

# Informe final publicable de proyecto

## 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.

Código de proyecto ANII: FCE\_1\_2017\_1\_136082

03/07/2021

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

**GARABATO, Florencia** (Investigador)

**EASTMAN, Guillermo** (Investigador)

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

**DURÁN MUÑOZ, María Del Rosario** (Investigador)

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

**SANDES BUFANO, Laura** (Investigador)

**SOTELO SILVEIRA, José Roberto** (Co-Responsable Técnico-Científico)

---

MINISTERIO DE EDUCACIÓN Y CULTURA. INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS "CLEMENTE ESTABLE"

(Institución Proponente) \\ INSTITUTO PASTEUR DE MONTEVIDEO \\

FUNDACIÓN DE APOYO AL INSTITUTO CLEMENTE ESTABLE

## Resumen del proyecto

El establecimiento de relaciones simbióticas entre rizobios y leguminosas hospederas esta finamente regulado, exigiendo una expresión génica coordinada entre ambos organismos. Esta coordinación comienza cuando los organismos se reconocen mutuamente mediante el intercambio de señales en la rizósfera y culmina con la formación de órganos especializados en la raíz de las plantas hospederas, los nódulos, en los cuales las bacterias llevan a cabo el proceso de fijación biológica de nitrógeno (FBN). La FBN es un proceso ecológico de capital importancia sin embargo la mayor parte de la información que tenemos acerca de este proceso ha sido obtenida mediante el estudio de modelos simbióticos que emplean rizobios pertenecientes al grupo alfa de las proteobacterias (alfa-rizobios). En nuestro país hemos encontrado rizobios pertenecientes a los géneros *Cupriavidus* y *Burkholderia* (Beta-rizobios) asociados a varias especies de leguminosas nativas. Considerando la escasísima información disponible y la relevancia ecológica de este modelo, proponemos estudiar el intercambio de señales y cambios fisiológicos que ocurren durante el establecimiento de una simbiosis efectiva entre la cepa UYMMa02A de *Cupriavidus* y la leguminosa *Mimosa polycarpa*. Combinaremos técnicas analíticas, Ribosome profiling y shotgun proteomic para estudiar pasos claves de la interacción. Las técnicas ómicas propuestas nos permitirán estudiar el conjunto de ARN mensajeros activamente traducidos y el perfil de proteínas totales, así como los fenómenos de regulación transcripcional y traduccional a los cuales está sujeto este modelo bacteriano durante la simbiosis con su hospedero. La integración de los datos ómicos y de química analítica, nos permitirá definir la proteostasis (Homeostasis proteica) del beta-rizobio *Cupriavidus* sp. UYMMa02A y elaborar un modelo que indique las principales señales y vías metabólicas implicadas en el establecimiento de una asociación simbiótica efectiva entre beta-rizobios y leguminosas hospederas, lo cual es indispensable para el diseño y aplicación de sistemas simbióticos sustentables.

**Ciencias Naturales y Exactas / Ciencias Biológicas / Bioquímica y Biología Molecular / Transcriptómica, traductómica y Proteómica**

**Palabras clave: Proteómica masiva / perfil ribosómico / beta-rizobios /**

## Introducción

El Departamento de Bioquímica y Genómica Microbiana (BIOGEM) del IIBCE, cuenta con una extensa experiencia e infraestructura para el estudio de microorganismos promotores del crecimiento vegetal. Una de nuestras líneas de investigación se ha centrado en el estudio de las estrategias empleadas para mantener la homeostasis de hierro y otros metales en dos bacterias del suelo capaces de formar asociaciones benéficas con plantas: *Sinorhizobium meliloti* y *Herbaspirillum seropedicae* (31–36). Por otro lado nuestro grupo se ha abocado en el aislamiento y caracterización de bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas tanto a leguminosas nativas como a diversos cultivos comerciales tales como arroz, caña de azúcar, sorgo, canola y festuca (37–40). Justamente en uno de estos trabajos, enfocado en la caracterización de bacterias diazótroficas asociadas a una de las especies de leguminosas arbóreas nativas con mayor potencial maderable, el Angico (*Parapiptadenia rigida*), se identificaron por primera vez en nuestro país beta-rizobios pertenecientes a los géneros *Cupriavidus* y *Burkholderia*, capaces de promover el crecimiento de esta planta tanto en invernáculo como en campo (41). Estos descubrimientos nos llevaron a profundizar en la caracterización de rizobios asociados a leguminosas nativas, en particular pertenecientes a la subfamilia Mimosoideae, a lo largo de todo nuestro país. Como resultado de estos estudios se lograron identificar y caracterizar bacterias simbiotas de más de 20 especies de leguminosas nativas de nuestro país (27, 42).

La diversidad de beta-rizobios encontrados nos llevó a trabajar en estrecha colaboración con el Departamento de Genómica del IIBCE para realizar estudios de genómica comparativa mediante la secuenciación y análisis de 10 genomas de cepas de beta-rizobios (Postdoctorado Andrés Iriarte, 14). Paralelamente, en el marco del proyecto ANII FCE\_1\_2011\_1\_6580, y la beca de post-doctorado PD\_NAC\_2012\_1\_7537 otorgada al Dr. Raúl Platero, se han desarrollado vectores y herramientas moleculares adecuadas para el estudio de beta-rizobios. Estos antecedentes nos permitieron proponer el proyecto FCE\_1\_2014\_104338 "Genómica funcional de la interacción *Cupriavidus*-*Mimosa*", llevado adelante en colaboración entre los Departamentos de BIOGEM y Genómica del IIBCE y cuenta con la participación del Dr. Martín Baraibar de Oxyproteomics (Paris Francia), experto en la aplicación de la técnica de DIGE y la Dra. Rosario Durán de la Unidad Mixta IIBCE/IPmont de Bioquímica y Proteómica Analíticas (43). El objetivo principal de este proyecto es evaluar los cambios que ocurren en la bacteria durante los primeros pasos de la interacción simbiótica antes de que ocurra el

contacto físico. Los avances realizados hasta el momento permitieron la puesta a punto de técnicas para la extracción y análisis de ARN y proteínas,

así como la identificación de una veintena de proteínas bacterianas expresadas diferencialmente en respuesta a la presencia de la planta. El proyecto ha tenido un fuerte énfasis en la formación de recursos humanos; Laura Sandes en el marco de su trabajo de postgrado ha recibido entrenamiento en el análisis de la expresión diferencial de proteínas mediante DIGE y en la identificación de proteínas mediante MALDI-TOF, mientras que Cecilia Rodríguez-Esperón se ha formado en el área de extracción de ARN y purificación de ARN mensajeros. Teniendo en cuenta estos antecedentes, el presente proyecto propone profundizar el estudio de los cambios que ocurren durante la interacción simbiótica analizando la proteostasis (homeostasis de proteínas) bacteriana durante el intercambio de señales en la rizósfera, la colonización radicular y en el nódulo maduro. Para llevar adelante estos estudios proponemos dos enfoques complementarios; por un lado empleando la técnica de "ribosome profiling", implementada con éxito en el Departamento de Genómica (46), determinaremos los niveles de traducción de todo el transcriptoma celular en los mencionados pasos de la interacción. Paralelamente investigaremos el perfil de proteínas totales expresadas por el simbiote bacteriano en cada una de las condiciones mediante el uso de proteómica por shotgun, o secuenciación masiva de proteínas, técnica disponible únicamente en nuestro país en la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas. Adicionalmente analizaremos el perfil metabólico de los exudados producidos por la planta hospedera en los distintos pasos de la interacción haciendo uso de la plataforma analítica disponible en nuestro Instituto y en estrecha colaboración con los responsables de los mismos, expertos en el análisis de flavonoides, flavonas e isoflavonas (47–50). De esta manera en el presente proyecto proponemos utilizar técnicas de vanguardia junto al trabajo sinérgico de 4 reconocidos grupos de investigación para estudiar los mecanismos subyacentes en el establecimiento de una simbiosis efectiva entre bacterias y leguminosas nativas.

