento de la simbiosis con *M. pudica*. Los genes seleccionados para este abordaje se muestran en la Tabla 1. En relación a la resistencia al arsénico, se eligieron los genes *acr3* y *arsR*. El primero codifica para una permeasa implicada en la expulsión de arseniato, la que ha sido asociada a su resistencia en diversas bacterias. El gen *arsR* codifica para un represor sensible a arsenito, que se une al ADN y reprime la transcripción del operón de resistencia al arsénico en ausencia del metaloide (Li et al., 2014). Se incluyeron también genes vinculados a la resistencia al cobre: *cueO*, que expresa una multicobre oxidasa implicada en la detoxificación del metal y *cusS*, codificante para una histidina quinasa del sistema de dos componentes CusSR, también asociada a la respuesta frente a este metal (Grass & Rensing, 2001; Pontel & Soncini, 2009). Asimismo, dentro de los genes relacionados con la motilidad, se incluyó el gen *fliC*, el cual codifica para la flagelina, proteína estructural del flagelo bacteriano (Nedeljković et al., 2021). Entre los genes vinculados a la respuesta general al estrés y al metabolismo intracelular, cinco genes destacados en los estudios previos fueron también aquí analizados: (i) *ppiB* y *ppiD*, codificantes para dos peptidil-prolil isomerasas involucradas en el plegamiento de proteínas y la adaptación frente a condiciones adversas (Ünal & Steinert, 2014); (ii) *uspA*, que codifica para una proteína universal de estrés presente en gran número de bacterias, asociada a la tolerancia frente a diferentes condiciones ambientales desfavorables (Kvint et al., 2003a); (iii) *mobB*, cuyo producto participa en la vía de síntesis del cofactor molibdeno (Eaves et al., 1997) y (iv) *ndk*, que codifica una nucleósido difosfato quinasa implicada en el mantenimiento del balance de nucleótidos y en mecanismos de

señalización intracelular (Yu et al., 2017). Finalmente, se incluyó el gen *pvsE*, cuyo producto forma parte de la vía de biosíntesis del sideróforo vibrioferrina y se encuentra asociado a la adquisición de hierro en condiciones de baja disponibilidad (Tanabe et al., 2024).

## 3. Objetivos

### 3.1 Objetivo general

El objetivo general de este trabajo fue desarrollar herramientas genéticas para caracterizar la función de algunos genes de *Cupriavidus ariasiae* UYMMa02A expresados diferencialmente durante la interacción simbiótica rizobio-leguminosa.

### 3.2 Objetivos específicos

Los objetivos específicos fueron:

1. Generar una colección de vectores plasmídicos que permita la expresión controlada de genes seleccionados de *C. ariasiae* UYMMa02A.
2. Evaluar el efecto de la presencia del vector y de la sobreexpresión de los genes seleccionados en la fisiología de *C. ariasiae* UYMMa02A.

Tabla 1. Listado de genes de interés seleccionados para evaluar durante este trabajo

<b>Gen</b>	<b>Función hipotética</b>	<b>Efecto observado</b>	<b>Evidencia</b>
<i>acr3</i>	Resistencia a arsénico	Inducción	Transcriptómica de <i>C. ariasiae</i> UYMMa02A en presencia de exudados
<i>arsR</i>	Resistencia a arsénico	Inducción	Transcriptómica de <i>C. ariasiae</i> UYMMa02A en presencia de exudados
<i>cueO</i>	Resistencia a cobre	Inducción	Transcriptómica de <i>C. ariasiae</i> UYMMa02A en presencia de exudados
<i>cusS</i>	Resistencia a cobre	Inducción	Transcriptómica de <i>C. ariasiae</i> UYMMa02A en presencia de exudados
<i>fliC</i>	Síntesis de flagelo	Inducción	Transcriptómica de <i>C. necator</i> UYPR2.512 en presencia de luteonina
<i>mobB</i>	Metabolismo de molibdeno	Inducción	Transcriptómica de <i>C. ariasiae</i> UYMMa02A en presencia de exudados
<i>ndK</i>	Mantenimiento de niveles de nucleótidos trifosfato	Inducción	Transcriptómica de <i>C. ariasiae</i> UYMMa02A en presencia del hospedero
<i>ppiB</i>	Plegado de proteínas	Inducción	Transcriptómica de <i>C. ariasiae</i> UYMMa02A en presencia del hospedero
<i>ppiD</i>	Plegado de proteínas	Inducción	Transcriptómica de <i>C. ariasiae</i> UYMMa02A en presencia de exudados
<i>pvsE</i>	Síntesis de sideróforos	Represión	Transcriptómica de <i>C. necator</i> UYPR2.512 en presencia de luteonina
<i>uspA</i>	Resistencia a estrés	Inducción	Transcriptómica de <i>C. ariasiae</i> UYMMa02A en presencia del hospedero



## 4. Materiales y métodos

### 4.1 Construcción de vectores para la sobreexpresión de genes de interés en UYMMa02A

#### Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Se utilizó la cepa de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (*supE* 44  $\Delta$ *lacU69* ( $\phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15) *hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*) como contexto para propagar las construcciones genéticas obtenidas en este trabajo. Las cepas portadoras de los plásmidos recombinantes se incubaron en medio Luria-Bertani (LB) a 37°C durante 24 horas. Además, se trabajó con la cepa *C. ariasiae* UYMMa02A (Platero et al., 2016), la que se cultivó en los medios LB, mínimo M9 y CAS, a 30°C durante 24 horas.

En los casos en que fue necesario se añadió el antibiótico kanamicina (Km) a la concentración final 50  $\mu$ g/ml. En el anexo se detalla la composición de los medios de cultivo mencionados.

#### Diseño de cebadores

La secuencia de los genes de interés se obtuvo a partir del genoma de UYMMa02A, anotado en RAST (Aziz et al., 2008). Las parejas de cebadores para la amplificación de cada uno de los genes se diseñaron usando el programa Primer3Plus (Untergasser et al., 2012). Para el posterior clonado de los fragmentos de ADN amplificados, se incluyeron en el extremo 5' de cada cebador, sitios de reconocimiento para distintas enzimas de restricción. Asimismo, con el fin de asegurar la traducción de los transcriptos, en cada cebador “forward” se incorporó una secuencia Shine-Dalgarno (5'-AGGAGG-3'), posicionada ocho nucleótidos “upstream” del codón de inicio del gen (Tabla 2).

Tabla 2. Cebadores diseñados en este trabajo

Gen blanco	Cebador	Secuencia *	Tm (°C)	Producto (pb)
<i>acr3</i>	acR3_F_RBS_EcoRI	<b>ggaattc</b> <i>aggagg</i> ccggcgcaATGACGACC	60	1065
	acR3_R_XbaI	<b>gctctaga</b> CCTCAGTGCgATTCTGTACC		
<i>arsR</i>	arsR_F_RBS_EcoRI	<b>ggaattc</b> <i>aggagg</i> gaaaaATGGAAACTGATAACGCAC	56	330
	arsR_R_XbaI	<b>gctctaga</b> TCAGGACTCCGAGGTGACG		
<i>cueO</i>	cueO_F_RBS_SacI	<b>agagctc</b> <i>aggagg</i> gactcacATGCGACGCG	60	1803
	cueO_R_XbaI	<b>aaatctagag</b> TCACGACACCACCACTTCGCGG		
<i>cusS</i>	cusS_F_RBS_EcoRI	<b>ggaattc</b> <i>aggagg</i> gcggtgtaATGCGGCGG	60	1398
	cusS_R_BamHI	<b>aaaggatcc</b> GCAAATAGCCGTCAGGCTGC		
<i>fliC</i>	fliC_F_RBS_EcoRI	<b>ggaattc</b> <i>aggagg</i> tcgcaaccATGGCGTCC	60	1239
	fliC_R_SacI	<b>cgagctcg</b> TTAACGCAGCAGCGAGAGCAC		
<i>mobB</i>	mobB_F_RBS_EcoRI	<b>ggaattc</b> <i>aggagg</i> tgaggatcATGCAAGGATTCTG	60	552
	mobB_R_BamHI	<b>aaaggatcc</b> AAAGGATCGCGGTGTCAGACG		
<i>ndk</i>	ndk_F_RBS_KpnI	<b>actggtacc</b> <i>aggagg</i> agttttcATGGCGATCG	58	426
	ndk_R_XbaI	<b>gctctaga</b> TCAACGGGTGTAAACGTTTCATGC		
<i>ppiB</i>	ppiB_F_RBS_EcoRI	<b>ggaattc</b> <i>aggagg</i> gaatgccATGTCCAAG	60	501
	ppiB_R_XbaI	<b>gctctaga</b> TTACTCGACGACCACGGCCTT		
<i>ppiD</i>	ppiD_F_RBS_EcoRI	<b>ggaattc</b> <i>aggagg</i> agaacatcATGCCAG	60	753
	ppiD_R_XbaI	<b>gctctaga</b> CTACTGCACCAGCGGGCTG		
<i>pvsE</i>	pvsE_F_RBS_EcoRI	<b>ggaattc</b> <i>aggagg</i> gagcgacATGGCAATG	62	1239
	pvsE_R_XbaI	<b>gctctaga</b> TTAGGCTGCAGCATGGGCGTTTTTC		
<i>uspA</i>	uspA_F_RBS_EcoRI	<b>ggaattc</b> <i>aggagg</i> acgtgaccATGATCAAG	60	585
	uspA_R_XbaI	<b>gctctaga</b> CTAACAACCGCTCATCGGGCCT		

\* Se resalta en **negrita** las secuencias blanco de las enzimas de restricción, en **azul** la secuencia Shine-Dalgarno (RBS) y en **mayúsculas** los nucleótidos pertenecientes a la secuencia codificante del gen.

## Manipulación del ADN

Como molde para las reacciones de PCR se emplearon alícuotas de extracciones de ADN genómico de UYMMa02A obtenidas mediante el kit Quick-DNA Fungal/Bacterial Miniprep Kit de ZYMO Research. Las amplificaciones de los genes a clonar se llevaron a cabo de acuerdo al protocolo recomendado por el fabricante de la ADN polimerasa utilizada (Thermo Fisher Phusion High-Fidelity DNA Polymerase). Cada reacción de 50 µl se preparó con 0,02 U/µL de polimerasa, 0,5 µM de cada cebador, 200 µM de cada dNTP, 3% de DMSO, entre 0,1 y 1 µg de ADN molde y 1X de Phusion™ HF Buffer. Se usó H<sub>2</sub>O mQ para completar el volumen final. Se utilizaron distintos programas de PCR dependiendo de la dupla de cebadores (Tabla 2), el tamaño del gen blanco y el ciclado recomendado por el fabricante de la polimerasa: un ciclo de desnaturalización inicial de 30 segundos a 98°C, seguido de 25 ciclos de desnaturalización de 10 segundos a 98°C, hibridación de cebadores de 30 segundos a la temperatura adecuada para cada pareja, una extensión a 72°C entre 30 segundos y 2 minutos, y por último un ciclo de extensión final de 10 minutos a 72°C. La purificación de los amplicones se realizó mediante extracción de banda de gel con el kit Purelink de Thermo Fisher Scientific.

Para realizar las digestiones en los extremos de los fragmentos amplificados y en el vector, se utilizaron las enzimas de restricción *Bam*HI, *Eco*RI, *Kpn*I, *Sac*I y *Xba*I, y para las ligaciones se usó la enzima T4 ligasa, todas de New England Biolabs. En todos los casos se realizó el procedimiento estándar establecido por el fabricante.

Para corroborar la presencia de las construcciones recombinantes se realizó una amplificación utilizando el primer forward del gen a verificar y el cebador PS2, complementario a la secuencia del vector pSEVA (Silva-Rocha et al., 2013). Como molde se usó 5 µl de una suspensión obtenida a partir de una ansada de células resuspendidas en 100 µl de H<sub>2</sub>O mQ. La amplificación se realizó con la enzima Taq de BIORON, siguiendo las recomendaciones del fabricante. La extracción de los plásmidos se realizó empleando el kit comercial PureLink Quick Plasmid Miniprep Kit de Thermo Fisher Scientific. Tanto la cuantificación de los amplicones purificados como del ADN plasmídico extraído se realizó en un NanoDrop 1000 de Thermo Fisher Scientific.

