

# Informe final publicable de proyecto

## Nuevos actores involucrados en el establecimiento de la simbiosis entre rizobios y leguminosas

Código de proyecto ANII: FCE\_1\_2019\_1\_156520

Fecha de cierre de proyecto: 01/02/2024

**PLATERO LABRUCHERIE, Raúl Alberto** (Responsable Técnico - Científico)

**EASTMAN ROGÉ, Ignacio** (Investigador)

**ALONSO, Verónica** (Investigador)

**PARADA CABRERA, Olga Cristina** (Investigador)

**ARMAND UGÓN, Virginia** (Investigador)

**RODRÍGUEZ ESPERÓN, Maria Cecilia** (Investigador)

**BATTISTONI URRUTIA, Federico José** (Investigador)

**FABIANO GONZÁLEZ, Elena** (Investigador)

**FERREIRA OLIVERA, María Virginia** (Investigador)

---

MINISTERIO DE EDUCACIÓN Y CULTURA. INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS "CLEMENTE ESTABLE"  
(Institución Proponente) \\ FUNDACIÓN DE APOYO AL INSTITUTO CLEMENTE ESTABLE

## Resumen del proyecto

Las leguminosas son el segundo grupo más abundante de plantas de nuestro planeta. Formada por más 19000 especies, esta familia está ampliamente distribuida, desarrollándose en pastizales, bosques, bordes de ríos y arroyos y en zonas desiertas tanto en climas tropicales como templados. Muchas de las leguminosas tienen la particularidad de formar asociaciones simbióticas benéficas con bacterias del suelo conocidas como rizobios, durante la cual se realiza la fijación biológica del nitrógeno (FBN). Esta capacidad le permite desarrollarse con escaso aporte de nutrientes y de mejorar el suelo en el que crecen lo que ha llevado al empleo de leguminosas en sistemas productivos.

La eficiencia de la simbiosis formada por el par leguminosa-rizobio, depende en gran medida de la selección de rizobios adecuados. Esta selección es específica e involucra un complejo diálogo entre ambos organismos. Por lo tanto, entender los mecanismos implicados en el establecimiento de simbiosis efectivas nos permitiría hacer un uso consciente y eficiente de esta riqueza natural.

Nuestro país cuenta con más de 190 especies de leguminosas nativas. El estudio de los rizobios a los que están asociados mostró una gran diversidad. En particular, encontramos la presencia de un grupo de rizobios muy poco estudiados, pero ampliamente distribuidos en nuestro territorio. Estos rizobios pertenecen a los géneros *Paraburkholderia* y *Cupriavidus* y se conocen como Beta-rizobios. Estos hallazgos nos llevaron a comenzar una línea de investigación que busca entender los mecanismos implicados en la interacción entre leguminosas nativas y los beta-rizobios. Para esto, hemos desarrollado un modelo de estudio formado por la leguminosa *Mimosa pudica* y el rizobio autóctono *Cupriavidus* sp. UYMMa02A. Nuestros estudios nos han permitido identificar genes y proteínas bacterianas que nunca antes habían sido relacionados al establecimiento de relaciones simbióticas. En el presente proyecto propusimos estudiar en profundidad la función de estos genes y proteínas.

**Ciencias Naturales y Exactas / Ciencias Biológicas / Biología Celular, Microbiología / Microbiología Agrícola**

**Palabras clave: Cupriavidus / leguminosas / Fijación biológica de nitrógeno /**

### **Antecedentes, problema de investigación, objetivos y justificación.**

Las leguminosas son sin duda una de las familias vegetales con mayor importancia en nuestro planeta. Compuesta por más de 19000 especies, tienen una distribución cosmopolita y presentan gran variabilidad en su porte o hábito, encontrándose desde acuáticas hasta xerófitas, desde rastreras a trepadoras, desde árboles de gran porte a pequeñas hierbas anuales (1,2). Esta familia contiene especies que tienen una importancia fundamental para la economía humana siendo alimento tanto para el hombre como para el ganado. Entre estas se encuentran especies como soja, maní, poroto, garbanzo, lentejas, alfalfa, lotus, vicia, etc.

Una de las características más sobresalientes de esta familia de plantas es su capacidad de formar asociaciones simbióticas con bacterias del suelo conocidas como rizobios. Como parte de esta asociación se forman unas estructuras características, llamadas nódulos, en las raíces o tallos de las leguminosas hospederas, dentro de los cuales se lleva a cabo el proceso de fijación biológica de nitrógeno (FBN). Debido a que el nitrógeno es un elemento esencial para el desarrollo de todos los seres vivos, la capacidad de fijar nitrógeno otorga a las leguminosas una ventaja a la hora de colonizar suelos pobres, por lo que estas plantas han sido frecuentemente utilizadas como abono verde, para la recuperación de ambientes degradados, así como para la fitorremediación, además de su clásico uso como alimento (3,4).

La FBN es un proceso fundamental durante el cual el nitrógeno atmosférico gaseoso es reducido a formas orgánicas asimilables por los seres vivos. La capacidad de realizar la FBN es exclusiva de bacterias y arqueas y se encuentra distribuido ampliamente a nivel filogenético. Las asociaciones simbióticas entre rizobios y leguminosas son responsables de introducir en los ecosistemas terrestres entre 50 y 80 millones de toneladas de nitrógeno a través de la FBN, siendo por lejos el proceso más eficiente (5,6).

