



Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas – opción Microbiología.
PEDECIBA-UdelaR

IMPORTANCIA DE LOS SISTEMAS DE CAPTACIÓN DE HIERRO UTILIZADOS POR EL ENDÓFITO *Herbaspirillum* *seropedicae* Z67 EN LA COLONIZACIÓN DE PLANTAS DE ARROZ

María Fernanda Trovero

Tutor: Dr. Federico Rosconi
Co-tutor: Dr. Raúl Platero

Departamento de Bioquímica y Genómica Microbianas
Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable
Setiembre 2015

Tribunal: Dr. José Sotelo-Silveira
Dr. Juan Martín Marqués
Dra. María Inés Siri

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar y muy especialmente a Fede, que estuvo conmigo desde mis inicios en la investigación enseñándome y soportándome en todo (y sé que no es tarea fácil! je).

A Rufo, mi co-tutor/tutor, que partiendo de una mano que me dio, terminó cumpliendo su rol con creces.

A todos y cada uno de mis compañeros de BIOGEM, LEM y MICROMOL. También a Guillermo y Coya, por la enorme ayuda que me dieron en los análisis de transcriptómica.

A los colegas del laboratorio de Emanuel M. de Souza en Curitiba-Brasil, que me recibieron en mi pasantía y me ayudaron en todo lo que estuvo a su alcance siempre, a Michelle y Anelis.

A Pao, por aceptarme en la pasantía de microscopía y tener tanta paciencia para enseñarme.

A Sebastián Martínez de INIA Treinta y Tres por cederme gentilmente las semillas de arroz.

A mis padres, que me respaldaron en todo momento, me apoyaron siempre en la carrera que seguí, y aún lo siguen haciendo. Son los mejores del mundo, son mi vida. A toda mi familia y amigos que son casi familia, que aunque la mayoría no entiende mucho lo que hago, igual siempre me da para adelante.

A mis amigos científicos Ine y Guille, porque sin ellos no sería lo que soy, porque nos aguantamos mutuamente la cabeza en épocas de crisis vocacionales y laborales (y personales jeje), y seguimos para adelante.

A mis amigos de Facultad, del liceo, del trabajo y de la vida, que estuvieron siempre, y aunque probablemente nunca lean esta tesis, vaya el agradecimiento para ellos: Vicky, Romi, Mari, Kari, Flo, Pato, Vivi, Noe L., Congo, May, Lu, Caro, Noe O., Ari, Pablito y Agus.

Al tribunal de esta tesis, por sus aportes y devoluciones que me ayudaron a crecer y mejorar.

A todos, GRACIAS TOTALES!!



ÍNDICE DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS.....	1
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	2
ÍNDICE DE FIGURAS.....	4
ÍNDICE DE TABLAS.....	5
RESUMEN.....	6
INTRODUCCIÓN.....	8
¿Qué son los endófitos?.....	9
El arroz: una gramínea de importancia agroeconómica.....	11
Interacción planta-endófito.....	12
Homeostasis del hierro.....	13
Sistemas de adquisición de hierro en microorganismos.....	17
Transportadores TonB-dependientes.....	22
Importancia del hierro.....	22
<i>Herbaspirillum seropedicae</i> como modelo de estudio.....	24
Sistemas de captación de hierro en <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	27
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	30
Estrategia experimental.....	31
MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
Bacterias, plásmidos y condiciones de cultivo.....	33
Extracción de proteínas de membrana.....	34
Identificación de proteínas expresadas diferencialmente.....	35
Obtención de ARN total.....	36
PCR en tiempo real.....	37
Construcción de librerías y secuenciación masiva.....	38
Construcción de mutantes y cepas marcadas.....	40

Ensayos de colonización de la planta de arroz.....	45
Ensayos de microscopía confocal con syto9.....	46
RESULTADOS.....	47
Proteínas de membrana no relacionadas al transporte de serobactinas son diferencialmente expresadas en medios limitados en hierro.....	48
Búsqueda de proteínas de membrana interna relacionadas al metabolismo de hierro mediante análisis genómico y RT-PCR.....	50
Transcripción génica global en respuesta a la restricción de hierro en <i>H. seropedicae</i>	53
Participación de los genes <i>fiu</i> , <i>fecA</i> y Hsero 2720 en la adquisición de hierro.....	55
La capacidad de colonizar individualmente plantas de arroz no se ve afectada en ninguna de las mutantes construidas.....	62
Competencia entre distintas cepas por la colonización de la planta de arroz.....	65
DISCUSIÓN.....	70
Identificación de genes expresados en condiciones limitantes de hierro.....	71
Importancia de los genes identificados in vitro y en interacción con la planta.....	78
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	85
Perspectivas.....	86
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	88
ANEXOS.....	96
Anexo 1. Composición de medios y soluciones.....	97
Anexo 2. Abreviaturas utilizadas.....	102
Anexo 3. Réplicas de geles de SDS-PAGE.....	103
Anexo 4. Resultados de MALDI-TOF.....	104
Anexo 5. Resultados de RT-qPCR.....	112
Anexo 6. Resultados de RNAseq.....	115

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1: Colonización de la raíz de la planta por endófitos.....	10
Fig. 2: Reconstrucción de la interacción arroz-endófito.....	14
Fig. 3: Esquema de la represión mediada por Fur.....	16
Fig. 4: Sistemas de captación de hierro mediado por sideróforos.....	18
Fig. 5: Estructura molecular de distintos tipos de sideróforos.....	19
Fig. 6: Colonización de raíz de arroz por <i>Herbaspirillum seropedicae</i> Z67.....	24
Fig. 7: Estructura molecular lipopeptídica de los sideróforos serobactinas.....	27
Fig. 8: Contexto genómico del casete de biosíntesis de serobactinas.....	28
Fig. 9: Esquema de la PCR cruzada.....	41
Fig. 10: Esquema de la estrategia I de mutagénesis.....	42
Fig. 11: Esquema de la estrategia II de mutagénesis.....	43
Fig. 12: Proteínas de membrana expresadas diferencialmente.....	49
Fig. 13: Contextos genómicos de los genes de RT-qPCR.....	50
Fig. 14: Niveles relativos de expresión de distintos genes por RT-qPCR.....	52
Fig. 15: Niveles de expresión del gen normalizador (16S ARNr).....	52
Fig. 16: Hsero_2720, FecA y Fiu no están involucradas en la adquisición de serobactinas.....	57
Fig. 17: Utilización de diferentes fuentes nutricionales de hierro.....	58
Fig. 18: Curvas de crecimiento en medio TY FeCl ₃ 37 μM y TY DP 100 μM.....	59
Fig. 19: Análisis de la varianza de la DO para las curvas en TY DP 100 μM	60
Fig. 20: Curvas de crecimiento en medio TY FeCl ₃ 37 μM y TY DP 200 μM.....	60
Fig. 21: Análisis de la varianza de la DO para las curvas en TY DP 200 μM	61
Fig. 22: Curvas de crecimiento en medio NFb FeCl ₃ 74 μM y NFb DP 50 μM.....	61
Fig. 23: Colonización individual de la parte aérea de la planta de arroz.....	63
Fig. 24: Colonización de la raíz de arroz por <i>H. seropedicae</i> Z67.....	63
Fig. 25: Colonización de un pelo radicular por <i>H. seropedicae</i> Z67.....	64

Fig. 26: Colonización de un vaso vascular de tallo por la cepa 2343FhuA.....	65
Fig. 27: Colonización de parte aérea de arroz por <i>H. seropedicae</i> Z67.....	65
Fig. 28: Marcado de la mutante 2343FhuA con GFP.....	66
Fig. 29: Curvas de crecimiento en medio TY DP 200 μ M de cepas marcadas y no marcadas.....	68
Fig. 30: Competencia por la colonización de la planta de arroz co-inoculada con dos cepas.....	69

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Contexto genómico del gen de la enzima NRPS (Hsero_2343).....	28
Tabla 2. Cepas y plásmidos.....	33
Tabla 3. Secuencias de cebadores para RT-qPCR.....	38
Tabla 4. Secuencias de cebadores para PCR cruzada.....	41
Tabla 5. Características de todas las mutantes construidas.....	44
Tabla 6. Proteínas diferencialmente expresadas según disponibilidad de hierro.....	48
Tabla 7. Genes sobre-expresados en ausencia de hierro.....	54
Tabla 8. Índices de competitividad.....	69

RESUMEN

Herbaspirillum seropedicae es un endófito diazótrofo utilizado como modelo de estudio de interacciones planta-bacteria, promueve el crecimiento vegetal de maíz, caña de azúcar y arroz, entre otros. Su genoma presenta un significativo número de genes implicados en sistemas de adquisición de hierro, sugiriendo que los mismos son un rasgo importante para el estilo de vida endofítico. La principal estrategia de *H. seropedicae* para sobrevivir en medios limitados en hierro es la producción de sideróforos serobactinas. Aunque dispensables para la colonización, le confieren una ventaja competitiva de supervivencia en el interior de la planta.

Nuestra hipótesis de trabajo propone que *H. seropedicae* utiliza además de las serobactinas, estrategias alternativas para la adquisición de hierro. Para identificar los genes implicados, estudiamos la expresión diferencial de proteínas y de genes a nivel de ARN de la bacteria salvaje creciendo en medios con diferente disponibilidad de hierro. Mediante estos abordajes identificamos dentro del grupo de los genes sobre-expresados en condiciones de hierro limitantes: el gen que codifica para el receptor específico de las serobactinas *fhuA* (Hsero_2345) y la enzima responsable de su biosíntesis (Hsero_2343), los genes de los receptores de membrana externa *fecA* (Hsero_1277) y *fiu* (Hsero_3255) y el gen de una permeasa de alta afinidad para Fe^{2+} (Hsero_2720). Construimos mutantes simples, dobles o triples dirigidas a estos genes, evaluamos su capacidad de crecer en medios con bajo hierro, y de colonizar plantas de arroz de forma individual. Realizamos estudios de competencia entre dos mutantes por la colonización de la planta, marcando una de ellas con GFP.

Los resultados obtenidos indican que *H. seropedicae* Z67 utiliza sistemas alternativos a las serobactinas, donde participan proteínas como FecA, Fiu y la permeasa de Fe^{2+} . Sin embargo, permanecerían desconocidos otros sistemas de adquisición de hierro, que no se pudieron identificar mediante la metodología empleada. Las mutantes carentes en estos genes tendrían un fenotipo de menor crecimiento que la salvaje, y la presencia de ellos le conferiría una ventaja competitiva en la colonización de la planta de arroz; sin embargo, son dispensables en la supervivencia en el interior vegetal.

INTRODUCCIÓN

¿Qué son los endófitos?

Los endófitos son microorganismos (bacterias y hongos) capaces de colonizar activamente y sobrevivir en el interior de plantas sin causar síntomas visibles de daño o enfermedad a la misma, estableciendo una relación con la planta que puede ser beneficiosa para una o ambas partes [1-4]. Desde un punto de vista metodológico, un microorganismo se considera un endófito verdadero si fue aislado de tejidos internos de una planta esterilizada en su superficie, es capaz de cumplir con el postulado de Koch re-infectando plántulas hospederas, y si existe evidencia microscópica de colonización interna de la planta o de un tejido interno por parte del endófito [4, 5]. Otros autores proponen una definición genético-funcional, considerando a un endófito competente como aquellos que tienen la maquinaria genética necesaria para la colonización y la persistencia dentro de la planta (Fig. 1) [5, 6]. Sin embargo, Mitter *et al.* [7] analizaron el genoma completo de nueve bacterias endófitas proponiendo que existe un amplio espectro de estrategias de vida endofítica; y postulan que a pesar de poseer características típicas en común, no habría un único clúster de genes que compartan exclusivamente los endófitos, sino que presentan alta diversidad genética [7].

En general, los endófitos pasan todo su ciclo de vida (o parte del mismo) dentro de los tejidos vegetales; pueden colonizar raíces, tallos y hojas, y en la senescencia de su hospedador esporulan o se liberan al ambiente [1]. Una clasificación existente los divide en endófitos obligados, aquellos que dependen estrictamente de la planta para crecer y sobrevivir, y su transmisión a otras plantas ocurre verticalmente o a través de vectores; y facultativos, que pasan un periodo de su ciclo de vida fuera de la planta [6].

La suma de procesos estocásticos junto con factores bacterianos determinantes, dan inicio al proceso de colonización del rizoplasma por los endófitos, donde ocurre la formación de microcolonias en la superficie radicular [6]. Existen señales químicas que atraen a las bacterias presentes en la rizósfera hacia la raíz vegetal, como ser los exudados radiculares que contienen flavonoides o ácidos orgánicos volátiles, el gradiente de nutrientes, entre otros [8].

Inicialmente los endófitos infectan por ejemplo el tejido roto por la emergencia de raíces laterales, y se distribuyen rápidamente por el espacio intercelular de las células radiculares. La infección inicial puede darse también por medio de heridas o estomas. Desde allí se propagan sistémicamente, alcanzando incluso los vasos vasculares de las plantas (Fig. 1) [3, 6].

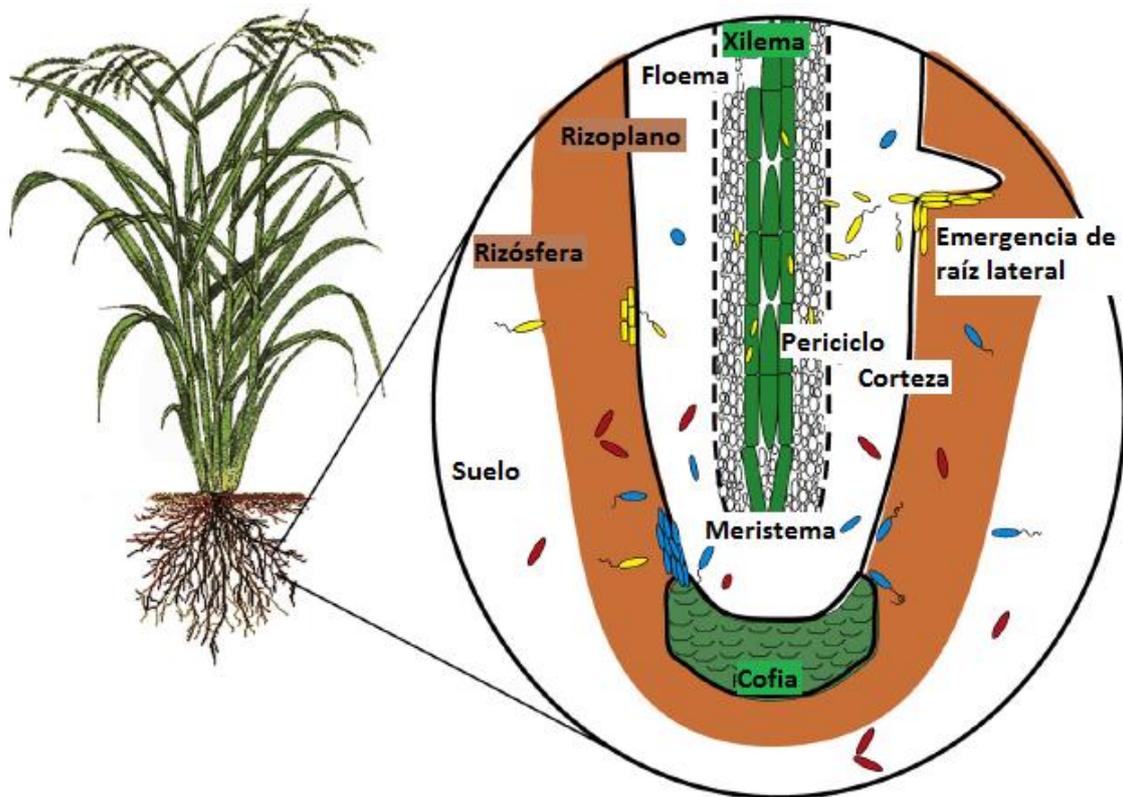


Figura 1. Colonización de la raíz de la planta por bacterias pasajeras que llegan por azar (células rojas), bacterias oportunistas que tienen una respuesta quimiotáctica hacia la planta pero no logran colonizar el interior (células azules) y los endófitos competentes (células amarillas), que cumplen con las definiciones mencionadas anteriormente; general, metodológica y genético-funcional; para ser un endófito verdadero. Modificado de Hardoim *et al.* 2008.

El arroz: una gramínea de importancia agroeconómica

Las plantas que pertenecen a la familia Poaceae, comúnmente conocidas como gramíneas, son plantas herbáceas monocotiledóneas, raramente leñosas, pertenecientes al orden Poales y la clase Liliopsida. Su importancia a nivel económico mundial, se ve reflejada en que la mayor parte de la dieta de los seres humanos proviene de las gramíneas, tanto en forma directa (consumo de maíz, trigo o arroz) como indirecta (forrajes para el ganado a partir de raigrás, festuca o cebadilla). Además, diferentes especies son utilizadas para la obtención de biocombustibles (como la caña de azúcar), como plantas ornamentales, y en procesos industriales (por ejemplo, sorgo dulce), entre muchas otras utilidades [9, 10].

Las gramíneas forman asociaciones con distintos microorganismos, tanto rizosféricos (por ejemplo del género *Azospirillum*) como endófitos fijadores de nitrógeno (géneros *Acetobacter* y *Herbaspirillum*) [11]. Muchos esfuerzos a nivel mundial se están poniendo en la búsqueda de éstos microorganismos para la producción y desarrollo de biofertilizantes, que promuevan el crecimiento y el rendimiento de los cultivos mencionados [12-15].

El arroz (cuya especie más común es *Oryza sativa*) por su parte, es una gramínea perteneciente a la subfamilia Oryzoideae, y al género *Oryza*, dentro del cual existen más de 30 especies. Se considera un alimento de primera necesidad a nivel mundial en la dieta humana junto con el maíz, aportando el 21, 14 y 2% de la energía, proteínas y grasas a nivel global, respectivamente. Sirve de planta modelo para investigaciones genómicas ya que es rico en diversidad genética a nivel interespecífico e intraespecífico [16].

En nuestro país las principales variedades cultivadas son el Paso 144, Olimar y Tacuarí, con un rendimiento aproximado de 8 toneladas por hectárea cultivada en la zafra 2013/2014 según datos publicados por el Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca [17]. Uruguay exporta el 95% del arroz que produce, siendo los principales destinos de exportación Brasil, Irak y Perú al año 2012, con una ganancia de U\$S 554 millones [18]. Se han realizado estudios de la diversidad de bacterias endófitas en los cultivos de arroz en nuestro país [19]. Loaces *et al.* [20]

demonstraron que la raíz de arroz presenta un mayor número de endófitos en comparación al resto de la planta y mayor número de productores de sideróforos (moléculas de captación de hierro) en comparación al suelo; y que ellos varían en los distintos estadios de crecimiento de la planta.

Interacción planta-endófito

Las asociaciones entre las plantas y los endófitos han demostrado ser de vital importancia, ya que éstos últimos pueden promover el crecimiento vegetal mediante diferentes mecanismos: la fijación biológica de nitrógeno, producción y regulación de fitohormonas, participación en el ciclo de nutrientes esenciales, control de fitopatógenos mediante producción de antifúngicos o de sideróforos. También pueden producir metabolitos secundarios de interés y potenciar la fitorremediación, contribuir a la fertilidad del suelo, actividades que los hacen igualmente interesantes de estudiar [1, 4, 21].

Los microorganismos del suelo, al igual que las plantas, juegan un papel importante en la mineralización y la transformación de los nutrientes en la rizósfera, teniendo influencia sobre la disponibilidad de nutrientes en el entorno, a través de la secreción de moléculas que solubilizan, quelan, reducen u oxidan los compuestos. Por ejemplo, las rizobacterias son capaces de incrementar la movilidad del hierro liberando compuestos quelantes llamados sideróforos [22]. Asimismo, el análisis genómico de bacterias endófitas ha revelado genes potencialmente involucrados en la producción de diversos metabolitos con distintas funciones, como factores de virulencia, agentes de formación de biopelículas, toxinas, fitohormonas, entre otras [23]. Hay autores que postulan inclusive que el genoma del microbioma presente dentro de la planta es el segundo genoma de la misma, dada la diversidad e importancia de las funciones que codifica [3].

Contrariamente a la asociación rizobio-leguminosa [24], donde mucho se sabe de la comunicación molecular y la relación huésped-hospedero, muy poco se sabe de procesos

similares en la asociación entre gramíneas y endófitos diazótrofos. Por ejemplo, en *Azoarcus* sp. BH72 los pili tipo IV son necesarios en la adhesión a la superficie de la raíz de arroz, pero no se sabe si participan en la colonización interna [25]. Otro ejemplo es el caso de *Herbaspirillum seropedicae*, para el cual la sacarosa es requerida para la expresión de los genes *nif* en caña de azúcar; sin embargo se observaron niveles bajos de expresión de *nif* en *H. seropedicae* LR15 en maíz en ausencia de toda fuente de carbono agregada [25]. Sessitsch *et al.* [26] reconstruyeron a partir de datos obtenidos de metagenómica las probables moléculas, funciones y vías de la interacción arroz-endófitos (Fig. 2).

Homeostasis del hierro

El hierro es un elemento vital para prácticamente todos los organismos, salvo para algunas especies del género *Lactobacillus* [27]. Es un metal de transición cuyos estados de oxidación varían entre -2 y +6, siendo los principales y naturales Fe^{2+} y Fe^{3+} ; y así se incorpora a proteínas como cluster Fe-S, grupo hemo o especies mono o binucleares, lo cual le da su funcionalidad biológica [28]. De esta manera participa en la gran mayoría de los procesos celulares bioquímicos, ya que actúa como co-factor en procesos enzimáticos como ser la biosíntesis de aminoácidos y ácidos nucleicos (como co-factor para la enzima glutamato sintasa), transporte y metabolismo de oxígeno (formando parte de la hemoglobina), cadena de transporte de electrones y respiración (como parte de los citocromos), fotosíntesis (en enzimas de síntesis de clorofilas), fijación de nitrógeno (con la enzima nitrogenasa y la leghemoglobina), y tiene un rol clave como donador y aceptor de electrones con propósitos energéticos en algunos microorganismos [27, 29, 30]. El hierro también es esencial para la formación de biopelículas, ya que regula la movilidad superficial y estabiliza la matriz de polisacáridos [29].

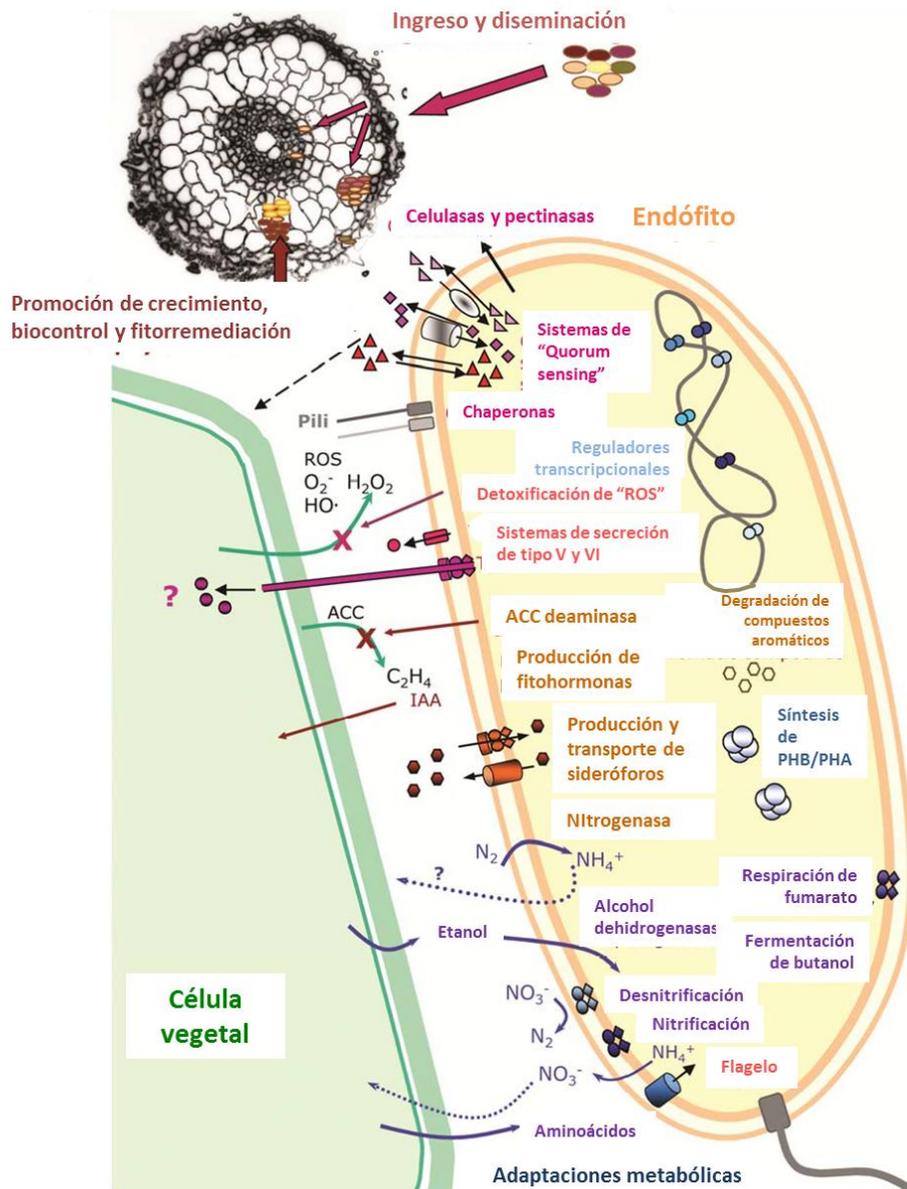


Figura 2. Reconstrucción de la interacción arroz-endófito, inferida mediante análisis del contexto génico del metagenoma de arroz. La comunidad endófito se representa como una única célula para simplificar, aunque no necesariamente todos los procesos son activos en una sola célula simultáneamente. Modificado de Sessitsch *et al.* 2012.

En la corteza terrestre, el hierro es el cuarto elemento más abundante, y el segundo metal después del aluminio, con una abundancia estimada de 5% [27]. Pese a ello, en presencia de agua y a pH neutro a básicos, el hierro se encuentra formando complejos de baja solubilidad. Por este motivo su biodisponibilidad para las bacterias, cuya demanda de hierro es del orden

μM [30], es limitada, y aquellos microorganismos que tienen estilos de vida aeróbicos frecuentemente se enfrentan a la escasez del metal [31]. Sin embargo, el balance del metabolismo del hierro es de suma importancia, y debe ser finamente regulado ya que el ión ferroso puede reaccionar con oxígeno y provocar estrés oxidativo, disparando reacciones de Fenton/Haber-Weiss produciendo especies reactivas de oxígeno (superóxido y peróxido de hidrógeno) y radicales libres altamente dañinos (como hidroxilo) [31, 32].

Los microorganismos cuentan así con diferentes estrategias para mantener la homeostasis de hierro controlada. En condiciones de suficiencia del metal, las bacterias expresan sus sistemas de resistencia al estrés oxidativo que degradan las especies reactivas del oxígeno. También pueden almacenar el hierro en depósitos intracelulares para su posterior utilización. Estos depósitos son constituidos por tres tipos de proteínas: ferritinas, bacterioferritinas y Dps. Todas ellas comparten su arquitectura molecular, que consiste en una cavidad central donde almacena el hierro en forma férrica, si bien son capaces de captarlo como ión ferroso. Las Dps y las bacterioferritinas están presentes únicamente en procariotas, mientras que las ferritinas también se encuentran en eucariotas. Estas últimas acumulan hierro durante la fase exponencial de crecimiento. Las proteínas Dps se expresan en fase estacionaria, y protegen el ADN contra el estrés oxidativo [28, 31].

La proteína Fur es un regulador global muy conservado en muchas bacterias Gram-positivas y negativas como por ejemplo *E. coli* K-12 [33], donde actúa primariamente en altas concentraciones de hierro reprimiendo más de 90 genes. La represión directa de la mayoría de estos genes ocurre cuando Fur forma un complejo con el ion Fe^{2+} como co-represor y se une a secuencias palindrómicas consenso de ADN denominadas “cajas Fur” (Fig. 3) [28, 31, 34]. Fur también está presente como regulador global del metabolismo del hierro en patógenos como *Actinobacillus actinomycetemcomitans* [35], o en Gram-positivas como *Bacillus subtilis* [36]. Otro regulador es RirA, presente en las α -Proteobacterias de la familia de los Rizobios como *Sinorhizobium meliloti* o *Rhizobium leguminosarum* [37, 38]. El mecanismo de acción de RirA y

el de Fur serían similares, reprimiendo los genes de adquisición de hierro en altas concentraciones del metal [39]. En el caso de *S. meliloti* existe Fur, pero está involucrada en el metabolismo de manganeso y no de hierro [40]. En rizobios y otras bacterias, como *Agrobacterium tumefaciens*, existe otro regulador global, la proteína Irr, que actúa reprimiendo genes relacionados al metabolismo del hierro pero en condiciones de deficiencia del metal [38, 41]. Finalmente, existe también reguladores de la expresión de genes relacionados al metabolismo del hierro del tipo DtxR, que operan de manera similar a Fur, pero no están filogenéticamente emparentados, y suelen estar presentes en bacterias Gram-positivas con alto contenido GC, como *Corynebacterium* o *Mycobacterium tuberculosis* [31].

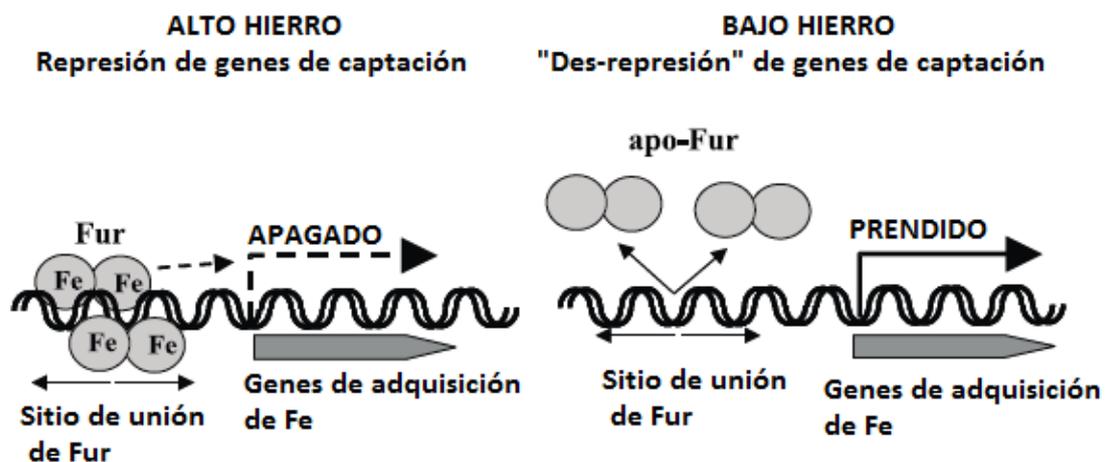


Figura 3. Esquema de la represión mediada por Fur. Modificado de Andrews *et al.* 2003.

En condiciones limitantes de hierro, las células ven afectados su crecimiento y morfología, [42]; y los microorganismos controlan el consumo del metal disminuyendo la expresión de proteínas que lo utilizan como co-factor. Al mismo tiempo, inducen la expresión de sistemas de alta afinidad para la adquisición del metal [28].

Sistemas de adquisición de hierro en microorganismos

Comúnmente, una bacteria presenta múltiples mecanismos para la adquisición de hierro que cubran un rango amplio de afinidades y especificidades para variadas formas de hierro presentes en el ambiente. Los más frecuentes son aquellos mecanismos que forman complejos con el Fe^{3+} : sideróforos, proteínas de unión a hemina o hemóforos, transferrina/lactoferrina y citrato férrico. Las bacterias también pueden internalizar hierro en su forma ferrosa mediante otro tipo de transportadores [43].

Sideróforos:

Luego del descubrimiento del ferricromo y el coprógeno, un gran número de biomoléculas fueron identificados como sideróforos por su gran estabilidad para complejar Fe^{3+} , su bajo peso molecular (aprox. 1 KDa), su producción durante períodos de depleción de hierro, y la facilitación para obtener el metal para el organismo [44]. El papel de los sideróforos en primer lugar es buscar y captar hierro, aunque también pueden formar complejos con otros elementos esenciales (Mo, Mn, Co y Ni) del ambiente, haciéndolos disponibles para las bacterias [29]. Son compuestos producidos por todo tipo de organismos, desde bacterias hasta las propias plantas gramíneas [44].

Los sideróforos son sintetizados y liberados al ambiente, y luego de quelar el hierro son internalizados nuevamente mediante receptores específicos. En el caso de las bacterias Gram-negativas, el transporte de los sideróforos al interior celular incluye transportadores de membrana externa TonB-dependientes (Fig. 4), proteínas de unión periplásmicas que dirigen el complejo hasta el receptor de membrana citoplásmica que puede ser un transportador del tipo ABC o una proteína de la familia MFS (*Major Facilitator Superfamily*) [45, 46]. Una vez en el citoplasma celular el complejo es disociado por reducción del metal o por hidrólisis de la molécula mediante una esterasa [28, 29, 31, 42]. La reducción del Fe^{3+} a Fe^{+2} también puede llevarse a cabo en el periplasma [47].

Los sideróforos se dividen en tres principales familias dependiendo de los grupos funcionales que presenten: hidroxamatos, catecoles y carboxilatos; aunque existen otros grupos que ocurren con menos frecuencia. La mayoría de los sideróforos bacterianos son de tipo catecoles (ejemplo, enterobactina), y algunos en menor proporción carboxilatos (como rhizobactina) e hidroxamatos (por ejemplo, ferroxamina B). Sin embargo, algunos tipos de sideróforos se denominan mixtos, por tener una mezcla de grupos funcionales (como pioverdina) (Fig. 5) [29, 44].

Interesantemente, las bacterias son también capaces de reconocer e internalizar sideróforos exógenos, producidos por otros organismos, mediante receptores TonB-dependientes con distintas especificidades, para beneficio propio. A esta actividad se le llama piratería de sideróforos [48].

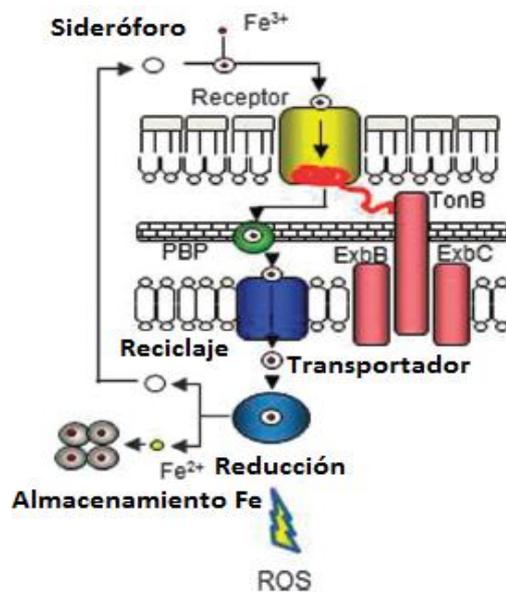


Figura 4. Sistemas de captación de hierro mediados por sideróforos en una bacteria Gram-negativa. Modificado de Cornelis *et al.* 2011.

Hemo y hemina:

Otra importante fuente de hierro son los grupos hemo, obtenidos del hospedero a través de hemoproteínas como hemoglobina o hemopexina, liberados desde dichas proteínas mediante proteasas o hemolisinas [28, 31]. También puede suceder a través de hemóforos, proteínas

que actúan como sideróforos pero uniendo hemoglobinas y hemopexinas e internalizados por receptores de membrana específicos [31, 49].

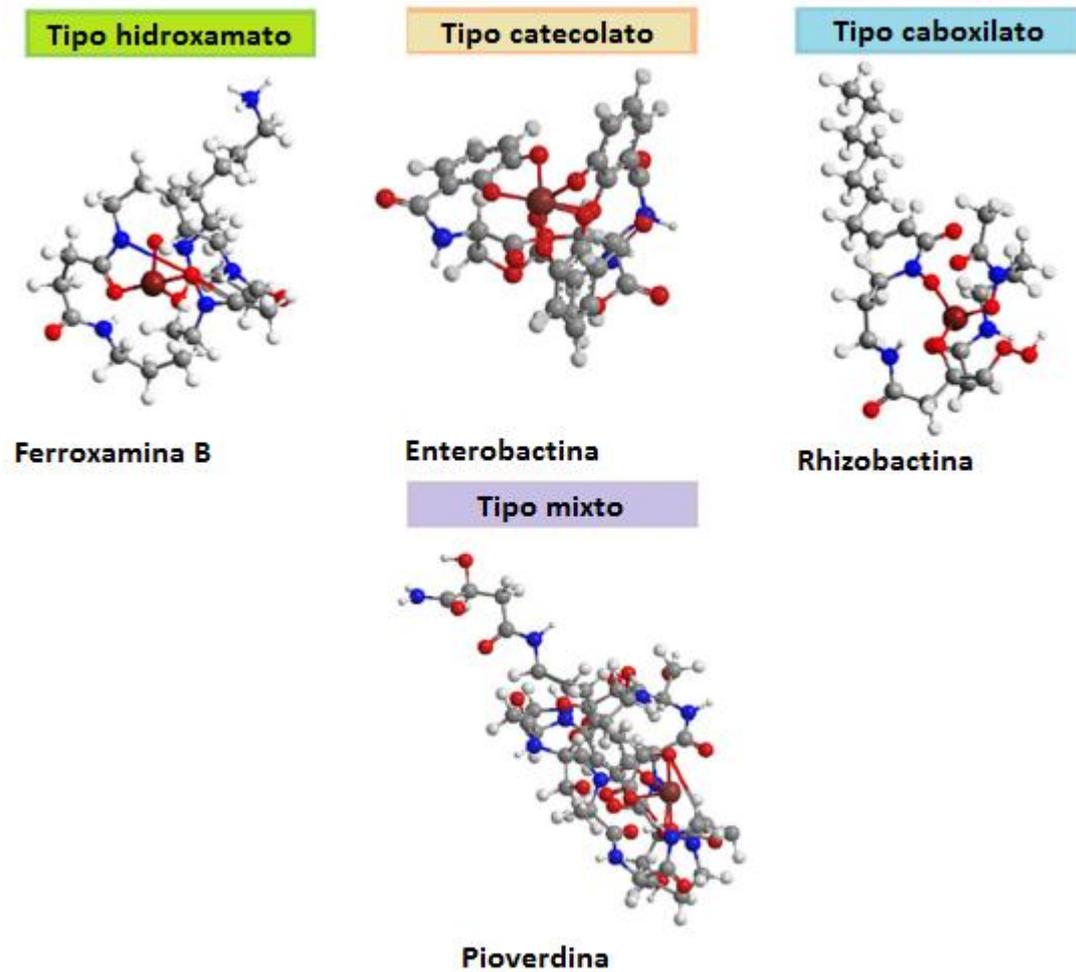


Figura 5. Estructura molecular de ejemplos de los distintos tipos de sideróforos. Modificado de Ahmed *et al.* 2014.

Ciertos receptores específicos presentes en los procariontes pueden unir directamente hemina como fuente de hierro. Amarelle *et al.* [50] establecieron que en *Sinorhizobium meliloti* 1021 existe un receptor de membrana externa ShmR que cumple dicha función y es expresado bajo condiciones limitantes de hierro. Tanto los receptores de hemina como los de hemóforos son dependientes de TonB, al igual que los transportadores de sideróforos [28].

Lactoferrina/Transferrina:

Lactoferrina y transferrina son dos glicoproteínas capaces de unir hierro, presentes en diversas secreciones de hospederos animales. Las bacterias expresan receptores TonB-dependientes para dichas proteínas, que se sitúan en la membrana externa de las Gram-negativas y se inducen bajo condiciones limitantes de hierro, y proveen otra ruta de entrada de ión férrico [28, 31, 43].

Citrato férrico:

El citrato es un ácido orgánico que es capaz de acomplejarse a hierro, con afinidad moderada por el ión férrico. En el fluido del xilema de las plantas, el hierro está principalmente acomplejado a citrato, en concentraciones cercanas a 10 μM [51], por lo que podría ser una posible fuente del metal para los organismos que colonizan el interior vegetal.