El establecimiento de una relación simbiótica efectiva entre rizobios y leguminosas es un proceso dinámico que involucra un complejo intercambio de señales y una regulación coordinada de la expresión génica entre los organismos involucrados. Sin embargo la información disponible hasta ahora y los modelos validados

han sido establecidos utilizando un grupo reducido de organismos modelo, en los cuales se han empleado microorganismos simbiotes pertenecientes a la familia Rhizobaceae en el subgrupo alfa de las proteobacterias (alfa-rizobios). Contrariamente existe escasa información acerca de los mecanismos utilizados por rizobios de los géneros *Cupriavidus* y *Burkholderia*, pertenecientes al subgrupo Beta de las proteobacterias (beta-rizobios). Considerando la relevancia que tiene este tipo de asociaciones en los ecosistemas nativos de nuestro país, el presente proyecto busca generar información que permita determinar las bases moleculares de la interacción entre beta-rizobios y sus leguminosas hospederas. Para esto proponemos analizar desde un punto de vista "ómico" los cambios adaptativos que ocurren a nivel fisiológico en el simbiote bacteriano en etapas clave de la interacción con su hoppedero. Las aproximaciones "ómicas" están dirigidas a estudiar en conjunto todas las capacidades de un organismo mediante la generación de gran cantidad de datos y uso de la bioinformática para su interpretación. Mientras que la genómica estudia la composición genética de un organismo, la transcriptómica estudia la expresión de estos genes. La traductómica por su lado estudia la fracción de los ARNm que están siendo activamente traducidos por los ribosomas dando una idea mas real del conjunto de proteínas que están siendo sintetizadas en una situación dada. Las técnicas proteómicas permiten el estudio de todas la proteínas presentes en un organismo en un momento dado. Todas estas aproximaciones aportan información complementaria, de modo que la integración de los datos obtenidos mediante distintos enfoques permite describir detalladamente los cambios que ocurren en un organismo ante cualquier estímulo. Para llevar adelante el presente proyecto hemos seleccionado el modelo simbiótico compuesto por la cepa bacteriana UYMMao2A perteneciente al género *Cupriavidus* y la leguminosa *Mimosa polycarpa*. Utilizando este modelo estudiaremos tres pasos fundamentales que ocurren durante la interacción (Figura 1, anexo): I) Bacteria en vida libre: Esto ocurre cuando la bacteria se encuentra en la zona influenciada por la raíz de la planta

hospedera (rizófera) y se supone que es el primer paso de la interacción. La planta, durante su desarrollo secreta grandes cantidades de exudados a través de sus raíces, entre ellos ácidos orgánicos, aminoácidos, azúcares y diversos flavonoides influenciando la estructura del suelo y del microbioma asociado (51–53). En los modelos aceptados, existen flavonoides que son específicamente reconocidos por posibles bacterias simbiotes, activando en ellas la expresión de genes capaces de sintetizar y exportar moléculas de naturaleza lipo-quito-oligosacárida que a su vez son reconocidas por la planta, activando los programas de rediferenciación necesarios para la producción del nódulo a partir de los tejidos meristemáticos (10). El análisis del genoma de UYMMa02A muestra la existencia de un operón que contiene genes necesarios para la síntesis (nodABC) y exportación (nodJI) así como un gen (nodD) que codifica para un regulador transcripcional del tipo AraC. Sin embargo la existencia de un solo (o dos) posible sitios de unión del regulador al genoma y la necesidad de altas concentraciones de flavonoides purificados para lograr la activación de los genes implicados en la síntesis de factores nod sugieren que existen vías alternativas de comunicación entre los organismos hospederos. El

análisis del perfil de moléculas presentes en los exudados radiculares de *Mimosa polycarpa* tanto en presencia como en ausencia del simbionte bacteriano podrá ayudarnos a identificar posibles moléculas implicadas en la comunicación simbiótica. Paralelamente analizaremos en profundidad los cambios que ocurren en el traductoma y proteoma de la bacteria cuando la misma crece en presencia de la planta. Los resultados esperados a través de las técnicas propuestas nos permitirán proponer una lista de posible moléculas señal así como profundizar en los procesos de regulación y vías metabólicas implicadas en esta primer etapa de la interacción. II) Bacterias adheridas a la raíz: El siguiente punto que será estudiado es cuando la bacteria se encuentra adherida a la superficie de la raíz de la planta hospedera (Figura 1, anexo; Figura 4 (54)). Se han descrito varias estructuras de superficie, principalmente polisacáridos, implicados en el reconocimiento mutuo de los organismos simbióticos. Este tipo de reconocimiento es fundamental para determinar la compatibilidad de la interacción y evitar la respuesta inmune vegetal (10, 16–22). Una de las respuestas vegetales a la presencia de la bacteria es la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) por lo que se espera que la bacteria active mecanismos de detoxificación a través de la expresión de peroxidasas, catalasas y superóxido-dismutasas (13, 19, 20). En esta etapa la expresión y secreción de proteínas a través de los numerosos sistemas de secreción puede tener un rol fundamental (55–58). El genoma de UYMMa02A codifica para sistemas de secreción del tipo III, IV y VI (14), por lo que sería interesante determinar la importancia de estos sistemas en la simbiosis beta-rizobio-leguminosa. El enfoque metodológico propuesto nos permitirá evaluar la participación de estos sistemas así como la expresión de posibles moléculas efectoras secretadas a través de los mismos. III) Bacterias dentro de los nódulos maduros: Una vez superadas las etapas de acercamiento y reconocimiento, las bacterias ingresan hacia el interior de la raíz a través de un hilo de infección que las lleva hacia las células meristemáticas que darán origen al nódulo (13, 19). Una vez dentro de la planta, la bacteria depende totalmente de los nutrientes suministrados por su hospedero, sufriendo profundas modificaciones de su metabolismo para adaptarse a esta nueva condición (19). En particular durante la simbiosis *Cupriavidus-Mimosa*, se ha visto que la expresión del gen *nodB* continúa activa en esta etapa (54), pero no se sabe nada más del resto de los posibles mediadores de la simbiosis. Lograr estudiar la expresión global génica dentro del nódulo maduro aportaría información crucial para explicar la relación simbiótica entre estos dos organismos.

### **Metodología/diseño del estudio**

Con la finalidad de estudiar los cambios que ocurren durante el establecimiento de la simbiosis entre el beta-rizobio *Cupriavidus sp. UYMMa02A* con una leguminosa hospedera, seleccionamos 3 etapas de la interacción para analizar la proteostasis bacteriana: I-La primer etapa que se analizará será el efecto que tiene la presencia de los exudados radiculares de la planta hospedera sobre su par simbiótico bacteriano. II-La segunda etapa estudiada será el momento en que la bacteria se encuentra adherida a la raíz de la planta hospedera. III-Finalmente intentaremos estudiar la proteostasis de la bacteria cuando la misma se encuentra en el interior de los nódulos maduros (Figura 1, anexo).