Los rizobios, contrariamente a la gran diversidad de microorganismos capaces de realizar FBN, abarcan un grupo reducido de bacterias clasificados dentro de las subdivisiones alfa y beta de las proteobacterias (7,8). Históricamente los primeros rizobios descritos y los más estudiados hasta la fecha, pertenecían todos a las alfa-proteobacterias, recién en el año 2001 se describieron los primeros representantes pertenecientes al grupo de las beta-proteobacterias, acuñándose los términos alfa-rizobio y beta-rizobios desde ese momento (9,10). Mientras que los alfa rizobios comprenden más de 50 especies, distribuidas en 9 géneros, hasta el momento solamente se han descrito 3 géneros de beta-rizobios (*Trinickia*, *Paraburkholderia* y *Cupriavidus*) de los que se han descrito unas pocas especies (11,12). La mayor parte de los beta-rizobios descritos están

asociados a leguminosas pertenecientes a las Mimosoideas, incluyendo a más de 50 especies de mimosas (11), sin embargo, se han descrito beta-rizobios capaces de formar asociaciones simbióticas efectivas con especies de importancia agronómica mundial tales como poroto (13–15) y soja (16).

En nuestro país, la presencia de beta-rizobios asociados a leguminosas fue reportada por primera vez por nuestro grupo de investigación (17). A partir de este trabajo realizamos muestreos de nódulos de leguminosas nativas en diferentes partes de nuestro país encontrando una gran variedad de especies de leguminosas naturalmente noduladas por beta-rizobios (18–20). En este momento disponemos en el laboratorio una colección de 60 cepas de los géneros *Cupriavidus* y *Paraburkholderia* aisladas a partir de nódulos de 20 especies distintas de leguminosas nativas. Interesantemente y contrariamente a lo observado en Brasil, la gran mayoría de las bacterias aisladas a partir de nódulos obtenidos de mimosas nativa pertenecen al género *Cupriavidus* (21). Mas aún ninguna de las cepas de *Cupriavidus* aisladas pertenece a la especie *C. taiwanensis* sino que estarían más emparentadas con otras especies del género *Cupriavidus* tales como *C. necator* y *C. pinatubonensis*, sugiriendo que la diversidad de especies de *Cupriavidus* simbióticos sería mayor a la pensada y que nuestro país podría ser un sitio de origen de diversidad para este género bacteriano.

Si bien se han realizado importantes avances en el estudio de la diversidad y distribución de beta-rizobios, la mayor parte de los conocimientos que poseemos sobre el establecimiento de la simbiosis entre rizobio y sus leguminosas hospederas provienen de modelos en los que se han empleado alfa-rizobios (22,23). En este sentido el modelo simbiótico beta-rizobio-leguminosas abre una nueva perspectiva en el estudio del establecimiento de simbiosis entre microorganismos y hospederos eucariotas. En los últimos años, nuestro grupo de investigación, así como otros, hemos abordado el estudio de la los mecanismos implicados en este tipo de simbiosis empleando una abordaje genómico-funcional. Como primer paso se han secuenciado los genomas de diversos beta-rizobios (24–28), estableciéndose como modelos para estudiar los cambios que ocurren en el simbiote microbiano en distintas etapas de la interacción. En una segunda etapa se han seleccionado diversos modelos microbianos para su estudio. Nuestro grupo emplea como modelos las cepas de *Cupriavidus necator* UYPR2512 (17) y la cepa de *Cupriavidus* sp. UYMMa02A (21) empleando aproximaciones de transcriptómica, proteómica y metabolómica, tanto en vida libre como durante su interacción con la leguminosa hospedera *Mimosa pudica* (29,30). A nivel mundial, cabe destacar los trabajos realizados por los grupos liderados por la Dra. Gabrielle Pessi y el Dr. Lionel Moulin, empleando los modelos *Paraburkholderia phymatum* durante su interacción con *Phaseolus vulgaris* (31,32) y *Cupriavidus taiwanensis* con *Mimosa pudica* (33) respectivamente. Todos estos trabajos han permitido identificar diversos genes y proteínas que estarían involucradas en la interacción simbiótica entre beta-rizobios y leguminosas hospederas. El próximo paso es profundizar en el estudio de cada uno de estos genes, proteínas y vías metabólicas identificados, si queremos determinar su rol e importancia en la interacción simbiótica.

A través del proyecto FCE\_1\_2014\_1\_104338 "Genómica funcional de la interacción *Cupriavidus*-*Mimosa*", hemos determinado, mediante el empleo de aproximaciones ómicas, un importante número de genes y proteínas expresados diferencialmente por la cepa UYMMa02A cuando la misma es expuesta a la presencia de flavonoides inductores de los genes *nod* o cuando es cultivada en presencia de su planta hospedera, *Mimosa pudica* (30,34). Por su parte mediante el proyecto FCE\_1\_2017\_1\_156520 "Análisis de la proteostasis de un beta-rizobio durante el establecimiento de la simbiosis con su hospedero mediante ribosome profiling y proteómica de alto rendimiento" pudimos definir un importante conjunto de genes y proteínas de la cepa UYMMa02A expresados diferencialmente en presencia de exudados de la planta hospedera *Mimosa pudica*. Estos genes, proteínas y vías metabólicas son la base de la presente propuesta.

Nuestra hipótesis de investigación es que los genes, proteínas y vías metabólicas inducidos o reprimidos en presencia de flavonoides, exudados radiculares o durante el co-cultivo UYMMa02A-*Mimosa pudica*, tienen un rol en el establecimiento de simbiosis efectivas entre beta-rizobios y leguminosa hospederas. Por lo tanto, entendemos que el esclarecimiento de la función e importancia de estos genes, tanto en vida libre como durante las distintas etapas de la interacción, contribuirá a un mejor entendimiento de los mecanismos subyacentes al establecimiento de simbiosis benéficas eficientes entre beta-rizobios y leguminosas hospederas.