Un sistema de captación muy conocido y estudiado es el de *E. coli*, a través del operón *fecABCDE*, siendo FecA el transportador TonB-dependiente de membrana externa, FecB la proteína de unión periplásmica, y FecCDE el transportador tipo ABC de membrana interna [28, 52]. Además participan los genes *fecI* y *fecR*, que constituyen factores sigma y anti-sigma, respectivamente. Cuando FecA une citrato férrico, se traduce una señal a FecR, que libera FecI y actúa como un factor sigma que re-dirige la ARN polimerasa hacia los genes de captación de citrato férrico [52-54]. La maquinaria de captación de citrato férrico por FecABCDE está bastante conservada en bacterias Gram-negativas como *Shigella*; aunque menos se sabe del transporte de citrato férrico en Gram-positivas. *Bacillus subtilis* posee el sistema de captación de citrato férrico en la forma de YfmC como proteína de unión, YfmD e YfmE como transportadores de membrana, y la ATPasa YfmF [55].

Neisseria meningitidis, *Mycobacterium smegmatis* y *Bradyrhizobium japonicum* son capaces de transportar hierro mediante citrato [56, 57]. *Pseudomonas aeruginosa*, además de producir los sideróforos pioverdina y pioquelina y utilizar sideróforos exógenos, tiene la capacidad de utilizar citrato férrico como fuente de hierro nutricional. En su genoma también se

identificaron genes homólogos a *fecA*, *fecI* y *fecR* de *E. coli*, pero no así homólogos a *fecBCDE*. Sin embargo, se encontró un homólogo al gen *feoB* de *E. coli*, que codifica para un transportador de Fe^{+2} de membrana interna. Se presume que un mecanismo reductivo liberaría el hierro del citrato, y el ión ferroso resultante se transportaría a través de FeoB; o bien se oxidaría a Fe^{+3} mediante la proteína PcoA para internalizarse por un transportador de membrana interna del ión férrico [58].

Captación del ión ferroso:

Finalmente, los microorganismos tienen la capacidad de captar hierro bajo su forma ferrosa, más soluble. Existen transportadores de dichos iones en algunas bacterias. Estas proteínas incluyen permeasas tipo ABC para metales y transportadores tipo NRaMP, como ser SitABCD y MntH respectivamente, en *Salmonella*. También se conocen los transportadores ZIP, como el ZupT de *E. coli*. Todos ellos muestran especificidad por metales divalentes como Fe^{2+} y Mn^{2+} , aunque preferiblemente captan manganeso. La principal ruta para captar hierro en su forma ferrosa parece ser vía “Feo” que opera anaeróticamente [43, 59]. En *E. coli* el locus *feo* presenta tres genes en la misma orientación que constituirían el operón Feo, *feoABC* [43]. FeoB es un transportador de Fe^{2+} con un dominio N-terminal citoplásmico y un dominio C-terminal transmembrana. FeoA interactúa con FeoB para importar el ión ferroso. FeoC regula los niveles celulares de *feoB* en *Salmonella entérica*, contribuyendo a incrementar su concentración a nivel post-traducciona, ya que interacciona con FeoB protegiéndola de la proteólisis [60]. Se identificó un nuevo sistema con similaridad al transportador de alta afinidad de Fe^{2+} de *Saccharomyces cerevisiae* Ftr1p. En *E. coli* O157:H7, el homólogo a Ftr1p, YcdN o EfeU, es parte del operón tricistrónico *ycdNOB* o *eFeUOB*, que es reprimido por hierro y regulado por Fur. Recientes estudios en *Bacillus subtilis* muestran deficiencias de crecimiento en mutantes *ywbL* (homólogo a *ycdN*) en medios con bajo hierro y sin citrato respecto a uno con bajo hierro y con citrato. Se encontró evidencia además de que el operón *ycdNOB* en *E. coli* es inducido en bajo pH, condiciones favorables para que el hierro se solubilice y establezca

contra la oxidación como ión ferroso [59]. Por su parte, *Burkholderia cenocepacia* H111 codifica también para un sistema de captación de hierro alternativo a sus sideróforos, *ftrABCD* homólogo al de *Saccharomyces* [61].

Transportadores TonB-dependientes

En bacterias Gram-negativas, el complejo sideróforo-Fe³⁺ es reconocido e internalizado al periplasma a través de receptores TonB-dependientes de membrana externa [62]. Esta familia de proteínas de membrana externa está también involucrada en la internalización de fuentes nutricionales de hierro alternativas, como ser hemo libre o en compuestos, citrato, lactoferrina, etc. La estructura de estos receptores consiste en un barril compuesto de 22 hojas beta (*β-sheets*), cerrado en el centro por un dominio globular llamado enchufe (*plug*), que separa el ambiente externo del periplasma [30, 47, 62]. Para internalizar el compuesto al periplasma, el enchufe debe ser movido para permitir la traslocación del mismo. La energía requerida para este cambio conformacional es provista por la proteína de membrana interna TonB, que junto con las proteínas de membrana interna ExbB y ExbD forman un complejo. Este complejo aprovecha el gradiente electroquímico de la membrana interna para energizar el transportador de membrana externa, provocando el cambio conformacional que permita la traslocación del compuesto al periplasma [28, 42, 63, 64].

Importancia del hierro

La importancia del hierro en las interacciones patógeno-célula animal es muy conocida y estudiada. Existen claros ejemplos de ellos: *Yersinia pestis* y *Klebsiella pneumoniae* donde la yersiniabactina es esencial para su virulencia [65], como lo es la pioverdina y la pioquelina para *Pseudomonas aeruginosa* que infecta los pulmones [42, 65]. Sucede lo mismo para el hongo letal *Aspergillus fumigatus*, en el cual sideróforos tanto intra como extracelulares contribuyen a la virulencia en ratón [42].

En el caso de microorganismos fitopatógenos, la relevancia de los mecanismos de captación de hierro depende del sistema en estudio. *Erwynia chrysantemi* requiere de sus sideróforos crisobactina y acromobactina para una óptima virulencia en violetas africanas; también el gen *feoB* del fitopatógeno *Xanthomonas oryzae* es esencial para su virulencia [65]. Las especies de hongos ascomicetes *Cochliobolus miyabeanus*, *C. heterostrophus*, *Fusarium graminearum* y *Alternaria brassicicola* requieren sus sideróforos para una completa patogenicidad de sus hospederos maíz, arroz, trigo y *Arabidopsis thaliana* respectivamente; la producción de sideróforos en el hongo *Colletotrichum graminicola* es necesaria para la virulencia de maíz, al igual que lo son los sideróforos en la virulencia de *A. alternata* en citrus; *Erwinia amylovora* toma ventaja de sus sideróforos para infectar manzana; y la virulencia en planta de tabaco de *Pseudomonas syringae* se ve afectada por la ausencia de pioverdina [42]. Por su parte, el transportador de citrato CitH de *Xanthomonas campestris* contribuye a la virulencia en dicho fitopatógeno [66]. Contrariamente, en el caso de *P. syringae* pv. tomate DC3000 no muestra alteraciones en su patogenicidad en plantas de tomate para mutantes carentes de sus sideróforos pioverdina, yersiniabactina y citrato [67]. La producción del sideróforo estafiloferrina B por *Ralstonia solanacearum* no es necesaria para la completa virulencia en tomate, pero los mutantes no productores de sideróforos no son capaces de captar hierro [51]. Por su parte, una mutante deficiente en sideróforos de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* es completamente virulenta en arroz [51]. *Dickeya dadantii* produce dos tipos de sideróforos, crisobactina y acromobactina, ambos esenciales para el proceso de infección y presentes en distintas etapas de la enfermedad [51].

Sin embargo, muy pocos estudios se han hecho en endófitos que esclarezcan la importancia de los mecanismos de obtención de hierro para la interacción con la planta, por lo que es aún un campo mayormente desconocido. Mediante un análisis metagenómico de la comunidad endofítica de la raíz de arroz, Sessitsch *et al.* [26] predijeron las características y los procesos metabólicos importantes en el estilo de vida endófito. Esto requiere varias adaptaciones,

siendo las características más prominentes flagelos, enzimas de degradación de polímeros vegetales, sistemas de secreción de proteínas, adquisición y almacenamiento de hierro, detoxificación de especies reactivas de oxígeno, entre otras [26].

Herbaspirillum seropedicae como modelo de estudio

Existen 14 especies descritas dentro del género *Herbaspirillum*, familia Oxalobacteraceae, orden Burkholderiales, clase β -Proteobacterias [68]. La primer especie definida dentro del género fue *Herbaspirillum seropedicae*, en Seropedica, Brasil (Fig. 6) [69].

Las especies de *Herbaspirillum* habitan en diversos ambientes como agua (*H. aquaticum*, *H. autotrophicum*, *H. huttense*), suelo (*H. chlorophenicum*) y asociados a plantas (*H. frisingense*, *H. lusitanum*, *H. hiltneri*, *H. rhizosphaerae*), e incluso algunas especies son patógenos oportunistas. El análisis filogenético basado en el gen del ARN ribosomal 16S muestra que el género no constituye un grupo monofilético [70].

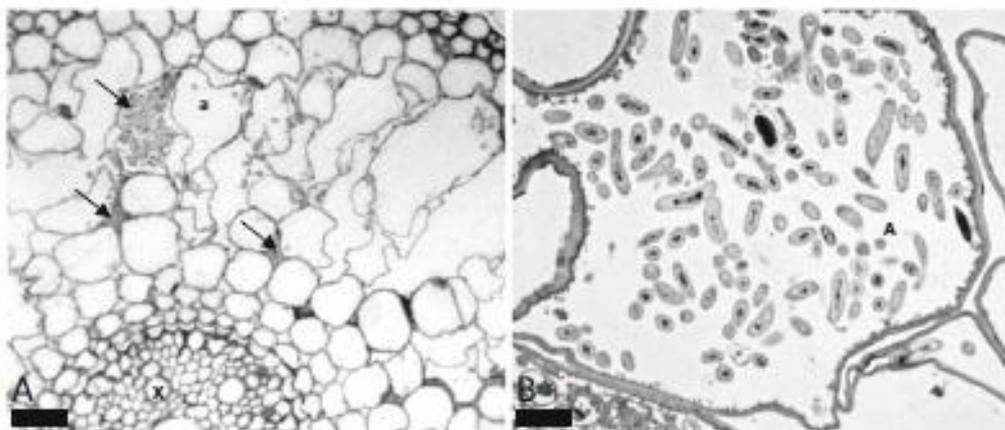


Figura 6. Colonización de raíz de arroz por *Herbaspirillum seropedicae* Z67, a los 2 días post-inoculación. Secciones transversales de la raíz, vistas en microscopio óptico (A, barra=20 μ M) y electrónico de trasmisión (B, barra= 2 μ M). Las flechas señalan las bacterias, ubicadas principalmente en el aerénquima. Tomado de Monteiro *et al.* 2012.

Todos ellos son microorganismos heterótrofos, en general no formadores de esporas, casi todos mesófilos y poseen metabolismo aerobio/microaerófilico. Las cepas de *Herbaspirillum*

son capaces de degradar benzoato, benzamida, benzonitrilo, hidroxibenzoato, lo que sugiere una flexibilidad metabólica y una posible defensa contra tóxicos derivados de la planta. Se trata de células con forma de bastones curvos, a veces en espiral, cuyo diámetro varía entre 0,3 y 0,8 μm , y el largo entre 1,4 y 5 μm . Son móviles, con 1 a 5 flagelos en uno o ambos polos, oxidasa y catalasa positivos. Oxidan azúcares pero no fermentan. Su temperatura de crecimiento es entre 20 y 37°, y toleran un pH entre 5 y 8. La actividad nitrogenasa está presente en las especies *H. seropedicae*, *H. rubrisubalbicans* y *H. frisigense*. Utiliza sales orgánicas como malato y succinato como las fuentes de carbono más favorables, aunque también puede usar glicerol, manitol, D-fructosa y D-glucosa [70].

El estudio de la interacción planta-endófito a nivel genético-molecular requiere de un buen modelo de estudio. Según Triplett [25], un apropiado modelo de endófito debe cumplir con ciertos atributos necesarios: 1) proveer nitrógeno fijado a una planta que tenga importancia agro-económica; 2) ser genéticamente controlable y manejable en laboratorio; 3) potenciar el crecimiento vegetal de una manera independiente a la fijación biológica de nitrógeno; 4) tener un amplio rango de hospederos; 5) poder re-aislarse del interior del hospedero en estado cultivable (y así cumplir con el postulado de Koch); 6) no ser saprófito y depender de la planta para sobrevivir en el campo; 7) colonizar el interior de la planta en gran número con una dosis de inóculo pequeña sin estresar la planta; 8) que sus sistemas genéticos estén secuenciados y disponibles; y 9) no debe ser patógeno de ningún organismo.

El mismo autor propone que dentro los endófitos descritos hasta el momento, cepas de la especie *H. seropedicae* cumplen con estos requisitos: sus hospederos son cultivos de gran importancia agro-económica, y varían desde banana, piña, sorgo, caña de azúcar, arroz, maíz, trigo, entre otros. No es un microorganismo saprófito, y promueve el crecimiento vegetal mediante diferentes mecanismos, además de la fijación biológica de nitrógeno. Si bien no se conoce la dosis mínima de inóculo, se sabe que *H. seropedicae* coloniza el interior vegetal en grandes números, sin estresar a la planta hospedera. Es un organismo fácilmente manipulable

genéticamente [25, 71, 72]. Distintas cepas del endófito *Herbaspirillum seropedicae* demostraron un gran potencial como promotores del crecimiento vegetal [73].

Tanto la cepa SmR1 y la Z67 poseen su genoma totalmente secuenciado, y presentan únicamente polimorfismos de simple nucleótido entre ellas. El genoma de estas cepas está compuesto por un único cromosoma circular de 5,5 Mpb y un contenido G+C del 63%. Cuenta con 4804 genes, de los cuales unas 3110 son proteínas con función asignada, aproximadamente 500 proteínas con funciones generales predichas y el resto de función desconocida [70, 74]. Metaboliza amplio rango de fuentes de C y N, contiene genes *nif* para la fijación biológica de nitrógeno, asimila NO_3 y NO_2 , y oxida NO, pero no tiene la capacidad de desnitrificar. Posee sistemas de secreción tipo I, II, III, V y VI y los pili tipo IV sugieren gran potencial de interactuar con la planta hospedera. Porta en su genoma genes que codifican para lipopolisacáridos (LPS) de superficie, sistemas de secreción de proteínas, flagelos, proteínas quimiotácticas, sistemas de captación de sideróforos, etcétera, para la adhesión radicular y colonización de las plantas hospederas. Además contiene los genes que codifican para ACC desaminasa, auxinas, sideróforos, hemaglutininas/hemolisinas/adhesinas, todos los cuales proponen un rol importante en la promoción de crecimiento vegetal [21, 70, 74]. Como ya fue mencionado anteriormente, los LPS son indispensables para la adhesión inicial, ya que mutantes carentes en *rfbB* y *rfbC*, genes de síntesis de ramnosa, componente de los LPS, muestran defectos en la colonización [75]. No se encontraron genes codificantes para enzimas que degraden la pared vegetal, por lo que la penetración se daría por aberturas naturales de los tejidos vegetales, atravesando las células corticales y llegando hasta los vasos del xilema en tallos y hojas [75]. Sin embargo, Pedrosa *et al.* [74] sugieren que a pesar de carecer de hidrolasas que degraden la pared celular vegetal, *H. seropedicae* presenta una variedad de proteínas de sistemas de secreción y hemaglutininas/hemolisinas/adhesinas que facilitarían la invasión y colonización de la planta, y la vida endofítica.

Sistemas de captación de hierro en *Herbaspirillum seropedicae*

Los mecanismos de obtención de hierro son esenciales para una efectiva fijación biológica de nitrógeno en *H. seropedicae* Z67 [76]. En el genoma de *H. seropedicae* SmR1 encontramos, además de sistemas tipo ABC de captación de sideróforos y Fe^{3+} , al menos 28 genes codificantes para distintos receptores TonB-dependientes, y de ellos unos 20 relacionados al transporte de sideróforos (Rosconi *et al.* 2015, manuscrito en revisión). La adquisición del metal podría darse vía un transporte activo con receptores asociados a complejos TonB, y sistemas tipo ABC; y la amplia cantidad de receptores podrían conferirle alta competitividad al endófito en ambientes limitados en hierro.

H. seropedicae Z67 produce un grupo de sideróforos denominados serobactinas [77]. Se trata de tres lipopéptidos de síntesis no ribosomal sintetizados por la enzima codificada en el gen Hsero_2343. Las tres serobactinas, A, B y C, cuya estructura molecular fue elucidada en nuestro laboratorio por Rosconi *et al.* [77], presentan el mismo esqueleto peptídico de 6 aminoácidos y difieren en el largo de la cola lipídica, que tienen 10, 12 y 14 carbonos (Fig. 7).

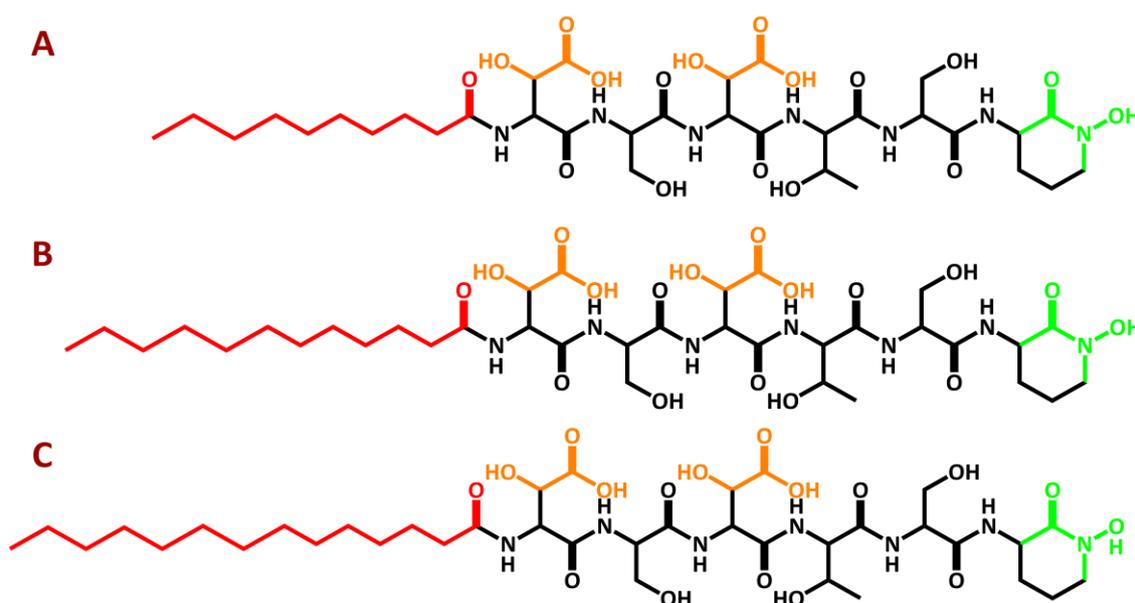


Figura 7. Estructura molecular lipopeptídica de los sideróforos de *H. seropedicae* Z67, serobactinas A, B y C.

La enzima NRPS responsable de la biosíntesis de las serobactinas se encuentra en un casete conformado por los genes Hsero_2337 al 2349 (Fig. 8), que incluyen una sintetasa, una lipasa, el receptor TonB-dependiente específico para serobactinas FhuA (Hsero_2345), entre otros (Tabla 1).



Figura 8. Contexto genómico del casete de biosíntesis serobactinas en *H. seropedicae* Z67, desde el gen Hsero_2337 al Hsero_2349.

Tabla 1. Contexto genómico del gen de la enzima NRPS (Hsero_2343) en *H. seropedicae* Z67.

Locus Tag	Función predicha	Anotación	Acceso GenBank
Hsero_2337	Receptor TonB-dependiente de sideróforos	<i>cirA</i>	YP_003775744
Hsero_2338	Regulador férrico sigma- subunidad 24	<i>pfrI</i>	YP_003775745
Hsero_2339	Proteína tipo MbtH		YP_003775746
Hsero_2340	Tioesterasa de síntesis de péptidos no ribosomales		YP_003775747
Hsero_2341	Tranferasa de 4'-fosfopanteteinil (EC:2.7.8.-)		YP_003775748
Hsero_2342	Sintetasa de ácido clavamínico tipo (CAS)		YP_003775749
Hsero_2343	Sintetasa de péptidos no ribosomales		YP_003775750
Hsero_2344	Esterasa/lipasa		YP_003775751
Hsero_2345	Receptor TonB-dependiente	<i>fhuA</i>	YP_003775752
Hsero_2346	L-ornitina N ⁵ -monooxigenasa (EC:1.13.12.-)		YP_003775753
Hsero_2347	Proteína tipo acetiltransferasa		YP_003775754
Hsero_2348	Reductasa de hierro		YP_003775755
Hsero_2349	Proteína transportadora ABC de sideróforos (péptidos cíclicos)	<i>pvdE</i>	YP_003775756

En trabajos anteriores llevados a cabo en nuestro laboratorio se identificó la enzima responsable de la biosíntesis de sideróforos serobactinas (Hsero_2343) y su receptor específico TonB-dependiente FhuA (Hsero_2345) [77]. Mutantes en dichas proteínas presentaron su crecimiento comprometido en condiciones de baja disponibilidad de hierro. La doble mutante no productora de serobactinas ni de sus receptores específicos no mostró

inconvenientes en la colonización individual de la planta de arroz, pero sí en competencia con la cepa silvestre, donde coloniza en una relación 1:9 respectivamente. Estas diferencias en la colonización no fueron observadas en la etapa de adhesión (día 0 post-inoculación) ni en los primeros días de colonización, sino recién al día 8 post-inoculación (Rosconi *et al.* 2015, manuscrito en revisión), dando la pauta que las mutaciones afectarían la multiplicación y sobrevivencia en plantas, más que la colonización. Estos resultados estarían indicando que las serobactinas son el mecanismo preferido por *H. seropedicae* Z67 para la captación de hierro, y que si bien le confieren una ventaja competitiva a la hora de colonizar el interior vegetal, no son imprescindibles para la supervivencia dentro de la planta.

El genoma de *H. seropedicae* SmR1 presenta genes homólogos a *feoAB* (Hsero_0050 y 0051), *pcoA* (Hsero_1601), *citH* (llamado *citM* Hsero_2226), y *fecA* (Hsero_1277), pero no contiene homólogos a *fecBCDE* asociados a *fecA*, así como tampoco *fecIR* [74]. El transporte de citrato férrico como fuente de hierro en *H. seropedicae* podría darse a través de sistemas conformados por algunos de estos genes mencionados. En mi trabajo final de graduación estudié la adquisición de citrato férrico en *H. seropedicae* Z67 mediante el transportador de membrana externa TonB-dependiente FecA (Hsero_1277) [78]. El mismo fue identificado mediante análisis por 2D-SDS-PAGE y MALDI-TOF de proteínas de membrana externa expresadas en cultivos de *H. seropedicae* Z67 crecidos en medios con baja disponibilidad de hierro. Los resultados del crecimiento *in vitro* de la mutante carente en el gen *fecA* mostraron que éste se ve levemente disminuido con respecto al de la cepa salvaje, en medio con citrato férrico como fuente de hierro [78]. Esto sugiere que *H. seropedicae* Z67 puede utilizar citrato férrico como fuente nutricional de hierro internalizándolo en parte a través del transportador FecA; aunque también evidencia la participación de otros sistemas de transporte de citrato férrico. Coincidiendo con lo anterior, la colonización individual de la planta de arroz por la mutante mencionada, no se ve afectada en relación a la cepa salvaje [78]. En ensayos

anteriores también hemos confirmado que *H. seropedicae* Z67 puede utilizar como fuentes de hierro hemoglobina, ferricromo, citrato y sideróforos (datos no publicados).

Asimismo, el genoma de la cepa SmR1 cuenta con un gen homólogo a la permeasa de alta afinidad Fe^{2+}/Pb^{2+} del sistema EfeUOB de *E. coli* (Hsero_2720).

Por todo lo anteriormente mencionado resulta interesante avanzar en el estudio de estos probables sistemas de adquisición de hierro alternativos a las serobactinas en este modelo de endófito.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis:

H. seropedicae Z67 utiliza en sinergia con la producción de serobactinas, estrategias alternativas para la adquisición de hierro en la colonización de la planta de arroz.

Objetivo general:

Determinar la importancia que poseen los sistemas de adquisición de hierro del endófito *H. seropedicae* Z67 en la colonización de la planta de arroz.

Objetivos específicos:

- 1) Identificar proteínas de membrana involucradas en los mecanismos de adquisición de hierro en el endófito *H. seropedicae* Z67.
- 2) Evaluar la importancia de dichas proteínas en la colonización de la planta de arroz por este endófito.

Estrategia experimental

Se plantearon tres abordajes alternativos y complementarios para identificar las proteínas que participen en los mecanismos de adquisición de hierro en el endófito *H. seropedicae* Z67 durante la colonización de la planta de arroz:

- a) Una estrategia proteómica con el fin de identificar proteínas de membrana involucradas en la captación de hierro mediante SDS-PAGE y MALDI-TOF.
- b) Un estudio de la expresión de genes seleccionados relacionados al metabolismo del hierro por RT-qPCR.
- c) Una estrategia transcriptómica, obteniendo el transcriptoma global de la cepa crecida en condiciones de hierro suficiente y deficiente (RNAseq); analizando luego la expresión de los genes relacionados al metabolismo del metal.

Una vez identificados los genes que codifican para las proteínas de interés, se construyeron mutantes dirigidos a dichos genes y se caracterizó su fenotipo *in vitro* y la capacidad de colonización de la planta de arroz de forma individual y en competencia entre mutantes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Bacterias, plásmidos y condiciones de cultivo

Las cepas salvaje, mutantes y plásmidos utilizados en este trabajo se listan en la Tabla 2. Las cepas de *H. seropedicae* se cultivaron en medio rico TY o medio mínimo NFb-malato (Ver Anexo 1), a 30°C con agitación a 190 rpm. Las cepas de *E. coli* fueron cultivadas en medio rico LB (Ver Anexo 1), a 37°C con agitación a 200 rpm.

Los antibióticos empleados fueron ácido nalidíxico 5 µg/ml (Nal⁵), kanamicina 50 µg/ml (Km⁵⁰), ampicilina 50 µg/ml (Amp⁵⁰), tetraciclina 5 y 10 µg/ml (Tc⁵, Tc¹⁰), cloramfenicol 25 µg/ml (Cm²⁵), estreptomycin 100 µg/ml (Str¹⁰⁰), nitrofurantoína 50 µg/ml (NF⁵⁰).

Tabla 2. Cepas y plásmidos.

Cepa	Características	Referencia
Z67	Cepa salvaje <i>H. seropedicae</i> Z67	[69]
FecA	<i>H. seropedicae</i> Z67 <i>fecA::lacZaacC1</i> (gen Hsero_1277)	[78]
FhuA	<i>H. seropedicae</i> Z67 Δ <i>fhuA</i> (gen Hsero_2345)	[79]
2343	<i>H. seropedicae</i> Z67 Hsero_2343:: <i>lacZaacC1</i> (gen Hsero_2343)	[77]
2343FhuA	<i>H. seropedicae</i> Z67 Hsero_2343:: <i>lacZaacC1</i> Δ <i>fhuA</i>	Rosconi <i>et al.</i> 2015 (en revisión)
DH5 α	<i>E. coli</i> DH5 α , Nal ^R	Invitrogen
TOP 10	<i>E. coli</i> TOP 10, Str ^R	Invitrogen
Plásmido		
pBluescript SK	Amp ^R , <i>lacZ</i>	pBSK Stratagene
pWS233	Tc ^R , suicida en <i>H. seropedicae</i>	[80]
pSEVA-312S	Cm ^R , suicida y que contiene sitios de corte para la nucleasa I-Sce-I (GeneBank: JX560377.1)	[81]
pSEVA-412	Str ^R , conteniendo la nucleasa I-Sce-I (GeneBank: JX560378.2)	[81]
pRK2013	Km ^R , mob, <i>sacRB</i> , colaborador para la conjugación (GeneBank: M14641)	ATCC staff
pMP4655	portador de proteína verde fluorescente GFP	[82]
pMP4662	portador de proteína rojo fluorescente RFP	[82]
mini-Tn7 <i>gfp</i>	portador de minitransposón Tn7 con GFP (excitación: 395 nm, emisión: 509 nm)	[83]

Se realizaron bioensayos en medio TY con diferentes fuentes de hierro, según la técnica descrita por Amarelle *et al.* [50]. Se partió de un inóculo primario de cada cepa en el mismo medio, incubado toda la noche a 30°C. Se sembró mediante cultivo incorporado 1 ml de dichos inóculos de DO=1 en 50 ml de medio TY con quelante EDDHA 400µM. Una vez solidificado, se

le hicieron pocillos al agar, y en cada uno se colocó 10 μl de una fuente distinta de hierro: FeCl_3 37 mM y Ferricromo 0,5 mM como controles positivos, dicitrato férrico 2 mM y serobactina férrica 300 nM. Se dejaron crecer las placas por 24 horas a 30°C.

La producción de sideróforos se evaluó mediante la formación de halos naranjas en placas de medio conteniendo el colorante *Chrome Azurol S* (CAS) (Ver Anexo 1) [84]. Se inocularon las placas con gotas de 10 μl de un cultivo en medio TY de una DO=1 de las distintas cepas, y se incubaron 24-48 horas a 30°C.

Para los ensayos de crecimiento en medio líquido, *H. seropedicae* Z67 y sus mutantes derivadas fueron crecidas en placas de 96 pocillos (*Cell Star*[®], *Greiner Bio One*), e incubadas a 30°C en un Varioskan[™] Flash Multimode Reader (*Thermo Scientific*). El crecimiento fue monitoreado por densidad óptica a 620 nm, durante 48 horas. Los cultivos se inocularon con 1×10^6 células/ml provenientes de un inóculo primario sin hierro, colocando en cada pocillo un volumen final de 200 μl . Las condiciones ensayadas fueron las siguientes: TY FeCl_3 37 μM , TY DP 100 y 200 μM , y para algunas cepas también NFb FeCl_3 74 μM y NFb DP 50 μM . Cada pocillo se sembró por triplicado, y el valor de la DO luego promediado, descartando los datos desviados de la tendencia. Tres repeticiones independientes de cada ensayo fueron realizadas, con idénticos resultados, y se analizó estadísticamente con un Test de Fisher (p-valor=0,05).

Extracción de proteínas de membrana

H. seropedicae Z67 fue cultivada en inóculos primarios en medio NFb-malato sin hierro agregado hasta alcanzar una densidad óptica (DO) de 1. Inóculos de volúmenes de 50 ml del mismo medio con diferentes condiciones de disponibilidad de hierro y citrato férrico fueron inoculados con 50 μl del inóculo primario y crecidos a 30°C durante 12 horas. Las diferentes condiciones ensayadas fueron: FeCl_3 37 μM , el quelante de hierro 2,2'-dipyridilo (DP) 50 μM , DP 50 μM dicitrato férrico 0,1 μM , DP 50 μM dicitrato férrico 1 μM y DP 50 μM dicitrato férrico 10 μM . Se recuperaron las células centrifugando 10 minutos a 2500 g. A continuación

se realizaron dos lavados con Tris-HCl 10 mM pH 7,5, y se resuspendió el pellet en 10 ml del mismo buffer. Las fracciones enriquecidas en proteínas de membrana se obtuvieron siguiendo el protocolo de Battistoni *et al.* [85], con modificaciones. Brevemente, las células se lisaron en una prensa de French (*French Press*) a 1200 p.s.i. El lisado obtenido se centrifugó 10 minutos a 10000 g para descartar las posibles células no lisadas. El sobrenadante obtenido se centrifugó 2 horas a 60000 g y 4°C. El pellet obtenido finalmente contiene la fracción enriquecida en proteínas de membrana totales. Dicho pellet se diluyó en 500 µl de buffer de muestra 1X (Ver Anexo 1) para su posterior análisis.

Identificación de proteínas expresadas diferencialmente

Alícuotas de las fracciones de proteínas de membrana fueron analizadas mediante SDS-PAGE en geles de poliacrilamida 12% (Ver Anexo 1), a 30 mA durante aproximadamente 1 hora. Los mismos se revelaron con tinción de plata y colorante Coomassie (Ver Anexo 1). Se corrieron geles SDS-PAGE de extracciones de proteínas de membranas totales de réplicas biológicas con iguales resultados.

El revelado con tinción de plata consistió en sumergir el gel en Metanol 50% durante 1 hora. Se descartó el metanol y agregó la solución C incubando durante 15 minutos. Se descartó y se hizo un lavado con agua destilada. Seguidamente se reveló con la solución D, agitando suavemente hasta que las bandas se evidenciaron. En ese momento se detuvo el revelado con solución de detección.

La tinción con Coomassie consistió en sumergir el gel en solución colorante por 30-60 minutos. Luego se descartó y colocó en solución decolorante el tiempo necesario para que se vieran claramente las bandas.

Las bandas expresadas diferencialmente en las distintas condiciones de disponibilidad de hierro y citrato férrico, fueron cortadas del gel teñido con plata mediante bisturí estéril y enviadas al servicio de la Plataforma de la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas

(UByPA) del Instituto Pasteur de Montevideo para identificarlas mediante un mapeo peptídico por MALDI-TOF/TOF. Los resultados fueron analizados utilizando el motor de búsqueda Mascot (www.matrixscience.com).

Obtención de ARN total

Partiendo de inóculos primarios de *H. seropedicae* Z67 en medio mínimo NFb-Malato sin hierro agregado, se inocularon cultivos del mismo medio con una DO inicial de 0,5, y conteniendo las siguientes condiciones de hierro: a) FeCl₃ 37 μM, b) sin hierro agregado, c) DP 75 μM, y d) DP 75 μM dicitrato férrico 100 μM. A los 30, 60, 120 y 180 minutos de incubación a 30°C se tomaron muestras de 10 ml, y se guardó el pellet celular en *RNAlater*[®] (*Life Technologies*), un buffer que mantiene la integridad del ARN, hasta su extracción. Se realizaron extracciones de tres réplicas biológicas para los ensayos de RT-qPCR y dos réplicas para los ensayos de RNAseq. Las extracciones de ARN total se realizaron mediante el método de Trizol [86] con modificaciones. Los pellet celulares se resuspendieron en 300 μl de buffer de lisis (Tris-HCl 50 mM pH 8, EDTA 10 mM pH 8, SDS 0,1%). Se agregó 1 ml de Trizol[®] (*Life Technologies*) y se mezclaron bien por inversión. Se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente, y luego se agregaron 200 μl de cloroformo. Se mezclaron por inversión y se incubaron 3 minutos a temperatura ambiente. Después de centrifugar 5 minutos a 12000 g, se transfirieron 600 μl de la fase acuosa a tubos nuevos. Se adicionaron 500 μl de isopropanol, se mezclaron bien por inversión, y se incubaron 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente a una centrifugación de 10 minutos a 12000 g, se descartaron los sobrenadantes. Se realizó un lavado con Etanol 70%, se secaron los pellets de ARN resultantes al vacío, se resuspendieron en 50 μl de agua libre de nucleasas y se almacenaron a -70°C.

La calidad, integridad y eficiencia de las extracciones de ARN se verificó en gel de agarosa 1%, por espectrofotometría en un NanoDrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer (*ThermoScientific*) y mediante una corrida en un chip de *Agilent 2100 Bioanalyzer*. Para mejorar las muestras de

baja calidad que tuvieran posibles contaminantes, se precipitaron con 3 volúmenes de Etanol absoluto y 0,1 volúmenes de Acetato de sodio 3M, durante 2 horas a -20°C.

Finalmente, las muestras de ARN fueron tratadas con DNAsa I, durante 1 hora a 37°C para eliminar posible ADN genómico contaminante.

PCR en tiempo real

A partir de 2 µg de ARN de cada muestra extraída de todas las condiciones a todos los tiempos trabajados (30, 60, 120 y 180 minutos), se generó ADN copia empleando una retrotranscriptasa con cebadores aleatorios incluidos en el kit *High Capacity RNA-to-cDNA kit* (Life Technologies). Se realizaron también controles negativos sin enzima retrotranscriptasa. Analizando el genoma de *H. seropedicae* SmR1 se encontraron y seleccionaron 5 genes posiblemente involucrados en los mecanismos de captación de hierro a nivel de membrana interna. Para detectarlos y cuantificarlos, se diseñaron cebadores específicos (Tabla 3) usando el software *PrimerExpress3.0* (Applied Biosystems). Se diseñaron cebadores también para el gen *fecA* (Hsero_1277). La eficiencia de amplificación de los mismos se testeó analizando por PCR en tiempo real, utilizando como molde un pool de los ADN copia de todas las muestras, y conjuntos de diferentes diluciones seriadas (1:10, 1:5 y 1:2). El gen codificante para el ARN ribosomal 16S fue utilizado como gen normalizador para la cuantificación relativa. La PCR cuantitativa fue llevada a cabo en un equipo *Step One Plus Real-Time PCR System* (Applied Biosystems). Las reacciones de amplificación fueron realizadas en un volumen final de 5 µl conteniendo un mix comercial concentración final 1X *Power SYBR Green PCR Master Mix* (Life Technologies) que incluye enzima polimerasa, dNTPs, intercalante fluorescente y buffer correspondiente; cebador sentido 1 µM y cebador antisentido 1 µM para cada gen; y 1 µl de ADN copia de una dilución 1:5 como molde. El programa de ciclado consistió en una desnaturalización inicial de 10 minutos a 95°C, seguida de 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C. Se realizó una cuantificación relativa de la expresión génica mediante el

método del $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [87], analizando los datos con el software del mismo equipo y los parámetros seteados por defecto.

Tabla 3. Secuencia de cebadores utilizados para la RT-qPCR, diseñados para los genes seleccionados.

