

Caracterización molecular de los mecanismos que regulan la transferencia conjugativa de plásmidos en rizobios

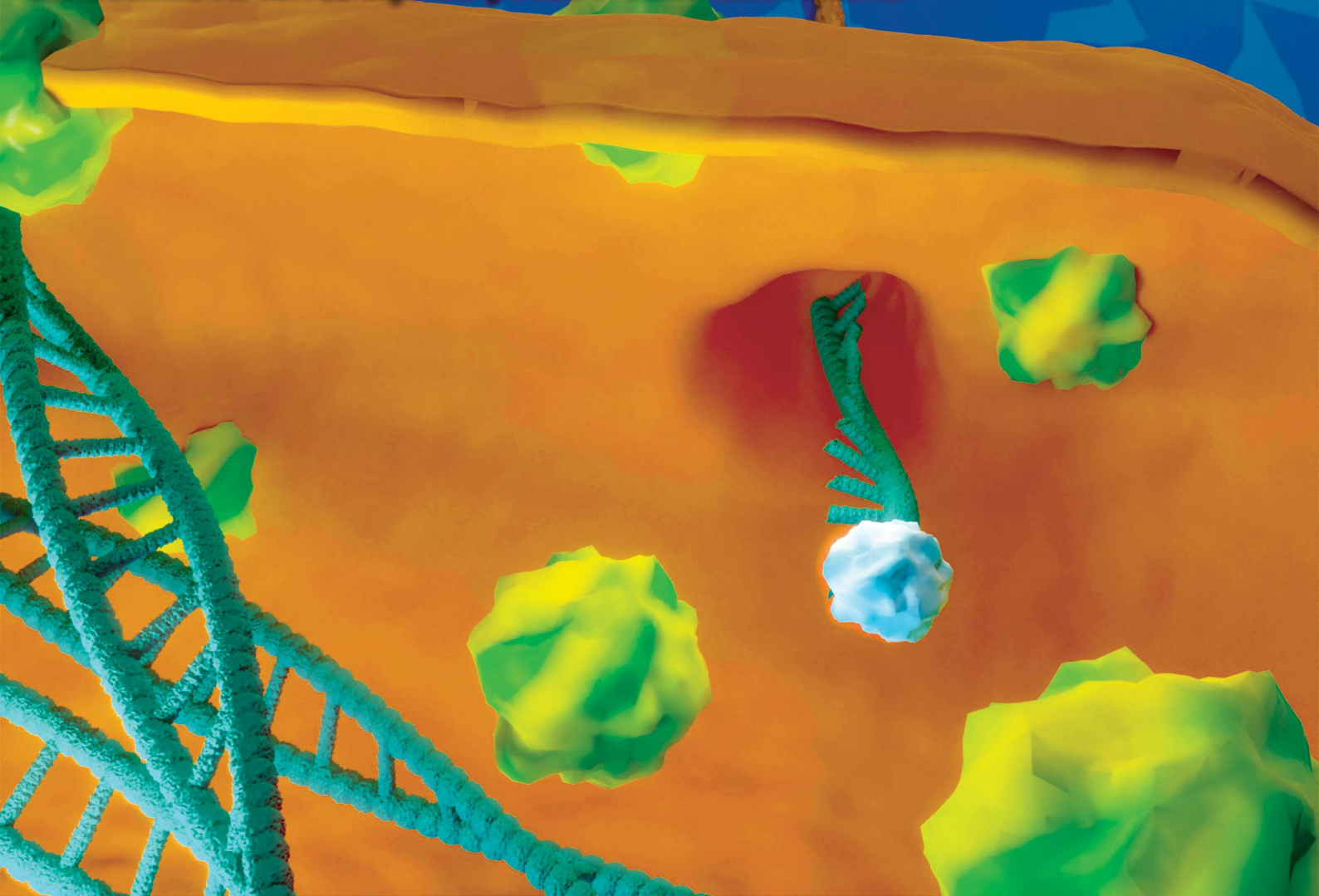
Lic. Lucas Gabriel Castellani

Trabajo de Tesis Doctoral

Año 2021

Directores:

Dr. Gonzalo A. Torres Tejerizo y Prof. Dr. Mariano Pistorio





UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral:

“Caracterización molecular de los mecanismos que regulan la transferencia conjugativa de plásmidos en rizobios”

Tesista: Lic. Lucas Gabriel Castellani

**Directores: Dr. Gonzalo A. Torres Tejerizo y
Prof. Dr. Mariano Pistorio**

Año: 2021

El presente trabajo ha sido realizado en el Instituto de Biotecnología y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, bajo la dirección del Dr. Gonzalo Torres Tejerizo y del Prof. Dr. Mariano Pistorio.

Reconocimientos

A la Universidad Nacional de La Plata, por formarme desde los 3 años, cuando tuve la suerte de ingresar a la Escuela Graduada "Joaquín V. González".

Al Instituto de Biotecnología y Biología Molecular (IBBM) y a la Facultad de Ciencias Exactas, por haberme brindado el lugar y los equipos para desarrollar este trabajo.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por el otorgamiento de la beca que posibilitó mi dedicación a la investigación científica.

Al CeBiTec de la Universidad de Bielefeld y a la DAAD, por brindarme la posibilidad de realizar una estadía en Alemania.

A mis directores de tesis, Dr. Gonzalo Torres Tejerizo y Prof. Dr. Mariano Pistorio, por brindarme todas las herramientas necesarias para crecer en lo profesional y en lo personal.

Agradecimientos

A mis viejos, por acompañarme y bancarme siempre con cada decisión, y por alegrarse por cada logro alcanzado. También por el esfuerzo de entender qué significa un rizobio, y por compartir mi alegría durante mi estadía en Bielefeld, o como ellos dicen, Bilfest.

A Caro, mi Chica Lunar, por acompañarme en gran parte de este trayecto, y ser siempre mi cable a tierra. Por siempre usar cada linda noticia como excusa para salir a festejar. Por cantar y tornarse en luz.

A Gala, mi perra salame, por transmitirme su alegría todos los días. A Uva, mi perra inteligente, por entretener a mi mamá a lo largo de este proceso.

A mis directores, Mariano y Gon, por enseñarme, aconsejarme y acompañarme en mi formación científica. Por generar el mejor ambiente de trabajo. Por tratarme como un colega desde el primer día. Por hacerme sentir como un amigo hasta el último.

A todos los integrantes de RPS que fueron parte de mi estadía en el laboratorio. Los que partieron hacia otros rumbos, los que se quedaron, y los que llegaron. A Ile y a Yuli por adoptarme en los primeros días. A Florcita, por decir siempre sí a cualquier evento vinero o malafamero. A mis compañeras del turno mañana en los últimos días, Carito, Sofi y Abru (la nueva generación), por su apoyo en esta etapa complicada. Al colorado, por ser de esos amigos delincuentes que tan bien hacen. A Abru de nuevo, por aceptar mi tutoría en sus primeros pasos, y por convertirse en una colega increíble (y ayudarme con todos mis últimos experimentos).

A todos los integrantes del IBBM, por compartir charlas, birras, fiestas, frustraciones, alegrías y experimentos. Muchas veces todo en el mismo momento.

A las chicas de City Bell; Chari, Maius y Paz; por ser unas amigas increíbles, y por siempre tener un *“qué bien amigo!!!”* para cada charla.

A Juan y Santi, por su amistad. Por escucharme siempre con un vino de por medio. Por bancarme en este mismo momento, cocinando y haciendo compras mientras escribo estas líneas.

Y para no olvidarme de nadie, a todo el resto de las personas que me acompañaron, ya sea diciendo *“qué interesante lo que hacés!!!”*, o preguntando *“y eso para qué sirve?”*.

Índice General

Capítulo I. Introducción	- 1 -
I.1 Introducción	- 3 -
I.2 Transferencia horizontal de genes	- 3 -
-Transducción.....	- 3 -
-Transformación.....	- 4 -
-Conjugación	- 5 -
I.3 Rizobios	- 8 -
I.4 Estructura genética de los rizobios	- 8 -
-Plásmidos simbióticos.....	- 8 -
-Plásmidos crípticos	- 9 -
I.5 Sistemas conjugativos en rizobios	- 10 -
-Sistemas Dtr presentes en rizobios.....	- 10 -
-Sistemas Mpf presentes en rizobios	- 11 -
I.6 Regulación de la transferencia plasmídica en rizobios	- 13 -
- <i>Quorum sensing</i>	- 14 -
- <i>rctA/rctB</i>	- 14 -
-Otros	- 15 -
I.7 <i>Rhizobium favelukesii</i>	- 17 -
I.8 Objetivos	- 19 -
-Consideraciones generales	- 19 -
-Objetivo general	- 19 -
-Objetivos específicos	- 19 -
Capítulo II. Materiales y métodos.	- 21 -
II.1 Técnicas microbiológicas	- 23 -
II.1.a Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo	- 23 -
II.1.b Plásmidos utilizados en este trabajo.....	- 27 -
II.1.c Medios de cultivo y de conservación de los microorganismos.	- 29 -
II.2 Procedimientos microbiológicos.....	- 31 -
II.2.a Recuento de bacterias en medios líquidos	- 31 -
II.2.b Conjugaciones biparentales	- 31 -
II.2.c Conjugaciones triparentales.....	- 32 -
II.2.d Preparación de células electrocompetentes. Electrotransformación de <i>E. coli</i>	- 32 -
II.2.e Evaluación de la estabilidad plasmídica	- 33 -
II.3 Técnicas de biología molecular	- 33 -
II.3.a Preparación de DNA plasmídico en pequeña escala (minipreps)	- 33 -
II.3.b Extracción de DNA total	- 33 -
II.3.c Electroforesis de DNA.....	- 34 -
II.3.c.1. Geles de lisis <i>in situ</i>	- 34 -
II.3.c.2. Separación e identificación de fragmentos de restricción o de amplificación por PCR mediante electroforesis en geles de agarosa.	- 34 -
II.3.c.3. Revelado de geles y fotografía.	- 35 -
II.3.c.4. Estimación de los pesos moleculares de fragmentos de restricción por electroforesis en gel de agarosa... ..	- 35 -
II.3.c.5. Extracción de fragmentos de DNA de geles de agarosa.....	- 35 -
II.3.c.6. Precipitación del DNA con etanol.....	- 35 -
II.3.d Tratamientos enzimáticos del DNA.....	- 35 -
II.3.e Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	- 36 -
II.3.f Construcción de mutantes por recombinación homóloga simple.....	- 38 -
II.3.g Construcción de mutantes delecionales por doble recombinación homóloga.....	- 39 -
II.3.h Construcción de plásmidos para complementar las cepas mutantes.....	- 39 -

II.3.i Construcción de fusiones traduccionales a His-tag y GFP	- 39 -
II.3.k Medida de la fluorescencia de cepas conteniendo fusiones transcripcionales a GFP	- 40 -
II.4 Detección de AHLs	- 40 -
II.5 Análisis metabolómico	- 40 -
II.6 Análisis transcriptómico (<i>RNA-Seq</i>)	- 41 -
II.7 Técnicas utilizadas para los análisis proteómicos	- 41 -
II.7.a. Extracción de proteínas totales.....	- 41 -
II.7.b. Fraccionamiento subcelular para separar proteínas citosólicas y de membrana.....	- 42 -
II.7.c. Cuantificación de proteínas mediante el método de Bradford.....	- 42 -
II.7.d. Análisis de proteínas mediante geles de poliacrilamida discontinuos en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)	- 43 -
II.7.e. Ensayos de western blot	- 43 -
II.8 Microscopía.....	- 44 -
II.9 Programas estadísticos y análisis bioinformático	- 44 -
Capítulo III. Búsqueda de posibles nuevos mecanismos regulatorios de la conjugación	- 47 -
III.1 Introducción.....	- 49 -
III.2 Caracterización genética del plásmido pLPU83a	- 50 -
III.3 Distribución filogenética de homólogos a <i>traR</i>	- 51 -
III.4 Características generales de la organización genética según el grupo de plásmidos	- 52 -
III.5 Estudio de la transferencia de pLPU83a en ausencia de AHLs.....	- 54 -
III.6 Ensayos de respuesta a QS.....	- 56 -
Capítulo IV. Análisis de los genes LPU83a_0145, LPU83a_0146 y LPU83a_0148.....	- 59 -
IV.1 Introducción.....	- 61 -
IV.2 Distribución taxonómica de los genes	- 61 -
IV.3 Distribución filogenética de LPU83a_0146 y LPU83a_0148	- 63 -
IV.4 Análisis bioinformático de los genes	- 64 -
IV.5 Organización genética de los genes hipotéticos.....	- 66 -
IV.6 Construcción y evaluación de los mutantes	- 67 -
IV.7 Complementación de los mutantes.....	- 69 -
Capítulo V. Estudio de la transferencia del plásmido pLPU83a y sus derivados mutantes desde diferentes entornos genéticos.....	- 73 -
V.1 Introducción.....	- 75 -
V.2 Estudio de la transferencia del plásmido pLPU83a desde entornos genómicos sin homólogos a LPU83a_0146 y LPU83a_0148.....	- 75 -
V.3 Estudio de la transferencia del plásmido pLPU83a desde entornos genómicos con homólogos a LPU83a_0146 y LPU83a_0148.....	- 77 -
V.3.1 Estudio de la transferencia de plásmidos con genes homólogos	- 77 -
V.3.2. Análisis de complementación de los mutantes en LPU83a_0146 y LPU83a_0148 por el entorno	- 79 -
V.4 Complementación heteróloga de LPU83a_0146.....	- 81 -
Capítulo VI. Análisis metabolómico y transcriptómico de los mutantes en los genes LPU83a_0145, LPU83a_0146 y LPU83a_0148.....	- 83 -
VI.1 Introducción.....	- 85 -
VI.2 Selección de las condiciones óptimas de los cultivos para la preparación de las muestras a analizar.....	- 85 -
VI.3 Análisis de los mutantes mediante metabolómica.....	- 86 -
VI.4 Análisis de los mutantes mediante RNAseq	- 89 -
VI.5 Detección de inicios de transcripción de los clusters de genes conjugativos.....	- 93 -
VI.6 Correlación entre los datos transcriptómicos y el fenotipo de los mutantes.....	- 95 -
Capítulo VII. Aproximaciones para comprender el mecanismo de acción de LPU83a_0146 y LPU83a_0148..	- 97 -
VII.1 Introducción.....	- 99 -
VII.2 Estabilidad de los plásmidos mutantes.....	- 99 -
VII.3 Efecto de la delección de <i>traMa</i>	- 100 -
VII.4 Efecto de la delección de <i>traR</i>	- 101 -
VII.5 Ensayos de interacción entre LPU83a_0146 y la región intergénica entre <i>traR</i> y LPU83a_0148.....	- 101 -

VII.6 Localización celular de LPU83a_0145, LPU83a_0146 y LPU83a_0148.....	- 105 -
VII.6.a. Ensayos de localización celular mediante western-blot.....	- 106 -
VII.6.b. Ensayos de localización celular mediante microscopía de fluorescencia.....	- 107 -
Capítulo VIII. Discusión general, conclusiones y perspectivas.....	- 111 -
VIII.1. Discusión general.....	- 113 -
VIII.2. Conclusiones.....	- 120 -
VIII.3. Perspectivas.....	- 120 -
Bibliografía.....	- 123 -

Índice de Figuras

Figura I.1. Principales mecanismos de HGT	- 5 -
Figura I.2. Esquema general de la conjugación.....	- 7 -
Figura I.3. Organización genética de los diferentes sistemas de Dtr	- 12 -
Figura I.4. Estructura del T4SS de <i>A. tumefaciens</i>	- 13 -
Figura I.5. Mecanismos que regulan la transferencia conjugativa en rizobios	- 16 -
Figura I.6. Organización genética de las regiones involucradas en conjugación de plásmidos del grupo I	- 18 -
Figura III.1. Esquema del plásmido pLPU83a y análisis de la secuencia mediante matriz de puntos.....	- 51 -
Figura III.2. Árbol filogenético basado en TraR.....	- 53 -
Figura III.3. Organización estructural de las regiones de transferencia de cada grupo de plásmidos.....	- 54 -
Figura III.4. Cromatografía de capa fina para detección de AHLs	- 55 -
Figura III.5. Evaluación de la relación entre la frecuencia conjugativa y la densidad óptica del cultivo donador.....	- 57 -
Figura IV.1. Distribución taxonómica de genes homólogos a LPU83a_0145, LPU83a_0146 y LPU83a_0148..	- 62 -
Figura IV.2. Árboles filogenéticos de LPU83a_0146 y LPU83a_0148.....	- 65 -
Figura IV.3. Predicción de dominios transmembrana de la proteína codificada por LPU83a_0148.....	- 66 -
Figura IV.4. PCRs diseñadas para determinar una posible estructura de operón.	- 67 -
Figura IV.5. Obtención de cepas mutantes.....	- 68 -
Figura IV.6. Frecuencias conjugativas obtenidas para la transferencia del plásmido salvaje y sus derivados mutantes.	- 69 -
Figura IV.7. Frecuencias conjugativas correspondientes a la complementación de los mutantes.....	- 70 -
Figura IV.8. Frecuencias conjugativas correspondientes a la sobreexpresión de los genes LPU83a_0145, LPU83a_0146 y LPU83a_0148.....	- 71 -
Figura V.1. Transferencia del plásmido pLPU83a y derivados mutantes desde diferentes entornos genómicos.....	- 78 -
Figura V.2. Análisis de la transferencia de los plásmidos pLPU88a y pDD12c	- 79 -
Figura V.3. Análisis de la transferencia de pLPU83a desde entornos con genes homólogos a LPU83a_0146 y LPU83a_0148.....	- 81 -
Figura V.4. Ensayo de complementación heteróloga de <i>R. favelukesii</i> LPU83-13 Δ LPU83a_0146 por el gen LPU88a_0146.....	- 82 -
Figura VI.1. Comparación de la frecuencia conjugativa de la cepa salvaje y el mutante en pLPU83_0146 a diferentes DOs.....	- 86 -
Figura VI.2. Análisis metabólico de las muestras.....	- 88 -
Figura VI.3. <i>Heatmap</i> de las cepas secuenciadas.....	- 90 -
Figura VI.4. Expresión diferencial de genes en la cepa mutante en LPU83a_0146	- 93 -
Figura VI.5. Detección de TSS en la región conjugativa de pLPU83a	- 94 -
Figura VII.1 Estabilidad del plásmido pLPU83a y sus derivados mutantes	- 100 -
Figura VII.2. Efecto de la delección de <i>traMa</i> sobre las cepas salvaje y mutante en LPU83a_0146.....	- 101 -
Figura VII.3. Esquema del ensayo de interferencia transcripcional mediada por LPU83a_0146	- 102 -
Figura VII.4. Resultados del ensayo de interferencia transcripcional mediada por LPU83a_0146	- 103 -
Figura VII.5. Esquema del ensayo diseñado para evaluar la actividad de la región promotora del gen traR. -	104 -
Figura VII.6. Resultados de los ensayos utilizando la fusión transcripcional entre la región promotora de traR y el gen que codifica la GFP	- 105 -
Figura VII.7. Ensayo de complementación utilizando las fusiones a His-tag y GFP.....	- 106 -
Figura VII.8. Extracción de fracciones proteicas y ensayo de localización celular mediante western-blot.	- 107 -
Figura VII.9. Ensayo de localización celular mediante microscopía de fluorescencia.....	- 108 -
Figura VII.10. Ensayo de co-localización de las proteínas codificadas por LPU83a_0146 y LPU83a_0148 mediante microscopía de fluorescencia	- 109 -
Figura VIII.1. Posibles modelos de funcionamiento de las proteínas codificadas por LPU83a_0146 y LPU83a_0148.	- 119 -

Índice de Tablas

Tabla II.1. Cepas bacterianas utilizadas en el presente trabajo.....	- 23 -
Tabla II.2. Plásmidos utilizados en el presente trabajo.....	- 27 -
Tabla II.3. Medios de cultivo utilizados en el presente trabajo.....	- 30 -
Tabla II.4. Lista de primers utilizados en el presente trabajo.....	- 36 -
Tabla VI.1. Resultados del secuenciamiento, procesamiento y mapeo de lecturas.....	- 89 -
Tabla VI.2. Genes expresados diferencialmente en los mutantes en LPU83-13 Δ LPU83_0145, LPU83-13 Δ LPU83_0148 y LPU83-13 Δ LPU83_0146.....	- 92 -

Publicaciones relacionadas a este trabajo.

Durante la realización de este Trabajo de Tesis Doctoral, parte de los resultados se publicaron en un artículo:

-"Insight into the structure, function and conjugative transfer of pLPU83a, an accessory plasmid of *Rhizobium favelukesii* LPU83". Castellani LG, Nilsson JF, Wibberg D, Schlüter A., Pühler A., Brom S., Pistorio M. y Torres Tejerizo G. *Plasmid* 2019. doi: 10.1016/j.plasmid.2019.03.004.

En paralelo, se realizaron colaboraciones relacionadas a la temática de esta tesis que también fueron publicadas:

"Proteomic Analysis of *Rhizobium favelukesii* LPU83 in Response to Acid Stress". Nilsson JF, Castellani LG, Draghi WO, Pérez-Giménez J, Torres Tejerizo G, Pistorio M. *Plasmid. J Proteome Res* 2019. doi: 10.1021/acs.jproteome.9b00275.

"Genome sequence of *Bradyrhizobium yuanmingense* strain P10 130, a highly efficient nitrogen-fixing bacterium that could be used for *Desmodium incanum* inoculation" Toniutti, M.A., Albicoro, F.J., Castellani, LG., López García, S.L., Fornasero, L.V., Zuber, N.E., Vera, L.M., Vacca, C., Cafiero, J.H., Winkler, A., Kalinowski, J., Lagares, A., Torres Tejerizo, G. y Del Papa, M.F. *Gene* 2020. doi: 10.1016/j.gene.2020.145267.

-"Transfer of the Symbiotic Plasmid of *Rhizobium etli* CFN42 to Endophytic Bacteria Inside Nodules". Bañuelos-Vazquez L, Cazares, D., Rodríguez, S., Cervantes-De la Luz, L., Sánchez-López, R., Castellani, LG, Torres Tejerizo, G. y Brom S. *Frontiers in Microbiology* 2020. doi: 10.3389/fmicb.2020.01752.

-"Role of plant compounds in the modulation of the conjugative transfer of pRet42a". Bañuelos-Vazquez, L.A., Castellani LG, Luchetti A, Romero D, Torres Tejerizo, G. y Brom, S. *PLoS ONE* 2020. doi: 10.1371/journal.pone.0238218.

-"Global transcriptome analysis of *Rhizobium favelukesii* LPU83 in response to acid stress" Nilsson JF, Castellani LG, Draghi WO, Mogro E, Wibberg D, Winkler A, Hansen L., Schlüter A., Pühler A., Kalinowski J., Torres Tejerizo G y Pistorio M. *FEMS Microbiology Ecology* 2021. doi: 10.1093/femsec/fiaa235.

-"Exopolysaccharide Characterization of *Rhizobium favelukesii* LPU83 and Its Role in the Symbiosis With Alfalfa" Castellani LG, Luchetti A, Nilsson JF, Pérez-Giménez J, Wegener C, Schlüter A., Pühler A., Lagares A., Brom S., Pistorio M, Niehaus K. y Torres Tejerizo G. *Frontiers in Plant Science* 2021. doi: 10.3389/fpls.2021.642576.

Abreviaturas.

AHLs:	Acil Homoserina Lactonas
Amp:	Ampicilina
bv.:	biovariedad
DNA:	Ácido Desoxirribonucleico
DO:	Densidad Óptica
EPS:	Exopolisacárido bacteriano
FBN:	Fijación Biológica de Nitrógeno
GFP:	Proteína verde fluorescente
Gm:	Gentamicina sulfato
HGT:	Transferencia Horizontal de genes, Horizontal Gene Transfer
Km:	Kanamicina sulfato
Nm:	Neomicina sulfato
PCR:	“Polymerase Chain Reaction”, reacción en cadena de la polimerasa.
QS:	<i>Quorum Sensing</i>
RNA:	Ácido Ribonucleico
Sm:	Estreptomomicina
Sp:	Espectinomomicina
TC:	Transferencia conjugativa
Tc:	Tetraciclina
u.f.c.:	unidades formadoras de colonias bacterianas.
wt:	Tipo salvaje
X-gal:	5-bromo-4cloro-3indolil- β -galactopiranósido

Capítulo I. Introducción

I.1 Introducción

A lo largo de la evolución biológica, las células primitivas han adquirido la capacidad de llevar a cabo diversas funciones metabólicas, logrando adaptarse y sobrevivir bajo condiciones desfavorables (Ochman *et al.*, 2000). La evolución bacteriana, principalmente conducida por recombinación, transferencia vertical de genes y transferencia horizontal de genes (HGT, *horizontal gene transfer*), ha permitido que algunos microorganismos desarrollen la capacidad de interactuar de diferentes maneras con otros organismos, incluso organismos multicelulares, haciendo uso de los recursos provistos por las células hospedadoras (Ochman & Moran, 2001). En particular, se ha vuelto de gran importancia el estudio de bacterias patógenas de plantas y animales. Asimismo, se ha prestado atención en el estudio de microorganismos capaces de relacionarse simbióticamente con organismos eucariotas. Dentro de este último grupo se encuentran los rizobios, bacterias capaces de establecer una relación simbiótica con las raíces de plantas leguminosas. Esta interacción ha despertado interés en el ámbito de la agricultura, ya que el uso de estos microorganismos permite mejorar notablemente el rendimiento de los cultivos. Los rizobios son capaces de proveer a las plantas hospedadoras el nitrógeno que las mismas requieren para su desarrollo (Peoples & Herridge, 1990, Peoples & Craswell, 1992, Roy *et al.*, 2020). De esta forma, el uso de estos microorganismos permite mejorar el rendimiento de los cultivos en suelos deficientes en nitrógeno sin necesidad de recurrir al uso de fertilizantes sintetizados químicamente, los cuales generan un gran daño al ambiente.

I.2 Transferencia horizontal de genes

La HGT ha sido definida como una de las principales responsables de la evolución y adaptación bacteriana (Soucy *et al.*, 2015). En muchos casos, la capacidad de incorporar DNA de otro organismo le confiere a la célula receptora determinadas características codificadas en el mismo. Una adquisición exitosa de genes requiere, además de la transferencia e incorporación del DNA, el mantenimiento de los genes adquiridos dentro del linaje celular. Para esto, la selección natural debe actuar sobre aquellas características que resultan de utilidad para la célula receptora (Ochman & Moran, 2001). Entre las características que resultan de utilidad para las células, es posible mencionar aquellas involucradas en la adaptación a diferentes entornos o en la respuesta a condiciones adversas. Como ejemplos de características adquiridas debido a HGT y mantenidas por generaciones, es posible mencionar la adquisición de genes que confieren resistencia a antibióticos, nuevas vías metabólicas y determinantes de patogenicidad o simbiosis, entre otros (Groisman & Ochman, 1997, Chistoserdova *et al.*, 1998, Gogarten *et al.*, 2002, Bailly *et al.*, 2007).

Existen tres mecanismos principales de HGT: transformación, transducción y conjugación. Además, en los últimos años se han descrito algunos mecanismos particulares como agentes de transferencia de genes (GTA, *gene transfer agent*), islas cromosomales inducibles por fagos (PICI, *phage-inducible chromosomal islands*), transferencia mediante vesículas de membrana, nanotubos o autólisis (García-Aljaro *et al.*, 2017). La transformación es la adquisición de material genético desnudo desde el medio extracelular. En la transducción, la transferencia del material genético es llevada a cabo por fagos. La conjugación es el proceso mediante el cual los plásmidos y los elementos conjugativos integrativos (ICEs, *integrative conjugative elements*) se transfieren desde una célula donadora a una célula receptora, para lo cual es requerido el contacto físico entre ambas.

-Transducción

La transferencia de material genético mediante transducción se realiza mediante fagos (figura I.1A), los cuales pueden empaquetar aleatoriamente material genético de una bacteria, y

transferirlo hacia otra al inyectar su propio material genético (Miller, 2004). El proceso de transducción puede llevarse a cabo mediante tres mecanismos diferentes. Por un lado, en la transducción generalizada, fagos defectivos conteniendo únicamente material genético de la bacteria donde fueron generados, infectan una nueva célula, depositando todo el material genético. Las moléculas de DNA pueden ser incorporadas al genoma mediante recombinación, o pueden ser mantenidas como elementos auto-replicativos, si codifican los genes necesarios. En la transducción especializada, la escisión incorrecta del fago genera una partícula viral conteniendo el material genético del fago, pero también partes del DNA bacteriano ubicado en la región de integración del fago. Por lo tanto, al infectar una nueva célula, el fago introducirá su propio material genético, pero también parte del DNA de la bacteria donde se hospedó. Por último, la transducción puede ser abortiva, en donde las secuencias bacterianas empaquetadas por el fago no son capaces de integrarse al genoma de la nueva célula. Por este motivo, es posible detectar la expresión de los genes adquiridos únicamente en los primeros ciclos celulares, ya que, al cabo de algunos ciclos de replicación, las secuencias de DNA que no sean replicadas por la maquinaria celular se perderán.

-Transformación

La transformación (figura I.1B) implica la incorporación estable de DNA extracelular y la recombinación del mismo, pudiendo ser replicado y expresado de la misma forma que el material genético propio de la célula. Para que la transformación ocurra, las bacterias deben desarrollar un estado fisiológico específico, denominado estado de competencia, para el cual es necesaria la inducción de entre 20 y 50 proteínas (Thomas & Nielsen, 2005). En la mayoría de los casos, el estado de competencia se genera en respuesta a una determinada condición, como puede ser una falta de nutrientes, cambios en la velocidad de crecimiento o una determinada densidad celular (Johnston *et al.*, 2014). Si bien no todas las bacterias son capaces de incorporar DNA mediante este mecanismo, evidencia experimental muestra que más de 80 especies pueden desarrollar el estado de competencia naturalmente, incluyendo bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (Blokesch, 2016). Además del estado de competencia, el proceso necesita de la presencia de DNA en el medio en el cual las bacterias competentes se encuentran. Dicho DNA proviene, generalmente, de bacterias muertas en descomposición, aunque también se han descrito mecanismos de secreción de DNA desde bacterias vivas (Lorenz & Wackernagel, 1994, Moscoso & Claverys, 2004). Una vez liberado al ambiente, la estabilidad de las moléculas de DNA dependerá de las condiciones del entorno. Experimentos en donde se agrega DNA a diferentes entornos han demostrado que su degradación no es inmediata, pudiendo mantenerse estable por horas, o incluso días (Baur *et al.*, 1996, Nielsen *et al.*, 1997). Luego de darse el contacto entre la célula competente y el DNA extracelular, éste se une a sitios de la superficie celular. Para la translocación del DNA, el mismo es convertido a simple cadena (Chen & Dubnau, 2004). La estabilidad del DNA introducido a la célula dependerá de la capacidad para recombinarse con el material genético propio de la bacteria transformada.