La visualización de los amplicones, del ADN plasmídico y de los productos de digestión fue llevada a cabo mediante la electroforesis en gel de agarosa 1%, en buffer TAE 1X, a un voltaje de 100 voltios. Se utilizaron 5 µl de intercalante (GoodView Nucleic Acid Stain, SBS Genetech) por cada 100 ml de agarosa y 2 µl del marcador de peso molecular (GeneRuler 1kb DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific).

### Vector y plásmidos recombinantes construidos en este trabajo

A partir del vector pSEVA238 (Silva-Rocha et al., 2013) se construyeron plásmidos derivados portadores de los distintos genes de interés. Asimismo, se empleó pFO1, plásmido derivado de pSEVA238 portador del gen codificante para la proteína verde fluorescente construido previamente en el Laboratorio (Ocampo, 2017) (Tabla 3).

Se seleccionó el vector pSEVA238 para generar las construcciones recombinantes, ya que posee el sistema de expresión *XylS/Pm*, inducible bajo presencia de 3-metilbenzoato. Brevemente, *XylS* en presencia de 3 metil-benzoato (3MB) es capaz de actuar como proteína activadora de la expresión uniéndose al promotor meta (*Pm*). Además, este vector cuenta con orígenes de transferencia conjugativa (*oriT*) y de replicación de amplio rango de hospedero (*pBBR1*), múltiples sitios de restricción para el clonado de genes bajo el influjo transcripcional de *Pm* y un marcador de resistencia a kanamicina ( $Km^R$ ) para la selección de las células transformadas (Figura 3).

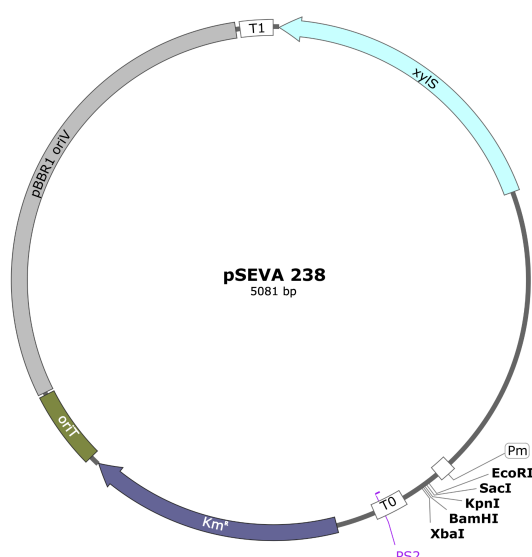


Figura 3. **Mapa esquemático del vector pSEVA238.** *Pm*: promotor inducible por 3MB; T0 y T1: terminadores de la transcripción; PS2: primer reverso complementario a una secuencia cercana al sitio de clonado múltiple; *oriT*: origen de transferencia conjugativa; *pBBR1 oriV*: replicón básico derivado de *pBBR1*. En negrita se destacan las enzimas utilizadas del sitio de policlonado.

Tabla 3. Principales características del vector y de los plásmidos recombinantes construidos

Plásmido	Características
pSEVA238	Presenta el sistema de expresión XylS- <i>Pm</i> , inducible bajo presencia de 3MB, el gen codificante para la resistencia a kanamicina y el origen de replicación pBBR1, que permite el establecimiento del plásmidos en <i>Cupriavidus</i> spp.
pFO1	Derivado de pSEVA 238 que porta el gen que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP) bajo la regulación del <i>Pm</i> (Ocampo, 2017).
pVAacr3	Derivado de pSEVA238 que porta el gen que codifica para Acr3
pVAarsR	Derivado de pSEVA238 que porta el gen que codifica para ArsR
pVAppiB	Derivado de pSEVA238 que porta el gen que codifica para PpiB
pVApvsE	Derivado de pSEVA238 que porta el gen que codifica para PvsE
pVAuspA	Derivado de pSEVA238 que porta el gen que codifica para UspA

### Obtención de células competentes

Quimiocompetentes. A partir de un cultivo de toda la noche (overnight -ON-) de la cepa *E. coli* DH5 $\alpha$ , se realizó una dilución 1/100 a un matraz con medio LB líquido y se incubó a 30°C con agitación hasta alcanzar una DO<sub>600</sub> = 0.3. El cultivo se fraccionó en tubos estériles de 50 ml y se recuperaron las células mediante centrifugación a 3.000 g durante 5 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet correspondiente a 50 ml de cultivo en 20 ml de una solución de CaCl<sub>2</sub> 0,1M frío y se mantuvo en hielo durante 20 minutos. Nuevamente se recuperaron las células centrifugando a 3.000 g durante 5 minutos a 4°C. El sobrenadante se descartó y el pellet se resuspendió en 0,5 ml de CaCl<sub>2</sub> 0,1 M frío. Las células se almacenaron a -80°C en glicerol al 20%.

Electrocompetentes. Se partió de un inóculo de la cepa UYMMa02A en 5 ml de medio LB líquido y se incubó ON a 30°C con agitación. Se tomaron 1,5 ml del cultivo obtenido para centrifugar a 8.000 g durante 2 minutos, se descartó el sobrenadante y las células se lavaron tres veces con 1 ml de H<sub>2</sub>O destilada estéril para finalmente resuspenderlas en 100  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O destilada estéril.

## Mecanismos de adquisición de ADN foráneo

Transformación por choque térmico. Para cada transformación se utilizaron alícuotas de células quimiocompetentes (100  $\mu$ l si eran frescas o 200  $\mu$ l si se encontraban almacenadas con glicerol a  $-80^{\circ}\text{C}$ ) adicionadas de 10  $\mu$ l de cada ligación. Las mezclas se mantuvieron en hielo durante 10 minutos, luego se incubaron en un baño a  $42^{\circ}\text{C}$  durante 90 segundos e inmediatamente se colocaron en hielo durante 2 minutos. Seguidamente se les adicionó 1 ml de medio LB líquido y se incubaron durante 1 hora a  $37^{\circ}\text{C}$  con agitación. Este mismo procedimiento se realizó sin la adición de la mezcla de ligación (control bacteria). Finalmente, se plaquearon alícuotas de 100  $\mu$ l de cada mezcla de transformación y de su correspondiente control bacteria en placas de LB Km y se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 18-24 horas.

Transformación por electroporación. A un volumen de 100  $\mu$ l de células electrocompetentes de UYMMa02A se le adicionó 1  $\mu$ l de ADN plasmídico (50-100 ng/ $\mu$ l). Se utilizaron cubas de electroporación de 1 mm, a las que se les agregaron las células con el ADN plasmídico y se las sometió a un pulso de 1,70 kV en un electroporador MicroPulser de Bio-Rad. Posteriormente, se les adicionó 1 ml de medio LB líquido y se traspasó el volumen a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. La mezcla de transformación se incubó a  $30^{\circ}\text{C}$  con agitación, entre 2 y 4 horas. Este mismo procedimiento se realizó sin la adición de ADN plasmídico (control bacteria). Luego se plaquearon 100  $\mu$ l de cada mezcla de transformación y de su correspondiente control bacteria en placas de LB Km y se incubaron a  $30^{\circ}\text{C}$  durante 24 a 48 horas.

## 4.2 Caracterización fenotípica de las cepas de UYMMa02A portadoras de los plásmidos recombinantes

### Inducción de la transcripción de los genes clonados

En los ensayos de caracterización fenotípica se utilizó una concentración final de 10  $\mu$ M de 3MB como inductor del sistema *XylS/Pm*. Esta concentración fue previamente establecida como óptima para lograr una eficiente expresión génica sin comprometer el crecimiento bacteriano (Ocampo, 2017).

### Curvas de crecimiento

Para evaluar el efecto de la sobreexpresión de los genes clonados, se realizaron curvas de crecimiento durante 48 horas a 30°C, usando placas de 96 pocillos. Para esto, a partir de un cultivo ON en 5 ml de LB Km de las cepas de UYMMa02A portadoras de las distintas construcciones genéticas y se determinó la  $DO_{600}$  con espectrofotómetro para poder partir de cultivos a una  $DO_{600}$  de 0,1. Posteriormente, se colocaron 20  $\mu$ l del cultivo de las cepas a ensayar en una placa de 96 pocillos tipo ELISA (Deltalab, código 900011). Se evaluaron dos condiciones: (i) sin inducción, pocillos conteniendo 180  $\mu$ l de LB Km y (ii) con inducción, pocillos conteniendo 180  $\mu$ l de LB Km y 10  $\mu$ M de 3MB. Se hicieron seis réplicas de cada condición. La placa se colocó en un lector de placas Tecan Sunrise, se incubó durante 48 horas a 30°C con agitación, llevando a cabo medidas de absorbancia a  $DO_{600}$  con un intervalo de 1 hora.

En base a este procedimiento estándar, se analizaron distintas condiciones de crecimiento variando la disponibilidad de nutrientes, la temperatura y la concentración de arsénico. Para analizar el efecto de la disponibilidad de nutrientes, se utilizó medio mínimo M9 con dos fuentes de carbono, citrato y succinato, ya que previamente se determinó que UYMMa02A era capaz de metabolizarlas para su crecimiento (Garabato, 2018). En este caso, los cultivos ON y las placas de ELISA fueron preparados en este mismo medio mínimo. Para evaluar el crecimiento a distintas temperaturas (15, 20, y 35°C) el protocolo base se modificó creciendo el cultivo ON en presencia de 3MB (10  $\mu$ M). Se movió el lector de placas al interior de las estufas para que alcanzaran las temperaturas de interés. Para ensayar la resistencia a arsénico se utilizó  $NaAsO_2$  (arsenito de sodio) a una concentración final de 1, 2 o 3  $\mu$ M. Las cepas portadoras de los plásmidos fueron crecidas en LB Km ON y posteriormente incubadas en presencia del inductor 3MB (10  $\mu$ M) y del metaloide en las concentraciones indicadas.

## Ensayos de movilidad

Para evaluar la movilidad tipo swimming, se partió de cultivos ON en LB Km de las cepas de UYMMa02A portadoras de las distintas construcciones genéticas, que se ajustaron a una  $DO_{600} = 1$ . Luego se inocularon 3  $\mu$ L de la suspensión bacteriana en placas de medio mínimo M9 citrato con una concentración de 0,2% de agar, con y sin la adición de 3MB (10  $\mu$ M). Las placas se incubaron a 30°C durante 24 horas y se midió el área de la zona de swimming. Se hicieron 5 réplicas de cada condición por cada cepa y se tomó el valor promedio del diámetro.

## Resistencia al estrés oxidativo

Se evaluó la sensibilidad al peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$  10 Vol) mediante un ensayo de difusión en disco (Jiang et al., 2019). A partir de cultivos ON en LB Km de las cepas de UYMMa02A portadoras de las distintas construcciones genéticas, se ajustó la  $DO_{600}$  a 1 y se sembraron 100  $\mu$ L de cada cultivo incorporándolos al medio LB Km para obtener un tapiz de células. Se colocaron 3 discos esterilizados Whatman AA con 4  $\mu$ L de  $H_2O_2$  por placa y se incubaron a 30°C durante 24 horas. Se midieron las zonas de inhibición del crecimiento del tapiz. Para cada cepa se evaluó la sensibilidad al peróxido con y sin inducción por 3MB (10  $\mu$ M), realizando cuadruplicados para cada condición. Se tomó el valor promedio del diámetro del halo de inhibición, midiéndose de borde a borde.

## Síntesis de sideróforos

Para detectar la producción de sideróforos se realizó un ensayo en medio cromo azurol-S (CAS) en el que el hierro se encuentra quelado (Anexo). Se partió de cultivos ON en LB Km con 3MB (10  $\mu$ M) de las cepas de UYMMa02A portadoras de las distintas construcciones genéticas, se ajustó la  $DO_{600}$  a 1. Se sembraron gotas de 5  $\mu$ L de cada cultivo en el medio CAS, con y sin la adición de 3MB (10  $\mu$ M), y se incubaron durante 7 días a 30°C. El ensayo se realizó por triplicado para cada condición. La producción de sideróforos se evidenció a través de la aparición de halos anaranjados alrededor del inóculo.



## Análisis estadístico

Para evaluar si la sobreexpresión de los genes de interés tenía un efecto significativo sobre el fenotipo de las cepas recombinantes de UYMMa02A, se realizaron análisis estadísticos mediante pruebas de one-way ANOVA. Se consideraron estadísticamente significativos aquellos casos con p-valores menores a 0,05. Todos los análisis se realizaron utilizando GraphPad Prism versión 10.3.1 para MacOS.