Considerando estos antecedentes, el objetivo general de este proyecto fue la identificación y caracterización de genes, proteínas y vías metabólicas importantes en el establecimiento de relaciones simbióticas eficientes entre beta-rizobios y leguminosas. Como objetivos específicos propusimos i) Obtención de mutantes en genes expresados en distintas etapas de la interacción rizobio-leguminosa; ii) Determinar la importancia de los genes seleccionados durante la vida libre de *Cupriavidus*; iii) Determinar la importancia de los genes seleccionados durante la interacción *Cupriavidus*-*Mimosa* y iv) Estudiar la dinámica de la expresión de genes involucrados en la interacción rizobio-leguminosa.

## **Metodología/Diseño del estudio**

El objetivo principal de esta línea de investigación es la identificación y caracterización de genes, proteínas y vías metabólicas

importantes en el establecimiento de relaciones simbióticas eficientes entre beta-rizobios y leguminosas hospedadas. Uno de nuestros modelos favoritos es la cepa UYMMa02A perteneciente al género *Cupriavidus* y su planta hospedera *Mimosa pudica*. UYMMa02A fue originalmente aislada de nódulos de *Mimosa magentea* (21), una leguminosa nativa (35) que crece naturalmente en el paraje de Abra de Zabaleta en el Departamento de Lavalleja, Uruguay. El análisis filogenético de esta cepa, mostró que forma un clado separado al de las especies conocidas para este género, sugiriendo que se trata de una nueva especie de *Cupriavidus* (21). La secuenciación de su genoma (24) y análisis de identidad nucleotídica con especies cercanas (ANI) permitieron comprobar esta hipótesis, por lo que se está en proceso de proponer un nombre para esta especie de rizobio nativo (Sandes et al., en preparación). Posteriormente se encontraron cepas pertenecientes a esta nueva especie, asociadas a diversas leguminosas nativas del género *Mimosa* en distintas partes de nuestro país (19–21), sugiriendo que esta especie se encuentra adaptada a las condiciones climáticas y edáficas de nuestro territorio, valorizando aún más su estudio. Decidimos utilizar la cepa UYMMa02A para profundizar el estudio de la interacción entre beta-rizobios y plantas hospedadas. En este sentido, la leguminosa *Mimosa pudica* constituye un buen modelo ya que es una planta nativa de Sudamérica, tiene un rápido crecimiento, se adapta a condiciones gnotobióticas y hay semillas comerciales, además su genoma ha sido publicado (36).

Empleando aproximaciones ómicas, hemos descrito genes y proteínas expresados diferencialmente por la cepa UYMMa02A cuando la misma es expuesta a la presencia de flavonoides inductores de los genes *nod* o cuando es cultivada en presencia de una planta hospedera (30). Es así que, para poder determinar la importancia de estas moléculas en la interacción simbiótica, propusimos estudiar la función específica de estos genes y establecer su participación en la formación de asociaciones simbióticas eficientes con plantas hospedadas. Para poder cumplir con estos objetivos, propusimos en primer lugar corroborar la expresión diferencial de los genes identificados, en segundo lugar, generar una colección de cepas derivadas de UYMMa02A en la que la expresión de estos genes esté modificada (silenciados o sobreexpresados) y, en tercer lugar, evaluar el efecto de estos cambios en la vida libre de la bacteria y en las diferentes etapas del establecimiento de la simbiosis.

Para corroborar la expresión diferencial de los genes y proteínas identificadas, empleamos la técnica de Real-timePCR (RT-qPCR). Para la generación de la colección de mutantes se utilizó un sistema de doble recombinación que permite quitar fragmentos de ADN sin dejar huellas (37,38). Debido a que este método no fue tan eficiente como pensábamos, decidimos implementar una metodología basada en el sistema CRISPR-Cas9 para bacterias gram-negativas (39). Para esto, enviamos al Bach. Ignacio Eastman a una pasantía de entrenamiento en el laboratorio de Microbiología Sintética Medioambiental del Centro Nacional de Biotecnología (CNB), del Consejo Superior de Investigación y Ciencia (CSIC), España. Para estudiar el efecto de la sobreexpresión de los genes seleccionados, estos se clonaron en el vector pSEVA238, replicable en *Cupriavidus* spp., de forma que la expresión de estos genes quedó bajo el control del promotor *meta*, inducible en presencia de 3-metil-benzoato (40).

El fenotipo de las mutantes obtenidas fue evaluado mediante ensayos de interacción con plantas en condiciones controladas (17,41,42). Para esto se utilizaron plantas de *Mimosa pudica*, *Mimosa polycarpa*, *Mimosa uraguensis* y de la hospedera original, *Mimosa magentea*. Se cuantificó la capacidad de colonización radicular, la tasa de nodulación, el número y peso de nódulos por planta y la capacidad de promover el crecimiento vegetal mediante la cuantificación del peso seco de las plantas inoculadas con las cepas modificadas, respecto a la cepa salvaje, utilizando protocolos descritos (17,37,43). Para la caracterización *in vitro* de las cepas modificadas, se realizaron curvas de crecimiento en medio de cultivo ricos y medios definidos usando diversas fuentes de carbono, así como su crecimiento en presencia de metales. Además, se caracterizó la sensibilidad de las cepas mutantes a especies reactivas de oxígeno y crecimiento en condiciones de estrés ácido y alcalino, empleando protocolos rutinariamente utilizados en nuestro departamento (41,42,44,45). Para determinar la expresión temporal de los genes en presencia de exudados radiculares, se evaluó su expresión mediante RT-qPCR.

## Resultados, análisis y discusión

1) Confirmación de la expresión diferencial de genes involucrados en distintas etapas de la interacción bacteria-planta.