Gen	Cebador	Amplicón
Hsero_1277	Fwd: 5' CCGTTCTATGCCCGCACTAC 3' Rev: 5' TGGGTGGTCGACAGATTGAA 3'	80 pb
Hsero_2720	Fwd: 5' GCGACGCCAGACCTACTT 3' Rev: 5' GCGCATCCAGAACACCATCT 3'	80 pb
Hsero_4534	Fwd: 5' GCCGAACTGACCAAGCAACT 3' Rev: 5' GCTTCTTCTGGTCCAGGTATTCC 3'	85 pb
Hsero_2230	Fwd: 5' TCAACCCAGCCATTCACAGA 3' Rev: 5' CCGATGCGAACAGGGAAA 3'	83 pb
Hsero_0598	Fwd: 5' CTGGGCTGACCTGCAAAAG 3' Rev: 5' CGACATAGCCGACGAAAGC 3'	80 pb
Hsero_0051	Fwd: 5' TCCTGGTGCTGTTCTTCTTCATC 3' Rev: 5' CCCACCGAGACCATCAG 3'	95 pb

Construcción de librerías y secuenciación masiva

Un total de 7 µg de ARN obtenidos de las muestras tomadas a los 60 minutos se secaron en vacío y re-suspendieron en 15 µl de agua libre de nucleasas. Para enriquecer las muestras en ARN mensajero y disminuir la cantidad de ARN ribosomal se utilizó el kit *MICROBExpress* (Ambion). Luego, las muestras se precipitaron con Etanol absoluto y Acetato de sodio nuevamente. Se construyeron las librerías para la secuenciación masiva utilizando el kit *ION total RNA-seq kit v2 for whole transcriptome libraries* (Life Technologies), siguiendo el protocolo del fabricante. Básicamente, consistió en la fragmentación de 750 ng de ARN de cada muestra con ARNasa. Posteriormente se hibridaron y ligaron los fragmentos de ARN con adaptadores. A continuación se generó ADN copia del ARN, y se purificó el mismo con el kit *PureLink PCR Microkit* (Invitrogen). Mediante una corrida en gel de agarosa (E-gel) se seleccionó y aisló la banda con los fragmentos del tamaño deseado (150-250 pb). Luego se

realizó una amplificación del ADN copia mediante PCR (16 ciclos), con un cebador común a todas las muestras, y el otro cebador distinto para cada una, conteniendo distintos códigos de barra (*barcodes*); cada uno presenta un número del 1 al 8 asignado para luego poder identificar las muestras. Se purificó nuevamente el producto de PCR con el kit *PureLink PCR Microkit (Invitrogen)*. Seguidamente, se cuantificaron y mezclaron 11 pg de cada muestra en un solo tubo, ya que luego cada una podrá ser identificada por separado usando los códigos de barra ligados. Se ligaron los fragmentos de ADN copia a las esferas de secuenciación, y se realizó una PCR en emulsión para amplificar clonalmente los fragmentos alrededor de cada esfera. Después se realizaron varios lavados y centrifugaciones para quitar el aceite de la emulsión. A continuación de un enriquecimiento de la muestra, donde se eliminan las esferas que no resultaron unidas a ningún fragmento de ADN, se preparó el chip de secuenciación PI, se cargó el mismo con la muestra, se agregó la enzima polimerasa y se procedió a secuenciar las muestras en una plataforma *ION Proton semiconductor sequencer (Life Technologies)*, previa calibración e inicialización del equipo. La eficiencia de cada paso del protocolo, la calidad y la cuantificación de las muestras a secuenciar se verificaron mediante una corrida en un chip de *Agilent 2100 Bioanalyzer*. Se realizaron dos réplicas biológicas para cada condición. Los datos obtenidos fueron analizados utilizando el software *CLC Genomics Workbench 6.5.1* (<http://www.clcbio.com>). En primer lugar se hizo un filtrado del total de las lecturas (*reads*) utilizables obtenidas por calidad (parámetro de calidad Q mayor a 20), por longitud (mayores a 20 pb) y se eliminó la secuencia de los adaptadores de los extremos. Posteriormente se realizó el análisis de la expresión génica, mapeando las lecturas contra el genoma de referencia de la cepa secuenciada *H. seropedicae* SmR1 (NC_014323.1), que sólo presenta polimorfismos de simple nucleótido con nuestra cepa (comunicación personal de Emanuel M. de Souza). La expresión de los genes se calculó en RPKM; una medida de normalización de la expresión de un gen, que toma en cuenta las lecturas mapeadas en el gen, el total de lecturas obtenidas y el largo del gen en cuestión. Se consideró un gen como diferencialmente expresado entre las

condiciones de insuficiencia y suficiencia de hierro, cuando su expresión era al menos el doble o la mitad (*fold-change* mayor a 2 o menor a -2). Asimismo, se analizaron estadísticamente los datos, utilizando el T-test basado en proporciones Gaussianas. Se descartaron aquellos que tuvieran un p-valor mayor a 0,05, y se requirió un mínimo de cobertura total del gen de 3. La cobertura se calcula multiplicando el número de lecturas mapeadas y el largo de las lecturas, dividiendo sobre el tamaño del gen.

Construcción de mutantes y cepas marcadas

Para la construcción de las mutantes en los genes identificados se siguieron dos estrategias alternativas. Ambas comenzaron con la amplificación de las secuencias de los extremos del gen (aprox. 500 pb de cada lado) mediante cebadores diseñados específicamente (Tabla 4). Mediante una PCR cruzada (*crossover PCR*) [88] (Figura 9) se obtuvieron fragmentos únicos de ADN conteniendo los extremos de cada gen particular en un solo amplicón. Las mezclas de las PCR contaron con buffer de la enzima Pfu 1X, mezcla de dNTPs 0,2 mM, 0,2 μ M de cada cebador, enzima Pfu 2 U. Para la primera ronda de la PCR cruzada se tomó una colonia de *H. seropedicae* Z67 con palillo estéril, calentada a 95°C por 20 minutos, cuyo ADN se utilizó como molde; en esta ronda se utilizaron los cebadores P1-P2 y P3-P4. El ciclado de la primera ronda constó de una desnaturalización inicial de 5 min a 95°C; 30 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 60 °C y 1 minutos a 68°C; y finalmente una elongación de 10 minutos a 68°C. En la segunda ronda de PCR cruzada se utilizó como molde 1 μ l del producto de cada PCR anterior, y los cebadores P1-P4. El ciclado es el mismo, con la excepción de que los ciclos tienen 1,5 minutos de elongación a 68°C. De aquí en más las estrategias toman diferentes caminos, que se detallan a continuación.

Tabla 4. Secuencia de cebadores utilizados para la PCR cruzada. Las secuencias subrayadas corresponden a sitios de corte de las enzimas EcoRI (línea delgada) y XbaI (línea gruesa).

Gen	Cebador
Hsero_3255 (<i>fiu</i>)	P1: 5' <u>GGAATTC</u> CCTGACCGGCAATTTCCAATTCTG 3' P2: 5' GCCGCTGTCCACCTTGGTCGCGTGCTTGC GGCTTTG 3' P3: 5' GACCAAGGTGGACAGCGGC 3' P4: 5' <u>GCTCTAGAG</u> CCCGCGCTCTCGAAACAAAGG 3'
Hsero_2720	P1: 5' <u>GGAATTC</u> CGGCAAGAAGGGCGGCTAC 3' P2: 5' CAGGTCGTCATCAGGTCGTCAGACGACCTGTCCCATGAAACCCTTCC 3' P3: 5' GTCTGACGACCTGATGACGACCTG 3' P4: 5' <u>GGAATTC</u> CGGCTTTCCAGAGATTGTTC 3'

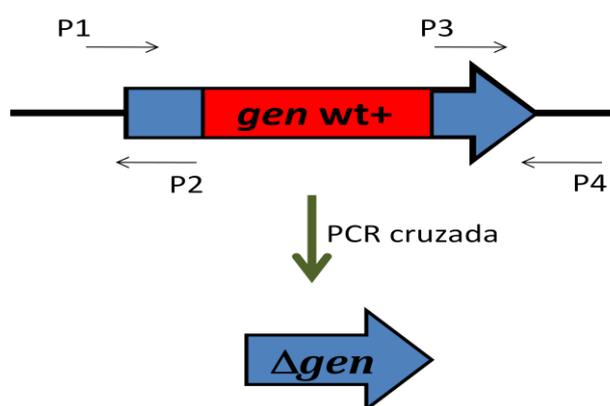


Figura 9. Esquema de la PCR cruzada; se señalan sitios donde hibridan los cebadores y como producto el gen deletado.

Estrategia I:

La mutante *fiu* y 2720 (Tabla 5) se obtuvieron mediante la estrategia de mutagénesis que se esquematiza en la figura 10. En la misma, el producto de PCR cruzada con extremos romos obtenido utilizando la enzima Pfu polimerasa, se insertó en el sitio EcoRV del vector pBSK, y transformó en células competentes de *E. coli* DH5 α (preparadas según Sambrook *et al.* [89] con variaciones), seleccionando en LB Amp⁵⁰. Luego se escindió mediante restricción con las enzimas EcoRI/XbaI y se subclonó en el plásmido pWS233 suicida en *H. seropedicae* Z67, previamente incubando por 2 minutos a 50°C tanto vector como inserto para facilitar la ligación (pWS- Δ gen). Células competentes de *E. coli* TOP10 se transformaron con esta construcción, seleccionando los clones en LB Tc¹⁰. La construcción se movilizó a *H. seropedicae*

Z67 mediante una conjugación triparental, utilizando la cepa de *E. coli* con el plásmido pRK2013 como colaboradora. En primera instancia se seleccionaron los simples eventos de recombinación en TY NaI⁵ Tc⁵, donde el plásmido con el inserto queda integrado al cromosoma de la bacteria. Se indujo luego el doble evento de recombinación en el cromosoma, y se seleccionaron en NFb- Malato sacarosa 8%, los clones que debido a haber sufrido doble evento de recombinación, perdieron la sensibilidad a sacarosa dada por el plásmido pWS233. De esta manera se obtuvieron las mutantes deseadas, que fueron verificadas por PCR de colonia. Como ADN molde se tomó una colonia con palillo estéril, calentada a 95°C por 20 minutos. La mezcla de PCR en un volumen final de 25 µl contenía buffer de la Taq polimerasa 1X, mezcla de dNTPs 0,2 mM, 0,2 µM de cada cebador, enzima Taq 2 U. El programa de ciclado de todas las verificaciones por PCR inició con una desnaturalización inicial de 5 minutos a 95°C; 30 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C y 1,5 minutos a 72°C; y una elongación final de 10 minutos a 72°C.

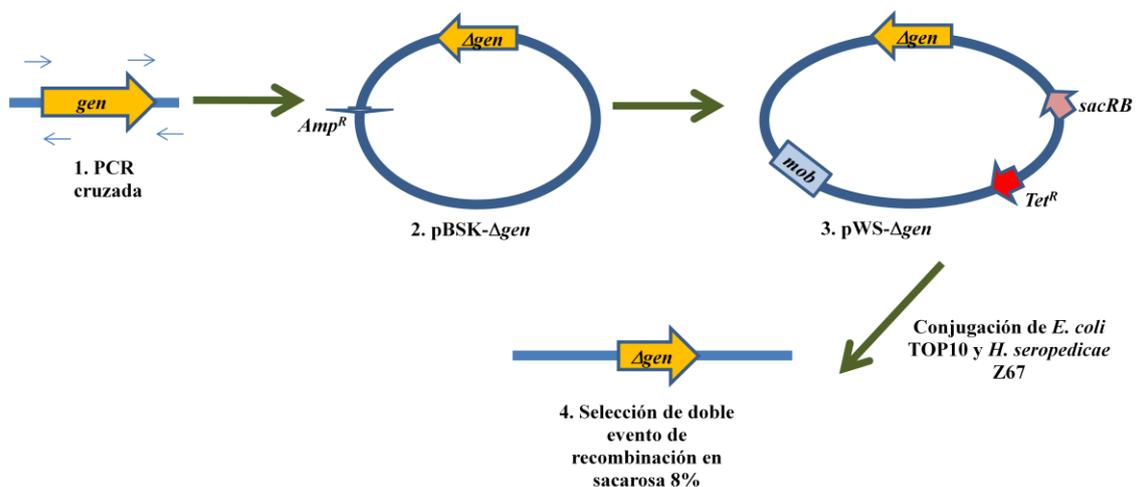


Figura 10. Esquema de la estrategia I de mutagénesis.

Estrategia II:

Para la mutante Fiu también se probó una segunda estrategia basada en el trabajo de Pósfai et al. [90] con modificaciones, que se esquematiza en la figura 11. El producto de PCR se insertó

en el plásmido pSEVA 312S, entre los sitios de las enzimas de restricción EcoRI y XbaI; plásmido que contiene sitios de corte para la nucleasa I-Sce-I. Se electroporaron células electrocompetentes de *H. seropedicae* Z67 (preparadas según protocolo de Sambrook *et al.* [89] con variaciones) con dicha construcción (pSEVA- Δ gen), y se seleccionaron en TY NaI⁵ Cm²⁵ los eventos donde ocurrió recombinación en el cromosoma bacteriano, quedando la construcción integrada en el mismo, evento que se verificó por PCR. Luego mediante electroporación se introdujo el plásmido pSEVA 412S portador de la nucleasa I-Sce-I. Colonias de *H. seropedicae* Z67 con la presencia del plásmido 412S y el pSEVA- Δ gen integrado al cromosoma se seleccionaron en TY NaI⁵ Cm²⁵ Str¹⁰⁰ y se verificaron por PCR. Se indujo luego la expresión de la nucleasa mediante el agregado de 15 mM de 3-metil-benzoato en un cultivo de este co-integrado, para que así produjera cortes en los sitios correspondientes en el pSEVA 312S integrado. Luego mediante la maquinaria de reparación de la propia célula, se repararían los cortes eliminando el fragmento correspondiente al plásmido, y se seleccionarían en TY NaI⁵ Cm²⁵, por sensibilidad a Cm²⁵, aquellos clones donde quedó únicamente el gen mutado en el cromosoma. Mediante múltiples repiques sucesivos en TY NaI⁵ se curaría del plásmido pSEVA 412S.

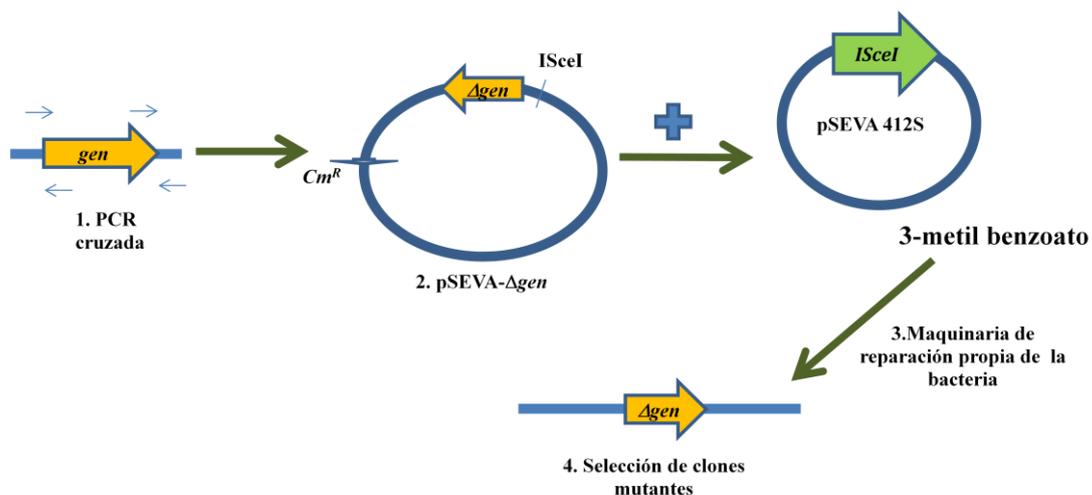


Figura 11. Esquema de la estrategia II de mutagénesis.

Utilizando las mutantes Z67*fecA::lacZaacC1*, Z67 Δ *fhuA* y Z672343::*mTn5gusA-o-pgfp* ya construidas en trabajos anteriores, se construyeron las dobles y triples mutantes en los genes *fecA*, *fhuA*, el gen de la enzima de biosíntesis de serobactinas y los identificados en este trabajo (Hsero_3255 y Hsero_2720) (Tabla 5). Se obtuvieron mediante conjugación triparental empleando como cepa dadora la transformación de *E. coli* TOP10 con pWS233 portando el gen con la mutación, y la *E. coli* TOP 10 con el plásmido pRK2013 como colaboradora. Se seleccionaron las transconjugantes en NFb-Malato sacarosa 8%. Todas las mutantes se verificaron por PCR de colonia, siguiendo el protocolo ya descrito.

Tabla 5. Características de todas las mutantes construidas en el trabajo

Mutante	Características
Fiu	<i>H. seropedicae</i> Z67 Δ <i>fiu</i> (gen Hsero_3255)
FecAFhuA	<i>H. seropedicae</i> Z67 <i>fecA::lacZaacC1</i> Δ <i>fhuA</i>
FhuAFiu	<i>H. seropedicae</i> Z67 Δ <i>fhuA</i> Δ <i>fiu</i>
FecAFiu	<i>H. seropedicae</i> Z67 <i>fecA::lacZaacC1</i> Δ <i>fiu</i>
FecAFhuAFiu	<i>H. seropedicae</i> Z67 <i>fecA::lacZaacC1</i> Δ <i>fhuA</i> Δ <i>fiu</i>
2343FhuAFiu	<i>H. seropedicae</i> Z67 Hsero_2343:: <i>mTn5-gusA-o-pgfp</i> Δ <i>fhuA</i> Δ <i>fiu</i>
2343FhuAFecA	<i>H. seropedicae</i> Z67 Hsero_2343:: <i>mTn5-guA-o-pgfp</i> Δ <i>fhuA</i> <i>fecA::lacZaacC1</i>
2720	<i>H. seropedicae</i> Z67 Δ Hsero_2720
2343FhuA2720	<i>H. seropedicae</i> Z67 Hsero_2343:: <i>mTn5-guA-o-pgfp</i> Δ <i>fhuA</i> Δ Hsero_2720

Cepas marcadas con proteínas fluorescentes se obtuvieron utilizando minitransposones de inserción única y neutral que portan proteínas fluorescentes [83], o plásmidos que también contienen genes que codifican para proteínas fluorescentes [82].

Para la inserción del minitransposón se realizó una conjugación tetraparental con dos cepas colaboradoras de *E. coli* DH5 α portadoras de plásmidos conteniendo la transposasa y la maquinaria de transposición; una *E. coli* DH5 α donante portadora de un plásmido con el minitransposón y la proteína fluorescente, y la cepa receptora de *H. seropedicae*. Se seleccionaron las cepas marcadas en TY NaI⁵ Cm²⁵ NF⁵⁰, este último para eliminar las *E. coli*.

Ensayos de colonización de la planta de arroz

Para los ensayos de colonización de plantas de arroz se utilizaron semillas de la variedad Tacuarí, cedidas gentilmente por el Ing. Agr. Sebastián Martínez de INIA Treinta y Tres. Para la esterilización de la superficie de las semillas, las mismas se descascararon, se incubaron 5 minutos en Etanol 70%, 30 minutos en hipoclorito de sodio 6% y se lavaron 20 veces con agua destilada estéril. Posteriormente se incubaron en una solución 62,5 mg/l de fungicida Difenconazol durante toda la noche a temperatura ambiente. Luego se lavaron 5 veces con agua destilada estéril, se secaron con papel absorbente estéril y se dejaron germinar durante 3 días en placas de agar-agua 1%, incubándose a 30°C en oscuridad.

A continuación se inocularon con las diferentes cepas por separado, incubándose en una solución bacteriana del orden de 10^6 células, por 30 minutos a 30°C y con agitación en un volumen de 1 ml por semilla. Posteriormente se realizó un lavado con agua destilada estéril, y las semillas inoculadas se pasaron a tubos de plantas conteniendo medio Hoagland (Ver Anexo 1), y se crecieron 8 días a 26°C con un fotoperíodo de 16 horas de luz.

A los 8 días post-inoculación, la superficie de las plantas (de unos 7 cm de alto), se esterilizó nuevamente con Etanol 70% por 1 minuto, Hipoclorito de sodio 6% por 1 minuto y 3 lavados con agua destilada estéril. Se secaron con papel absorbente y se cortó con bisturí estéril la parte aérea de las plantas. Se registró el peso fresco de las mismas, y posteriormente se maceraron con homogeneizador en 1 ml de NaCl 0,9% estéril. Del macerado resultante, se realizaron diluciones seriadas al décimo, y se sembraron en placas de NFb-Malato NaI⁵ para realizar recuento de colonias.

Ensayos de competencia de la colonización se realizaron con cepas marcadas y no marcadas con proteínas verde fluorescentes. En este caso, las semillas se incubaron en una solución bacteriana conteniendo dos cepas diferentes (marcada y no marcada) en una relación 1:1. El recuento final se realizó en un transiluminador SafelImager™ 2.0 (Invitrogen), para poder diferenciar entre las colonias de ambas cepas.

Los resultados fueron analizados estadísticamente con un análisis de varianza (ANOVA) con p -valor=0,05. Aquellas diferencias significativas se analizaron con un Test de Tukey con p -valor=0,05, utilizando el software *InfoStat* [91]. Se realizaron 5 réplicas biológicas en cada ensayo.

Ensayos de microscopía confocal con Syto9

Con el fin de estudiar la colonización interna individual se hicieron ensayos de microscopía confocal, con plantas inoculadas únicamente con la cepa salvaje de *H. seropedicae* Z67 o la doble mutante 2343FhuA como se explicó en la sección “Ensayos de colonización de la planta de arroz”, y utilizando el marcador Syto 9 Stain (*Life Technologies*), un intercalante fluorescente verde del ADN con excitación a 485 nm y emisión a 498 nm. Se realizaron cortes de distintas secciones de la planta (raíz y tallo), primero gruesos simplemente con bisturí, y luego montando la planta en bloques con Tissue-Tek® y realizando cortes finos de 20 μ m en un crióstato (Leica CM1800). Los distintos cortes se tiñeron con Syto9 12 μ M, durante 15 minutos en cámara húmeda, luego se lavaron con PBS 1X (Ver Anexo 1), se montaron en portaobjetos con líquido de montaje Citifluor y se les colocó un cubreobjeto, sellando los extremos.

Los cortes se visualizaron en un microscopio láser confocal Olympus BX-61 directo fluoview FV300 y empleando el software Olympus Fluoview Versión 4.3. La visualización se realizó con un objetivo de inmersión en aceite 100X, apertura numérica 1.35 y utilizando el láser 488. Se obtuvieron imágenes de 1024x1024 píxeles de secciones ópticas individuales, y de secciones consecutivas en el eje z (*stacks*) con una distancia entre imágenes de 0,3 μ m. La reconstrucción 3D de imágenes se llevó a cabo utilizando el software Volocity (*Perkin-Elmer*). Se analizaron imágenes de cortes tomados de plantas a los 8 días post-inoculación, de 5 tubos distintos para cada condición, como réplicas biológicas.

RESULTADOS

Proteínas de membrana no relacionadas al transporte de serobactinas son diferencialmente expresadas en medios limitados en hierro

Para poder identificar proteínas de membrana que participen en los sistemas de adquisición de fuentes nutricionales de hierro, y expresadas diferencialmente en condiciones limitantes del metal, alícuotas de las fracciones enriquecidas en proteínas de membranas totales fueron corridas en un gel de SDS-PAGE acrilamida 12% (Fig. 12) (para réplicas biológicas Ver Anexo 3). Las bandas que mostraron ser expresadas mayoritariamente en hierro suficiente (+Fe) o hierro deficiente (+DP) fueron identificadas por mapeo peptídico en MALDI-TOF y están indicadas con letras de la A a la G en la figura 12 y nombradas en la Tabla 6. Los resultados del análisis en el MALDI-TOF se detallan en el Anexo 4.

Tabla 6. Proteínas diferencialmente expresadas según la disponibilidad de hierro.

Banda	Locus tag	Descripción del gen	Condición en que se expresó
C	Hsero_0972	Transportador ABC de azúcares	FeCl ₃ 37 μM
B y G	Hsero_2973	Subunidad A de succinato deshidrogenasa	FeCl ₃ 37 μM, DP 50 μM Dicitrato férrico 10 μM
A	Hsero_4295	Porina	Todas las condiciones
E	Hsero_3255	Receptor TonB dependiente de catecoles monoméricos	DP 50 μM, DP 50 μM Dicitrato férrico 0,1 1 y 10 μM
E y F	Hsero_2345	Receptor TonB dependiente específico de serobactinas	DP 50 μM, DP 50 μM Dicitrato férrico 0,1 1 y 10 μM
F	Hsero_1277	Receptor TonB dependiente de dicitrato férrico	DP 50 μM, DP 50 μM Dicitrato férrico 0,1 1 y 10 μM
D	Hsero_2343	Enzima NRPS de biosíntesis de serobactinas	DP 50 μM, DP 50 μM Dicitrato férrico 0,1 y 1 μM

Dentro de las bandas expresadas diferencialmente cuando la disponibilidad de hierro es alta, se identificó el producto del gen Hsero_0972 un transportador de tipo ABC para azúcares (banda C) y el producto del gen Hsero_2973, correspondiente a la subunidad A de la succinato deshidrogenasa (banda B). Esta banda se identificó igualmente en presencia de citrato férrico 10 μM (banda G). La porina codificada por el gen Hsero_4295 (banda A) se expresó en todas las condiciones ensayadas. En condiciones de hierro limitante se identificaron tres

transportadores TonB-dependientes relacionados a la captación de hierro: Hsero_3255 (Fiu), un receptor anotado como involucrado en el transporte de catecoles monoméricos (banda E); Hsero_2345 (FhuA), el receptor específico de las serobactinas (identificado por picos característicos, tanto en la banda E como en la F); y Hsero_1277 (FecA), anotado como el receptor de dicitrato férrico (banda F). La banda D, una proteína de alto peso molecular, fue identificada como la enzima responsable de la síntesis de serobactinas (Hsero_2343).

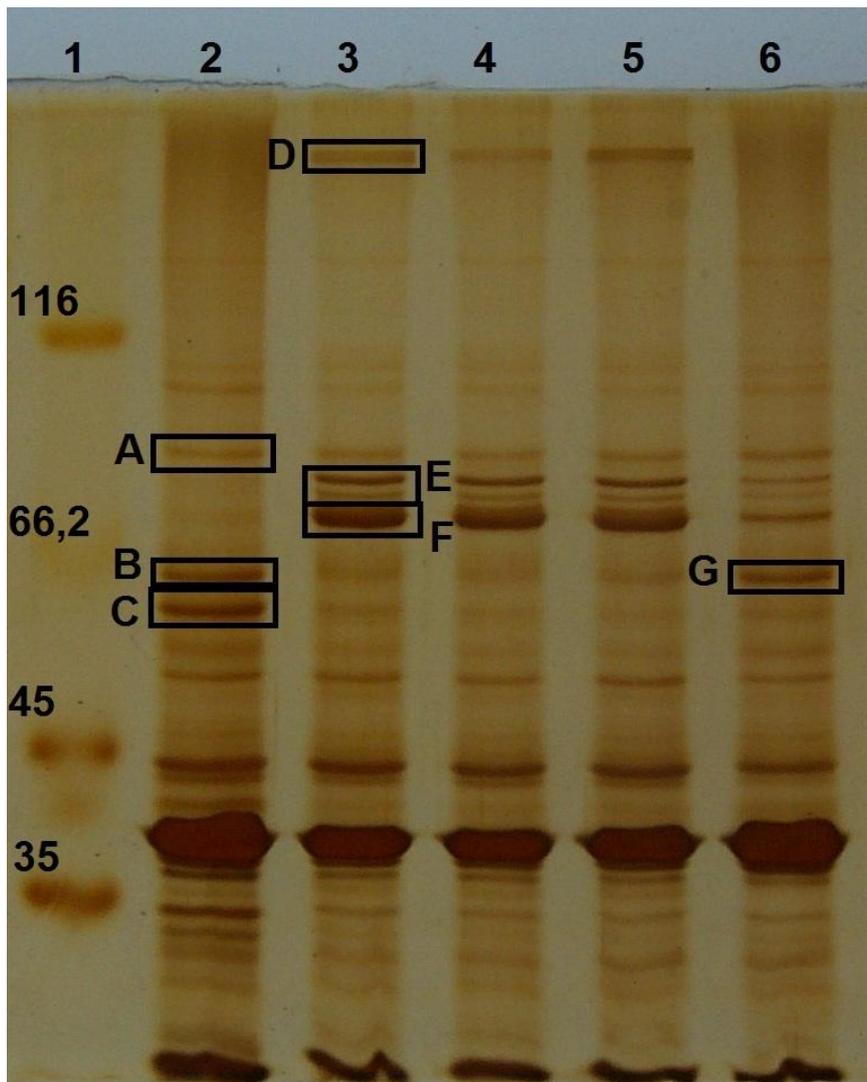


Figura 12. Proteínas de membrana expresadas diferencialmente según la disponibilidad de hierro. Muestras enriquecidas en proteínas de membrana se analizaron mediante SDS-PAGE (acrilamida 12%) y tinción por plata. Las letras de la A-G indican las bandas de proteínas identificadas por MALDI-TOF. Carril 1: marcador de peso molecular (KDa). Se sembraron además las fracciones de proteínas extraídas de cultivos en NFb-malato con: FeCl_3 37 μM (carril 2), DP 50 μM (carril 3), y DP 50 μM con dicitrato férrico 0,1 μM (carril 4), DP 50 μM dicitrato férrico 1 μM (carril 5) y DP 50 μM dicitrato férrico 10 μM (carril 6).

En resumen, además de dos proteínas (bandas D y E-F) involucradas en la adquisición de hierro mediada por serobactinas, dos proteínas probablemente involucradas en sistemas alternativos de adquisición del metal fueron identificadas: Fiu y FecA (bandas E y F).

Búsqueda de proteínas de membrana interna relacionadas al metabolismo de hierro mediante análisis genómico y RT-qPCR.

Mediante el acercamiento proteómico, no se identificaron proteínas de membrana interna relacionadas al transporte de serobactinas o de otras fuentes de hierro alternativas. Con el fin de identificar las posibles proteínas de membrana interna involucradas en la captación de hierro se realizó primero una búsqueda a nivel del genoma de *H. seropedicae* de genes homólogos a sistemas ABC de transporte de Fe³⁺ y homólogos a los transportadores de Fe²⁺ Feo y Ftr1 [59, 61]. Se encontraron y seleccionaron 5 genes posiblemente implicados en el metabolismo de hierro, cuyos contextos génicos se muestran en la figura 13; todos ellos codificantes de proteínas de membrana y periplásmicas.

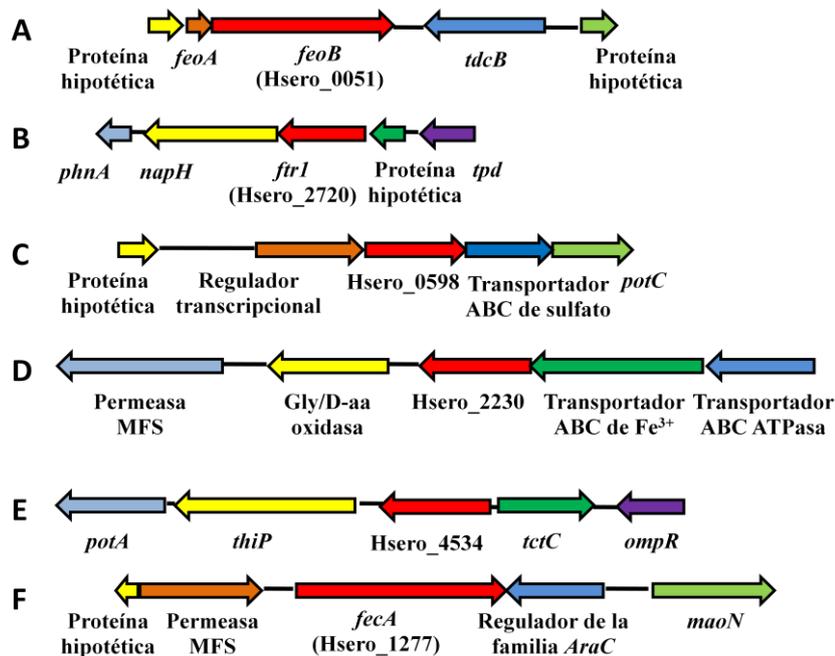


Figura 13. Contextos genómicos de los genes homólogos a proteínas de membrana interna. En rojo se representan los genes: Hsero_0051 (A), Hsero_2720 (B), Hsero_0598 (C), Hsero_2230 (D), Hsero_4534 (E), y Hsero_1277 (F).

El gen Hsero_0051 codifica para el transportador transmembrana de hierro Fe^{2+} FeoB (Fig. 13A), Hsero_2720 para la permeasa de alta afinidad $\text{Fe}^{2+}/\text{Pb}^{2+}$ (Fig. 13B), y Hsero_0598, Hsero_2230 y Hsero_4534 para tres componente periplásmicos de tres transportadores tipo ABC de Fe^{3+} (Fig. 13C, D y E). Se utilizó como control el receptor de dicitrato férrico FecA, codificado por el gen Hsero_1277 (Fig. 13F), ya que por resultados anteriores se sabía que debía expresarse diferencialmente en las condiciones trabajadas [78]. Se realizaron tres réplicas biológicas para cada condición (+Fe, -Fe, +DP y +DPCF) muestreado a los tiempos 30, 60, 120 y 180 minutos para la PCR cuantitativa. Las eficiencias de amplificación de todos los pares cebadores fueron superiores a 95%. En las muestras control no tratadas con retrotranscriptasa no hubo amplificación, u ocurrió en ciclos mayores al 38.

Los resultados de la cuantificación relativa de la expresión de cada gen en los distintos tiempos se resumen en la figura 14. Los resultados muestran que los genes Hsero_1277, Hsero_2720 y Hsero_0051 presentan niveles más altos de ARN mensajero en condiciones de hierro limitantes (+DP), con un pico de expresión a los 60 minutos. El resto de los genes, que corresponden a los tres transportadores tipo ABC, no muestran diferente expresión entre las distintas condiciones ensayadas. A los 180 minutos la expresión de todos los genes disminuye. En relación a la presencia de dicitrato férrico (+DPCF), todos los genes evaluados presentan niveles de ARN mensajero más bajo en todos los tiempos ensayados (Figura 14).

De los resultados obtenidos mediante esta aproximación se puede suponer que las proteínas FeoB y Hsero_2720 participarían en la adquisición de hierro a nivel de membrana interna en condiciones de hierro limitantes, mientras FecA lo haría a nivel de membrana externa.

Se analizó también la expresión del gen utilizado como normalizador (gen del ARNr 16S) a los distintos tiempos y condiciones, observándose que varía más de los esperado en condiciones de bajo hierro, y entre las distintas réplicas biológicas (Fig. 15). Los datos crudos de la PCR en tiempo real se encuentran en el Anexo 5.

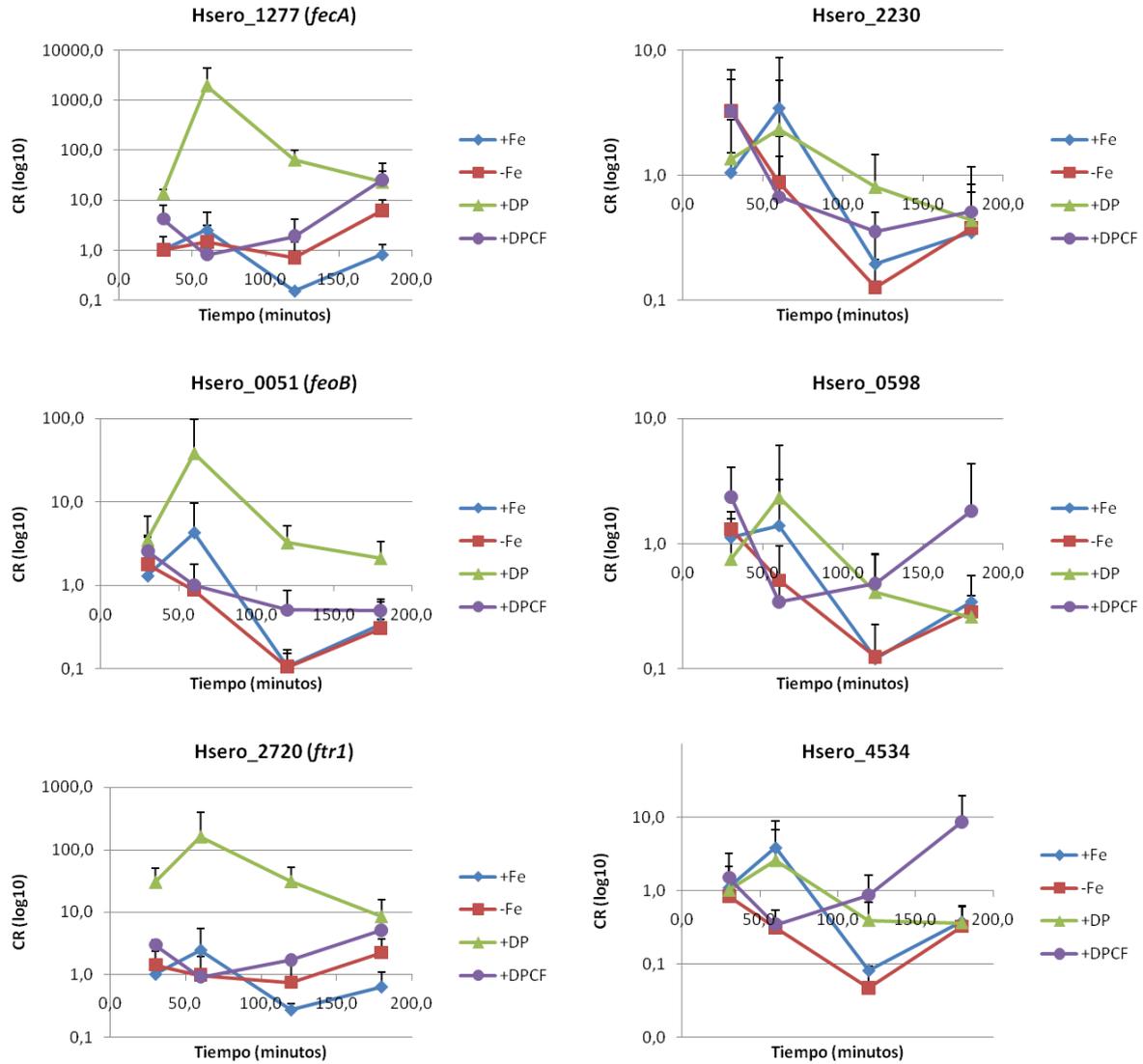


Figura 14. Niveles relativos de expresión de los distintos genes evaluados. Cuantificación relativa de la expresión génica expresada como logaritmo en base 10 (CR (log₁₀)) para cada gen en los 4 tiempos ensayados. Gen normalizador: ARNr 16S. Condición calibradora: con hierro (+Fe) a los 30 min. Cada punto se grafica con su barra de error (desvío estándar). Se realizaron tres réplicas biológicas.

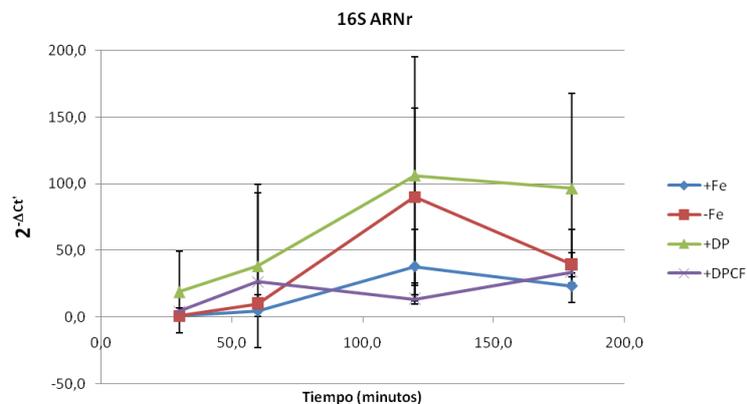


Figura 15. Niveles de expresión del gen normalizador (16S ARNr). Método del 2^{-ΔCt} utilizando como condición calibradora: con hierro (+Fe) a los 30 min. Cada punto se grafica con su barra de error (desvío estándar). Se realizaron tres réplicas biológicas.

Transcripción génica global en respuesta a la restricción de hierro en *H. seropedicae*

Con el fin de ver la expresión global de genes relacionados al metabolismo de hierro ante la escasez del metal en *H. seropedicae* Z67, se aplicó la técnica de RNA-seq utilizando la plataforma *ION Proton semiconductor sequencer*. Se realizaron dos réplicas biológicas de cada condición de disponibilidad de hierro y tres réplicas técnicas (tres corridas), únicamente para el tiempo 60 minutos. En el caso de las muestras de la condición con citrato férrico, se realizaron sólo dos corridas. En total se obtuvieron poco más de 332 millones de lecturas (*reads*). Luego de un filtrado realizado automáticamente por el software de la plataforma de secuenciación, que elimina las lecturas de baja calidad, quedaron unas 142 millones de lecturas utilizables. De ellos, solamente alrededor de un 20% pasaron el filtrado manual por calidad y longitud, y fueron mapeados contra el genoma de referencia anotado. Finalmente se realizó el estudio de la expresión génica comparando entre las diferentes condiciones de disponibilidad de hierro y citrato férrico. Los resultados completos se encuentran en el Anexo 6.

Los genes sobre-expresados bajo condiciones de hierro limitantes se enumeran en la Tabla 7. Dentro de las proteínas probablemente presentes en membrana externa, los genes: *FecA* transportador de dicitrato férrico y el siguiente gen corriente abajo que es un regulador transcripcional; dos receptores TonB-dependientes *Hsero_2337* y *Hsero_0948* mostraron tendencia a estar más expresados en condiciones de bajo hierro. A nivel de membrana interna y periplasma, entre los genes sobre-expresados en condiciones de hierro insuficientes, se encontró al componente periplásmico de un transportador tipo ABC de Fe^{3+} ; la permeasa de alta afinidad codificada por el gen *Hsero_2720*; y algunas proteínas reguladas por hierro (*Hsero_2341* y *Hsero_3248*). A nivel de citoplasma la lipasa *Hsero_2344*, el gen contiguo a *FhuA* el receptor específico de las serobactinas, mostró tendencia a sobre-expresarse.