## 5. Resultados

### 5.1 Construcción de vectores para la sobreexpresión de los genes de interés

#### Diseño de los cebadores y amplificación de los genes de interés

Se diseñaron cebadores para 11 genes de UYMMa02A identificados como diferencialmente expresados en distintas condiciones. Con el fin de clonar los fragmentos de ADN amplificados, a cada pareja de cebadores se le adicionó al extremo 5' sitios de corte para distintas enzimas de restricción. A su vez, para asegurar la posterior traducción del transcripto, a cada primer forward se le agregó una secuencia Shine-Dalgarno canónica, 5'-AGGAGG-3' (RBS), ocho nucleótidos upstream del inicio del gen a amplificar (Tabla 2).

Se llevaron a cabo las reacciones de PCR para amplificar los 11 genes de interés a partir del genoma de UYMMa02A y, luego de optimizar las condiciones de reacción para cada par de cebadores, se obtuvo el amplicón del tamaño esperado para cada gen, lo que confirmó la especificidad del diseño (Figura 4).

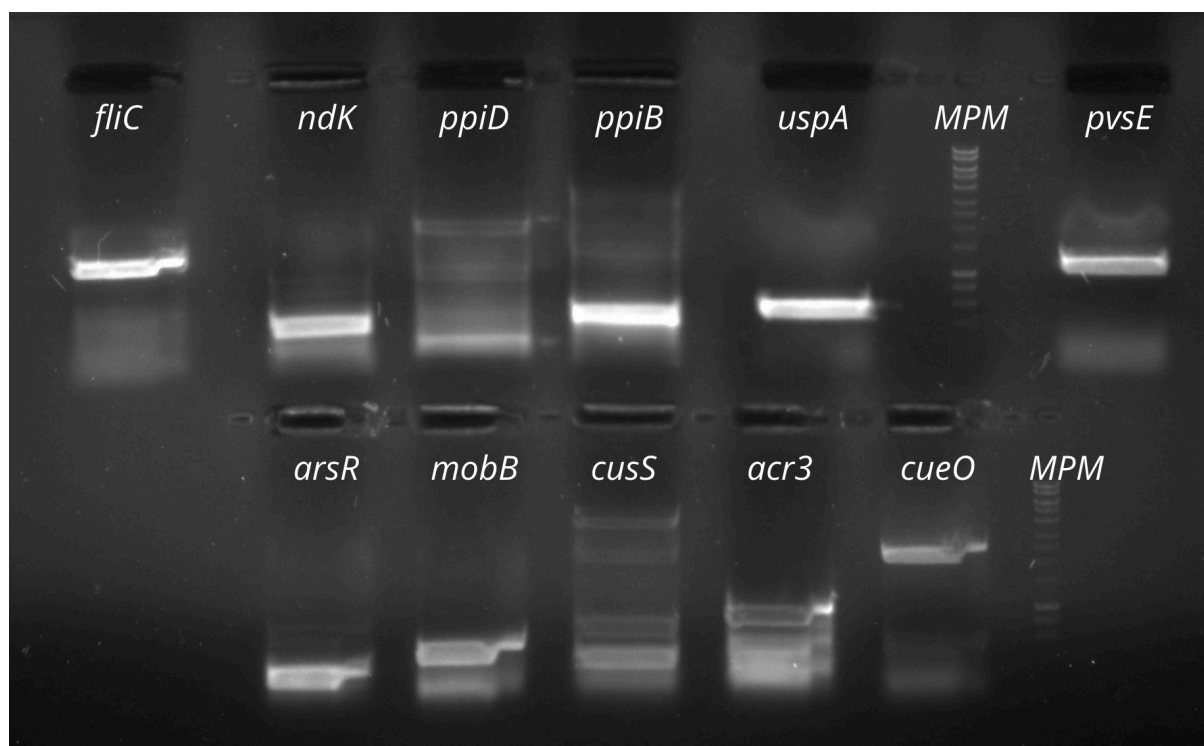


Figura 4. **Amplicones obtenidos de los 11 genes de interés.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de PCR obtenidos tras la amplificación con los cebadores diseñados. MPM: marcador de peso molecular.

## Clonado de los genes de interés

Una vez obtenidos los amplicones, estos fueron purificados, digeridos con las enzimas de restricción correspondientes y clonados en el vector pSEVA238 previamente digerido con las mismas enzimas. Las reacciones de ligación fueron utilizadas para transformar células quimiocompetentes de *E. coli* DH5 $\alpha$ , seleccionando los clones resistentes a kanamicina. Se detectaron aquellos transformantes que portaban plásmidos recombinantes mediante PCR utilizando un cebador específico complementario al gen insertado y uno complementario a la secuencia del vector (PS2). De los 11 experimentos de clonado se confirmó la presencia y la correcta orientación del inserto para cinco de los genes (*acr3*, *arsR*, *ppiB*, *pvsE* y *uspA*) (Figura 5).

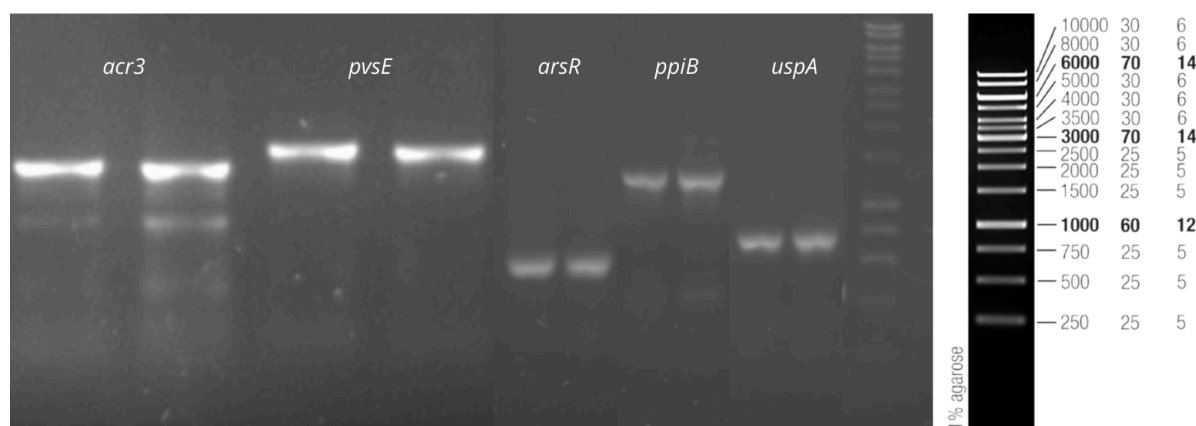


Figura 5. Amplicones obtenidos para verificar la correcta inserción de los genes de interés en pSEVA238. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de PCR obtenidos de dos clones transformantes resistentes a kanamicina de cada experimento. A la derecha se muestra el marcador de peso molecular utilizado.

Posteriormente se purificaron los plásmidos recombinantes y se enviaron para su secuenciación, confirmando así la identidad y la fidelidad de la secuencia de los genes clonados (Figura 6) (Tabla 3). Una vez confirmados, los plásmidos recombinantes fueron introducidos en la cepa UYMMa02A.

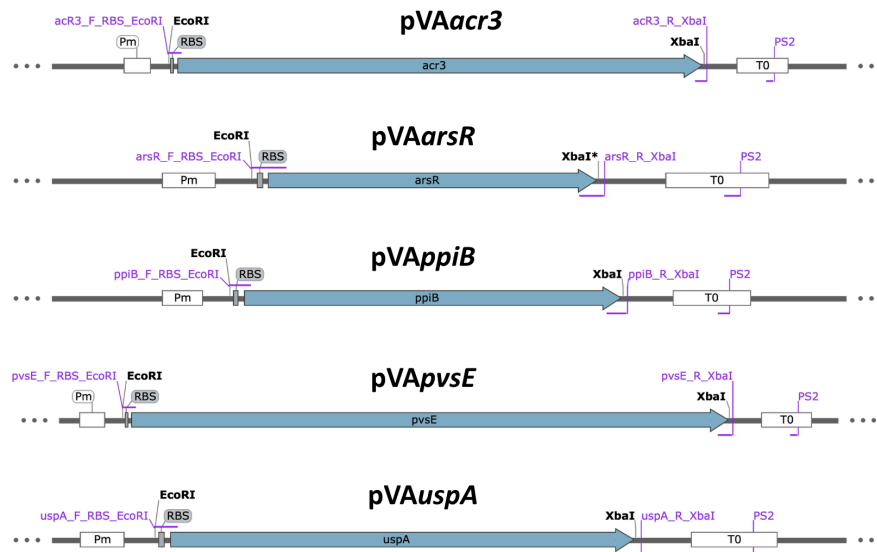


Figura 6. Esquema de los fragmentos portados por los plásmidos recombinantes derivados del vector pSEVA238. Flanqueando cada gen se indican las distintas parejas de cebadores empleadas. Lo restante se consigna como en la Figura 3.

Se lograron obtener cepas de UYMMa02A con los cinco plásmidos generados, las que exhibieron un buen crecimiento. Se procedió entonces a la caracterización fenotípica de los clones resultantes.

## 5.2 Análisis de la sobreexpresión de los genes de interés en UYMMa02A

Se evaluó el efecto de la sobreexpresión de los genes *acr3*, *arsR*, *ppiB*, *pvsE* y *uspA* en la cepa UYMMa02A en condiciones de vida libre. Se realizaron varios ensayos buscando evaluar el efecto de la sobreexpresión de estos genes en diversas condiciones. Concretamente, se analizó, en presencia y en ausencia de inducción, el crecimiento, la movilidad, la resistencia al estrés oxidativo y la síntesis de sideróforos de las cinco cepas. Además, se analizó si la sobreexpresión de los genes *acr3* y *arsR*, cuyos productos están vinculados a la resistencia al arsénico, afectaba la sensibilidad de UYMMa02A a este metaloide.

### Crecimiento de las cepas portadoras de los plásmidos recombinantes

Se evaluó el crecimiento de las cepas recombinantes en diferentes medios de cultivo (LB, M9 citrato y M9 succinato), tanto en presencia como en ausencia del inductor 3MB, como se describe en Materiales y Métodos (Figura 7). En este ensayo se adicionaron dos cepas control, UYMMa02A (pSEVA238), a modo de evidenciar si la presencia de alguno de los genes clonados afectaba el crecimiento, y UYMMa02A (pFO1), como indicador de las condiciones de inducción. En condiciones de ausencia de 3MB, las curvas de crecimiento de las cepas problema fueron muy similares entre sí y a las de las cepas control. Por lo tanto, la presencia de vectores que portan los genes de interés no genera *per se* una alteración sustancial del crecimiento en ninguno de los medios empleados. Se continuó entonces con el análisis del crecimiento bacteriano en presencia del inductor. Las cepas control no vieron alterado su patrón de crecimiento en relación al evidenciado sin inducción, verificando que los controles utilizados funcionan como lo esperado. No se observaron diferencias sustanciales en las curvas de crecimiento entre las cepas control y las cepas portadoras de los plásmidos pVA*ppiB* y pVA*pvsE*, en ninguno de los tres medios ensayados. En M9 citrato las cepas portadoras de los plásmidos pVA*acr3* y pVA*uspA* vieron disminuido su crecimiento. Este efecto se repite en la cepa que sobreexpresa *uspA* al crecer en M9 succinato. En el caso de UYMMa02A (pVA*arsR*), se observaron siempre densidades ópticas finales más bajas que las alcanzadas por la cepa en condiciones de no inducción. Por lo tanto, la sobreexpresión del gen *arsR* estaría afectando el crecimiento de UYMMa02A independientemente de las condiciones de cultivo. De acuerdo a lo esperado, en los ensayos realizados en condiciones de inducción se registró fluorescencia de la cepa UYMMa02A (pFO1) (ejemplo en la Figura 10b).