El primer paso del proyecto consistió en verificar la expresión diferencial de los genes bacterianos seleccionados en presencia de exudados radiculares de la leguminosa hospedera *Mimosa pudica*. Para esto, en primer lugar, seleccionamos genes de referencia útiles para la técnica de qPCR en la cepa *Cupriavidus* sp. UYMMa02A (Tabla 1, anexo). Usando como molde el mismo ADNc que fuera utilizado para el análisis de expresión mediante secuenciación masiva en el proyecto FCE\_1\_2017\_1\_156520, logramos confirmar la expresión diferencial de 20 genes seleccionados (Figura 1, anexo). Estos resultados permiten validar los resultados obtenidos anteriormente, aportando nuevas evidencias sobre la participación de estos genes en las primeras etapas de la interacción rizobio-leguminosa.

2) Obtención de mutantes en genes bacterianos seleccionados

Una vez confirmada la expresión diferencial de 20 de los genes seleccionados, procedimos a la construcción de los plásmidos

mutagénicos, necesarios para la construcción de las mutantes por reemplazo. La técnica para la obtención de mutantes había sido puesta en práctica previamente en nuestro laboratorio, observándose qué, aunque con baja eficiencia, permite la obtención de mutantes en genes blanco en la cepa UYMMa02A (34).

### 2.1 Construcción de plásmidos mutagénicos

Con la finalidad avanzar en la descripción de los mecanismos moleculares de la interacción UYMMa02A-Mimosa pudica, se construyeron 20 plásmidos mutagénicos (Tabla 1, anexo), dirigidos a genes expresados diferencialmente en distintas etapas de la interacción, así como genes involucrados en la interacción rizobio-leguminosa en otros modelos.

### 2.2 Obtención de mutantes por recombinación

Durante el proyecto FCE\_1\_2014\_1\_10438 se logró obtener una mutante en la que se eliminó el gen *nodD* empleando la técnica propuesta. En el presente proyecto intentamos reproducir los resultados obtenidos y hacer más eficiente el proceso ya que se tenía como objetivo generar mutantes en todos los genes seleccionados. Una vez construidos y secuenciados los plásmidos mutagénicos, se generaron las co-integraciones, en las que los plásmidos son insertados, mediante recombinación dirigida, en el genoma de UYMMa02A. Esta etapa no representó mayores dificultades y se obtuvieron todas las cepas recombinantes buscadas. La siguiente etapa consiste en introducir un segundo plásmido, quien expresa la nucleasa ISce-I, encargada de generar un corte en la doble hebra del ADN y de esta forma estimular la doble recombinación que llevaría a la generación de las mutantes buscadas. Tenemos en nuestro laboratorio varios plásmidos que expresan la nucleasa bajo la influencia de distintos promotores. En los plásmidos pSWGm y pSEVA638-S, el gen de la nucleasa está bajo el control del promotor meta, el cual se induce en presencia de 3-metil-benzoato (37,38). Como forma de optimizar la concentración de inductor a utilizar, así como analizar la cinética de inducción génica en UYMMa02A, empleamos el vector pF001 (46), en el cual el gen *gfp* está bajo el control del promotor meta en el plásmido pSEVA238 (40). Estos ensayos nos permitieron definir que al usar una concentración de 1μM de 3MB, se logra la inducción de la expresión del gen bajo la acción del promotor meta con una cinética lineal entre las 5 y las 25hs (Figura 2, anexo).

Siguiendo con este protocolo se logró obtener una mutante en el gen *arsR*, el cual codifica para un posible factor de transcripción que regula la expresión del operón *ars* (Figura 3, anexos). Este segundo caso de éxito demuestra que el protocolo generado funciona, sin embargo, a pesar de haber invertido importantes esfuerzos, no fuimos capaces de obtener las demás mutantes propuestas mediante este mecanismo. Esto nos motivó a explorar un mecanismo alternativo para la obtención de mutantes usando un sistema de recombinación asistido llamado Recombineering /CRISPR-Cas9 (39).

### 2.3 Puesta a punto de un protocolo para la obtención de mutantes por Recombineering /CRISPR-Cas9.

Debido a la baja eficiencia en la obtención de mutantes usando el sistema de recombinación homóloga, decidimos intentar poner a punto una nueva técnica de edición de genomas. En este caso nos basamos en el protocolo desarrollado por Aparicio y colaboradores (39) y enviamos al estudiante de posgrado Ignacio Eastman a formarse en el Laboratorio de Biología Sintética Ambiental del Centro Español de Biotecnología, CSIC, España. Los resultados obtenidos muestran que el sistema de recombineering es funcional en nuestra cepa, puesto que fue posible la obtención de mutantes puntuales (cambio de una base por otra) evidenciado por la obtención de cepas resistentes a la estreptomina. De forma complementaria, el sistema Cas9 también fue validado en nuestra cepa, ya que su uso genera un corte en el ADN letal para la cepa. Sin embargo, no fue posible combinar ambas metodologías para lograr cepas con la delección de genes completos.

Por lo tanto, decidimos hacer un cambio drástico en la estrategia y en lugar de seguir intentado la obtención de mutantes, nos propusimos estudiar el efecto de la sobreexpresión de los genes seleccionados.

### 2.4. Construcción de plásmidos de sobreexpresión.

Como alternativa a la construcción de mutantes, decidimos evaluar el efecto de la sobreexpresión de los genes previamente identificados, en el fenotipo de la cepa UYMMa02A. Para esto utilizamos el plásmido pSEVA238, el cual tiene un origen de replicación funcional en *Cupriavidus sp.*, porta un gen de resistencia a la Kanamicina (Km) y tiene la posibilidad de regular la expresión de genes que se clonen delante del promotor meta en el sitio de clonado múltiple (40). Para asegurar la expresión de los genes clonados, colocamos delante del ATG de inicio de cada gen, una secuencia de unión a ribosomas (RBS) canónica (Figura 4). Siguiendo este protocolo logramos generar 6 vectores conteniendo diferentes genes seleccionados: *nodD*, *arsR*, *uspA*, *acr3*, *pvsE* y *ppiD* (Tabla 3 y figura 5).