A su vez, el gen *Hsero_1987*, la proteína *EpsL*, que participa en la síntesis de la matriz de exopolisacáridos de las biopelículas que forman algunos microorganismos, no evidentemente relacionado al metabolismo de hierro, fue sobre-expresado por falta del metal.

Tabla 7. Genes sobre-expresados en ausencia de hierro. Se muestra para cada uno la diferencia de expresión entre las condiciones de insuficiencia (+DP) y suficiencia (+Fe) de hierro (*fold-change*) y el p-valor del test estadístico (Ver Anexo 6, Tablas A3 y A4)

Locus tag	Descripción del gen	Fold-change	p-valor
Hsero_0948	Receptor TonB-dependiente	57,7	0,05
Hsero_1277	Transportador de membrana externa de dicitrato férrico	7,5	0,05
Hsero_1278	Regulador transcripcional de la familia AraC	2,9	0,04
Hsero_1892	Componente periplásmico de transportador tipo ABC de Fe ³⁺	13,7	0,03
Hsero_2337	Receptor TonB-dependiente	27,3	0,02
Hsero_2344	Esterasa/lipasa perteneciente al casete de las serobactinas	14,2	0,01
Hsero_2431	Proteína de membrana regulada por hierro	5,8	0,02
Hsero_2720	Permeasa de alta afinidad Fe ²⁺ /Pb ²⁺	59,4	0,01
Hsero_3248	Proteína de membrana regulada por hierro	19,6	0,03
Hsero_4800	Proteína tipo ferredoxina [2Fe-2S]	3,6	0,03
Hsero_1987	Proteína de biosíntesis de exopolisacáridos2	3,9	0,02

Resultó sorprendente no identificar los genes relacionados a la biosíntesis y transporte de serobactinas (a excepción de la lipasa y el Hsero_2337). Con p-valor mayor a 0,05, pero *fold-change* mayor a 2 se encontró a: los genes Hsero_2337 al 49 (genes del casete de biosíntesis de las serobactinas), Hsero_2719 (*napH*, siguiente gen corriente arriba de la permeasa Hsero_2720), Hsero_4514 (factor sigma *fecI*), Hsero_0033 (receptor TonB-dependiente), Hsero_0689 (*exbD* del complejo TonB), Hsero_1494 (*ptsX*, un regulador transcripcional de tipo LacI expresado a continuación pero en sentido contrario a un receptor TonB-dependiente), Hsero_2542 (proteína regulada por hierro), Hsero_0050 y Hsero_0051 (*feoA* y *feoB*, respectivamente).

Dentro de los genes reprimidos por ausencia de hierro, el gen *bfr* (Hsero_1195), que codifica para un homólogo a bacterioferritinas, se reprime en ausencia de hierro (-2,9 y un p-valor de 0,001). También algunos genes relacionados al flagelo se expresan menos en condiciones de bajo hierro (*flgN*, *fliP*, *flhB*, *motB*). El resto de los genes de los operones *flg*, *fli* y *flh* tienden a estar reprimidos en ausencia del metal (*fold-change* menor a -2), pero su p-valor es mayor a 0,05.

Los componentes alternativos del complejo TonB, *exbB2* (Hsero_1167) y *exbD2* (Hsero_1168), fueron sobre-expresados en presencia de dicitrato férrico, con *fold-change* de 9,5 y 3,5 y p-valor de 0,05 y 0,02, respectivamente. Sorprendentemente, no sólo no se encontraron más

genes relacionados al metabolismo del hierro que pudieran responder a la presencia de dicitrato férrico, sino que los cultivos mostraron expresión de genes no esperados, como aquellos de respuesta a estrés y toxicidad a metales pesados (*copZ*, bombas y sistemas ATP de eflujo), sistemas de regulación por GMP di-cíclico, de metabolismo de carbono, entre otros.

Participación de los genes *fiu*, *fecA* y Hsero_2720 en la adquisición de hierro

Con los datos obtenidos, se postuló la hipótesis que *H. seropedicae* utiliza, además de utilizar las serobactinas sintetizadas por la enzima NRPS (Hsero_2343) e internalizadas por el transportador FhuA (Hsero_2345), utiliza las proteínas Fiu, FecA y la permeasa codificada por el gen Hsero_2720 como sistemas alternativos a la adquisición de hierro en esta bacteria. Con el fin de comprobar la hipótesis construimos mutantes en dichos genes. Para la construcción de la mutante dirigida en el gen identificado *fiu* (Hsero_3255) se plantearon dos estrategias en paralelo. La primera estrategia (Estrategia II en la sección “Construcción de mutantes y cepas marcadas” de Materiales y Métodos) se basa en el método descrito por Pósfai *et al.* [90], en el cuál se utiliza la endonucleasa I-Sce-I expresada *in trans* para resolver sitios de recombinación homóloga del co-integrado de un plásmido en el genoma. Mediante esta técnica no se logró obtener la cepa mutante esperada. Se llegó hasta la construcción del co-integrado del plásmido pSEVA- Δ *fiu* en el cromosoma y la electroporación del plásmido portador de la nucleasa. Pero no fue posible inducir la actividad de la misma con el agregado del 3-metilbenzoato a una concentración de 15 mM y por 6 y 16 horas. Esta técnica permite quitar fragmentos grandes de ADN, por lo que sería interesante ponerla a punto, cambiando concentraciones de benzoato o mayor tiempo de incubación, para poder aplicarla en *H. seropedicae*.

Se utilizó una segunda estrategia (Estrategia I en la sección “Construcción de mutantes y cepas marcadas” de Materiales y Métodos) que emplea un plásmido suicida con el gen de sensibilidad a sacarosa *sacRB* para seleccionar un doble evento de recombinación homóloga.

Esta técnica fue utilizada previamente para la construcción del mutante *fecA* [78] y la *fhuA* [79]. Mediante esta estrategia se logró obtener la mutante carente del gen Hsero_3255 (*fiu*) y la mutante en el gen Hsero_2720.

Con el objetivo de ver el efecto en el fenotipo de más de una mutación simultánea en los sistemas de adquisición de hierro, construimos dobles y triples mutantes en los genes identificados. Una vez que los genes deletados o interrumpidos están clonados en el vector suicida pWS233, es posible hacer conjugación triparental con cualquier cepa receptora. Siguiendo el protocolo descrito anteriormente se construyeron mutantes carentes en dos y tres de los genes estudiados (Ver Tabla 5 en la sección “Construcción de mutantes y cepas marcadas” de Materiales y Métodos).

El fenotipo esperado para las diferentes mutantes es que no se vean afectados los sistemas de adquisición mediados por serobactinas, pero su crecimiento se vea enlentecido en medios donde la disponibilidad de hierro es baja. Las diferentes mutantes fueron caracterizadas fenotípicamente evaluando su capacidad para producir o internalizar serobactinas, en su capacidad de utilizar citrato férrico como fuente nutricional de hierro y su crecimiento en medio líquido.

Para evaluar la producción de serobactinas se crecieron las cepas en placas de medio con el indicador CAS. La cepa salvaje *H. seropedicae* Z67 presenta halo en placa CAS alrededor de la colonia, indicando la producción de sideróforos serobactinas [77] (Fig. 16A). *FecA* (Fig. 16B), *Fiu* (Fig. 16D) poseen el mismo fenotipo. Todas aquellas mutantes dobles-triples donde el gen Hsero_2343 de la enzima de biosíntesis de serobactinas está interrumpido, como era de esperarse, no presentaron halo naranja alrededor del crecimiento, (mutantes 2343FhuA, 2343FhuAFecA y 2343FhuAFiu, Figuras 16 I, J y K, respectivamente). Igualmente esperado es que aquellas mutantes con el gen *fhuA* interrumpido presentan un halo mayor debido a la acumulación de serobactinas en el medio (FhuA, FecAFhuA, FhuAFiu y FecAFhuAFiu, Figuras 16

C, E, G y H, respectivamente). Ninguna de las mutantes construidas utilizando como parental la *fhuA* presenta diferencias en el tamaño de halo. Esos resultados permiten concluir que ninguno de los tres genes evaluados participa en los sistemas de adquisición mediados por serobactinas.

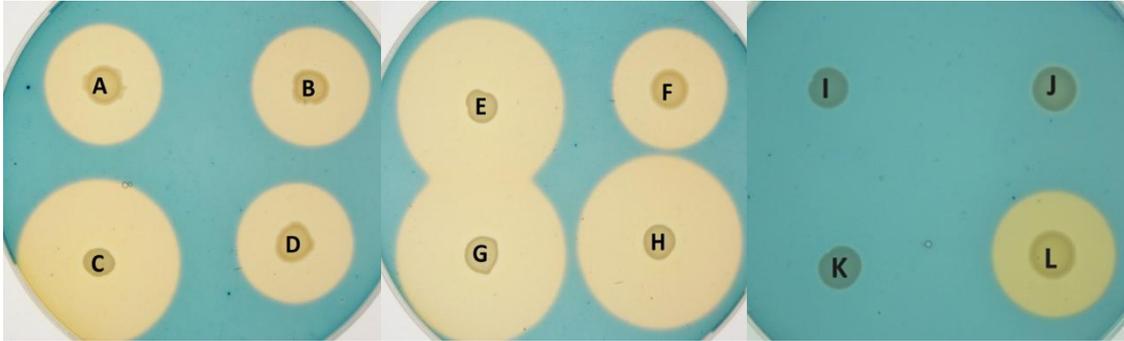


Figura 16. Hsero_2720, FecA y Fiu no están involucrados en la adquisición de hierro por serobactinas. Placas de medio con indicador CAS sembradas con: Z67 (A), FecA (B), FhuA (C), Fiu (D), FecAFhuA (E), FecAFiu (F), FhuAFiu (G), FecAFhuAFiu (H), 2343FhuA (I), 2343FhuAFecA (J), 2343FhuAFiu (K), 2720 (L).

La utilización de citrato férrico y ferricromo como fuentes nutricionales de hierro fue evaluada mediante bioensayos [50]. El control con la cepa salvaje (Fig. 17A) indica que la misma es capaz de crecer con serobactina férrica y dicitrato férrico como fuentes de hierro. Todas las cepas presentan halo de crecimiento alrededor de los pocillos de los controles positivos con FeCl_3 (pocillo 1) y ferricromo (pocillo 2). Las mutantes FecA (Fig. 17B), Fiu (Fig. 17D), 2720 (Fig. 17E) y FecAFiu (Fig. 17H) presentan halo de crecimiento alrededor de los pocillos que contienen tanto serobactina férrica (pocillo 3) como dicitrato férrico (pocillo 4). Las cepas donde el gen *fhuA* no está activo no presentaron halo de crecimiento en el pocillo suplementado con Fe^{3+} -serobactina (Figuras 17 C, F, G, I, J, K y L), pero sí alrededor del pocillo de dicitrato férrico.

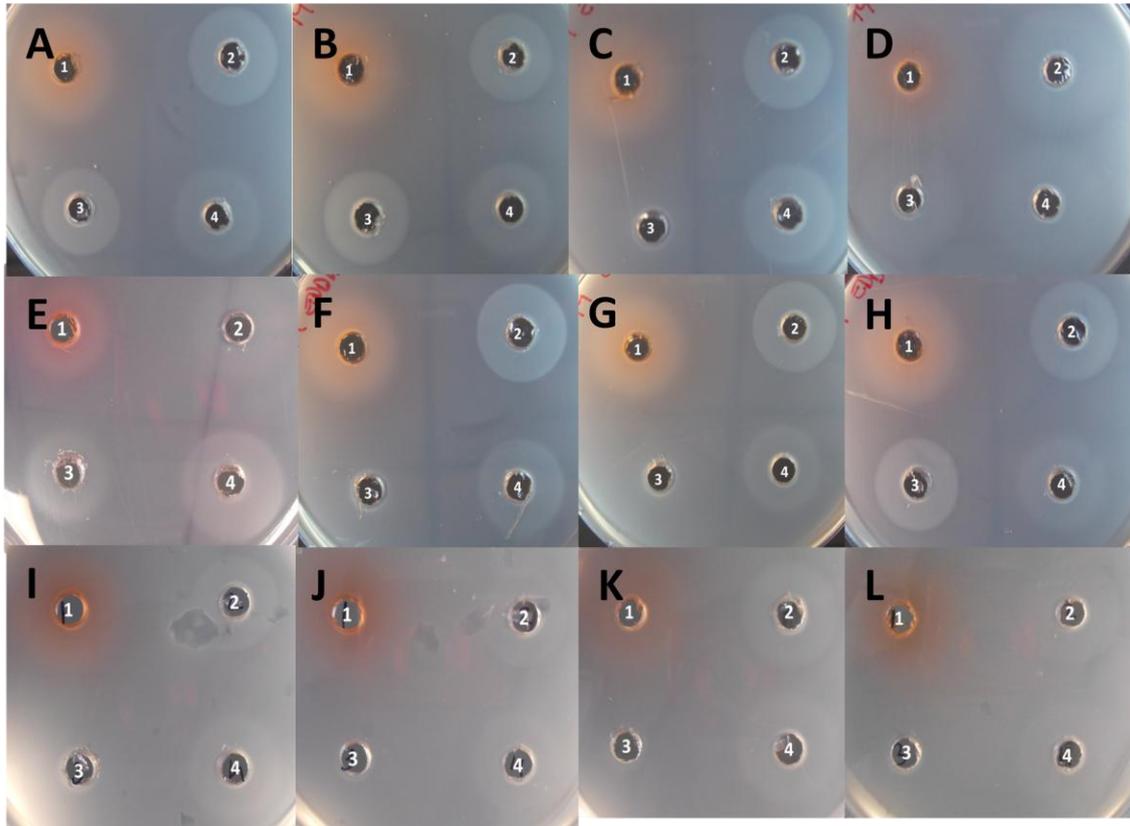


Figura 17. Utilización de diferentes fuentes nutricionales de hierro por la cepa salvaje y mutantes. Bioensayos en medio TY EDDHA 400 μ M, con FeCl_3 37 mM (1), Ferricromo 0,5 mM (2), serobactina férrica 300 nM (3) y dicitrato férrico 2 mM (4). A: Z67, B: FecA, C: FhuA, D: Fiu, E: 2720, F: FhuAFecA, G: FiuFhuA, H: FecAFiu, I: 2343FhuA, J: 2343FhuAFecA, K: 2343FhuAFiu, L: FecAFhuAFiu.

La capacidad de crecer en medios limitados en hierro fue evaluada mediante curvas de crecimiento. El crecimiento de todas las cepas resultó similar en condiciones de suficiencia de hierro (FeCl_3 37 μ M) y la única simple mutante cuyo fenotipo se ve significativamente afectado por escasez de hierro ya desde las 20 horas de incubación fue la FhuA, mutante incapaz de internalizar serobactinas (Figuras 18, 19, 20 y 21).

Cuando además del gen *fhuA* se muta *fiu*, el crecimiento de dicha doble mutante se ve más comprometido que la simple mutante FhuA (Fig. 18 y 19); no así para la FecAFhuA que crece igual a FhuA. La doble mutante FecAFiu, presenta un crecimiento sin diferencias significativas respecto a la bacteria salvaje, al igual que las simples mutante FecA, Fiu y 2720 (Fig. 20). Al

mismo tiempo, la mutante doble 2343FhuA muestra un fenotipo de crecimiento similar a la Z67 silvestre a las 44 horas de incubación, revirtiendo el fenotipo observado para la FhuA simple (Fig. 20A y 21). El fenotipo de la triple mutante 2343FhuAFiu también compromete significativamente el crecimiento de la bacteria con respecto a la cepa 2343FhuA (Fig. 20A y 21); esto no ocurre para las triples 2343FhuAFecA y 2343FhuA2720, cuya curva no se diferencia significativamente de la salvaje (Fig. 20B)

Finalmente, la triple mutante FecAFhuAFiu tiene una velocidad de crecimiento menor al resto, y asimismo alcanza una DO final significativamente menor que la cepa salvaje, tanto a las 20 como las 30 horas de incubación, una diferencia de $DO=0,6$ (Fig. 18 y 19).

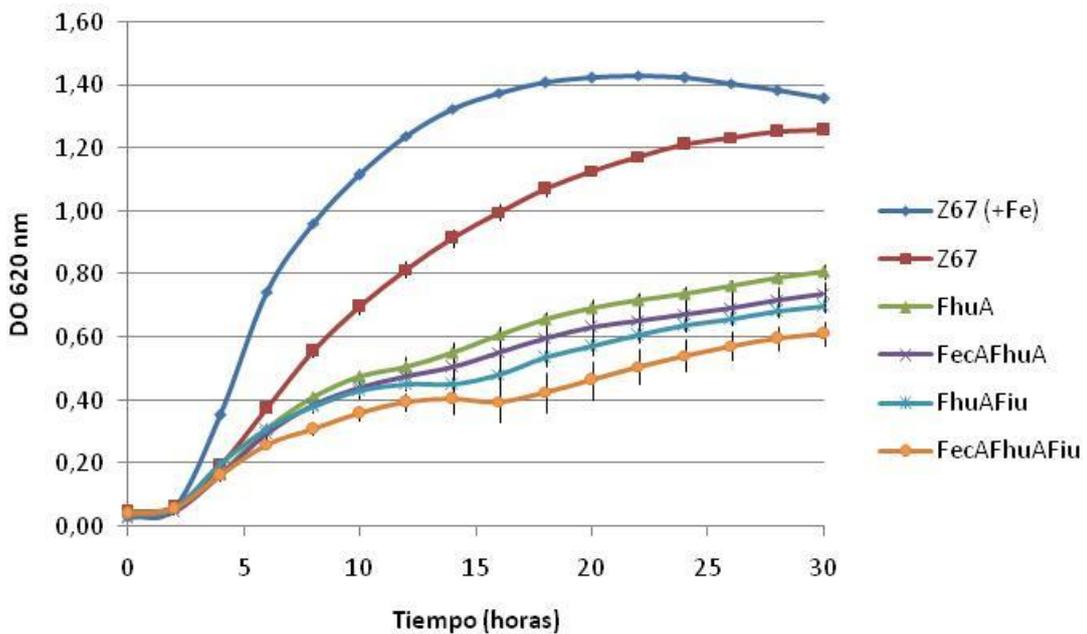


Figura 18. Curvas de crecimiento en medio TY $FeCl_3$ 37 μM y TY DP 100 μM . El crecimiento de todas las cepas en TY +Fe no mostró diferencias, por lo cual sólo se representa la cepa Z67. Se realizaron tres ensayos independientes con resultados similares. Cada punto presenta su barra de error (desvío estándar)

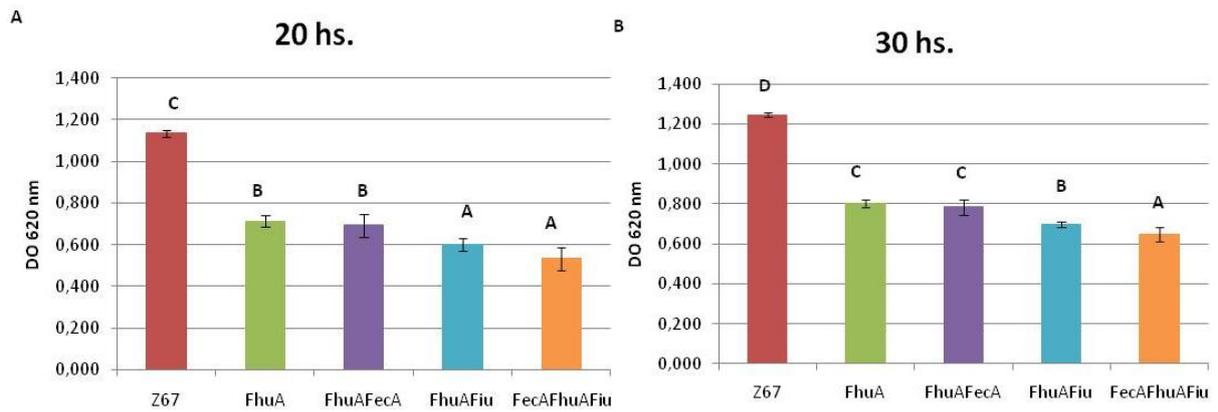


Figura 19. Análisis de la varianza (p-valor=0,05) de la DO a 620 nm a los tiempo 20 (A) y 30 hs. (B) de las curvas en TY DP 100 μ M para las distintas mutantes. Cada columna presenta su barra de error (desvío estándar). Letras distintas indican diferencias significativas.

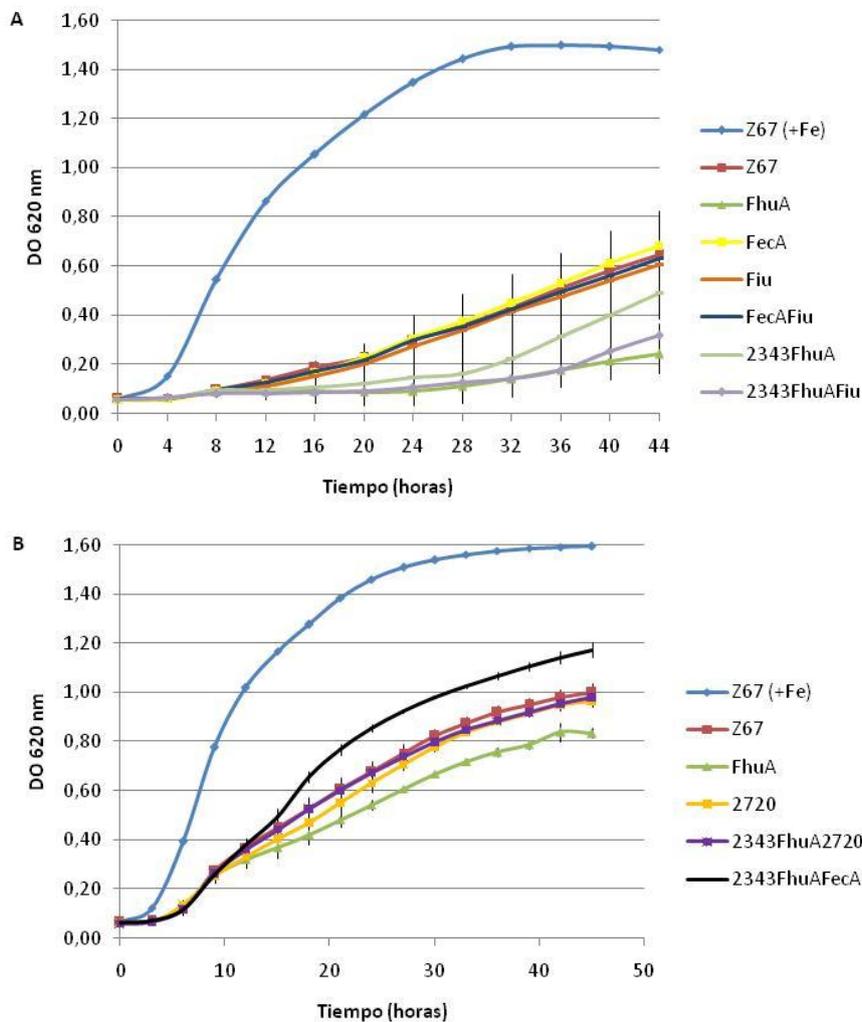


Figura 20. Curvas de crecimiento en medio TY FeCl₃ 37 μ M y TY DP 200 μ M. El crecimiento de todas las cepas en TY +Fe no mostró diferencias, por lo cual sólo se representa la cepa Z67. Se realizaron tres ensayos independientes con resultados similares. Cada punto presenta su barra de error (desvío estándar). En (A) se muestran las mutantes: FhuA, FecA, Fiu, FecAFiu, 2343FhuA y 2343FhuAFiu. En (B), las mutantes: FhuA, 2720, 2343FhuA2720 y 2343FhuAFecA.

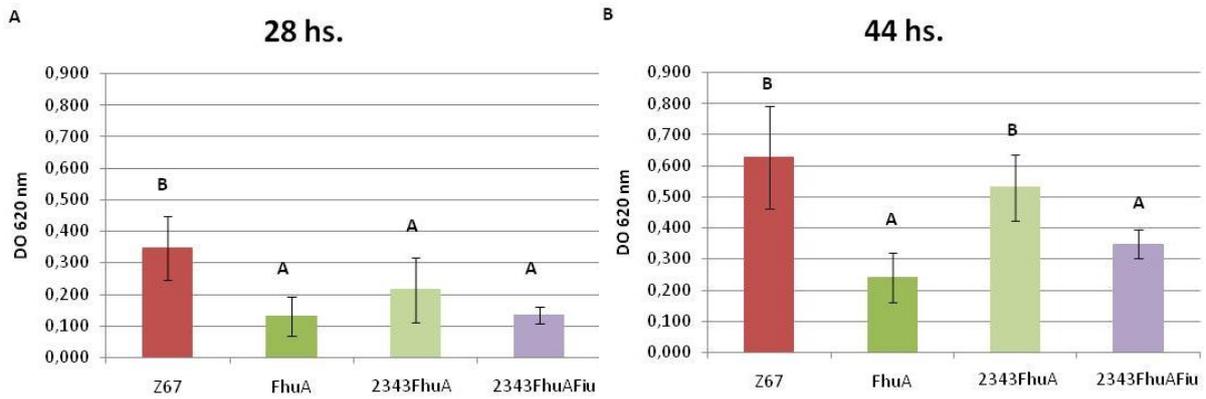


Figura 21. Análisis de la varianza (p-valor=0,05) de la DO a 620 nm a los tiempo 28 (A) y 44 hs. (B) de las curvas en TY DP 200 μ M para las distintas mutantes. Cada columna presenta su barra de error (desvío estándar). Letras distintas indican diferencias significativas.

En el caso de las mutantes FhuA, FhuAFiu, FecAFhuA y FecAFhuAFiu se construyeron curvas de crecimiento también en medio mínimo NFb-malato con hierro o con quelante DP (Fig. 22). Los resultados son equiparables a los obtenidos en medio rico TY, alcanzando la mutante simple FhuA una DO final menor que la bacteria salvaje y levemente mayor que las dobles mutantes; y éstas a su vez una DO final mayor a la FecAFhuAFiu. Las velocidades de crecimiento son similares para todas las cepas.

En suma, la triple mutante carente en los tres receptores TonB-dependientes es la cepa que muestra su crecimiento mayormente comprometido en condiciones de hierro limitantes.

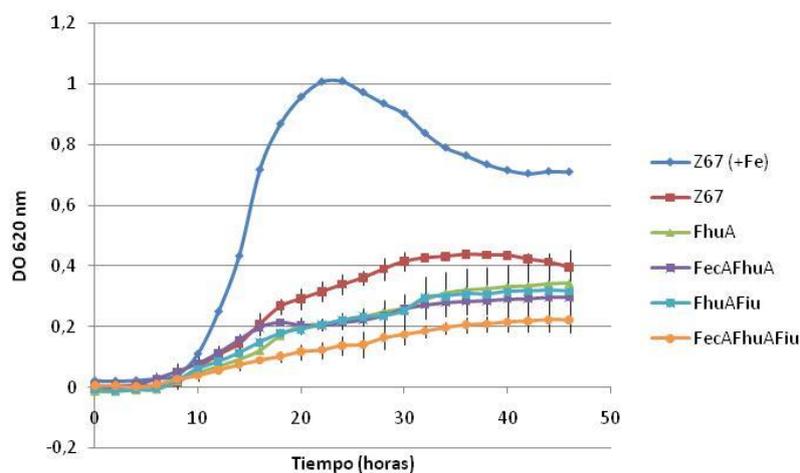


Figura 22. Curvas de crecimiento en medio NFb-malato FeCl_3 74 μ M y DP 50 μ M. El crecimiento de todas las cepas en NFb +Fe no mostró diferencias, por lo cual sólo se representa solo la cepa Z67. Se realizaron tres ensayos independientes con resultados similares. Cada punto presenta su barra de error (desvío estándar)

La capacidad de colonizar individualmente plantas de arroz no se ve afectada en ninguna de las mutantes construidas

En trabajos anteriores, se demostró que la capacidad de colonizar plantas de arroz de las cepas *fecA* y *fhuA* no se ve afectada. La caracterización *in vitro* de las mutantes construidas muestra que la triple mutante en los genes *fhuA*, *fecA* y *fhu* presenta el crecimiento más comprometido en medios limitados en hierro. De esta manera se evaluó la capacidad de colonizar plantas de arroz de las cepas construidas y se representan en la figura 23. Los datos mostrados son resultado del promedio de 5 réplicas biológicas por condición. La colonización individual de las cepas mutantes no presenta diferencias significativas con respecto a *H. seropedicae* Z67 salvaje, según un análisis de varianza con un p-valor de 0,05.

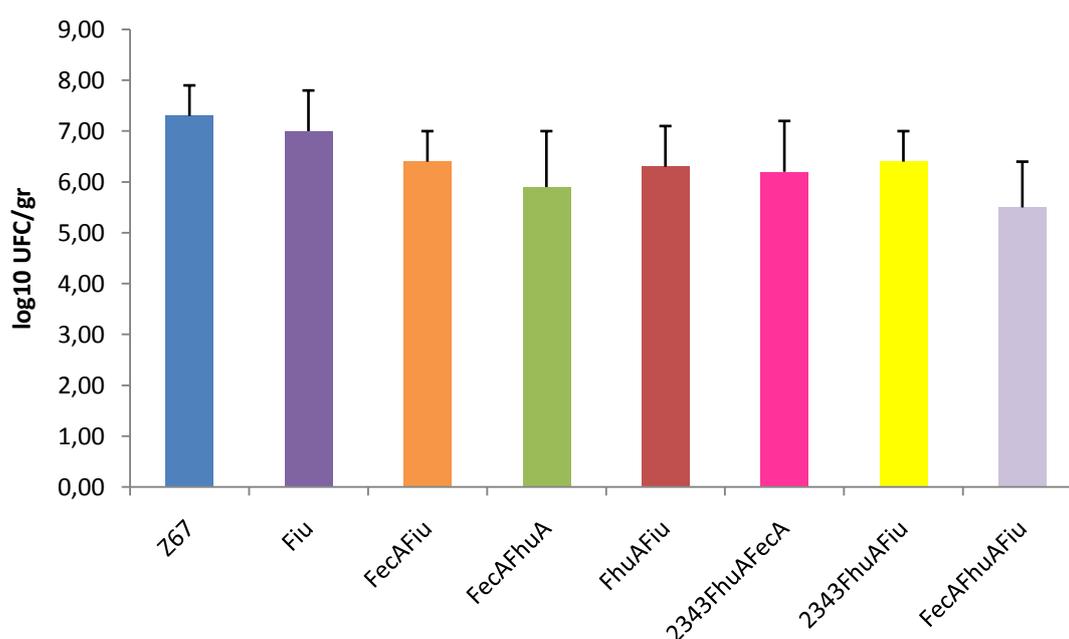


Figura 23. Colonización individual de la parte aérea de la planta de arroz por las diferentes cepas, expresado como el \log_{10} de las UFC/gr de peso fresco. Cada columna presenta su correspondiente barra de error con el desvío estándar.

Cuando evaluamos la colonización mediante recuentos en placa utilizando *lacZ* como gen reportero, los resultados obtenidos sugieren que *H. seropedicae* utiliza otros mecanismos para

suplirse de hierro en el interior de la planta. Aunque dispensables para la colonización y supervivencia en plantas de arroz, los sistemas mediados por serobactinas confieren una ventaja competitiva, según resultados de competencia hechos entre la cepa salvaje y la doble mutante 2343FhuA (Rosconi *et al.* 2015, manuscrito en revisión). Es así que surgen dos hipótesis: 1) la cepa salvaje y la doble mutante 2343FhuA poseen un patrón de colonización diferente de los distintos compartimentos de la planta; y 2) los genes *fecA* o *fiu* confieren también una ventaja competitiva a la hora de sobrevivir en el interior de la planta.

Para comprobar la primera hipótesis se realizaron ensayos de microscopía confocal de plantas colonizadas por la cepa salvaje o la mutante y tinción con el colorante general Syto9.

En los cortes de raíz y tallo de plantas de arroz, inoculadas con *H. seropedicae* Z67 y 2343FhuA respectivamente y vistos en microscopio confocal, se observó la colonización interna individual de la planta por las bacterias. Ambas cepas alcanzaron la raíz y la parte aérea de la planta. En la imagen de la figura 24, se puede observar la colonización del espacio intercelular de los tejidos vegetales de la raíz de arroz, por parte de la cepa salvaje. En la figura 25 se muestra una biopelícula formada por la cepa salvaje alrededor de un pelo radicular de la planta de arroz. Se puede ver un apilamiento de secciones ópticas (Fig. 25A), todas las vistas de una sección óptica en un valor xyz fijo (Fig. 25B), y la descomposición de la imagen en dos canales, en rojo la autofluorescencia de la planta, y en verde además la marcación específica (Fig. 25C y 25D).

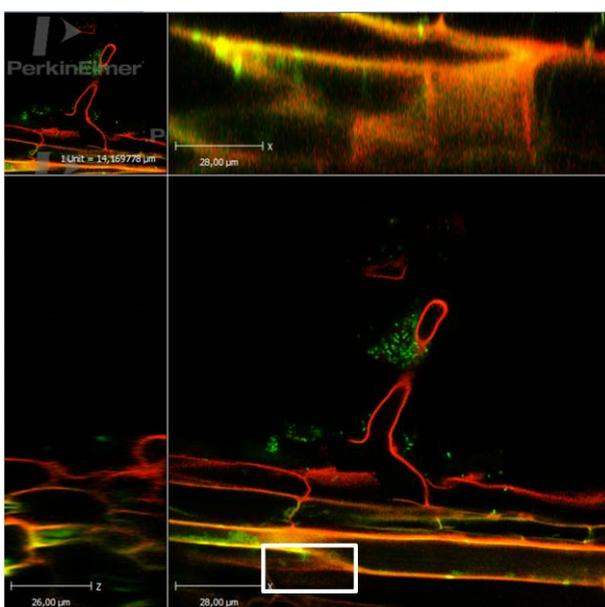


Figura 24. Colonización de la raíz de arroz por la cepa salvaje de *H. seropedicae* Z67. Vista de una sección óptica por microscopía confocal; en rojo la autofluorescencia de la planta, en verde además la marcación específica. El recuadro representa el sector de los planos x (arriba) y z (izquierda abajo).

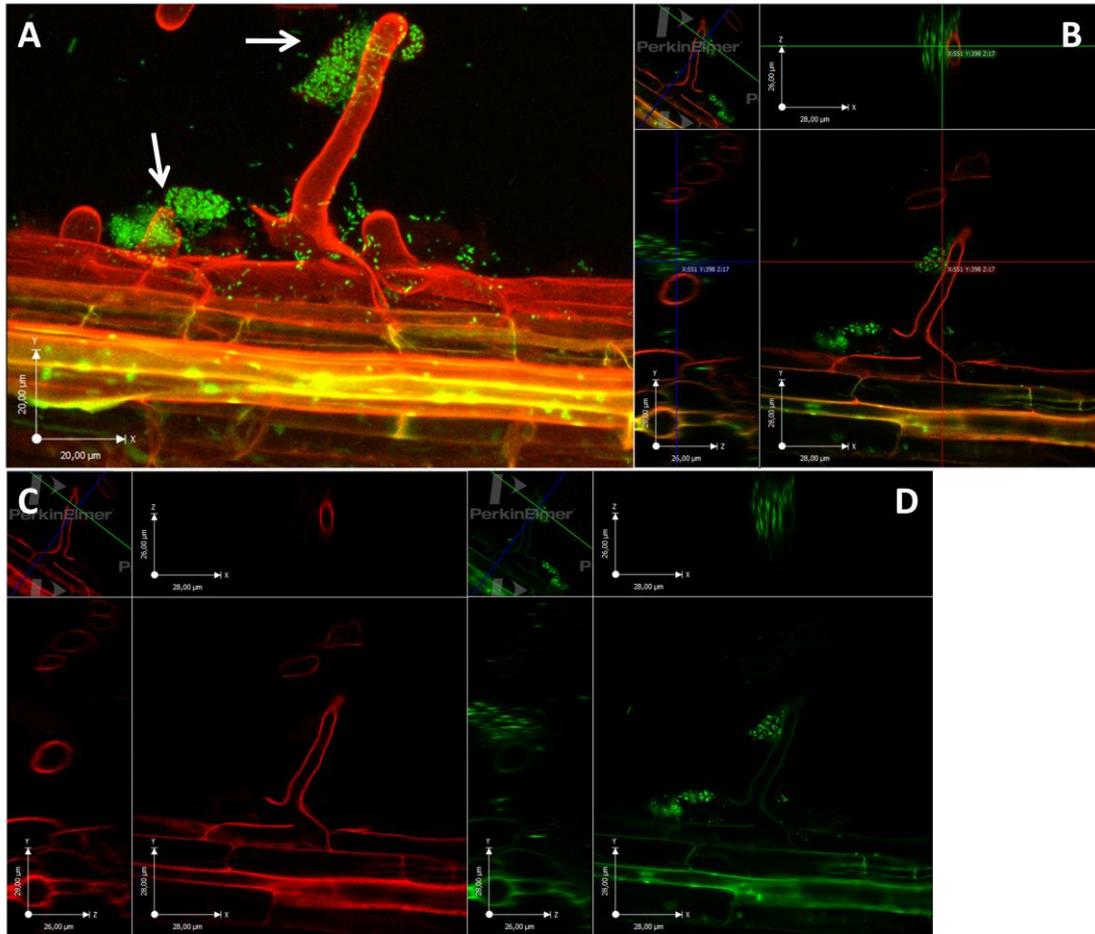


Figura 25. Imágenes de microscopía confocal de un pelo radicular siendo colonizado por una biopelícula (flechas) de bacterias de *H. seropedicae* Z67, en rojo se ve la autofluorescencia de la planta y en verde además la marcación específica con syto9. Foco extendido (A), sección óptica (B), sección óptica en canal rojo (C) y sección óptica en canal verde (D).

La colonización interna del tallo de arroz por la cepa mutante 2343FhuA se evidencia en la figura 26: sección óptica (Fig. 26A) y un apilamiento de secciones ópticas (Fig. 26B). Se muestra la formación de una biopelícula de bacterias en el vaso central del tallo. Finalmente encontramos que hay colonización de los tricomas de la parte aérea, glándulas vegetales de diversas funciones, como se evidencia en la figura 27.

Tanto la cepa salvaje como la 2343FhuA alcanzan el xilema y el tallo de la planta de arroz. Estos resultados muestran que el patrón de colonización de ambas cepas es similar, por lo que se descartaría la primera hipótesis.

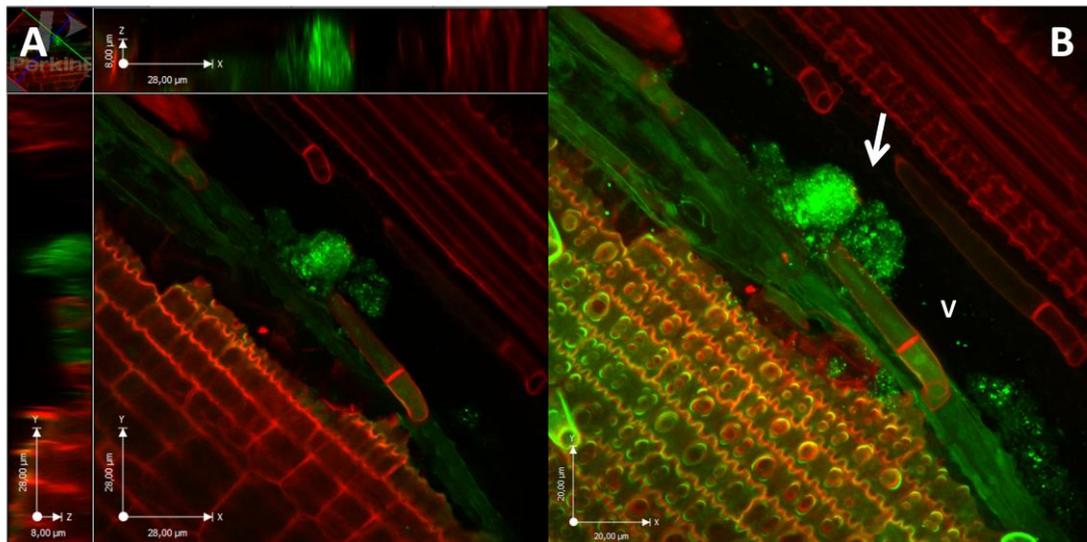


Figura 26. Colonización de un vaso vascular (v) de un tallo por una biopelícula (flecha) de bacterias de 2343FhuA. Imágenes de microscopía confocal; en rojo se ve la autofluorescencia de la planta y en verde además la marcación específica con syto9. Sección óptica (A), foco extendido (B).