Para determinar el perfil de metabolitos presentes en los exudados de la planta en presencia o ausencia de su par simbiótico emplearemos protocolos previamente puestos a punto en nuestro instituto (47, 48, 59, 60). Los exudados radiculares serán obtenidos de plantas creciendo durante una semana en condiciones controladas de luz y temperatura en medio mineral líquido con baja disponibilidad de nitrógeno y en presencia o ausencia de células bacterianas (61). Utilizando la plataforma analítica del IIBCE analizaremos la presencia de ácidos orgánicos, aminoácidos, azúcares y compuestos fenólicos en los exudados mediante técnicas analíticas (HPLC y GC).

Para llevar adelante los estudios de proteostasis utilizaremos las técnicas de Ribosome profiling y proteómica de alto rendimiento o shotgun. La técnica de Ribosome Profiling es capaz de determinar a escala genómica, qué ARNs mensajeros se encuentran traduciendo en un momento dado de la vida celular y en qué proporción en términos relativos. Básicamente la técnica consiste en extraer y purificar los polisomas activos de las células, realizar un ensayo de protección de ARNs sobre los mismos, y purificar los fragmentos protegidos (62, 63) para su posterior secuenciación masiva y su análisis bioinformático (62, 64, 65). Estos fragmentos son conocidos como huellas ribosomales pues denotan la posición en la que se encontraba un ribosoma, como parte de un polisoma activo (66). En paralelo se realiza un RNA-seq o transcriptoma de la misma condición a estudiar con el objeto de evaluar simultáneamente cambios en traducción y transcripción estimando el parámetro de eficiencia traduccional. El mismo se trata de un cociente que vincula el nivel de traducción de un ARNm con su nivel transcripcional. Esto último resulta de utilidad para identificar regulación a nivel traduccional, esperando resultados del cociente mayores a 2 en mRNAs que cambian su traducción pero no su transcripción o menores a 0.5 en casos donde la traducción se reprima. Como corolario también es posible observar cambios regulatorios transcripcionales. La implementación de esta técnica en el modelo simbiótico rizobio-leguminosa tendrá ciertamente un importante impacto a nivel científico y académico. Es importante resaltar que el Departamento de Genómica del IIBCE cuenta con experiencia en la aplicación exitosa de esta técnica (46).

Para cada punto experimental se prepararan bibliotecas de secuenciación masiva de dos tipos: una transcriptómica y otra a partir de huellas polisomales. Para esto se seguirán protocolos previamente puestos apunto en nuestro laboratorio. Para la purificación de los polisomas se utilizarán protocolos basados en su ultracentrifugación de acuerdo a protocolos descritos (71). Para esto las bacterias obtenidas en cada condición, serán lisadas mediante French Press en presencia de inhibidores de la traducción. Las células no lisadas y fragmentos mayores serán removidos por centrifugación y los polisomas presentes en el sobrenadante aislados mediante ultracentrifugación utilizando un gradiente de sacarosa. Se verificará la presencia de polisomas midiendo la absorbancia a 260nm a través del gradiente usando un detector UV en línea. Los polisomas obtenidos serán tratados con nucleasas y los fragmentos protegidos (28 a 30 nt) se purificaran a partir de un gel de poli(acrilamida) desnaturante. Se evaluará la calidad de los ARN obtenidos y se construirán bibliotecas similares a las preparadas para ARN pequeños. Luego de la secuenciación, el mapeo de reads obtenidos, la estimación de niveles traduccionales y la eficiencia se hará en el Departamento de Genómica, utilizando como base de referencia el genoma de UYMMa02A ensamblado y anotado previamente por nuestro grupo (14). Para la detección de expresión diferencial o la abundancia relativa de huellas polisomales de genes, se utilizará el paquete edge.R (72). Se utilizará el análisis Gene Ontology para detectar vías metabólicas con cambios significativos en estudios del transcriptoma completo mediante el programa G0seq (v1.4.0) (70). Un límite FDR de 5% será utilizado como límite de significancia.

Dado que la cantidad de células y la calidad y nivel de purificación de los polisomas que pueden recuperarse a partir de los nódulos, puede ser limitante para llevar adelante estos análisis proponemos como alternativa emplear la técnica de ribosome-tag (73, 74). En este caso usaríamos como modelo bacteriano una cepa derivada de UYMMa02A en la cual las proteínas ribosomales S6 y L11 serán reemplazadas en el cromosoma por versiones que contengan en su extremo N-terminal una colita de histidina o His-Tag, permitiendo su purificación mediante IMAC. Esto incrementaría la eficiencia de recuperación de los ribosomas bacterianos presentes en una muestra compleja como lo es el nódulo vegetal. Para construir estas variantes bacterianas utilizaremos un sistema basado en la recombinación homóloga inducida por corte en la doble hebra de ADN, para reemplazar los genes deseados por versiones conteniendo las colitas de histidina (72). En este caso los nódulos colectados serán lisados en presencia de inhibidores de traducción al igual que se describió mas arriba. A partir de los sobrenadantes clarificados se implementará la purificación de los polisomas bacterianos por afinidad utilizando columnas de Ni-NTA, capaces de capturar a las proteínas con colas de histidina. Posteriormente se aislará el ARN de las fracciones purificadas por afinidad y se enviarán a secuenciar. La abundancia de ARN se calculará mediante RNA-seq como se detalló más arriba. Mediante este procedimiento, aunque no se pueden estimar tasas de traducción, si se puede identificar que ARN se encuentran traduciendo en la bacteria dentro del nódulo. En caso de que la recuperación de ARNm a partir de los ribosomas taggeados sea limitante, utilizaremos sistema de amplificación de ARN diseñados para muy bajas cantidades (Ovation amplification systems, NUGEN).

Por su lado la estrategia de shotgun para los análisis proteómicos propuestos permite el análisis simultáneo o masivo de todas las proteínas presentes en una mezcla compleja. Esta estrategia tiene la ventaja de que no es necesario realizar una separación previa de las proteínas mediante electroforesis en gel y si se dispone de una buena base de datos sobre el organismo en estudio, tiene alta sensibilidad y requiere bajas cantidades de material de partida (Figura 3, anexo). Utilizando esta aproximación se identificarán aquellas proteínas presentes exclusivamente en una u otra condición, así como aquellas proteínas presentes en varias condiciones con diferentes niveles de expresión (75, 76). Estos análisis permitirán además identificar modificaciones pos-traduccionales tales como niveles de fosforilación y posibles glicosilaciones. Para la extracción de proteínas totales, las bacterias lavadas serán resuspendidas en tampón de extracción (77). Luego de lo cual la suspensión será centrifugada (15min, 20000Xg, 4°C). El sobrenadante será conservado a -20°C hasta su utilización. La identificación de las proteínas se hará mediante espectrometría de masa. Para ello se utilizará la estrategia de tipo "shotgun", donde la mezcla de proteínas se digiere con tripsina y los péptidos generados se separan por nano-HPLC en fase reversa acoplado a un espectrómetro de masa híbrido Quaruolo-Orbitrap con una fuente nanospray (Q exactive Plus, Thermo). La asignación de la identidad se realizará mediante comparación de datos obtenidos a partir de espectros de MS y MS/MS de los iones peptídicos con las digestiones y fragmentaciones teóricas de proteínas en bases de datos, utilizando Patternlab como motor de búsqueda (75). Utilizando esta misma herramienta bioinformática se identificarán aquellas proteínas presentes exclusivamente en una u otra condición, así como aquellas proteínas presentes en varias condiciones con diferentes niveles de expresión. La cuantificación se llevará a cabo mediante la técnica de conteo de espectros (76). Este tipo de análisis se realizan en forma rutinaria en la Unidad Mixta IIBCE-IPMont de Bioquímica y Proteómica Analíticas.