## 3) Ensayos de colonización radicular

El efecto de las mutaciones en los genes reguladores *nodD* y *arsR* en la colonización radicular de plantas de *Mimosa pudica* fue

evaluada mediante ensayos de competencia con la cepa salvaje. En estos ensayos las plantas fueron inoculadas con cada cepa por separado, así como en mezcla 50:50 (wt:mutante). A distintos tiempos post-inoculación, se cuantificaron las bacterias adheridas a las raíces en placas con medio sólido (Figura 7). Para facilitar la identificación de las cepas, las mismas fueron marcadas con el transposón mTn7-gfp (47). De esta forma, es posible cuantificar las colonias que corresponden a cada cepa, contando las colonias bajo luz UV (Figura 7). Los resultados obtenidos indican que la capacidad de colonización de las raíces de *Mimosa pudica*, no se ve afectada por las mutaciones en los genes *nodD* ni *arsR*.

#### 4) Ensayos de nodulación

Para evaluar el fenotipo de las cepas mutantes se realizaron ensayos de nodulación en los que se evaluó la velocidad de nodulación (número de nódulos en función del tiempo) (Figura 8, anexos), así como la promoción del crecimiento vegetal cuantificada mediante la altura y peso seco de las plantas inoculadas (Figura 9). Como controles se usaron plantas no inoculadas y plantas inoculadas con la cepa salvaje. También se realizaron ensayos de competencia empleando cepas marcadas. En este caso se usaron las variantes del mTn7-gfp y mTn7-cherry para marcar una u otra cepa (Figura 10a). Para evaluar la competencia, las plantas se inocularon con mezclas 50:50, 90:10 y 10:90 de las cepas a ensayar. Se recuperaron los nódulos 30 días post-inoculación y se colocó una gota de una dilución de su contenido en la superficie de placas de Petri con medio YMA para su identificación (Figura 10b). Los resultados obtenidos (Tabla 3) muestran por un lado que la presencia del mTn7-cherry tuvo un peso metabólico mayor que el mTn7-gfp. Esto se evidenció en el cambio de proporciones observadas entre los datos de competencia A y B mostrados en la tabla 3 (anexos). Al utilizar el transposón con que codifica la proteína Cherry, la cepa perdió capacidad de competencia

#### 5) Caracterización fenotípica de las mutantes

Además del fenotipo en planta expuesto en los párrafos anteriores, el fenotipo de las cepas mutantes UYMMa02A::?nodD y UYMMa02A::?arsR así como el de las cepas que sobreexpresan los genes *nodD*, *arsR*, *uspA*, *acr3*, *pvsE* y *ppiD* fue evaluado in vitro mediante curvas de crecimiento en medio líquido, la capacidad de formación de biofilms, la capacidad de nado (Swimming) y la resistencia a metales pesados.

Para la mutante ?nodD, los resultados obtenidos muestran un aumento en la capacidad de nado, junto a una concomitante disminución de la capacidad de formar biofilms (Figura 11). Este defecto no se reflejó en la cinética de nodulación, en el número de nódulos formados ni en la capacidad de promoción del crecimiento vegetal en *M. pudica*. Por su lado la mutante ?arsR mostró un aumento en sensibilidad al arsénico, un fenotipo inverso al esperado debido a su función como represora de un sistema de detoxificación de este metal (Figura 12).

#### 6) Complementación de mutantes seleccionadas

Los plásmidos sobreexpresantes también fueron usados para complementar a las mutantes ?nodD y ?arsR. Para esto los plásmidos pSEVA238-nodD (pNodD) y pSEVA238-arsR (pArsR) fueron transferidos a las cepas UYMMa02A, UYMMa02A::?nodD y UYMMa02A::?arsR respectivamente. La efectividad de la complementación se corroboró mediante qPCR y ensayos in vitro. La cepa UYMMa02A::?nodD forma un halo de mayor tamaño que el formado por la cepa salvaje, cuando se crece en placas M9 conteniendo 0.2% de agar. El aumento en la movilidad tipo swimming observado, indica que la mutación en el gen *nodD* afecta este tipo de movimiento. Tal como se espera, al introducir el plásmido pSEVA238-nodD en la cepa mutante, la movilidad es restaurada a niveles similares a los observados para la cepa salvaje, indicando que existe complementación mediada por el plásmido (Figura 11).

El efecto de sobreexpresión del gen *arsR* fue evaluado tanto en la cepa salvaje como en la cepa mutante ?arsR, mediante la introducción del plásmido pArsR en ambas cepas. Como control se utilizaron las cepas conteniendo el vector parental vacío pseva238. La presencia multicopia del gen *arsR* provocó una serie de cambios en el comportamiento de ambas cepas, los cuales se manifestaron con mayor intensidad en el contexto génico de la cepa salvaje (Figura 13). En primer lugar, se observó un menor crecimiento de las cepas conteniendo el plásmido pArsR solo cuando las mismas fueron incubadas en presencia del inductor 3-metil-benzoato (3MB), indicando que la expresión aumentada de este regulador sería el responsable del fenotipo observado (Figura 13). En segundo lugar, observamos un aumento de la sensibilidad de las cepas a la presencia de cadmio (Figuras 15). Finalmente, también observamos un aumento de la sensibilidad a la presencia de NaCl (Figura 16). El hecho de que estos efectos se observen solamente en presencia del plásmido pArsR y cuando se incluye al inductor 3MB, podría sugerir que la sobreexpresión de este regulador transcripcional tiene efectos pleiotrópicos en el crecimiento de la bacteria. En este sentido es posible que un aumento en el número de copias de este regulador transcripcional genere una unión inespecífica al ADN, perturbando la expresión de genes no-blanco. Sin embargo, también es posible hipotetizar que exista una conexión entre el metabolismo del arsénico y otros metales. Estas y otras hipótesis serán analizadas en futuras investigaciones.