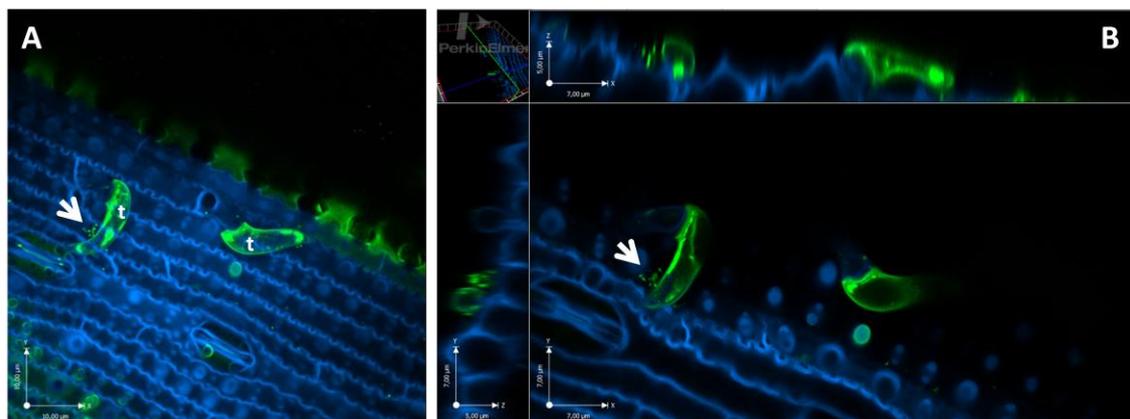


Figura 27. Colonización de la parte aérea de la planta arroz por la cepa salvaje de *H. seropedicae* Z67. Imágenes de microscopía confocal; en azul se ve la autofluorescencia de la planta, en verde además la marcación específica. (A)-apilamiento de secciones ópticas en el eje Z, (B)-sección óptica. Se observan tricomas (t), y las flechas señalan grupos de bacterias.

Competencia entre distintas cepas por la colonización de la planta de arroz

La segunda hipótesis plantea que los genes *fiu* y *fecA* confieren una ventaja competitiva al momento de sobrevivir en la planta, como lo hacen las serobactinas. Para demostrar este papel de las serobactinas se utilizó como gen marcador *lacZ*, pudiendo diferenciar cepa salvaje de mutante mediante colonias blanco-azules (Rosconi *et al.* 2015, manuscrito en revisión).

Para poder evaluar la competencia entre las diferentes mutantes construidas en este trabajo se decidió utilizar proteínas fluorescentes. Estas proteínas permitirían evaluar la colonización mediante recuento en placa y también permitiría estudiar la competencia mediante microscopía confocal.

Con el fin de obtener cepas marcadas se utilizó una estrategia (a) de inserción del minitransposón mini-Tn7 portando la proteína verde fluorescente (GFP) [83], y se obtuvieron la doble mutante no productora de sideróforos 2343FhuA y la cepa silvestre marcadas. Dichas cepas son claramente diferenciables en un transiluminador (Figura 28). La segunda estrategia (b) que se planteó, de utilizar plásmidos portadores de proteínas fluorescentes, no resultó exitosa.

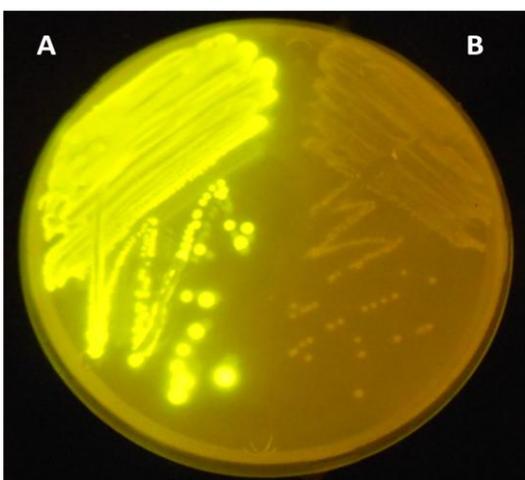


Figura 28. Marcado de la mutante 2343FhuA con GFP (A) y de la triple mutante FecAFhuAFiu no marcada (B). Placa con medio TY vista en transiluminador.

El resultado del recuento de colonias se expresó en todos los casos como el \log_{10} de UFC/gr de peso fresco de parte aérea de la planta, el porcentaje de cada cepa con respecto al total (Figura 30), y el valor del Índice de Competitividad (IC) para cada ensayo de competencia (Tabla 8). El IC se calcula como la proporción de la cepa al final de la competencia dividido la proporción de la cepa al inicio del ensayo [92]. Todos los ensayos contaron con al menos 5 réplicas cada uno.

Los ensayos de competencia por la colonización de la planta de arroz fueron realizados entre la doble mutante 2343FhuA marcada con GFP (2343FhuA-GFP) contra las tres triples mutantes

construidas en este trabajo. En la figura 30A se resumen los resultados obtenidos en esta etapa. La cepa 2343FhuA-GFP presentó un valor de \log_{10} UFC/gr de $5,87 \pm 0,42$ (un 85%, IC=1,7) contra un valor de $4,17 \pm 2,36$ (15%, IC=0,3) de la cepa 2343FhuAFiu. Las diferencias no son significativas si tomamos en cuenta los valores de \log_{10} , pero sí lo son para los porcentajes, aunque dichos datos no son normales. Por su parte, la competencia entre la doble mutante marcada y la variante 2343FhuAFecA arrojó como resultados de \log_{10} UFC/gr $5,58 \pm 1,14$ y $5,26 \pm 1,04$, y porcentajes de 68% (IC=1,4) y 32% (IC=0,6), respectivamente. Al igual que en el caso anterior, las diferencias son significativas si consideramos los porcentajes, pero no si consideramos los valores de \log_{10} . En el último caso, la colonización de 2343FhuA-GFP fue de un valor de \log_{10} UFC/gr de $5,2 \pm 0,41$ y un 20% (IC=0,4), mientras que para la mutante FecAFhuAFiu fueron de $5,86 \pm 0,29$ y 80% (IC=1,6). Las diferencias para esta competencia son significativas, pero los valores de porcentajes no son datos normales.

Este último resultado es contradictorio a los dos anteriores. Una explicación posible, es que el marcado con la proteína GFP esté afectando la colonización de la planta. Para evaluar esta posibilidad y validar la metodología empleada, realizamos curvas de crecimiento en medio rico y ensayos de competencia por la colonización entre las cepas salvaje y la doble mutante 2343FhuA, ambas marcadas y no marcadas.

El crecimiento *in vitro* no muestra diferencias en el patrón de crecimiento entre las cepas Z67 y 2343FhuA no marcadas y las cepas isogénicas marcadas con GFP (Fig. 29).

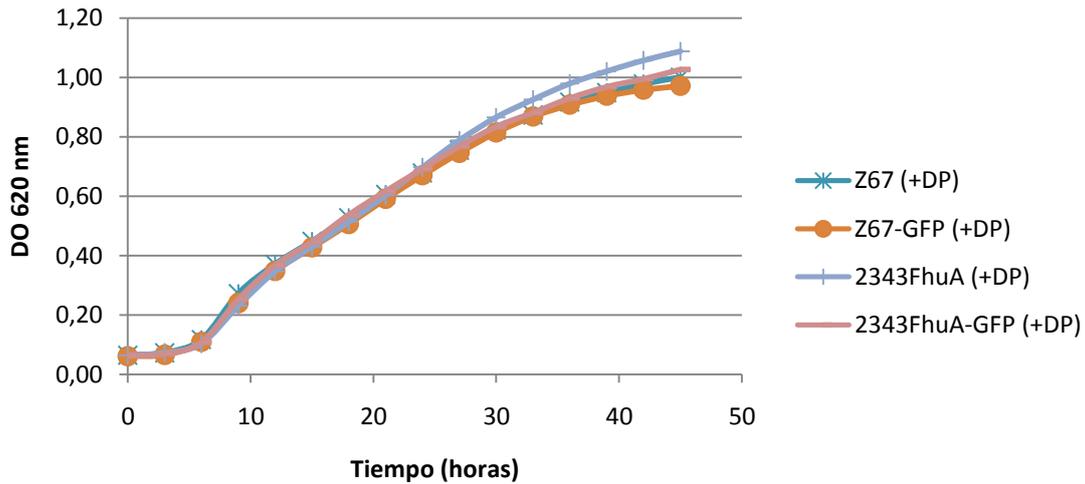


Figura 29. Curvas de crecimiento en medio TY DP 200 μ M, de cepas marcadas y no marcadas con GFP. Se realizaron tres ensayos independientes con resultados similares.

En los ensayos de competencia, la cepa silvestre coloniza en un 90:10 con respecto a la mutante marcada con GFP, y valores de \log_{10} UFC/gr de $6,51 \pm 0,88$ y $5,19 \pm 0,49$ e IC de 1,8 y 0,2, respectivamente (Fig. 30B). El análisis estadístico indicó que existen diferencias significativas en la colonización de ambas cepas, aunque los datos de porcentajes no son normales. La competencia entre la cepa salvaje y la cepa isogénica marcada con GFP, dio como valores de recuento $6,69 \pm 0,88$ y un 60% (IC=1,2), contra $6,97 \pm 0,59$ y un 40% (IC=0,8) (Fig. 30B). El análisis estadístico indica que existen diferencias significativas si consideramos los valores de porcentaje, pero no así los valores del \log_{10} . Finalmente, los ensayos de competencia entre la cepa Z67 marcada con GFP (Z67-GFP) y la doble mutante no dieron diferencias significativas en la colonización de ambas, aunque los datos de porcentajes no fueron normales. Los resultados del recuento para la cepa Z67-GFP y 2343FhuA fueron $5,26 \pm 0,88$ (27%, IC=0,54) y $6,1 \pm 0,59$ (73%, IC=1,46) respectivamente (Fig. 30B).

En conjunto, estos resultados demuestran que el marcado con la proteína GFP estaría afectando el fenotipo de colonización de la planta de arroz por las cepas marcadas. Asimismo, resultó evidente que para obtener datos normales sería necesario poder evaluar un número mayor de plantas, ya que existe una gran varianza interna.

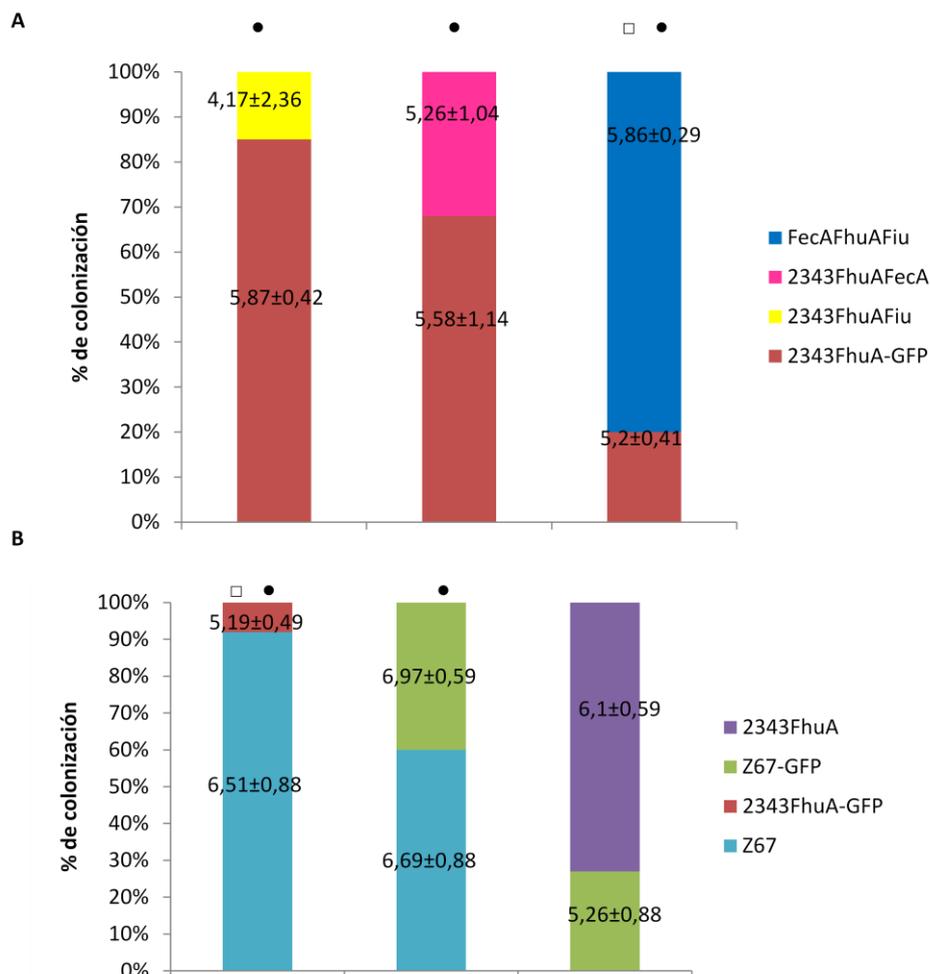


Figura 30. Competencia por la colonización de la planta de arroz co-inoculada con dos cepas, expresada como el % de colonización de cada cepa en cada ensayo de competencia. Las cifras con su error que aparecen en cada columna corresponden al valor del \log_{10} UFC/gr de parte aérea de la planta para cada cepa. □ significa que hay diferencias significativas cuando se consideran los valores de \log_{10} UFC/gr. ● indica que existen diferencias significativas si consideramos los porcentajes.

Tabla 8. Índices de Competitividad de cada cepa para los ensayos de colonización de arroz.

Competencia	IC (Índice de Competitividad)
2343FhuA-GFP:2343FhuAFiu	2343FhuA-GFP = 1,7 2343FhuAFiu = 0,3
2343FhuA-GFP:2343FhuAFecA	2343FhuA-GFP = 1,4 2343FhuAFecA = 0,6
2343FhuA-GFP:FecAFhuAFiu	2343FhuA-GFP = 1,6 FecAFhuAFiu = 0,4
Z67:2343FhuA-GFP	Z67 = 1,8 2343FhuA-GFP = 0,2
Z67:Z67-GFP	Z67 = 1,2 Z67-GFP = 0,8
Z67-GFP:2343FhuA	Z67-GFP = 0,54 2343FhuA = 1,46

DISCUSIÓN

El objetivo del presente trabajo fue identificar genes participantes de los mecanismos de adquisición de hierro alternativos a las serobactinas en el endófito diazótrofo *Herbaspirillum seropedicae* Z67, y evaluar su importancia en la colonización de la planta de arroz. Para ello, y mediante tres aproximaciones experimentales, se intentó identificar aquellas proteínas y genes inducidos en condiciones limitantes de hierro. Una vez identificados y seleccionados algunos de esos genes, se procedió a la construcción de mutantes en los mismos para evaluar su fenotipo.

Identificación de genes expresados en condiciones limitantes de hierro

La primera estrategia para estudiar expresión diferencial de genes, la cual ya habíamos empleado en trabajos anteriores, consistió en obtener fracciones enriquecidas en proteínas de membrana de cultivos crecidos en condiciones de alto y bajo hierro, y visualizar el perfil de dichas fracciones mediante SDS-PAGE. Mediante mapeo peptídico se logró identificar aquellas bandas que eran diferencialmente expresadas en condiciones limitantes de hierro (Fig. 12, Carril 3). Mediante esta técnica, no fue posible detectar bandas diferencialmente expresadas en presencia de citrato férrico (Fig. 12, Carriles 4 a 6) en comparación con la condición con alto hierro; aunque resulta evidente que a medida que aumenta la concentración de citrato férrico las bandas inducidas por falta de hierro se vuelven más tenues, y que se parecen más al perfil de bandas de la condición de hierro suficiente (Fig. 12, Carril 2). Se evidencia entonces que al aumentar la concentración de una fuente de hierro nutricional, las bandas sobreexpresadas en condiciones de bajo hierro, relacionadas a la captación del metal, se reprimen.

Mediante este abordaje se identificaron 6 proteínas diferencialmente expresadas y una proteína expresada en todas las condiciones estudiadas. Esta última fue una porina de membrana externa codificada por el gen Hsero_4295. Si bien no hay evidencia que en *H. seropedicae* Z67 esta porina tenga relación con la captación de hierro, en *Mycobacterium smegmatis* por ejemplo, unas porinas son las responsables de la captación del citrato férrico

por difusión. Cepas mutadas en los genes de dichas porinas presentan severamente afectado su crecimiento en condiciones deficientes de hierro [93].

En condiciones de hierro limitantes se identificaron proteínas ya estudiadas en trabajos anteriores: los transportadores TonB-dependientes de dicitrato férrico FecA (Hsero_1277), el receptor específico de las serobactinas FhuA (Hsero_2345), y la enzima responsable de la biosíntesis de serobactinas (Hsero_2343). En referencia a esta última proteína, está asociada a la membrana. Esto indicaría que la biosíntesis de los lipopéptidos serobactinas se daría a nivel de un “siderosoma” anclado a la membrana celular como ha sido demostrado para la biosíntesis de los sideróforos pioverdinas en *Pseudomonas aeruginosa* [94].

También bajo estas condiciones, se identificó el producto del gen Hsero_3255, anotado como Fiu, con homología a un receptor TonB dependiente de *E. coli*, donde transporta sideróforos del tipo catecoles monoméricos [95, 96].

Dentro de las bandas reprimidas por la falta de hierro, se identificó el producto del gen Hsero_0972 un transportador ABC de azúcares, y el producto del gen Hsero_2973, que corresponde a la subunidad A de la proteína succinato deshidrogenasa. Esta última se expresó tanto en condiciones de hierro suficientes como en la concentración más alta de dicitrato férrico ensayada, 10 μ M. En ensayos anteriores aún no publicados, vimos que la actividad de la enzima succinato deshidrogenasa en la cepa salvaje se encuentra regulada por la presencia de hierro. En condiciones de baja disponibilidad del metal, la actividad de dicha enzima es menos del 50% que en condiciones de suficiencia de hierro. Esto puede deberse a que esta enzima cuenta en su estructura con 8 átomos de hierro (Trovero *et al.*, manuscrito en preparación).

A pesar de que el protocolo de extracción es para proteínas de membrana totales, no se logró identificar ninguna proteína de membrana citoplasmática en estas condiciones. Por lo tanto, la segunda estrategia consistió en primer lugar en una búsqueda de homólogos a proteínas de membrana interna involucradas en la captación de hierro en el genoma de *H. seropedicae* SmR1. Como ya se mencionó, esta cepa secuenciada sólo presenta polimorfismos de simple

nucleótido con respecto a nuestro modelo de estudio (según comunicación personal de Emanuel M. de Souza). Se seleccionaron 5 genes que codifican para el componente periplásmico de tres transportadores de tipo ABC para Fe^{3+} (Hsero_4534, Hsero_0598 y Hsero_2230), para el gen Hsero_2720 que codifica para la permeasa de alta afinidad homóloga a la del sistema EfeUOB de *E. coli*, y para la proteína homóloga a FeoB (Hsero_0051). También, se estudió la expresión del gen Hsero_1277, que codifica para el transportador de dicitrato férrico homólogo a FecA. Los resultados de la PCR cuantitativa mostraron que los componentes periplásmicos de transportadores ABC no se sobreexpresaron en condiciones de bajo hierro, mientras que los otros genes Hsero_2720, Hsero_0051 y Hsero_1277 presentaron niveles de expresión superiores en condiciones de bajo hierro, con un pico de expresión a los 60 minutos, que disminuye luego a los 180.

Los 6 genes muestran niveles de expresión inferior en presencia de dicitrato férrico, a todos los tiempos trabajados. Esto evidencia de que el dicitrato férrico utilizado podría contener algún contaminante y/o exceso de hierro.

El análisis de la expresión del gen utilizado como normalizador (gen del ARNr subunidad 16S) mostró que la misma varía más de lo esperado entre las distintas condiciones, y entre las distintas réplicas biológicas. Esto podría deberse a múltiples motivos: la normalización de la cantidad de ARN a retrotranscribir de cada muestra no haya sido homogénea (por una medición errada en el espectrofotómetro), que el ARN de algunas muestras tuviera más contaminantes (etanol, solventes, etc. luego de la extracción), que las extracciones a 180 minutos fueron realizadas en diferentes lotes de cultivo, o que la expresión del gen del ARNr 16S se vea afectada por las condiciones de trabajo. Dado que no se realizó una evaluación del gen como normalizador, no podemos asegurar que el mismo sea un gen óptimo para dicha función. Sin embargo, las tendencias a la sobreexpresión en bajo hierro de los genes *fecA*, Hsero_2720 y *feoB* observadas en la cuantificación relativa, son claras y lógicas, y observadas también mediante otras metodologías. Asimismo, el patrón de sobreexpresión en condiciones

de bajo hierro que se observa para los genes evaluados, ocurre también con el gen normalizador, por lo que no se estaría aumentando las diferencias de expresión de los genes entre condiciones de hierro al hacer la cuantificación relativa.

El tercer abordaje utilizado fue la secuenciación del ARN total de *H. seropedicae* Z67 creciendo en diferentes condiciones de disponibilidad de hierro. Lo primero que se debe mencionar es que sólo un bajo porcentaje de las lecturas (*reads*) generadas pudo ser efectivamente utilizado en el análisis. Esto pudo deberse a varios factores: no se eliminó la cantidad deseada de ARN ribosomal, normalmente el ARN ribosomal en una bacteria es del 95% del total, y se pretendió sin completo éxito reducirlo al 60%. Al mismo tiempo, la secuenciación dio como resultado lecturas de diverso tamaño, y debieron descartarse las de pequeña longitud en el filtrado por longitud, quedando menor cantidad disponible para analizar. Finalmente, y aunque se hicieron controles iniciales de calidad del ARN extraído, pudo haberse degradado parcialmente en la manipulación durante la construcción de las librerías de secuenciación.

Si bien con sólo dos réplicas biológicas no se puede realizar una estadística que permita inferir conclusiones biológicas, el test estadístico basado en la distribución Gausiana aplicado en los datos de RNAseq permite ver claramente las tendencias a la sobreexpresión o represión de los genes en las condiciones de disponibilidad de hierro evaluadas. El análisis de la expresión génica de aquellos genes relacionados al metabolismo del hierro, mostró la sobreexpresión de varios de ellos en ausencia de hierro. Entre éstos, el ya identificado y estudiado transportador TonB-dependientes de membrana externa FecA (y el gen siguiente corriente abajo Hsero_1278 que es un regulador de la familia AraC). En este mismo grupo de sobre-expresados en ausencia de hierro se encontró también a otros receptores TonB-dependientes cuya función se desconoce en *H. seropedicae*, y varias proteínas de membrana reguladas por hierro. Del casete genómico de biosíntesis y transporte de las serobactinas, se logró identificar la esterasa/lipasa codificada en el gen Hsero_2344, contiguo al gen Hsero_2345 cuyo producto es el receptor específico de dichos sideróforos, y al receptor TonB-dependiente Hsero_2337 anotado como

cirA. Esta proteína fue identificada previamente [77], como un transductor TonB-dependiente, que debido a su bajo número de copias no actúa como un transportador de serobactinas. Sin embargo, con un p-valor mayor a 0,05, el resto de los genes del casete también mostraron una tendencia a estar más expresados en ausencia de hierro que en presencia del mismo. En ausencia de hierro, también la permeasa de alta afinidad de Fe^{2+}/Pb^{2+} (Hsero_2720) homóloga a la del sistema EfeUOB de *E. coli*, mostró una expresión aumentada, al igual que *napH*, el gen inmediato corriente arriba (Hsero_2719). En el trabajo de Mathew *et al.* [61] también se presenta a una proteína homóloga a esta permeasa en *Burkholderia* como alternativa al mecanismo de captación de hierro por sideróforos, planteando que éstos son dispensables para su crecimiento. Otras proteínas con tendencia a estar sobre-expresadas, pero sin valor estadístico significativo (p-valor mayor a 0,05), fueron por ejemplo un factor sigma Fecl; ExbD (Hsero_0689), una de las proteínas del complejo TonB; FeoA del operón Feo de transporte de ion ferroso. De los genes reprimidos por ausencia de hierro, el único relacionado directamente al metabolismo de hierro fue la bacterioferritina, *bfr*, una proteína de almacenamiento de hierro, utilizada como reserva en condiciones de suficiencia del metal [31].

Entre los genes no relacionados al metabolismo del hierro, destaca en condiciones limitantes del metal la sobre-expresión de la proteína EpsL relacionada a la biosíntesis de exopolisacáridos y la represión de genes relacionados a la biosíntesis de flagelo (*flgN*, *fliP*, *fliB*, *motB*). Aunque la expresión de la maquinaria flagelar parecería ser influenciada por muchos factores, en el fitopatógeno *Pantoea stewartii*, condiciones de hierro suficientes favorecen la movilidad, mientras que condiciones de hierro limitante favorecen el estado sésil e inicio de la maduración del biofilm [51].

En cuanto al análisis del transcriptoma global de *H. seropedicae* Z67 en presencia de dicitrato férrico, dentro de los genes sobre-expresados encontramos a los componentes alternativos del complejo TonB, *exbB2* (Hsero_1167) y *exbD2* (Hsero_1168). Lo que más llama la atención de este ensayo es que genes relacionados a la respuesta de estrés y toxicidad a metales pesados

fueron sobre-expresados en presencia de dicitrato férrico. Entre ellos proteínas que forman parte de bombas y sistemas de eflujo, CopZ (Hsero_1609) que es una proteína de transporte y detoxificación de metales pesados, proteínas asociadas a sistemas de regulación por GMP di-cíclico, entre otros genes no esperados. Es decir que la presencia de dicitrato férrico, o bien generaría una respuesta naturalmente a los 60 minutos que se parece a la de estrés celular y de rearrreglos transcripcionales mediados por di-GMP cíclico; o bien el dicitrato férrico usado no fue de buena calidad o estaba contaminado con algún compuesto tóxico a la célula. En el trabajo de Coutinho *et al.* [97] se vio que genes de bombas de eflujo son sobre-expresados por *Burkholderia kururiensis* M130 en presencia de macerado de planta de arroz. *Erwinia amylovora* expresa las bombas de eflujo como método de defensa contra metabolitos secundarios vegetales [98]. Se sabe que en el xilema de las plantas existe una alta concentración de citrato férrico, entre 10 a 100 μM [99]. Una posible explicación a nuestros resultados es que se sobre-expresen las bombas de eflujo en el transcriptoma que obtuvimos de *H. seropedicae* en presencia de dicitrato férrico porque lo perciba como una señal de estar en el interior de la planta, y exprese la maquinaria de respuesta a estrés como medio de defensa contra posibles metabolitos antimicrobianos vegetales. En todo caso se deberían repetir los ensayos de secuenciación de ARN de la bacteria crecida en presencia de dicitrato férrico de mejor calidad.

A modo de comparación entre los tres abordajes experimentales planteados, se vio que no en todos los casos se obtuvieron los mismos resultados. El producto del gen Hsero_0972, un transportador de tipo ABC para azúcares, se sobre-expresó en el gel de SDS-PAGE en condiciones de hierro suficientes, lo cual coincide con los resultados del transcriptoma donde se vio reprimido en ausencia de hierro (aunque no fue estadísticamente significativo). Coinciden los resultados de las tres estrategias para el gen *fecA*; sobre-expresado en condiciones de hierro limitantes. Similares resultados se obtuvieron para el gen Hsero_4295 codificante de la porina, expresada en todas las condiciones ensayadas en el gel de SDS-PAGE,

a la vez que no se encontraron diferencias de expresión en el transcriptoma obtenido en baja disponibilidad de hierro. Sin embargo, en el caso de la subunidad A de la succinato deshidrogenada que se sobre-expresó en cultivos con hierro suficiente en la aproximación proteómica, no se observaron diferencias de expresión con el abordaje transcriptómico. Los genes Hsero_2343 (enzima de biosíntesis de serobactinas), Hsero_2345 (FhuA) y Hsero_3255 (Fiu), identificados como diferencialmente expresados en el gel SDS-PAGE en condiciones de bajo hierro, también mostraron tendencia a sobre-expresarse mediante la estrategia transcriptómica; sin embargo estadísticamente no son datos significativos. Todas estas diferencias entre ambas aproximaciones podrían deberse a que la extracción de proteínas se realizó a las 12 horas de incubación de los cultivos, mientras que la secuenciación de ARN se llevó a cabo con ARN molde extraído a la hora de incubación, y el RT-qPCR con ARN extraídos a tiempos entre 30 minutos y 3 horas. Podría haber una respuesta temprana a la falta de hierro que se vea reflejada en el transcriptoma global, y que luego de las 12 horas se pierda y se activen otros genes de respuesta tardía para la obtención de hierro, como por ejemplo el *fiu* identificado en la estrategia proteómica. Otra explicación es la regulación llevada a cabo mediante ARNs pequeños no codificantes, estrategia que es cada vez más estudiada aunque aún poco conocida. En *H. seropedicae* SmR1 existe una chaperona Hfq involucrada en la regulación génica a nivel pos-transcripcional, aparentemente involucrada en el silenciamiento de ARN mediado por ARN pequeño [100]. Hfq regula la expresión favoreciendo la interacción entre el ARN mensajero blanco y el ARN pequeño provocando tanto estabilidad del primero como su degradación; cambiando al accesibilidad del ARN blanco para las ARNasas; uniéndose y promoviendo el apareamiento de ARN reguladores y ARN blancos llevando a la activación y represión traduccional [100]. Y en tercer lugar también la degradación de proteínas o las modificaciones post-transcripcionales que sufran las mismas puede ser una posible explicación a las diferencias entre los diferentes abordajes.

En definitiva, mediante las tres aproximaciones planteadas logramos identificar genes que tendrían relación a la adquisición de hierro, y que incluyen proteínas de membrana externa y de membrana interna, así como también analizamos el transcriptoma global de la cepa en condiciones de hierro limitantes.

Importancia de los genes identificados *in vitro* y en interacción con la planta

De los resultados previos, se decidió trabajar con dos proteínas aparentemente relacionadas al metabolismo del hierro y las cuales aún no habíamos estudiado hasta el momento, sumadas a los genes ya estudiados FecA, FhuA y la enzima NRPS Hsero_2343. Estas proteínas son la homóloga a Fiu de *E. coli*, codificada por el gen Hsero_3255, un receptor TonB-dependiente para catecoles monoméricos, que se identificó en el abordaje proteómico en condiciones de hierro limitantes; y la permeasa de alta afinidad de Fe^{2+}/Pb^{2+} homóloga a la del sistema EfeUOB de *E. coli*, Hsero_2720, expresada diferencialmente en el transcriptoma global y en RT-qPCR en condiciones de baja disponibilidad de hierro. En bacterias como *Bacillus subtilis*, el sistema EfeUOB es responsable de la captación tanto de ión férrico como ferroso [101]; y en *E. coli* O157:H7 el sistema EfeUOB actúa en la internalización de Fe^{2+} en condiciones de bajo pH [59].

Para estudiar sus funciones, se construyeron mutantes simples dirigidas a estos dos genes; y también dobles y triples mutantes carentes en las proteínas ya caracterizadas en trabajos anteriores: Hsero_1277 (transportador FecA), Hsero_2343 (enzima de biosíntesis de serobactinas), y Hsero_2345 (transportador FhuA). Se caracterizó el fenotipo *in vitro* de todas las mutantes construidas mediante bioensayos, siembra en placa CAS y curvas de crecimiento.

Los resultados de los bioensayos señalaron que aquellas mutantes que carecen del receptor que internaliza las serobactinas, FhuA, no son capaces de crecer a expensas de la serobactina férrica, y por tanto no presentan halo de crecimiento alrededor del pocillo que contiene dicho compuesto. El hecho de carecer de la enzima de síntesis de las serobactinas, no afecta el

crecimiento con ninguna de las fuentes de hierro suplementadas en los ensayos. Las cepas carentes de los receptores FecA y Fiu y la permeasa Hsero_2720 pueden crecer igualmente cuando las fuentes de hierro son dicitrato férrico y serobactinas, por lo que ninguna de estas proteínas estarían involucradas en su utilización. Esto estaría indicando que existe otro mecanismo de internalización, alternativo a los mencionados, o que hay transportadores con acción redundante presentes en el genoma, y que no pudieron ser identificados mediante las estrategias empleadas.

Las mutantes carentes del receptor específico de las serobactinas FhuA, forman un halo naranja alrededor de la gota de cultivo sembrada en la placa CAS, que es de mayor tamaño en comparación con la cepa salvaje. Esto demuestra que las serobactinas están siendo sintetizadas y secretadas al medio, y se acumulan en el exterior sin poder internalizarse. En cuanto a las mutantes que carecen del gen que codifica para la enzima de síntesis de las serobactinas, no muestran halo en placa CAS; verificando que esta enzima no es funcional y no se están produciendo los sideróforos. Por último, las cepas cuyos genes Hsero_3255 (Fiu) Hsero_1277 (FecA) y Hsero_2720 están mutados, forman un halo naranja similar a la cepa salvaje, lo cual evidencia que estos genes no tienen relación a la producción ni transporte de serobactinas.

Las curvas de crecimiento muestran un fenotipo en la mutante simple FhuA que crecen significativamente menos que la salvaje, indicando que la ausencia de este receptor condiciona el crecimiento del endófito en bajo hierro. Mientras que las otras simples mutantes Fiu, 2720 y FecA presentan un crecimiento semejante al de la cepa Z67, no mostrando un fenotipo diferencial. Las dobles mutantes carentes en el gen *fhuA*, muestran un crecimiento semejante al de la mutante FhuA tanto en medio rico TY como mínimo NFb, sugiriendo que la ausencia de este receptor compromete el crecimiento del endófito en medios con bajo hierro. La doble mutante FecAFiu no presenta un crecimiento diferencial, así como tampoco las variantes 2343FhuAFecA y 2343FhuA2720. Sin embargo, la doble mutante 2343FhuA crece mejor que la

simple FhuA. Esto podría deberse a que, dado que la biosíntesis de serobactinas conlleva un importante gasto energético, la doble mutante no tiene ese gasto energético produciendo serobactinas que no podrá utilizar. Otro posible motivo es que, como las serobactinas actúan como quelante del hierro ambiental, al no poder internalizarlas y utilizarlas como fuente de hierro, le privan a la bacteria de utilización del metal disponible. La triple mutante 2343FhuAFiu compromete el crecimiento de la bacteria con respecto a 2343FhuA, indicando que Fiu cumple un papel relevante en la adquisición de hierro, en condiciones de baja disponibilidad. Finalmente, la triple mutante carente en los tres receptores TonB-dependientes, FecAFhuAFiu, es la cepa que muestra su crecimiento más comprometido en ausencia de hierro. En conclusión, los sistemas de adquisición mediados por Fiu, FecA y la permeasa codificada por el gen Hsero_2720 son de menor afinidad e importancia que el mediado por serobactinas, serían redundantes en su función sinergista con la adquisición de serobactinas, pero la carencia de los tres sistemas (FecA, Fiu y FhuA) resulta en una severa limitación para crecer cuando la disponibilidad de hierro es baja.

Sin embargo, en cuanto a la colonización de la planta de arroz por las diferentes cepas en forma individual, no se vieron diferencias significativas para ninguna de las mutantes con respecto a la salvaje. Esto daría la pauta de que ninguno de los genes estudiados es imprescindible para colonizar el interior vegetal, resultados observados por recuento en placa. En trabajos previos habíamos visto también por recuentos en placa, que la cepa mutante en la síntesis y transporte de serobactinas 2343FhuA al competir por la colonización de la planta de arroz con *H. seropedicae* Z67 salvaje, lo hacía en una relación 10:90 (mutante:salvaje). Para saber si ambas tienen un patrón de colonización diferente a lo largo de la planta, observamos cortes de plantas inoculadas con una y otra cepa en el microscopio confocal. La estrategia de observación por microscopía confocal de secciones de plantas colonizadas por un endófito es muy sólida y ampliamente utilizada en otros trabajos, como por ejemplo el de Landa *et al.*

[102]. En los ensayos de colonización de la planta de arroz por la cepa *H. seropedicae* Z67 y la mutante 2343FhuA de forma individual, se logró ver tanto a nivel de tallo como raíz que ambas cepas colonizan, formando biopelículas. La colonización comienza por la adhesión superficial y la penetración por la rotura de la epidermis en la emergencia de una raíz lateral como se ve en la figura 25, una de las vías por la cual se cree que los endófitos inician la colonización [6]; alcanzando el espacio intercelular de los tejidos vegetales, evidenciado en la figura 24. Asimismo, las cepas alcanzan también el vaso vascular del tallo, donde forman una biopelícula como se puede observar en la figura 26. Interesantemente, se encontró que los tricomas son colonizados por nuestro endófito, como puede observarse en la figura 27. Barak *et al.* [103] encuentran que *Salmonella entérica* prefiere colonizar tricomas glandulares de tomate, al igual que *E. coli* O157:H7 se refugia en los tricomas de lechuga. En la misma línea, especies del hongo endófito *Trichoderma* pueden colonizar y penetrar la planta de cacao vía los tricomas glandulares [104].

La carencia de los genes estudiados no afecta la colonización de la planta de arroz de forma individual, para poder estudiar si le otorgan un beneficio a la hora de competir por el nicho vegetal, se decidió marcar la bacteria con proteína GFP de manera de poder diferenciar dos cepas co-inoculadas. Esta aproximación experimental de utilizar una cepa marcada con una proteína fluorescente para inocular una planta y ver la colonización a través de secciones de la misma en un microscopio láser confocal fue realizada por Monteiro *et al.* [105]. Estos autores plantean que la estrategia puede evitar artefactos acarreados por técnicas como marcar la bacteria con un gen reportero y seguirla por microscopía.

Se escogió la doble mutante 2343FhuA para marcar y poner a competir con otras mutantes construidas. Esta elección se basó en que se buscaba identificar y ver la importancia de los mecanismos de captación de hierro alternativos a las serobactinas. Si se utilizara la mutante simple en la enzima NRPS de biosíntesis de las mismas (Hsero_2343), la bacteria no podría producir los sideróforos, pero si utilizar sideróforos exógenos producidas por la otra cepa, en

lo que se conoce como piratería de sideróforos [48]. Por otra parte, si se empleaba la mutante únicamente en el gen del receptor específico de las serobactinas FhuA, la bacteria no podría internalizar la serobactina férrica, pero igualmente tendría el costo energético de sintetizar el sideróforo sin aprovecharlo, lo cual la pondría en desventaja. Es por ellos que se decidió poner a competir las diferentes construcciones contra la doble mutante no productora ni de serobactinas ni de su transportador específico.