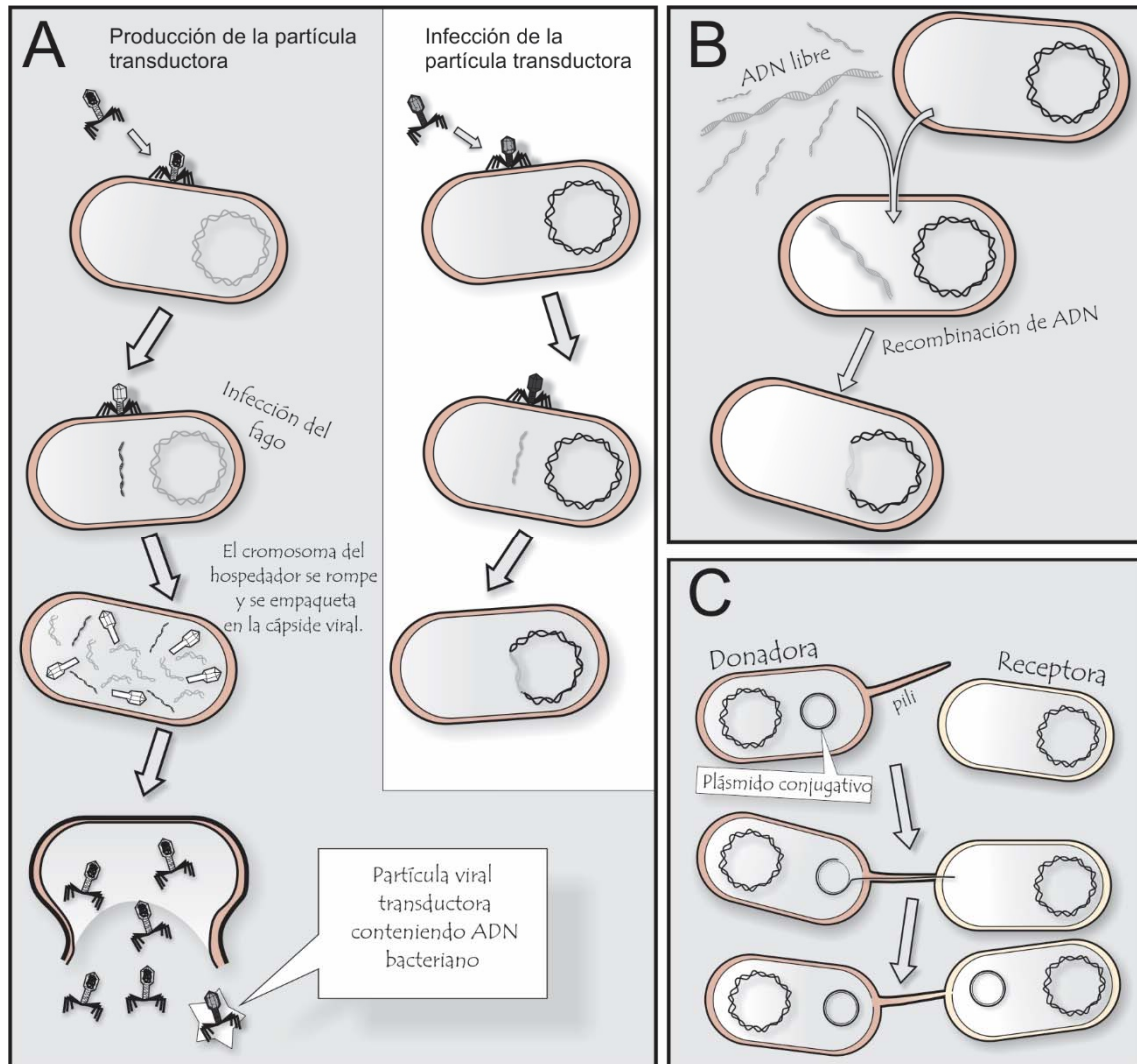


Figura I.1. Principales mecanismos de HGT. A. Transducción. B. Transformación. C. Conjugación. Adaptado de (Torres Tejerizo *et al.*, 2010).

-Conjugación

La transferencia conjugativa (TC) de genes o conjugación (figura I.1C) es considerada como la principal causa de HGT en la naturaleza. Consiste en la transferencia de material genético codificado en elementos extracromosomales, denominados plásmidos, o elementos integrados en el cromosoma, llamados elementos integrativos y conjugativos (ICE, *integrative and conjugative elements*), desde una célula donadora hacia una célula receptora. Como se mencionó previamente, para que el proceso tenga lugar, es necesario el contacto físico entre ambas células. Además, se requiere de una sofisticada maquinaria, encargada del reconocimiento y procesamiento del DNA, y de la formación del aparato mediante el cual se transferirá el material genético. El proceso completo puede entenderse mediante tres pasos: el reconocimiento (figura I.2, etapa 1) y procesamiento del DNA (figura I.2, etapa 2), el reclutamiento del DNA (figura I.2, etapa 3) y la translocación hacia la célula receptora (figura I.2, etapa 4) (Alvarez-Martinez & Christie, 2009). En el primer paso, las proteínas de reconocimiento y procesamiento del DNA (Dtr, *DNA transfer and replication*) se unen a una secuencia de DNA codificada en el mismo plásmido, denominada *oriT* (origen de transferencia). Dentro del conjunto de proteínas que forman el Dtr se encuentra la relaxasa, la cual

posee una actividad fosfodiesterasa encargada de clivar la hebra de DNA a ser transferida (hebra T) en la región del *oriT*. Luego del corte, la relaxasa permanece unida al extremo 5' de la hebra T, formando un complejo DNA-relaxasa, el cual es llamado relaxosoma (Alvarez-Martinez & Christie, 2009). Por otro lado, ocurre el ensamblaje del poro conjugativo, llevado a cabo por proteínas del Mpf (*mating pair formation*). El mismo consiste en un sistema de secreción tipo 4 (T4SS, *type 4 secretion system*), mediante el cual se transferirá el material genético. Dentro del mismo *cluster* de genes del Mpf se encuentran aquellos involucrados en la formación del pili conjugativo (Aly & Baron, 2007), importante para la adhesión entre la célula donadora y la célula receptora (Clarke *et al.*, 2008). Para que el relaxosoma pueda entrar en contacto con el T4SS es necesaria la presencia de una proteína, denominada proteína acopladora (CP, *coupling protein*). Esta proteína es la encargada de reclutar el relaxosoma hacia el T4SS, formando un complejo de pre-iniciación. El mismo permanece inactivo, hasta que el pili logra conectar con una célula receptora, dando inicio a la transferencia (Waksman, 2019). Una vez que el DNA simple cadena se encuentra en la célula receptora, la misma relaxasa que generó el corte en el *oriT* y se mantuvo unida al extremo 5', es la encargada de juntar los dos extremos del DNA y unirlos mediante una reacción *end-joining*. De esta forma, la célula receptora adquiere una copia circular simple cadena del plásmido, lista para ser replicada (figura 1.2, etapa 5).

De acuerdo a los componentes necesario para la conjugación que un plásmido codifique, puede ser clasificado en diferentes categorías. Para dicha clasificación se ha utilizado la presencia de Dtr y/o Mpf (Ding & Hynes, 2009). De esta forma, son catalogados como auto-transmisibles o conjugativos los plásmidos que poseen un *oriT*, codifican una relaxasa capaz de reconocer esta secuencia junto con las proteínas del Dtr necesarias para este proceso y que además codifican los elementos del Mpf encargados de la formación del poro conjugativo. Son catalogados como movilizables (transmisibles) aquellos plásmidos que cuentan con *oriT* y elementos del Dtr, pero carecen de Mpf. Este tipo de plásmidos puede ser transferido en presencia de un plásmido que le aporte los elementos del Mpf necesarios para ser movilizado (plásmido de ayuda, *helper*). Los plásmidos que no cuentan con los genes necesarios para ser transferidos, aún en presencia de un plásmido *helper*, son clasificados como plásmidos no movilizables (Smillie *et al.*, 2010). Algunos plásmidos (que pueden codificar genes conjugativos o no) pueden ser transferidos al formar un co-integrado con otro plásmido que posea los genes necesarios para la transferencia, como es el caso del plásmido pRetCFN42d, cuya transferencia es llevada a cabo por la integración con el plásmido pRetCFN42a (Brom *et al.*, 2004). En algunos casos, se ha observado que la sola presencia de un *oriT* permite la transferencia de un plásmido en presencia de los elementos faltantes (Perez-Mendoza *et al.*, 2006, Torres Tejerizo *et al.*, 2014). Cabe mencionar que los entornos genéticos también juegan un rol clave en la transferencia plasmídica (Pistorio *et al.*, 2013, Torres Tejerizo *et al.*, 2014, Banuelos-Vazquez *et al.*, 2017).

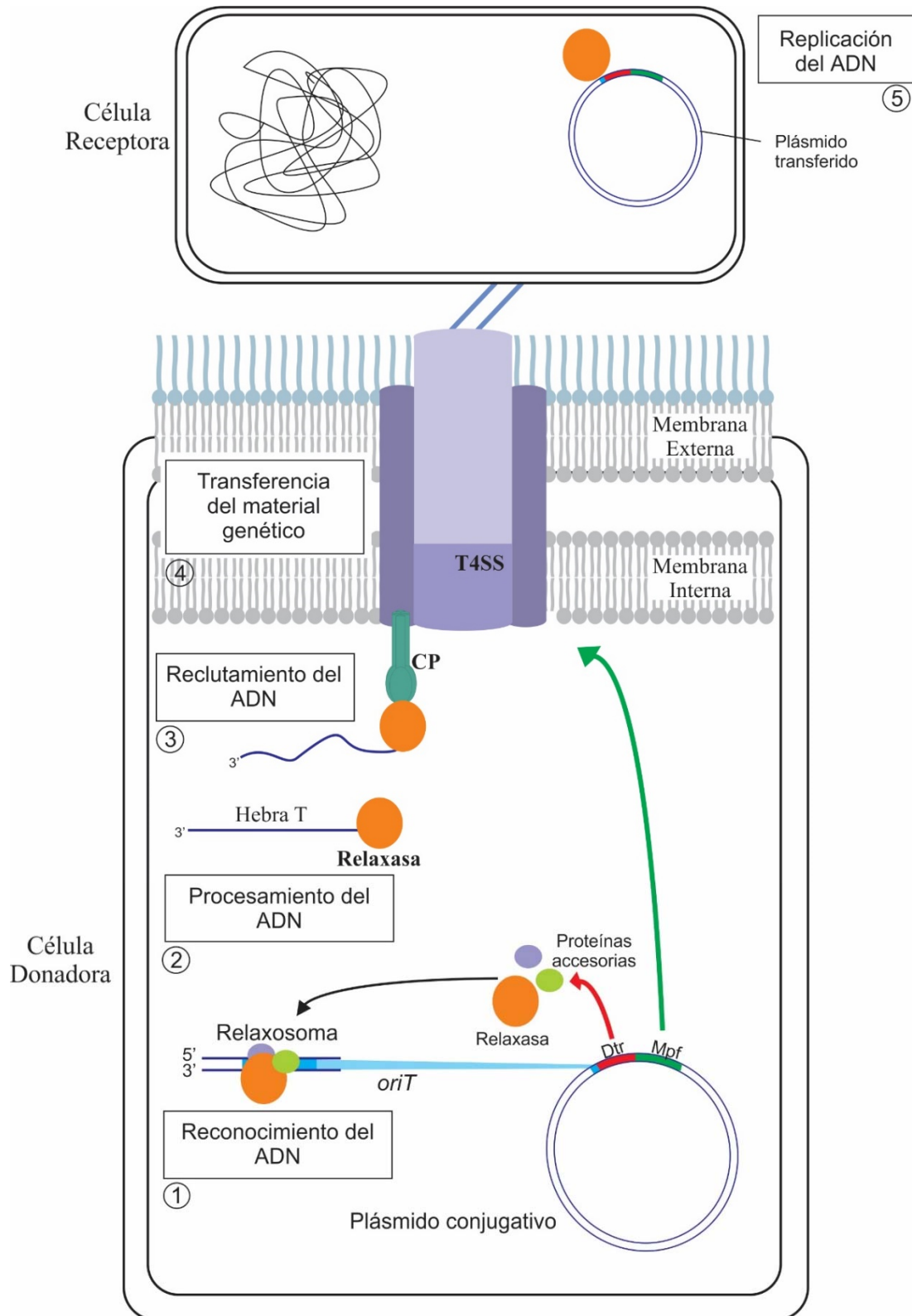


Figura I.2. Esquema general de la conjugación. 1. Reconocimiento del origen de transferencia por parte de la relaxasa. 2. Generación del DNA simple cadena a ser transferido (hebra T) mediante el clivaje de una hebra en el origen de transferencia. 3. Reclutamiento del DNA hacia el T4SS por parte de la proteína acopladora. 4. Transferencia del plásmido simple cadena. 5. Re-circularización y replicación del material genético transferido. Adaptada de (Alvarez-Martinez & Christie, 2009)

I.3 Rizobios

Los rizobios son bacterias que pertenecen a las α -y β -proteobacterias. Estas bacterias habitan en el suelo en vida libre pero también son capaces de interactuar simbióticamente con las raíces de plantas leguminosas (Masson-Boivin *et al.*, 2009, Gyaneshwar *et al.*, 2011). Las bacterias pertenecientes a este conjunto se caracterizan por reconocer e intercambiar señales con células pertenecientes a las raíces de plantas leguminosas, logrando el ingreso a las mismas y la colonización luego de dicha comunicación (Niehaus & Becker, 1998, Oldroyd, 2013). Como resultado, este proceso induce la formación de un nuevo órgano en la raíz, denominado nódulo, el cual aloja a las bacterias y ofrece un ambiente propicio para la diferenciación de las mismas. Dentro de este nuevo órgano, las bacterias diferenciadas a bacteroides son capaces de fijar nitrógeno, es decir, convertir el nitrógeno atmosférico a formas asimilables por la planta. Como recompensa, los rizobios hacen uso de esqueletos carbonados aportados por la planta (Gage, 2004). De esta forma, la co-existencia de ambos organismos en un mismo ambiente a lo largo de los años, ha permitido el desarrollo de esta interacción, beneficiosa para ambos (Ochman & Moran, 2001).

La interacción rizobio-leguminosa se caracteriza por ser, usualmente, altamente específica. No todos los rizobios pueden interactuar con todas las plantas leguminosas (Andrews & Andrews, 2017). De hecho, algunos rizobios son capaces de generar nódulos en una única especie vegetal. En otros casos, una misma cepa es capaz de interactuar con varios hospedadores diferentes (Pueppke & Broughton, 1999, Wegener *et al.*, 2001). En algunos casos, un rizobio capaz de nodular una única especie puede ampliar su rango al recibir nuevo material genético (Crook *et al.*, 2012). Incluso, una especie bacteriana no simbiótica puede adquirir dicha capacidad luego de obtener material genético de otra bacteria presente en el mismo nicho (Sullivan *et al.*, 1995, Sullivan & Ronson, 1998, Bañuelos-Vazquez *et al.*, 2020). Considerando que el estudio de la interacción rizobio-leguminosa tiene como principal objetivo el uso de los rizobios como inoculantes para suelos de cultivo de leguminosas, es importante conocer de qué manera se da el intercambio de material genético entre estas especies, ya que la liberación masiva de microorganismos en el suelo puede afectar el germoplasma del mismo, ya sea por la naturalización de las bacterias introducidas o por la transferencia de material genético con microorganismos del entorno.

I.4 Estructura genética de los rizobios

Una característica común a la mayoría de los genomas de rizobios, es que pueden poseer además del cromosoma, plásmidos que codifican una gran variedad de funciones (García de los Santos *et al.*, 1996, Mercado-Blanco & Toro, 1996). En muchos casos, las funciones codificadas en plásmidos pueden ser beneficiosas en el momento de la adaptación a un nuevo entorno. En algunos casos, es posible encontrar hasta un 45% del total del material genético de la bacteria codificado en plásmidos (Lagares *et al.*, 2015). Ha sido descrita la presencia desde 1 hasta 10 plásmidos en distintas cepas de rizobios (Mercado-Blanco & Toro, 1996). Aquellos elementos extracromosomales que codifican genes esenciales para el establecimiento de la simbiosis rizobio-leguminosa son llamados plásmidos simbióticos o pSym, mientras que aquellos plásmidos que codifican otro tipo de funciones son llamados plásmidos crípticos o accesorios (Mercado-Blanco & Toro, 1996). Debido a la capacidad para ser transferidos a otros organismos, los plásmidos tienen un rol crucial en la adaptación y evolución de los rizobios (Pistorio *et al.*, 2008).

-Plásmidos simbióticos

Se denomina plásmido simbiótico a todo plásmido que posea los genes esenciales para una interacción rizobio-leguminosa completa (Lagares *et al.*, 2015). Para que esto sea posible, los

plásmidos simbióticos deben codificar genes con diversas funciones. Entre ellos, se deben remarcar los genes requeridos para la nodulación (*nod*) y aquellos involucrados en la síntesis de la nitrogenasa (*nif*) y en la fijación biológica de nitrógeno llevada a cabo por dicha enzima (*fix*) (Romero & Brom, 2004, Lagares *et al.*, 2015). Además, es posible encontrar genes involucrados en la síntesis de polisacáridos (*exo/ips*) o moléculas involucradas en el intercambio de señales entre las bacterias y la planta (Niehaus & Becker, 1998). Cabe destacar que, en algunos casos, la capacidad noduladora del rizobio no viene dada por la información codificada en los plásmidos, sino que se debe a genes ubicados en el cromosoma, en lo que se denominan “islas simbióticas”. En algunos casos, estas islas simbióticas pueden ser adquiridas por otros rizobios mediante transferencia horizontal de genes (Sullivan & Ronson, 1998), del mismo modo que puede transferirse un plásmido, mostrando la naturaleza “accesoria” de este tipo de genes.

En cuanto al tamaño de los plásmidos simbióticos, se los cataloga como mega plásmidos debido a su gran tamaño. *Ensifer meliloti* cuenta, en general, con tres grandes replicones: un cromosoma y dos (mega)plásmidos. Uno de ellos denominado plásmido simbiótico pSymA (1.4 Mpb), en donde se codifican los genes asociados a la fijación de nitrógeno, y otro denominado pSymB (1.7 Mpb), en donde se encuentran los genes necesarios para la producción de exopolisacárido entre otras funciones (Galibert *et al.*, 2001). El plásmido simbiótico pNGR234a de *Sinorhizobium fredii* NGR234 posee 536 Kbp (Freiberg *et al.*, 1997) y el análogo de *R. etli* CFN42 cuenta con 371 Kbp (González *et al.*, 2006). Si bien el tamaño de los plásmidos simbióticos varía, se caracterizan por ser de gran tamaño, ya que además de los genes involucrados en la simbiosis, suelen portar genes con otro tipo de funciones. Entre ellos, se han observado genes involucrados en el catabolismo de diferentes moléculas (Boivin *et al.*, 1990). En uno de los plásmidos simbióticos de *E. meliloti* se encontró la región completa de genes *nos*, esenciales para la reducción desasimilatoria de óxido nitroso (Holloway *et al.*, 1996), mientras que en plásmidos de *R. leguminosarum* conteniendo genes *nif*, se hallaron genes involucrados en la importación de hidrógeno (Leyva *et al.*, 1987).

-Plásmidos crípticos

Se consideran plásmidos crípticos (también denominados accesorios o no simbióticos) a los plásmidos que no son necesarios para el establecimiento de una simbiosis completa con la planta (Mercado-Blanco & Toro, 1996). Sin embargo, en muchos casos se ha observado que su presencia puede modular positiva o negativamente el desarrollo de la simbiosis. Algunos plásmidos no simbióticos de *R. leguminosarum* están asociados a la producción de bacteriocinas, las cuales contribuyen a la competencia con otras bacterias del mismo entorno (Hirsch, 1979, Johnston *et al.*, 1982). También se ha observado la presencia de genes involucrados en la movilidad celular (Baldani *et al.*, 1992) y en la producción de EPS (Skorupska *et al.*, 1991), dos factores que también afectan la capacidad de nodular. En *R. etli* CFN42, la ausencia del plásmido pRetCFN42e genera una desventaja en la competitividad de la cepa salvaje (Brom *et al.*, 1992). Sin embargo, también ha sido descrito el efecto contrario, en donde la presencia de plásmidos crípticos disminuye la competitividad de una célula o su efectividad en la nodulación (Velazquez *et al.*, 1995)

Además, muchos de estos plásmidos codifican funciones que aportan a la célula una ventaja adaptativa en ciertos ambientes. Al igual que los plásmidos simbióticos, muchos plásmidos crípticos pueden portar genes que le permitan a la bacteria hacer uso de diferentes fuentes orgánicas de carbono. Un plásmido de *E. meliloti* Rm41 está involucrado en el metabolismo de las calisteginas (Tepfer *et al.*, 1988), moléculas encontradas en los exudados de diversas plantas. Baldani *et al.* (1992) encontraron que diferentes plásmidos de *R. leguminosarum* *bv trifolii* le confieren a cepas de esta especie la capacidad de crecer en medios con malato o lactosa, adonitol, ramnosa y sorbitol.

De esta forma, la capacidad de utilizar diversos tipos de moléculas como fuentes de carbono aportaría a las bacterias involucradas un mayor porcentaje de sobrevivencia en diversos entornos.

En algunos casos, se ha reportado la imposibilidad de curar un plásmido accesorio, a pesar de no encontrar genes asociados a una función esencial en el mismo. Por lo tanto, es posible pensar que muchos de estos plásmidos codifican más funciones de las que se pueden observar, siendo en muchos casos esenciales para la célula.

I.5 Sistemas conjugativos en rizobios

Como se mencionó previamente, el proceso conjugativo requiere de la presencia de dos sistemas, encargados de la formación del aparato conjugativo (Mpf) y del procesamiento del DNA (Dtr). Con el avance de las técnicas de secuenciación del DNA, y por ende la acumulación de secuencias pertenecientes a plásmidos de rizobios, ha sido posible analizar en detalle la organización de los genes pertenecientes a los sistemas mencionados en numerosas cepas, encontrando características compartidas entre muchas, y organizaciones diferentes en otras. Sumado a estas características, algunos estudios develaron diferentes circuitos regulatorios para la expresión de genes conjugativos.

-Sistemas Dtr presentes en rizobios

Con el propósito de catalogar los distintos sistemas conjugativos observados, Ding & Hynes (2009) propusieron un sistema de clasificación basado en las secuencias aminoacídicas de uno de los principales actores de la conjugación. Para esto, llevaron a cabo análisis filogenéticos utilizando las secuencias de un elemento fundamental del Dtr, la relaxasa (TraA) de diversos plásmidos correspondientes a rizobios. El árbol filogenético generado por Ding & Hynes (2009) mostró la agrupación de plásmidos en diferentes ramas del mismo, generando un sistema de clasificación en grupos. Además, el análisis de la organización genética del Dtr y del Mpf de los plásmidos de cada grupo permitió generar un esquema general de cada región, compartido por todos los miembros del mismo grupo (figura I.3). En base a la cercanía de las relaxasas dentro del árbol, y a las características compartidas entre los diferentes Dtr y Mpf, Ding & Hynes (2009) propusieron la clasificación de las relaxasas de plásmidos de rizobios (y por ende, de los Dtr) en tres grandes grupos, llamados I, II y III. Al mismo tiempo, definieron dos grupos para catalogar los Mpf observados.

Los Dtr pertenecientes al grupo I (figura I.3) se caracterizan por la presencia de los operones *traAFBH* y *traCDG*, en donde *traA* codifica la relaxasa mencionada, *traG* codifica la proteína acopladora, y el resto de los genes codifican proteínas accesorias que ayudan a la formación del relaxosoma (Alvarez-Martinez & Christie, 2009). Los Dtr de este tipo están, muchas veces, asociados a un Mpf del grupo I, el cual está formado por un operón conteniendo once genes *trb* (*trbBCDEJKLFGHI*), ubicado adyacentemente y en dirección opuesta a los genes de replicación plasmídica *repABC*. En muchos casos, entre los genes de replicación y el operón *trb* es posible encontrar el gen *tral*, que codifica una acil homoserin-lactona sintasa involucrada en la regulación de la conjugación (Hwang *et al.*, 1994, Tun-Garrido *et al.*, 2003). Además, a continuación del operón *trb* se suele ubicar *traR*, un regulador transcripcional que frecuentemente responde a la presencia de acil homoserin lactonas (AHLs).

Los Dtr del grupo II (figura I.3) están compuestos por un gen *traA* de mayor tamaño que el del resto de los grupos, y carecen de los genes que completan el operón del grupo I (*traFBH*), mientras que los genes *traCDG* se ubican de forma muy similar. El Mpf mayormente asociado a este grupo de Dtr está conformado por un operón formado en la mayoría de los casos por once genes *vir* (*virB1B2B3B4B5B6B7B8B9B10B11*), con una organización diferente a la del operón *trb*.

Los Dtr ubicados en el grupo III (figura I.3) no cuentan con los genes *traFBH* ni *traCD*, sino que poseen un gen homólogo a *mobC* ubicado entre *traA* y *traG*. La proteína codificada por *mobC* está involucrada en la relajación del *oriT*, pero su presencia no es esencial para la conjugación (Zhang & Meyer, 1997). En los plásmidos que poseen un Dtr perteneciente a este grupo no se han encontrado genes del Mpf, por lo que no serían autotransmisibles.

Como un criterio para clasificar plásmidos conjugativos y movilizables, Francia *et al.* (2004) y Garcillan-Barcia *et al.* (2009) propusieron un sistema de clasificación basado en las similitudes que presentaban las relaxasas de cada plásmido. Utilizando dicho sistema de clasificación, Giusti *et al.* (2012) observaron que las relaxasas de los Dtr de los grupos I, II y III se ubicaban muy cerca en el árbol filogenético realizado, perteneciendo todas a la familia de relaxasas MOB_Q. Sin embargo, al introducir nuevas secuencias al análisis, pudieron identificar plásmidos de rizobios con relaxasas pertenecientes a diferentes familias que las descritas previamente, generando una actualización en el sistema de clasificación. Las relaxasas descritas fueron catalogadas como relaxasas del tipo MobZ, agrupadas dentro de una nueva familia a la que llamaron MOB_{P0} (Giusti *et al.*, 2012). El análisis filogenético incluyendo las nuevas proteínas mostró que las mismas se ubicaban en una nueva rama del árbol. Además, debido a que los Dtr conformados por las relaxasas MOB_{P0} presentaban una organización diferente a la del resto de los grupos, se denominó a este sistema de Dtr como grupo IV (figura I.3). A diferencia de los Dtr de tipo I, II y III, en donde el gen de la proteína acopladora *traG* se ubica generalmente en la proximidad de la relaxasa y otros genes del Dtr, en los sistemas de tipo IV dicho gen puede ubicarse en las cercanías de la relaxasa o en una región distante. Además, *traG* se ubica *downstream* al operón *trb* y se transcribe dentro del mismo operón. *Upstream* a la relaxasa y en la misma orientación se ubica un homólogo al gen *mobC*, mientras que *Upstream* del mismo y en la orientación opuesta se encuentra un homólogo al gen de partición *parA*.

Luego de la división de las relaxasas en cuatro grupos, un estudio realizado por Ding *et al.* (2013) sobre la relaxasa del plásmido pRleVF39b actualizó, nuevamente, el sistema de clasificación, al sugerir la división de los Dtr del grupo IV en IVA y IVB. Si bien la relaxasa analizada en el trabajo citado también pertenecía al grupo de relaxasas MOB_{P0}, el sistema mostraba algunas diferencias con respecto al descrito por Giusti *et al.* (2012). Por un lado, un nuevo árbol filogenético incluyendo la relaxasa del plásmido pRleVF39b la ubicaba en una rama diferente al resto de las relaxasas de tipo MOB_{P0}. Asimismo, no fue posible encontrar un gen homólogo a *mobC* en la región conjugativa, y el gen homólogo a *parA* se ubicó en la misma orientación que la relaxasa. De esta forma, se definió a los sistemas Dtr de este estilo como grupo IVA (figura I.3), mientras que los similares a aquellos descritos por Giusti *et al.* (2012) como grupo IVB.

-Sistemas Mpf presentes en rizobios

Como se mencionó previamente, es posible identificar dos grupos principales de genes del Mpf en rizobios. Algunos sistemas conjugativos poseen un Mpf con genes homólogos a los descritos en el operón *trb* del plásmido RP4 de *Escherichia coli* (Alt-Morbe *et al.*, 1996), llamados con el mismo nombre debido a su similitud. En otros casos, la organización de los genes del Mpf se correlaciona con la observada en la región involucrada en la transferencia de la hebra T del plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens* (genes *virB*) (von Bodman *et al.*, 1989), siendo este caso el estudiado con mayor detalle. Si bien ambos operones poseen la misma cantidad de genes, sólo es posible encontrar seis genes *trb* con similitud de secuencia con genes *virB* (Li *et al.*, 1998), ubicados de manera diferente en ambos sistemas.