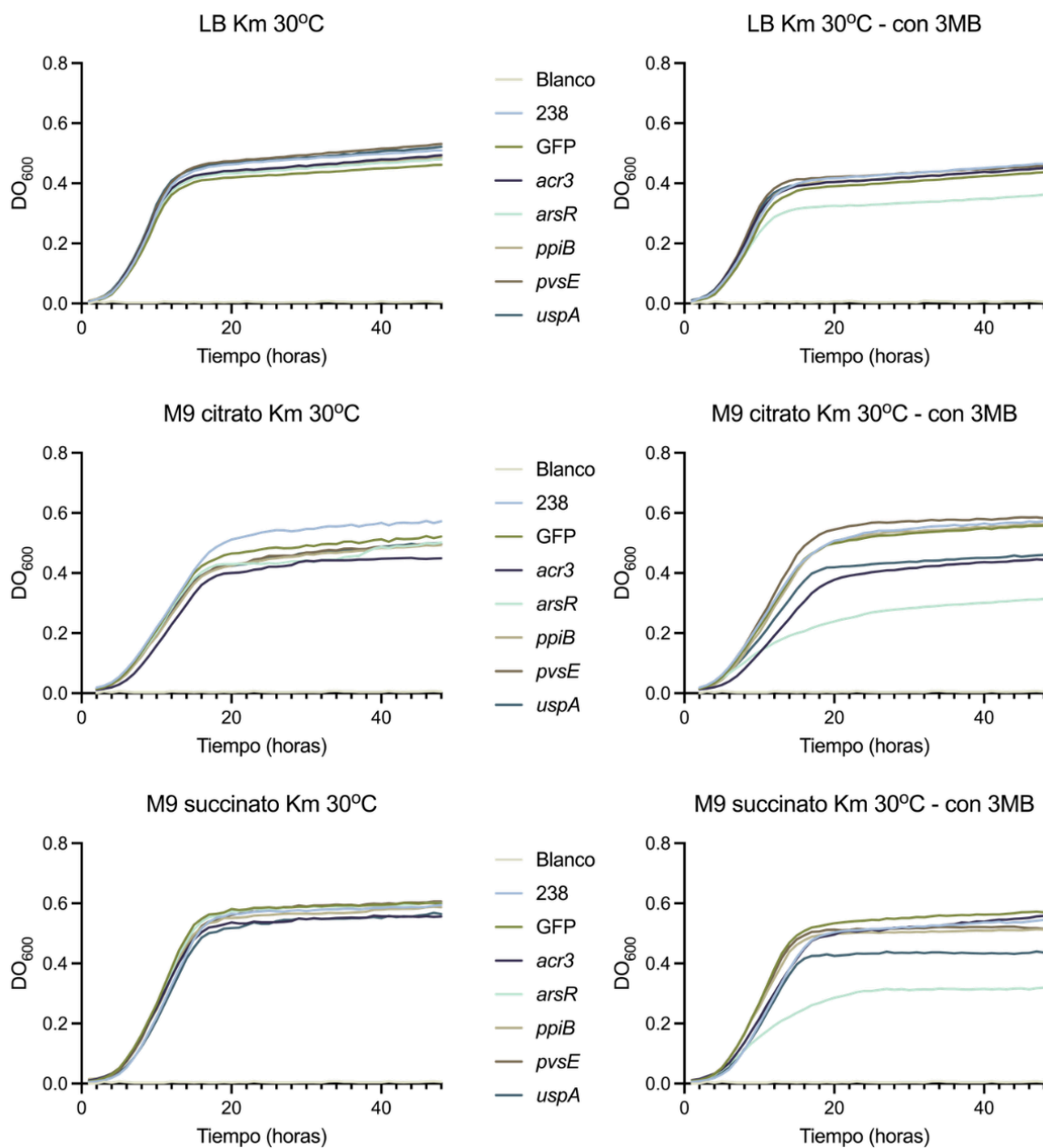


Figura 7. **Análisis del crecimiento de las cepas problema en distintos medios de cultivo con y sin inducción.** Con distintos colores se consignan las curvas de crecimiento de las cepas de UYMMa02A portadoras de los plásmidos recombinantes (*acr3*: pVA*acr3*, *arsR*: pVA*arsR*, *ppiB*: pVA*ppiB*, *pvsE*: pVA*pvsE*, *uspA*: pVA*uspA*), del vector pSEVA238 (238) y del plásmido pFO1 (GFP). Blanco: control sin inocular.

Además, se evaluó el crecimiento de las cepas portadoras de las construcciones recombinantes a temperaturas por encima y por debajo de la óptima para UYMMa02A (30°C) (manuscrito en preparación). Concretamente, se ensayó el crecimiento a 15°C, 20°C, y 35°C en presencia del inductor 3MB (Figura 8). Se utilizaron como control las cepas con el plásmido vacío UYMMa02A (pSEVA238) y la cepa que tiene al gen *gfp* clonado en pSEVA238; UYMMa02A (pFO1). Las curvas de crecimiento a 20°C fueron similares a las obtenidas a 30°C, por lo que esta disminución en la temperatura no afectaría mayormente el crecimiento de las cepas control y las cepas problema, a excepción de UYMMa02A (pVAarsR) (Figura 7). Por el contrario, tanto a 15°C como a 35°C, las curvas fueron notoriamente distintas a las obtenidas a la temperatura óptima, evidenciándose un menor crecimiento de todas las cepas ensayadas. Particularmente, a 15°C las cepas alcanzaron una densidad óptica de 0,4, mientras que al subir la temperatura a 35°C ninguna fue capaz de superar esta DO. A su vez, a estas dos temperaturas, la cepa portadora de pVAarsR creció mucho menos en relación al resto de las cepas (Figura 8).

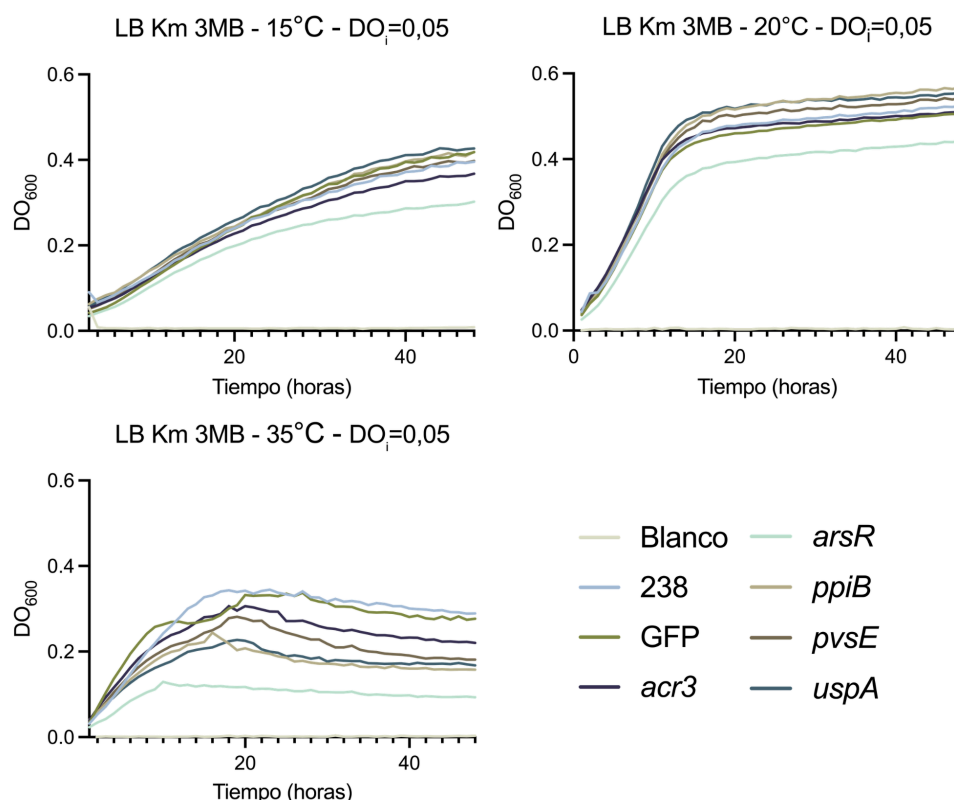


Figura 8. **Análisis del crecimiento de las cepas problema en distintas temperaturas en condiciones de inducción.** Con distintos colores se consignan las curvas de crecimiento de las cepas de UYMMa02A portadoras de los plásmidos recombinantes (*acr3*: pVA*acr3*, *arsR*: pVA*arsR*, *ppiB*: pVA*ppiB*, *pvsE*: pVA*pvsE*, *uspA*: pVA*uspA*), del vector pSEVA238 (238) y del plásmido pFO1 (GFP). Blanco: control sin inocular.

## Movilidad de tipo swimming

En el ensayo de movilidad, la mayoría de las cepas problema no mostraron diferencias significativas en el diámetro de la zona de swimming respecto a la cepa control portadora del plásmido vacío, UYMMa02A (pSEVA238), tanto en presencia como en ausencia del inductor (Figura 9). La excepción fue la cepa UYMMa02A (pVA*arsR*), la cual presentó una disminución marcada en el tamaño del halo en presencia de 3MB, lo que indicaría un efecto negativo de la sobreexpresión de *arsR* sobre la movilidad.

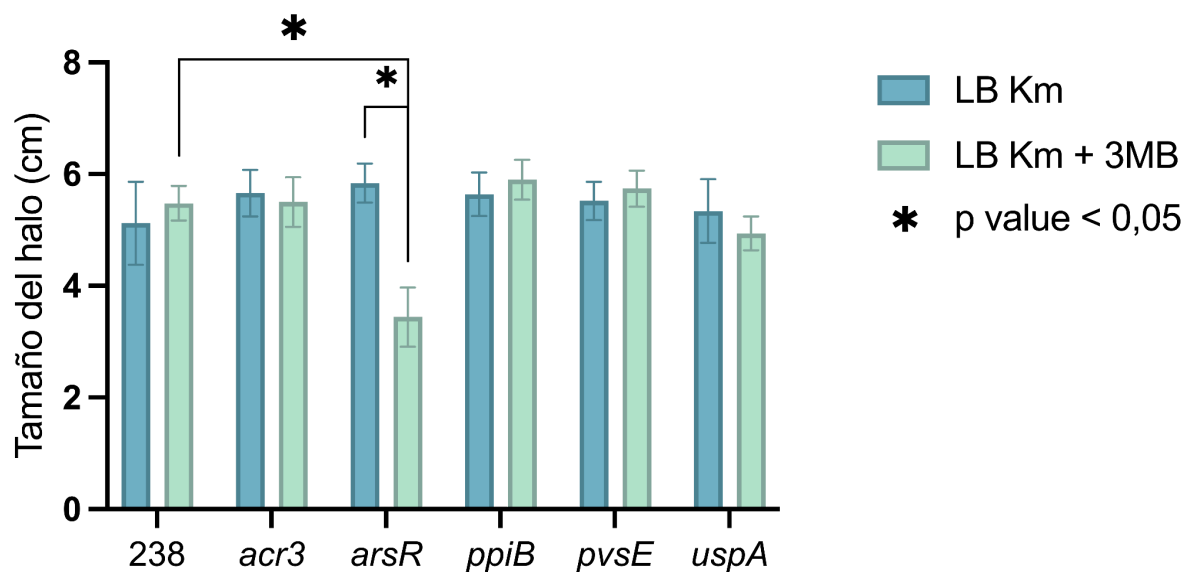


Figura 9. **Análisis de la movilidad de tipo swimming de las cepas problema con y sin inducción.** Se indica el diámetro promedio de las zonas de movilidad de las cepas de UYMMa02A portadoras de los plásmidos recombinantes (*acr3*: pVA*acr3*, *arsR*: pVA*arsR*, *ppiB*: pVA*ppiB*, *pvsE*: pVA*pvsE*, *uspA*: pVA*uspA*) y control (238: pSEVA238).



## Resistencia al estrés oxidativo

Se evaluó la resistencia de las cepas derivadas de UYMMa02A al estrés oxidativo, mediante la exposición a peróxido de hidrógeno concentrado en presencia del inductor (Figura 10). Las cepas portadoras de las construcciones recombinantes no mostraron diferencias significativas en la sensibilidad, frente a lo observado en el control, UYMMa02A (pSEVA238). Sin embargo, la cepa UYMMa02A (pFO1) presentó un halo de inhibición significativamente mayor, lo que indicaría una mayor sensibilidad al peróxido, resultado que ya se ha evidenciado en otros organismos (Ganini et al., 2017; Ragon et al., 2023).