En primer lugar, se realizaron ensayos de competencia en planta seguido de recuentos de colonias en placa, en transiluminador para poder diferenciar marcadas/no-marcadas. En muchos casos, los datos del recuento del número de UFC/gr no fueron normales, debido a la gran varianza interna de colonización que hay entre las réplicas de un mismo ensayo. Por este motivo, se trabajó con el logaritmo en base 10 (\log_{10}) de esos datos. Sin embargo, para poder normalizar los valores, a causa también a la enorme variación interna en la colonización, se calculó el porcentaje de la colonización de cada cepa con respecto al total de UFC/gr en cada réplica. Entonces, en algunos casos no se encontraron diferencias significativas en los análisis estadísticos según el valor de \log_{10} UFC/gr porque la varianza interna es muy amplia, pero sí hubo diferencias significativas cuando se tomaron en cuenta los datos de porcentajes, donde los valores están normalizados. En el caso de los valores del Índice de Competitividad, los resultados reflejan el mismo patrón de colonización que los porcentajes y los \log_{10} UFC/gr. Ya se había visto que la doble mutante 2343FhuA en competencia con la cepa salvaje coloniza la planta de arroz en una proporción 10/90, respectivamente (Rosconi *et al.* 2015, manuscrito en revisión). Cuando la doble mutante marcada (2343FhuA-GFP) fue co-inoculada con la triple mutante 2343FhuAFiu, esta última colonizó en una proporción 15/85 con respecto a la doble mutante marcada. Lo mismo sucedió cuando se puso a competir a 2343FhuA-GFP con 2343FhuAFecA, que colonizaron en una relación 70/30. En el caso de la competencia entre 2343FhuA-GFP y la triple mutante carente en los tres receptores FecAFhuAFiu los resultados del recuento indicaron una colonización en una relación 20/80, respectivamente. Estos datos

de la última competencia resultaron contradictorios a los anteriores, por lo cual con el objetivo de validarlos, se decidió analizar si el hecho de portar la proteína GFP influía en la sobrevivencia y competencia de la cepa 2343FhuA dentro de la planta. Para ellos se marcó también la cepa salvaje con GFP (Z67-GFP). Cuando se puso a competir la cepa silvestre no-marcada con la mutante marcada, los valores de colonización fueron de 90/10 respectivamente, resultados ya obtenidos en trabajos anteriores (Rosconi *et al.* 2015, manuscrito en revisión). La competencia entre la cepa salvaje contra ella misma marcada con GFP, dio como resultado que coloniza en una proporción 60/40, con diferencias estadísticamente significativas. Finalmente, los ensayos de competencia entre la cepa Z67 marcada con GFP (Z67-GFP) y la cepa doble mutante no-marcada no dieron diferencias significativas en la colonización, lo cual no concordaría con los ensayos anteriores, dando la idea de que el marcado con GFP sí afectaría la colonización de la planta. No así el crecimiento *in vitro*, ya que no se observaron diferencias en las curvas de crecimiento entre las cepas marcadas y no marcadas. Dado que no se verificó el lugar de inserción del minitransposón, no podemos afirmar que esta inserción sea única y neutral como mencionaba la bibliografía, por lo que quizás no sea la expresión de GFP lo que afecte la colonización de la planta, sino el lugar donde está insertado el transposón, que afecte algún gen necesario. Con todos estos resultados no se podría validar la metodología empleada, por lo que para repetir los experimentos, habría que rediseñar la estrategia de marcado, o desarrollar una metodología nueva.

Mediante las estrategias planteadas en este trabajo, se intentó identificar componentes de sistemas de captación de hierro alternativos a los sideróforos serobactinas en *H. seropedicae* Z67, tanto a nivel de ARN como de proteínas. Si bien en este trabajo se avanzó considerablemente, aún no logramos completar enteramente la identificación de estos sistemas, dada la gran cantidad que posee *H. seropedicae*. En futuras líneas de investigación sería interesante realizar estudios de expresión de ARN dentro de la planta, lo que daría una

idea de la expresión de genes durante la interacción. Podría ser en condiciones gnotobióticas como las trabajadas hasta el momento, o en condiciones no-gnotobióticas para tomar en cuenta también la competencia por la colonización con otros endófitos, obteniendo así una representación más fiel de la realidad.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En *H. seropedicae* Z67, los sistemas de adquisición de hierro alternativos al mediado por las serobactinas incluye la participación conjunta de los transportadores TonB-dependientes como FecA (Hsero_1277), Fiu (Hsero_3255). No está tan claro sin embargo el rol de la permeasa de alta afinidad de Fe^{2+}/Pb^{2+} (Hsero_2720). Mutantes construidas carentes en estos genes mostraron fenotipo leve de menor crecimiento en comparación con la cepa salvaje en condiciones de hierro limitantes. Mutantes dobles y triples dirigidas a estos genes y a los anteriormente estudiados FhuA (Hsero_2345, receptor de serobactinas) y Hsero_2343 (enzima NRPS de síntesis de serobactinas), mostraron también un crecimiento inferior al de las cepas parentales, indicando que su ausencia afecta el crecimiento del endófito. A pesar de ello, a la hora de colonizar de forma individual la planta de arroz, las mutantes no presentaron dificultades. Sin embargo, es probable que dichos mecanismos de obtención de hierro le confieran una ventaja para competir por el nicho vegetal.

En definitiva, mediante las estrategias utilizadas se logró identificar y estudiar otras proteínas participantes en los mecanismos de adquisición de hierro. Pero de acuerdo a los resultados obtenidos, quedan aún por conocer otros sistemas de adquisición de hierro no identificados mediante la metodología empleada. La variedad tan grande de mecanismos para la adquisición del metal sugiere la importancia que el hierro posee para el estilo de vida endófito de esta bacteria.

Perspectivas

-Puesta a punto de la inducción de la nucleasa I-Sce-I por 3-metil-benzoato, para la construcción de la mutante mediante la estrategia II de mutagénesis (Ver Materiales y Métodos).

-Seleccionar y evaluar uno o varios genes normalizadores óptimos para los ensayos de RT-qPCR.

- Repetir los ensayos de secuenciación del ARN total, agregando más replicados biológicos y con citrato férrico de mejor calidad.
- Re-analizar los datos de RNAseq con otros test estadísticos y otro/s software alternativos para comparar resultados.
- Continuar con la construcción de dobles y triples mutantes con el gen Hsero_2720 de la permeasa identificada y caracterizarlas fenotípicamente *in vitro* e *in vivo*.
- Continuar con los ensayos pendientes de competencia por la colonización de la planta de arroz y observación por microscopía confocal, desarrollando una nueva metodología de marcado que no afecten la colonización.
- Estudiar la expresión de genes de la bacteria en interacción con la planta, dentro de la misma, para detectar los genes efectivamente implicados en la interacción.
- Realizar ensayos en condiciones no-ghnotobióticas para considerar también las interacciones con otros endófitos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abdalla, M.A. and J.C. Matasyoh, *Endophytes as producers of peptides: an overview about the recently discovered peptides from endophytic microbes*. Natural products and bioprospecting, 2014. **4**(5): p. 257-70.
2. Mano, H. and H. Morisaki, *Endophytic bacteria in the rice plant*. Microbes and environments / JSME, 2008. **23**(2): p. 109-17.
3. Mercado-Blanco, J., *Life of microbes inside the plant*, in *Principles of Plant-Microbe Interactions. Microbes for Sustainable Agriculture*, B. Lugtenberg, Editor 2015, Springer: Suiza. p. 25-32.
4. Rosenblueth, M. and E. Martinez-Romero, *Bacterial endophytes and their interactions with hosts*. Molecular plant-microbe interactions : MPMI, 2006. **19**(8): p. 827-37.
5. Reinhold-Hurek, B. and T. Hurek, *Living inside plants: bacterial endophytes*. Current opinion in plant biology, 2011. **14**(4): p. 435-43.
6. Hardoim, P.R., L.S. van Overbeek, and J.D. Elsas, *Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth*. Trends in microbiology, 2008. **16**(10): p. 463-71.
7. Mitter, B., A. Petric, M.W. Shin, P.S. Chain, L. Hauberg-Lotte, B. Reinhold-Hurek, J. Nowak, and A. Sessitsch, *Comparative genome analysis of Burkholderia phytofirmans PsJN reveals a wide spectrum of endophytic lifestyles based on interaction strategies with host plants*. Frontiers in plant science, 2013. **4**: p. 120.
8. Lugtenberg, B., *Life of Microbes in the Rhizosphere*, in *Principles of Plant-Microbe Interactions. Microbes for Sustainable Agriculture.*, B. Lugtenberg, Editor 2015, Springer: Suiza. p. 7-15.
9. Eggleston, G. and E. Borges, *Multiple applications of ion chromatography oligosaccharide fingerprint profiles to solve a variety of sugar and sugar-biofuel industry problems*. Journal of agricultural and food chemistry, 2015. **63**(11): p. 2841-51.
10. Paterson, A.H., M. Freeling, and T. Sasaki, *Grains of knowledge: genomics of model cereals*. Genome Research, 2005. **15**(12): p. 1643-50.
11. James, E.K. and F.L. Olivares, *Infection and Colonization of Sugar Cane and Other Gramineous Plants by Endophytic Diazotrophs*. Critical Reviews in Plant Sciences, 1997. **17**(1): p. 77-119.
12. Calvo, P., L. Nelson, and J.W. Kloepper, *Agricultural uses of plant biostimulants*. Plant Soil, 2014. **383**: p. 3-41.
13. Cavalcanti Alves, G., S. Sampaio Videira, S. Urquiaga, and V. Massena Reis, *Differential plant growth promotion and nitrogen fixation in two genotypes of maize by several Herbaspirillum inoculants*. Plant Soil, 2014.
14. Geetha, S.J. and S.J. Joshi, *Engineering rhizobial bioinoculants: a strategy to improve iron nutrition*. TheScientificWorldJournal, 2013. **2013**: p. 315890.
15. Mareque, C., C. Taulé, M. Beracochea, and F. Battistoni, *Isolation, characterization and plant growth promotion effects of putative bacterial endophytes associated with sweet sorghum (Sorghum bicolor (L) Moench)*. Annals of Microbiology, 2015. **65**(2): p. 1057-1067.
16. Singh, N., D.R. Choudhury, A.K. Singh, S. Kumar, K. Srinivasan, R.K. Tyagi, N.K. Singh, and R. Singh, *Comparison of SSR and SNP markers in estimation of genetic diversity and population structure of Indian rice varieties*. PloS one, 2013. **8**(12): p. e84136.
17. Dirección de Estadística Agropecuaria (DIEA) del Ministerio de Ganadería, A.y.P., *Encuesta de Arroz zafra 2013/2014*. <http://www.mgap.gub.uy/>. 2014 (acceso Junio 2015).
18. UruguayXXI, *Informe Sector arrocerero*. Asociación Cultivadores de Arroz (<http://www.aca.com.uy/datos-estadisticos>), 2013 (acceso Junio 2015).

19. Fernández Mañay, J., L. Ferrando, V. Macazaga, and A. Fernández Scavino, *DIVERSIDAD DE BACTERIAS ENDÓFITAS EN CULTIVOS DE ARROZ EN URUGUAY. ESTUDIOS PRELIMINARES*. Agrocencias, 2005. **IX N° 1 y N° 2**: p. 285 - 290.
20. Loaces, I., L. Ferrando, and A.F. Scavino, *Dynamics, diversity and function of endophytic siderophore-producing bacteria in rice*. Microbial ecology, 2011. **61**(3): p. 606-18.
21. Ryan, R.P., K. Germaine, A. Franks, D.J. Ryan, and D.N. Dowling, *Bacterial endophytes: recent developments and applications*. FEMS microbiology letters, 2008. **278**(1): p. 1-9.
22. Pii, Y., A. Penn, R. Terzano, C. Crecchio, T. Mimmo, and S. Cesco, *Plant-microorganism-soil interactions influence the Fe availability in the rhizosphere of cucumber plants*. Plant physiology and biochemistry : PPB / Societe francaise de physiologie vegetale, 2015. **87**: p. 45-52.
23. Brader, G., S. Compant, B. Mitter, F. Trognitz, and A. Sessitsch, *Metabolic potential of endophytic bacteria*. Current opinion in biotechnology, 2014. **27**: p. 30-7.
24. Gourion, B., F. Berrabah, P. Ratet, and G. Stacey, *Rhizobium-legume symbioses: the crucial role of plant immunity*. Trends in plant science, 2015. **20**(3): p. 186-94.
25. Triplett, E.W., *Prospects for significant nitrogen fixation in grasses from bacterial endophytes*, in *Associative and Endophytic Nitrogen-fixing Bacteria and Cyanobacterial Associations*, C. Elmerich and W.E. Newton, Editors. 2010, Springer.
26. Sessitsch, A., et al., *Functional characteristics of an endophyte community colonizing rice roots as revealed by metagenomic analysis*. Molecular plant-microbe interactions : MPMI, 2012. **25**(1): p. 28-36.
27. Ilbert, M. and V. Bonnefoy, *Insight into the evolution of the iron oxidation pathways*. Biochimica et biophysica acta, 2013. **1827**(2): p. 161-75.
28. Andrews, S.C., A.K. Robinson, and F. Rodriguez-Quinones, *Bacterial iron homeostasis*. FEMS microbiology reviews, 2003. **27**(2-3): p. 215-37.
29. Ahmed, E. and S.J. Holmstrom, *Siderophores in environmental research: roles and applications*. Microbial biotechnology, 2014. **7**(3): p. 196-208.
30. Sandy, M. and A. Butler, *Microbial iron acquisition: marine and terrestrial siderophores*. Chemical reviews, 2009. **109**(10): p. 4580-95.
31. Cornelis, P., Q. Wei, S.C. Andrews, and T. Vinckx, *Iron homeostasis and management of oxidative stress response in bacteria*. Metallomics : integrated biometal science, 2011. **3**(6): p. 540-9.
32. Touati, D., *Iron and oxidative stress in bacteria*. Archives of biochemistry and biophysics, 2000. **373**(1): p. 1-6.
33. Hantke, K., *Iron and metal regulation in bacteria*. Current opinion in microbiology, 2001. **4**(2): p. 172-7.
34. Quatrini, R., C. Lefimil, D.S. Holmes, and E. Jedlicki, *The ferric iron uptake regulator (Fur) from the extreme acidophile Acidithiobacillus ferrooxidans*. Microbiology, 2005. **151**(Pt 6): p. 2005-15.
35. Haraszthy, V.I., S.F. Jordan, and J.J. Zambon, *Identification of Fur-regulated genes in Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Microbiology, 2006. **152**(Pt 3): p. 787-96.
36. Ollinger, J., K.B. Song, H. Antelmann, M. Hecker, and J.D. Helmann, *Role of the Fur regulon in iron transport in Bacillus subtilis*. Journal of bacteriology, 2006. **188**(10): p. 3664-73.
37. Amarelle, V., U. Koziol, F. Rosconi, F. Noya, M.R. O'Brian, and E. Fabiano, *A new small regulatory protein, HmuP, modulates haemin acquisition in Sinorhizobium meliloti*. Microbiology, 2010. **156**(Pt 6): p. 1873-82.
38. Johnston, A.W., J.D. Todd, A.R. Curson, S. Lei, N. Nikolaidou-Katsaridou, M.S. Gelfand, and D.A. Rodionov, *Living without Fur: the subtlety and complexity of iron-responsive gene regulation in the symbiotic bacterium Rhizobium and other alpha-proteobacteria*. Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine, 2007. **20**(3-4): p. 501-11.

39. O'Brian, M. and E. Fabiano, *Mechanisms and Regulation of Iron Homeostasis in the Rhizobia*, in *Iron Uptake and Homeostasis in Microorganisms*, C. P. and A. S.C., Editors. 2010, Caister Academic Press: Norfolk, UK. p. 37-63.
40. Platero, R., L. Peixoto, M.R. O'Brian, and E. Fabiano, *Fur is involved in manganese-dependent regulation of mntA (sitA) expression in Sinorhizobium meliloti*. Applied and environmental microbiology, 2004. **70**(7): p. 4349-55.
41. Hibbing, M.E. and C. Fuqua, *Antiparallel and interlinked control of cellular iron levels by the Irr and RirA regulators of Agrobacterium tumefaciens*. Journal of bacteriology, 2011. **193**(14): p. 3461-72.
42. Aznar, A. and A. Dellagi, *New insights into the role of siderophores as triggers of plant immunity: what can we learn from animals?* Journal of experimental botany, 2015.
43. Cartron, M.L., S. Maddocks, P. Gillingham, C.J. Craven, and S.C. Andrews, *Ferrous transport of ferrous iron into bacteria*. Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine, 2006. **19**(2): p. 143-57.
44. Harrington, J.M., O.W. Duckworth, and K. Haselwandter, *The fate of siderophores: antagonistic environmental interactions in exudate-mediated micronutrient uptake*. Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine, 2015.
45. Chatfield, C.H., B.J. Mulhern, V.K. Viswanathan, and N.P. Cianciotto, *The major facilitator superfamily-type protein LbtC promotes the utilization of the legiobactin siderophore by Legionella pneumophila*. Microbiology, 2012. **158**(Pt 3): p. 721-35.
46. Page, W.J., E. Kwon, A.S. Cornish, and A.E. Tindale, *The csbX gene of Azotobacter vinelandii encodes an MFS efflux pump required for catecholate siderophore export*. FEMS microbiology letters, 2003. **228**(2): p. 211-6.
47. Miethke, M. and M.A. Marahiel, *Siderophore-based iron acquisition and pathogen control*. Microbiology and molecular biology reviews : MMBR, 2007. **71**(3): p. 413-51.
48. Traxler, M.F., M.R. Seyedsayamdost, J. Clardy, and R. Kolter, *Interspecies modulation of bacterial development through iron competition and siderophore piracy*. Molecular microbiology, 2012. **86**(3): p. 628-44.
49. Letoffe, S., P. Delepelaire, and C. Wandersman, *Free and heme-bound heme acquisitions through the outer membrane receptor HasR have different requirements for the TonB-ExbB-ExbD complex*. Journal of bacteriology, 2004. **186**(13): p. 4067-74.
50. Amarelle, V., M.R. O'Brian, and E. Fabiano, *ShmR is essential for utilization of heme as a nutritional iron source in Sinorhizobium meliloti*. Applied and environmental microbiology, 2008. **74**(20): p. 6473-5.
51. Burbank, L., M. Mohammadi, and M.C. Roper, *Siderophore-mediated iron acquisition influences motility and is required for full virulence of the xylem-dwelling bacterial phytopathogen Pantoea stewartii subsp. stewartii*. Applied and environmental microbiology, 2015. **81**(1): p. 139-48.
52. Braun, V., M. Braun, and H. Killman, *Ferrichrome- and citrate-mediated iron transport*, in *Iron transport in bacteria*, C. J.H., M. A.R., and P. S.M., Editors. 2004, AM Press: Washington DC. p. 158-177.
53. Braun, V. and C. Herrmann, *Docking of the periplasmic FecB binding protein to the FecCD transmembrane proteins in the ferric citrate transport system of Escherichia coli*. Journal of bacteriology, 2007. **189**(19): p. 6913-8.
54. Enz, S., S. Mahren, U.H. Stroehel, and V. Braun, *Surface signaling in ferric citrate transport gene induction: interaction of the FecA, FecR, and FecI regulatory proteins*. Journal of bacteriology, 2000. **182**(3): p. 637-46.
55. Fukushima, T., A.K. Sia, B.E. Allred, R. Nichiporuk, Z. Zhou, U.N. Andersen, and K.N. Raymond, *Bacillus cereus iron uptake protein fishes out an unstable ferric citrate trimer*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012. **109**(42): p. 16829-34.

56. Guerinot, M.L., E.J. Meidl, and O. Plessner, *Citrate as a siderophore in Bradyrhizobium japonicum*. Journal of bacteriology, 1990. **172**(6): p. 3298-303.
57. Harding, R.A. and P.W. Royt, *Acquisition of iron from citrate by Pseudomonas aeruginosa*. Journal of general microbiology, 1990. **136**(9): p. 1859-67.
58. Marshall, B., A. Stintzi, C. Gilmour, J.M. Meyer, and K. Poole, *Citrate-mediated iron uptake in Pseudomonas aeruginosa: involvement of the citrate-inducible FecA receptor and the FeoB ferrous iron transporter*. Microbiology, 2009. **155**(Pt 1): p. 305-15.
59. Cao, J., M.R. Woodhall, J. Alvarez, M.L. Cartron, and S.C. Andrews, *EfeUOB (YcdNOB) is a tripartite, acid-induced and CpxAR-regulated, low-pH Fe²⁺ transporter that is cryptic in Escherichia coli K-12 but functional in E. coli O157:H7*. Molecular microbiology, 2007. **65**(4): p. 857-75.
60. Kim, H., H. Lee, and D. Shin, *The FeoC protein leads to high cellular levels of the Fe(II) transporter FeoB by preventing FtsH protease regulation of FeoB in Salmonella enterica*. Journal of bacteriology, 2013. **195**(15): p. 3364-70.
61. Mathew, A., L. Eberl, and A.L. Carlier, *A novel siderophore-independent strategy of iron uptake in the genus Burkholderia*. Molecular microbiology, 2014. **91**(4): p. 805-20.
62. Noinaj, N., M. Guillier, T.J. Barnard, and S.K. Buchanan, *TonB-dependent transporters: regulation, structure, and function*. Annual review of microbiology, 2010. **64**: p. 43-60.
63. Llamas, M.A. and W. Bitter, *Iron gate: the translocation system*. Journal of bacteriology, 2006. **188**(9): p. 3172-4.
64. Krewulak, K.D. and H.J. Vogel, *TonB or not TonB: is that the question?* Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire, 2011. **89**(2): p. 87-97.
65. Pandey, A. and R.V. Sonti, *Role of the FeoB protein and siderophore in promoting virulence of Xanthomonas oryzae pv. oryzae on rice*. Journal of bacteriology, 2010. **192**(12): p. 3187-203.
66. Tamir-Ariel, D., T. Rosenberg, and S. Burdman, *The Xanthomonas campestris pv. vesicatoria citH gene is expressed early in the infection process of tomato and is positively regulated by the TctDE two-component regulatory system*. Molecular plant pathology, 2011. **12**(1): p. 57-71.
67. Jones, A.M. and M.C. Wildermuth, *The phytopathogen Pseudomonas syringae pv. tomato DC3000 has three high-affinity iron-scavenging systems functional under iron limitation conditions but dispensable for pathogenesis*. Journal of bacteriology, 2011. **193**(11): p. 2767-75.
68. Monteiro R., B.E., M.A.M. Wassem R., Brusamarello-Santos L., T.-S.M. Schmidt M.A., C.L.M. Pankiewicz V., P.F.O. Chubatsu L., and d.S. E.M., *Herbaspirillum-plant interactions: microscopical, histological and molecular aspects*. Plant Soil, 2012. **356**: p. 22.
69. Baldani, J.I., B.V. Baldani, L. Seldin, and J. Döbereiner, *Characterization of Herbaspirillum seropedicae gen. Nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium*. Int. J. Syst. Bacteriol, 1986. **36**: p. 86-93.
70. Baldani, J.I., L. Rouws, L. Magalhaes Cruz, F.L. Olivares, M. Schmid, and A. & Hartmann, *The family Oxalobacteraceae*, in *The Prokaryotes – Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria.*, E. Rosenberg;, et al., Editors. 2014, Springer-Verlag Berlin: Heidelberg. p. 919-974.
71. James, E.K., P. Gyaneshwar, N. Mathan, W.L. Barraquio, P.M. Reddy, P.P. Iannetta, F.L. Olivares, and J.K. Ladha, *Infection and colonization of rice seedlings by the plant growth-promoting bacterium Herbaspirillum seropedicae Z67*. Molecular plant-microbe interactions : MPMI, 2002. **15**(9): p. 894-906.
72. Roncato-Maccari, L.D., H.J. Ramos, F.O. Pedrosa, Y. Alquini, L.S. Chubatsu, M.G. Yates, L.U. Rigo, M.B. Steffens, and E.M. Souza, *Endophytic Herbaspirillum seropedicae expresses nif genes in gramineous plants*. FEMS microbiology ecology, 2003. **45**(1): p. 39-47.

73. Elbeltagy, A., K. Nishioka, T. Sato, H. Suzuki, B. Ye, T. Hamada, T. Isawa, H. Mitsui, and K. Minamisawa, *Endophytic colonization and in planta nitrogen fixation by a Herbaspirillum sp. isolated from wild rice species*. Applied and environmental microbiology, 2001. **67**(11): p. 5285-93.
74. Pedrosa, F.O., et al., *Genome of Herbaspirillum seropedicae strain SmR1, a specialized diazotrophic endophyte of tropical grasses*. PLoS genetics, 2011. **7**(5): p. e1002064.
75. Balsanelli, E., R.V. Serrato, V.A. de Baura, G. Sasaki, M.G. Yates, L.U. Rigo, F.O. Pedrosa, E.M. de Souza, and R.A. Monteiro, *Herbaspirillum seropedicae rfbB and rfbC genes are required for maize colonization*. Environmental microbiology, 2010. **12**(8): p. 2233-44.
76. Rosconi, F., E.M. Souza, F.O. Pedrosa, R.A. Platero, C. Gonzalez, M. Gonzalez, S. Batista, P.R. Gill, and E.R. Fabiano, *Iron depletion affects nitrogenase activity and expression of nifH and nifA genes in Herbaspirillum seropedicae*. FEMS microbiology letters, 2006. **258**(2): p. 214-9.
77. Rosconi, F., D. Davyt, V. Martinez, M. Martinez, J.A. Abin-Carriquiry, H. Zane, A. Butler, E.M. de Souza, and E. Fabiano, *Identification and structural characterization of serobactins, a suite of lipopeptide siderophores produced by the grass endophyte Herbaspirillum seropedicae*. Environmental microbiology, 2013. **15**(3): p. 916-27.
78. Trovero, F., *Sistemas de adquisición de hierro mediados por citrato férrico en Herbaspirillum seropedicae Z67. Tesina de grado.*, in Departamento de Bioquímica y Genómica Microbianas. Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable.2012, Facultad de Ciencias. UdelaR.: Montevideo.
79. Rosconi, F., *Sistemas de adquisición de hierro mediados por sideróforos en Herbaspirillum seropedicae Z67. Tesis de Doctorado.*, in Departamento de Bioquímica y Genómica Microbianas. Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable.2013, PEDECIBA-UdelaR: Montevideo.
80. Selbitschka, W., S. Niemann, and A. Pühler, *Construction of gene replacement vectors for Gram- bacteria using a genetically modified sacRB gene as a positive selection marker*. Applied microbiology and biotechnology, 1993. **38**(5): p. 615-618.
81. Silva-Rocha, R., et al., *The Standard European Vector Architecture (SEVA): a coherent platform for the analysis and deployment of complex prokaryotic phenotypes*. Nucleic acids research, 2013. **41**(Database issue): p. D666-75.
82. Bloemberg, G.V., A.H. Wijnjes, G.E. Lamers, N. Stuurman, and B.J. Lugtenberg, *Simultaneous imaging of Pseudomonas fluorescens WCS365 populations expressing three different autofluorescent proteins in the rhizosphere: new perspectives for studying microbial communities*. Molecular plant-microbe interactions : MPMI, 2000. **13**(11): p. 1170-6.
83. Koch, B., L.E. Jensen, and O. Nybroe, *A panel of Tn7-based vectors for insertion of the gfp marker gene or for delivery of cloned DNA into Gram-negative bacteria at a neutral chromosomal site*. Journal of microbiological methods, 2001. **45**(3): p. 187-95.
84. Schwyn, B. and J.B. Neilands, *Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores*. Analytical biochemistry, 1987. **160**(1): p. 47-56.
85. Battistoni, F., R. Platero, R. Duran, C. Cervenansky, J. Battistoni, A. Arias, and E. Fabiano, *Identification of an iron-regulated, hemin-binding outer membrane protein in Sinorhizobium meliloti*. Applied and environmental microbiology, 2002. **68**(12): p. 5877-81.
86. Chomczynski, P., *A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples*. BioTechniques, 1993. **15**(3): p. 532-4, 536-7.
87. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.

88. Horton, R.M., H.D. Hunt, S.N. Ho, J.K. Pullen, and L.R. Pease, *Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension*. *Gene*, 1989. **77**(1): p. 61-8.
89. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis, *Molecular Cloning. A laboratory manual* 1989, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
90. Posfai, G., V. Kolisnychenko, Z. Bereczki, and F.R. Blattner, *Markerless gene replacement in Escherichia coli stimulated by a double-strand break in the chromosome*. *Nucleic acids research*, 1999. **27**(22): p. 4409-15.
91. Di Rienzo, J.A., F. Casanoves, M.G. Balzarini, L. Gonzalez, M. Tablada, and C.W. Robledo, *InfoStat*. 2011.
92. van Opijnen, T. and A. Camilli, *Transposon insertion sequencing: a new tool for systems-level analysis of microorganisms*. *Nat Rev Micro*, 2013. **11**(7): p. 435-442.
93. Jones, C.M. and M. Niederweis, *Role of porins in iron uptake by Mycobacterium smegmatis*. *Journal of bacteriology*, 2010. **192**(24): p. 6411-7.
94. Imperi, F. and P. Visca, *Subcellular localization of the pyoverdine biogenesis machinery of Pseudomonas aeruginosa: a membrane-associated "siderosome"*. *FEBS letters*, 2013. **587**(21): p. 3387-91.
95. Nikaido, H. and E.Y. Rosenberg, *Cir and Fiu proteins in the outer membrane of Escherichia coli catalyze transport of monomeric catechols: study with beta-lactam antibiotics containing catechol and analogous groups*. *Journal of bacteriology*, 1990. **172**(3): p. 1361-7.
96. Patzer, S.I., M.R. Baquero, D. Bravo, F. Moreno, and K. Hantke, *The colicin G, H and X determinants encode microcins M and H47, which might utilize the catecholate siderophore receptors FepA, Cir, Fiu and IroN*. *Microbiology*, 2003. **149**(Pt 9): p. 2557-70.
97. Coutinho, B.G., D. Licastro, L. Mendonca-Previato, M. Camara, and V. Venturi, *Plant-Influenced Gene Expression in the Rice Endophyte Burkholderia kururiensis M130*. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, 2015. **28**(1): p. 10-21.
98. Burse, A., H. Weingart, and M.S. Ullrich, *The phytoalexin-inducible multidrug efflux pump AcrAB contributes to virulence in the fire blight pathogen, Erwinia amylovora*. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, 2004. **17**(1): p. 43-54.
99. Rellan-Alvarez, R., J. Giner-Martinez-Sierra, J. Orduna, I. Orera, J.A. Rodriguez-Castrillon, J.I. Garcia-Alonso, J. Abadia, and A. Alvarez-Fernandez, *Identification of a tri-iron(III), tri-citrate complex in the xylem sap of iron-deficient tomato resupplied with iron: new insights into plant iron long-distance transport*. *Plant & cell physiology*, 2010. **51**(1): p. 91-102.
100. Kadowaki, M.A., J. Iulek, J.A. Barbosa, O. Pedrosa Fde, E.M. de Souza, L.S. Chubatsu, R.A. Monteiro, M.A. de Oliveira, and M.B. Steffens, *Structural characterization of the RNA chaperone Hfq from the nitrogen-fixing bacterium Herbaspirillum seropedicae SmR1*. *Biochimica et biophysica acta*, 2012. **1824**(2): p. 359-65.
101. Miethke, M., C.G. Monteferrante, M.A. Marahiel, and J.M. van Dijl, *The Bacillus subtilis EfeUOB transporter is essential for high-affinity acquisition of ferrous and ferric iron*. *Biochimica et biophysica acta*, 2014. **1833**(10): p. 2267-78.
102. Landa, B.B., C. Lopez-Diaz, D. Jimenez-Fernandez, M. Montes-Borrego, F.J. Munoz-Ledesma, A. Ortiz-Urquiza, and E. Quesada-Moraga, *In-plant detection and monitorization of endophytic colonization by a Beauveria bassiana strain using a new-developed nested and quantitative PCR-based assay and confocal laser scanning microscopy*. *Journal of invertebrate pathology*, 2013. **114**(2): p. 128-38.
103. Barak, J.D., L.C. Kramer, and L.Y. Hao, *Colonization of tomato plants by Salmonella enterica is cultivar dependent, and type 1 trichomes are preferred colonization sites*. *Applied and environmental microbiology*, 2011. **77**(2): p. 498-504.

104. Bailey, B.A., M.D. Strem, and D. Wood, *Trichoderma* species form endophytic associations within *Theobroma cacao* trichomes. *Mycological research*, 2009. **113**(Pt 12): p. 1365-76.
105. Monteiro R.A., S.M.A., de Baura V.A., Balsanelli E., Wassem R., and R.M.A.F. Yates M.G., Pedrosa F.O. & de Souza E.M., *Early colonization pattern of maize (Zea mays L. Poales, Poaceae) roots by Herbaspirillum seropedicae (Burkholderiales, Oxalobacteraceae)*. *Genetics and Molecular Biology*, 2008: p. 6.

ANEXOS

ANEXO 1. Composición de medios y soluciones.

Composición de los medios

TY (Tryptone Yeast extract medium)

Triptona	5 g
Extracto de levadura	3 g
CaCl ₂ 2,5% anhidro	2 ml
Agua desionizada	1000 ml csp

NFb-Malato

MgSO ₄ 4%	5 ml
NaCl 10%	1 ml
CaCl ₂ 2,5% anhidro	0,8 ml
Biotina 0,1g/l	1 ml
Solución de microelementos	10 ml
Malato 20%	25 ml
NH ₄ Cl	20 ml
Mezcla de fosfatos	50 ml
Agua desionizada	1000 ml csp

- Solución de microelementos: Na₂MoO₄·2H₂O 1 g/l; MnSO₄·H₂O 1,175 g/l;

H₃BO₃ 1,4 g/l; CuSO₄·5H₂O 0,04 g/l; ZnSO₄·7H₂O 0,12 g/l

- Mezcla de fosfatos: K₂HPO₄ 17,8 g/l; KH₂PO₄ 159,5 g/l

LB (Luria-Bertani)

Triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g

Agua desionizada	1000 ml csp
------------------	-------------

En el caso de los medios sólidos, se utilizó una concentración de Agar de 16 g/l.

Hoagland

K ₂ HPO ₄ 1M	1 ml
KH ₂ PO ₄ 1M	1 ml
MgSO ₄ 1M	2 ml
Solución de micronutrientes	1 ml
FeSO ₄ 200 Mm	1 ml
Agua desionizada	1000 ml csp
CaCl ₂ 1% (luego de autoclavado)	30 ml
KNO ₃ 1% (luego de autoclavado)	50 ml
• Solución de micronutrientes:	
KCl	3,728 g/l
H ₃ BO ₃	1,546 g/l
MnSO ₄ ·H ₂ O	0,338 g/l
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,575 g/l
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,125 g/l
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,081 g/l

Medio CAS

Por un lado mezclar:

Solución salina	25 ml
Pipes	7,56 g
Agua desionizada	187 ml

Llevar a pH 6,6 con NaOH 50%, y agregar luego:

Extracto de levadura desferrado 5%	5 ml
MgCl ₂ 1M	0,25 ml
CaCl ₂ 0,1M	0,25 ml
Agar	3,75 g

Autoclavar, y luego adicionar:

Glucosa 20%	2,5 ml
Biotina 0,01%	1,25 ml
Glutamato 10%	1,25 ml

Por otra parte preparar dos soluciones:

Solución A: 15,12 mg de CAS, 14,75 ml de agua desionizada y 0,25 ml de FeCl₃ (135 mg/50 ml en HCl 0,01 N).

Solución B: 18,22 mg de HDTMA y 10 ml de agua desionizada.

Se agrega lentamente la solución A en la B, se autoclava, y finalmente se mezcla con la preparación inicial.

Composición de las soluciones utilizadas

Buffer de muestra de SDS-PAGE 1X

- 12 ml de Tris 0,5 M pH 6,8
- 10 ml de glicerol 100%
- 10 ml de SDS 20%
- 5 ml de azul de bromofenol 0,1%
- 5 ml de β-mercaptoetanol
- 45 ml de agua destilada c.s.p.

Geles de poliacrilamida para SDS-PAGE (x2)

Gel Separador (12%):

-2,5 ml de buffer separador (Tris-base 1,5 M; SDS 14 mM; pH 8,8)

-4 ml de Acrilamida 30%/Bisacrilamida 0,8%

-3,6 ml de agua destilada

-5 µl de TEMED 10%

-100 µl de persulfato de amonio 10%

Gel concentrador:

-1,25 ml de buffer concentrador (Tris-base 0,5 M; SDS 14 mM; pH 6,8)

-0,8 ml de Acrilamida 30%/ Bisacrilamida 0,8%

-3 ml de agua destilada

-5 µl de TEMED 10%

-30 µl de persulfato de amonio 10%

Tinción de plata**Solución A:**

-0,8 g de AgNO_3

-4 ml de agua destilada

Solución B:

-21 ml de NaOH 0,36%

-1,4 ml de NH_4OH 14,8 M

Solución C:

-Agregar solución A en solución B lentamente.

-100 ml de agua destilada c.s.p.

Solución D Reveladora:

-1,25 ml de ácido cítrico 1%

-0,125 ml de formol 38%

-250 ml de agua destilada c.s.p.

Solución de detección de revelado:

-50 ml de Metanol 100%

-10 ml de ácido acético glacial 100%

-40 ml de agua destilada

Tinción Coomassie

Solución colorante:

-180 mg de Azul Brillante (Coomassie)

-90 ml de agua destilada

-90 ml de Etanol 95%

-20 ml de ácido acético glacial 100%

Solución decolorante:

-50 ml de Etanol 95%

-16 ml de ácido acético glacial 100%

-130 ml de agua destilada

PBS 1X

NaCl 137 mM

KCl 2,7 mM

Na₂HPO₄ 10 mM

KH₂PO₄ 2 mM

Ajustar pH a 7,4.

ANEXO 2. Abreviaturas utilizadas

CFP - proteína cian fluorescente (Cyan Fluorescent Protein)

DO - densidad óptica

DP – 2,2'-dipiridilo

EDDHA - ácido etilendiamino -N, N' –bis (2-hidroxifenilacético)

GFP - proteína verde fluorescente (Green Fluorescent Protein)

NRPS Sintetasa de péptidos no ribosomales (Non-Ribosomal Peptide Synthetase)

pb- pares de bases

RT-qPCR - retrotranscripción y PCR cuantitativa

ANEXO 3. Réplicas de geles SDS-PAGE.

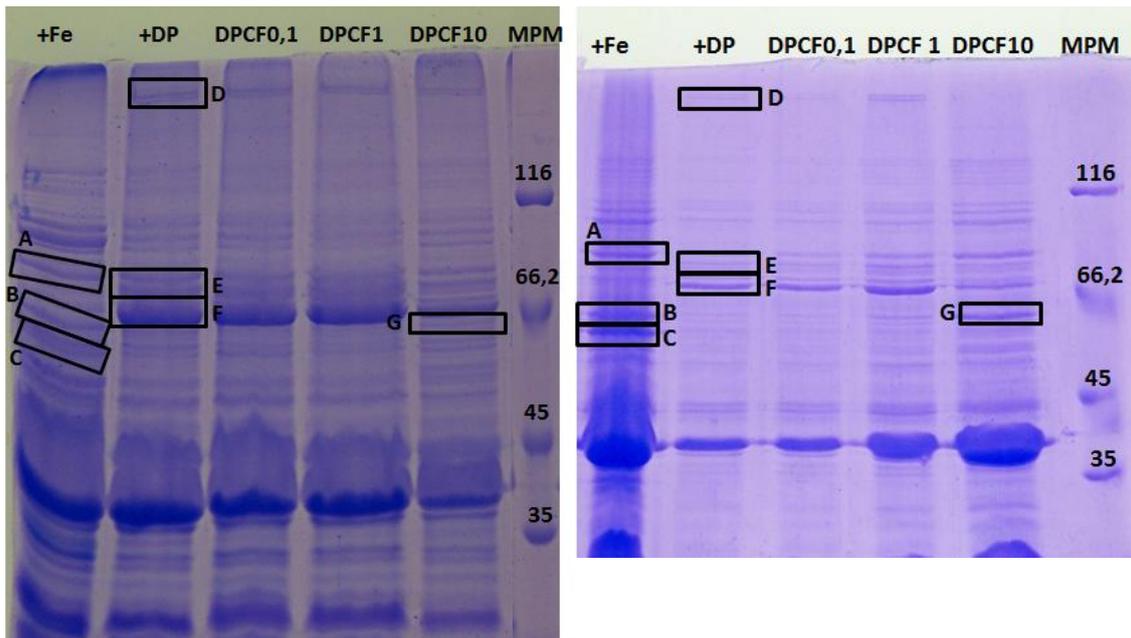


Figura A1. Proteínas de membrana expresadas diferencialmente según la disponibilidad de hierro. Muestras enriquecidas en proteínas de membrana totales se analizaron mediante SDS-PAGE (acrilamida 12%) y tinción por Coomassie. Las letras de la A-G indican las bandas de proteínas identificadas por MALDI-TOF. Carril 6: marcador de peso molecular (KDa). Se sembraron además las fracciones de proteínas extraídas de cultivos en NFb-malato con: FeCl_3 37 μM (+Fe), DP 50 μM (+DP), y DP 50 μM con dicitrato férrico 0,1 μM (DPCF0,1), DP 50 μM dicitrato férrico 1 μM (DPCF1) y DP 50 μM dicitrato férrico 10 μM (DPCF10).