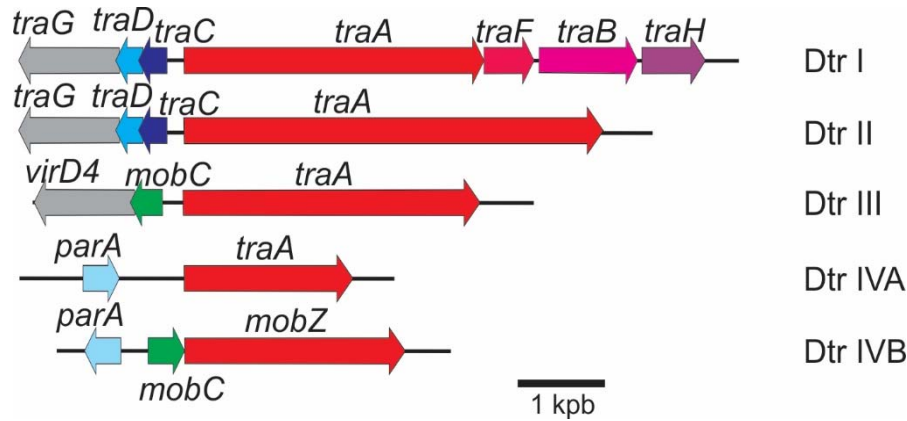


Figura I.3. Organización genética de los diferentes sistemas de Dtr. Se muestra la organización de los genes involucrados en el procesamiento del DNA de diferentes sistemas conjugativos.

-Organización del sistema *virB*

Los sistemas conformados por genes *virB* se organizan en un operón de 11 genes, llamados *virB1B2B3B4B5B6B7B8B9B10B11*. En la figura I.4 se muestra un esquema de la ubicación de cada proteína en el T4SS correspondiente a este sistema. VirB4 y VirB11 son dos ATPasas que aportan energía al proceso, y que además forman parte de la estructura de membrana interna del T4SS (Chandran Darbari & Waksman, 2015). Su presencia también está involucrada en la síntesis del pili conjugativo. VirB3, VirB6 y VirB8 son proteínas estructurales que forman el complejo de membrana interna del T4SS (Chandran Darbari & Waksman, 2015), mientras que VirB7, VirB9 y VirB10 son componentes del T4SS ubicados en la membrana externa (Chandran Darbari & Waksman, 2015). Si bien VirB10 interacciona con VirB7 y VirB9, también está conectada con las proteínas de membrana interna, funcionando como una especie de sensor energético del sistema (Cascales & Christie, 2004). Por otro lado, VirB1 pertenece a la familia de proteínas transglicosilasas líticas, cuya actividad muramidasa permite romper capas de peptidoglicano, ayudando a la inserción del T4SS en la membrana celular (Chandran Darbari & Waksman, 2015). VirB2 y VirB5 son componentes esenciales del pili conjugativo. VirB2 codifica una prepilina, que luego es procesada en una proteína que será la principal componente del pili (pilina mayor). VirB5 codifica la pilina menor, y se cree que cumple un papel de adhesina en el extremo del pili (Aly & Baron, 2007).

-Organización del sistema *trb*

Los organismos que poseen su Mpf organizado en genes similares al sistema *trb*, poseen un operón conformado por los genes *trbBCDEJKLFGHI*. Las proteínas TrbB y TrbE poseen sitios de unión a nucleótidos, y presentan similitudes con VirB11 y VirB4 respectivamente, por lo que serían las ATPasas que impulsan la transferencia plasmídica (Lessl *et al.*, 1992). TrbD es similar a VirB3, ubicada en la membrana interna, mientras que TrbI se asemeja a VirB10 (membrana externa) (Clewell, 2013). En este sistema, la pilina mayor está codificada por el gen *trbC*, el cual codifica una prepilina que es procesada en unidades menores para integrarse al pili (Eisenbrandt *et al.*, 1999), mientras que TrbF presenta similitudes con la pilina menor codificada por *virB5* (Clewell, 2013). Además, en el operón *trb* es posible encontrar dos genes cuya función no está ligada a la formación del T4SS, sino que están involucrados en un proceso mediante el cual se impide la entrada de plásmidos similares a la célula (*entry exclusion*). Las proteínas involucradas en este proceso son las codificadas por *trbK* y *trbJ* (Haase *et al.*, 1996, Cho *et al.*, 2009). A diferencia del sistema codificado por los genes *virB*, el operón *trb* no cuenta con un gen cuya función esté ligada a la hidrólisis del peptidoglicano.

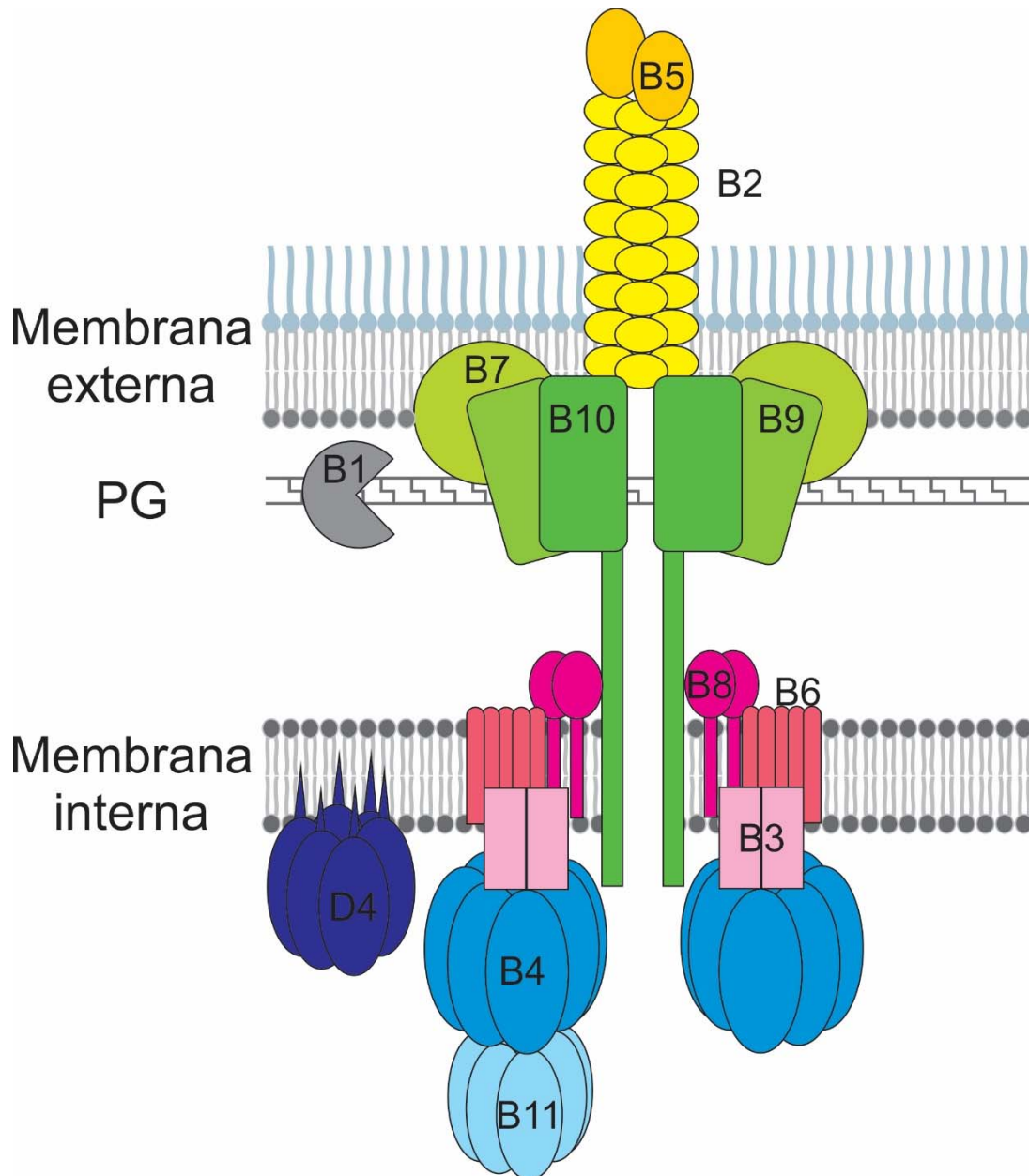


Figura I.4. Estructura del T4SS de *A. tumefaciens*. Se muestra la organización de los diferentes componentes del T4SS de *A. tumefaciens*. En la imagen también se puede observar a la proteína acopladora VirD4, la cual no se codifica en el Mpf pero forma parte del T4SS. PG: peptidoglicano. Adaptada de (Bergé *et al.*, 2017).

I.6 Regulación de la transferencia plasmídica en rizobios

Si bien la transferencia de plásmidos entre rizobios ha sido ampliamente observada, muchos plásmidos son transferidos a muy bajas frecuencias (incluso no detectables) en condiciones de laboratorio. Esto demuestra que el proceso cuenta con una importante regulación, la cual permite la transferencia sólo en determinadas condiciones (Ding & Hynes, 2009). Como se mencionó previamente, el proceso conjugativo es altamente demandante en aspectos energéticos, ya que requiere la expresión de diversas proteínas. Por este motivo, es entendible que la célula regule cuál

es el momento adecuado para llevarlo a cabo. En relación a esto, muchos estudios han descrito una correlación entre los distintos sistemas de Dtr y los mecanismos de regulación conocidos hasta el momento. Así, los plásmidos con un Dtr de tipo I están asociados a una regulación mediada por Quorum Sensing (QS) y los Dtr de tipo II se asocian a una regulación llevada a cabo por el sistema *rctA/rctB* (Ding & Hynes, 2009). También se ha descrito la respuesta de la conjugación ante diferentes moléculas y condiciones (Vanderlinde *et al.*, 2014, Banuelos-Vazquez *et al.*, 2019, Banuelos-Vazquez *et al.*, 2020). Además, se han descrito otros genes involucrados en la modulación de la transferencia de plásmidos de rizobios (Ding *et al.*, 2013, Pistorio *et al.*, 2013, Lopez-Fuentes *et al.*, 2015, Wathugala *et al.*, 2020), dando lugar a la posibilidad de nuevos circuitos regulatorios.

-*Quorum sensing*

El sistema de regulación por QS ha sido descrito para numerosos plásmidos, como los plásmidos pTi de *A. tumefaciens*, pRetCFN42a de *R. etli* CFN42, pRI1JI de *R. leguminosarum* 248 y pNGR234a de *R. sp.* NGR234 (Piper *et al.*, 1993, Danino *et al.*, 2003, He *et al.*, 2003, Tun-Garrido *et al.*, 2003). Uno de los sistemas más estudiados es el del plásmido pTiC58 (Piper *et al.*, 1993, Cook *et al.*, 1997). En este caso, la AHL sintasa Tral lleva a cabo la síntesis de una molécula autoinductora, N-3-oxo-octanoil-L-homoserin lactona (3-oxo-C8-HSL) (Hwang *et al.*, 1994). Cuando la densidad poblacional es baja, esta molécula difunde hacia el exterior de las células, diluyéndose muy rápidamente. Sin embargo, cuando la densidad poblacional aumenta, estas moléculas comienzan a acumularse en el medio, pudiendo ingresar al interior celular y unirse al regulador transcripcional TraR. Como resultado, TraR adopta una conformación activa (Luo & Farrand, 1999), que le permite iniciar la transcripción de los operones *traAFB*, *traCDG* y *tral-trb*, como también del gen *traM* y de los genes involucrados en la replicación plasmídica (Piper *et al.*, 1993). Además de la inducción de *traR*, para que la transferencia del plásmido pTiC58 sea posible, previamente es necesaria la presencia de moléculas secretadas por los tumores inducidos en la planta, llamadas opinas (Ellis *et al.*, 1982), las cuales se unen a una proteína receptora de la bacteria, activando la síntesis de TraR (Farrand, 1998). Así, la conjugación tiene lugar únicamente cuando las bacterias se encuentran en presencia de opinas y la densidad poblacional es lo suficientemente alta. En la figura I.5A se muestra un esquema de este proceso. Dado que la presencia de AHLs genera una retroalimentación positiva que deriva en la expresión constante de las mismas (Piper *et al.*, 1993), en este sistema cumple un rol importante TraM, que funciona como un anti-activador de la conjugación (Fuqua *et al.*, 1995). Esta proteína es capaz de unirse a TraR, impidiendo la unión de AHLs (Hwang *et al.*, 1999). De esta forma, se logra una regulación más fina del proceso. Si bien diferentes circuitos regulatorios de QS responden a diferentes AHLs, el funcionamiento es, en la mayoría de los casos, similar al descrito en *A. tumefaciens*, incluyendo a *tral*, *traR* y *traM* como actores principales.

-*rctA/rctB*

En algunos plásmidos, como el plásmido simbiótico de *R. etli* CFN42 o el pSymA de *E. meliloti* 1021, el mecanismo que regula la transferencia de los mismos es diferente al descrito previamente. En estos casos, la regulación viene dada por el par de genes *rctA/rctB*. RctA es una proteína represora, con una estructura relacionada a los reguladores transcripcionales con dominio *winged-helix DNA-binding*. En el caso del plásmido simbiótico de *R. etli*, *rctA* se ubica *downstream* del operón *virB*, en la orientación opuesta. Una vez expresado, el represor RctA se une específicamente a un sitio dentro del promotor del operón *virB*, impidiendo su expresión y, por lo tanto, la conjugación. Además, la ubicación divergente del operón *virB* y *rctA* genera una interferencia transcripcional entre ellos, modulando la expresión de *rctA*. En el mismo sistema, se encuentra el gen *rctB*, que

codifica una proteína represora de *rctA*. Por esto, una sobreexpresión de RctB es la que permite la transferencia del plásmido, al disminuir la cantidad del represor RctA -que genera una obstrucción en el promotor (Pérez-Mendoza *et al.*, 2005, Sepúlveda *et al.*, 2008). Sin embargo, todavía no se conoce la señal que desencadena la sobreexpresión de *rctB* y de los genes conjugativos, aunque en un estudio reciente se demostró la transferencia del plásmido en el interior de los nódulos (Bañuelos-Vazquez *et al.*, 2020). La transferencia del pSymA de *E. meliloti* también responde a la represión/activación mediada por *rctA/rctB*, aunque el circuito regulatorio presenta algunas diferencias. Un esquema del mismo se muestra en la figura 1.5B. En este sistema, *rctB* activa la conjugación, sin influir en la expresión de *rctA* (Nogales *et al.*, 2013). Además, en la activación de *rctB* se ven involucrados otros genes ausentes en el sistema descrito en *R. etli*, como son *rctC* y *rctR*. En este sistema, descrito por Nogales *et al.* (2013), la expresión de *rctR* impide la transcripción de *rctC*. Ante el posible ingreso y/o modificación de un compuesto extracelular, se produciría una molécula capaz de unirse a RctR, liberando la expresión de *rctC*. Luego, el producto de *rctC* aumentaría la expresión de *rctB*, llevando a la inhibición de *rctA* y, por ende, a la promoción de la conjugación. Cabe destacar que tampoco se conoce la señal que lleva a la transferencia de este plásmido.

-Otros

Si bien la mayoría de los plásmidos responden a los sistemas regulatorios previamente descritos, diversos trabajos han aportado evidencias para suponer que existen otros mecanismos que todavía no han sido estudiados, e incluso algunos elementos importantes para el funcionamiento de los sistemas ya conocidos. Ding *et al.* (2013) encontraron que el plásmido pRleVF39b de la cepa *R. leguminosarum* VF39SM, perteneciente al grupo IVA, cuenta con un gen represor de la conjugación, *trbR*, que no ha sido descrito en otros sistemas. El mismo codifica un regulador transcripcional del tipo Xre (*xenobiotic response element*), que cuando es mutado aumenta 50 veces la frecuencia conjugativa. Wathugala *et al.* (2020) identificaron seis genes hipotéticos dentro del mismo plásmido que también afectan la frecuencia conjugativa. Si bien ninguno de ellos resulta esencial, en conjunto son importantes para la transferencia. La mutación de cada uno de estos genes arrojó frecuencias conjugativas diez veces inferiores a las frecuencias del plásmido salvaje. Los genes analizados fueron renombrados *trcA*, *trcB*, *trcC*, *trcD*, *trcE* y *trcF*. El análisis bioinformático de cada uno de ellos permitió asociar a los genes *trcA* y *trcB* con nucleasas, a *trcC* como una posible proteína de unión a DNA del tipo ParA y a *trcF* como una proteína del tipo dehalogenasa haloácida. Dado que la relaxasa codificada en este plásmido carece de algunos dominios relevantes para su función (Ding *et al.*, 2013), en el trabajo mencionado se sugirió que los genes hipotéticos podrían estar involucrados en compensar la carencia de los dominios de la relaxasa, asistiendo en la formación y estabilización del relaxosoma.

En el plásmido pRet42a de *R. etli* CFN42, cuyo mecanismo regulatorio por QS ha sido muy estudiado (Tun-Garrido *et al.*, 2003), también se han identificado genes codificando proteínas hipotéticas, que afectan la transferencia del mismo (Lopez-Fuentes *et al.*, 2015). A la vez, se ha observado que la transferencia de dicho plásmido es muy elevada en el interior de los nódulos (Bañuelos-Vazquez *et al.*, 2019), y se ha comprobado que algunas moléculas secretadas por la planta también influyen en su eficiencia conjugativa (Bañuelos-Vazquez *et al.*, 2020).

Vanderlinde *et al.* (2014) describieron que la transferencia conjugativa del plásmido pRI8JI desde la cepa *R. leguminosarum* 3841 aumenta en respuesta a la presencia de L-homoserina como fuente de carbono en el medio. Sin embargo, no es posible observar una respuesta a dicha molécula cuando el plásmido es transferido desde *A. tumefaciens* UBAPF2.

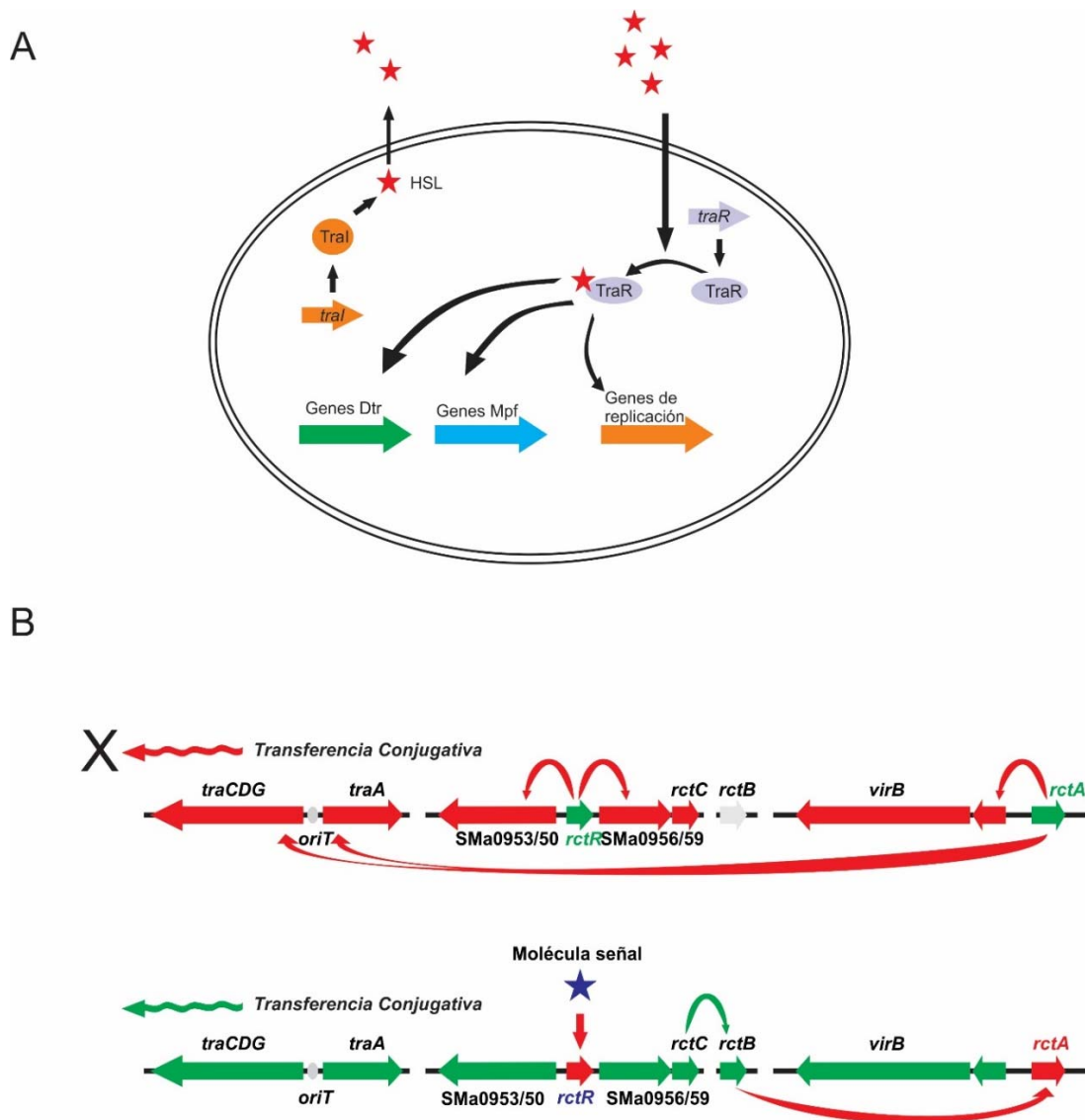


Figura I.5. Mecanismos que regulan la transferencia conjugativa en rizobios. A. Esquema general de la regulación mediada por *quorum sensing*. En la figura se representa una célula con los elementos principales de la regulación de la conjugación mediada por QS. La acumulación de AHLs producidas por TraI permite que las mismas ingresen a la célula y se unan al regulador TraR, iniciando la expresión de los genes conjugativos. **B.** Regulación de la transferencia del plásmido pSymA de *E. meliloti* 1021 mediada por *rctA/rctB*. En la parte superior se representa la condición en la que la conjugación es reprimida. En la parte inferior, la presencia de una molécula señal inhibe la expresión de *rctR*, dando lugar a una cascada que deriva en la transferencia del plásmido. Los genes cuya transcripción es inhibida se marcan en rojo. Los genes expresados se marcan en verde. Tomado de (Brom *et al.*, 2014)

En 2013, en un plásmido de *E. meliloti* LPU88, Pistorio *et al.* (2013) identificaron a *rptA*, un gen necesario para la transferencia del plásmido desde entornos como *E. meliloti* 2011 o *A. tumefaciens* UBAPF2, pero sin función aparente en la transferencia desde la cepa parental LPU88 o desde la cepa GRM8. De este modo, el análisis de la función de un gen, o incluso el estudio de un circuito regulatorio, no puede estar limitado a un único entorno, sino que debe ser considerada la posibilidad de un comportamiento diferente en otros entornos genómicos.

De esta forma, se demuestra que la regulación de la conjugación es un proceso muy complejo, en el cual participan muchos elementos que todavía no han sido definidos. La presencia de proteínas sin una función asignada presenta un gran desafío en esta temática, ya que cualquiera de ellas podría tener un rol activo en la regulación del proceso conjugativo, o ser de gran importancia en algún entorno genético específico.

1.7 *Rhizobium favelukesii*

R. favelukesii LPU83 es un rizobio tolerante a la acidez, capaz de crecer en un rango de pH entre 4.5 y 7 (Del Papa *et al.*, 1999, Nilsson *et al.*, 2019). Esta cepa es muy competitiva para la nodulación de alfalfa en suelos ácidos (Segundo *et al.*, 1999). Además de interactuar con alfalfa, este rizobio es capaz de nodular otras especies, como *Phaseolus vulgaris* (poroto) y *Leucaena leucocephala* (Del Papa *et al.*, 1999, Wegener *et al.*, 2001). Sin embargo, este microorganismo es ineficiente en la fijación biológica de nitrógeno.

El secuenciamiento de la cepa *R. favelukesii* LPU83 (Wibberg *et al.*, 2014) mostró que cuenta con un cromosoma de 4.19 Mpb y cuatro plásmidos (pLPU83a, 151 Kpb; plásmido simbiótico pLPU83b, ca. 531 Kpb, pLPU83c, 760 Kpb y pLPU83d, 1.9 Mpb). Llamativamente, el análisis de genes de LPU83 mostró una estructura genética particular, ya que se observó que los genes cromosomales se relacionan con aquellos presentes en rizobios noduladores de poroto, mientras que los genes simbióticos están relacionados con los genes de cepas noduladoras de *Medicago*, como *E. meliloti* (Torres Tejerizo *et al.*, 2011). El plásmido simbiótico, pLPU83b, es capaz de ser transferido en presencia de pLPU83a (Torres Tejerizo *et al.*, 2010) y, en relación al resto de los replicones de la cepa, presenta un contenido GC claramente menor (Wibberg *et al.*, 2014). Por estos motivos, podría pensarse que dicho plásmido fue adquirido, recientemente, por HGT, mostrando la importancia de este proceso para la evolución, diversificación y adaptación de los rizobios.

El plásmido pLPU83a es un plásmido accesorio, definido como un plásmido autotransmisible o movilizable, dependiendo del entorno en el cual sea estudiado (Torres Tejerizo *et al.*, 2010). En particular, pLPU83a ha sido transferido desde su propio entorno y desde otras cepas como *E. meliloti* 2011 a frecuencias muy similares, aunque no se han detectado transconjugantes a la hora de realizar conjugaciones desde *A. tumefaciens* UBAPF2, mostrando que su sistema regulatorio presenta alguna diferencia en este último entorno (Torres Tejerizo *et al.*, 2010).

El análisis de la secuencia de pLPU83a mostró que presenta un sistema Dtr y un Mpf (del tipo *trb*), ambos necesarios para su condición de plásmido autotransmisible (Torres Tejerizo *et al.*, 2014). El análisis filogenético realizado por Torres Tejerizo *et al.* (2014) sobre la relaxasa TraA de este plásmido, lo ubicó dentro del grupo I, conformado por plásmidos cuya regulación es, en la mayoría de los casos, mediada por QS. Dado que la topología del árbol generado indicaba la presencia de varios subgrupos, en el mismo trabajo se llevó a cabo un nuevo análisis filogenético, utilizando las secuencias de los reguladores TraR de todos los plásmidos del grupo. Esto llevó a una nueva actualización en la clasificación, separando a los plásmidos del grupo I en tres grandes ramas: I-A, I-B y I-C. Nuevamente, la distribución en grupos permitió definir características compartidas entre los plásmidos del mismo grupo. En el caso de los plásmidos correspondientes al grupo I-C, al cual pertenece pLPU83a, la característica más llamativa fue la ausencia de la AHL sintasa codificada por *traI*, a pesar de encontrar al regulador TraR (usualmente dependiente de AHLs). De esta forma, se encontró un plásmido que comparte la maquinaria conjugativa con aquellos que son regulados por QS, pero que carece de unos los componentes fundamentales del sistema, y aun así es capaz de ser transferido. En la figura 1.6 se muestra un esquema de la organización genética de los plásmidos pertenecientes a cada grupo. Además, los mismos autores confirmaron que la transferencia de pLPU83a requería la presencia de *traR*, dejando en claro su funcionalidad. En base a esto, surge la posibilidad de un nuevo mecanismo regulatorio, en el cual la enzima responsable de la síntesis de la molécula señal se encuentre codificada en otra región del plásmido, o sintetice un tipo de molécula diferente a las AHLs involucradas en los sistemas de QS descriptos. A pesar de la presencia de TraR, tampoco puede ser descartado un sistema de regulación que no responda a QS.

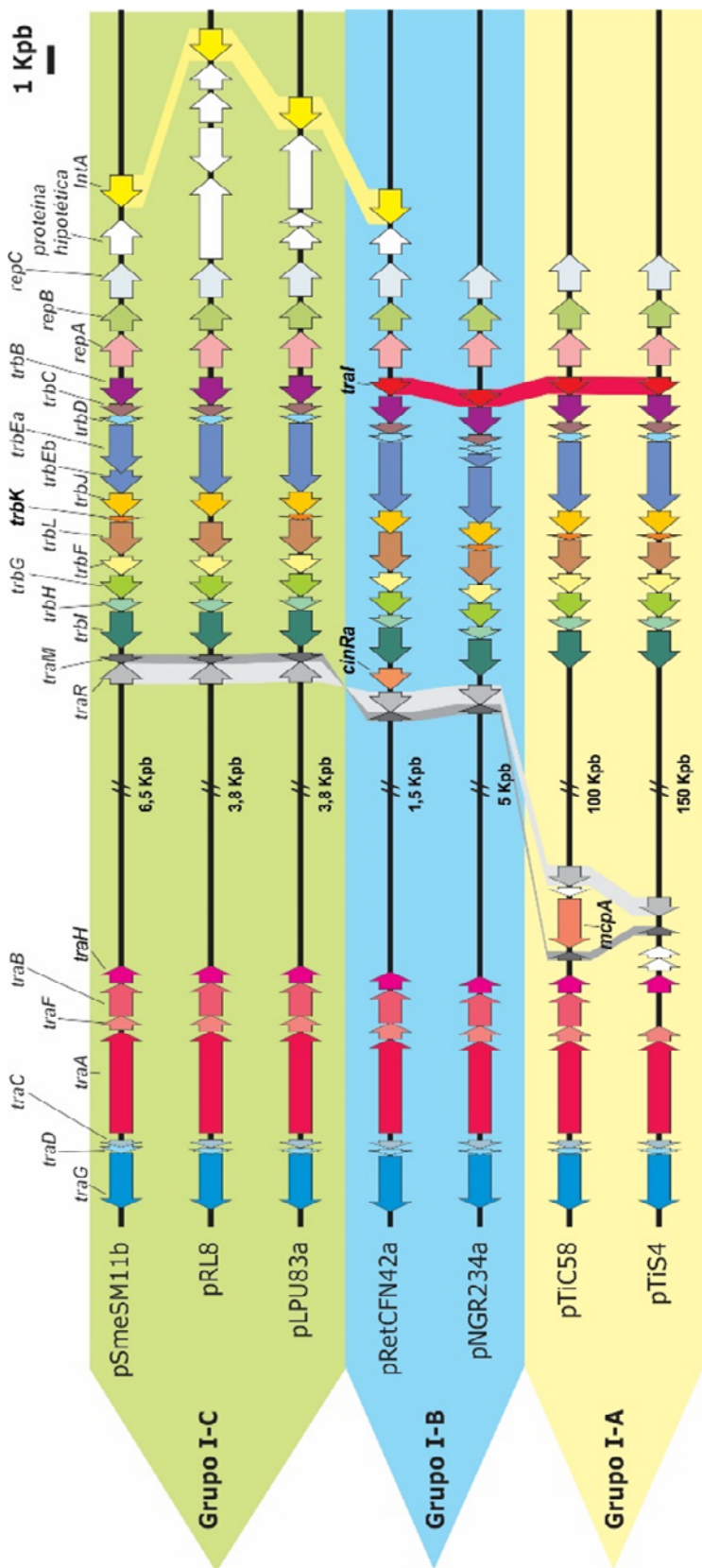


Figura I.6. Organización genética de las regiones involucradas en conjugación de plásmidos del grupo I. Se muestran las características más relevantes de las regiones Dtr y Mpf de plásmidos correspondientes a distintos subgrupos dentro del grupo I. Las sombras de algunos genes indican el cambio de posición en los diferentes plásmidos. Adaptada de (Torres Tejerizo *et al.*, 2014).