La combinación de los datos obtenidos mediante química analítica, ribosome profiling y proteómica nos permitirá elaborar un modelo en el que se identifiquen las principales vías metabólicas y sistemas de regulación involucrados en el establecimiento de la simbiosis, incluyendo la identificación de conjuntos de genes que se regulan en la transcripción,

traducción o postraduccionalmente. Con la finalidad de corroborar la importancia de las posibles vías identificadas, se seleccionaran blancos para la generación de mutaciones limpias en el genoma de las bacterias y se evaluará el fenotipo simbiótico de acuerdo con protocolos establecidos previamente en nuestro laboratorio. Se utilizará un sistema basado en la recombinación homóloga inducida por corte en la doble hebra de ADN, para eliminar los genes deseados (78). Para el clonado de genes, complementación de mutantes y análisis de fusiones con genes reporteros se empleará la colección de plásmidos pSEVA disponible y empleada con éxito en nuestro laboratorio (79). El fenotipo de las mutantes obtenidas será evaluado mediante ensayos de interacción con plantas en condiciones controladas. Entre otros datos se cuantificará la colonización radicular, la cinética de nodulación, el número de nódulos por planta y la capacidad de fijar nitrógeno de los mismos, en caso de que se formen, utilizando protocolos descritos.

## Resultados, análisis y discusión

Con el objetivo general de determinar las bases moleculares de la interacción entre beta-rizobios y sus leguminosas hospederas, en el presente proyecto nos propusimos 4 objetivos específicos:

1. Analizar los cambios a nivel del compartimento traduccional activo (polisomas) de *Cupriavidus UYMMa02A* mediante Ribosome profiling durante el establecimiento de la simbiosis con la leguminosa hospedera *Mimosa polycarpa*.
2. Analizar los cambios a nivel del estado estacionario de proteoma de *Cupriavidus UYMMa02A* mediante proteómica shotgun de alto rendimiento durante el establecimiento de la simbiosis con la leguminosa hospedera *Mimosa polycarpa*.
3. Estudiar la producción de moléculas señal durante la interacción *Cupriavidus-mimosa* mediante aproximaciones de química analítica.
4. Integrar los resultados obtenidos mediante un modelo que explique la dinámica temporal de la interacción entre Beta-rizobios y sus leguminosas hospederas.

Puesta a punto de la técnica de ribosome profiling en *Cupriavidus sp. UYMMa02A*. El primer paso para lograr llevar adelante el primer objetivo fue la puesta a punto de la técnica de Ribosome profiling en el modelo *Cupriavidus sp. UYMMa02A*. A grandes rasgos, la técnica consiste en extraer y purificar los polisomas activos de las células, realizar un ensayo de protección de ARNs sobre los mismos y purificar los fragmentos protegidos (huellas ribosomales) para su posterior secuenciación masiva y análisis bioinformático. Estas huellas ribosomales revelan la posición exacta en la que se encontraban los ribosomas al momento de la transcripción. El mayor reto fue la obtención de polisomas y de las huellas ribosomales en concentración y tamaño adecuado para su secuenciación. En este sentido los pasos claves que se debieron optimizar fueron el número de células de partida, la obtención del extracto celular de forma rápida y sencilla para evitar la degradación del ARN y finalmente, la digestión de los polisomas con la enzima benzonasa (la cual degrada todo el ARN salvo las regiones protegidos por los ribosomas) para obtener las huellas ribosomales. La purificación de las huellas ribosomales se realizó mediante separación en geles de acrilamida, recorte de las bandas de tamaño esperado y recuperación a partir del gel. La puesta a punto de estas actividades fue posible gracias a la participación de varios integrantes del Departamento de Genómica del IIBCE. Luego de más de un año de ensayo y error, se logró un protocolo mediante el cual partiendo de 150mL de un cultivo en fase exponencial de *Cupriavidus sp. UYMMa02A*, se recuperaron 350mg de peller celular, el cual fue rápidamente lisado empleando esferas de sílice y luego sometido a ultracentrifugación para la obtención de una fracción enriquecida en polisomas de la bacteria. Esta fracción fue tratada con 6 unidades de la nucleasa Benzonasa y posteriormente purificada, obteniéndose huellas ribosomales con la calidad y concentración necesarias para su secuenciación. El esquema general y protocolo completo se incluyen en el Anexo I.

Análisis de la expresión de los genes *nod* en presencia de luteolina. La puesta a punto del protocolo de ribosome profiling, nunca antes utilizado en una bacteria de este género, nos permitió pensar en el siguiente paso. En la propuesta original pensamos en aplicar esta técnica en distintos pasos de la interacción, sin embargo, la cantidad de material de partida necesario excluyó inmediatamente su utilización para el estudio de las bacterias adheridas a la raíz o dentro del nódulo. Por lo tanto, pensamos en emplear esta aproximación para analizar la respuesta bacteriana a la presencia del flavonoide Luteolina, un inductor de genes *nod* en varias bacterias, incluyendo *Cupriavidus taiwanensis*. Con el objetivo de determinar la concentración de flavonoide a usar así como los tiempos de incubación necesarios para la activación de los genes de nodulación, introducimos en *UYMMa02A*, un plásmido conteniendo una fusión transcripcional entre el promotor del gen *nodB*, primero del operón *nod*, y el gen reportero *lacZ*. De esta forma cuando se diera la inducción de los genes *nod*, veríamos expresión de la betagalactosidasa codificada por *lacZ*. Como controles de estos experimentos empleamos a las cepas de *Cupriavidus necator* UYPR2.512 y *Cupriavidus taiwanensis* LMG19424. Mientras que en las cepas control observamos un rápido aumento de la actividad Beta-gal, en tan solo 2 horas y usando concentraciones tan bajas como 1nM, la cepa *UYMMa02A* no mostró variaciones en la actividad enzimática (Figura 2. Anexo I). Estos resultados fueron

parte de la tesina de grado de la Lic. Carolina Croci y pueden verse aquí (<https://hdl.handle.net/20.500.12008/25999>). Este resultado nos indica que la luteolina no sería un inductor de los genes *nod* en UYMMa02A por lo que decidimos estudiar los cambios en la expresión génica de UYMM02A en presencia de exudados radiculares de la planta hospedera *Mimosa pudica*.

Cambios en la expresión génica de UYMMa02A en respuesta a exudados de *Mimosa pudica*. El siguiente paso fue entonces obtener extractos celulares de la cepa UYMMa02A crecida en presencia de exudados radiculares de *Mimosa pudica*.

El protocolo para la obtención de los exudados se detalla en el anexo I, brevemente lo que hicimos fue mantener las raíces de plantas de *Mimosa pudica* en agua durante una semana, recoger el líquido conteniendo los exudados, filtrarlo y usarlo para preparar el medio de cultivo M9 citrato. La proporción utilizada fue de 1 planta por cada mL de agua con exudado, así para preparar 150mL de medio de cultivo, se partió de los exudados de 150 plantas.