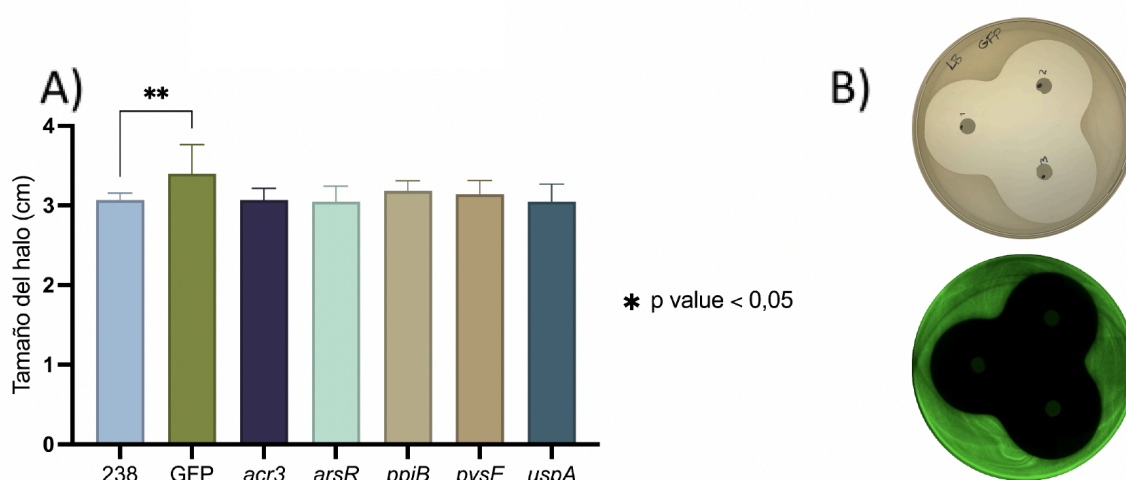


Figura 10. **Análisis de la resistencia al estrés oxidativo de las cepas portadoras de los plásmidos recombinantes.** **A)** Se indica el diámetro promedio de los halos de inhibición del crecimiento generados por discos impregnados con  $H_2O_2$  sobre las distintas cepas de UYMMa02A (*acr3*: pVA*acr3*, *arsR*: pVA*arsR*, *ppiB*: pVA*ppiB*, *pvsE*: pVA*pvsE*, *uspA*: pVA*uspA*) y controles (238: pSEVA238 y GFP: pFO1), en presencia de 3MB. **B)** Halos de inhibición generados por discos impregnados con  $H_2O_2$  sobre la cepa UYMMa02A (pFO1). La imagen superior corresponde a la observación bajo luz blanca; la imagen inferior, a la misma placa visualizada en un transiluminador bajo iluminación azul.

## Síntesis de sideróforos

El ensayo de producción de sideróforos se basa en que el CAS forma un complejo con el hierro que le otorga una coloración azul al medio. Si las bacterias son capaces de secuestrar el hierro de dicho complejo mediante la producción de sideróforos, se produce un viraje de color, observándose un halo de color naranja alrededor de la colonia. Se observó un halo de color naranja alrededor de todas las cepas de UYMMa02A ensayadas, indicando que todas las cepas portadoras de las construcciones recombinantes fueron capaces de producir sideróforos, tanto en presencia como en ausencia de 3MB (Figura 11). No se detectaron diferencias en los tamaños de los halos generados por las distintas cepas y por los correspondientes controles, tanto en ausencia como en presencia de inducción.

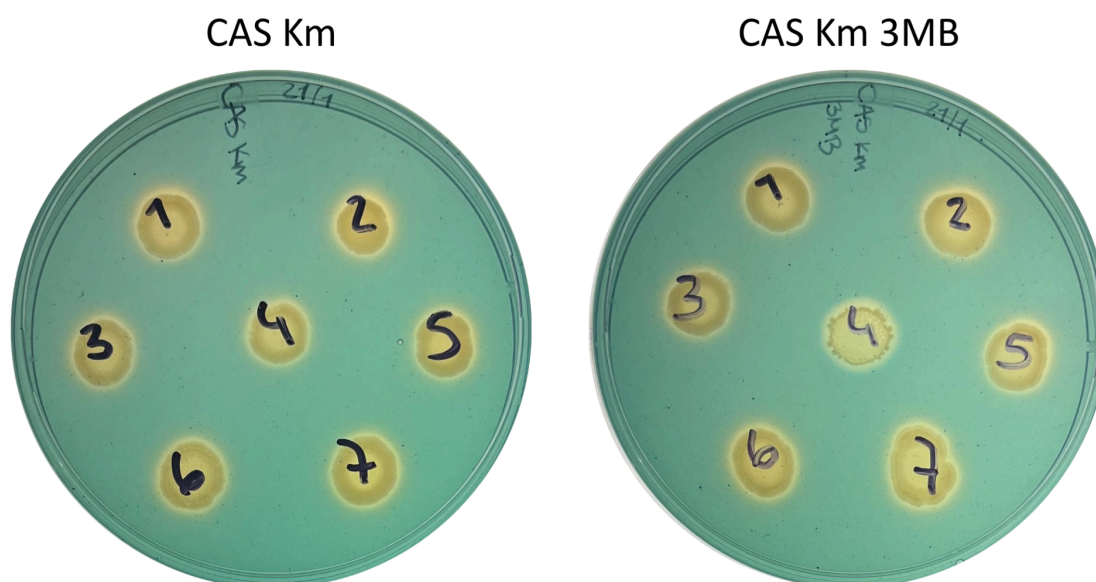


Figura 11. **Análisis de la producción de sideróforos de las cepas de UYMMa02A con y sin inducción.** Se consignan con números las cepas portadoras de los plásmidos: 1, pSEVA238; 2, pFO1; 3, pVAacr3; 4, pVAarsR; 5, pVAppiB; 6, pVApvsE; 7, pVAuspA.

## Análisis de la resistencia al arsénico

Dado que los productos de dos de los genes analizados (*acr3* y *arsR*) estarían hipotéticamente vinculados funcionalmente con la resistencia al arsénico, se realizó un análisis de resistencia a este metaloide en las cepas de UYMMa02A portadoras de las construcciones que sobreexpresaban estos dos genes. Para ello, se realizaron curvas de crecimiento de UYMMa02A (pVA*acr3*) y UYMMa02A (pVA*arsR*) en LB Km suplementado con el inductor 3MB y en presencia de dos concentraciones distintas de arsénico. Como control, se sometió a la cepa UYMMa02A (pSEVA238) a este mismo procedimiento (Figura 12). En presencia de arsénico (2µM), se observa un aumento de la fase lag y una disminución en el crecimiento de la cepa control. La cepa que sobreexpresa el gen *arsR* sigue este mismo comportamiento, mientras que la cepa que porta el plásmido que permite la sobreexpresión de *acr3* muestra una disminución en la fase lag. Además, esta última fue la única capaz de crecer en presencia de 3 µM de este metaloide mostrando densidades ópticas comparables, e incluso mayores, a las alcanzadas sin el metaloide.

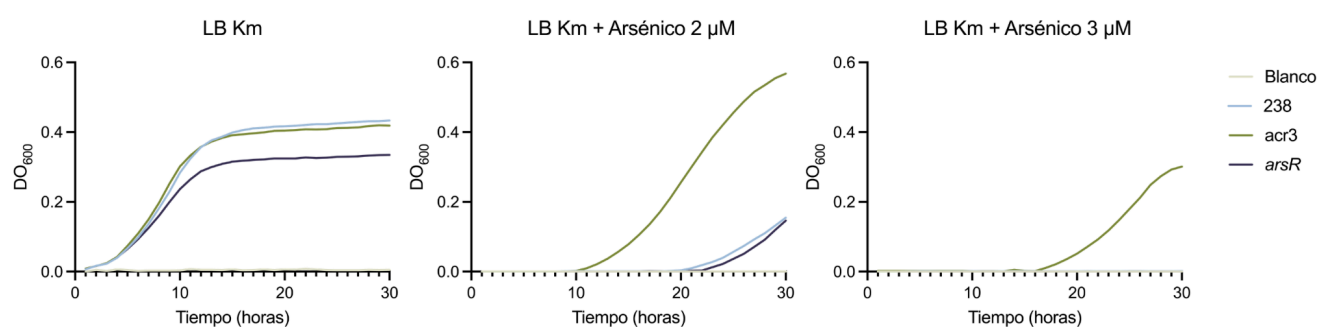


Figura 12. **Análisis de la resistencia al arsénico de las cepas problema en condiciones de inducción.** Curvas de crecimiento de las cepas de UYMMa02A (pSEVA238) (238), UYMMa02A (pVA*acr3*) (*acr3*) y UYMMa02A (pVA*arsR*) (*arsR*). Blanco: control sin inocular.

## 6. Discusión

Los  $\beta$ -rizobios fueron descubiertos recién a inicios de este siglo y su estudio se ha enfocado fundamentalmente en clasificar las especies que los componen, así como en identificar las distintas leguminosas con las que son capaces de asociarse (Paulitsch et al., 2021). Es así que los mecanismos moleculares para el establecimiento de la simbiosis  $\beta$ -rizobio-leguminosa son poco conocidos. En los últimos años nuestro grupo se ha interesado en describir los mecanismos moleculares implicados en los primeros pasos de la interacción entre  $\beta$ -rizobios pertenecientes al género *Cupriavidus* y sus plantas hospederas. Mediante distintas aproximaciones ómicas se logró evidenciar una serie de genes y proteínas diferencialmente expresados en el simbionte bacteriano al ser expuesto a flavonoides, exudados radiculares o la presencia de la planta hospedera (Sandes, 2020; Garabato, 2022; Rodríguez-Esperón et al., 2022, 2023). En este marco, la presente tesina apostó a continuar el análisis de algunos de los genes previamente identificados con el fin de aportar información acerca del rol que cumplen en el establecimiento de la simbiosis *Cupriavidus-Mimosa*. Para esto se seleccionaron 11 genes de la bacteria modelo *Cupriavidus ariasiae* UYMMa02A, los cuales abarcaban distintas funciones celulares y cuyo rol en la simbiosis no se había reportado aún. El abordaje consistió en construir plásmidos recombinantes que sobreexpresaran dichos genes en el contexto de UYMMa02A y analizar su impacto sobre distintos parámetros fisiológicos.

Se logró clonar cinco de los once genes seleccionados en el vector pSEVA238, de forma que quedaran bajo el control del sistema *XylS/Pm*, y así poder evaluar el impacto de su sobreexpresión en el crecimiento, la movilidad, la producción de sideróforos y la tolerancia frente a metales y estrés oxidativo. Cabe aclarar que uno de los objetivos iniciales de este trabajo era evaluar el impacto de la sobreexpresión de los genes seleccionados durante el establecimiento de la simbiosis *Cupriavidus-Mimosa*, realizando ensayos en plantas de *M. pudica*. Sin embargo, durante las primeras etapas de la investigación, se constató que UYMMa02A no mantiene de forma estable al plásmido pSEVA238 en ausencia del antibiótico (datos no mostrados), de modo que se intentó contrarrestar esta limitación realizando ensayos en planta en presencia de kanamicina. Sin embargo, se observó que la presencia del antibiótico afectaba el desarrollo de *M. pudica*, disminuyendo el crecimiento radicular e inhibiendo la formación de raíces secundarias (datos no mostrados), efectos que han sido reportados en otras especies vegetales (Colby & Meredith, 1990; Duan et al., 2009). En consecuencia, la imposibilidad de combinar la presión antibiótica para el mantenimiento

de las construcciones recombinantes con el correcto desarrollo de la planta impidió avanzar en la caracterización fenotípica de las cepas sobreexpresantes durante la simbiosis.

Por lo tanto, se continuó el trabajo realizando una caracterización fisiológica de las cepas portadoras de los plásmidos recombinantes en vida libre, variando distintos parámetros de su cultivo. Un primer aspecto a destacar de este trabajo es que se logró validar el sistema de expresión *XylS/Pm* para inducir la expresión de genes propios en *C. ariasiae* UYMMa02A, constituyendo el primer registro de su implementación con este fin en un  $\beta$ -rizobio. El uso del sistema de regulación *XylS/Pm* permitió modular de manera controlada la expresión de los genes clonados mediante la adición de 3MB, lo que se pudo corroborar mediante la expresión del gen reportero *gfp* y los efectos fenotípicos específicos observados en algunas de las cepas recombinantes. Este resultado no solo permite validar la funcionalidad del sistema en este género, sino que también amplía el repertorio de herramientas disponibles para el estudio de  $\beta$ -rizobios. Un segundo aspecto a resaltar es que la mera presencia de los plásmidos recombinantes no impactó de forma significativa en el crecimiento de UYMMa02A, indicando que el sistema no conlleva una carga metabólica excesiva sobre la bacteria, validando la estrategia seleccionada. Este resultado es muy importante ya que nos permite atribuir los efectos fisiológicos observados en condiciones de inducción, a la sobreexpresión de los genes seleccionados y no a la presencia de los plásmidos. De esta manera, se cumplió con el primer objetivo de este trabajo, el cual consistía en generar una colección de vectores plasmídicos que permitieran la expresión controlada de genes propios en *C. ariasiae* UYMMa02A.