I.8 Objetivos

-Consideraciones generales

Las características particulares del genoma de *R. favelukesii* LPU83 hacen de este microorganismo un objeto de estudio muy interesante para comprender de qué manera la HGT se ve involucrada en la evolución, diversificación y adaptación de los rizobios. Además, uno de sus plásmidos presenta algunas particularidades en cuanto a la organización genética de las regiones conjugativas que lo diferencian de otros plásmidos similares, lo que permite pensar en la posibilidad de nuevos sistemas que regulen la conjugación bacteriana. Conocer cómo funcionan los sistemas regulatorios del proceso conjugativo, en particular en rizobios, resulta de gran importancia debido a los cambios que la liberación de estos microorganismos en el suelo pueda generar a la población nativa de los mismos. Como se mencionó previamente, además de las características que aportan los plásmidos simbióticos, la presencia de plásmidos accesorios puede modificar la efectividad de una cepa a la hora de fijar nitrógeno, ya sea mejorando su capacidad o generando una desventaja en el proceso (Mercado-Blanco & Toro, 1996). Motivo por el cual resulta importante conocer qué factores afectan la dinámica de la transferencia plasmídica de las bacterias que habitan el suelo.

-Objetivo general

Caracterizar funcionalmente la transferencia conjugativa del plásmido pLPU83a de *R. favelukesii* LPU83 e identificar nuevos determinantes moleculares que regulen la transferencia plasmídica en rizobios.

-Objetivos específicos

- Análisis *in silico* de genes hipotéticos involucrados en el proceso conjugativo.
- Caracterización funcional de los genes encontrados y análisis del rol en la conjugación.
- Determinación de los mecanismos moleculares mediante los cuales llevan a cabo su función.

Capítulo II. Materiales y métodos.

II.1 Técnicas microbiológicas

II.1.a Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo

Las cepas bacterianas utilizadas en este trabajo y sus características más relevantes se muestran en la tabla II.1.

Tabla II.1. Cepas bacterianas utilizadas en el presente trabajo.

Cepas	Propiedades	Referencias
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>		
GMI9023	Rifa ^r . <i>A. tumefaciens</i> derivada de C58C1, curada del plásmido pAtC58.	(Rosenberg & Huguet, 1984)
GMI9023 (pLPU83a-13)	GMI9023 con el plásmido pLPU83a-13	Este trabajo
NT1	<i>A. tumefaciens</i> C-58 portando el plásmido pTiC58Trac::Tn517-52	(von Bodman <i>et al.</i> , 1989)
UBAPF2	Rifa ^r . Cepa libre de plásmidos	Hynes <i>et al.</i> (1985)
UBAPF2 (pLPU83a-13)	UBAPF2 con el plásmido pLPU83a-13	Este trabajo
UBAPF2 (pLPU83a-13 ΔLPU83a_0145)	UBAPF2 con el plásmido pLPU83a-13 ΔLPU83a_0145	Este trabajo
UBAPF2 (pLPU83a-13 ΔLPU83a_0146)	UBAPF2 con el plásmido pLPU83a-13 ΔLPU83a_0146	Este trabajo
UBAPF2 (pLPU83a-13 ΔLPU83a_0148)	UBAPF2 con el plásmido pLPU83a-13 ΔLPU83a_0148	Este trabajo
UBAPF2 (pHU231-pBBR1MCS-5)	UBAPF2 con los plásmidos pHU231 y pBBR1MCS-5	Este trabajo
UBAPF2 (pHU231-pBBR1MCS-5::0146)	UBAPF2 con los plásmidos pHU231 y pBBR1MCS-5::146	Este trabajo
UBAPF2 (pHU231-pBBR1MCS-5::traR)	UBAPF2 con los plásmidos pHU231 y pBBR1MCS-5::traR	Este trabajo
UBAPF2 (pHU231 región intergénica::GFP - pBBR1MCS-5)	UBAPF2 con los plásmidos pHU231 región intergénica::GFP y pBBR1MCS-5	Este trabajo
UBAPF2 (pHU231 región intergénica::GFP - pBBR1MCS-5::0146)	UBAPF2 con los plásmidos pHU231 región intergénica::GFP y pBBR1MCS-5::146	Este trabajo
UBAPF2 (pHU231 región intergénica::GFP - pBBR1MCS-5::traR)	UBAPF2 con los plásmidos pHU231 región intergénica::GFP y pBBR1MCS-5::traR	Este trabajo
UBAPF2 (pBBR1MCS-5)	UBAPF con el plásmido pBBR1MCS-5	Este trabajo
<i>Ensifer meliloti</i>		
20MP6	Sm ^r , Tc ^r , GFP. Derivada de <i>E. meliloti</i> 2011	Pistorio <i>et al.</i> (2002)
20MP6 (pLPU83a-13)	20MP6 con el plásmido pLPU83a-13	Este trabajo

20MP6 (pLPU83a-13 ΔLPU83a_0145)	20MP6 con el plásmido pLPU83a-13 ΔLPU83a_0145	Este trabajo
20MP6 (pLPU83a-13 ΔLPU83a_0146)	20MP6 con el plásmido pLPU83a-13 ΔLPU83a_0146	Este trabajo
20MP6 (pLPU83a-13 ΔLPU83a_0148)	20MP6 con el plásmido pLPU83a-13 ΔLPU83a_0148	Este trabajo
2011 (pLPU88a)	2011 con el plásmido pLPU88a de <i>E. meliloti</i> LPU88	(Pistorio <i>et al.</i> , 2013)
2011 (pLPU88a -pLPU83a-13)	2011 (pLPU88a) con el plásmido pLPU83a	Este trabajo
2011 (pLPU88a -pLPU83a-13 ΔLPU83a_0146)	2011 (pLPU88a) con el plásmido pLPU83a-13 ΔLPU83a_0146	Este trabajo
2011 (pLPU88a -pLPU83a-13 ΔLPU83a_0148)	2011 (pLPU88a) con el plásmido pLPU83a-13 ΔLPU83a_0148	Este trabajo
SM11	Cepa aislada de suelos alemanes	(Stiens <i>et al.</i> , 2006)
SM11 pSM11b-Gm	SM11 marcada en el plásmido pSM11b con Gm ^r en la región intergénica entre los genes pSmeSM11b_004 y pSmeSM11b_005	Este trabajo
LPU88	Cepa aislada de suelos argentinos	Pistorio <i>et al.</i> (2003)
LPU88 pLPU88a-Gm	LPU88 marcada en el plásmido pLPU88a con Gm ^r en la región intergénica entre los genes <i>rptA</i> y ORF 4 (número de acceso AFM35680.1)	Este trabajo
LPU88 LPU88a_0146	LPU88 con el plásmido pG18mob::mut88-146 interrumpiendo el gen LPU88a_0146	Este trabajo
LPU88 LPU88a_0146 (pLPU83a-13)	LPU88 0146 con el plásmido pLPU83a-13	Este trabajo
LPU88 LPU88a_0146 (pLPU83a-13 ΔLPU83a_0146)	LPU88 0146 con el plásmido pLPU83a ΔLPU83a_0146	Este trabajo
LPU88 (pLPU83a-13)	LPU88 con el plásmido pLPU83a-13	Este trabajo
LPU88 (pLPU83a-13 ΔLPU83a_0145)	LPU88 con el plásmido pLPU83a-13 ΔLPU83a_0145	Este trabajo
LPU88 (pLPU83a-13 ΔLPU83a_0146)	LPU88 con el plásmido pLPU83a-13 ΔLPU83a_0146	Este trabajo
LPU88 (pLPU83a-13 ΔLPU83a_0148)	LPU88 con el plásmido pLPU83a-13 ΔLPU83a_0148	Este trabajo
<i>Rhizobium etli</i>		
CFNX559	Derivada de <i>R. etli</i> CFN42 marcada en el plásmido pRetCFN42a con Spr	Tejerizo <i>et al.</i> (2015)
CFNX559 (pLPU83a-13)	CFNX559 con el plásmido pLPU83a-13	Este trabajo
CFNX559 (pLPU83a-13 ΔLPU83a_0145)	CFNX559 con el plásmido pLPU83a-13 ΔLPU83a_0145	Este trabajo
CFNX559 (pLPU83a-13 ΔLPU83a_0146)	CFNX559 con el plásmido pLPU83a-13 ΔLPU83a_0146	Este trabajo

CFNX559 (pLPU83a-13 ΔLPU83a_0148)	CFNX559 con el plásmido pLPU83a-13 ΔLPU83a_0148	Este trabajo
<i>Rhizobium favelukesii</i>		
LPU83-13	Nm ^r Sm ^r . Tn5-B10 insertado en el plásmido pLPU83a	Del Papa <i>et al.</i> (1999)
LPU83-13 ΔLPU83a_0145	LPU83-13 con delección en el gen LPU83a_0145	Este trabajo
LPU83-13 ΔLPU83a_0146	LPU83-13 con delección en el gen LPU83a_0146	Este trabajo
LPU83-13 ΔLPU83a_0148	LPU83-13 con delección en el gen LPU83a_0148	Este trabajo
LPU83-13 ΔLPU83a_0146 ΔLPU83a_0148	LPU83-13 con delección en los genes LPU83a_0146 y LPU83a_0148	Este trabajo
LPU83-13 (pBBR1MCS-5::LPU83a_0145)	LPU83-13 con el plásmido pBBR1MCS-5::LPU83a_0145	Este trabajo
LPU83-13 (pBBR1MCS-5::LPU83a_0146)	LPU83-13 con el plásmido pBBR1MCS-5::LPU83a_0146	Este trabajo
LPU83-13 (pBBR1MCS-5::LPU83a_0148)	LPU83-13 con el plásmido pBBR1MCS-5::LPU83a_0148	Este trabajo
LPU83-13 Δ <i>traMa</i>	LPU83-13 con delección en el gen <i>traMa</i> ubicado en pLPU83a	Este trabajo
LPU83-13 ΔLPU83a_0146 Δ <i>traMa</i>	LPU83-13 con delección en los genes LPU83a_0146 y <i>traMa</i>	Este trabajo
LPU83-13 ΔLPU83a_0146 Δ <i>traR</i>	LPU83-13 con delección en los genes LPU83a_0146 y <i>traR</i>	Este trabajo
LPU83-13 LPU83a_0051 ⁻	LPU83-13 con el plásmido pG18::LPU83a_0051 interrumpiendo el gen LPU83a_0051 (<i>trala</i>).	Este trabajo
LPU83-13 ΔLPU83a_0145 (pBBR1MCS-5::LPU83a_0145)	LPU83-13 ΔLPU83a_0145 con el plásmido pBBR1MCS-5::LPU83a_0145	Este trabajo
LPU83-13 ΔLPU83a_0145 (pBBR1MCS-5::LPU83a_0145::HisTag)	LPU83-13 ΔLPU83a_0145 con el plásmido pBBR1MCS-5::LPU83a_0145::HisTag	Este trabajo
LPU83-13 ΔLPU83a_0145 (pBBR1MCS-5::LPU83a_0145::eGFP)	LPU83-13 ΔLPU83a_0145 con el plásmido pBBR1MCS-5::LPU83a_0145::eGFP	Este trabajo
LPU83-13 ΔLPU83a_0146 (pBBR1MCS-5::LPU83a_0146)	LPU83-13 ΔLPU83a_0146 con el plásmido pBBR1MCS-5::LPU83a_0146	Este trabajo
LPU83-13 ΔLPU83a_0146 (pBBR1MCS-5::LPU83a_0146::HisTag)	LPU83-13 ΔLPU83a_0146 con el plásmido pBBR1MCS-5::LPU83a_0146::HisTag	Este trabajo
LPU83-13 ΔLPU83a_0146 (pBBR1MCS-5::LPU83a_0146::eGFP)	LPU83-13 ΔLPU83a_0146 con el plásmido pBBR1MCS-5::LPU83a_0146::eGFP	Este trabajo
LPU83-13 ΔLPU83a_0148 (pBBR1MCS-5::LPU83a_0148)	LPU83-13 ΔLPU83a_0148 con el plásmido pBBR1MCS-5::LPU83a_0148	Este trabajo
LPU83-13 ΔLPU83a_0148 (pBBR1MCS-5::LPU83a_0148::HisTag)	LPU83-13 ΔLPU83a_0148 con el plásmido pBBR1MCS-5::LPU83a_0148::HisTag	Este trabajo
LPU83-13 ΔLPU83a_0148 (pBBR1MCS-5::LPU83a_0148::eGFP)	LPU83-13 ΔLPU83a_0148 con el plásmido pBBR1MCS-5::LPU83a_0148::eGFP	Este trabajo
LPU83-13 ΔLPU83a_0146 (pBBR1MCS-3::LPU83a_0146::mCherry)	LPU83-13 ΔLPU83a_0146 con el plásmido pBBR1MCS-3::LPU83a_0146::mCherry	Este trabajo
LPU83-13 ΔLPU83a_0148 (pBBR1MCS-5::LPU83a_0148::eGFP -pBBR1MCS-3::LPU83a_0146::mCherry)	LPU83-13 ΔLPU83a_0148 con los plásmidos pBBR1MCS-5::LPU83a_0148::eGFP y pBBR1MCS-3::LPU83a_0146::mCherry	Este trabajo

LPU83-13 <i>traMb</i>	LPU83-13 con el plásmido pG18:: <i>traMb</i> interrumpiendo el gen <i>traMb</i> del plásmido simbiótico.	Este trabajo
LPU83-13 <i>nodH</i> -	LPU83-13 con el plásmido pG18:: <i>nodH</i> interrumpiendo el gen <i>nodH</i> del plásmido simbiótico.	Este trabajo
LPU83-13 ΔLPU83a_0146 <i>nodH</i> -	LPU83-13 ΔLPU83a_0146 con el plásmido pG18:: <i>nodH</i> interrumpiendo el gen <i>nodH</i> del plásmido simbiótico.	Este trabajo
LPU83-13 ΔLPU83a_0146 (pHU231 – pBBR1MCS-5)	LPU83-13 ΔLPU83a_0146 con los plásmidos pHU231 y pBBR1MCS-5	Este trabajo
LPU83-13 ΔLPU83a_0146 (pHU231 región intergénica::GFP – pBBR1MCS-5)	LPU83-13 ΔLPU83a_0146 con los plásmidos pHU231 región intergénica::GFP y pBBR1MCS-5	Este trabajo
LPU83-13 ΔLPU83a_0146 (pHU231 región intergénica::GFP – pBBR1MCS-5::0146)	LPU83-13 ΔLPU83a_0146 con los plásmidos pHU231 región intergénica::GFP y pBBR1MCS-5::146	Este trabajo
LPU83-13 ΔLPU83a_0146 (pHU231 región intergénica::GFP – pBBR1MCS-5:: <i>traR</i>)	LPU83-13 ΔLPU83a_0146 con los plásmidos pHU231 región intergénica::GFP y pBBR1MCS-5:: <i>traR</i>	Este trabajo
<i>Shinella</i> sp		
DD12	Cepa endófitas de <i>Daphnia magna</i>	(Freese & Schink, 2011, Poehlein <i>et al.</i> , 2016)
DD12 pDD12c-Gm	DD12 marcada con Gm ^r en el plásmido pDD12c en la región intergénica entre los genes SHLA_RS09770 y SHLA_RS09775	Este trabajo
DD12-Gm (pLPU83a-13 ΔLPU83a_0146)	DD12-Gm con el plásmido pLPU83a-13 ΔLPU83a_0146	Este trabajo
DD12-Gm (pLPU83a-13 ΔLPU83a_0148)	DD12-Gm con el plásmido pLPU83a-13 ΔLPU83a_0148	Este trabajo
<i>Escherichia coli</i>		
DH5α	<i>recA</i> , Δ <i>lacU</i> 169, Φ80d <i>lacZ</i> ΔM15	Bethesda Res. Lab.
S17-1	<i>E. coli</i> 294 RP4-2-Tc::Mu-Km::Tn7 integrado en el cromosoma	Simon <i>et al.</i> (1983)
DH5α (pUC19 -pBBR1MCS-5)	DH5α conteniendo los plásmidos pUC19 y pBBR1MCS-5	Este trabajo
DH5α (pUC19 región intergénica::GFP - pBBR1MCS-5)	DH5α conteniendo los plásmidos pUC19 región intergénica::GFP y pBBR1MCS-5	Este trabajo
DH5α (pUC19 región intergénica::GFP - pBBR1MCS-5::LPU83a_0146)	DH5α conteniendo los plásmidos pUC19 región intergénica::GFP eGFP y pBBR1MCS-5::LPU83a_0146	Este trabajo
DH5α (pUC19 región intergénica ::GFP - pBBR1MCS-5:: <i>traR</i>)	DH5α conteniendo los plásmidos pUC19 región intergénica::GFP -pBBR1MCS-5:: <i>traR</i>	Este trabajo

II.1.b Plásmidos utilizados en este trabajo

Los plásmidos utilizados en este trabajo y sus características más importantes se muestran en la tabla II.2.

Tabla II.2. Plásmidos utilizados en el presente trabajo.

Plásmidos	Propiedades	Referencias
pK18mob	Km ^r . Vector de clonado de alto número de copias.	Schäfer <i>et al.</i> (1994)
pK18mobsacB	Km ^r . Vector de clonado de alto número de copias. Confiere sensibilidad a sacarosa.	Schäfer <i>et al.</i> (1994)
pK18mob::145N	Derivado de pK18mob conteniendo fragmento N terminal del gen LPU83a_0145, amplificado con los <i>primers</i> 145-Nter-hind y 145-Nter-sal	Este trabajo
pK18mob::145C	Derivado de pK18mob conteniendo fragmento C terminal del gen LPU83a_0145, amplificado con los <i>primers</i> 145-Cter-hind y 145-Cter-xba	Este trabajo
pK18mob::146N	Derivado de pK18mob conteniendo fragmento N terminal del gen LPU83a_0146, amplificado con los <i>primers</i> 146-Nter-bam y 146-Nter-sal	Este trabajo
pK18mob::146C	Derivado de pK18mob conteniendo fragmento C terminal del gen LPU83a_0146, amplificado con los <i>primers</i> 146-Cter-bam y 146-Cter-xba	Este trabajo
pK18mob::148N	Derivado de pK18mob conteniendo fragmento N terminal del gen LPU83a_0148, amplificado con los <i>primers</i> 148-Nter-bam y 148-Nter-sal	Este trabajo
pK18mob::148C	Derivado de pK18mob conteniendo fragmento C terminal del gen LPU83a_0148, amplificado con los <i>primers</i> 148-Cter-bam y 148-Cter-xba	Este trabajo
pK18mob::traMa-N	Derivado de pK18mob conteniendo fragmento N terminal del gen <i>traMa</i> , amplificado con los <i>primers</i> traMa_Nter_Bam y traMa_Nter_Xba	Este trabajo
pK18mob::traMa-C	Derivado de pK18mob conteniendo fragmento C terminal del gen <i>traMa</i> , amplificado con los <i>primers</i> traMa_Cter_Bam y TraR_left_Xho	Este trabajo
pK18mob::traR	Derivado de pK18mob conteniendo el gen <i>traR</i> , amplificado con los <i>primers</i> traR Fw out y traR Rv out	Este trabajo
pK18mob::traRΔEcoRV	Derivado de pK18mob::traR sin el fragmento contenido entre los sitios <i>EcoRV</i> .	Este trabajo
pG18mob2	Gm ^r . Vector de clonado de alto número de copias.	Kirchner & Tauch (2003)
pG18mob2::LPU83a_0051	Derivado de pG18mob2 conteniendo fragmento del gen LPU83a_0051, amplificado con los <i>primers</i> tral-a051-Rv y tral-a051-Fw	Este trabajo
pG18mob2::nodH	Derivado de pG18mob2 conteniendo fragmento del gen <i>nodH</i> de LPU83.	(Del Papa <i>et al.</i> , 2007)
pG18mob2::traMb	Derivado de pG18mob2 conteniendo fragmento del gen <i>traMb</i> codificado en el plásmido simbiótico de LPU83, amplificado	Este trabajo

	con los <i>primers</i> traM_sym_left y traM_sym_right	
pG18mob2::mut88-146	Derivado de pG18mob2 conteniendo fragmento del gen LPU88a_0146 amplificado con los <i>primers</i> mut 88-146 left y mut 88-146 right	Este trabajo
pG18mob2 marca Shinella	Derivado de pG18mob2 conteniendo fragmento correspondiente a la región intergénica de los genes SHLA_RS09770 y SHLA_RS09775 del plásmido pDD12c de <i>Shinella sp.</i> DD12, amplificado con los <i>primers</i> Shinella left y Shinella right	Este trabajo
pG18mob2 marca 88	Derivado de pG18mob2 conteniendo fragmento correspondiente a la región intergénica de los genes <i>rptA</i> y ORF 4 (número de acceso AFM35680.1) del plásmido pLPU88a de <i>E. meliloti</i> LPU88, amplificado con los <i>primers</i> marca 88a left y marca 88a right	Este trabajo
pG18mob2 marca SM11	Derivado de pG18mob2 conteniendo fragmento correspondiente a la región intergénica de los genes pSmeSM11b_004 y pSmeSM11b_005 del plásmido pSM11b de <i>E. meliloti</i> SM11, amplificado con los <i>primers</i> pSM11 left y pSM11 right	Este trabajo
pJQ200KS	Gm ^f . Vector de clonado suicida en rizobios.	(Quandt & Hynes, 1993)
pJQ200KS::145N-145C	Derivado de pJQ200KS con los fragmentos 145N y 145C	Este trabajo
pJQ200KS::146N-146C	Derivado de pJQ200KS con los fragmentos 146N y 146C	Este trabajo
pJQ200KS::148N-148C	Derivado de pJQ200KS con los fragmentos 148N y 148C	Este trabajo
pJQ200KS::148N-146C	Derivado de pJQ200KS con los fragmentos 148N y 146C	Este trabajo
pJQ200KS::traMa-N-traMa-C	Derivado de pJQ200KS con los fragmentos traMa-N y traMa-C	Este trabajo
pJQ200KS::traR-N-traR-C	Derivado de pJQ200KS con los fragmentos traR-N y traR-C	Este trabajo
pBBR1MCS-3	Tc ^r . Vector de clonado de bajo número de copias, con promotor <i>lac</i> , replicativo en rizobios.	Kovach <i>et al.</i> (1995)
pBBR1MCS-5	Gm ^f . Vector de clonado de bajo número de copias, con promotor <i>lac</i> , replicativo en rizobios.	Kovach <i>et al.</i> (1995)
pBBR1MCS-5::LPU83a_0145	Derivado de pBBR1MCS-5 conteniendo copia del gen LPU83a_0145.	Este trabajo
pBBR1MCS-5::LPU83a_0146	Derivado de pBBR1MCS-5 conteniendo copia del gen LPU83a_0146.	Este trabajo
pBBR1MCS-5::LPU83a_0148	Derivado de pBBR1MCS-5 conteniendo copia del gen LPU83a_0148.	Este trabajo
pBBR1MCS-5::LPU83a_0145::Histag	Derivado de pBBR1MCS-5 conteniendo copia del gen LPU83a_0145 fusionada a His-tag	Este trabajo

pBBR1MCS-5::LPU83a_0145::GFP	Derivado de pBBR1MCS-5 conteniendo copia del gen LPU83a_0145 fusionada a GFP	Este trabajo
pBBR1MCS-5::LPU83a_0146::Histag	Derivado de pBBR1MCS-5 conteniendo copia del gen LPU83a_0146 fusionada a His-tag	Este trabajo
pBBR1MCS-5::LPU83a_0146::GFP	Derivado de pBBR1MCS-5 conteniendo copia del gen LPU83a_0146 fusionada a GFP	Este trabajo
pBBR1MCS-5::LPU83a_0148::Histag	Derivado de pBBR1MCS-5 conteniendo copia del gen LPU83a_0148 fusionada a His-tag	Este trabajo
pBBR1MCS-5::LPU83a_0148::GFP	Derivado de pBBR1MCS-5 conteniendo copia del gen LPU83a_0148 fusionada a GFP	Este trabajo
pBBR1MCS-3::LPU83a_0146::mCherry	Derivado de pBBR1MCS-3 conteniendo copia del gen LPU83a_0146 fusionada a mCherry	Este trabajo
pBBR1MCS-5::traR	Derivado de pBBR1MCS-5 conteniendo copia del gen <i>traR</i>	(Torres Tejerizo <i>et al.</i> , 2014)
pBBR1MCS-5::88-146	Derivado de pBBR1MCS-5 conteniendo copia del gen LPU88a_0146 de <i>E. meliloti</i> LPU88	Este trabajo
pBBR1MCS-5::88-148	Derivado de pBBR1MCS-5 conteniendo copia del gen LPU88a_0148 de <i>E. meliloti</i> LPU88	Este trabajo
pHU231	Tc ^r . Vector utilizado para fusiones transcripcionales a eGFP	(McIntosh <i>et al.</i> , 2008)
pHU231 región intergénica::GFP	Derivado de pHU231 con la región intergénica de los genes <i>traR</i> y LPU83a_0148 de LPU83 clonado <i>upstream</i> a la GFP	Este trabajo
pRK2013	Km ^r . replicón ColE1, tra ⁺ de RK2	(Figurski & Helinski, 1979)
pRK600	Cm ^r . replicón ColE1, tra ⁺ de RK2	Kessler <i>et al.</i> (1992)
pMP6	Gm ^r . Tc ^r . Vector conteniendo eGFP.	(Pistorio <i>et al.</i> , 2002)
pUC19	Amp ^r . Vector de alto número de copias	(Vieira & Messing, 1982)
pUC19 GFP	pUC19 conteniendo la eGFP de pMP6	Este trabajo
pUC19 región intergénica::GFP	pUC19 eGFP conteniendo el promotor del gen <i>traR</i> de LPU83 <i>upstream</i> a la eGFP	Este trabajo
pZLR4	Derivado de pBBR1MCS-5 (Gm ^r) conteniendo la fusión reportera <i>traG::lacZ</i> y el gen <i>traR</i> de pTiC58	(Cha <i>et al.</i> , 1998)

II.1.c Medios de cultivo y de conservación de los microorganismos.

II.1.c.1 Medios de cultivo

Los cultivos de las bacterias de los géneros *Ensifer*, *Agrobacterium*, *Shinella* y *Rhizobium* se llevaron a cabo habitualmente en medio completo TY o YEM. Para el cultivo de las cepas de *Escherichia coli* se utilizó habitualmente el medio LB.

Tabla II.3. Medios de cultivo utilizados en el presente trabajo.

Medios de cultivo complejos		
TY -(Beringer, 1974)	CaCl ₂ .H ₂ O	0.7 g/L
	Triptona	5 g/L
	Extracto de levadura	3 g/L
YEM -(Vincent, 1970)	K ₂ HPO ₄	0.5 g/L
	NaCl	0.1 g/L
	MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2 g/L
	Manitol	10 g/L
	Extracto de levadura	0.4 g/L
LB -(Sambrook et al., 1989)	Glucosa	1 g/L
	NaCl	5 g/L
	Triptona	10 g/L
	Extracto de levadura	5 g/L
Medios de cultivo definidos		
VMM -(Vincent, 1970)	MOPS	10 g/L
	Manitol	10 g/L
	NH ₄ Cl	1 g/L
	MgSO ₄ .7H ₂ O	0.246 g/L
	CaCl ₂ .2H ₂ O	37 mg/L
	FeCl ₃ .6H ₂ O	10 mg/L
	H ₃ BO ₃	3 mg/L
	MnSO ₄ .H ₂ O	1.7 mg/L
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.3 mg/L
	NaMoO ₄ .2H ₂ O	0.12 mg/L
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0.065 mg/L
	K ₂ HPO ₄	0.348 g/L
	Biotina	1 mg/L

Para la preparación de medios sólidos se utilizó en todos los casos 15 g/L de agar. Al utilizar medio YEM sólido se le adicionó rojo congo 0.25 % p/v.

Los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave a 120 °C durante 20 minutos.

La temperatura de incubación para el crecimiento de las cepas de *E. coli* fue 37 °C; las bacterias de los géneros *Ensifer*, *Agrobacterium*, *Shinella* y *Rhizobium* se incubaron a 28 °C.

II.1.c.2 Medios de conservación

La conservación a largo plazo de las cepas bacterianas se realizó por congelamiento de alícuotas de cultivos crecidos hasta fase logarítmica tardía que fueron luego suplementadas con glicerol estéril hasta alcanzar una concentración final 25 %v/v o 50 %v/v. Las suspensiones de bacterias fueron congeladas a -80 °C o a -20 °C, respectivamente, y preservadas a esa temperatura.