Obtenidos los exudados, pasamos a crecer a la cepa UYMMa02A en M9 con exudados, condición a la que llamamos inducción y en M9 sin exudados, condición que llamamos control. Se realizaron 4 cultivos por cada condición. Las bacterias se recuperaron y se prepararon los extractos celulares de la forma descrita mas arriba. El extracto obtenido se dividió reservando una parte para los análisis de expresión proteica, una parte para la transcriptómica y 8 partes para la obtención de los polisomas y análisis de los fragmentos de ARN protegidos (Figura 1, anexos).

Los fragmentos de ARN protegidos y el ARN total fueron purificados y enviados para su secuenciación en Macrogen (Corea del Sur). En ambos casos se obtuvieron cerca de 30 millones de lecturas apareadas (pair-end) de alta calidad. Los detalles se describen en el anexo I (Tablas 1 a 4).

Usando un criterio de selección de genes que mostraron un cambio en la expresión (Fold-change) de al menos 2 y un valor de probabilidad ajustada (p-value) menor a 0,05, identificamos unos 100 genes expresados diferencialmente con una muy buena correlación entre lo observado a nivel transcripcional (RNAseq) y traduccional (Ribosome-profiling). Las tablas completas con los genes mapeados se encuentran en el Anexo I (Tablas S1 a S4). En ambos casos la mayoría de los genes sobreexpresados se mapearon al cromosoma 1, mientras que los reprimidos se distribuyeron mas homogéneamente entre el cromosoma 1, el cromosoma 2 y el plásmido simbiótico pSym. Para determinar la relevancia biológica de estos hallazgos clasificamos los genes identificados en categorías COG y analizamos las vías metabólicas afectadas usando la base de datos KEGG. Con respecto a las categorías COG, se observó que todos los genes considerados se distribuyen en 17 de un total de 21 categorías, lo cual indica que los exudados radiculares de *M. pudica* tienen un amplio efecto sobre el comportamiento y funcionamiento de UYMMa02A. En particular en los genes sobreexpresados se vieron enriquecidas, las categorías C (producción y conversión de energía) y P (transporte y metabolismo de iones inorgánicos), mientras que en los genes subexpresados o reprimidos se enriquecieron las categorías L (replicación y reparación) y O (modificaciones post-traduccionales, recambio proteico, funciones chaperonas) frente a la exposición a exudados (Figura 4 anexo I). Por otro lado, en cuanto a la clasificación dentro de vías metabólicas KEGG, los datos de transcriptómica indicaron que se vieron enriquecidas vías metabólicas involucradas en el metabolismo energético (fosforilación oxidativa y metabolismo del nitrógeno) y en el metabolismo de carbohidratos (metabolismo de fructosa y manosa). Por su lado los datos de traductómica indican que se observó un enriquecimiento en el metabolismo energético, en particular el metabolismo de nitrógeno y la fosforilación oxidativa. Interesantemente, también se observó un enriquecimiento en el procesamiento de información ambiental y en particular en el efecto de la bacteria sobre la vía de señalización MAPK de la planta hospedera (Tablas 5 y 6, anexo I). Las cascadas de señalización mediadas por quinasas activadas por mitógenos (MAPK por sus siglas en inglés, mitogen-activated protein kinase signaling cascades) tienen un rol en la activación de la respuesta inmune de la planta y se ha visto que ciertas señales de los rizobios pueden inducir la supresión de esta vía en su planta hospedera, facilitando así la colonización de la misma.

Cambios en el proteoma de UYMMa02A en respuesta a exudados de *Mimosa pudica*

Como tercera aproximación para responder el objetivo principal, se empleó la técnica de shotgun proteomics para analizar los cambios en el proteoma de UYMMa02A en respuesta a la presencia de exudados radiculares. Las proteínas se obtuvieron a partir de los mismos extractos de los cuales se extrajo el ARN total y las huellas ribosomales (Figura 1, Anexo). La técnica de shotgun proteomics, a grandes rasgos, se basa en fraccionar los péptidos de una muestra mediante una nano-cromatografía acoplada en línea con un espectrómetro de masas. La identificación de proteínas se logra comparando los espectros obtenidos experimentalmente, con los generados teóricamente a partir de una base de datos de secuencias. Empleando esta estrategia se logró identificar en las tres réplicas biológicas, 1656, 1509 y 1676 proteínas totales en la condición control y 1591, 1217 y 1210 en presencia de exudados radiculares de *M. pudica* respectivamente, compartiendo todas las muestras un total de 1175 proteínas (Datos no mostrados). Considerando tanto las proteínas de expresión única como las de expresión diferencial, observamos que en presencia de exudados 24 proteínas se encuentran

sobre-expresadas y 104 sub-expresadas con respecto a la condición control (ausencia de exudados) (Tablas S5 y S6, Anexo I). El mapeo contra el genoma de UYMMa02A mostró que los genes que codifican para estas proteínas se localizan principalmente en el cromosoma 1 (75% de las proteínas sobre expresadas y 73% de las proteínas reprimidas) y en el cromosoma 2 (17% de las sobreexpresadas y 20% de las reprimidas). El resto (8% de las sobreexpresadas y 7% de las reprimidas) mapean en los contigs tig00000009 y tig00000506 que son posibles plásmidos de esta cepa, pero no tienen genes simbióticos identificados.

Las proteínas expresadas diferencialmente fueron analizadas con la base de datos eggNog-mapper, logrando clasificarlas dentro de las categorías funcionales COG. Sobre esta clasificación se realizó además un análisis de enriquecimiento funcional basado en el test exacto de Fisher, considerando un p-valor < 0.05 como un enriquecimiento significativo. En la Figura 7 del anexo I, se observa que aquellas proteínas que en presencia de exudados radiculares aumentaron su expresión, están asociadas principalmente a la producción y conversión de energía (C), a los procesos de transcripción (K) y traducción (J) y al proceso de replicación, recombinación y reparación (L). Sin embargo, la única categoría que se encuentra estadísticamente enriquecida es la traducción.

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

Los exudados de *Mimosa pudica* contiene nutrientes y aminoácidos que pueden ser utilizados por UYMMa02A.

Con la finalidad de describir la composición de los exudados radiculares utilizados para los ensayos de inducción se realizó un análisis mediante GC-MS. En la tabla 7 (anexo I) se listan los compuestos presentes en una concentración mayor al 1%. Entre estos compuestos encontramos una gran abundancia de ácidos carboxílicos, como los ácidos propanoico, oxálico y succínico. Por su lado se detectó la presencia de los carbohidratos fructosa, glucosa y arabinosa y aminoácidos serina, prolina, glicina, alanina entre los más abundantes y de valina, tirosina, treonina, isoleucina y leucina a concentraciones menores al 1%. Todos estos compuestos podrían ser utilizados por UYMMa02A para la obtención de energía y la síntesis de macromoléculas. La composición de estos exudados nos permite entender mejor la respuesta a nivel transcriptómico y proteómico de *Cupriavidus* sp. UYMMa02A.