Para cumplir con el segundo objetivo, en base a la función a la que se vinculan algunos de los genes seleccionados, se incluyeron en este trabajo los ensayos para evidenciar la síntesis de sideróforos (*pvsE*), la resistencia a condiciones de estrés (temperatura, pH, peróxido de hidrógeno, genes *uspA* y *ppiB*) y la resistencia a arsénico (*acr3* y *arsR*), buscando detectar si la sobreexpresión de los mismos tenía un efecto sobre dichas funciones.

En cuanto al crecimiento, se evaluó el comportamiento de las cepas de UYMMa02A portadoras de las cinco construcciones en presencia de distintos nutrientes. Partiendo de la base de que ninguna de las cepas recombinantes vieron afectado su crecimiento en condiciones de no inducción, se evaluó el efecto de la sobreexpresión de los genes clonados mediante el monitoreo de la densidad óptica de los cultivos en función del tiempo (Figura 7). Por un lado, no se detectaron cambios en el perfil de crecimiento de UYMMa02A frente a la

sobreexpresión de dos de los genes ensayados, *ppiB* y *pvsE*. Sin embargo, la disminución en el crecimiento en medios mínimos al sobreexpresar *uspA* es un efecto que ya fue observado en *E. coli* (Nyström y Neidhardt, 1996). La función exacta de esta proteína no se conoce, aunque sí se sabe que se induce su expresión en condiciones de estrés (Kvint et al., 2003b). UYMMa02A posee al menos cinco parálogos de este gen, dos de los cuales se ven inducidos en presencia de la planta hospedera (Rodríguez-Espérón et al., 2023).

En el caso de la cepa UYMMa02A (pVA*arsR*), la misma presentó menores densidades ópticas finales en todas las condiciones ensayadas, evidenciando que la sobreexpresión del gen *arsR* genera un efecto negativo sobre el crecimiento. Este mismo comportamiento se observó a distintas temperaturas (Figura 8). Algo similar sucedió al evaluar el efecto de la sobreexpresión de los genes seleccionados sobre la movilidad de tipo swimming (Figura 9). La cepa UYMMa02A (pVA*arsR*) fue la única que mostró una reducción marcada en el tamaño del halo de crecimiento en presencia de 3MB, lo que podría interpretarse como un efecto negativo de la sobreexpresión de *arsR* sobre la movilidad. En este sentido, se ha demostrado que un regulador transcripcional de la familia ArsR es capaz de regular negativamente la movilidad en *Bacillus thuringiensis* (Zhang et al., 2024). Sin embargo, dado que en las curvas de crecimiento esta misma cepa exhibió menores densidades ópticas finales, la disminución observada en la movilidad también podría ser consecuencia de un menor crecimiento bacteriano.

Dentro de los genes clonados se encontraban algunos cuyos productos se asocian a la respuesta al estrés, como *ppiB* (codificante para una peptidil-prolil isomerasa involucrada en el plegamiento de proteínas) y *uspA* (codificante para una proteína universal de estrés), por lo que se evaluó el “fitness” de las cepas bajo condiciones de estrés térmico y oxidativo. Sin embargo, en ninguno de los dos casos se evidenció una relación entre la sobreexpresión de estos genes y una mayor tolerancia a dichas condiciones (Figuras 8 y 10). La falta de un cambio detectable en el fitness de las cepas recombinantes podría deberse a que la sobreexpresión de componentes individuales dentro de un sistema de respuesta a estrés no sea suficiente para generar cambios fenotípicos detectables o que no se hayan seleccionado los ensayos adecuados para evidenciarlos. En *E. coli* el gen *uspA* está involucrado en la resistencia al estrés oxidativo, al igual que el parálogo *uspD* (Nachin et al., 2005). En el genoma de UYMMa02A existen al menos cinco genes anotados como codificantes para proteínas UspA, por lo que es posible que otra de estas proteínas sea la involucrada en la resistencia al estrés oxidativo.

En cuanto al ensayo de producción de sideróforos, se esperaba que la sobreexpresión de *pvsE* tuviera un efecto, sin embargo no se observaron cambios en presencia de 3MB (Figura 11). Esta ausencia de cambio se podría explicar dado que el resto de los genes de la vía de síntesis de la vibioferrina mantienen su sistema de expresión natural, la cual es regulada por la presencia de hierro en el medio de cultivo. El medio CAS contiene hierro quelado, por lo que no se encuentra disponible para la bacteria a menos que produzca sideróforos para su captación, es así que se puede suponer que una vez que se obtienen los niveles de hierro necesarios para mantener las funciones celulares, el resto de los genes del operón se ven reprimidos, evidenciando que la sobreexpresión de *pvsE* no es suficiente para aumentar la producción total de sideróforos.

Por último, dentro de los genes evaluados se ensayaron dos que están funcionalmente vinculados con la resistencia al arsénico; *acr3* y *arsR* (Li et al., 2014). En los ensayos de tolerancia a este metaloide se observó que su presencia afectó el crecimiento inicial de todas las cepas, evidenciado por un aumento de la fase de latencia (Figura 12). Sin embargo, la cepa UYMMa02A (pVA*acr3*) mostró una recuperación más rápida y alcanzó densidades ópticas finales comparables o incluso superiores a las obtenidas en ausencia de arsénico, lo que sugiere que la sobreexpresión de *acr3* confiere una ventaja adaptativa frente a este estrés. Este resultado concuerda con la función propuesta para Acr3, una permeasa de expulsión de arseniato, por lo que su sobreexpresión permitiría reducir más rápidamente la concentración intracelular del metaloide, disminuyendo el tiempo necesario para que la célula restablezca su homeostasis y continúe su crecimiento. Por el contrario, la cepa UYMMa02A (pVA*arsR*) no mostró mejoras, manteniendo una curva de crecimiento similar al control con el plásmido vacío, lo que sugiere que la sobreexpresión de este regulador transcripcional no confiere una ventaja en estas condiciones. Este comportamiento resulta coherente con el rol conocido de ArsR como represor del operón *ars* de resistencia al arsénico, cuyo incremento en la expresión intensificaría entonces la represión de los genes involucrados en la detoxificación del metaloide.

En la figura 13 se resumen los resultados obtenidos. En términos generales, se puede observar que la sobreexpresión de los genes seleccionados provocó mayormente cambios sutiles en los parámetros evaluados. No obstante, la sobreexpresión de *acr3* y *arsR*, ambos vinculados a la resistencia al arsénico, resultó en la alteración de una o más de las condiciones ensayadas. Cabe mencionar que en los estudios de Klonowska, et al. (2018) y Rodríguez-Esperón, et al. (2022) se detectó la expresión diferencial de genes vinculados a la resistencia a distintos

metales, tales como cobre o hierro, cuando cepas de *C. taiwanensis* y *C. necator* se expusieron a exudados radiculares de *M. pudica* (Klonowska et al., 2018) o a flavonoides inductores (Rodríguez-Esperón et al., 2022), pero no se había reportado antes una respuesta vinculada a la resistencia al arsénico. Dado que UYMMa02A no pertenece a ninguna de las especies de *Cupriavidus* descritas hasta el momento, no se descarta que los productos de los genes *acr3* y *arsR* puedan cumplir un rol especie-específico en el establecimiento de la simbiosis.

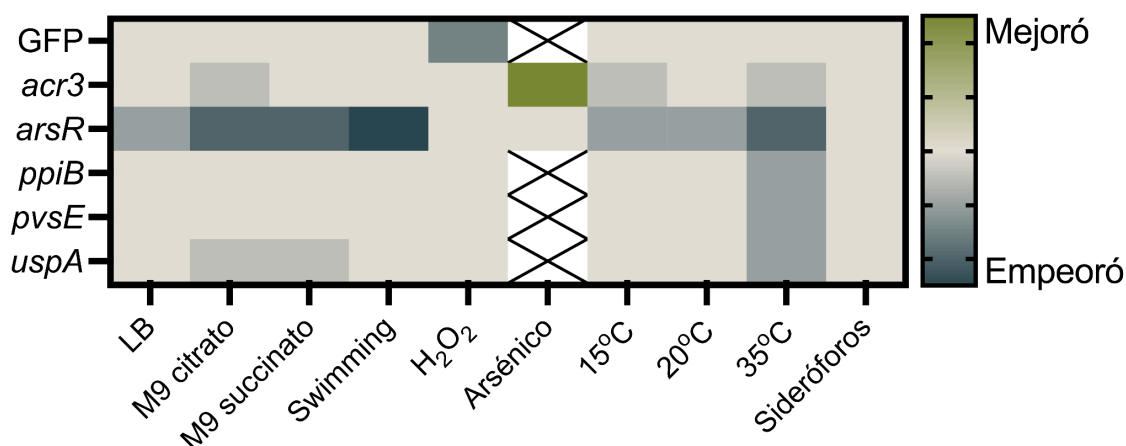


Figura 13. Comportamiento en los distintos ensayos de las cepas portadoras de los plásmidos recombinantes en comparación con la cepa UYMMa02A (pSEVA238). Cruz, no ensayado.

Uno de los aspectos más destacables observados en este trabajo es que la sobreexpresión de *arsR* en UYMMa02A afectó varios de los parámetros fisiológicos ensayados, sugiriendo un posible efecto pleiotrópico de este regulador. Este comportamiento ya se ha reportado en *Agrobacterium tumefaciens* 5A, un  $\alpha$ -rizobio, donde el regulador ArsR fue descrito como un modulador global de la expresión génica más allá del operón de resistencia al arsénico (Rawle et al., 2021). En dicho estudio, análisis transcriptómicos revelaron que *arsR* regularía un conjunto amplio de genes implicados no solo en la detoxificación de metales, sino también en procesos como el transporte de nutrientes, la adquisición de hierro, la quimiotaxis y la respuesta al estrés, sugiriendo entonces que cumple un rol global en la homeostasis celular. En este sentido, los efectos observados en UYMMa02A (pVA*arsR*) podrían deberse a alteraciones indirectas en funciones reguladas por ArsR. Esto sugiere que ArsR podría cumplir un papel regulador más amplio en UYMMa02A, respondiendo a distintas señales ambientales y modulando rutas metabólicas relevantes para el establecimiento de la simbiosis. Ciertamente se requieren más ensayos para dilucidar el rol de este regulador durante la simbiosis.



## 7. Conclusión

En este trabajo se realizó una primera aproximación sobre la función de genes posiblemente involucrados en el establecimiento de la simbiosis *Cupriavidus-Mimosa*. Para ello, se realizó la sobreexpresión de genes seleccionados utilizando un vector de tipo SEVA en el simbionte bacteriano. Los resultados obtenidos permitieron validar por primera vez en un  $\beta$ -rizobio la funcionalidad del sistema XylS/*Pm* para la expresión de genes propios de la bacteria. Si bien este sistema había sido previamente ensayado con un gen reportero (*gfp*), los experimentos realizados demuestran que también es capaz de modular la expresión de genes endógenos de *C. ariasiae* UYMMa02A, constituyendo una herramienta valiosa para futuros estudios. Además, se logró demostrar experimentalmente que Acr3 participa en la detoxificación de arsénico en UYMMa02A, validando su función esperada por secuencia y homología. Finalmente, este trabajo reveló que el regulador transcripcional ArsR tendría un efecto global sobre las funciones celulares de UYMMa02A, siendo un hallazgo novedoso para el grupo de los  $\beta$ -rizobios.