II.1.c.3 Antibióticos

Los antibióticos, cuando se requirieron, fueron adicionados a los medios de cultivo a partir de soluciones concentradas de los mismos preparados en agua desionizada salvo en los casos de tetraciclina, que se utilizó etanol y para rifampicina y espectinomicina, en los que se utilizó metanol. Las soluciones preparadas en agua se esterilizaron por filtración empleando membranas de nitrocelulosa de 0,2 μm de tamaño de poro. Las concentraciones finales en los medios de cultivo fueron ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$): para *E. coli* kanamicina sulfato (Km) 25; y para rizobios, neomicina sulfato 120 (Nm), ampicilina 200 (Ap), estreptomycinina 400 (Sm), rifampicina 200 (Rifa), espectomicina 200 (Sp), tetraciclina 5 (Tc), gentamicina (Gm) 30 para rizobios y 10 para *E. coli*.

II.2 Procedimientos microbiológicos

II.2.a Recuento de bacterias en medios líquidos

El recuento del número de unidades formadoras de colonias (ufc) en un medio líquido se determinó por el método de recuento de gotas en placa (Herigstad *et al.*, 2001). Para ello, se realizaron sucesivas diluciones del cultivo cuyo número de ufc se quiso determinar, en solución fisiológica estéril. Para cada dilución, se sembraron 10 gotas de 10 μl cada una en medio TY sólido (conteniendo o no antibiótico, según el caso). Luego se incubó durante 48 o 72 hs a 28 °C (dependiendo del microorganismo), pasado este tiempo se contaron las colonias en cada gota. En aquellas diluciones en las que se visualizaron entre 1 y 20 colonias, se realizó un promedio de las 10 gotas y se refirió al número de ufc/ml del cultivo original.

II.2.b Conjugaciones biparentales

Las conjugaciones fueron realizadas empleando la técnica de Simon *et al.* (1983) con modificaciones menores según se indica a continuación. En un microtubo de polipropileno de 1,5 ml se mezclaron 0,7 ml de un cultivo de la cepa donadora ($\text{DO}_{620\text{nm}} = 0,8 - 1,0$ o según se indique) con 0,7 ml de un cultivo de igual densidad óptica de la cepa receptora. La mezcla fue luego centrifugada a 2,500 rpm durante 10 minutos y el sedimento fue resuspendido suavemente en aproximadamente 50 μl de medio líquido TY. La suspensión entonces fue colocada en una caja de

Petri con medio TY sólido sin antibióticos e incubada a 28°C durante 12 a 16 horas. La mezcla de bacterias fue finalmente resuspendida en medio líquido TY y plaqueada en medio sólido TY suplementado con el (los) antibiótico(s) adecuado(s) para la selección de transconjugantes. En todas las conjugaciones se realizaron controles en los que sólo se agregaron la bacteria donadora o la receptora.

Para los recuentos de las bacterias donadoras y receptoras se realizaron las diluciones seriadas correspondientes en solución MgSO₄ (10 mM) y Tween 40 (0.01 % V/V) como se detalla en II.2.a.

II.2.c Conjugaciones triparentales

Mediante esta metodología se realizó la transferencia de plásmidos no autotransmisibles (conteniendo el *oriT* del plásmido RK2) desde cepas que no poseían las funciones compatibles para la transferencia de los mismos. Para ello se utilizaron dos plásmidos *helper* (de ayuda) según el caso, pRK2013 o pRK600 desde una tercera cepa de *E. coli* (conjugaciones triparentales). Para ello fueron mezclados en una proporción de volúmenes 1:1:1, la cepa donadora, la receptora y la cepa movilizadora (*helper*), todas en su fase exponencial tardía de crecimiento (500 µl de cada una). Esta mezcla fue centrifugada a 640 g por 10 minutos y el sedimento bacteriano fue resuspendido en 100 µl de medio líquido TY. La mezcla fue colocada sobre una placa conteniendo medio sólido TY. Las cajas fueron incubadas a 28°C por 12 a 16 horas. La mezcla de bacterias fue resuspendida en medio TY líquido y plaqueada en medio sólido TY suplementado con el (los) antibiótico(s) adecuado(s). Se realizaron controles en los que la cepa donadora, receptora y portadora del plásmido de ayuda se procesaron en forma independiente.

II.2.d Preparación de células electrocompetentes. Electrotransformación de *E. coli*

Se siguió la técnica de Tung & Chow (1995), con leves modificaciones. Se inocularon 500 ml de medio LB con cloruro de sodio con 1 ml de un cultivo de la cepa de *E. coli* de interés que había sido crecida desde el día anterior. El cultivo fue incubado a 37 °C y agitado vigorosamente hasta que la DO a 600nm llegó a 0,8 unidades. Las células fueron centrifugadas a 4000 g por 15 min a 4 °C y se lavaron 2 veces con glicerol 10% a 4 °C. Luego, las células se resuspendieron suavemente en glicerol 10 % a 4 °C y se fraccionaron en alícuotas de 100 µl.

Las transformaciones fueron llevadas a cabo usando un equipo Gene Pulser (Bio-Rad) y en cubetas de 0,2 cm bajo las condiciones recomendadas por el fabricante (25 µF, 200µ, 2,5 kV). Luego de la transformación se adicionó inmediatamente a las células 1 ml de medio LB, y la mezcla se incubó 1 hora a 37 °C para permitir que la información contenida en el DNA introducido se

expresara. Luego de la incubación las bacterias fueron plaqueadas en medio LB sólido selectivo e incubadas una noche a 37 °C.

II.2.e Evaluación de la estabilidad plasmídica

Se inocularon cultivos con cada cepa en medio VMM sin adición de antibióticos, y al llegar a fase estacionaria se repicaron en medio fresco. El proceso se repitió diariamente durante cuatro días, abarcando aproximadamente 40 generaciones de cada cepa. Al último cultivo de cada cepa, se le realizaron diluciones seriadas y se plaquearon en medio TY sin antibiótico y en medio TY con el antibiótico al cual el plásmido pLPU83a es resistente, para observar la proporción de células que habían perdido el plásmido.

II.3 Técnicas de biología molecular

II.3.a Preparación de DNA plasmídico en pequeña escala (*minipreps*)

Los plásmidos de *E. coli* fueron preparados por la técnica de lisis alcalina descrita por Sambrook, *et al.* (1989). Alternativamente, luego de obtener el sobrenadante de lisis, se purificó con sílica (Sigma). Para esto se le agregó 10 µl de suspensión de sílica al extracto de la lisis alcalina y se mezcló bien. Se centrifugó 10 segundos a máxima velocidad y se descartó el sobrenadante. Luego de realizar 3 lavados con 500 µl de solución de lavado (se resuspendió completamente, se centrifugó 10 segundos a máxima velocidad y se descartó el sobrenadante), se dejó secar la sílica a 37° C. Para finalizar, se agregó 30 µl de agua y se incubó 5 minutos a 60°C. Se centrifugó 3 minutos a máxima velocidad y se tomó el sobrenadante que contenía el DNA.

Suspensión de sílica: Se colocan 2 gr de sílica Sigma en 15 ml de agua destilada, se lava 3 veces centrifugando a 2000 g por 2 minutos y se resuspende la sílica en dos volúmenes de agua miliQ.

Solución de Lavado: 50 mM NaCl; 10 mM Tris pH 7,5; 2.5 mM EDTA; 50 % etanol.

II.3.b Extracción de DNA total

A partir de cultivos en fase exponencial tardía, se centrifugó 1 ml de los mismos durante 3 min en un microtubo de polipropileno. Las células se lavaron luego con 100 µl de N-lauril sarcosina 0,1 % (P/V) en TE y se centrifugó durante 2 minutos. Se descartó el sobrenadante y se lavó con 1 ml de NaCl 1M. A continuación, el sedimento se resuspendió en 250 µl de sacarosa 20 % (P/V) en TE, se añadieron 250 µl de lisozima 5 mg/ml en TE, se incubó 1 hora a 37 °C, y luego se agregaron 50 µl de pronasa (2,5 mg/ml en TE) y 100 µl de SDS al 5 % (P/V) en TE. La suspensión que fue mezclada por inversión se incubó a 37°C durante 1-2 horas. Posteriormente, a la solución de DNA se le añadió 200 µl de fenol equilibrado con Tris pH 8, 70 µl de acetato de sodio 3 M pH 5,4 y 100 µl de cloroformo.

Se mezcló suavemente. La mezcla se centrifugó durante 15 minutos a 13000 rpm pasando a continuación la fase superior acuosa a un nuevo tubo donde se agregaron 200 μ l de cloroformo, se agitó suavemente y se centrifugó durante 15 minutos a 13000 rpm. Recogida la fase acuosa, el DNA se precipitó añadiendo un volumen de isopropanol frío y centrifugando durante 15 minutos a 13000 rpm. El precipitado obtenido se lavó con 0,5 ml de etanol al 70% y se incubó a temperatura ambiente durante 20-30 minutos. El DNA se resuspendió en 25-50 μ l de agua y se incubó a 60° durante una hora.

En ocasiones se utilizó el Kit comercial “*Wizard Genomic DNA Purification Kit*” de PROMEGA, siguiendo las instrucciones del producto.

II.3.c Electroforesis de DNA

II.3.c.1. Geles de lisis *in situ*.

Los perfiles de plásmidos fueron obtenidos por el método de lisis *in situ* de Eckhardt (1978). Las bacterias fueron cultivadas en medio TY líquido. Alícuotas de 1 ml de cultivos crecidos hasta una DO_{600nm} de 0,2 fueron centrifugadas y las células lavadas con 1 ml de solución 0,3% (P/V) de sarcosilato de sodio. Las células de cada muestra fueron centrifugadas nuevamente, resuspendidas en 15 μ l de solución de ficoll 20% (P/V), y mantenidas en agua hielo hasta el momento de sembrar el gel de lisis/separación (0,45-0,80 % de agarosa -según los plásmidos a resolver-en buffer TBE (Tris 0,09 M; ácido bórico 0,09 M; EDTA 0,002 M). Previo a la siembra de las muestras en cada fosa del gel se introdujeron 25 μ l de una solución de SDS 10% (P/V) con xylene cyanol, y la electroforesis se corrió a polaridad invertida hasta que el frente retrocedió un centímetro. Se detuvo la corrida y se procedió a la siembra. Para ello se agregaron 15 μ l de solución de lisis (sacarosa 8% ficoll 2% Tris 50 mM EDTA 25 mM, RNAsa 0,4 mg/ml lisozima 1 mg/ml) a cada una de las muestras, se mezclaron en forma suave e inmediatamente se sembraron 15 μ l de la mezcla por calle. Las condiciones de corrida variaron dependiendo los plásmidos a resolver. Luego se lavó con agua 30 minutos y se tiñó con bromuro de etidio (0,5 μ g/ml).

II.3.c.2. Separación e identificación de fragmentos de restricción o de amplificación por PCR mediante electroforesis en geles de agarosa.

La separación de fragmentos de DNA mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa (0,8-2 % p/v) fue realizada empleando TBE (Tris 89 mM, Na_2EDTA 2,5 mM, H_3BO_3 89 mM, pH 8,2) como *buffer* de corrida. El voltaje de trabajo varió entre 5 y 12 volts/cm. Como solución de siembra se utilizó sacarosa 40% y azul de bromofenol 0,25% en una relación 5 μ l solución de DNA en agua o TE / μ l solución de carga.

II.3.c.3. Revelado de geles y fotografía.

El agregado de 0,5 $\mu\text{g/ml}$ de bromuro de etidio a los geles de agarosa permitió la visualización de los fragmentos de DNA por transiluminación con luz ultravioleta de $\lambda = 260 \text{ nm}$. El registro de los resultados se realizó mediante fotografía de los geles con una cámara digital bajo iluminación ultravioleta.

II.3.c.4. Estimación de los pesos moleculares de fragmentos de restricción por electroforesis en gel de agarosa.

El tamaño de los fragmentos de restricción fue determinado por interpolación gráfica, realizada mediante el uso del programa LabWorks (UVP Inc., USA). Como patrones de peso molecular fueron utilizados DNA del fago lambda digerido con la endonucleasa de restricción *HindIII* (fragmentos de 23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027 y 564 pb) o marcadores de peso molecular comerciales.

II.3.c.5. Extracción de fragmentos de DNA de geles de agarosa.

Luego de cortar la banda del gel de agarosa con el fragmento que se deseaba purificar, se lo colocó en un tubo de polipropileno y se le agregaron 5 volúmenes de $\text{NaI } 6 \text{ M}$. Se colocó a $55 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 5 minutos agitándolo ocasionalmente. Luego se dejó enfriar a temperatura ambiente y se agregó 1/10 de volumen de acetato de sodio $3 \text{ M pH } 5,4$. A continuación se purificó con sílica (Sigma). Para esto se le agregó $10 \mu\text{l}$ de suspensión de sílica y se procedió como se describe en II.3.a para la purificación de plásmidos.

II.3.c.6. Precipitación del DNA con etanol.

Cuando fue necesario purificar el DNA de impurezas o luego de tratamientos enzimáticos se realizó la precipitación del DNA con etanol. Para esto, se agregaron $10 \mu\text{l}$ de acetato de sodio $3 \text{ M pH } 5,4$ a la mezcla, se llevó a $100 \mu\text{l}$ con agua bidestilada y se agregó $300 \mu\text{l}$ de etanol 96° frío. Se incubó a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 2 horas y se centrifugó 30 minutos a 13.000 rpm a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Se descartó el sobrenadante con pipeta y se dejó secar para eliminar el etanol remanente. Luego se resuspendió en $20 \mu\text{l}$ de agua bidestilada estéril.

II.3.d Tratamientos enzimáticos del DNA

Las reacciones enzimáticas del DNA se realizaron en las condiciones óptimas para la enzima, siguiendo las indicaciones de temperatura y tampón propuestas por las casas comerciales (*Invitrogen*, *Fermentas* y *Promega Corp.*), y las recomendaciones descriptas en Sambrook *et al.* (1989). Las mezclas de reacción fueron incubadas a la temperatura óptima de las enzimas utilizadas. Cuando

fue necesario luego de los tratamientos enzimáticos se procedió a la inactivación de las enzimas por desnaturalización térmica.

II.3.e Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Los ensayos de PCR fueron realizados empleando un termociclador. Se utilizaron las DNA polimerasas Platinum *pfx* (temperatura óptima de elongación 68 °C), DNA Taq polimerasa (temperatura optima de elongación 72 °C) de Invitrogen o LongAmp Taq DNA polimerasa (temperatura óptima de elongación 65 °C) de *New England Biolabs* para fragmentos mayores a 2,5 Kpb, siguiendo las instrucciones de los respectivos fabricantes. Los *primers* fueron utilizados 10 µM para PCR específicas, con volumen final de 25 µl en cada mezcla de reacción. Los *primers* empleados para la realización y evaluación de mutantes están listados en la tabla 2.4. Los *primers* fueron sintetizados por *Operon*, *molecules for life* o *GenBiotech*.

Finalizada la reacción de PCR, 10 µl del producto fueron sembrados en un gel de agarosa 1,5% (P/V) conteniendo 0,5-1,0 µg/ml de bromuro de etidio.

Los DNA moldes para las amplificaciones por PCR fueron obtenidos utilizando alguna de las siguientes metodologías:

a) para amplificaciones específicas sobre DNA genómico: Las células provenientes de cultivos líquidos o sólidos (10^8 - 10^9 ufc) fueron resuspendidas en 100 µl agua bidestilada estéril. La suspensión fue hervida por cinco minutos y centrifugada a 14.000 g por 4 minutos y 5 µl de los sobrenadantes fueron usados como DNA molde. El remanente fue conservado a -20 °C.

Alternativamente se realizaron preparaciones de DNA total de acuerdo a la metodología que se describió en II.3.b.

b) para la amplificación de secuencias específicas de DNA contenidas en plásmidos: Se preparó DNA plasmídico según se detalla en II.3.a y se realizó una dilución final 1/200.

Tabla II.4. Lista de *primers* utilizados en el presente trabajo

Nombre	Secuencia	Referencias
M13 Fw-40	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'	<i>Primer universal</i>
M13 Rv-40	5'-GTTTCCCAGTCACGAC-3'	<i>Primer universal</i>
145-Cter-xba	5'-AAAAATCTAGAGGCCCGACTTCTTTGGT-3'	Este trabajo

145-Cter-hind	5'-AAAAAAGCTTGCGCTCACCTCTCCGGTTT-3'	Este trabajo
145-Nter-hind	5'-AAAAAAGCTTGAGCCAGTCATACGCC-3'	Este trabajo
145-Nter-sal	5'-AAAAAGTCGACTGGAAAAGCGGGCTGA-3'	Este trabajo
146-Cter-xba	5'-AAAAATCTAGAGTACTCGGTCAACTCAAG-3'	Este trabajo
146-Cter-bam	5'-AAAAAGGATCCCTTCAGGTGGTGTG-3'	Este trabajo
146-Nter-bam	5'-AAAAAGGATCCATCAAGCCAGCTAAG-3'	Este trabajo
146-Nter-sal	5'-AAAAAGTCGACTTCATGTGCCTCTCTG-3'	Este trabajo
148-Cter-xba	5'-AAAAATCTAGAGATCAAGCCAGCTAAG-3'	Este trabajo
148-Cter-bam	5'-AAAAAGGATCCTCTACGGTTCGATCTG-3'	Este trabajo
148-Nter-bam	5'-AAAAAGGATCCGAAATCCGTCTTACC-3'	Este trabajo
148-Nter-sal	5'-AAAAAGTCGACTCACGTCGCCTACTC-3'	Este trabajo
145Cter-Gfp	5'-GCTGCCGCCGCCGCTGCCGCCGGGGCGAAACCGGAGAGGT-3'	Este trabajo
145Nter Kpn	5'-AAAAAGGTACCTGGAAAAGCGGGCTGA-3'	Este trabajo
145Cter-His 6x Xba	5'- AAAAATCTAGACTAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGGGCGAAACCGGAGAGG T-3'	Este trabajo
145Cter Xba	5'-AAAAATCTAGACTAGGGCGAAACCGGAGAGGT-3'	Este trabajo
146Cter-Gfp	5'-GCTGCCGCCGCCGCTGCCGCCGACAGACAGAAACCGTTT-3'	Este trabajo
146Nter Kpn	5'-AAAAAGGTACCCATCGGTGTTCTG-3'	Este trabajo
146Cter-His 6x Xba	5'-AAAAATCTAGATCAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGAGACAGAAACCGTTT-3'	Este trabajo
146Cter Xba	5'-AAAAATCTAGATCAAGACAGAAACCGTTT-3'	Este trabajo
148Cter-Gfp	5'-GCTGCCGCCGCCGCTGCCGCCGACAGATAACAATTTGTTTGCT-3'	Este trabajo
148Nter Kpn	5'-AAAAAGGTACCCCTGCCGACCTCCTC-3'	Este trabajo
148Cter-His 6x Xba	5'- AAAAATCTAGACTAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGAGATACAATTTGTTTGCT- 3'	Este trabajo
148Cter Xba	5'-AAAAATCTAGACTAAGATACAATTTGTTTGCT-3'	Este trabajo
TraR_left_Xho	5'-AAAAACTCGAGAGCTCCTTCAATCCAG-3'	Este trabajo
TraM_Cter_Bam	5'-AAAAAGGATCCGCTCACGACACTTCTCAAC-3'	Este trabajo
TraM_Nter_Bam	5'-AAAAAGGATCCGTGTACGCCTTGTGTTG-3'	Este trabajo

TraM_Nter_Xba	5'-AAAAATCTAGATGTGCTCGTTGATCAG-3'	Este trabajo
traR Fw out	5'-GGGACGGGAGGAGCAG-3'	Este trabajo
traR Rv out	5'-CCGGTGACCGAGACGA-3'	Este trabajo
tral-a051-Rv	5'-CTGAGGCCGGAGGACAG-3'	Este trabajo
tral-a051-Fw	5'-GCCAACCCGCTTTATGTG-3'	Este trabajo
GFP N-ter	5'-GGCGGGCGGCAGCGGGCGGCGGCAGCATGGTGAGCAAGGGCGAG-3'	Este trabajo
GFP C-ter Xba	5'-AAAAATCTAGATTACTTGTACAGCTCGTC-3'	Este trabajo
marca 88a left	5'-CTTCTTATGGCGACTG-3'	Este trabajo
marca 88a right	5'-GTCGACCGAATACTC-3'	Este trabajo
88 chequeo	5'-GACTCACAGCTCATCAAG-3'	Este trabajo
88 148 left	5'-CTTCTTCGCTTCCTC-3'	Este trabajo
88 148 right	5'-ATGAGCTGTGAGTCTCTG-3'	Este trabajo
88 146 left	5'-CTTTCCTGAGTGTGACTG-3'	Este trabajo
88 146 right	5'-CTAAGGAGGATGTCTGC-3'	Este trabajo
trbE left	5'-GCATAGGAAACAGTGG-3'	Este trabajo
trbE right	5'-TGAGGAGGCTACAATG-3'	Este trabajo
Shinella left	5'-GATCAGGTGCTTCAGAC-3'	Este trabajo
Shinella right	5'-GTCATCGAACCTACCAC-3'	Este trabajo
Shinella chequeo	5'-GGAGGTGCCTACTACTAC-3'	Este trabajo
traM_sym_left	5'-CGACATACTCATCCTGCAG-3'	Este trabajo
traM_sym_right	5'-GTCTACGAGGAATGGAC-3'	Este trabajo
Prom_148_left	CGGTGGAGGGAGAAAT	Este trabajo
Prom_TraR_right	TCAGCGTTGCATCGTC	Este trabajo

II.3.f Construcción de mutantes por recombinación homóloga simple

Se diseñaron los *primers* para amplificar una región interna al gen a mutar (ver tabla 2.4). Luego se amplificó dicho fragmento con la polimerasa Platinum *pfx* (que deja extremos romos) y se clonó en el plásmido pK18mob o pG18mob2, previamente digerido con *SmaI* (extremos romos). La

selección se realizó en placas conteniendo Km o Gm respectivamente y X-gal, permitiendo la selección blanco/azul. Uno de los clones obtenidos fue secuenciado para corroborar el correcto clonado. Cada plásmido fue transferido desde *E. coli* S17-1 a la cepa a mutar por conjugación y los transconjugantes fueron seleccionados con los antibióticos correspondientes. La correcta integración de los plásmidos fue confirmada por PCR utilizando los *primers* M13 y los *primers* con la denominación *out* correspondiente.

II.3.g Construcción de mutantes delecionales por doble recombinación homóloga

Se diseñaron los *primers* para amplificar dos regiones internas contiguas del gen a deleccionar, en los cuales se incluyeron sitios de reconocimiento para enzimas de restricción (ver tabla 2.4). Luego se amplificaron dichos fragmentos con la polimerasa Platinum *pfx* (que deja extremos romos) y se clonaron en el plásmido pK18mob, previamente digerido con *SmaI* (extremos romos). Los fragmentos se subclonaron en el vector pJQ200KS+, el cual no es capaz de replicar en rizobios. La construcción con ambos fragmentos se introdujo en la cepa *R. favelukesii* LPU83 y se corroboró el primer evento de recombinación. Luego, las cepas con el vector integrado se plaquearon en placas conteniendo los antibióticos correspondientes y sacarosa 10%, buscando el segundo evento de recombinación. Los clones capaces de crecer en sacarosa fueron analizados por PCR, buscando aquellos en los cuales se generó la deleción del gen.

II.3.h Construcción de plásmidos para complementar las cepas mutantes

Se diseñaron *primers* para amplificar una copia entera del gen salvaje. Cada uno de los genes fue amplificado con la polimerasa *pfx* y se clonó en el vector de amplio rango de huésped pBBR1MCS-5. Uno de los clones obtenidos fue secuenciado para corroborar el correcto clonado. Luego, el vector fue introducido en la cepa a complementar mediante conjugación triparental.

II.3.i Construcción de fusiones traduccionales a His-tag y GFP

Se diseñaron *primers* para amplificar una copia entera del gen a fusionar y la proteína GFP o el His-tag, diseñando una región de hibridación de 24 nucleótidos entre la región 3' del gen amplificado y la región 5' del gen de la GFP o el His-tag. Cada fragmento fue amplificado independientemente utilizando la polimerasa Platinum *pfx* y luego los fragmentos amplificados fueron combinados, utilizando una PCR en dos etapas. En la primera de ellos se buscaron las condiciones para permitir la hibridación de las regiones de 24 nucleótidos complementarias y la extensión de las mismas, para luego amplificar la molécula entera en la segunda etapa. Los productos obtenidos fueron clonados en el vector pBBR1MCS-5.

II.3.k Medida de la fluorescencia de cepas conteniendo fusiones transcripcionales a GFP

Para los ensayos de cuantificación de fluorescencia de fusiones transcripcionales a GFP se utilizó un fluorómetro DeNovix QFX. Para llevar a cabo las medidas en *E. coli*, se crecieron las cepas a analizar en medio LB líquido, agregando los antibióticos correspondientes. Se colocó el volumen necesario de cada cultivo para obtener una Do de 0.2 en tubos de 0.5 ml, se centrifugaron y los *pellet* resultantes se resuspendieron en agua destilada, para evitar la autofluorescencia del medio de cultivo. Los tubos fueron excitados con longitudes de onda cercanas a los 470 nm.

Para las medidas en *R. favelukesii* y *A. tumefaciens*, se crecieron cultivos en 15 ml de medio TY líquido. Los cultivos fueron centrifugados y lavados dos veces con 5 ml de solución de NaCl 1 M para eliminar el EPS producido por las células. Las células se resuspendieron en 1 ml de la misma solución, utilizando 0.2 ml para medir la fluorescencia.

II.4 Detección de AHLs

Las AHLs fueron detectadas a través de una cromatografía de capa fina, empleando el plásmido reportero pZLR4 como se describió previamente (Shaw et al., 1997, Cha et al., 1998). Este plásmido contiene al gen *traR* y una fusión reportera *traG::lacZ* de *A. tumefaciens* pTI58. Los extractos fueron preparados a partir de 5 ml de cultivos crecidos en medio TY. La presencia de las moléculas autoinductoras se detectó debido a la capacidad de formar un complejo con TraR, induciendo la expresión del reportero *traG::lacZ*.

II.5 Análisis metabólico

El crecimiento de *R. favelukesii* LPU83 se realizó en cultivos *batch* de 200 ml en medio VMM. Los cultivos se centrifugaron a durante 3 minutos a 10000 RPM y los *pellet* se congelaron en nitrógeno líquido y fueron almacenados a -80°C . Para procesar las muestras, se procedió a la liofilización de las mismas. Posteriormente, las muestras se fraccionaron de a 10 mg, se agregó un mililitro de metanol 80% conteniendo 10 μM ribitol (como estándar interno) y 0.5 g de perlas de vidrio lavadas previamente con ácido (Sigma-Aldrich). Las células se lisaron por tratamiento en un FastPrep Instrument (Qbiogene, Heidelberg, Germany) a 6.5 m/s por 45 s, tres veces. Luego, las muestras se centrifugaron a 18,500 g por 20 min a temperatura ambiente. 800 μl del sobrenadante se evaporaron hasta que quedó totalmente seco bajo corriente de nitrógeno. A continuación, se realizó la derivatización para realizar el GC-MS/MS. El análisis se realizó con un cromatógrafo gaseoso TraceGC y un espectrómetro de masa PolarisQ ion trap equipado con un AS2000 de inyección automática (Thermo Finnigan, Dreieich, Germany). Luego se ejecutaron los archivos de identificación

y cuantificación de los metabolitos, teniendo en cuenta los tiempos de retención (Rt) correspondientes a las corridas de los patrones en el equipo. Previamente se realizó una búsqueda de cada metabolito en la corrida de las mezclas de referencia que lo contuvieran. Una vez hecho todo este análisis se obtuvieron los valores de las áreas de cada metabolito en cada muestra. En primer lugar, se analizaron los datos del ribitol, ya que al ser el normalizador afecta a los datos relativos del resto de los metabolitos. Posteriormente, se evaluó para cada metabolito, que el área identificada y usada para cuantificar se correspondiera en Rt y en el patrón de fragmentos m/z que le dan identidad al metabolito en cuestión. El análisis de los espectros, la asignación de identidad a los picos, las integraciones, y la obtención de los valores de las áreas de cada metabolito en cada muestra se llevó a cabo con el programa Xcalibur 2.0. Posteriormente, se analizaron los datos procesados con el programa Metaboanalyst 3.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/>) y Clustvis (<https://biit.cs.ut.ee/clustvis/>).

II.6 Análisis transcriptómico (RNA-Seq)

El crecimiento de *R. favelukesii* LPU83 se realizó en cultivos *batch* en medio TY. Posteriormente se agregó el reactivo RNA Protect (Qiagen) y se cosecharon las células, el pellet obtenido se congeló en nitrógeno líquido. La extracción de ARN se realizó utilizando el kit comercial (RNeasy® Protect Bacteria Mini Kit, Qiagen). Luego, el DNA se removió con DNAasa, libre de ARN (ThermoFisher). Luego se sustrajo el ARN ribosomal por medio de un *kit* comercial (Ribo-Zero rRNA removal kit, Illumina Inc.). Las bibliotecas de DNAC se prepararon con el kit comercial TruSeq® mRNA Sample Preparation (stranded) (Illumina Inc., San Diego, U.S.A.). Las muestras fueron secuenciadas por medio de la plataforma Illumina Hiseq disponible en el Centro de Biotecnología (CeBiTec, Bielefeld Universität, Germany). Con la información del secuenciamiento, se evaluó la calidad de las secuencias generadas con FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) y se alinearon con Bowtie2 (Langmead & Salzberg, 2012) al genoma de referencia de *R. favelukesii* LPU83. Luego, se utilizaron como herramientas bioinformáticas para la visualización, el *software* *ReadXplorer* (Hilker et al., 2014), que a su vez proveyó los *test* estadísticos para la búsqueda de genes de expresión diferencial como Deseq2 (Love et al., 2014).

II.7 Técnicas utilizadas para los análisis proteómicos

II.7.a. Extracción de proteínas totales.