Las proteínas identificadas en las bandas E y F (Hsero_2345 y Hsero_1277) fueron identificadas previamente en trabajos anteriores por Rosconi *et al.* [79].

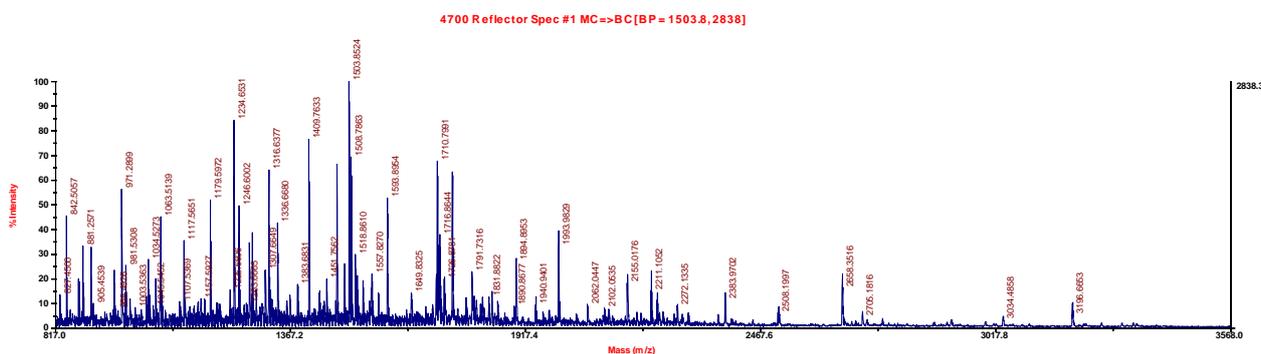
ANEXO 4. Resultados de MALDI-TOF.

Tabla A1. Identificación por MALDI-TOF/TOF de las proteínas presentes en las 7 bandas diferencialmente expresadas en SDS-PAGE en ausencia de hierro.

Rotulo de la muestra	Masa mol. en el gel (kDa.) y banda correspondiente	Proteína identificada por EM	Masa mol. teórica (kDa.)
1	55 (banda B)	Flavoproteína subunidad A de succinato deshidrogenasa	65
2	50 (banda C)	Transportador ABC de unión a sustrato	65
3	75 (banda A)	Porina de membrana externa	39
4	130 (banda D)	Sintetasa de péptidos no ribosomales	99
5	65 (banda F)	Receptor TonB-dependiente	78
		Transportador de membrana externa de dicitrato férrico	78
6	70 y 68 (banda E)	Receptor TonB-dependiente	77
		Receptor de membrana externa TonB-dependiente de catecoles monoméricos	86
7	55 (banda G)	Flavoproteína subunidad A de succinato deshidrogenasa	65

Espectros de masa obtenidos para cada proteína

Muestra 1: subunidad A de la succinato deshidrogenasa

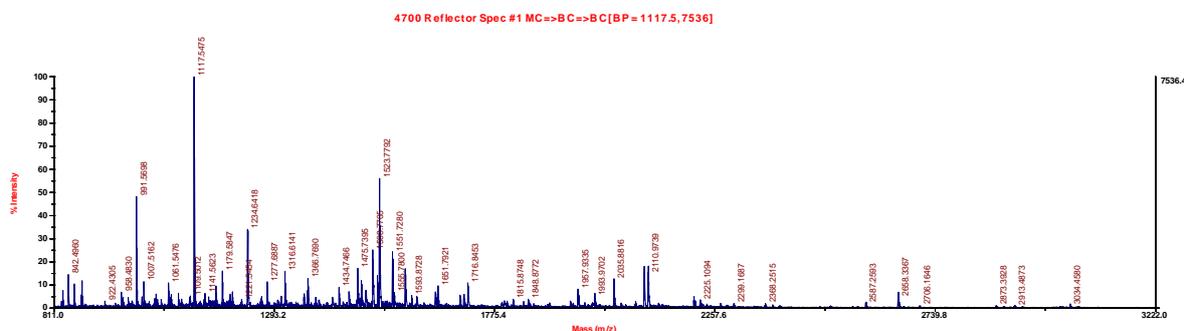


Lista de masas MS (m/z) y MS/MS (m/z) obtenidas experimentalmente:

827.4500, 842.5057, 870.5335, 872.4283, 881.2571, 882.2624, 883.3098, 900.2569, 954.4067, 971.2899, 972.2877, 973.5099, 980.5392, 981.5308, 991.5828, 1029.5253, 1034.5273, 1037.5209, 1051.5444, 1061.5131, 1063.5139, 1065.5135, 1066.5011, 1107.5369, 1117.5651, 1120.6289, 1157.5927, 1165.5791, 1179.5972, 1194.6018, 1196.6306, 1225.6606, 1234.6531, 1246.6002, 1263.6665, 1270.5591, 1276.7632, 1277.7190, 1286.6307, 1307.6649, 1315.6660, 1316.6377, 1320.6119, 1323.6571, 1336.6680, 1365.6644, 1383.6831, 1409.7633
iones(175.1230, 181.1198, 185.1157, 195.0969, 209.1234, 239.0948, 251.1477, 268.1148, 296.0956, 303.1524, 306.0852, 308.0929, 352.1504, 359.1429, 361.1389, 367.1088, 384.1345, 435.1410, 436.1610, 437.1611, 449.0641, 466.1623, 480.1342, 565.2173, 579.2147, 593.2152, 662.2662, 680.2551, 693.1747, 702.1999, 702.3549, 703.2144, 730.2998, 791.3608, 800.3221, 801.2218, 813.3763, 817.3293, 831.4310, 898.4529, 913.4167, 913.6792, 944.4991, 1044.6089, 1107.7308, 1186.6469, 1235.7800, 1251.7197, 1253.7466, 1254.6941, 1255.5593,

1365.2264, 1366.4252), 1434.7576, 1445.7269, 1451.7562, 1472.7356, 1475.7555, 1492.7637, 1503.8524 iones(171.1398, 175.1258, 201.1144, 202.0854, 213.1446, 215.0997, 229.1216, 232.1134, 285.0705, 303.1128, 315.0866, 328.1104, 342.1097, 343.1244, 360.0963, 362.1174, 379.1348, 386.1094, 400.0801, 414.0844, 427.1307, 429.1413, 438.1246, 455.1492, 473.1357, 478.1584, 513.1666, 540.1826, 541.1968, 543.1438, 547.1224, 558.2009, 568.1921, 569.1900, 577.2064, 584.1555, 586.1769, 658.1850, 671.2462, 690.3068, 700.2829, 701.2521, 787.3162, 788.3117, 797.2808, 805.3482, 814.3372, 910.3577, 918.5153, 927.4191, 1026.5146, 1031.5807, 1118.6561, 1215.7030), 1508.7863, 1518.8610, 1523.7864, 1536.8267, 1557.8270, 1558.8059, 1593.8954, 1649.8325, 1707.8298, 1709.8138, 1710.7991 iones(171.1077, 175.1007, 217.1264, 243.0655, 245.0933, 257.0789, 265.0916, 267.0472, 273.0840, 285.0780, 293.0431, 302.9894, 303.1031, 334.0901, 342.0415, 360.0559, 380.0726, 408.1112, 414.0838, 418.0554, 435.0551, 447.0021, 459.0258, 463.0671, 471.0259, 473.0211, 499.0373, 499.1631, 503.0557, 517.0690, 532.1229, 534.1071, 576.1108, 617.9862, 627.1364, 627.2512, 644.1241, 656.1367, 665.1349, 666.1079, 672.0855, 693.1049, 705.0876, 722.1199, 742.2498, 814.2569, 817.1181, 819.1756, 820.1082, 825.2590, 842.2064, 845.2438, 869.2397, 871.2488, 961.3370, 989.2829, 1006.3081, 1043.4390, 1045.3611, 1046.3660, 1135.4109, 1177.4824, 1248.5596, 1536.7806, 1539.4840, 1553.8481, 1554.7656), 1715.8889, 1716.8644, 1726.8781, 1745.9323, 1791.7316, 1801.9008, 1811.8580, 1815.8964, 1831.8822, 1837.9507, 1851.9323, 1890.8677, 1894.8953, 1940.9401, 1993.9829, 2062.0447, 2102.0535, 2112.0222, 2155.0176, 2211.1052, 2225.1238, 2231.2173, 2239.1450, 2272.1335, 2284.1758, 2298.1853, 2383.9702, 2508.1997, 2658.3516, 2705.1816, 3034.4858, 3196.6653

Muestra 2: Transportador ABC de unión a sustrato

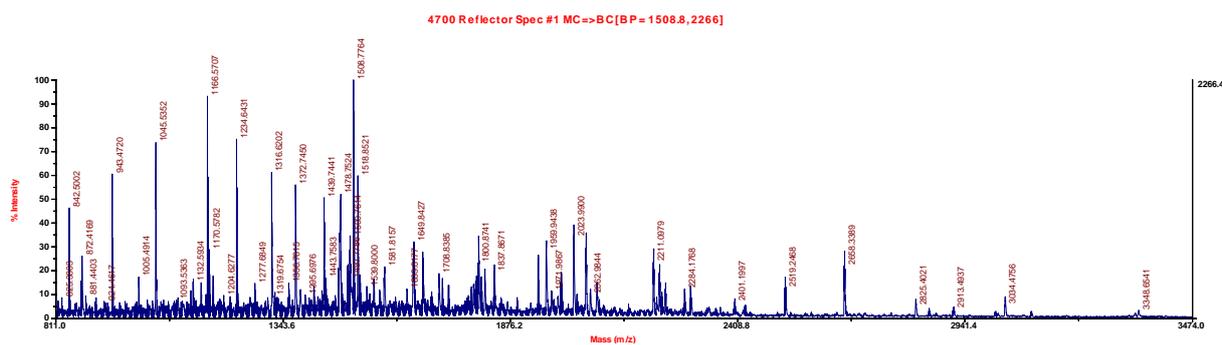


Lista de masas MS (m/z) y MS/MS (m/z) obtenidas experimentalmente:

807.3898, 809.3809, 827.4269, 830.3995, 842.4960, 855.3856, 870.5195, 872.4106, 922.4305, 958.4830, 962.4722, 973.5057, 981.5167, 982.4896, 991.5698, 995.4951, 1003.5270, 1007.5162, 1034.5150, 1061.5476, 1062.5168, 1063.5210, 1067.5327, 1083.4711, 1107.5214, 1109.5012, 1117.5475 iones(175.1523, 221.1415, 227.1919, 228.1508, 230.1591, 232.1331, 243.1387, 249.1573, 277.1314, 278.1337, 283.1478, 284.1798, 321.1505, 338.1697, 341.2007, 363.1935, 390.1651, 391.1776, 393.2233, 413.2059, 425.1700, 440.1358, 468.1965, 470.2443, 475.2034, 476.2614, 485.2321, 492.2197, 493.2278, 504.2622, 520.2192, 539.3314, 589.2850, 597.2640, 605.3322, 614.2914, 617.3440, 633.3312, 639.3397, 667.3557, 710.3865, 727.4236, 737.3365, 752.4568, 780.5003, 782.6276, 840.6056, 880.5079, 897.5887, 943.5982, 954.6832,

1010.6979), 1141.5623, 1149.5538, 1165.5609, 1179.5847, 1196.6241, 1201.5967, 1221.5454, 1234.6418, 1263.6510, 1265.6302, 1277.6887, 1307.6573, 1316.6141, 1357.6853, 1358.6896, 1365.6244, 1366.7690, 1383.6691, 1390.6710, 1420.7108, 1434.7466, 1456.6876, 1475.7395, 1480.7314, 1483.6805, 1486.6698, 1493.7190, 1508.7705, 1518.8427, 1522.7859, 1523.7792
 iones(169.1341, 171.1137, 172.1026, 175.1157, 197.1191, 212.0864, 213.0855, 244.0805, 269.0916, 270.0897, 286.0895, 288.1342, 312.0943, 345.1407, 354.1342, 355.1346, 382.1026, 383.0857, 413.1101, 422.0510, 439.1102, 440.0887, 441.0744, 458.1047, 488.0517, 507.1050, 514.1524, 524.1647, 531.1597, 535.1391, 552.1658, 553.1297, 579.1695, 585.2501, 599.1400, 627.1242, 643.1662, 644.1324, 658.1921, 660.1998, 684.1617, 693.2136, 694.2139, 758.2084, 769.2648, 775.2322, 797.2250, 823.2735, 846.2494, 857.3699, 874.3845, 929.3805, 954.3973, 970.5521, 971.4302, 992.4063, 1084.5602, 1141.5999, 1210.6705, 1238.6877, 1240.5631, 1256.6777, 1335.8667, 1352.8647, 1353.7625), 1551.7280, 1554.7612, 1555.7800, 1579.8082
 iones(166.1168, 171.1118, 175.1185, 181.1470, 185.1700, 241.0928, 253.0843, 258.1095, 270.1156, 324.1628, 345.1018, 350.1388, 352.1192, 355.0637, 358.0143, 359.0797, 366.1205, 371.1087, 375.1176, 393.1942, 428.1367, 430.1072, 437.1692, 456.0970, 465.1545, 474.2037, 529.0369, 536.2020, 547.1537, 564.1794, 600.1764, 644.1087, 646.2140, 660.2296, 676.3488, 677.2778, 739.2128, 747.2600, 775.2836, 778.3647, 789.2441, 803.2390, 805.3488, 885.4064, 886.3346, 888.0560, 894.2816, 903.3609, 905.2198, 921.4091, 934.4341, 991.4713, 1016.4732, 1088.6427, 1090.5702, 1106.5425, 1115.5861, 1151.5568, 1177.6337, 1205.6622, 1230.6658, 1304.7623, 1367.7854, 1420.9310, 1422.7794, 1424.5154, 1433.8953, 1435.7374, 1451.8748, 1453.7079), 1604.7998, 1645.7972, 1649.8142, 1650.8021, 1651.7921, 1699.8318, 1707.7634, 1716.8453, 1802.8564, 1815.8748, 1838.9197, 1848.8772, 1940.9351, 1957.9335, 1972.9823, 1993.9702, 2035.8816, 2051.8743, 2084.0642, 2102.0447, 2110.9739, 2134.0435, 2211.0889, 2214.0620, 2225.1094, 2230.1785, 2240.1140, 2269.2075, 2299.1687, 2368.2515, 2587.2593, 2658.3367, 2706.1646, 2873.3928, 2913.4873, 3034.4580

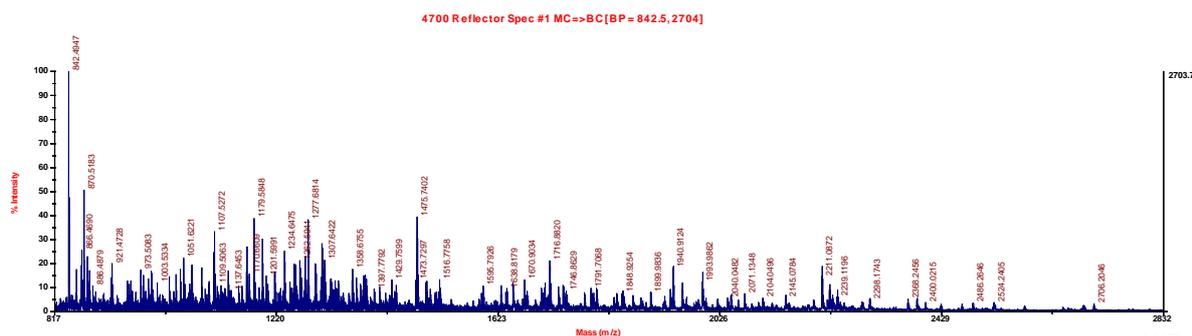
Muestra 3: Porina de membrana externa



Lista de masas MS (m/z) y MS/MS (m/z) obtenidas experimentalmente:

816.3864, 825.3803, 842.5002, 870.5304, 872.4169, 874.4455, 881.4403, 903.4360, 905.4875, 924.4617, 943.4720, 973.5032, 1005.4914, 1025.5234, 1044.5441, 1045.5352, 1063.5485, 1074.5331, 1093.5363, 1096.5521, 1127.5647, 1132.5934, 1151.5811, 1162.6021, 1165.5784, 1166.5707 iones(175.1410, 177.1410, 205.1274, 215.1610, 217.1524, 229.1342, 245.1396, 262.1304, 273.1163, 274.1592, 290.1402, 304.1488, 314.1376, 332.1505, 338.1432, 360.1346, 386.2063, 401.1495, 403.1998, 432.1723, 441.1270, 443.1393, 461.1871, 512.1719, 532.2021, 546.2189, 574.2892, 602.2617, 619.2911, 640.2775, 642.2957, 689.3098, 766.4239, 821.4574, 846.4897, 850.5320, 863.4904, 962.6255), 1170.5782, 1179.5917, 1204.6277, 1219.5802, 1234.6431 iones(175.1376, 202.1253, 205.1257, 229.1777, 242.1388, 244.1497, 245.1161, 259.1293, 272.1902, 299.1731, 304.1071, 318.1845, 319.1534, 357.1505, 358.1375, 360.1550, 373.1973, 409.1094, 430.1658, 432.1747, 440.2144, 447.1693, 458.2527, 471.1736, 490.1708, 502.2772, 514.2171, 515.2663, 529.2652, 543.2145, 545.1590, 560.2920, 576.2867, 576.9991, 587.2661, 617.2622, 631.3198, 636.3210, 639.1845, 647.3223, 675.3275, 677.2188, 690.3669, 701.3682, 715.4671, 716.4120, 803.4654, 865.4850, 886.6781, 900.5169, 1019.3337, 1057.8390, 1076.7295, 1077.7108), 1265.6417, 1277.6849, 1316.6202 iones(175.1316, 189.1026, 201.1198, 217.0809, 219.1227, 229.0859, 229.1724, 235.0955, 272.1078, 288.1447, 289.0967, 306.1184, 330.1452, 338.1317, 348.1720, 361.1549, 403.0760, 420.1177, 430.2158, 475.2000, 493.1690, 507.1694, 536.1261, 548.2028, 564.1842, 589.1713, 612.2706, 633.2109, 645.2685, 683.2733, 710.9885, 711.3070, 736.2994, 753.2960, 988.5224, 1100.6569, 1166.7134, 1185.7135, 1215.7183), 1319.6754, 1324.6384, 1329.6663, 1356.7615, 1372.7450, 1383.6730, 1395.6976, 1439.7441, 1472.7198, 1475.7468, 1477.7556, 1478.7524, 1494.7345, 1496.7782, 1497.7786, 1499.7549, 1500.7614, 1508.7764, 1518.8521, 1523.7997, 1579.8171, 1580.7966, 1581.8157, 1633.8177, 1647.8922, 1649.8427, 1670.8707, 1691.8320, 1708.8385, 1716.8481, 1730.9187, 1783.8781, 1789.8480, 1793.9275, 1794.8779, 1796.8566, 1800.8741, 1807.9287, 1815.8943, 1837.8671, 1940.9398, 1959.9438, 1971.9867, 1988.0527, 1993.9777, 1995.9937, 2023.9900, 2032.0764, 2052.9822, 2062.9844, 2078.0239, 2211.0979, 2219.0425, 2225.1128, 2230.1970, 2239.1243, 2284.1768, 2297.1753, 2401.1997, 2519.2468, 2658.3389 iones(175.0884, 212.0473, 243.0267, 250.8681, 254.0125, 256.0372, 273.9706, 288.0699, 300.9904, 345.0280, 359.0011, 387.8857, 404.0526, 446.0283, 497.8977, 515.9203, 559.0510, 571.9845, 611.9410, 628.9556, 658.8537, 672.0157, 717.0025, 742.8598, 743.1198, 744.0202, 973.2216, 1058.1354, 1059.1154, 1130.2163, 1131.9963, 1228.2832, 1245.2788, 1390.3417, 1471.2130, 1490.4680, 1561.4451, 1618.4602, 1671.6503, 1675.5150, 2012.8943, 2029.9117, 2126.9275, 2143.9160, 2385.2532), 2825.4021, 2857.5227, 2913.4937, 3034.4756, 3348.6541

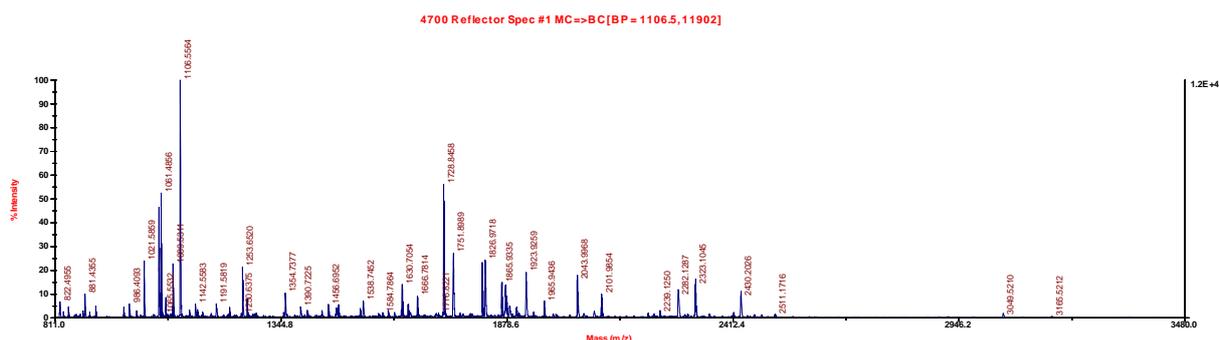
Muestra 4: Sintetasa de péptidos no ribosomales



Lista de masas MS (m/z) y MS/MS (m/z) obtenidas experimentalmente:

842.4947, 856.5129, 865.4701, 866.4690, 867.4841, 870.5183, 876.4420, 880.4279, 919.4833, 921.4728, 955.4851, 973.5083, 978.4822, 987.5056, 992.5029, 993.4949, 1003.5334, 1025.4948, 1037.5021, 1045.5404, 1051.6221 iones(175.1694, 185.1892, 214.2009, 226.1747, 229.2054, 242.1954, 253.1970, 255.1890, 270.1991, 272.1679, 286.1711, 288.2151, 327.1894, 355.2805, 359.2189, 360.1945, 369.1910, 385.2194, 397.2893, 427.2210, 439.3349, 456.3425, 458.3462, 483.3245, 501.3907, 505.3082, 508.3543, 540.3743, 544.2383, 552.3714, 557.3878, 617.4734, 634.4988, 709.5199, 780.6591, 782.6948, 783.5892, 790.6165, 809.5876, 820.6399, 838.7031, 862.5012, 878.6934, 894.8103, 895.8042, 897.6931, 992.5863, 1009.4954), 1065.5082, 1066.4973, 1084.4983, 1106.5164, 1107.5272 iones(175.1453, 200.1338, 219.1636, 244.1352, 246.1718, 247.1349, 251.1358, 258.1190, 314.1571, 315.1602, 343.1818, 344.1445, 357.1639, 360.1658, 361.1664, 363.1439, 372.1342, 374.1885, 375.1808, 387.1056, 390.1402, 422.1358, 449.1750, 456.2151, 483.1171, 487.2724, 489.2397, 492.1997, 504.1917, 537.2242, 546.2309, 550.2205, 573.1896, 586.2251, 601.2296, 603.2745, 616.3106, 618.2734, 621.2654, 635.3105, 672.0026, 684.4986, 720.3373, 723.2354, 723.3630, 724.3452, 732.4293, 748.3967, 843.5605, 921.0076, 950.5816, 952.6242, 977.4597, 978.6854, 992.6783, 1006.6578, 1042.5564, 1065.1848), 1132.5236 iones(175.1680, 185.1849, 214.1694, 216.1438, 226.1572, 227.1537, 229.1913, 242.1662, 272.1817, 273.1892, 286.1992, 288.1521, 303.2014, 340.1753, 341.1337, 342.2069, 373.1925, 413.2822, 433.2320, 447.2627, 450.2822, 454.2932, 457.2614, 468.2300, 502.3253, 513.3229, 556.3505, 563.3492, 632.3511, 633.4185, 647.3954, 659.3714, 662.4731, 663.4937, 674.4756, 676.4440, 691.4207, 699.2992, 728.5757, 777.5686, 823.7689, 900.6889, 917.7004, 959.0208, 961.4281, 973.7242, 974.7153, 977.6710, 978.5554, 1016.9568), 1165.5792, 1166.5898, 1170.6609, 1179.5848, 1194.5768, 1234.6475, 1235.6113, 1252.6467, 1262.5941, 1272.6578, 1277.6814, 1290.7288, 1291.6765, 1302.6738, 1303.6993, 1306.6398, 1307.6422, 1308.6442, 1358.6755, 1378.8146, 1381.7190, 1407.6730, 1429.7599, 1434.7423, 1437.8153, 1473.7297, 1475.7402, 1491.7310, 1493.7157, 1499.7361, 1507.7278, 1510.8612, 1514.7133, 1516.7758, 1592.7924, 1595.7926, 1627.8475, 1636.8406, 1638.8179, 1649.8180, 1670.9034, 1675.8905, 1701.8734, 1707.7782, 1715.9579, 1716.8820, 1732.8276, 1740.9236, 1742.8732, 1791.7068, 1801.9276, 1838.9425, 1847.8843, 1848.9254, 1850.9261, 1851.9340, 1867.9626, 1882.9880, 1899.9836, 1926.0050, 1936.0313, 1940.9124, 1957.0841, 1966.0306, 1993.9862, 2000.9829, 2022.1440, 2040.0482, 2045.9766, 2060.0491, 2071.1348, 2104.0496, 2145.0784, 2196.0688, 2211.0872, 2221.1831, 2225.1226, 2230.2153, 2239.1196, 2245.0757, 2284.1545, 2298.1743, 2368.2456, 2383.9458, 2400.0215, 2486.2646, 2524.2405, 2706.2046

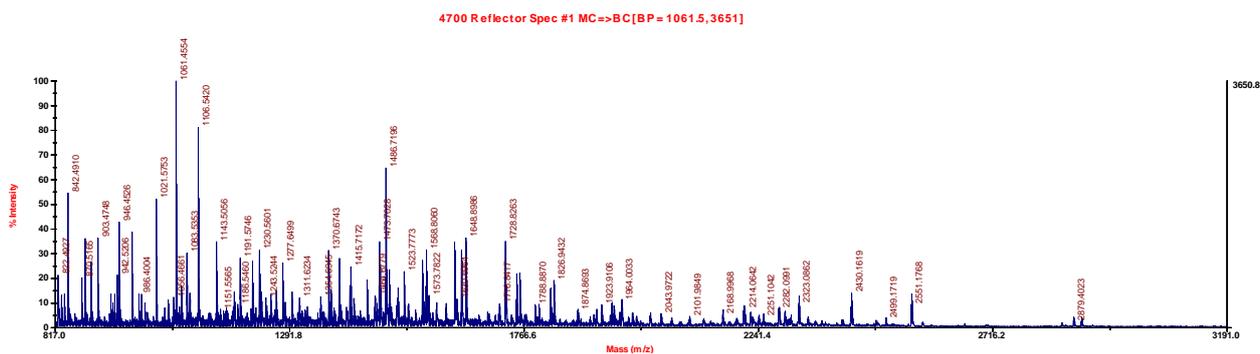
Muestra 5: Receptor TonB-dependiente y transportador de membrana externa de dicitrato férrico



Lista de masas MS (m/z) y MS/MS (m/z) obtenidas experimentalmente:

805.4781, 821.3999, 822.4955, 830.4944, 842.4952, 877.0323, 881.4355, 893.0041, 907.3722, 973.4536, 986.4093, 1003.4799, 1021.5859, 1056.4703, 1060.4962, 1061.4856, 1072.6156, 1088.5127, 1089.5311, 1106.5564 iones(175.1545, 186.1218, 196.1751, 197.1780, 212.1407, 214.1905, 230.1736, 242.1603, 276.2141, 288.1344, 305.1637, 322.1817, 331.1774, 333.1477, 339.1903, 359.1595, 376.2378, 377.2470, 388.2054, 390.1600, 416.1862, 433.2083, 436.2033, 450.2368, 473.2123, 490.2295, 499.2146, 507.2694, 516.2369, 517.2435, 544.2419, 562.3318, 600.3005, 620.3131, 637.3317, 654.3695, 657.3118, 663.3434, 673.3519, 691.3620, 694.3569, 708.3755, 709.3735, 711.3925, 751.4276, 768.4263, 785.5009, 805.4918, 809.6785, 823.5270, 831.4785, 833.2180, 848.5209, 865.5448, 932.6329, 961.6725, 978.7098), 1128.5372, 1142.5583, 1147.5552, 1159.5709, 1179.5824, 1191.5819, 1193.6021, 1222.5190, 1223.4923, 1250.6375, 1253.6520, 1264.6676, 1283.6356, 1285.6471, 1350.7046, 1354.7377, 1358.7103, 1390.7225, 1406.7043, 1441.7429, 1456.6952, 1474.6727, 1475.7157, 1480.6664, 1531.7407, 1538.7452, 1584.7864, 1597.8083, 1612.7228, 1628.8394, 1630.7054, 1644.7758, 1649.8408, 1666.7814 iones(175.1310, 211.1516, 216.1379, 219.1261, 230.1074, 243.0871, 253.0959, 258.1047, 272.0957, 354.0878, 369.7980, 377.0664, 395.1372, 405.0945, 445.1380, 494.1351, 495.2164, 595.2401, 648.1851, 650.2471, 694.3085, 712.2639, 792.3024, 809.3883, 858.4098, 946.4920, 973.4357, 1072.5327, 1173.6943, 1205.7860, 1262.7523, 1273.8833, 1397.7596, 1450.0193, 1493.1648, 1493.9817, 1511.1165), 1716.8221, 1727.8401, 1728.8458 iones(175.1099, 186.0824, 212.0840, 214.0798, 221.0932, 229.1023, 242.0864, 255.0616, 271.0814, 272.0726, 283.1092, 289.0786, 299.0789, 311.0809, 327.0700, 345.0786, 370.0767, 372.0247, 380.0644, 385.0966, 398.0445, 402.1148, 424.0904, 426.0436, 481.0746, 501.1471, 519.0427, 538.0986, 558.1406, 610.1058, 615.1441, 620.0793, 625.0991, 628.1150, 652.1451, 653.1083, 670.1953, 694.1581, 695.1525, 697.0507, 711.1916, 712.2153, 714.6686, 714.9603, 792.2001, 793.2261, 795.1831, 809.2271, 810.2277, 827.2451, 831.2210, 885.2986, 898.2828, 902.2697, 1008.3331, 1017.3177, 1026.3978, 1066.4032, 1083.4424, 1230.5717, 1327.6998, 1331.6461, 1554.8663, 1573.7960, 1574.8989), 1750.9012, 1751.8989, 1819.9739, 1826.9718, 1865.9335, 1872.8566, 1874.8973, 1877.9258, 1884.8403, 1900.8159, 1906.9065, 1922.9340, 1923.9259, 1940.9172, 1965.9436, 2043.9968, 2059.9988, 2084.0159, 2100.9958, 2101.9854, 2211.0930, 2225.1084, 2239.1250, 2282.1287, 2285.1619, 2299.1641, 2305.1094, 2321.0894, 2323.1045, 2355.2520, 2413.2014, 2429.1885, 2430.2026, 2446.2024, 2462.2021, 2479.2119, 2511.1716, 3049.5210, 3165.5212

Muestra 6: Receptor TonB-dependiente y receptor de membrana externa TonB-dependiente de catecoles monoméricos

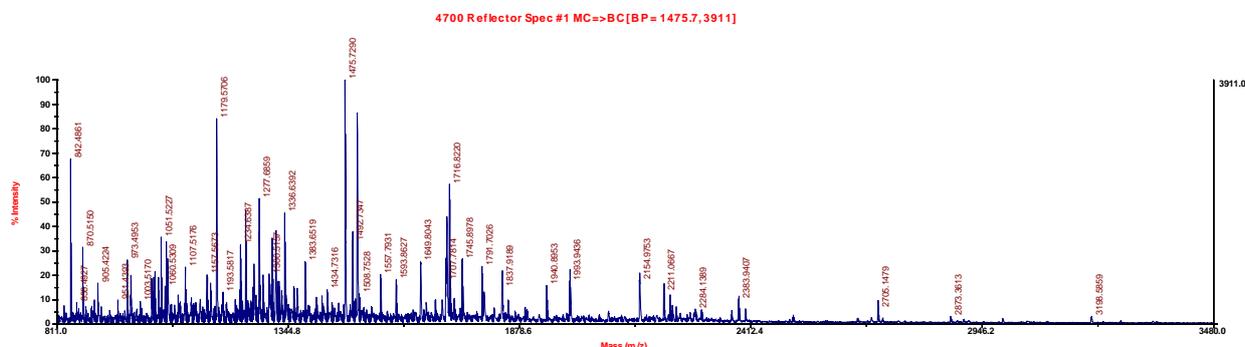


Lista de masas MS (m/z) y MS/MS (m/z) obtenidas experimentalmente:

807.4106, 822.4927, 823.4578, 835.4190, 842.4910, 870.5165, 877.4307, 889.4350, 903.4748, 929.4835, 937.4425, 942.5206, 946.4526, 972.3882, 986.4004, 991.5564, 1021.5753, 1045.5392, 1056.4661, 1061.4554, 1068.4962, 1072.6036, 1083.5353, 1089.5153, 1106.5420 iones(175.1557, 177.1648, 186.1130, 197.1774, 212.1493, 214.1938, 229.1475, 242.1720, 286.1666, 288.1866, 305.1765, 322.1992, 331.1767, 333.1433, 334.0749, 359.1367, 387.1548, 390.1720, 415.1990, 416.1898, 433.2123, 435.2789, 436.1715, 473.2169, 487.2276, 490.2333, 507.2550, 516.2065, 527.2477, 544.2595, 581.2788, 600.3352, 613.3374, 621.2587, 637.3544, 654.3885, 663.4099, 664.3255, 691.3704, 694.4260, 709.4340, 711.4187, 751.4152, 823.5280, 831.5029, 848.5286, 865.5696, 916.4713, 950.5496, 978.6785, 1042.5576), 1143.5056, 1151.5565, 1163.5638, 1177.6267, 1179.5698, 1186.5460, 1191.5746, 1216.5354, 1230.5601, 1232.5607, 1234.6302, 1253.6354, 1264.6467, 1277.6499, 1296.6575, 1311.6234, 1327.6685, 1354.6945, 1370.6743, 1375.7170, 1391.6516, 1392.6442, 1395.6709, 1413.6664, 1415.7172, 1448.6349, 1473.7028, 1475.7080, 1485.7679, 1486.7196 iones(175.1194, 177.1221, 199.1964, 200.1331, 205.1060, 227.1617, 228.1343, 229.1222, 272.0922, 274.1463, 286.1035, 303.1201, 320.0714, 341.1293, 345.1257, 361.1352, 399.0943, 412.1441, 416.1527, 426.0963, 447.0726, 450.0419, 459.0855, 476.1094, 485.1517, 514.1194, 531.1859, 544.1443, 575.2124, 602.1757, 616.1244, 622.1610, 634.0617, 635.1715, 652.1376, 703.2382, 706.1763, 722.2636, 765.1949, 790.3015, 831.3408, 847.3342, 906.4406, 916.3486, 936.3979, 944.3995, 962.3861, 993.5137, 1047.5554, 1167.6405, 1330.7018), 1493.7206, 1510.6785, 1511.6588, 1523.7773, 1560.7346, 1564.7769, 1567.8066, 1568.8060, 1573.7822, 1607.7676, 1625.8217, 1630.6964, 1639.7914, 1648.8986, 1692.8152, 1716.8417, 1728.8263 iones(175.1093, 212.0763, 214.0900, 226.0976, 229.0968, 230.1013, 242.0727, 255.0610, 272.0596, 283.0900, 289.0924, 299.0886, 311.0769, 327.0522, 345.0683, 357.1169, 385.0595, 387.0714, 396.1349, 402.1072, 424.0884, 501.1951, 558.1415, 670.0640, 690.1521, 695.1816, 697.1179, 712.2203, 715.1192, 720.1752, 809.2764, 810.2399, 827.2745, 1017.3311, 1026.3854, 1083.4031, 1230.6487, 1573.7424, 1574.9257, 1575.8042), 1750.8784, 1751.8721, 1757.9008, 1788.8870, 1796.8060, 1819.9456, 1826.9432, 1874.8693, 1912.8538, 1922.9064, 1923.9106, 1943.9125, 1948.9547, 1959.9043, 1964.0033, 1985.9469, 2021.9886, 2043.9722, 2101.9849, 2168.9968, 2211.0591, 2214.0642, 2225.0635, 2229.0752, 2242.1179, 2251.1042, 2282.0991, 2294.9939, 2307.0088,

2323.0862, 2341.1702, 2411.1104, 2428.1597, 2430.1619, 2499.1719, 2551.1768, 2879.4023, 2895.4492

Muestra 7: Flavoproteina subunidad A de succinato deshidrogenasa



Lista de masas MS (m/z) y MS/MS (m/z) obtenidas experimentalmente:

807.3801, 842.4861, 856.4927, 870.5150, 897.3920, 905.4224, 951.4393, 973.4953, 980.5159, 981.5026, 982.4440, 1029.5062, 1034.5043, 1037.4923, 1045.5356, 1051.5227, 1063.4917, 1065.4860, 1066.4810, 1107.5176, 1109.4834, 1121.5746, 1141.5178, 1157.5673, 1165.5546, 1179.5706, 1193.5817, 1232.5708, 1234.6387, 1235.5209, 1246.5721, 1263.6482, 1265.6056, 1277.6859, 1286.6072, 1300.5157, 1307.6426, 1315.6323, 1316.6248, 1320.5680, 1323.6312, 1336.6392, 1383.6519, 1410.7362, 1422.6953, 1434.7316, 1475.7290, 1492.7347, 1499.7693, 1503.8223 iones(171.1362, 175.1183, 201.1130, 202.0775, 215.0927, 216.1053, 229.0803, 232.1005, 272.1105, 287.1089, 303.0928, 315.1485, 341.0987, 342.1030, 360.0937, 362.0661, 379.1064, 427.1476, 428.1482, 429.1505, 438.1703, 441.1526, 445.0844, 455.1327, 473.1149, 478.1636, 544.1219, 558.1898, 568.1951, 577.1644, 586.1905, 600.2274, 656.2611, 683.1887, 687.2239, 690.2980, 699.2667, 701.1951, 788.3265, 796.2894, 797.2593, 798.2217, 805.3397, 814.2920, 910.4005, 918.4329, 927.4210, 1026.5680, 1031.5592, 1074.5522, 1118.6726, 1215.7213, 1232.8647, 1333.8339, 1348.7633, 1444.3588), 1508.7528, 1557.7931, 1593.8627, 1649.8043, 1683.9028, 1699.8116, 1707.7814, 1708.7504, 1710.7640, 1716.8220, 1745.8978, 1791.7026, 1796.8435, 1837.9189, 1851.9054, 1940.8953, 1993.9436, 2154.9753 iones(175.0868, 183.1150, 189.0759, 229.0528, 246.0584, 260.0201, 287.0376, 300.0587, 304.0376, 317.0453, 371.0337, 443.9977, 505.0191, 675.9687, 691.9794, 693.0193, 791.0647, 808.1072, 815.1463, 865.0131, 966.1196, 1063.0929, 1080.1703, 1340.4165, 1411.4231, 1508.5216), 2211.0667, 2225.0857, 2230.1743, 2239.0923, 2284.1389, 2298.1594, 2368.2156, 2383.9407, 2399.0081, 2705.1479, 2873.3613, 3198.5859

ANEXO 5. Resultados de RT-qPCR.