## 8. Referencias bibliográficas

- Amadou, C., Pascal, G., Mangenot, S., Glew, M., Bontemps, C., Capela, D., Carrère, S., Cruveiller, S., Dossat, C., Lajus, A., Marchetti, M., Poinso, V., Rouy, Z., Servin, B., Saad, M., Schenowitz, C., Barbe, V., Batut, J., Médigue, C., & Masson-Boivin, C. (2008). Genome sequence of the  $\beta$ -rhizobium *Cupriavidus taiwanensis* and comparative genomics of rhizobia. *Genome Research*, 18(9), 1472-1483. <https://doi.org/10.1101/gr.076448.108>
- Azani, N., Babineau, M., Bailey, C. D., Banks, H., Barbosa, A. R., Pinto, R. B., Boatwright, J. S., Borges, L. M., Brown, G. K., Bruneau, A., Candido, E., Cardoso, D., Chung, K.-F., Clark, R. P., Conceição, A. de S., Crisp, M., Cubas, P., Delgado-Salinas, A., Dexter, K. G., ... Zimmerman, E. (2017). A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny: The Legume Phylogeny Working Group (LPWG). *TAXON*, 66(1), 44-77. <https://doi.org/10.12705/661.3>
- Azcón-Bieto, J., & Talón, M. (2013). *Fundamentos de Fisiología Vegetal* (2da ed.).
- Aziz, R. K., Bartels, D., Best, A. A., DeJongh, M., Disz, T., Edwards, R. A., Formsma, K., Gerdes, S., Glass, E. M., Kubal, M., Meyer, F., Olsen, G. J., Olson, R., Osterman, A. L., Overbeek, R. A., McNeil, L. K., Paarmann, D., Paczian, T., Parrello, B., ... Zagnitko, O. (2008). The RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology. *BMC Genomics*, 9(1), 75. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-75>
- Badri, D. V., Weir, T. L., van der Lelie, D., & Vivanco, J. M. (2009). Rhizosphere chemical dialogues: Plant-microbe interactions. *Current Opinion in Biotechnology*, 20(6), 642-650. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2009.09.014>
- Chen, W. M., Laevens, S., Lee, T. M., Coenye, T., De Vos, P., Mergeay, M., & Vandamme, P. (2001). *Ralstonia taiwanensis* sp. Nov., isolated from root nodules of Mimosa species and sputum of a cystic fibrosis patient. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(Pt 5), 1729-1735. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-5-1729>
- Colby, S. M., & Meredith, C. P. (1990). Kanamycin sensitivity of cultured tissues of Vitis. *Plant Cell Reports*, 9(5), 237-240. <https://doi.org/10.1007/BF00232291>
- Crews, T. E., & Peoples, M. B. (2004). Legume versus fertilizer sources of nitrogen: Ecological tradeoffs and human needs. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 102(3), 279-297. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2003.09.018>
- da Silva, K., Florentino, L. A., da Silva, K. B., de Brandt, E., Vandamme, P., & de Souza Moreira, F. M. (2012). *Cupriavidus necator* isolates are able to fix nitrogen in symbiosis with different legume species. *Systematic and Applied Microbiology*, 35(3), 175-182. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2011.10.005>
- Dall'Agnol, R. F., Plotegher, F., Souza, R. C., Mendes, I. C., Dos Reis Junior, F. B., Béna, G., Moulin, L., & Hungria, M. (2016). *Paraburkholderia nodosa* is the main N<sub>2</sub>-fixing species trapped by promiscuous common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in the Brazilian «Cerradão». *FEMS Microbiology Ecology*, 92(8), fiw108. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw108>

- de Bruijn, F. J. (2015). Biological Nitrogen Fixation. En B. Lugtenberg (Ed.), *Principles of Plant-Microbe Interactions: Microbes for Sustainable Agriculture* (pp. 215-224). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-08575-3\\_23](https://doi.org/10.1007/978-3-319-08575-3_23)
- del Solar, G., Alonso, J. C., Espinosa, M., & Díaz-Orejas, R. (1996). Broad-host-range plasmid replication: An open question. *Molecular Microbiology*, 21(4), 661-666. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1996.6611376.x>
- D'Haeze, W., & Holsters, M. (2002). Nod factor structures, responses, and perception during initiation of nodule development. *Glycobiology*, 12(6), 79R-105R. <https://doi.org/10.1093/glycob/12.6.79r>
- dos Reis Jr, F. B., Simon, M. F., Gross, E., Boddey, R. M., Elliott, G. N., Neto, N. E., de Fatima Loureiro, M., de Queiroz, L. P., Scotti, M. R., Chen, W.-M., Norén, A., Rubio, M. C., de Faria, S. M., Bontemps, C., Goi, S. R., Young, J. P. W., Sprent, J. I., & James, E. K. (2010). Nodulation and nitrogen fixation by *Mimosa* spp. In the Cerrado and Caatinga biomes of Brazil. *New Phytologist*, 186(4), 934-946. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03267.x>
- Duan, H., Ding, X., Song, J., Duan, Z., Zhou, Y., & Zhou, C. (2009). *Effects of kanamycin on growth and development of Arabidopsis thaliana seedling, cotyledon and leaf*.
- Eaves, D. J., Palmer, T., & Boxer, D. H. (1997). The product of the molybdenum cofactor gene *mobB* of *Escherichia coli* is a GTP-binding protein. *European Journal of Biochemistry*, 246(3), 690-697. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1997.t01-1-00690.x>
- Ertl, G. (2012). The Arduous Way to the Haber–Bosch Process. *Zeitschrift Für Anorganische Und Allgemeine Chemie*, 638(3-4), 487-489. <https://doi.org/10.1002/zaac.201190458>
- Fabre, S., Gully, D., Poitout, A., Patrel, D., Arrighi, J.-F., Giraud, E., Czernic, P., & Cartieaux, F. (2015). Nod Factor-Independent Nodulation in *Aeschynomene evenia* Required the Common Plant-Microbe Symbiotic Toolkit1. *Plant Physiology*, 169(4), 2654-2664. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01134>
- Franche, C., Lindström, K., & Elmerich, C. (2009). Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant and Soil*, 321(1-2), 35-59. <https://doi.org/10.1007/s11104-008-9833-8>
- Gage, D. J. (2004). Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 68(2), 280-300. <https://doi.org/10.1128/MMBR.68.2.280-300.2004>
- Ganini, D., Leinisch, F., Kumar, A., Jiang, J., Tokar, E. J., Malone, C. C., Petrovich, R. M., & Mason, R. P. (2017). Fluorescent proteins such as eGFP lead to catalytic oxidative stress in cells. *Redox Biology*, 12, 462-468. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.03.002>
- Garabato, F. (2018). *Descripción de nuevos rizobios asociados a leguminosas nativas* [Tesis de Grado]. Facultad de Ciencias, Universidad de la República.
- Garabato, F. (2022). *Estudio de la proteostasis durante el establecimiento de la simbiosis entre un  $\beta$ -rizobio y su leguminosa hospedera* [Tesis de Maestría]. PEDECIBA Biología.
- Gibson, K. E., Kobayashi, H., & Walker, G. C. (2008). Molecular determinants of a symbiotic chronic infection. *Annual Review of Genetics*, 42, 413-441.

- <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.42.110807.091427>
- Giraud, E., Moulin, L., Vallenet, D., Barbe, V., Cytryn, E., Avarre, J.-C., Jaubert, M., Simon, D., Cartieaux, F., Prin, Y., Bena, G., Hannibal, L., Fardoux, J., Kojadinovic, M., Vuillet, L., Lajus, A., Cruveiller, S., Rouy, Z., Mangenot, S., ... Sadowsky, M. (2007). Legumes symbioses: Absence of Nod genes in photosynthetic bradyrhizobia. *Science (New York, N.Y.)*, 316(5829), 1307-1312. <https://doi.org/10.1126/science.1139548>
- Grass, G., & Rensing, C. (2001). CueO Is a Multi-copper Oxidase That Confers Copper Tolerance in *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 286(5), 902-908. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5474>
- Guha, S., Molla, F., Sarkar, M., Ibañez, F., Fabra, A., & DasGupta, M. (2022). Nod factor-independent «crack-entry» symbiosis in dalbergoid legume *Arachis hypogaea*. *Environmental Microbiology*, 24(6), 2732-2746. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15888>
- Hassen, A. I., Lamprecht, S. C., & Bopape, F. L. (2020). Emergence of  $\beta$ -rhizobia as new root nodulating bacteria in legumes and current status of the legume–rhizobium host specificity dogma. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 36(3), 40. <https://doi.org/10.1007/s11274-020-2811-x>
- Herridge, D. F., Peoples, M. B., & Boddey, R. M. (2008). Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. *Plant and Soil*, 311(1-2), 1-18. <https://doi.org/10.1007/s11104-008-9668-3>
- Hirsch, A. M., Lum, M. R., & Downie, J. A. (2001). What Makes the Rhizobia-Legume Symbiosis So Special? *Plant Physiology*, 127(4), 1484-1492. <https://doi.org/10.1104/pp.010866>
- Iriarte, A., Platero, R., Romero, V., Fabiano, E., & Sotelo-Silveira, J. R. (2016). Draft Genome Sequence of *Cupriavidus UYMMa02A*, a Novel Beta-Rhizobium Species. *Genome Announcements*, 4(6), e01258-16. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01258-16>
- Jach, M. E., Sajnaga, E., & Ziaja, M. (2022). Utilization of Legume-Nodule Bacterial Symbiosis in Phytoremediation of Heavy Metal-Contaminated Soils. *Biology*, 11(5), 676. <https://doi.org/10.3390/biology11050676>
- Jain, A., & Srivastava, P. (2013). Broad host range plasmids. *FEMS Microbiology Letters*, 348(2), 87-96. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12241>
- Jiang, G., Yang, J., Li, X., Cao, Y., Liu, X., Ling, J., Wang, H., Zhong, Z., & Zhu, J. (2019). Alkyl hydroperoxide reductase is important for oxidative stress resistance and symbiosis in *Azorhizobium caulinodans*. *FEMS Microbiology Letters*, 366(3), fnz014. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnz014>
- Kereszt, A., Mergaert, P., & Kondorosi, E. (2011). Bacteroid development in legume nodules: Evolution of mutual benefit or of sacrificial victims? *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI*, 24(11), 1300-1309. <https://doi.org/10.1094/MPMI-06-11-0152>
- Klonowska, A., Melkonian, R., Miché, L., Tisseyre, P., & Moulin, L. (2018). Transcriptomic profiling of *Burkholderia phymatum* STM815, *Cupriavidus taiwanensis* LMG19424 and *Rhizobium mesoamericanum* STM3625 in response to *Mimosa pudica* root exudates illuminates the molecular basis of their nodulation competitiveness and symbiotic evolutionary history. *BMC Genomics*, 19(1), 105.

- <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4487-2>
- Kvint, K., Nachin, L., Diez, A., & Nyström, T. (2003a). The bacterial universal stress protein: Function and regulation. *Current Opinion in Microbiology*, 6(2), 140-145. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(03\)00025-0](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(03)00025-0)
- Kvint, K., Nachin, L., Diez, A., & Nyström, T. (2003b). The bacterial universal stress protein: Function and regulation. *Current Opinion in Microbiology*, 6(2), 140-145. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(03\)00025-0](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(03)00025-0)
- Lale, R., Brautaset, T., & Valla, S. (2011). Broad-Host-Range Plasmid Vectors for Gene Expression in Bacteria. En J. A. Williams (Ed.), *Strain Engineering* (Vol. 765, pp. 327-343). Humana Press. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-197-0\\_19](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-197-0_19)
- Li, X., Zhang, L., & Wang, G. (2014). Genomic Evidence Reveals the Extreme Diversity and Wide Distribution of the Arsenic-Related Genes in Burkholderiales. *PLoS ONE*, 9(3), e92236. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092236>
- Lloret, L., & Martínez-Romero, E. (2005). Evolución y filogenia de Rhizobium. *Rev Latinoam Microbiol.*
- Makkar, N. S., & Casida, L. E. (1987). Cupriavidus necator gen. Nov., sp. Nov.; a Nonobligate Bacterial Predator of Bacteria in Soil†. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 37(4), 323-326. <https://doi.org/10.1099/00207713-37-4-323>
- Masson-Boivin, C., & Sachs, J. L. (2018). Symbiotic nitrogen fixation by rhizobia-the roots of a success story. *Current Opinion in Plant Biology*, 44, 7-15. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2017.12.001>
- Mavima, L., Steenkamp, E. T., Beukes, C. W., Palmer, M., De Meyer, S. E., James, E. K., Venter, S. N., & Coetzee, M. P. A. (2025). Estimated timeline for the evolution of symbiotic nitrogen fixing Paraburkholderia. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 213, 108447. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2025.108447>
- Miller, A. J., & Cramer, M. D. (2005). Root Nitrogen Acquisition and Assimilation. *Plant and Soil*, 274(1-2), 1-36. <https://doi.org/10.1007/s11104-004-0965-1>
- Moulin, L., Munive, A., Dreyfus, B., & Boivin-Masson, C. (2001). Nodulation of legumes by members of the beta-subclass of Proteobacteria. *Nature*, 411(6840), 948-950. <https://doi.org/10.1038/35082070>
- Nachin, L., Nannmark, U., & Nyström, T. (2005). Differential Roles of the Universal Stress Proteins of Escherichia coli in Oxidative Stress Resistance, Adhesion, and Motility. *Journal of Bacteriology*, 187(18), 6265-6272. <https://doi.org/10.1128/jb.187.18.6265-6272.2005>
- Nascimento, S. V. do, Herrera, H., Costa, P. H. de O., Trindade, F. C., da Costa, I. R. C., Caldeira, C. F., Gastauer, M., Ramos, S. J., Oliveira, G., & Valadares, R. B. da S. (2022). Molecular Mechanisms Underlying Mimosa acutistipula Success in Amazonian Rehabilitating Minelands. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(21), 14441. <https://doi.org/10.3390/ijerph192114441>
- Nedeljković, M., Sastre, D. E., & Sundberg, E. J. (2021). Bacterial Flagellar Filament: A Supramolecular Multifunctional Nanostructure. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(14), 7521. <https://doi.org/10.3390/ijms22147521>
- Nyström, T., & Neidhardt, F. C. (1996). Effects of overproducing the universal stress protein,