Para comenzar, se centrifugaron 250 ml de cultivos que poseían un $DO_{600} = 1,5$ a 10.000 g por 30 min a 4°C, y se realizaron dos ciclos de resuspensión y centrifugación en 30 ml de solución buffer LS

(Low Salt: KCl, 3 mM; NaH₂PO₄, 9 mM; KH₂PO₄, 1,5 mM; NaCl, 68 mM). Los *pellets* secos así obtenidos se resuspendieron en 6,5 ml de *buffer* TRIS pH=7,6 y se les agregó 6,5 µl del inhibidor de proteasas PMSF (0,25M). Se procedió a la ruptura de las células colocando las muestras en viales conteniendo 500 mg de esferas de vidrio (1 mm) y aplicando 3 pulsos por 20 seg a velocidad 5500 en un homogenizador de alta potencia (Precellys, Bertin). Posteriormente, se separaron las esferas y los restos celulares centrifugando los tubos a 10.000 xg por 20 min a 4 °C y se recuperaron los sobrenadantes. Se procedió a la degradación de ácidos nucleicos adicionando 1 µl de DNAsa y 4 µl de RNAsa (10 mg/ml) por cada 5 ml de muestra e incubándolas 1 hs a 37 °C. Las muestras se conservaron a 4 °C.

II.7.b. Fraccionamiento subcelular para separar proteínas citosólicas y de membrana.

Para separar las proteínas solubles de aquellas asociadas a membranas, se realizó una ultracentrifugación a 100.000 xg por 2 hs. a 4 °C (ultracentrífuga Beckman Coulter, rotor SW41 Ti). Las proteínas citosólicas (sobrenadante) se precipitaron a 10.000 g 30 min a 4°C previa incubación por 24 hs. con 4 volúmenes de acetona fría. Estas proteínas y las proteínas de membrana (precipitados de la ultracentrifugación) se resuspendieron en un *buffer* de rehidratación (urea, 7M; tiourea, 2M; isopropanol, 10%; Tritón X100, 2%). Los preparados se conservaron a -80 °C.

II.7.c. Cuantificación de proteínas mediante el método de Bradford

Para la cuantificación de proteínas se utilizó el método de Bradford (Bradford, 1976). Este método se basa en el cambio de color del colorante Comassie Brilliant Blue G-250 en presencia de distintas concentraciones de proteínas. La interacción del colorante con aminoácidos básicos y aromáticos provoca un cambio en su máximo de absorción, de 465 nm a 595 nm (rojo y azul, respectivamente). Para determinar la concentración de proteínas en una muestra dada, se realizaron diluciones 1/5, 1/10 y 1/50 de la misma. En forma paralela se realizó la medida de muestras de BSA de concentración conocida a fin de realizar una curva de calibración (0,05 mg/mL; 0,1 mg/mL; 0,2 mg/mL; 0,4 mg/mL y 0,5 mg/mL). Tanto las muestras como la curva de calibración fueron medidas por triplicado. Se determinó la absorbancia a 595 nm de las diferentes diluciones y de la curva de calibración. La concentración de la muestra fue determinada a partir de la dilución que presentaba valores de absorbancia dentro del rango de la curva de calibración. Utilizando el valor de absorbancia a 595 nm y mediante interpolación de la curva de calibración se determinó la

cantidad de proteína en la muestra problema. Para la realización de estos ensayos se utilizó reactivo de Bradford comercial (BioRad) y BSA comercial (Sigma Aldrich).

II.7.d. Análisis de proteínas mediante geles de poliacrilamida discontinuos en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).

Para evaluar la calidad de las proteínas, se realizaron ensayos de electroforesis de geles de poliacrilamida 13% en condiciones desnaturalizantes (13% SDS-PAGE). Los geles de apilamiento se prepararon con 5% de poliacrilamida en Tris-HCl a pH= 6,8, mientras que los de separación se hicieron con 12,5% de poliacrilamida en Tris-HCl a pH= 8,8. En las calles del gel se sembraron 26 μ l de muestra previamente preparadas en buffer Laemmli 4X (278 mM Tris-HCl pH=6,8; glicerol 40 % v/v; SDS 4,4 %; azul bromofenol 0,02 %). Las corridas se llevaron a cabo durante 2 horas en equipos Miniprotean II (BioRad) a 100 -120 volts. Las proteínas en el gel fueron visualizadas por tinción con Azul Coomassie (metanol 50 %v/v, ácido acético 5 %v/v, Coomassie Brilliant Blue R2500, 1 % p/v). Los geles se incubaron con la solución colorante a temperatura ambiente durante 12 hs aproximadamente. Luego se destiñeron mediante una serie de lavados sucesivos con solución decolorante (metanol 50 % v/v, ácido acético 5 % v/v). El registro digital se realizó sobre un transiluminador con luz blanca.

II.7.e. Ensayos de *western blot*

Las muestras de proteínas sometidas a SDS-PAGE fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa mediante el equipo Mini Trans-Blot transfer Cell (BioRad) según las indicaciones del fabricante. En primera instancia se armó el dispositivo de transferencia con el gel a transferir y la membrana previamente tratada con buffer de transferencia (Tris 25mM; Glicina 192mM). Una vez armado, se aplicó sobre el mismo una diferencia de potencial de 100 V durante una hora en baño de agua-hielo. Luego se procedió al bloqueo de la membrana durante una hora a temperatura ambiente con solución de leche 3,0% p/v en TBS (TBS-BSA). Posteriormente se reemplazó la solución de bloqueo por una solución de TBS-leche conteniendo el anticuerpo primario (GFP antibody [3H9], Chromotek). La membrana fue incubada con esa solución durante toda la noche a 4°C y con agitación suave. Transcurrida esa incubación se retiró la solución del anticuerpo y se realizaron tres lavados con Tween 80 0,05% v/v en TBS. Se adicionó el anticuerpo secundario policlonal conjugado con peroxidasa HRP (Rat IgG HRP-conjugated Antibody, R&D systems) disuelto en TBS-leche y se incubó con agitación lenta durante 2,5 horas a temperatura ambiente. Se retiró la solución del segundo anticuerpo y se realizaron tres lavados con TBS-Tween y un lavado final con TBS. Para el revelado de la membrana se preparan las soluciones A (500 μ l Tris-HCl 1M pH 8.5; 30 μ l de H₂O₂

30%; 4,470 ml de H₂O bidestilada) y B (500μl Tris-HCl 1M pH 8.5; 50μl de ácido cumárico 90mM; 22μl de luminol 250mM; 4,428 ml de H₂O bidestilada). Se mezclan los 5ml de ambas soluciones al momento de ser utilizadas y se incuba la membrana por 30seg agitando manualmente para cubrir toda la superficie de la misma. Se retiran los restos del sustrato secando la membrana con papel de filtro y se coloca en el transiluminador, donde se adquieren las imágenes con cámara fotográfica digital HCCD BioChemi System Video (UVP Inc., USA).

II.8 Microscopía

Para obtener las imágenes microscópicas se utilizaron los microscopios TIRF Olympus Invertido IX81 con los láseres correspondientes a 488 nm y 561 nm con un objetivo 100X/1.49 o un microscopio de súper-resolución ONI (<https://oni.bio/>). Se utilizó un láser a 488 nm para excitar la proteína eGFP, y un láser HeNe 2.5mW a 594nm para la excitación de la sonda específica de membrana *FM™ 4-64 Dye (N-(3-Triethylammoniumpropyl)-4-(6-(4-(Diethylamino) Phenyl) Hexatrienyl) Pyridinium Dibromide)*. A partir de un precultivo de 24 horas en medio TY, las células se colectaron en tubos eppendorf de 1.5 mL y se centrifugaron a 10,000 x g durante 2 minutos. El *pellet* de células fue lavado 3 veces con una solución de MgSO₄ (10 mM) y Tween 40 (0.01 % V/V) y resuspendido en 500 μL de PBS 1X. En los casos necesarios, se incubaron durante 5 min con 5 μL de la sonda comercial FM4-64 (thermofisher).

Las células fueron colocadas en un portaobjetos de vidrio de 1 mm de espesor y cubiertas con un cubreobjetos de vidrio de 0.170 mm.

II.9 Programas estadísticos y análisis bioinformático

Para el análisis estadístico de los datos obtenidos de las conjugaciones cuantitativas, se utilizó el programa GraphPad. En el caso del análisis transcriptómico se utilizó el software ReadXplorer (Hilker et al., 2014) para el análisis estadístico y su visualización.

Para la comparación de secuencias de aminoácidos y el análisis de dominios conservados se utilizó la herramienta BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Altschul et al., 1997). El análisis de dominios transmembrana de cada proteína se realizó mediante TMHMM Server v. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>).

Para la construcción de árboles filogenéticos, las proteínas fueron alineadas con el módulo CLUSTAL presente en el paquete MEGA X (Kumar et al., 2018). Los modelos evolutivos para cada proteína fueron seleccionados con Prottest2.4 (Abascal et al., 2005). Los árboles de máxima

verosimilitud se infirieron bajo el modelo seleccionado usando PhyML v3.1 (Guindon & Gascuel, 2003). La robustez de las topologías fue evaluada mediante *bootstrap* (100)

Capítulo III. Búsqueda de posibles nuevos mecanismos regulatorios de la conjugación

III.1 Introducción

Como se mencionó en el capítulo introductorio (sección I.6), ha sido descrito que la transferencia horizontal de plásmidos en rizobios es regulada principalmente mediante dos mecanismos diferentes (Brom *et al.*, 2014). En algunos plásmidos, como por ejemplo el plásmido simbiótico pRetCFN42d de *Rhizobium etli* CFN42, la regulación viene dada por el par de genes *rctA/rctB*. En este sistema, el represor codificado por *rctA* se expresa constitutivamente, impidiendo la expresión de los genes necesarios para la conjugación. Para que el proceso conjugativo tenga lugar, es necesaria la expresión del gen *rctB*, el cual inhibe la expresión de *rctA* (Pérez-Mendoza *et al.*, 2005). Nogales *et al.* (2013) describieron el funcionamiento de un sistema dependiente de *rctA/rctB* en el plásmido simbiótico pSymA de *Ensifer (Sinorhizobium) meliloti* 1021. En este caso, para que la expresión de *rctB* sea posible, es necesaria la acción de *rctC*, el cual es regulado negativamente por el regulador *rctR* (en condiciones de laboratorio). En este caso, la conjugación ocurre ante la presencia de una señal todavía desconocida, que reprime al gen *rctR*, dando inicio a la cascada que finaliza con la expresión de los genes conjugativos y la consecuente transferencia del plásmido (Nogales *et al.*, 2013). Los genes descritos en *E. meliloti* 1021 fueron hallados también en el plásmido pAtC58 de la cepa *Agrobacterium tumefaciens* C58, pero no se encuentran presentes en el plásmido pRetCFN42d (Nogales *et al.*, 2013).

Mientras tanto, otro grupo de plásmidos es regulado por un mecanismo de **Quorum Sensing (QS)**, en donde el regulador transcripcional TraR es capaz de unirse a los promotores de genes conjugativos sólo en presencia de una alta concentración de **acil homoserin lactonas (AHLs)**. Estas pequeñas moléculas difusibles son sintetizadas por la AHL-sintasa TraI, una proteína codificada usualmente en el mismo plásmido. Las AHLs producidas en el interior de la célula se acumulan a medida que aumenta la densidad poblacional del cultivo y difunden hacia el medio extracelular. Cuando la densidad poblacional es lo suficientemente alta, la concentración de AHLs en el medio extracelular es tal que se produce el ingreso de dichas moléculas a las células, dando lugar a la interacción con TraR. El mecanismo que permite la expresión de los genes conjugativos en respuesta a las AHLs implica la unión de estas moléculas a un dominio de TraR (Luo & Farrand, 1999), induciendo un cambio conformacional en la proteína. Esto permite que TraR, unido a la AHL, sea capaz de unirse a elementos regulatorios presentes en promotores de genes conjugativos (cajas *tra*), y, de esta forma, se produzca la expresión de los genes necesarios para la conjugación. Como se mencionó previamente, el gen que codifica la proteína encargada de la síntesis de AHLs se encuentra frecuentemente en el mismo plásmido. En muchos de los casos estudiados se ubica en las cercanías del regulador codificado por *traR* (Torres Tejerizo *et al.*, 2014).

Al analizar la secuencia del plásmido pLPU83a de *Rhizobium favelukesii* LPU83, se observó la presencia del gen *traR*, ubicado entre las regiones del Dtr y Mpf, pero no se encontró ninguna copia cercana de *traI* (Torres Tejerizo *et al.*, 2014). A pesar de esto, el plásmido es capaz de ser transferido a otras cepas, mostrando que la ausencia de *traI* en la región del Dtr y Mpf no anula la conjugación, como sí ocurre en el plásmido pRetCFN42a de *R. etli* (Tun-Garrido *et al.*, 2003). Torres Tejerizo *et al.* (2014) demostraron que al generar una versión de pLPU83a mutante en *traR*, el mismo perdía su capacidad conjugativa. De esta forma, a pesar de la ausencia del circuito regulatorio convencional de QS, se comprobó que TraR es esencial para la transferencia de pLPU83a.

Considerando la estrecha relación entre la presencia de *traR* y la regulación de la conjugación mediada por QS, y teniendo en cuenta la importancia de este gen en la transferencia de pLPU83a, en este capítulo nos propusimos comenzar la caracterización de la regulación de la transferencia de dicho plásmido, como así también estudiar la relación entre la proteína TraR de este sistema y aquellas cuyo circuito regulatorio se conoce con mayor detalle.

III.2 Caracterización genética del plásmido pLPU83a

La secuencia del plásmido pLPU83a de *R. favelukesii* LPU83 fue publicada algunos años atrás (Wibberg et al., 2014). Dicho plásmido cuenta con 151.688 pb y posee un porcentaje de GC del 59,65%. La anotación automática del plásmido mediante la plataforma GenDB (Meyer et al., 2003) arrojó 160 CDS. Para cada uno de ellos fue posible encontrar transcritos correspondientes obtenidos mediante experimentos de RNAseq (Nilsson et al., 2020), mostrando que todos los CDS predichos son expresados. Como una primera aproximación a la caracterización del plásmido, en este trabajo se analizó en detalle la secuencia del mismo, detectando la presencia de regiones repetidas, las cuales fueron analizadas mediante una matriz de puntos (figura III.1B). El análisis mostró dos regiones repetidas invertidas, una de 4.531 pb (denominada R1 y R2) y otra de 1.340 pb (S1 y S2). Las dos copias de la primera región se encontraron entre las bases 35.187 y 39.717 (R1) y entre 92.597 y 97.127 (R2). Para la segunda de las regiones, las copias se encontraron entre las bases 41.728 y 43.067 (S1) y entre 104.539 y 105.878 (S2). En la figura III.1A se muestra un esquema de la estructura de pLPU83a, donde se detallan las regiones mencionadas y otros elementos del plásmido. Analizando en detalle la más larga de las secuencias repetidas, se detectó que estaba compuesta por una transposasa del tipo Tn3, una resolvasa y una metiltransferasa. Al mismo tiempo, se observó la presencia de un *cluster* de genes *exo* entre ambas regiones invertidas, lo que podría significar una inserción de ADN desde otro organismo, posiblemente mediante una recombinación ilegítima o por la escisión del transposón tipo Tn3. La presencia de los genes *exo* implica, en la mayoría de los casos, la síntesis de exopolisacárido (EPS). En rizobios, la síntesis de este tipo de moléculas suele estar involucrada en el establecimiento de una correcta simbiosis fijadora con la planta huésped (Niehaus & Becker, 1998, Jones et al., 2007). Por ejemplo, el simbionte de alfalfa *Ensifer meliloti* 2011, porta en el megaplásmido simbiótico pSymB el set de genes *exo* mediante el cual se sintetiza el succinoglucano, necesario para el desarrollo de una simbiosis fijadora de nitrógeno exitosa (Becker et al., 1997, Finan et al., 2001). Es por esto que es posible suponer que los genes *exo* presentes en pLPU83a pudieron haber sido incorporados a partir de un proceso de recombinación desde un plásmido involucrado en un proceso simbiótico.

Para abordar las posibles funciones codificadas en el plásmido, se realizó una anotación manual y una posterior clasificación por grupos de ortólogos (COGs, *cluster of orthologous groups*) de los 160 CDSs anotados automáticamente. A partir de esta anotación, 37 CDSs fueron agrupados dentro del COG L (replicación, recombinación y reparación), mientras que 11 CDSs clasificaron dentro del COG U (tráfico intracelular, secreción y transporte vesicular), siendo estos dos grupos los más abundantes. Al mismo tiempo, 13 proteínas fueron clasificadas en la categoría COG R (predicción de función general únicamente), mientras que otras 10 fueron asignadas al grupo COG S (función desconocida). En la figura III.1A se muestra en detalle el porcentaje asignado a cada grupo funcional. Cabe destacar que, de las 160 proteínas anotadas, 48 de ellas fueron catalogadas como proteínas hipotéticas, pudiendo estar involucradas en cualquier tipo de proceso.

Además de la posibilidad de agrupar genes en base a su posible función, la anotación manual permitió identificar en el plásmido un gen (LPU83a_0051) con un 43% de identidad a nivel de secuencia de aminoácidos con el producto del gen *tral* codificado en el plásmido pRetCFN42a de *R. etli*, encargado de la síntesis de las AHLs que regulan la transferencia conjugativa de dicho plásmido. Si bien la ubicación del gen *tral* en el plásmido pLPU83a no se corresponde con la ubicación de homólogos a este gen en sistemas regulados por QS (en donde en la mayoría de los casos, *tral* se ubica muy cerca de la región del Mpf), no podríamos descartar totalmente una regulación basada en la síntesis y acumulación de AHLs.

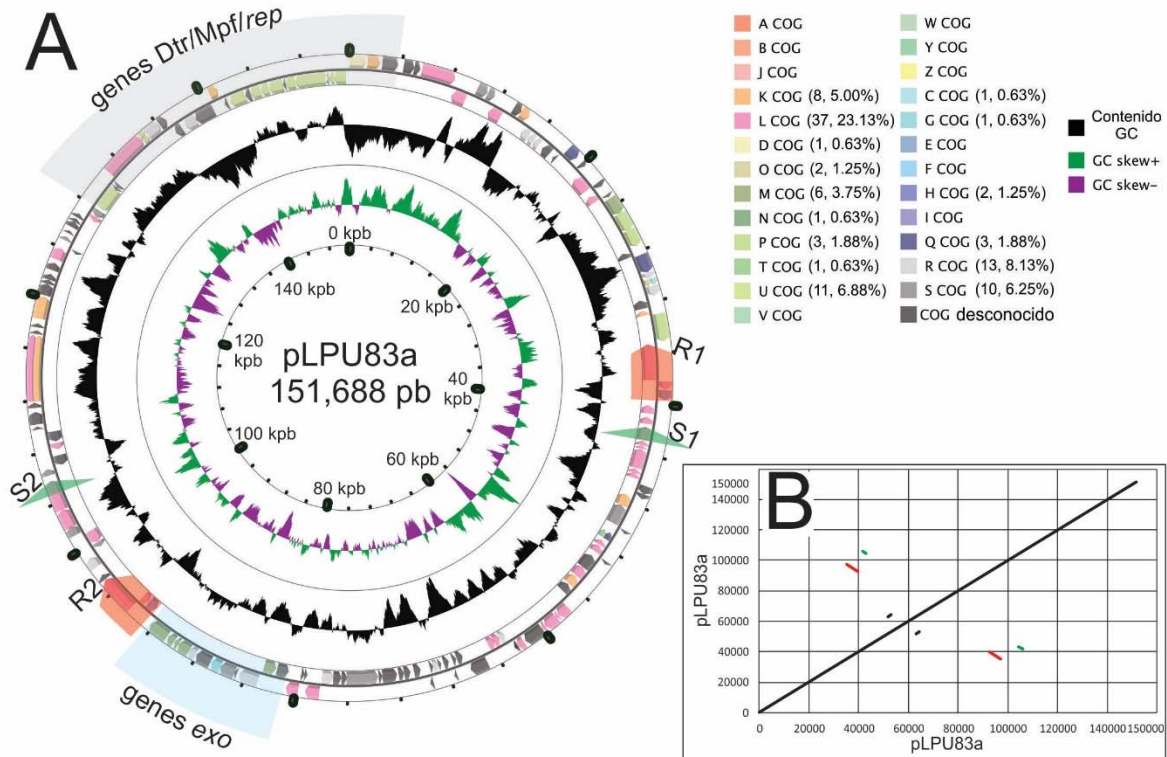


Figura III.1. Esquema del plásmido pLPU83a y análisis de la secuencia mediante matriz de puntos. **A.** Dibujo esquemático de pLPU83a. Desde el círculo interno al externo se muestra la posición genómica en kpb, GC skew, el contenido de GC y las secuencias codificantes predichas traducidas en ambas orientaciones. Los CDSs están coloreados de acuerdo al COG asignado. Las regiones repetitivas están marcadas como R1, R2, S1 y S2. Los genes *rep*, *Dtr* y *Mpf* están sombreados en gris y los genes *exo* en celeste. El gen *repA* fue elegido como el primer gen. El gráfico fue realizado mediante CGView Server (Grant & Stothard, 2008) **B.** Gráfico de matriz de puntos realizado mediante la herramienta BLASTN. En ambos ejes se muestra la secuencia de nucleótidos de pLPU83a. Las regiones repetitivas R1, R2, S1 y S2 están graficadas con los mismos colores que las sombras correspondientes en la figura III.1A.

III.3 Distribución filogenética de homólogos a *traR*

TraR es una proteína que pertenece a la familia de reguladores transcripcionales del tipo LuxR, los cuales están involucrados en la comunicación bacteria-bacteria mediada por AHLs. Este sistema ha sido descrito en la regulación de distintos procesos celulares, como son la producción de bioluminiscencia en *Vibrio Fisherii* (Nealson et al., 1970, Nealson, 1977), patogénesis, formación de *biofilm* y producción de metabolitos secundarios en diferentes organismos (Waters & Bassler, 2005). En rizobios, se ha comprobado que la regulación por QS está involucrada en la regulación de la transferencia horizontal de algunos plásmidos (Cha et al., 1998, Tun-Garrido et al., 2003). En un estudio realizado por Torres Tejerizo et al. (2014), al evaluar la distribución filogenética de homólogos a la proteína TraR, se observó que las proteínas generaban grupos independientes en un árbol filogenético, y que todos los plásmidos que formaban parte del mismo grupo se caracterizaban por compartir ciertos rasgos en cuanto a la organización genética de las regiones conjugativas. Además, muchos de los plásmidos agrupados compartían similitudes en cuanto al circuito regulatorio que involucraba a TraR. Gracias al progreso de las nuevas tecnologías de secuenciamiento, en los últimos años ha aumentado notablemente la cantidad de genomas secuenciados. Haciendo uso de toda la información genética disponible, y con el objetivo de obtener nueva información acerca de cómo TraR se relaciona con el mecanismo regulatorio del sistema estudiado, se decidió construir un árbol filogenético basado en las secuencias aminoacídicas de homólogos a TraR de pLPU83a, ampliando el trabajo realizado por Torres Tejerizo et al. (2014). Si

bien se conocía que la presencia de *traR* era necesaria para la transferencia de pLPU83a, el árbol generado nos podría aportar información sobre genes ubicados en las cercanías de *traR*, los cuales podrían estar relacionados con su función en la conjugación de pLPU83a. En base a lo observado en el trabajo mencionado, se comprobó que los diferentes grupos obtenidos a partir de la filogenia de TraR poseen similitudes en cuanto a la regulación de genes conjugativos. Así, conocer un sistema que involucre un tipo de regulación, ayudaría a comprender aquellos similares. Para llevar a cabo la construcción del árbol, se seleccionaron secuencias de proteínas TraR de diferentes organismos para obtener un árbol que representara diferentes especies cercanas en términos evolutivos. En el árbol obtenido, fue posible distinguir cuatro grandes agrupaciones de plásmidos (figura III.2). Como ya habían descrito Torres Tejerizo *et al.* (2014), uno de los grupos estaba formado por plásmidos pertenecientes a cepas de *Agrobacterium* spp., cuya regulación involucraba la síntesis de AHLs y la interacción con moléculas secretadas por plantas (grupo I-A). Otro grupo (I-B) estaba constituido por plásmidos también regulados por un mecanismo de QS, como el plásmido pRetCFN42a, aunque con una organización diferente al grupo anterior. Mientras tanto, pLPU83a formaba parte de un tercer grupo (grupo I-C), junto con plásmidos cuya característica más llamativa era la ausencia de *traI* en las cercanías de *traR*. Sin embargo, en nuestro estudio también se observó un cuarto grupo (I-D), formado por plásmidos de diferentes especies, ampliando el esquema de clasificación previo.

III.4 Características generales de la organización genética según el grupo de plásmidos

Teniendo en cuenta que dentro de cada grupo, algunos de los plásmidos compartían algunas características relacionadas a la organización genética de genes conjugativos (Torres Tejerizo *et al.*, 2014), nos propusimos estudiar en detalle la organización genética de los plásmidos mostrados en el árbol, para determinar si la cercanía evolutiva de las proteínas TraR implicaba similitudes en el mecanismo regulatorio. Al mismo tiempo, mediante esta aproximación, podría ser posible encontrar genes conservados, candidatos a estar involucrados en un nuevo mecanismo regulatorio de pLPU83a. La similitud entre los plásmidos pertenecientes a un mismo grupo nos permitió, al comparar las regiones en donde se ubicaban los genes conjugativos, elaborar un esquema que representara la organización genética de los plásmidos de cada grupo y de algunas otras características en común. Dicho esquema se muestra en la figura III.3.

Los plásmidos del grupo I-A, en su mayoría provenientes de cepas de *Agrobacterium* spp., se caracterizaron por tener al regulador *traR* ubicado en las cercanías del Dtr, con un regulador *traM* en la misma región. Además, en todos los casos se encontró a la AHL-sintasa *traI* entre los operones *trb* y *rep*. Dentro de los plásmidos de este grupo fue posible observar un segundo regulador del tipo *luxR*, ubicado entre medio del Dtr (a 40-80 Kbp) y del Mpf (a 30-70 Kbp). Cabe destacar que, para algunos de los plásmidos pertenecientes a este grupo, algunos estudios han identificado una regulación de la transferencia mediada por QS, como es el caso del plásmido pTiC58 (Hwang *et al.*, 1994) y pTiR10 (Pappas & Winans, 2003).

Dentro del grupo I-B, al cual pertenecen plásmidos cuya regulación también es mediada por QS, se observó en todos los casos que los genes *traR* y *traM* se ubicaban a continuación del Mpf, marcando una diferencia con respecto al grupo anterior. En este caso, el gen *traI* encargado de la síntesis de AHLs involucradas en QS se encontró entre los operones *trb* y *rep*.

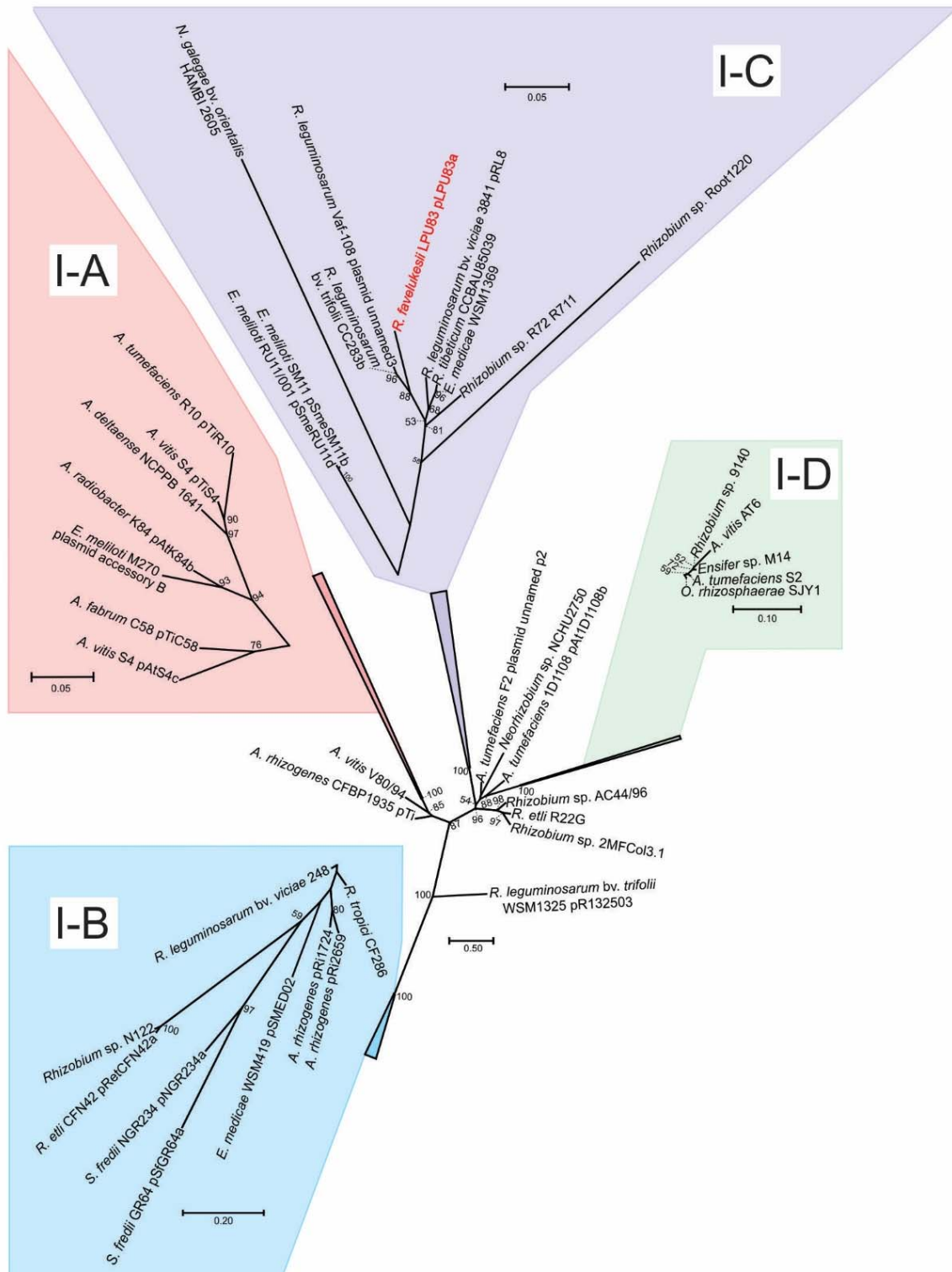


Figura III.2. Árbol filogenético basado en TraR. Los análisis se llevaron a cabo mediante el método de máxima verosimilitud, utilizando como modelo evolutivo JTT+I+G+F. Los valores de *bootstrap* mayores a 50 se muestran en los nodos.