## 7) Dinámica de la expresión in vivo de genes posiblemente implicados en la interacción bacteria-planta

Con la finalidad de analizar el comportamiento de los genes seleccionados durante la interacción con la planta, decidimos determinar la dinámica de la expresión de los mismos en presencia de exudados. Para analizar la respuesta temprana, las bacterias fueron crecidas en medio M9 y luego se incubaron durante 30 minutos, 1 hora, 2 horas y 4 horas con exudados radiculares. Para analizar la respuesta a tiempos mayores: 8hs, 12hs, 24hs, las bacterias se crecieron directamente en M9 suplementado con exudados. A los tiempos indicados, se tomaron alícuotas de los cultivos, se lavaron y se extrajo el ARN total. Cada ensayo se realizó por cuatuplicado. Los niveles de expresión de los genes se cuantificaron mediante qPCR tal como fuera descrito en materiales y métodos.

Los resultados obtenidos muestran una dinámica de expresión que no refleja los resultados obtenidos previamente (Tabla 4). El resultado más llamativo fue que la mayor parte de los genes que habían sido seleccionados por su sobreexpresión en los experimentos de ARNseq (Figura 1), no mostraron cambios significativos en su expresión. De los genes que mostraron cambios significativos en su expresión (resaltados en verde en la tabla 4), mostraron un comportamiento inverso a lo determinado previamente. Tal es el caso de los genes *copB* y *copC*, los cuales se vieron reprimidos consistentemente durante todo el experimento. En este sentido es posible que ligeras variaciones en la obtención de los exudados radiculares provoquen cambios en su composición que a su vez se vea reflejado en cambios en la expresión génica. Será necesario profundizar en estas variaciones para poder sacar conclusiones robustas sobre el este comportamiento. De todas maneras, el hecho de que veamos cambios en la expresión de varios de los genes seleccionados (13/29) indica que están implicados en las adaptaciones de UYMMa02A al estímulo de los exudados radiculares y por ende en la interacción simbiótica con plantas hospederas.

## Conclusiones y recomendaciones

Los mecanismos moleculares subyacentes a la interacción entre beta-rizobios y leguminosas hospederas han sido muy poco estudiados. En comparación con la información que se tiene sobre las interacciones que involucran alfa-rizobios, es muy poco lo que se sabe sobre los genes y proteínas implicados en los primeros pasos de la interacción, una etapa clave para la formación de simbiosis efectivas. La cepa UYMMa02A representa una nueva especie dentro del género *Cupriavidus* (Sandes, Garabato y colaboradores, en elaboración). Esta cepa fue aislada en nódulos de la leguminosa nativa *Mimosa magentea* en un suelo rico en metales de Lavalleja (21). Esta cepa es capaz de formar asociaciones simbióticas efectivas con varias especies de *Mimosa* nativas y con la planta modelo *Mimosa pudica*. Además, hemos encontrado cepas muy similares a esta especie naturalmente nodulando mimosas en diferentes zonas de nuestro país (19,20). Usando a la cepa UYMMa02A como modelo hemos intentado, durante los últimos 8 años, esclarecer los mecanismos implicados en la interacción con plantas hospederas. Para esto hemos secuenciado su genoma, estudiado la expresión génica y proteica en distintas etapas de la interacción, así como desarrollado herramientas moleculares para su estudio (24,30,48). El presente proyecto nos permitió avanzar en la caracterización de genes que responden al estímulo de la presencia de la planta y que no necesariamente habían sido previamente relacionados con el proceso simbiótico. Cabe destacar la función del regulador *nodD* modulando la formación de biopelículas y el movimiento de tipo *swimming* en UYMMa02A así como la intervención de genes relacionados al metabolismo de cobre y otros metales en la respuesta de la bacteria a la presencia de la planta. También es válido asumir que no pudimos avanzar tanto como se hubiese querido con este proyecto. Sin embargo, esto es parte del riesgo que asumimos al decidir trabajar con cepas bacterianas salvajes en lugar de cepas modelo ya establecidas. Este desafío nos obliga a plantear continuamente nuevas estrategias y seguir formándonos como investigadoras e investigadores. En este sentido quiero resaltar que además de los resultados obtenidos con nuestro modelo biológico, el presente proyecto permitió la formación de dos estudiantes de grado, culminar los estudios de dos magister y una doctoranda, así como la participación de una investigadora posdoc. El trabajo desarrollado por este equipo fue presentado en eventos nacionales e internacionales y permitió un crecimiento de todas las personas involucradas.

Aún nos queda mucho camino por recorrer si queremos completar un modelo que explique los mecanismos implicados en la interacción simbiótica entre estos organismos, por lo tanto, seguiremos presentando propuestas y formando investigadoras e investigadores en una temática que tiene tanto para ofrecer desde lo básico y en sus posibles aplicaciones en el desarrollo de sistemas productivos sustentables.