- UspA, in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*, 178(3), 927-930. <https://doi.org/10.1128/jb.178.3.927-930.1996>
- Ocampo, F. (2017). *Puesta a punto de herramientas moleculares estándar para el estudio de Cupriavidus simbiotes de Mimosas nativas* [Tesis de Grado]. Facultad de Ciencias, Universidad de la República.
- Okazaki, S., Tittabutr, P., Teulet, A., Thouin, J., Fardoux, J., Chaintreuil, C., Gully, D., Arrighi, J.-F., Furuta, N., Miwa, H., Yasuda, M., Nouwen, N., Teaumroong, N., & Giraud, E. (2016). Rhizobium-legume symbiosis in the absence of Nod factors: Two possible scenarios with or without the T3SS. *The ISME Journal*, 10(1), 64-74. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.103>
- Paulitsch, F., Dos Reis, F. B., & Hungria, M. (2021). Twenty years of paradigm-breaking studies of taxonomy and symbiotic nitrogen fixation by beta-rhizobia, and indication of Brazil as a hotspot of Paraburkholderia diversity. *Archives of Microbiology*, 203(8), 4785-4803. <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02466-5>
- Pereira-Gómez, M., Ríos, C., Zabaleta, M., Lagurara, P., Galvalisi, U., Iccardi, P., Azziz, G., Battistoni, F., Platero, R., & Fabiano, E. (2020). Native legumes of the Farrapos protected area in Uruguay establish selective associations with rhizobia in their natural habitat. *Soil Biology and Biochemistry*, 148, 107854. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2020.107854>
- Peters, J. W., Fisher, K., & Dean, D. R. (1995). NITROGENASE STRUCTURE AND FUNCTION: A Biochemical-Genetic Perspective. *Annual Review of Microbiology*, 49(Volume 49), 335-366. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.49.100195.002003>
- Platero, R., James, E. K., Rios, C., Iriarte, A., Sandes, L., Zabaleta, M., Battistoni, F., & Fabiano, E. (2016). Novel Cupriavidus Strains Isolated from Root Nodules of Native Uruguayan Mimosa Species. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(11), 3150-3164. <https://doi.org/10.1128/AEM.04142-15>
- Pontel, L. B., & Soncini, F. C. (2009). Alternative periplasmic copper-resistance mechanisms in Gram negative bacteria. *Molecular Microbiology*, 73(2), 212-225. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06763.x>
- Ragon, M., Bertheau, L., Dumont, J., Bellanger, T., Grosselin, M., Basu, M., Pourcelot, E., Horrigue, W., Denimal, E., Marin, A., Vaucher, B., Berland, A., Lepoivre, C., Dupont, S., Beney, L., Davey, H., & Guyot, S. (2023). The Yin-Yang of the Green Fluorescent Protein: Impact on *Saccharomyces cerevisiae* stress resistance. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology*, 238, 112603. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2022.112603>
- Rajkumari, J., Katiyar, P., Dheeman, S., Pandey, P., & Maheshwari, D. K. (2022). The changing paradigm of rhizobial taxonomy and its systematic growth upto postgenomic technologies. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 38(11), 206. <https://doi.org/10.1007/s11274-022-03370-w>
- Rawle, R., Saley, T. C., Kang, Y.-S., Wang, Q., Walk, S., Bothner, B., & McDermott, T. R. (2021). Introducing the ArsR-Regulated Arsenic Stimulon. *Frontiers in Microbiology*, 12, 630562. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.630562>
- Ríos, C. (2014). *Estudio de bacterias simbiotes de leguminosas nativas: Aportes para la conservación de la biodiversidad en un área protegida de Uruguay* [Tesis de Grado].

Facultad de Ciencias, Universidad de la República.

- Rodríguez-Esperón, C. (2023). *Identificación de actores moleculares involucrados en la interacción entre  $\beta$ -rizobios y leguminosas hospederas* [Tesis de Doctorado]. PEDECIBA Biología.
- Rodríguez-Esperón, C., Eastman, G., Sandes, L., Garabato, F., Eastman, I., Iriarte, A., Fabiano, E., Sotelo-Silveira, J. R., & Platero, R. (2022). Genomics and transcriptomics insights into luteolin effects on the beta-rhizobial strain Cupriavidus necator UYPR2.512. *Environmental Microbiology*, 24(1), 240-264. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15845>
- Rodríguez-Esperón, C., Sandes, L., Eastman, I., Croci, C., Garabato, F., Ferreira, V., Baraibar, M., Portela, M., Durán, R., & Platero, R. A. (2023). Nodulation in the absence of nod genes induction: Alternative mechanisms involved in the symbiotic interaction between Cupriavidus sp. UYMMa02A and Mimosa pudica. *Environmental Sustainability*, 6(3), 383-401. <https://doi.org/10.1007/s42398-023-00286-5>
- Sandes, L. (2015). *Análisis de Cupriavidus aislados de mimosas nativas de Uruguay*. [Tesis de Grado]. Facultad de Ciencias, Universidad de la República.
- Sandes, L. (2020). *Bases moleculares de la interacción Cupriavidus Mimosa: Una aproximación proteómica* [Tesis de Maestría]. PEDECIBA Biología.
- Santi, C., Bogusz, D., & Franche, C. (2013). Biological nitrogen fixation in non-legume plants. *Annals of Botany*, 111(5), 743-767. <https://doi.org/10.1093/aob/mct048>
- Sawana, A., Adeolu, M., & Gupta, R. S. (2014). Molecular signatures and phylogenomic analysis of the genus Burkholderia: Proposal for division of this genus into the emended genus Burkholderia containing pathogenic organisms and a new genus Paraburkholderia gen. nov. harboring environmental species. *Frontiers in Genetics*, 5, 429. <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00429>
- Schlaman, H. R., Okker, R. J., & Lugtenberg, B. J. (1992). Regulation of nodulation gene expression by NodD in rhizobia. *Journal of Bacteriology*, 174(16), 5177-5182. <https://doi.org/10.1128/jb.174.16.5177-5182.1992>
- Silva-Rocha, R., Martínez-García, E., Calles, B., Chavarría, M., Arce-Rodríguez, A., De Las Heras, A., Páez-Espino, A. D., Durante-Rodríguez, G., Kim, J., Nikel, P. I., Platero, R., & De Lorenzo, V. (2013). The Standard European Vector Architecture (SEVA): A coherent platform for the analysis and deployment of complex prokaryotic phenotypes. *Nucleic Acids Research*, 41(D1), D666-D675. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1119>
- Simon, M. F., Grether, R., de Queiroz, L. P., Särkinen, T. E., Dutra, V. F., & Hughes, C. E. (2011). The evolutionary history of Mimosa (Leguminosae): Toward a phylogeny of the sensitive plants. *American Journal of Botany*, 98(7), 1201-1221. <https://doi.org/10.3732/ajb.1000520>
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2003). *Plant physiology* (Vol. 91). <https://academic.oup.com/aob/article-lookup/doi/10.1093/aob/mcg079>
- Talbi, C., Delgado, M. J., Girard, L., Ramírez-Trujillo, A., Caballero-Mellado, J., & Bedmar, E. J. (2010). Burkholderia phymatum Strains Capable of Nodulating Phaseolus vulgaris Are Present in Moroccan Soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(13), 4587-4591. <https://doi.org/10.1128/AEM.02886-09>

- Tanabe, T., Mitome, H., Miyamoto, K., Akira, K., Tsujibo, H., Tomoo, K., Nagaoka, K., & Funahashi, T. (2024). Analysis of the vibrioferrin biosynthetic pathway of *Vibrio parahaemolyticus*. *Biometals: An International Journal on the Role of Metal Ions in Biology, Biochemistry, and Medicine*, 37(2), 507-517. <https://doi.org/10.1007/s10534-023-00566-x>
- Taulé, C., Zabaleta, M., Mareque, C., Platero, R., Sanjurjo, L., Sicardi, M., Frioni, L., Battistoni, F., & Fabiano, E. (2012). New Betaproteobacterial *Rhizobium* Strains Able To Efficiently Nodulate *Parapiptadenia rigida* (Benth.) Brenan. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(6), 1692-1700. <https://doi.org/10.1128/AEM.06215-11>
- Ünal, C. M., & Steinert, M. (2014). Microbial Peptidyl-Prolyl cis/trans Isomerases (PPIases): Virulence Factors and Potential Alternative Drug Targets. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* : *MMBR*, 78(3), 544-571. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00015-14>
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M., & Rozen, S. G. (2012). Primer3—New capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*, 40(15), e115. <https://doi.org/10.1093/nar/gks596>
- Vandamme, P., & Coenye, T. (2004). Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: A tale of lost and found. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(Pt 6), 2285-2289. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63247-0>
- Velazquez, E., R. Silva, L., & Peix, A. (2010). Legumes: A Healthy and Ecological Source of Flavonoids. *Current Nutrition & Food Science*, 6(2), 109-144. <https://doi.org/10.2174/157340110791233247>
- Yu, H., Rao, X., & Zhang, K. (2017). Nucleoside diphosphate kinase (Ndk): A pleiotropic effector manipulating bacterial virulence and adaptive responses. *Microbiological Research*, 205, 125-134. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.09.001>
- Zhang, X., Chen, Y., Liu, Y., Gang, L., Yan, T., Wang, H., Peng, Q., Li, J., & Song, F. (2024). A novel regulator CdsR negatively regulates cell motility in *Bacillus thuringiensis*. *Scientific Reports*, 14(1), 25270. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-76694-2>



## Anexo

### Medio LB

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

Para el medio sólido se agrega agar 16 g/L.

### Medio 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
K <sub>2</sub> HPO <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 16 g/L.

## Medio CAS

Componente	Cantidad por litro
Solución salina	100 ml
PIPES	30,24 g
Extracto de levadura desferrado	1 g
MgCl 1M	1 ml
CaCl <sub>2</sub> 0,1M	1 ml
Manitol	1,0 g
Agar	15 g
H <sub>2</sub> O	c.s.p 1 litro
<b>Solución salina</b>	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,3 g
NaCl	0,5 g
NH <sub>4</sub> Cl	1,0 g
H <sub>2</sub> O	100 ml
<b>Solución Colorante</b>	
CAS	60,48 mg
H <sub>2</sub> O	59 ml

Se ajusta el pH del medio base a 6,8 con NaOH 50%, luego se agrega 10 ml/L de glucosa y 6,25 ml/L de glutamato 10%.

Mezclar la solución colorante con 1ml de FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O (135 mg/50 ml en HCl 0,01N) y bajo agitación constante agregarla gota a gota sobre una solución de 72,88 mg de HDTMA en 40ml de H<sub>2</sub>O. Agregar la solución final al medio base justo antes de armar las placas. Previamente al armado de placas todas las soluciones (base, salina y HDTMA) deben esterilizarse a 121°C por 20 minutos.