## Conclusiones y recomendaciones

En este proyecto buscamos responder la pregunta de cuáles son los cambios que ocurren durante la interacción simbiótica entre un rizobio perteneciente al género *Cupriavidus* y sus plantas hospederas. Como modelo de estudio seleccionamos a la cepa UYMMa02A, perteneciente a una nueva especie dentro de los *Cupriavidus*. Esta cepa fue aislada por nuestro grupo de trabajo a partir de nódulos de la leguminosa nativa *Mimosa magentea* en la zona del Abra de Zabaleta en el departamento de Lavalleja. Mediante ensayos en condiciones controladas demostramos que esta cepa es capaz de formar nódulos en las raíces de varias especies de *Mimosa*, entre las que se encuentra *Mimosa pudica*, conocida como vergonzosa o sensitiva, debido a su característica sensibilidad al tacto. *Mimosa pudica* es una planta modelo, su genoma ha sido secuenciado, su distribución es cosmopolita, aunque su centro de origen es el sur de Brasil. Decidimos utilizar esta planta en nuestros ensayos ya que es posible obtener semillas de origen comercial y tiene un rápido desarrollo. Los ensayos para la obtención de exudados, colonización radicular y nodulación son exitosos con esta especie de *Mimosa*, demostrando que es un buen modelo para estudiar la interacción *Cupriavidus*-*Mimosa*.

El análisis del genoma de la cepa UYMMa02A, demostró la presencia de un cluster de genes conteniendo los genes implicados en la simbiosis nod, nif y fix. Los genes nod están formados por dos operones, para un lado se transcribe el gen nodD, el cual codifica para una proteína reguladora del tipo AraC, llamada NodD. En *Cupriavidus taiwanensis*, NodD regula la expresión del segundo operón nod, formado por los genes nodBCIJHASUQ los cuales codifican para las proteínas que ensamblan y exportan los factores Nod. El promotor del primer gen de este operón, nodB, se ha utilizado para ver la activación de estos genes en respuesta a diversos flavonoides. A su vez se ha visto la activación del operón completo en presencia de exudados de *Mimosa pudica*. Sin embargo, en la cepa UYMMa02A no se inducen los genes nod en presencia de luteolina ni en presencia de los exudados radiculares. Estas afirmaciones están apoyadas por ensayos con genes reporteros, proteómica y transcriptómica. Además, el análisis fenotípico de una mutante de UYMMa02A a la que se eliminó el gen nodD mostró que la misma es capaz de inducir nódulos efectivos en *Mimosa pudica*. Estos resultados nos permiten concluir que los genes nod de UYMMa02A no son indispensables para la simbiosis en *Mimosa pudica* y sugieren que esta cepa tiene mecanismos de regulación de la simbiosis, independientes de la proteína NodD. Estos resultados abren nuevas perspectivas en el estudio de las vías de regulación de la simbiosis en *Cupriavidus* y resaltan la importancia de estudiar estos mecanismos en diversos modelos bacterianos.

Empleando diversas técnicas ómicas, hemos sido capaces de entender las principales adaptaciones metabólicas de la

cepa UYMMa02A a la presencia de exudados. Las técnicas analíticas disponibles en nuestro país han sido una poderosa herramienta para esto. La composición de los exudados de Mimosa pudica, determinada por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas muestra la presencia de ácidos orgánicos y carbohidratos que son utilizados por la bacteria UYMMa02A. De igual forma hemos identificado la presencia de diversos aminoácidos en los exudados. Por su lado las principales adaptaciones bacterianas a la presencia de los exudados, están dirigidas a reacomodar su metabolismo a la presencia de estos nutrientes. Si bien estos resultados fueron obtenidos en ensayos muy controlados, pueden extrapolarse a lo que podría ocurrir durante la interacción en la rizósfera. En ese caso la bacteria en el suelo se encontraría en un ambiente oligotrófico, mientras que la germinación de una planta hospedera en su cercanía provocaría un cambio drástico en la disponibilidad de nutrientes. Por lo tanto, podemos concluir que los resultados obtenidos aportan nuevas miradas a la adaptación bacteriana a la disponibilidad de nutrientes y a su interacción con plantas hospederas.

Durante este proyecto pudimos profundizar en el estudio de una bacteria encontrada naturalmente en suelos de nuestro país. Se trata de un rizobio perteneciente al género Cupriavidus, pero que pertenece a una especie que no se conocía antes. El proyecto permitió consolidar a esta bacteria como un modelo, cuyas características únicas la hacen muy interesante de seguir estudiando. Actualmente estamos caracterizando la función, en el establecimiento de la simbiosis, de una veintena de genes y proteínas encontradas en este proyecto. Este proyecto tuvo un impacto muy importante en la formación de recursos humanos, durante el mismo se formaron dos estudiantes de grado y una estudiante de posgrado. Durante el mismo se realizó un curso de posgrado para 10 estudiantes de diversas instituciones y que contó con la participación de profesores y estudiantes de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sao Paulo. Estas instancias permitieron estrechar lasos entre los laboratorios e investigadores participantes y difundir el trabajo que se realiza en nuestro país. Finalmente hay que destacar que el proyecto permitió la colaboración fluida entre varios grupos de investigación, los cuales se nutrieron recíprocamente, mediante la puesta a punto de técnicas y la interpretación de datos. Podemos concluir que aún cuando no se logró realizar todos los experimentos y análisis planteados, se lograron avances muy significativos que serán utilizados en el curso de futuras investigaciones y plasmados en la futura publicación de artículos científicos.