## Referencias bibliográficas

1. Izaguirre P, Beyhaut R. Las leguminosas del Uruguay y regiones vecinas. Parte I-Papilonoideae. Hemisferio Sur, editor. ISBN 9974-645-06-9. Montevideo; 2003. 549 p.
2. Izaguirre P, Beyhaut R. Las leguminosas en Uruguay y regiones vecinas. Parte 2: Caesalpinioideae. Parte 3: Mimosoideae. Hemisferio Sur, editor. ISBN 9974-645-31-X. Montevideo; 2003. 302 p.
3. Franco AA, De Faria SM. The contribution of N<sub>2</sub>-fixing tree legumes to land reclamation and sustainability in the tropics. *Soil Biol Biochem.* 1997;29(5-6):897-903.
4. Coba de la Peña T, Pueyo J. Legumes in the reclamation of marginal soils, from cultivar and inoculant selection to transgenic approaches. *Agron Sustain Dev.* 2012;32(1):65-91.
5. Crews TE, Peoples MB. Legumes versus fertilizers sources of nitrogen: Ecological tradeoffs and human needs. *Agric Ecosyst Environ.* 2004;102 SRC-:279-97.
6. Peoples MB, Brockwell J, Herridge DF, Rochester IJ, Alves BJR, Urquiaga S, et al. The contributions of nitrogen-fixing crop legumes to the productivity of agricultural systems. *Symbiosis.* 2009 Feb;48(1-3):1-17.
7. Andrews M, Andrews ME. Specificity in Legume-Rhizobia Symbioses. *Int J Mol Sci.* 2017 Mar 26;18(4):705.
8. Willems A. The taxonomy of rhizobia: an overview. *Plant Soil.* 2006 Aug 24;287(1-2):3-14.
9. Moulin L, Munive A, Dreyfus B, Boivin-masson C. Nodulation of legumes by members of the b-subclass of Proteobacteria. *Nature.* 2001;412:948-50.
10. Chen WM, Laevens S, Lee TM, Coenye T, De Vos P, Mergeay M, et al. *Ralstonia taiwanensis* sp. nov., isolated from root nodules of Mimosa species and sputum of a cystic fibrosis patient. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2001;51(5):1729-35.
11. Andrews M, Andrews ME. Specificity in legume-rhizobia symbioses. *Int J Mol Sci.* 2017;18(4).
12. Checcucci A, diCenzo GC, Perrin E, Bazzicalupo M, Mengoni A. Genomic Diversity and Evolution of Rhizobia. *Microbial Diversity in the Genomic Era.* Elsevier Inc.; 2018. 37-46 p.
13. Talbi C, Delgado MJ, Girard L, Ramirez-Trujillo A, Caballero-Mellado J, Bedmar EJ. Burkholderia phymatum strains capable of nodulating Phaseolus vulgaris are present in Moroccan soils. *Appl Environ Microbiol.* 2010;76(13):4587-91.
14. Martínez-Aguilar L, Salazar-Salazar C, Méndez RD, Caballero-Mellado J, Hirsch AM, Vásquez-Murrieta MS, et al. Burkholderia caballeronis sp. nov., a nitrogen fixing species isolated from tomato (Lycopersicon esculentum) with the ability to effectively nodulate Phaseolus vulgaris. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2013;104(6):1063-71.
15. da Silva K, Florentino LA, da Silva KB, de Brandt E, Vandamme P, de Souza Moreira FM. Cupriavidus necator isolates are able to fix nitrogen in symbiosis with different legume species. *Syst Appl Microbiol.* 2012 May;35(3):175-82.
16. Ramírez MDA, España M, Aguirre C, Kojima K, Ohkama-Ohtsu N, Sekimoto H, et al. Burkholderia and Paraburkholderia are Predominant Soybean Rhizobial Genera in Venezuelan Soils in Different Climatic and Topographical Regions. *Microbes Environ.* 2018;ME18076.
17. Taulé C, Zabaleta M, Mareque C, Platero R, Sanjurjo L, Sicardi M, et al. New betaproteobacterial Rhizobium strains able to efficiently nodulate Parapiptadenia rigida (Benth.) Brenan. *Appl Environ Microbiol.* 2012 Mar;78(6):1692-700.
18. Platero R, James EK, Rios C, Iriarte A, Sandes L, Zabaleta M, et al. Novel Cupriavidus Strains Isolated from Root Nodules of Native Uruguayan Mimosa Species. Voordouw G, editor. *Appl Environ Microbiol.* 2016 Jun 1;82(11):3150-64.
19. Pereira-Gómez M, Ríos C, Zabaleta M, Lagurara P, Galvalisi U, Iccardi P, et al. Native legumes of the Farrapos protected area in Uruguay establish selective associations with rhizobia in their natural habitat. *Soil Biol Biochem.* 2020 Sep;148:107854.
20. Fabiano E, Platero R, Irisarri P, Azziz G, Morel M, Monza J. Rhizobia biodiversity in Uruguay: preservation and uses. *Environ Sustain.* 2023;6(2):109-19.
21. Platero R, James EK, Rios C, Iriarte A, Sandes L, Zabaleta M, et al. Novel Cupriavidus Strains Isolated from Root Nodules of Native Uruguayan Mimosa Species. Voordouw G, editor. *Appl Environ Microbiol.* 2016 Jun 1;82(11):3150-64.
22. Masson-Boivin C, Giraud E, Perret X, Batut J. Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes? *Trends Microbiol.* 2009 Oct;17(10):458-66.
23. Oldroyd GED, Murray JD, Poole PS, Downie JA. The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. *Annu Rev Genet.* 2011 Jan;45:119-44.
24. Iriarte A, Platero R, Romero V, Fabiano E, Sotelo-Silveira JR. Draft genome sequence of Cupriavidus UYMMa02A, a novel beta-rhizobium species. *Genome Announc.* 2016;4(6):e01258-16.
25. Langleib M, Beracochea M, Zabaleta M, Battistoni F, Sotelo-Silveira J, Fabiano E, et al. Draft Genome Sequence of Paraburkholderia sp. UYCP14C, a Rhizobium Strain Isolated from Root Nodules of Calliandra parvifolia. *Microbiol Resour*



Announc. 2019;8(16):e00173-19.