Tabla A2. Cts para cada gen, a los 4 tiempos, en las cuatro condiciones trabajadas y las tres réplicas biológicas.

Ct 16S					Ct 1277				
30 min	+Fe	x1	x2	x3	30 min	+Fe	x1	x2	x3
	-Fe	18,5	18,3	16,5		-Fe	32,4	31,9	29,7
	+DP	19,8	17,6	17,0		+DP	36,0	31,1	29,7
	+DPCF	18,0	17,4	12,0		+DPCF	28,0	nd	21,6
60 min	+Fe	15,5	17,0	15,0	60 min	+Fe	28,3	27,8	nd
	-Fe	15,4	20,1	14,6		-Fe	30,6	31,0	28,3
	+DP	14,4	16,1	13,7		+DP	29,2	27,9	28,0
	+DPCF	15,4	18,9	11,0		+DPCF	23,0	22,1	12,4
120 min	+Fe	12,8	13,3	nd	120 min	+Fe	27,9	26,5	nd
	-Fe	14,3	11,7	12,6		-Fe	30,7	27,8	28,9
	+DP	10,4	11,7	12,5		+DP	23,3	27,1	28,1
	+DPCF	10,9	14,2	10,2		+DPCF	18,3	21,2	19,0
180 min	+Fe	15,8	13,0	14,6	180 min	+Fe	29,4	24,4	29,9
	-Fe	12,6	13,3	14,2		-Fe	26,0	28,6	27,7
	+DP	12,9	12,2	12,4		+DP	25,7	22,9	22,7
	+DPCF	11,6	12,4	10,3		+DPCF	20,7	20,7	20,8
		12,8	11,7	15,9			24,0	21,5	23,6
Ct 2230					Ct 0051				
30 min	+Fe	x1	x2	x3	30 min	+Fe	x1	x2	x3
	-Fe	33,4	32,3	nd		-Fe	32,7	31,3	28,1
	+DP	33,7	29,7	nd		+DP	33,8	30,9	27,9
	+DPCF	34,0	30,6	nd		+DPCF	30,6	nd	22,4
60 min	+Fe	30,4	28,9	nd	60 min	+Fe	27,8	28,1	nd
	-Fe	30,5	31,3	31,8		-Fe	29,8	30,0	nd
	+DP	31,0	29,4	30,7		+DP	29,6	28,1	27,6
	+DPCF	30,5	30,7	29,1		+DPCF	26,0	25,1	22,3
120 min	+Fe	30,0	27,5	nd	120 min	+Fe	26,9	25,6	nd
	-Fe	30,4	29,9	nd		-Fe	30,2	28,8	28,4
	+DP	27,0	29,7	30,8		+DP	26,6	29,2	28,0
	+DPCF	25,0	30,2	nd		+DPCF	22,5	24,7	22,2
180 min	+Fe	31,3	29,9	30,4	180 min	+Fe	28,9	28,4	28,7
	-Fe	29,0	28,9	30,2		-Fe	27,9	28,9	27,7
	+DP	27,7	29,0	29,5		+DP	27,5	27,4	26,7
	+DPCF	28,9	28,7	24,9		+DPCF	24,9	23,7	21,9
		30,3	29,1	30,0			26,4	26,1	nd
Ct 0598					Ct 2720				
30 min	+Fe	x1	x2	x3	30 min	+Fe	x1	x2	x3
	-Fe	31,2	32,2	30,8		-Fe	32,8	31,9	30,5
	+DP	33,4	30,8	30,0		+DP	34,1	30,5	nd
	+DPCF	33,0	30,4	27,3		+DPCF	26,5	nd	21,9
60 min	+Fe	28,9	28,8	nd	60 min	+Fe	28,1	29,2	nd
	-Fe	30,1	31,9	31,0		-Fe	29,7	31,5	29,1
	+DP	29,7	29,7	29,7		+DP	29,1	29,0	29,5
	+DPCF	30,8	29,8	28,0		+DPCF	23,8	24,1	22,3
		28,5	28,1	nd			27,1	27,2	nd

120 min	+Fe	31,0	28,6	29,1	120 min	+Fe	30,1	28,0	28,1
	-Fe	27,6	29,6	28,2		-Fe	23,6	28,2	27,8
	+DP	26,7	28,0	27,0		+DP	19,8	22,5	20,9
	+DPCF	29,9	28,7	nd		+DPCF	28,8	26,4	nd
180 min	+Fe	29,3	28,4	28,7	180 min	+Fe	28,9	28,0	28,0
	-Fe	28,3	27,7	27,8		-Fe	27,4	24,9	24,5
	+DP	28,3	27,5	25,7		+DP	23,8	22,3	21,8
	+DPCF	27,2	27,6	27,3		+DPCF	24,3	23,4	nd
Ct 4534		x1	x2	x3					
30 min	+Fe	32,4	31,4	31,2					
	-Fe	33,6	31,8	31,5					
	+DP	33,6	30,1	27,1					
	+DPCF	29,8	29,1	30,6					
60 min	+Fe	31,1	31,1	nd					
	-Fe	30,8	30,8	30,0					
	+DP	31,1	29,9	35,6					
	+DPCF	28,4	28,6	nd					
120 min	+Fe	31,7	29,5	30,0					
	-Fe	27,8	31,8	31,1					
	+DP	28,2	28,6	25,5					
	+DPCF	29,2	28,5	nd					
180 min	+Fe	29,6	28,4	28,9					
	-Fe	28,4	27,5	28,2					
	+DP	29,1	27,1	25,4					
	+DPCF	24,6	25,8	25,4					

+Fe: con FeCl₃ 37 μM

-Fe: sin hierro agregado

+DP: con quelante Dipiridilo 75 μM

+DPCF: Dipiridilo 75 μM Dicitrato férrico 100 μM

nd: no determinado

X1: réplica biológica 1

X2: réplica biológica 2

X3: réplica biológica 3

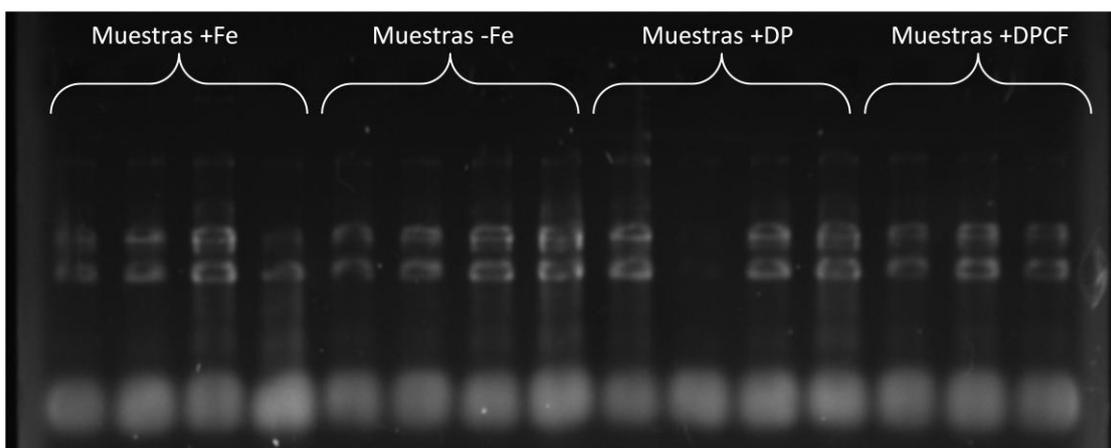


Figura A2. Extracciones de ARN de la segunda réplica biológica (x2), para las cuatro condiciones y los cuatro tiempos. Gel de agarosa 1%, tinción con BrEt.

ANEXO 6. Resultados de RNAseq.

Tabla A3. Genes con expresión diferencial (fold-change) entre las condiciones sin hierro agregado (-Fe) y con quelante (+DP), el p-valor del test estadístico y la cobertura del gen en RPKM. x1: réplica biológica 1. x2: réplica biológica 2.

Locus tag	Fold Change	P-valor	RPKM -Fe x1	RPKM -Fe x2	RPKM +DP x1	RPKM +DP x2
hisD	-2,8861	0,036604	39,17437			
nuoE	-4,43354	0,030017	230,4881	164,3012	84,82984	
rfaC	-2,5654	0,009841	32,70792			
Hsero_1781	-8,21843	0,015983	30,43338	35,04438		
Hsero_2435	-3,07337	0,019389	39,34946	29,87561		
rfaJ (NC_014323 4092531..4093748)	-3,46863	0,017363	34,34279	27,18795		
Dxs	-4,14191	0,038697		26,62294		
accB (NC_014323 424682..425356)	-3,74991	0,025278	58,13499	41,44096		
Hsero_1603	-10,9104	0,046126	33,91208	35,70298		
spoU (NC_014323 2468970..2469962)	-3,49173	0,002885	32,2575	28,15646		
aer (NC_014323 560915..562780)	-2,46713	0,03378	36,76687			
serC	-2,86391	0,028016	84,0559	54,00023	41,10892	
Hsero_0587	-5,51291	0,004632		27,60367		
Hsero_1295	-2,07186	0,052566	29,74286			
secD	-2,27179	0,036958	37,53872	28,37521		
Hsero_4242	-3,03929	0,035367	36,99645	31,18208		
Hsero_1881	-4,65308	0,045152	31,23643	40,01135		
Hsero_3799	-2,79335	0,019917	29,26088	29,75595		
talB	-4,56531	0,004226	27,59365	37,07013		
glyQ	-2,59778	0,022785	30,95853	30,36419		
lasT	-3,37548	0,02606		33,02253		
nuoB	-3,74787	0,041288	174,5967	113,6163	62,07847	
Hsero_1813	-3,22412	0,040575		33,52791		
nuoC	-2,39941	0,001478	99,96495	64,1601	52,21467	
nuoD	-4,51634	0,002498	203,9096	157,5213	63,7599	
hpcH	-2,70194	0,025474		36,97408		
Hsero_0424	-3,1428	0,01279	39,8201	53,05882		
Hsero_1814	-2,415	0,033707	44,35809	51,07884		
moeA (NC_014323 2133954..2135441)	-2,29634	0,053074	28,98539	41,32391		
Hsero_3838	-2,14964	0,014551	38,41469	56,8735		30,81064
kdtB	-2,35979	0,000668	100,3956	84,93554	47,05474	31,48256
Hsero_3842	-2,31895	0,027899	164,1083	104,6446	84,32751	31,56684
lepA	-2,54605	0,038548	63,53643	77,3652		31,99148
degQ (NC_014323 4647894..4649276)	-2,11892	0,001186	41,11094	59,07748		32,67397
gst (NC_014323 3429658..3430551)	-2,20394	0,003682	25,59545	55,81911		33,71066
Alas	-2,1903	0,019075	80,21531	78,03246	38,50481	33,74447
rpsN	-2,08803	0,029361	482,6889	227,5939	306,173	33,99618
Hsero_3163	-2,7097	0,041848	32,77856	64,7055		35,97601
opuBB1	-2,34583	0,045124	35,01032	70,99163		38,42548
Hsero_4673	-2,53566	0,0087	87,01349	103,8862	29,99674	45,28933
adhA	-5,60918	0,026134	675,4217	516,284	165,6861	46,77017
Eno	-2,32212	0,047373	87,57203	108,8755	35,81668	48,7817
sspA	-2,16174	0,033517	151,1987	128,5957	72,05462	57,37554
Dtd	2,221067	0,03611		36,34054	33,01136	60,6156
Hsero_3248	19,62441	0,03328			60,20437	66,57509
Hsero_1278	2,912838	0,037462		36,20543	38,92375	76,25031
tpiA	-2,55462	0,000119	116,1741	170,0751	29,059	82,99244

Hsero_3511	-2,27531	0,039396	94,01664	146,6944		83,41521
Hsero_3789	-2,94483	0,032115	222,912	248,8086	75,00937	85,1767
Hsero_1892	13,90244	0,046033			84,74152	88,79611
Mdh	-2,33684	0,012035	205,793	231,8272	78,2512	109,0187
Hsero_2414	-2,38545	0,008	174,8688	274,9335	45,88967	142,6712
secE	-2,01871	0,020133	1120,638	667,8639	683,6446	202,3192
Hsero_2720	15,9802	0,009496			206,9753	203,0688
cirA (Hsero_2337)	8,478987	0,049379	33,63242		205,6337	217,23
rpsP	-2,25147	0,005846	785,0949	697,9261	376,7137	281,9753
nuoF	-3,39978	0,039993	194,2561	116,6194	91,43995	

Tabla A4. Genes con expresión diferencial (fold-change) entre las condiciones con hierro (+Fe) y con quelante (+DP), el p-valor del test estadístico y la cobertura del gen en RPKM. x1: réplica biológica 1. x2: réplica biológica 2.

Locus tag	Fold Change	P-valor	RPKM +Fe x1	RPKM +Fe x2	RPKM +DP x1	RPKM +DP x2
Hsero_4543	-23,28229357	0,038143		26,25112		
Hsero_3232	-3,727574958	0,038054	28,73487			
Hsero_3159	-11,97683763	0,020802	34,77656	35,32006		
Hsero_1961	-12,96238022	0,048596	29,64559	34,26185		
Hsero_0513	-25,38157867	0,021752	30,61347	35,38044		
Hsero_0207	-2,226832634	0,01903	26,83087			
KdpE	-7,543338726	0,012133	34,04362	34,79465		
Hsero_0732	-2,409200079	0,011327	27,53985			
miaB	-3,408356448	0,043519	28,3403	26,89885		
Hsero_0384	-11,12081031	0,001807	32,1286	38,67865		
Hsero_4006	-12,68354742	0,016448	37,45933	46,02917		
FdhF	-7,586146112	0,003472	34,17923	38,47028		
Hsero_1498	-10,81821752	0,030738	37,23138	46,94057		
mesJ (NC_014323 2124349..2125899)	-5,408147661	0,044071	30,62581	29,88886		
Hsero_4300	-6,22123153	0,049936	34,72027	41,66163		
ugpB (NC_014323 4349950..4351464)	-3,607230247	0,046278	66,88861	53,95186	26,39826	
livF (NC_014323 1887729..1888637)	-5,016982404	0,000608	64,82688	55,04977		
AtpH	-5,096469391	0,013636	156,9399	114,6068	45,46932	
Hsero_3679	-11,38793003	0,005246	44,04109	53,3227		
Hsero_3230	-2,914542219	0,018677		25,70499		
LeuA	-3,566571226	0,013821		26,25272		
Hsero_3422	-6,184971024	0,030873		37,40904		
Hsero_3763	-2,373950636	0,010781	30,16213	25,41789		
Hsero_3234	-4,472472852	0,029928	30,55541	33,63175		
flhB (NC_014323 2326087..2326632)	-7,886802157	0,003985	36,00172	46,97646		
Hsero_4448	-4,44819687	0,01637		34,00022		
FliP	-4,317517656	0,041145		27,382		
Hsero_2914	-2,601871134	0,030761	68,91347	49,61661	34,1907	
SseA	-3,556444277	0,017371		32,26486		
Hsero_4042	-4,153953419	0,023549		30,72889		
TalB	-6,514209644	0,027256	42,9013	49,36703		
Hsero_0285	-7,177673268	0,035713	70,10955	80,65152		
Hsero_0532	-2,74388596	0,017565	34,66868	34,86665		
LspA	-2,200277924	0,03654	38,89535	34,05449		
Hsero_0642	-2,610347631	0,051724		25,75671		
Hsero_2059	-6,030013159	0,033962	77,54263	85,53205		
Hsero_0246	-2,073391726	0,05013		27,10769		

ompW1	-2,316126597	0,024094		28,11149		
Nth	-6,257207951	0,047421	43,13765	61,60222		
Hsero_4516	-2,516261883	0,053866		26,54175		
Hsero_3637	-3,084297276	0,018793		35,19199		
Hsero_1631	-2,677326127	0,023242		32,00142		
Hsero_2709	-7,860295971	0,050977	53,96398	77,51827		
Hsero_1471	-4,638517527	0,04625	34,0592	52,48363		
Hsero_3170	-2,076396982	0,050428		28,87793		
mhpC	-4,407862612	0,012087	47,62781	55,26523		
Hsero_4697	-2,549009797	0,050759	26,61659	33,02048		
Hsero_4011	-6,571245831	0,037651	43,26142	65,21461		
Hsero_4594	-3,258727878	0,004535		39,74784		
phaB	-6,93758926	0,004384	71,05697	84,90968		
Hsero_1636	-5,176763064	0,002613	65,05297	74,97727		
Hsero_3830	-5,343076673	0,038855	65,13035	70,76865		
Hsero_2293	-2,579788848	0,043806	87,33928	71,33896	42,10269	
Hsero_0874	-2,131231161	0,014526	79,73964	57,59768	44,12297	
ArgE	-3,221618773	0,024819	27,96997	45,18592		
Hsero_1039	-3,436720776	0,015268	76,77331	73,08027		
Hsero_0695	-2,552295858	0,007821	44,43229	52,39904		
Hsero_1400	-2,466636727	0,014138	28,7697	45,08416		
Hsero_3148	-3,978725744	0,00457	173,5719	141,4484	56,49642	
TatB	-2,897041267	0,011979	63,11801	65,85441		
Hsero_3307	-4,532848164	0,020926	48,03036	67,84482		
fdx (Hsero_4800)	3,554158085	0,031495			33,585	
Hsero_3579	-2,762612639	0,040128	39,95156	58,77616		25,29296943
Hsero_2773	-2,701208204	0,00593		47,49939		25,77732636
GidA	-2,427747611	0,019898	50,24225	59,55458		26,25961703
Hsero_1554	4,938009477	0,053713				26,60799555
FolP	-2,288439792	0,026866	42,83915	52,29913		26,64762853
Hsero_1047	-2,297596111	0,05105		46,17051		27,14417253
FolC	-3,663685682	0,011255	67,30666	85,35667		28,87841855
Hsero_2214	-4,626442491	0,050241	75,50221	88,18731		29,10671594
Hsero_4169	-2,692178001	0,023834	117,9046	101,1658	51,63466	29,73826514
RfbG	-3,351787494	0,033893	58,62335	74,64189		30,38042035
suhB	-2,432190751	0,017005	75,47002	76,96043	31,78994	30,88213812
Hsero_1158	-2,10532622	0,015383	37,16513	56,402		31,24634442
Hsero_1745	-2,215291301	0,023572	41,56901	60,5746		31,5191158
cheA (NC_014323 3549933..3552050)	-2,4025362	0,021276	76,23903	79,47228	32,3085	32,50272862
Hsero_2211	2,099265865	0,029382			39,48362	33,23429119
Hsero_1816	-2,423650196	0,000409	46,16405	67,86061		34,39313244
Hsero_2782	-2,751719916	0,033944	59,94883	75,96902		35,01584359
Hsero_0769	-3,336286844	0,015396	45,51918	81,4159		38,04681384
lpdA (NC_014323 1677109..1679100)	-2,752311891	0,014097	109,6746	106,5456	39,31985	39,23961021
Hsero_2800	-2,76917607	0,037962	37,45489	73,19088		39,95620687
tsr (NC_014323 3998624..4000453)	-2,42379594	0,012418	47,40945	77,32176		39,97200315
Pnp	-2,056269859	0,005564	159,9246	112,5851	90,54457	41,98167788
motB	-7,919051765	0,05114	173,9317	236,5517		42,79121672
cphA2	-3,168556869	0,044485	76,43572	114,2679		44,44177915
Hsero_4673	-2,373968303	0,042646	78,24726	100,4795	29,99674	45,28933034
adhA	-7,116857244	0,046163	862,6686	649,352	165,6861	46,77017162
Hsero_2893	-6,74005408	0,037735	158,0076	217,395		48,05618454
EpsL (Hsero_1987)	3,907301708	0,023524			38,44854	50,41228474
Hsero_1984	-2,348922724	0,036008	219,6529	168,4353	114,5283	50,69140435

AceE	-2,396680015	0,006533	86,08069	110,6789	28,16088	53,93583979
Hsero_1054	-2,23905296	0,025286	44,69268	94,28538		57,35951092
bfr (Hsero_1195)	-2,918166372	0,001035	58,21989	115,3467		58,39510981
Hsero_4683	-2,535577003	0,018594	52,59332	104,7981		58,53139565
Hsero_1917	-4,215268052	0,042568	104,8417	172,0274		59,3629686
Hsero_3246	12,93149143	0,032369			76,25981	59,39940995
Hsero_3623	-2,619744518	0,050239	114,6445	128,8159	33,4289	59,50401269
Hsero_3606	-2,600084082	0,022824	195,7995	182,4341	83,59183	61,87794648
nifR3	-3,024900404	0,041446	169,2308	167,4713	49,18763	62,12249002
fhuA (Hsero_0948)	57,74795921	0,049299			75,45706	63,49429261
apaG	-2,96199386	0,038927	105,6724	139,9373		63,57286415
Hsero_2344	14,19597358	0,013079			74,97958	64,59471363
Hsero_3248	1,7977E+308	0,031964			60,20437	66,57509098
Hsero_3995	-2,057830288	0,016853	57,41894	112,3014		67,52382332
GloB	-2,329122929	0,004446	83,33093	127,4288		67,71333742
xthA (NC_014323 5364962..5365939)	-2,164259076	0,034346	110,7795	147,2465	45,12516	74,09625475
LeuC	-2,169716591	0,019983	130,0656	150,7757	51,98638	77,4504986
Hsero_3494	-2,519224536	0,020218	63,10773	135,8585		77,77084036
Hsero_2984	-4,424078471	0,010332	345,3888	356,864	78,04024	80,69403286
Hsero_0854	-3,345459998	0,016872	150,6584	201,0302		81,01595054
Hsero_2725	-2,306844342	0,053491	98,54662	144,8109		81,68451763
Hsero_0753	-3,028368205	0,052175	117,2483	204,8573		88,12535411
Hsero_1892	13,74742318	0,026911			84,74152	88,79610579
Hsero_2903	-2,031176839	0,005909	122,4867	162,8825	49,37695	91,11757261
Hsero_2431	5,843546111	0,015767			88,52648	91,25766113
fecA (Hsero_1277)	7,523393151	0,051744			99,79981	91,45419534
coxA (NC_014323 4759259..4761079)	-2,704976679	0,049218	127,2822	184,8822		94,12304305
Hsero_1059	-2,462261837	0,003456	78,60625	169,108		95,95240169
Hsero_3472	-2,340342083	0,053371	177,8015	194,12	62,34995	96,56765394
phbC (NC_014323 3413761..3415728)	-3,106514984	0,03794	274,1532	280,7704	74,78136	103,850824
Hsero_2576	-3,255230383	0,042811	159,3337	261,1255		105,6687139
Hsero_2975	-2,166843948	0,015711	316,2041	261,0298	156,9478	109,4460829
Hsero_4221	2,944373708	0,030834	29,10995	43,25503	102,8723	110,1972234
Hsero_1727	-2,548528373	0,023905	219,1259	264,0092	77,85958	111,7145868
FlgN	-2,086187287	0,01966	117,1743	196,1001	38,13941	112,0266262
Hsero_1337	-2,314057447	0,000814	188,0074	236,6163	67,29021	116,2072717
Hsero_0666	4,45448461	0,036848	41,03808		132,5485	117,969302
UbiD	-2,072536499	0,047238	117,5716	211,9948	38,63551	120,380454
Hsero_1291	-2,301842261	0,024489	239,4505	272,4209	100,2729	122,1017074
cheA (NC_014323 3397177..3399471)	-3,121203277	0,053415	332,7453	409,7495	101,6606	136,2267898
Ndk	-2,311974782	0,016261	254,7911	309,6565	98,72939	145,4115268
Hsero_3929	-2,132248818	0,015566	277,8874	305,0671	126,8949	146,5040259
Hsero_0869	-3,833705331	0,049233	427,349	535,3264	99,13519	151,9731671
Hsero_4192	-2,172275105	0,012312	295,8096	334,232	129,0958	160,9419
dacC (NC_014323 1865983..1867284)	-2,371352971	0,022981	262,7087	361,7158	88,67685	174,6430922
Hsero_1200	-2,256980284	0,015621	131,044	310,7976		184,7405311
ilvC (NC_014323 1965824..1967041)	-2,924935339	0,040775	662,0577	662,1682	254,2605	198,4763522
marR (NC_014323 2100659..2101321)	-2,01400865	0,015574	226,594	340,6993	80,28996	201,3837397
Hsero_2720	59,38949156	0,009619			206,9753	203,0688495
cirA (Hsero_2337)	27,30454748	0,023959			205,6337	217,2300318
CoxG	-3,082853954	0,044933	302,1377	512,5796	46,37344	217,9002934
Hsero_3596	-3,106311108	0,034523	411,5078	617,3656	81,61629	249,6040381
IhfA	-2,135852076	0,013616	476,8508	525,5369	216,0161	253,2990761
Atpl	-2,15090343	0,045295	540,0258	595,0351	214,7095	313,00401

Phd	-2,311905269	0,036254	436,2508	643,7573	147,2913	319,859346
trnG (NC_014323 2200884..2201160)	-2,691690497	0,042329	1206,243	967,3697	477,7167	329,8102021
Hsero_4343	-2,632558552	0,002136	320,9136	660,9682		357,537151
Hsero_3609	-2,542552833	0,001234	570,0176	809,5356	150,7229	391,8629066
Hsero_3198	-2,688400659	0,053087	481,7015	846,9323	99,36137	394,8483786
phoH (NC_014323 2340975..2342876)	-2,357726419	0,00195	425,84	748,4214	86,69766	411,3505482
Hsero_4228	2,0392118	0,028009	225,7937	226,0224	450,2245	471,1240841
RpsT	-3,04487851	0,012921	2145,468	2185,073	720,833	701,4048527
Hsero_3347	2,288199786	0,037268	927,6996	724,524	2054,267	1726,350508
Hsero_2091	-3,971999017	0,019933	66,45256	37,7706	26,23947	
fnr (NC_014323 2710569..2711588)	-2,05891998	0,030434	58,3864		38,81741	
Hsero_2174	1,7977E+308	0,027836	27,6793	30,21219		
Hsero_1600	1,7977E+308	0,000515	32,22675	32,27894		
Hsero_2303	1,7977E+308	0,01266	179,3655	186,6453		
YjgH	1,7977E+308	0,015721	315,9538	331,9568		

Tabla A5. Genes con expresión diferencial (fold-change) entre las condiciones con quelante (+DP) y con quelante y dicitrato férrico (+DPCF), el p-valor del test estadístico y la cobertura del gen en RPKM. x1: réplica biológica 1. x2: réplica biológica 2.

Locus tag	Fold Change	P-valor	RPKM +DP x1	RPKM +DP x2	RPKM +DPCF x1	RPKM +DPCF x2
ugpE (NC_014323 2984716..2985813)	-35,5393	0,018144	69,68267	75,75422		
Hsero_0916	-34,4269	0,03084	31,85079	37,09928		
Hsero_2720	-6,83983	0,018407	229,1594	214,9199	45,06552	
Hsero_4101	-6,50503	0,039189	108,6156	110,1011		
Hsero_0945	-6,458	0,002621	47,97141	47,29995		
Hsero_2344	-5,41918	0,038402	70,65686	61,21059		
cirA (NC_014323 2645150..2647849)	-4,99853	0,035864	179,8466	186,2799	41,66513	31,58168
Hsero_3023	-3,96718	0,042778	63,36213	55,35238		
napH	-3,426	0,016701	95,26243	82,39995	30,70921	
ftsL	-3,42054	0,029225	43,0962			
Hsero_3249	-3,39707	0,051749	66,4712	74,52115		
nfnB (NC_014323 4959719..4960513)	-3,32091	0,038811	41,71891	28,78231		
Hsero_4705	-3,26797	0,031831	43,32349	44,48175		
Hsero_2571	-3,16882	0,052448	28,17268	39,56041		
ptxS	-2,82845	0,01499	58,55445	66,22317		
era	-2,53842	0,036359	59,75546	58,83354	25,87442	
Hsero_0946	-2,16298	0,001725	74,10274	55,32394	39,40231	
Hsero_3495	-2,12671	0,003231	47,70164		29,82404	
Hsero_3136	-2,12648	0,038468	39,96334	46,92104		
Hsero_2903	-2,01247	0,031908	53,64343	90,84066		52,6727
trnL (NC_014323 2111273..2111558)	2,019674	0,025174	487,2611	379,0635	911,4708	838,2225
hisI	2,026757	0,050344	47,25366		73,79305	39,99876
rrsC	2,068987	0,033877	81,88621	321,1977	285,8563	548,1188
Hsero_3308	2,114135	0,006687			26,24852	28,24581
ilvC (NC_014323 1965824..1967041)	2,134969	0,022387	226,1223	170,7115	459,2418	387,986
tsr (NC_014323 3998624..4000453)	2,15785	0,001172				42,31165
ubiB	2,206898	0,014788			41,81395	34,12086
purH	2,228645	0,040214			36,17319	39,87507
prfB	2,243621	0,016693	133,2801	88,98937	275,1144	223,574
Hsero_3511	2,243993	0,020521	47,22703	77,01298	126,9957	151,7981
sdhA	2,355435	0,037252	47,63938	41,99211	111,9428	99,17834

groES1	2,372555	0,042506	604,5811	165,02	1168,058	657,8632
ilvA (NC_014323 4472109..4473836)	2,417593	0,005574				38,96579
phbA2	2,419698	0,035055	202,771	161,5544	475,642	405,9154
Hsero_2930	2,425334	0,024847	385,8982	198,9645	818,9871	599,5004
typA	2,439089	0,048802	128,9926	105,6724	310,8139	261,5551
gpmA	2,563566	0,035188	37,66936	54,84581	113,9979	123,1709
Hsero_1984	2,584522	0,027354	106,8678	54,67262	229,3474	188,1573
atpD	2,598594	0,002692	505,3154	218,0075	1085,91	793,7124
Hsero_4166	2,76984	0,037251	29,44997		64,42099	51,85126
ihfB	2,794399	0,031862	863,6221	480,3843	2009,063	1746,627
Hsero_4192	2,826639	0,037608	83,16132	113,9132	252,5081	304,5504
rpoB	2,833359	0,017877	165,3549	59,33128	365,5349	271,0818
guaA	2,867071	0,039793	36,94904	30,12635	103,4854	88,82447
smc	2,895666	0,022628	26,6348		64,80207	47,79654
Hsero_3153	2,910861	0,008534				27,77871
atpE	2,948348	0,026051	228,5258	158,379	590,0063	550,7238
petC	2,988664	0,031129	316,8576	213,1382	818,0605	765,9187
fusA (NC_014323 129448..131754)	2,998451	0,014289	176,2429	53,15525	410,609	277,2299
rsuA (NC_014323 4136780..4138663)	3,012559	0,021523	45,33197	30,89308	119,4415	110,191
fabF1	3,044507	0,044749	281,8419	142,6341	746,3152	546,0048
rpsJ	3,0543	0,03594	258,2496	100,2683	605,6896	489,3316
Hsero_3091	3,082388	0,007408		25,71237	58,45391	69,4038
gltB	3,169784	0,024028	50,67913		130,2781	93,8279
rpmE	3,182556	0,028258	284,624	437,6136	1107,793	1190,768
Hsero_0004	3,19182	0,049879	62,01038	40,44806	183,1112	143,9177
Hsero_3963	3,273031	0,017621	72,33631	56,32258	222,6075	198,497
leuB	3,329432	0,01391	85,20273	31,05714	217,6533	169,4261
infB	3,349658	0,030779	118,8819	63,71634	343,7833	267,8583
rplA	3,360456	0,046781	318,5079	88,11078	763,082	603,3421
Hsero_0192	3,394365	0,053725		32,63182	55,51217	74,65917
pstS	3,40012	0,027952			27,88864	
Hsero_2703	3,43589	0,011426			42,63666	37,87276
Hsero_3561	3,475467	0,039262		25,6753	42,85072	60,06323
Hsero_3161	3,492093	0,025738	238,4064	183,2412	742,5461	729,8864
ribF	3,659712	0,045787		33,50902	94,50734	115,2032
cheZ (NC_014323 3549193..3550134)	3,817634	0,017397	32,49389	37,53295	133,8456	133,4913
Hsero_3613	3,855468	0,051809			68,51514	51,9931
dadX	3,866254	0,015613			43,92742	35,04892
Hsero_4073	3,877109	0,011816		26,15632	77,86846	85,73116
Hsero_2978	3,902879	0,022849			37,53478	59,89668
trnK (NC_014323 2023789..2024065)	3,914295	0,032326	470,8377	286,0408	1629,771	1332,875
glnA	3,924191	0,001291	79,62696	56,56721	278,352	256,1
dalR	3,926233	0,00976			41,57808	59,7911
obgE	3,943873	0,038498	42,79189		110,7373	83,04721
accB (NC_014323 424682..425356)	3,984211	0,020921			38,37457	26,6247
ftsX	4,037892	0,042567			35,01687	38,91552
Hsero_1222	4,07795	0,038142			67,26011	74,14335
aroG	4,116641	0,003503	113,0028	40,76844	351,309	281,7119
copZ	4,123637	0,019139	260,5251	119,1618	835,6945	729,9964
Hsero_3572	4,364691	0,03768		44,16254	127,8361	142,0097
Hsero_2724	4,372609	0,045054	259,0757	66,45659	769,1079	654,3176
atpB	4,374726	0,038559			90,22743	89,98861
cyoA	4,387882	0,03384	105,7008	64,1788	378,1557	367,2557
rpmA	4,644664	0,030848	637,0157	127,0124	1961,81	1586,844

rplM	4,666871	0,02255	710,946	161,8449	2254,447	1818,755
Hsero_1438	4,728173	0,045217			40,39777	35,35727
rpsC	4,750668	0,04643	1246,525	177,3775	4111,917	2652,574
rpsT	4,862114	0,028395	692,9421	720,6951	3544,595	3328,671
adhA	4,895083	0,004345	198,4829	47,44834	674,1748	529,6789
Hsero_3789	4,935422	0,038673	90,19691	70,91543	426,5013	368,6561
cysG	4,968113	0,001859			28,0551	
Hsero_2951	5,025988	0,015374	49,77736		184,0591	143,3045
Hsero_2434	5,062185	0,011359	985,7269	658,1923	4384,259	3937,565
gltD	5,079439	0,04076	130,1595		400,0774	318,1363
phaC (NC_014323 278152..279483)	5,112035	0,031065			55,76241	44,66038
rplW	5,113106	0,023831	100,8403	28,07513	356,0326	303,1258
Hsero_2095	5,148627	0,013151			39,43199	52,43682
gidB	5,176017	0,03558	39,0429	83,77256	281,1355	354,5594
petA	5,200188	0,012352	214,1759	123,2668	909,0858	845,6797
Hsero_1694	5,335368	0,010506	30,76695		101,2211	75,09933
nuoF	5,41942	0,006184	98,78853		314,9619	220,4146
cyoB	5,558479	0,029982	46,24433	25,45105	217,357	181,1603
nadA	5,629201	0,049024			97,3484	79,51396
rpsD	5,728746	0,013416	168,5309		593,6599	415,1425
phnA	6,028059	0,048029	49,63759	111,7796	486,1192	486,9133
nuoE	6,141799	0,009964	110,541		390,2822	288,6381
rplO	6,242851	0,04165	156,4952		639,3065	439,7949
kdtA	6,527553	0,00508			92,26235	78,44169
pheT	6,776334	0,002673	33,46333		201,6213	191,2681
prsA	6,869138	0,019742	84,12371	37,90508	453,334	384,8986
rrsA	6,937507	0,050704	583,5315	3287,765	12993,77	13863,38
thrS	7,061785	0,045365	137,7985	120,2383	975,7055	846,4945
tpiA	7,115318	0,040779		67,79405	294,7483	311,6771
cheB (NC_014323 684976..686322)	7,262001	0,019802			142,8653	131,6548
ubiF	7,352973	0,002426	36,9731		217,5655	202,0716
parA	8,446216	0,043551			32,42757	36,96199
Hsero_1268	8,663543	0,014295			34,22519	39,70759
nuoM	8,736277	0,002601	58,01326		309,8974	261,3227
nuoI	9,323922	0,011116	61,02037		370,4949	310,9129
Hsero_4241	9,713894	0,002181			109,0735	110,6933
flhB (NC_014323 2288741..2290117)	9,778725	0,043521			67,01485	61,13183
Hsero_2379	9,835181	0,002719	29,74019		236,2554	225,4954
rpml	9,850776	0,031765	416,1409	146,16	2780,274	2758,825
cheW (NC_014323 683556..684341)	10,02062	0,039181		34,40544	164,7418	180,022
Hsero_2716	10,05213	0,002087			158,3355	165,0944
prfC	10,06583	0,01855			47,03884	40,65909
Hsero_3148	11,09028	0,042484	46,71235		382,3781	309,2614
flgB	11,66813	0,013223			64,3617	74,8899
Hsero_3266	11,70535	0,0451			225,4685	202,5243
Hsero_2384	12,83732	0,011087			41,61506	47,10108
Hsero_3606	12,99349	0,033854	29,33022		263,7415	272,726
Hsero_2092	13,00411	0,029669			88,56774	69,59594
Hsero_4412	13,24202	0,017357			49,47984	60,56453
cydA	14,62228	0,034023			163,8161	182,4233
ompW1	15,87645	0,037195		32,77703	378,0317	436,9205
Hsero_3071	18,37917	0,03748			51,11554	50,98024
fixN	19,14374	0,034386	170,6013	40,83655	2192,442	1855,267
Hsero_2263	19,57486	0,017097	34,75846	47,96045	823,6414	795,57

lipB	21,71134	0,00116		144,8178	158,25
fixP	21,79897	0,002805	61,84619	930,0051	897,8462
Hsero_2914	22,5984	0,002452	26,26175	356,0257	336,7067
yhhJ	22,92006	0,00256		45,72685	42,22761
prfA	26,74066	0,012478		42,17032	37,67759
Hsero_2915	28,62933	0,020095	50,73576	872,0175	777,8999
Hsero_0985	29,53421	0,047309		30,30448	
Hsero_2510	30,10366	0,025495	25,16041	518,864	463,1239
qbdB (NC_014323 1020790..1021941)	32,69946	0,049511		52,7587	65,2866
narK1	39,37349	0,015721		51,39448	51,25844
crp (NC_014323 5394785..5395660)	44,32624	0,015554		52,69282	52,55335
ldhA	49,26069	0,048968		526,9228	447,498
Hsero_0041	57,93875	0,020666		309,5379	340,4066
Hsero_4259	61,70939	0,027329		28,97497	25,77413
Hsero_3256	1,8E+308	0,028077		26,8052	29,28037
Hsero_0562	12,63672	0,026567		41,71407	32,93623
Hsero_4460	89,02993	0,012752		52,69643	53,60809
Hsero_1013	1,8E+308	0,012147		54,63361	56,75938
mgtA	3,755732	0,043076	29,23866	84,63478	56,77854
aspS	5,570354	0,03483	25,48063	89,40108	58,3214
Hsero_2380	1,8E+308	0,036835		79,71436	70,98515
purM	3,192781	0,046129	35,84494	85,8774	71,22481
sdhB	19,92111	0,050447		67,89221	71,40592
phbC (NC_014323 2732256..2734229)	89,02681	0,029732		83,21496	89,24772
Hsero_2401	1,8E+308	0,00316		89,28524	90,17611
Hsero_3621	2,79631	0,050233	57,81666	136,6947	90,8886
Hsero_2403	92,42711	0,041059		146,1165	169,7105
nuoK	1,8E+308	0,025794		234,1875	215,9399
nuoG	6,538707	0,050852	78,39415	327,6752	217,2782
narX	25,65087	0,037803		223,5504	231,8145
Hsero_1829	27,97312	0,003098		238,8645	232,2095
Hsero_2400	34,86207	0,04125		195,2098	234,6301
Hsero_2366	1,8E+308	0,008448		941,4769	916,8145
rpsP	5,511171	0,009827	204,405	155,2462	1028,153
rpmJ	6,330442	0,023336	409,7999	26,46573	1615,186