## Referencias bibliográficas

1. Izaguirre P, Beyhaut R. 2003. Leguminosas en Uruguay y regiones vecinas. Parte 2: Caesalpinioideae. Parte 3: Mimosoideae. 1-302. Editorial Hemisferio Sur. ISBN 9974-645-31-X. Montevideo.
2. Coba de la Peña T, Pueyo J. 2012. Legumes in the reclamation of marginal soils, from cultivar and inoculant selection to transgenic approaches. *Agron Sustain Dev* 32:65–91.
3. Peoples MB. 1995. Biological nitrogen fixation: An efficient source of nitrogen for sustainable agricultural production? *Plant Soil* 174:3–28.
4. Chalk PM. 1991. The contribution of associative and symbiotic nitrogen fixation to the nitrogen nutrition of non- legumes. *Plant Soil* 132:29–39.
5. Willems A. 2006. The taxonomy of rhizobia: an overview. *Plant Soil* 287:3–14.
6. Moulin L, Munive A, Dreyfus B, Boivin-masson C. 2001. Nodulation of legumes by members of the  $\beta$ -subclass of Proteobacteria. *Nature* 412:948–950.
7. Chen W-M, Moulin L, Bontemps C, Vandamme P, Béna G, Boivin-Masson C. 2003. Legume symbiotic nitrogen fixation by beta-proteobacteria is widespread in nature. *J Bacteriol* 185:7266–7272.
8. Amadou C, Pascal G, Mangenot S. 2008. Genome sequence of the  $\beta$ -rhizobium *Cupriavidus taiwanensis* and comparative genomics of rhizobia. *Genome Res* 18:1472–1483.
9. Bournaud C, de Faria SM, dos Santos JMF, Tisseyre P, Silva M, Chaintreuil C, Gross E, James EK, Prin Y, Moulin L. 2013. Burkholderia species are the most common and preferred nodulating symbionts of the Piptadenia group (tribe Mimoseae). *PLoS One* 8:e63478.
10. Masson-Boivin C, Giraud E, Perret X, Batut J. 2009. Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes? *Trends Microbiol* 17:458–66.
11. Oldroyd GED, Murray JD, Poole PS, Downie JA. 2011. The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. *Annu Rev Genet* 45:119–44.
12. Maillat F, Poinot V, André O, Puech-Pagès V, Haouy A, Gueunier M, Cromer L, Giraudet D, Formey D, Niebel A, Martinez EA, Driguez H, Bécard G, Dénarié J. 2011. Fungal lipochitooligosaccharide symbiotic signals in arbuscular mycorrhiza. *Nature* 469:58–63.
13. Oldroyd GED, Harrison MJ, Paszkowski U. 2009. Reprogramming plant cells for endosymbiosis. *Science* 324:753–4.
14. Iriarte A, Platero R, Romero V, Fabiano E, Sotelo-Silveira JR. 2016. Draft Genome Sequence of *Cupriavidus UYMMa02A*, a Novel Beta-Rhizobium Species. *Genome Announc* 4:e01258-16.
15. Perret X, Staehelin C, Broughton WJ. 2000. Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol Mol Biol Rev* 64:180–201.
16. Becker A, Fraysse N, Sharypova L. 2005. Recent advances in studies on structure and symbiosis-related function of rhizobial K-antigens and lipopolysaccharides. *Mol Plant Microbe Interact* 18:899–905.
17. Hallack LF, Passos DS, Mattos KA, Agrellos OA, Jones C, Mendonça-Previato L, O Previato J, Todeschini AR. 2009. Structural elucidation of the repeat unit in highly branched acidic exopolysaccharides produced by nitrogen fixing Burkholderia. *Glycobiology* 20:338–347.
18. Downie JA. 2010. The roles of extracellular proteins, polysaccharides and signals in the interactions of rhizobia with legume roots. *FEMS Microbiol Rev* 34:150–170.
19. Oldroyd GED, Murray JD, Poole PS, Downie JA. 2011. The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. *Annu Rev Genet* 45:119–44.
20. Gourion B, Berrabah F, Ratet P, Stacey G. 2015. Rhizobium-legume symbioses: The crucial role of plant immunity. *Trends Plant Sci* 20:186–194.
21. Kawaharada Y, Kelly S, Nielsen MW, Hjuler CT, Gysel K, Muszyński A, Carlson RW, Thygesen MB, Sandal N, Asmussen MH, Vinther M, Andersen SU, Krusell L, Thirup S, Jensen KJ, Ronson CW, Blaise M, Radutoiu S, Stougaard J. 2015. Receptor-mediated exopolysaccharide perception controls bacterial infection. *Nature* 523:308–12.
22. Abramovitch RB, Anderson JC, Martin GB. 2006. Bacterial elicitation and evasion of plant innate immunity. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:601–11.
23. Batut J, Mergaert P, Masson-Boivin C. 2011. Peptide signalling in the rhizobium-legume symbiosis. *Curr Opin Microbiol* 14:181–7.
24. Perret X, Staehelin C, Broughton WJ. 2000. Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol Mol Biol Rev* 64:180–201.
25. Seshadri R, Reeve WG, Ardley JK, Tennessen K, Woyke T, Kyrpides NC, Ivanova NN. 2015. Discovery of Novel Plant Interaction Determinants from the Genomes of 163 Root Nodule Bacteria. *Sci Rep* 5:16825.

26. Taulé C, Zabaleta M, Mareque C, Platero R, Sanjurjo L, Sicardi M, Frioni L, Battistoni F, Fabiano E. 2012. New betaproteobacterial Rhizobium strains able to efficiently nodulate Parapiptadenia rigida (Benth.) Brenan. *Appl Environ Microbiol* 78:1692–1700.
27. Rios C. 2013. 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.
28. Lagurara P. 2014. 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.
29. Platero R, James EK, Rios C, Iriarte A, Sandes L, Zabaleta M, Battistoni F, Fabiano E. 2016. Novel Cupriavidus strains isolated from root nodules of native Uruguayan Mimosa species. *Appl Environ Microbiol* 82:3150–3164.
30. Sandes L. 2015. Análisis de Cupriavidus aislados de mimosas nativas de Uruguay. Tesina de Grado. UdelaR, Montevideo, Uruguay.
31. Platero R a, Jauregui M, Battistoni FJ, Fabiano ER. 2003. Mutations in sit B and sit D genes affect manganese-growth requirements in Sinorhizobium meliloti. *FEMS Microbiol Lett* 218:65–70.
32. Platero R, Peixoto L, O´Brian M. 2004. Fur is Involved in manganese-dependent regulation of mntA (sitA) expression in Sinorhizobium meliloti. *Appl Environ Microbiol* 70:4349–4355.
33. Battistoni F, Platero R, Noya F, Arias A, Fabiano E. 2002. Intracellular Fe content influences nodulation competitiveness of Sinorhizobium meliloti strains as inocula of alfalfa. *Soil Biol Biochem* 34:593–597.
34. Rosconi F, Souza EM, Pedrosa FO, Platero R a, González C, González M, Batista S, Gill PR, Fabiano ER. 2006. Iron depletion affects nitrogenase activity and expression of nifH and nifA genes in Herbaspirillum seropedicae. *FEMS Microbiol Lett* 258:214–219.
35. Battistoni F, Duran R, Cerven C, Battistoni J, Arias A, Fabiano E. 2002. Identification of an Iron-Regulated, Hemin-Binding Outer Membrane Protein in Sinorhizobium meliloti. *Society* 68:5877–5881.
36. Platero R, de Lorenzo V, Garat B, Fabiano E. 2007. Sinorhizobium meliloti fur-like (Mur) prote in binds a fur box-like sequence present in the mntA promoter in a manganese-responsive manner. *Appl Environ Microbiol* 73:4832–8.
37. Mareque C, Taule &#769; C, Beracochea M, Battistoni F. 2015. Isolation, characterization and plant growth promotion effects of putative bacterial endophytes associated with sweet sorghum (Sorghum bicolor (L) Moench). *Ann Microbiol* 65:1057–1067.
38. Taulé C, Mareque C, Barlocco C, Hackembruch F, Reis VM, Sicardi M, Battistoni F. 2012. The contribution of nitrogen fixation to sugarcane (Saccharum officinarum L.), and the identification and characterization of part of the associated diazotrophic bacterial community. *Plant Soil* 356:35–49.
39. Barlocco C, Mareque C, Taulé C, Hackembruch F, Sicardi M, Battistoni F. 2005. Aislamiento de bacterias endófitas-diazótrofas asociadas a cultivos comerciales de caña de azúcar ( Saccharum officinarum) en Uruguay.
40. Krause A, Bischoff B, Miché L, Battistoni F, Reinhold-Hurek B. 2011. Exploring the function of alcohol dehydrogenases during the endophytic life of Azoarcus Sp. strain BH72. *Mol Plant Microbe Interact* 24:1325–32.
41. Taulé C, Zabaleta M, Mareque C, Platero R, Sanjurjo L, Sicardi M, Frioni L, Battistoni F, Fabiano E. 2012. New Betaproteobacterial Rhizobium Strains Able To Efficiently Nodulate Parapiptadenia rigida (Benth.) Brenan. *Appl Environmental Microbiol* 78:1692–1700.
42. Zabaleta M. 2013. Conservación de Leguminosae nativas y sus bacterias simbióticas del Parque Nacional Esteros de Farrapos e Islas del Río Uruguay (ROU). Facultad de Agronomía, UdelaR. Montevideo, Uruguay.
43. Lilley KS, Friedman DB. 2004. All about DIGE: quantification technology for differential-display 2D-gel proteomics. *Expert Rev Proteomics* 1:401–409.
44. Morishita R, Kawagoshi A, Sawasaki T, Madin K, Ogasawara T, Oka T, Endo Y. 1999. Ribonuclease activity of rat liver perchloric acid-soluble protein, a potent inhibitor of protein synthesis. *J Biol Chem* 274:20688–20692.
45. Dietrich LEP, Teal TK, et al. 2008. Redox-active antibiotics control gene expression and community behavior in divergent bacteria. *Science* (80- ) 321:1203–1206.
46. Smircich P, Eastman G, Bispo S, Duhagon MA, Guerra-Slombo EP, Garat B, Goldenberg S, Munroe DJ, Dallagiovanna B, Holetz F, Sotelo-Silveira JR. 2015. Ribosome profiling reveals translation control as a key mechanism generating differential gene expression in Trypanosoma cruzi. *BMC Genomics* 16:443.
47. Dajas F, Rivera-Megret F, et al. 2003. Neuroprotection by flavonoids. *Brazilian J Med Biol Res* 36:1613–1620.
48. Dajas F, Juan Andres A-C, et al., 2013. Neuroprotective actions of flavones and flavonols: mechanisms and relationship to flavonoid structural features. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem (Formerly Curr Med Chem Nerv Syst Agents)* 13:30–35.
49. Dajas F, Abin-Carriquiry JA, et al., 2015. Quercetin in brain diseases: potential and limits. *Neurochem Int* 89:140–148.
50. Echeverry C, Arredondo F, et al. 2010. Pretreatment with natural flavones and neuronal cell survival after oxidative stress: a structure &#8722; activity relationship study. *J Agric Food Chem* 58:2111–2115.