Los plásmidos del grupo I-C, al cual pertenece pLPU83a, se caracterizaron principalmente por la ausencia del gen *traI* en las regiones donde se ubicaban los genes de conjugación. Al mismo tiempo, se encontró que todos los plásmidos tenían el par *traM-traR* a continuación del Mpf, pero en una orientación invertida a los plásmidos de los grupos I-A y I-B. Además de estas características, fue posible encontrar la presencia de dos genes ubicados en tándem, que codifican proteínas hipotéticas. Dichos genes están ampliamente conservados entre todos los plásmidos del grupo I-C y se localizan *upstream* a *traR*.

En cuanto al grupo I-D, los plásmidos se caracterizaron por poseer, a continuación del Mpf, a *traR* y a un segundo regulador del tipo *luxR* muy cercanos entre sí. A su vez, al igual que los plásmidos de los grupos I-A y I-B, poseen el gen *traI*, pero a diferencia de ellos, se localiza a continuación del operón *trb* y no entre los operones *trb* y *rep*.

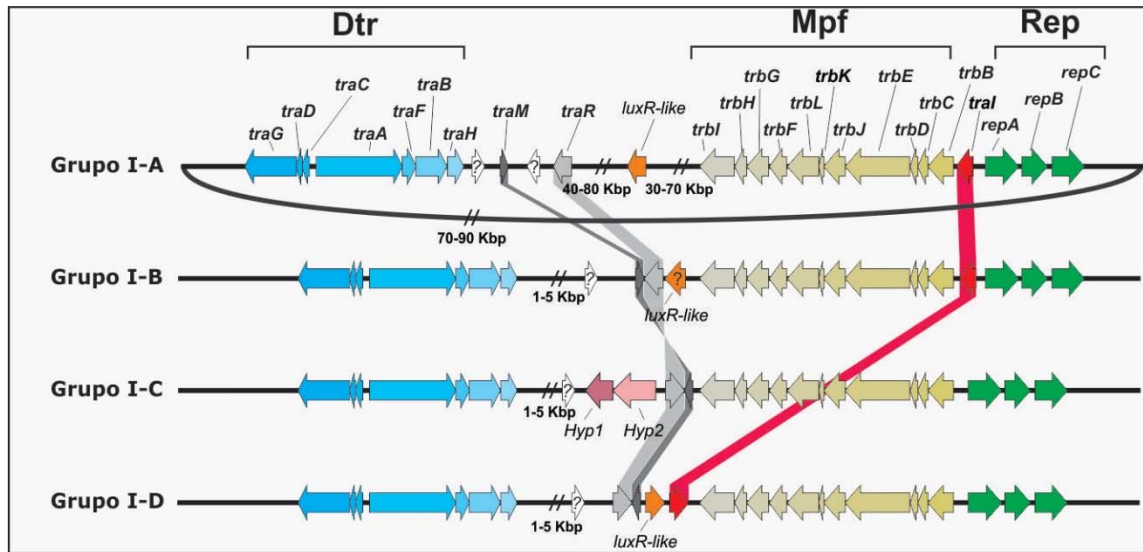


Figura III.3. Organización estructural de las regiones de transferencia de cada grupo de plásmidos. Los genes ortólogos se muestran con el mismo color. Se resaltan características destacadas entre los diferentes grupos. Las flechas blancas con un signo interrogatorio pueden representar uno o más genes hipotéticos.

III.5 Estudio de la transferencia de pLPU83a en ausencia de AHLs

Como se mencionó previamente, en base a los sistemas conocidos, la presencia del regulador TraR es un indicativo de una regulación por QS. En algunos sistemas con este tipo de regulación, como es el caso del plásmido pRetCFN42a de *R. etli* CFN42, la función de TraR depende de la presencia de AHLs, sintetizadas por TraI, una enzima codificada en las cercanías de *traR* (Tun-Garrido *et al.*, 2003). En otros sistemas, como es el caso del plásmido pR11J1 de *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae*, se ha demostrado una regulación cruzada entre AHLs codificadas en cromosoma y reguladores TraR codificados en plásmido (Danino *et al.*, 2003). A su vez, la transferencia del plásmido pSfr64a de *Sinorhizobium fredii* GR64 necesita de la expresión de elementos codificados en el plásmido simbiótico y en el cromosoma (Cervantes *et al.*, 2019). Debido a estos ejemplos, y dado que *R. favelukesii* LPU83 presenta en su genoma 4 genes homólogos a *traI*, no sería extraño pensar en una interacción entre las diferentes AHLs codificadas en *R. favelukesii* LPU83 y el regulador *traR* presente en pLPU83a. Para determinar si las AHLs cumplían un rol activo en la regulación de la transferencia de pLPU83a, Torres Tejerizo *et al.* (2014) analizaron la transferencia del plásmido desde dos cepas de *Ensifer meliloti*, una de ellas con producción de AHLs endógenas (*E. meliloti* 20MP6) y otra libre de AHLs (*E. meliloti* Rm11512). La comparación de la transferencia

desde ambas cepas no mostró variaciones en las frecuencias de transferencia del plásmido (desde la cepa productora de AHLs 20MP6, $4.85 \pm 3.9 \times 10^{-7}$ transconjugantes por célula donadora, y desde la cepa libre de AHLs, Rm11512, $6.61 \pm 5.69 \times 10^{-7}$ transconjugantes por célula donadora). Dado que, previamente se había demostrado que la frecuencia de conjugación con la que pLPU83a era transferido desde *E. meliloti* 20MP6 era muy similar a aquella obtenida para la transferencia desde el propio entorno (Torres Tejerizo *et al.*, 2010), se concluyó que el plásmido pLPU83a no respondía a las AHLs codificadas en *R. favelukesii* LPU83 ni en *E. meliloti* 20MP6 (Torres Tejerizo *et al.*, 2014). Sin embargo, existía la posibilidad de que el plásmido respondiera a alguna molécula producida por algún elemento propio de pLPU83a.

La presencia de un homólogo a *tral* en el plásmido pLPU83a (sección III.2) nos condujo a preguntarnos si dicho gen era funcional, y si podía estar involucrado en el circuito regulatorio de la conjugación de dicho plásmido. Al realizar un análisis de producción de AHLs, se detectó que *R. favelukesii* LPU83 es capaz de producir al menos cuatro moléculas diferentes de AHLs, como se observa en la cromatografía en capa fina (TLC) de la figura III.4. Dos de los homólogos a *Tral* en el genoma de *R. favelukesii* LPU83 se encuentran codificadas en el plásmido pLPU83b, uno en pLPU83c y otro en pLPU83a, lo cual es coherente con el hecho de observar cuatro bandas en la cromatografía realizada.

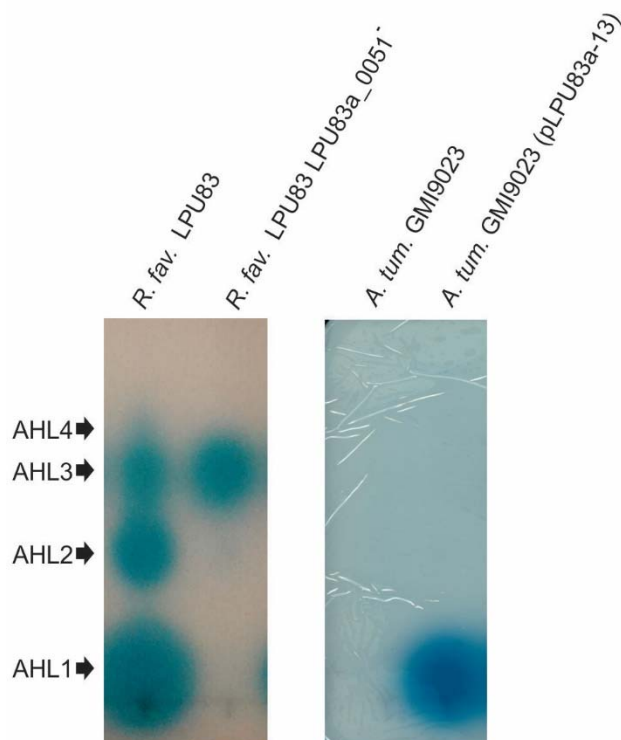


Figura III.4. Cromatografía de capa fina para detección de AHLs. La cepa salvaje *R. favelukesii* LPU83 presenta cuatro bandas mientras que el mutante en LPU83a_0051 sólo muestra una. *A. tumefaciens* GMI9023 no produce AHLs, mientras que dicha cepa conteniendo el plásmido pLPU83a presenta una nueva banda.

Para caracterizar el gen *tral* codificado en pLPU83a, en una primera instancia se introdujo el plásmido pLPU83a en una cepa de *Agrobacterium tumefaciens* sin producción de AHLs endógenas, y, al realizar una TLC para detectar AHLs, se observó la presencia de una única banda, coincidente con una de las bandas observadas en el perfil obtenido para las AHLs extraídas de *R. favelukesii* LPU83 (figura III.4). De esta forma, se confirmó la producción de al menos una AHL por parte de pLPU83a. Para determinar si el gen LPU83a_0051 (homólogo a *tral*) presente en pLPU83a era el

encargado de la producción de una de las AHLs detectadas, y si la misma formaba parte del circuito regulatorio involucrado en la transferencia de dicho plásmido, se generó un mutante insercional en el gen mencionado. El análisis de las AHLs producidas por la cepa mutante mostró la ausencia de una de las bandas (figura III.4), confirmando que una de las AHLs detectadas en la TLC era producida por el producto de este gen. La transferencia conjugativa del plásmido mutante fue evaluada, mostrando que tanto la cepa salvaje como la cepa mutante eran capaces de conjugarse con frecuencias similares (ca. 1×10^{-6} transconjugantes por célula donadora), dejando en claro que si bien el gen LPU83a_0051 era funcional y era el encargado de la síntesis de una de las AHLs, ésta no formaba parte de una posible regulación por QS de la transferencia de pLPU83a. En conjunto, toda la información presentada permite descartar una regulación mediada por AHLs, ya sean producidas por la cepa salvaje o aportadas por otro organismo.

III.6 Ensayos de respuesta a QS

A pesar de haber descartado una regulación mediada por las AHLs sintetizadas por *R. favelukesii* LPU83, todavía existía la posibilidad de una respuesta del tipo de QS, en donde la regulación estuviera afectada por la acumulación de otro tipo de molécula en función de la población bacteriana. Para abordar esta hipótesis, se realizó un ensayo conjugativo utilizando como cepa donadora *R. favelukesii* LPU83-13 (pLPU83a-13) (cepa con un Tn5-B10 integrado en el plásmido pLPU83a, lo cual le confiere resistencia a Nm; de aquí en adelante *R. favelukesii* LPU83-13) a diferentes densidades ópticas (DOs), con la intención de observar si la frecuencia conjugativa se veía alterada en función del número de bacterias presentes en el cultivo. Como control se utilizaron cultivos de *R. etli* CFN42, una cepa en la cual la conjugación de uno de sus plásmidos (pRetCFN42a) es regulada por QS. Como se observa en la figura III.5A, el resultado de este ensayo mostró que el aumento de la DO del cultivo de *R. favelukesii* LPU83-13 no se correlaciona con un aumento en la frecuencia conjugativa de pLPU83a (como se esperaría para un sistema regulado por QS), sino que presenta una leve pero estadísticamente significativa disminución. El mismo ensayo fue realizado introduciendo el plásmido pLPU83a en la cepa *E. meliloti* 20MP6, para analizar su comportamiento desde un entorno diferente. Si bien los valores de transferencia obtenidos para la cepa *E. meliloti* 20MP6 (pLPU83-13a) fueron muy similares a los obtenidos desde el entorno natural (figura III.5B), la diferencia entre las frecuencias a baja y alta DO no fue significativa. Para analizar si los valores observados a baja y alta DO eran significativos o no, se realizó un test estadístico dividiendo los valores de frecuencias conjugativas en aquellos obtenidos a DOs menores a 0.9, y aquellos a DOs mayores a 1.2. El test utilizado fue un test U de Mann-Whitney, con el que pudimos determinar que las diferencias observadas entre valores a bajas DOs (< a 0.9) y a altas DOs (> a 1.2) en la cepa *R. favelukesii* LPU83-13 eran significativas, mientras que la transferencia desde *E. meliloti* 20MP6 no mostraba el mismo comportamiento. Como observaron Tun-Garrido *et al.* (2003), la frecuencia conjugativa del plásmido pRetCFN42a aumentó notablemente al incrementarse el número de bacterias en cultivo (figura III.5C). Cabe mencionar que, para cada cepa utilizada como donadora, se realizó una curva de correlación entre la DO del cultivo donador y el número de bacterias presente en el mismo, asegurándose una relación lineal entre ambos valores. Estos resultados confirman que la conjugación de pLPU83a no es regulada por un mecanismo de QS. Sin embargo, es llamativo que se produzca una leve disminución de la conjugación al aumentar la DO del cultivo donador al analizar la transferencia desde el entorno natural.

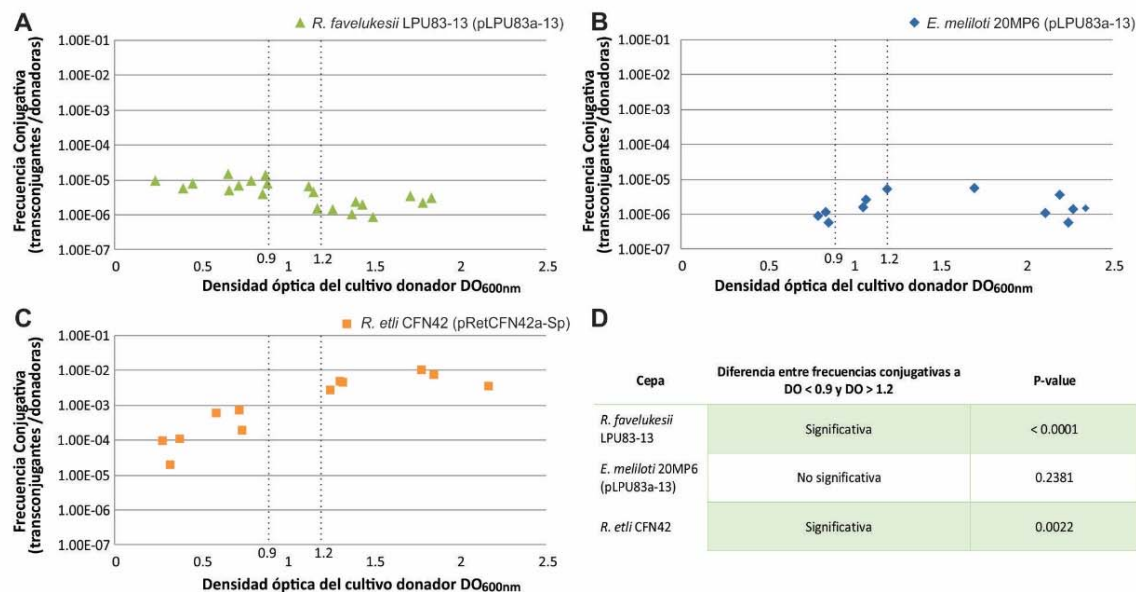


Figura III.5. Evaluación de la relación entre la frecuencia conjugativa y la densidad óptica del cultivo donador. **A.** *R. favelukesii* LPU83-13 (pLPU83a-13), de aquí en adelante *R. favelukesii* LPU83-13 (triángulos verdes) muestra una leve disminución de la conjugación a altas densidades. **B.** *E. meliloti* 20MP6 (pLPU83a-13) (rombos azules) permanece constante a todas las densidades. **C.** La frecuencia conjugativa de *R. etli* CFN42 (pRetCFN42a-Sp) (cuadrados naranjas) aumenta a altas densidades. **D.** Análisis estadístico de los valores conjugativos obtenidos a bajas (< 0.9) y altas (> 1.2) DOs, realizado mediante el test U de Mann-Whitney.

En los sistemas conjugativos descritos hasta el momento en plásmidos de rizobios, la presencia del gen *traR* en la región conjugativa está asociada a una regulación por QS del proceso conjugativo. Sabiendo que la expresión de este gen es necesaria para que la transferencia de pLPU83a ocurra, y conociendo el hecho de que la transferencia de dicho plásmido no responde a un mecanismo de QS, es posible pensar que el comportamiento de este sistema podría estar siendo regulado por un nuevo mecanismo, que involucra a TraR y otros elementos aún desconocidos.

Hemos detectado características compartidas en cuanto a la organización genética de las regiones involucradas en la conjugación entre pLPU83a y otros plásmidos pertenecientes al grupo I-C (algunos de los cuales ya fueron descritos como no regulados por QS (Vanderlinde *et al.*, 2014)). Entre dichas características, se ha destacado la presencia de genes codificando proteínas hipotéticas muy conservadas entre los diferentes plásmidos, ubicadas en las cercanías de las regiones conjugativas. Más específicamente, los genes en cuestión fueron localizados entre el Dtr y el Mpf de todos los plásmidos. En algunos trabajos anteriores, ha sido descrito que genes hipotéticos ubicados entre las regiones conjugativas tienen un rol activo en la transferencia plasmídica (Lopez-Fuentes *et al.*, 2015, Wathugala *et al.*, 2020). Debido a esto, en el próximo capítulo, haremos foco en los dos genes hipotéticos mencionados, ya que, debido a su ubicación conservada entre los *clusters* de genes conjugativos, podrían estar involucrados en el proceso conjugativo de los plásmidos pertenecientes al mismo grupo. Además, se decidió sumar al estudio un tercer gen ubicado a continuación de los otros dos (presente sólo en pLPU83a y otros pocos plásmidos), también de función desconocida. En nuestro modelo de estudio, dichos genes son LPU83a_0145 (618 pb), LPU83a_0146 (996 pb) y LPU83a_0148 (1686 pb). Para comenzar la caracterización de dichos genes, en el siguiente capítulo se abordará la mutagénesis de los mismos para evaluar el fenotipo de los mutantes, y se estudiará la distribución de estos genes entre diferentes géneros y especies. A la vez, se intentará obtener información acerca de la función de las proteínas codificadas mediante herramientas bioinformáticas.

Capítulo IV. Análisis de los
genes LPU83a_0145,
LPU83a_0146 y LPU83a_0148.

IV.1 Introducción

En trabajos previos, ha sido descrita la participación de proteínas hipotéticas conservadas en diferentes plásmidos en el proceso de transferencia del plásmido en el que se encuentran. Los genes correspondientes se han encontrado entre los *clusters* de genes conjugativos o a una pequeña distancia de los mismos. Lopez-Fuentes *et al.* (2015) estudiaron tres proteínas hipotéticas conservadas, ubicadas entre el Dtr y el Mpf del plásmido pRetCFN42a de *R. etli* CFN42 (cuyo mecanismo regulatorio responde a QS (Tun-Garrido *et al.*, 2003)), encontrando que una de ellas estaba involucrada en una fina regulación de la transferencia de dicho plásmido, y que las otras dos cumplían un rol activo en la transferencia del plásmido desde entornos no nativos. Wathugala *et al.* (2020) encontraron, en el plásmido pRleVF39b de *R. leguminosarum* VF39SM (perteneciente al grupo IVA, con una relaxasa de menor tamaño que otros plásmidos), la presencia de catorce proteínas hipotéticas conservadas ubicadas entre los genes *trb* y *tra*, de las cuales seis tenían un rol importante en la conjugación, posiblemente formando parte del relaxosoma. Debido a la importancia de estos nuevos elementos en el proceso conjugativo, podemos afirmar que no es suficiente la caracterización del Dtr y del Mpf de un plásmido para comprender los factores que alteran su transferencia, sino que es necesario analizar nuevos genes que participan del proceso.

En el capítulo previo se estudiaron algunos aspectos relacionados a la transferencia del plásmido pLPU83a. Específicamente, se observó que la regulación de la transferencia de dicho plásmido no involucraba AHLs a pesar de contar con un regulador TraR. Al mismo tiempo, se concluyó que la transferencia del plásmido tampoco se veía afectada por un mecanismo de QS, ya que no fue posible observar un aumento de la frecuencia conjugativa al utilizar cultivos con mayor cantidad de bacterias sino que, al contrario, se observó una leve disminución de la conjugación. La construcción de un árbol filogenético basado en las secuencias de homólogos a la proteína TraR presente en dicho plásmido nos permitió observar ciertas características compartidas entre las regiones conjugativas de pLPU83a y otros plásmidos con secuencias de TraR cercanas filogenéticamente. Entre dichas características, se destacaron la ausencia de la sintasa de AHLs (*trai*) en la región mencionada, y la presencia de dos genes hipotéticos conservados entre todos los plásmidos del grupo, ubicados entre el Dtr y el Mpf del plásmido. Estos datos, en conjunto, abrieron el interrogante acerca de un nuevo mecanismo de regulación de la transferencia plasmídica en rizobios, el cual involucraría a TraR en una forma diferente a la descrita para sistemas de QS. La ubicación y la conservación de los genes hipotéticos encontrados en pLPU83a y en los plásmidos del mismo grupo podrían implicar una relación entre dichos genes y el proceso conjugativo. Como un primer abordaje a dicha hipótesis, en este capítulo se evaluará si los genes hipotéticos mencionados están involucrados en la transferencia del plásmido pLPU83a, mediante estudios bioinformáticos y mutagénesis de los mismos.

IV.2 Distribución taxonómica de los genes

Durante los estudios realizados sobre la estructura genética de las regiones conjugativas de los plásmidos de rizobios, particularmente los pertenecientes al grupo I-C, se observó que todos ellos poseían dos genes hipotéticos entre el Dtr y Mpf, *hyp1* e *hyp2*. Debido a esto, nos preguntamos si dichos genes estaban presentes únicamente en los plásmidos de dicho grupo, o si se encontraban en otros organismos. Para evaluar esta posibilidad, se realizó una búsqueda de proteínas homólogas mediante la herramienta bioinformática BLASTp (Altschul *et al.*, 1997), utilizando las secuencias proteicas codificadas por LPU83a_0146 (*hyp1*) y LPU83a_0148 (*hyp2*). Además, se sumó a la búsqueda la secuencia de LPU83a_0145, presente sólo en algunos plásmidos del grupo. A partir de esta herramienta, se pudo obtener un listado de todas las proteínas similares a las presentes en pLPU83a, tomando como proteínas homólogas a aquellas obtenidas a partir de la base de datos nr

(*non-redundant proteins*), con un porcentaje de identidad mayor al 30% y un porcentaje de cobertura superior al 70%, según los criterios aconsejados por Rost (1999). Los resultados obtenidos (actualizados al 10/03/2020) se resumen en la figura IV.1.

Para LPU83a_0145, se encontraron 936 proteínas homólogas, con un 62.93% correspondiendo a proteobacterias. Dentro de las mismas, se observó un predominio de γ -proteobacterias (35.04% del total), dejando solamente un 17.2% para α -proteobacterias. Las proteínas restantes se distribuyeron en una amplia variedad de grupos como Bacterioidea y Chitinophagia, entre otros.

Para LPU83a_0146 se encontraron 921 proteínas homólogas. Un 73.51% se encontraron dentro del grupo α -proteobacterias, con un 67.64% del total perteneciendo al grupo Rhizobiales y apenas un 5.65% al grupo Rhodobacterales. El porcentaje restante estuvo distribuido entre algunos géneros pertenecientes al grupo de las Acidobacterias (25.08%), como Acidobacteriales (5.32% del total) y Blastocatellia (1.41% del total) entre otros.

Para LPU83a_0148 se encontraron 607 proteínas homólogas, con un 99.67% de ellas distribuidas dentro del grupo α -proteobacterias. Más específicamente, un 82.48% se encontraron dentro del grupo Rhizobiales, y un 17.19% dentro del grupo Rhodobacterales.

Un dato remarcable es que, en el caso del gen LPU83a_0148, se observó que en todas las cepas en las cuales fue posible encontrar un homólogo a dicho gen con un porcentaje de identidad superior al 45%, *downstream* del mismo se encontraba un homólogo al gen LPU83a_0146. De manera similar, cuando se buscaron los homólogos al gen LPU83a_0146, se encontró que cuando éstos presentaban un porcentaje de identidad superior al 50% estaban acompañados de un homólogo a LPU83a_0148, indicando una posible evolución conjunta de ambos genes. Sugiriendo, incluso, una relación entre la función de los mismos. Además, en la mayoría de los casos, en regiones cercanas a estos genes fue posible encontrar genes involucrados en conjugación (genes del Mpf o Dtr), sugiriendo que se localizan en plásmidos capaces de ser transferidos, y que su función puede estar ligada a la transferencia plasmídica.

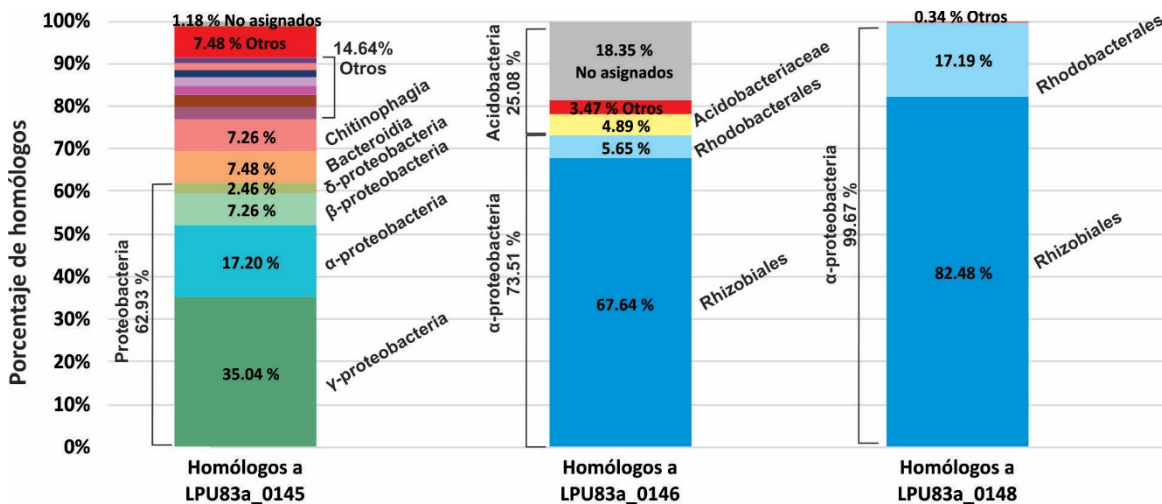


Figura IV.1. Distribución taxonómica de genes homólogos a LPU83a_0145, LPU83a_0146 y LPU83a_0148. Se muestran gráficos de barras que representan en qué proporción están distribuidos los genes homólogos entre diferentes grupos de bacterias. Con corchetes se agrupan los subgrupos mayoritarios.

En algunas cepas que poseían genes homólogos a LPU83a_0148 con identidades inferiores al 45%, se observó *downstream* un gen codificando para una proteína con dominio α/β hidrolasa, el cual también está presente en la proteína codificada por LPU83a_0146. Sin embargo, en estos casos, la identidad entre LPU83a_0146 y las proteínas con dominios α/β hidrolasa no fue mayor al 30% establecido como límite de homología. En resumen, estos resultados muestran que, en todos los casos, homólogos a LPU83a_0148 están acompañados de un gen con dominio α/β hidrolasa, en algunos casos homólogos a LPU83a_0146 y en otros no.

En ciertos organismos que poseían genes homólogos a LPU83a_0146 con identidades inferiores al 50%, se observó la presencia de un gen anotado automáticamente como proteína involucrada en conjugación (según homología con proteínas previamente anotadas). Esta organización se mantuvo conservada dentro de bacterias pertenecientes al grupo de α -proteobacterias. Al analizar los homólogos a LPU83a_0146 ubicados en el grupo acidobacterias, no fue posible encontrar homólogos a LPU83a_0148 ni tampoco a la proteína involucrada en conjugación.

Dado que la presencia de uno de los genes está, en la mayoría de los casos, acompañada por la presencia del otro, es de suponer que la función que ambos llevan a cabo esté ligada. El hecho de que su ubicación sea mayoritariamente dentro de regiones conjugativas de plásmidos, nos permite pensar que la función de estas proteínas hipotéticas puede estar relacionada al proceso conjugativo.

Si bien el gen LPU83a_0145 no se encontraba conservado entre los plásmidos del grupo, su ubicación entre las regiones conjugativas de pLPU83a permitía imaginarlo como un gen involucrado en la conjugación de este plásmido, por lo que también se incluyó en la búsqueda. La distribución taxonómica de los homólogos a este gen fue muy variada, y no permitió relacionarla con un grupo en particular de bacterias. Al mismo tiempo, la presencia de homólogos no está asociada a la presencia de homólogos a los genes LPU83a_0146 y LPU83a_0148, por lo que sus funciones no parecieran estar conectadas.