26. De Meyer SE, Fabiano E, Tian R, Van Berkum P, Seshadri R, Reddy TBK, et al. High-quality permanent draft genome sequence of the *Parapiptadenia rigida*-nodulating *Burkholderia* sp. strain UYPR1. 413. *Stand Genomic Sci.* 2015;10:1–8.
27. Amadou C, Pascal G, Mangenot S, Glew M, Bontemps C, Capela D, et al. Genome sequence of the  $\beta$ -rhizobium *Cupriavidus taiwanensis* and comparative genomics of rhizobia. *Genome Res.* 2008 Sep;18(9):1472–83.
28. Klonowska A, Moulin L, Ardley JK, Braun F, Gollagher MM, Zandberg JD, et al. Novel heavy metal resistance gene clusters are present in the genome of *Cupriavidus neocaledonicus* STM 6070, a new species of *Mimosa pudica* microsymbiont isolated from heavy-metal-rich mining site soil. *BMC Genomics.* 2020 Mar 6;21(1):214.
29. Rodríguez-Esperón MC, Eastman G, Sandes L, Garabato F, Eastman I, Iriarte A, et al. Genomics and transcriptomics insights into luteolin effects on the  $\beta$ -rhizobial strain *Cupriavidus necator* UYPR2.512. *Environ Microbiol.* 2022 Jan 22;24(1):240–64.
30. Rodríguez-Esperón C, Sandes L, Eastman I, Croci C, Garabato F, Ferreira V, et al. Nodulation in the absence of nod genes induction: alternative mechanisms involved in the symbiotic interaction between *Cupriavidus* sp. UYMa02A and *Mimosa pudica*. *Environ Sustain.* 2023;
31. Lardi M, Liu Y, Purtschert G, de Campos SB, Pessi G. Transcriptome analysis of *Paraburkholderia phymatum* under Nitrogen starvation and during symbiosis with *Phaseolus Vulgaris*. *Genes (Basel).* 2017;8(12).
32. de Campos SB, Lardi M, Gandolfi A, Eberl L, Pessi G. Mutations in two *Paraburkholderia phymatum* type VI secretion systems cause reduced fitness in interbacterial competition. *Front Microbiol.* 2017 Dec 12;8(DEC).
33. Klonowska A, Melkonian R, Miché L, Tisseyre P, Moulin L. Transcriptomic profiling of *Burkholderia phymatum* STM815, *Cupriavidus taiwanensis* LMG19424 and *Rhizobium mesoamericanum* STM3625 in response to *Mimosa pudica* root exudates illuminates the molecular basis of their nodulation competitiveness and symbiotic ev. *BMC Genomics.* 2018 Dec 30;19(1):105.
34. Sandes L. Bases moleculares de la interacción *Cupriavidus* - *Mimosa*: una aproximación proteómica. School of Science, PEDECIBA, Universidad de la República, Uruguay; 2020.
35. Ing PL, Izaguirre AP, Aitucio D. Leguminosas.
36. Griesmann M, Chang Y, Liu X, Song Y, Haberger G, Crook MB, et al. Phylogenomics reveals multiple losses of nitrogen-fixing root nodule symbiosis. *Science.* 361(6398).
37. Taulé C, Luizzi H, Beracochea M, Mareque C, Platero R, Battistoni F. The Mo- and Fe-nitrogenases of the endophyte *Kosakonia* sp. UYS010 are necessary for growth promotion of sugarcane. *Ann Microbiol.* 2019;69(7):741–50.
38. Martínez-García E, de Lorenzo V. Engineering multiple genomic deletions in Gram-negative bacteria: analysis of the multi-resistant antibiotic profile of *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ Microbiol.* 2011 Oct;13(10):2702–16.
39. Aparicio T, de Lorenzo V, Martínez-García E. CRISPR/Cas9-Based Counterselection Boosts Recombineering Efficiency in *Pseudomonas putida*. *Biotechnol J.* 2018 May;13(5):1700161.
40. Silva-Rocha R, Martínez-García E, Calles B, Chavarría M, Arce-Rodríguez A, de Las Heras A, et al. The Standard European Vector Architecture (SEVA): a coherent platform for the analysis and deployment of complex prokaryotic phenotypes. *Nucleic Acids Res.* 2013 Jan;41(Database issue):D666-----.
41. Rios C. Una aproximación molecular al estudio de simbioses de leguminosas nativas presentes en el área protegida Esteros de Farrapos e Islas del Río Uruguay. Tesina de Grado. UdelaR, Montevideo, Uruguay; 2013.
42. Lagurara P. Caracterización fenotípica de rizobios presentes en el parque Esteros de Farrapos e Islas del Río Uruguay. Tesis de Grado. Facultad de Ciencias. UdelaR, Montevideo, Uruguay; 2014.
43. Chen WM, James EK, Prescott AR, Kierans M, Sprent JI. Nodulation of *Mimosa* spp. by the  $\beta$ -proteobacterium *Ralstonia taiwanensis*. *Mol plant-microbe Interact.* 2003 Dec;16(12):1051–61.
44. Garabato BF. Descripción de nuevos rizobios asociados a leguminosas nativas. Facultad de Ciencias, Universidad de la República. Uruguay; 2018.
45. Sandes L. Análisis de *Cupriavidus* aislados de mimosas nativas de Uruguay. Universidad de la República. Montevideo, Uruguay.; 2015.
46. Ocampo F. Puesta a punto de herramientas moleculares estándar para el estudio de *Cupriavidus* simbioses de Mimosas nativas. Universidad de la República, Uruguay; 2017.
47. Lambertsen L, Sternberg C, Molin S. Mini-Tn7 transposons for site-specific tagging of bacteria with fluorescent proteins. *Environ Microbiol.* 2004 Jul;6(7):726–32.
48. Garabato F. Estudio de la proteostasis durante el establecimiento de la simbiosis entre un  $\beta$ -rizobio y su leguminosa hospedera. School of Science, PEDECIBA, Universidad de la República, Uruguay; 2022.

## Licenciamiento

Reconocimiento-NoComercial-Compartir Igual 4.0 Internacional. (CC BY-NC-SA)