51. Haichar F el Z, Santaella C, Heulin T, Achouak W. 2014. Root exudates mediated interactions belowground. *Soil Biol Biochem* 77:69–80.
52. Bais HPHPP, Weir TLTL, et al. 2006. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu Rev Plant Biol* 57:233–266.
53. Huang X-F, Chaparro JM, et al. 2014. Rhizosphere interactions: root exudates, microbes, and microbial communities 1. *Botany* 92:267–275.
54. Chen W, James EK, et al. 2003. Nodulation of *Mimosa* spp. by the beta-proteobacterium *Ralstonia taiwanensis*. *Mol Plant Microbe Interact* 16:1051–1061.
55. Deakin WJ, Broughton WJ. 2009. Symbiotic use of pathogenic strategies: rhizobial protein secretion systems. *Nat Rev Microbiol* 7:312–20.
56. Bernard CS, Brunet YR, et al. 2011. Regulation of type VI secretion gene clusters by sigma54 and cognate enhancer binding proteins. *J Bacteriol* 193:2158–67.
57. Black M, Moolhuijzen P, et al. 2012. The Genetics of Symbiotic Nitrogen Fixation: Comparative Genomics of 14 Rhizobia Strains by Resolution of Protein Clusters. *Genes (Basel)* 3:138–166.
58. Tampakaki AP. 2014. Commonalities and differences of T3SSs in rhizobia and plant pathogenic bacteria. *Front Plant Sci* 5:114.
59. Morel MA, Cagide C, et al. 2015. The Pattern of Secreted Molecules During the Co-Inoculation of Alfalfa Plants With *Sinorhizobium meliloti* and *Delftia* sp. strain JD2: An Interaction That Improves Plant Yield. *Mol Plant Microbe Interact* 28:134–42.
60. Rosconi F, Davyt D, et al 2013. Identification and structural characterization of serobactins, a suite of lipopeptide siderophores produced by the grass endophyte *Herbaspirillum seropedicae*. *Environ Microbiol* 15:916–27.
61. Vincent JM. 1970. A Manual for the Practical Study of Root-Nodule Bacteria International Biological Programme handbook IBP V.15. Blackwell Scientific Ltd., Oxford.
62. Ingolia NT, Ghaemmaghami S, et al. 2009. Genome-wide analysis in vivo of translation with nucleotide resolution using ribosome profiling. *Science (80- )* 324:218–223.
63. Ingolia NT, Brar GA, et al. 2012. The ribosome profiling strategy for monitoring translation in vivo by deep sequencing of ribosome-protected mRNA fragments. *Nat Protoc* 7:1534–1550.
64. Guo M, Feng H, Z et al., . 2009. Dissecting transcription regulatory pathways through a new bacterial one-hybrid reporter system 1–9.
65. Ingolia NT, Lareau LF, Weissman JS. 2011. Ribosome profiling of mouse embryonic stem cells reveals the complexity and dynamics of mammalian proteomes. *Cell* 147:789–802.
66. Steitz JA. 1969. Polypeptide chain initiation: nucleotide sequences of the three ribosomal binding sites in bacteriophage R17 RNA. *Nature* 224:957–964.
67. Li G-W, Oh E, Weissman JS. 2012. The anti-Shine–Dalgarno sequence drives translational pausing and codon choice in bacteria. *Nature* 484:538–541.
68. Vasquez J-J, Hon C-C, Vanselow JT, Schlosser A, Siegel TN. 2014. Comparative ribosome profiling reveals extensive translational complexity in different *Trypanosoma brucei* life cycle stages. *Nucleic Acids Res* 42:3623–3637.
69. Jensen BC, Ramasamy G, et al.,. 2014. Extensive stage-regulation of translation revealed by ribosome profiling of *Trypanosoma brucei*. *BMC Genomics* 15:911.
70. Stern-Ginossar N, Weisburd B, et al., . 2012. Decoding human cytomegalovirus. *Science (80- )* 338:1088–1093.
71. Qin D, Fredrick K. 2012. Analysis of polysomes from bacteria. *Methods Enzymol* 530:159–172.
72. Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. 2010. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 26:139–40.
73. Simons SP, McLellan TJ, et al. 2009. Purification of the large ribosomal subunit via its association with the small subunit. *Anal Biochem* 395:77–85.
74. Gao R, Yu K, et al., . 2016. Deep sequencing reveals global patterns of mRNA recruitment during translation initiation. *Sci Rep* 6:1–11.
75. Carvalho PC, Lima DB, et al., . 2015. Integrated analysis of shotgun proteomic data with PatternLab for proteomics 4.0. *Nat Protoc* 11:102–117.
76. Liu H, Sadygov RG, Yates JR. 2004. A model for random sampling and estimation of relative protein abundance in shotgun proteomics. *Anal Chem* 76:4193–4201.
77. Baraibar M a, Hyzewicz J, et al., . 2011. Oxidative stress-induced proteome alterations target different cellular pathways in human myoblasts. *Free Radic Biol Med* 51:1522–1532.
78. Martínez-García E, de Lorenzo V. 2011. Engineering multiple genomic deletions in Gram-negative bacteria: analysis of

the multi-resistant antibiotic profile of *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ Microbiol* 13:2702–16.

79. Silva-Rocha R, Martínez-García et al. 2013. The Standard European Vector Architecture (SEVA): a coherent platform for the analysis and deployment of complex prokaryotic phenotypes. *Nucleic Acids Res* 41:D666–D675.

## **Licenciamiento**

Reconocimiento 4.0 Internacional. (CC BY)