IV.3 Distribución filogenética de LPU83a_0146 y LPU83a_0148

Habiendo observado una gran cantidad de proteínas homólogas a LPU83a_0148 y LPU83a_0146, y que en la mayoría de los casos las mismas se encuentran ubicadas *en tándem*, nos propusimos realizar un análisis filogenético para cada una de dichas proteínas. Para esto, se seleccionaron secuencias con diferentes porcentajes de identidad, incluyendo proteínas muy similares y también proteínas con un vínculo más lejano. Dentro de las proteínas seleccionadas, incluimos a aquellas que formaban parte de los plásmidos pertenecientes al grupo I-C del árbol de homólogos a TraR, suponiendo que los homólogos presentes en esos plásmidos tendrían una relación más directa con los presentes en pLPU83a. Para la proteína codificada por LPU83a_0145, sólo fue posible encontrar cuatro cepas que, además del gen homólogo, tuvieran homólogos a LPU83a_0148 y LPU83a_0146, por lo que dicho análisis filogenético no fue realizado. La topología de los árboles filogenéticos obtenidos para LPU83a_0146 y LPU83a_0148 resultó muy similar (figura IV.2 A y B). Además de esto, en ambas filogenias se destacó la agrupación de homólogos en dos grupos principales. En uno de ellos, denominado grupo X, se ubican las proteínas codificadas por pLPU83a y las codificadas por los plásmidos pertenecientes al grupo I-C descrito en el capítulo anterior, indicando una relación entre la evolución de TraR y estas proteínas hipotéticas. En el otro grupo, llamado Y, se ubicaron una gran mayoría de los plásmidos pertenecientes al género *Ensifer* (*Sinorhizobium*) elegidos. Dentro de este grupo, encontramos un plásmido perteneciente a una cepa estudiada previamente en nuestro laboratorio, *E. meliloti* LPU88. Según lo descrito por Pistorio *et al.* (2013), dicho plásmido presenta un gen involucrado en la conjugación desde entornos diferentes al salvaje (*rptA*), el cual se ubica junto a los homólogos de LPU83a_0148 y LPU83a_0146. Otro dato

llamativo fue que el análisis de homólogos a *rptA* realizado en dicho trabajo, arrojó cepas que encontramos dentro del grupo Y, indicando que la evolución de estos genes estaría conectada. El hecho de observar una organización genética casi idéntica en los plásmidos pertenecientes al grupo X (también grupo I-C, sección III.3), sumado a la sintenia observada por Pistorio *et al.* (2013) para algunos de los plásmidos pertenecientes al grupo Y, nos llevó a realizar un análisis más profundo de la organización genética de la región en donde se encuentran estos genes. De esta forma, fue posible observar que todos los plásmidos del grupo Y también compartían características. Una de ellas fue la presencia de los genes correspondientes al Mpf, también conocidos como genes *vir* (los cuales pertenecen a una familia distinta que los genes *trb* observados en el grupo X, ver sección I.5). En todos los casos, los genes *vir* se encontraron *downstream* de los genes hipotéticos. Además de esto, para todos los plásmidos fue posible observar la presencia de un gen homólogo a *rptA*, y la ausencia de *traR* y de genes correspondientes al Dtr en la región analizada. Al analizar la secuencia entera de los plásmidos en búsqueda de una copia de *traR*, se encontró que únicamente los plásmidos simbióticos del grupo Y (cromosoma 3 de *E. meliloti* AK83, pSymA de *E. meliloti* RU11/001 y pSM11c de *E. meliloti* SM11) contaban con un gen similar a *traR* (con muy bajo nivel de identidad), y con genes correspondientes al Dtr en su cercanía. En los demás plásmidos no fue posible encontrar homólogos a *traR* ni a genes del Dtr. Cabe destacar que el plásmido pAtS4a de *A. tumefaciens* S4 y la secuencia correspondiente a *Neorhizobium huautlense* DSM21817 fueron ubicadas fuera del grupo Y, a pesar de poseer ancestros comunes a las proteínas del resto de las cepas pertenecientes al grupo, ya que no contaban con las características en común observadas para el resto de los replicones. En el caso del plásmido pAtS4a, se encontraron homólogos a LPU83a_0146, LPU83a_0148 y *rptA*, pero el Mpf no se encontró a continuación de estos genes. Para el replicón de *N. huautlense* DSM21817, no fue posible encontrar una copia del gen *rptA*, presente en todos los plásmidos del grupo, ni genes del Mpf en las cercanías de los homólogos a LPU83a_0146 y LPU83a_0148.

De esta forma, las filogenias realizadas a partir de LPU83a_0148 y LPU83a_0146 nos permitieron definir dos grupos de plásmidos, uno de ellos con los genes hipotéticos ubicados al lado de *traR*, entre el Dtr y el Mpf, y otro grupo en donde los genes hipotéticos se encuentran al lado de *rptA*, caracterizándose por la presencia de un sistema diferente de Mpf (genes *vir*) y la ausencia del regulador *traR* y del sistema Dtr.

IV.4 Análisis bioinformático de los genes

La búsqueda por BLASTP de LPU83a_0145, LPU83a_0146 y LPU83a_0148 no arrojó demasiada información acerca de la posible función de cada uno de ellos. Las proteínas similares a LPU83a_0145 no aportaron ningún dato relacionado a una posible función, ya que todas las proteínas alineadas fueron anotadas como proteínas hipotéticas. Además, en este caso no fue posible encontrar un dominio de función predicha conservado entre todas las proteínas.

En el caso del gen LPU83a_0146, algunas de las proteínas homólogas se encuentran anotadas como posibles α/β hidrolasas, una familia de proteínas con actividad hidrolítica caracterizadas por tener una estructura conservada a pesar de diferir en secuencia de aminoácidos (Ollis *et al.*, 1992). Dentro de esta familia, algunos de los homólogos fueron catalogados como dienolactona hidrolasas, una función descrita para algunas α/β hidrolasas (Ollis *et al.*, 1992). En cuanto a dominios, fue posible detectar la presencia de un fragmento de un dominio conservado entre las diferentes proteínas, catalogado como un posible dominio con actividad lipasa, ubicado en el exterior celular. Sin embargo, la presencia de estos dominios no permite catalogar a las proteínas dentro de una función particular, ya que es posible que estén implicados en una amplia variedad de procesos.

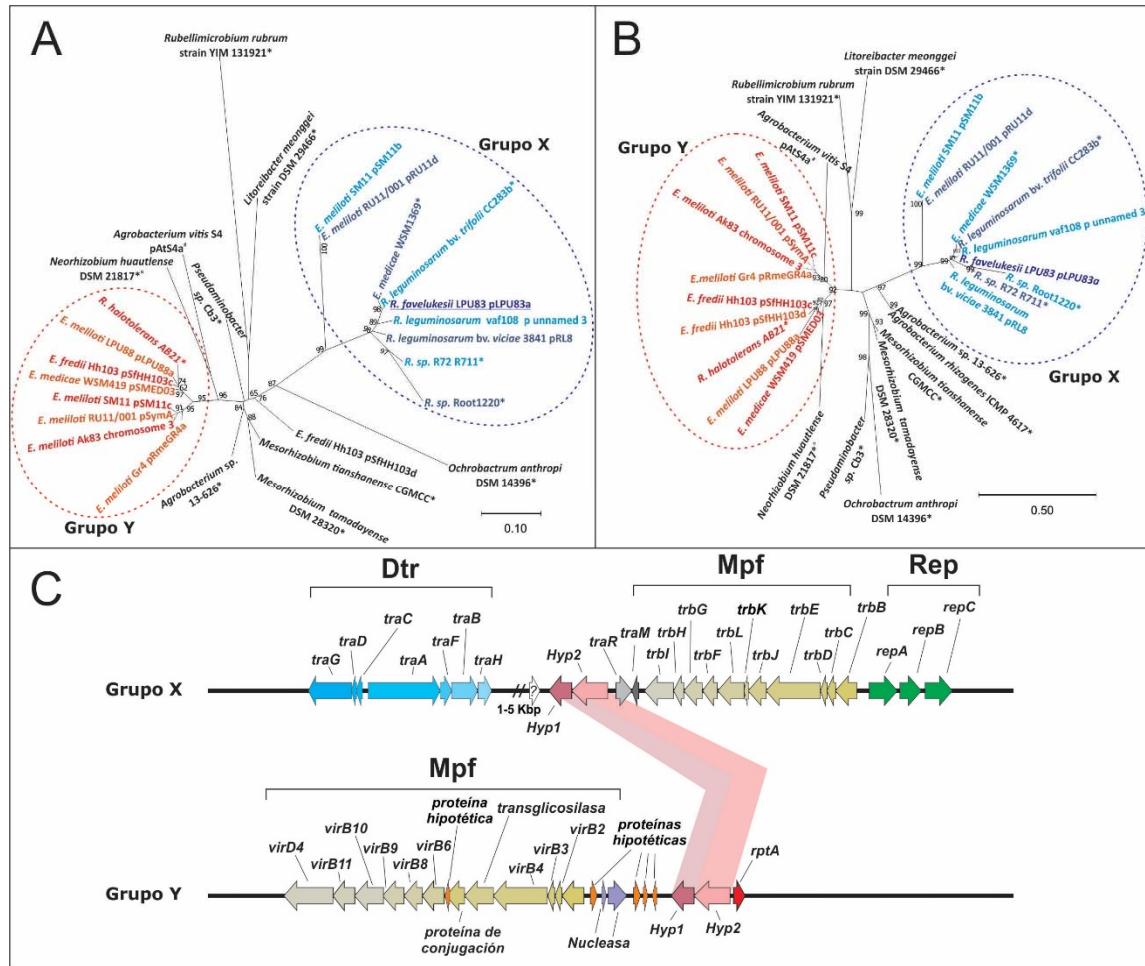


Figura IV.2. Árboles filogenéticos de LPU83a_0146 y LPU83a_0148. A. Árbol filogenético generado mediante el método de máxima verosimilitud, utilizando como modelo evolutivo JTT +G+F a partir de la secuencia de LPU83a_0146. **B.** Árbol filogenético generado mediante el método de máxima verosimilitud, utilizando como modelo evolutivo JTT+G+F a partir de la secuencia de LPU83a_0148. En ambos casos se remarcan con gamas de azules aquellas cepas pertenecientes al grupo X, y con gamas de rojo a aquellas que pertenecen al grupo Y. El género *Rhizobium* se representa como "R." y el género *Ensifer* (*Sinorhizobium*) con la letra "E.". Referencia: * la secuencia corresponde a un *scaffold*, y no a un replicón cerrado, por lo que no es posible definir si corresponde a un plásmido. # la cepa cuenta con homólogos a LPU83a_0146, LPU83a_0148 y *rptA*, pero la organización genética de los genes conjugativos es diferente a las cepas del grupo Y. †: la cepa cuenta con homólogos a LPU83a_0146, LPU83a_0148 pero no fue posible encontrar un homólogo a *rptA*. **C.** Esquema general de la organización genética de los plásmidos correspondientes a los grupos X e Y.

En el caso del gen LPU83a_0148, todas las proteínas homólogas obtenidas en la búsqueda fueron catalogadas como posibles proteínas de membrana, pero no fue posible observar un dominio conservado con alguna función predicha entre todos los homólogos. La herramienta TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>), la cual permite la predicción de dominios de membrana basada en las propiedades fisicoquímicas de los aminoácidos de la proteína (Sonnhammer *et al.*, 1998), predijo la presencia de varios dominios transmembrana en LPU83a_0148 (figura IV.3), lo cual incrementa las posibilidades de que se trate de una proteína que fehacientemente se localice en la membrana de la célula.

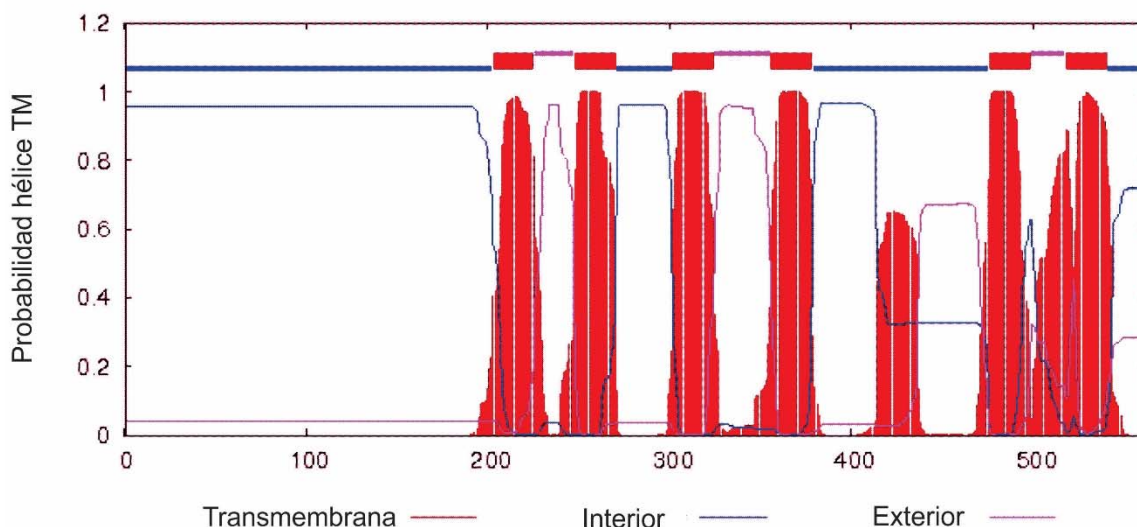


Figura IV.3. Predicción de dominios transmembrana de la proteína codificada por LPU83a_0148. En el gráfico se observan tres posibles dominios transmembrana, predichos por el servidor TMHMM.

IV.5 Organización genética de los genes hipotéticos

La ubicación en *tandem* de los tres genes hipotéticos genera la posibilidad de una organización genética en estructura de operón. Además de aportar información acerca de la regulación de estos genes, definir si son expresados en un operón es un dato crucial para el diseño de la estrategia a utilizar para la posterior mutagénesis de los mismos.

Como estrategia para dilucidar la organización de LPU83a_0145, LPU83a_0146 y LPU83a_0148, se diseñaron *primers* específicos que permitieran amplificar fragmentos conteniendo regiones de genes contiguos (regiones intergénicas). Es decir, un fragmento que amplificara desde la región 3' de LPU83a_0148 hasta la región 5' de LPU83a_0146 y lo mismo para el par LPU83a_0145/LPU83a_0146. De esta forma, si los genes se expresaran en forma de operón, se produciría un mensajero único conteniendo ambos genes, permitiendo la amplificación por PCR sobre el cDNA generado por la retro-transcripción de una muestra de RNA. Si cada gen se expresara independientemente, los *primers* estarían hibridándose a cDNA de mensajeros distintos, por lo que no sería posible la amplificación sobre el cDNA derivado del mRNA. Para confirmar los resultados del experimento, se decidió utilizar dos combinaciones de *primers* diferentes para cada par de genes, al mismo tiempo que se amplificó un fragmento interno de cada gen para corroborar la integridad del RNA obtenido. El esquema de los fragmentos de PCR hipotéticos puede observarse en la figura IV.4A. Como se observa en los resultados de las electroforesis mostrados en la figura IV.4B, para las combinaciones generadas para el par LPU83a_0146/LPU83a_0148 se observó la amplificación de la región intergénica, confirmando una expresión conjunta de ambos genes, mientras que para el par LPU83a_0145/LPU83a_0146 el resultado fue negativo. De esta forma, se corroboró que LPU83a_0146 y LPU83a_0148 forman parte de un mismo operón, y que LPU83a_0145 se expresa en un transcrito independiente.

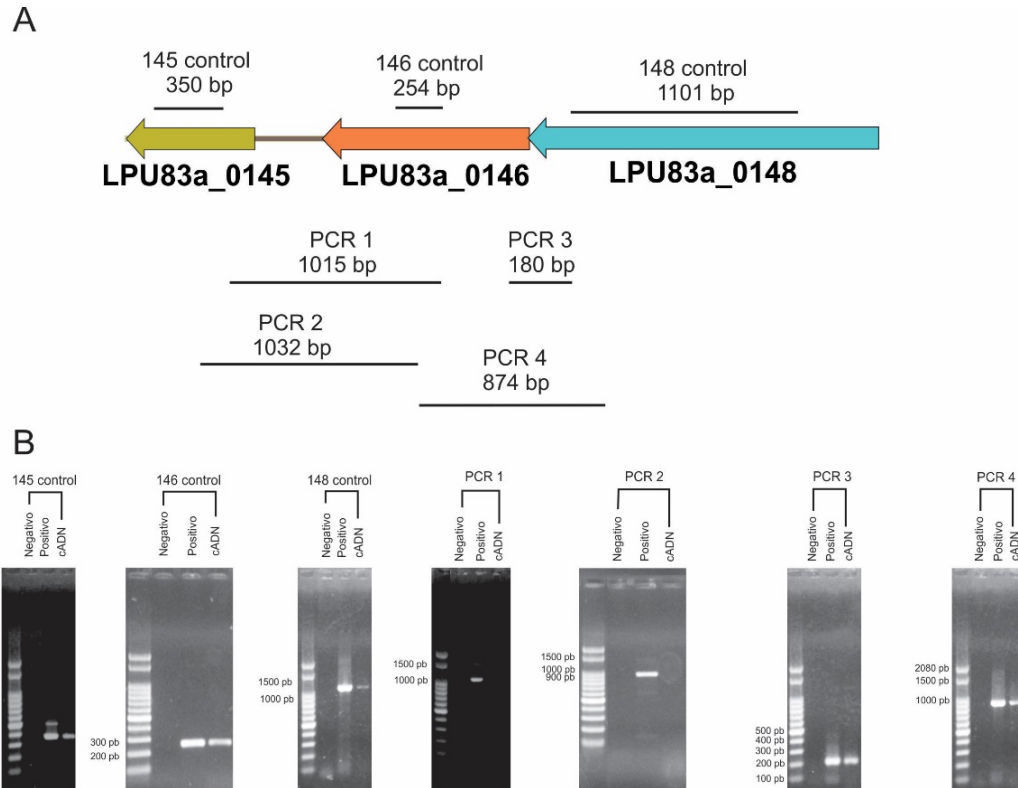


Figura IV.4. PCRs diseñadas para determinar una posible estructura de operón. A. Esquema de los fragmentos a amplificar. Se muestran los fragmentos a amplificar y sus respectivos tamaños, utilizando como molde cDNA. Los fragmentos 145 control, 146 control y 148 control corresponden a fragmentos internos de cada gen, para corroborar la integridad del cDNA. Los fragmentos PCR 1 y 2 fueron utilizados para analizar el posible operón LPU83a_0145/ LPU83a_0146 y los fragmentos PCR 3 y 4 para el operón LPU83a_0146/ LPU83a_0148. **B. Electroforesis de los productos de PCR amplificados.** Para cada una de las combinaciones de *primers* descritas previamente, se realizó un control negativo, un control positivo utilizando DNA total de LPU83 como molde y la reacción sobre cDNA. Como es posible observar, se amplificaron los tres fragmentos correspondientes a los controles, y sólo fue posible visualizar bandas para las reacciones correspondientes al solapamiento entre los genes LPU83a_0146 y LPU83a_0148, demostrando su estructura de operón. Para los genes LPU83a_0145 y LPU83a_0146 no se obtuvieron fragmentos.

IV.6 Construcción y evaluación de los mutantes

Con el objetivo de determinar si alguno de los tres genes estaba implicado en el proceso conjugativo, se procedió a la mutagénesis de cada uno de ellos. Anteriormente, confirmamos que LPU83a_0146 y LPU83a_0148 estaban codificados dentro de un operón, y que LPU83a_0145 era expresado independientemente. Dada esta estructura, se decidió utilizar como estrategia una deleción en marco por doble recombinación, para tener la seguridad de no generar efectos polares sobre la expresión de LPU83a_0146 al mutar LPU83a_0148. Para esto, se amplificaron los fragmentos de DNA utilizando *pfu* polimerasa y *primers* específicamente diseñados, y se clonaron individualmente en el vector pK18mob. Luego, los fragmentos fueron subclonados en el vector pJQ200ks+, el cual no es capaz de replicar en rizobios, obteniendo una construcción con las dos regiones de recombinación necesarias para cada una de las deleciones deseadas. En la figura IV.5 A se muestra un esquema general de la estrategia utilizada para la generación de los mutantes. Los clones obtenidos, candidatos a poseer la deleción, fueron evaluados por PCR, seleccionando aquellos clones que presentaron un fragmento amplificado del tamaño predicho para la deleción diseñada de cada uno de los genes. En la figura IV.5 B se muestran las electroforesis de los productos de PCRs de los clones analizados. Los fragmentos amplificados que mostraron el tamaño esperado fueron secuenciados, confirmando que la deleción generada fue correcta.

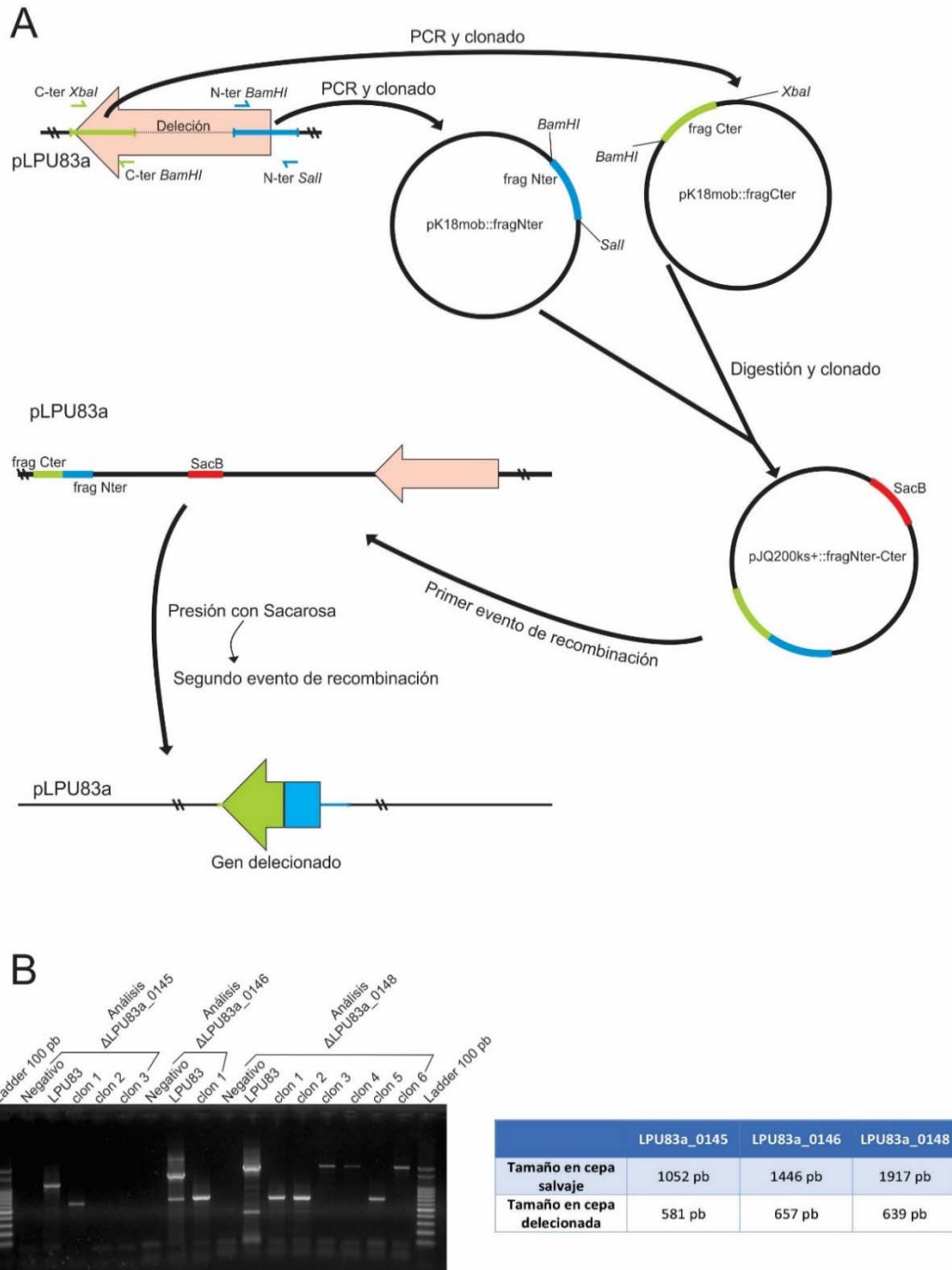


Figura IV.5. Obtención de cepas mutantes. A. Esquema general utilizado para la obtención de las cepas mutantes. En el esquema se observan las regiones a amplificar de cada gen y sus posteriores clonados, hasta obtener un vector con los dos fragmentos necesarios para la deleción. Luego se muestra la estrategia utilizada para la doble recombinación **B. Análisis por PCR de clones candidatos.** A la izquierda se muestra la electroforesis de los productos de PCR obtenidos para los clones candidatos, utilizando *primers* específicos en cada caso. En la tabla de la derecha se muestran los tamaños esperados para la cepa salvaje y la cepa mutante en cada caso.

Una vez obtenidos los mutantes por delección, su fenotipo fue analizado realizando conjugaciones hacia la cepa libre de plásmidos *Agrobacterium tumefaciens* UBAPF2 y comparando las frecuencias conjugativas con aquellas obtenidas para la conjugación del plásmido salvaje. En la figura IV.6 se puede observar que el mutante en LPU83a_0145 no mostró diferencias con la cepa salvaje. El mutante en LPU83a_0146 resultó en un aumento significativo de la frecuencia conjugativa, mostrando valores cinco veces superiores al control ($9.63 \pm 6.20 \times 10^{-6}$ contra $1.77 \pm 0.84 \times 10^{-6}$ transconjugantes por célula donadora). Por último, el mutante en LPU83a_0148 fue incapaz de conjuguar (valores inferiores a $2.9 \pm 0.55 \times 10^{-10}$ transconjugantes por célula donadora). De esta forma, se demostró que los dos genes codificados en el operón estaban implicados en la conjugación, mientras que el rol de LPU83a_0145 no estaría ligado a dicho proceso, al menos, desde el entorno genómico de LPU83 y en las condiciones experimentales utilizadas.

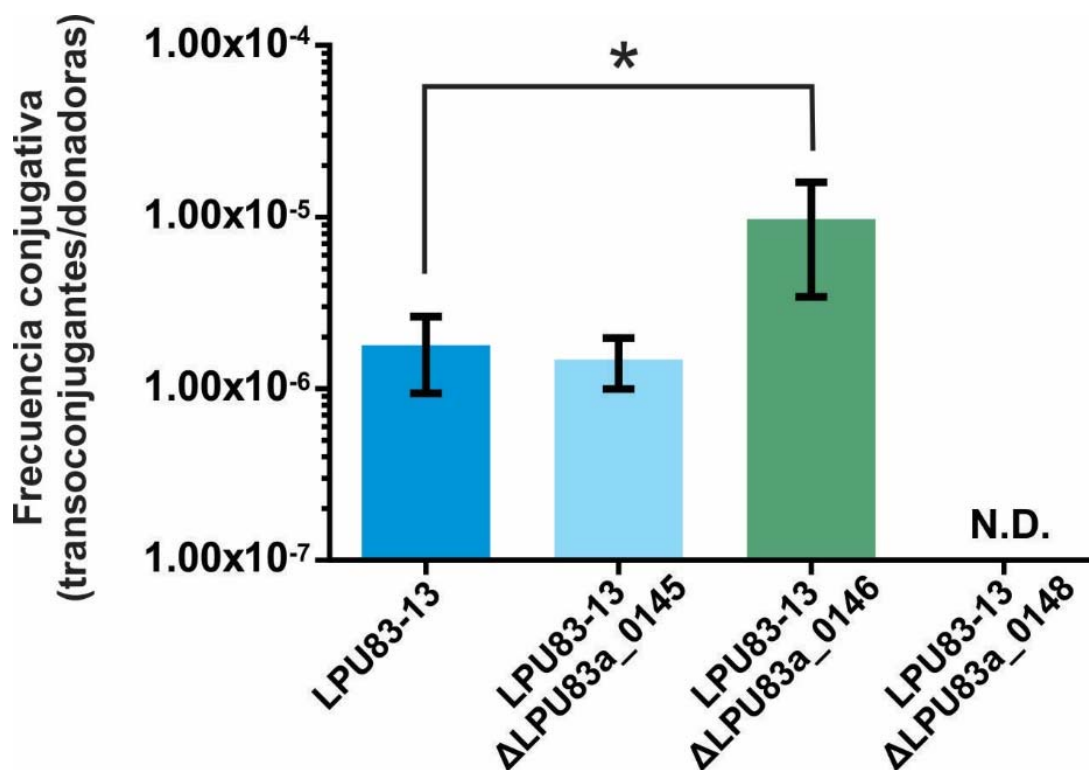


Figura IV.6. Frecuencias conjugativas obtenidas para la transferencia del plásmido salvaje y sus derivados mutantes. Se muestran las frecuencias obtenidas para cada cepa. El asterisco simboliza que el mutante en LPU83a_0146 presentó diferencias significativas con la cepa salvaje al analizar los valores mediante test t de Student ($p < 0.05$). Las barras en cada columna simbolizan la desviación estándar (SD) de cada muestra. N.D.: no detectado.

IV.7 Complementación de los mutantes

Para confirmar que cada uno de los fenotipos observados por LPU83a_0146 y LPU83a_0148 eran causados por la delección de los genes mencionados, se procedió a complementar las cepas mutantes con una copia entera del gen deleccionado aportada en *trans*, bajo la expresión del promotor *lac* presente en el vector utilizado. También se construyó el vector para complementar LPU83a_0145, para evaluarlo en otros entornos genómicos. Cada uno de los genes fue amplificado y clonado en el vector de amplio rango de huésped pBBR1MCS-5, el cual es replicativo tanto en *E. coli* como en rizobios (Kovach *et al.*, 1995). Luego de corroborar el correcto clonado, cada vector fue secuenciado para confirmar que el fragmento clonado no poseía errores en la secuencia, y posteriormente fue introducido en la cepa correspondiente. Las frecuencias de conjugación

obtenidas para estas cepas fueron comparadas con las frecuencias de conjugación del plásmido salvaje y de cada uno de los mutantes conteniendo el vector pBBR1MCS-5 vacío como control. Como se observa en la figura IV.7, tanto la cepa mutante en LPU83a_0145 como aquella conteniendo una copia entera del gen, presentaron valores muy similares a los obtenidos para la transferencia del plásmido salvaje, como era de esperar. El mutante en LPU83a_0146 conteniendo el vector vacío se comportó de la misma forma que el mutante en este gen previamente analizado, mientras que la presencia de una copia del gen LPU83a_0146 complementó al mutante. Esto confirmó que el fenotipo observado era causado por la mutagénesis del gen LPU83a_0146. La presencia de una copia entera de LPU83a_0148 fue capaz de restablecer el fenotipo conjugativo del mutante en dicho gen. Dado que el mutante en LPU83a_0148 es incapaz de conjugarse, y que la presencia de una copia del gen permite que la conjugación ocurra, es posible afirmar que el gen mencionado es indispensable para que el proceso conjugativo tenga lugar.

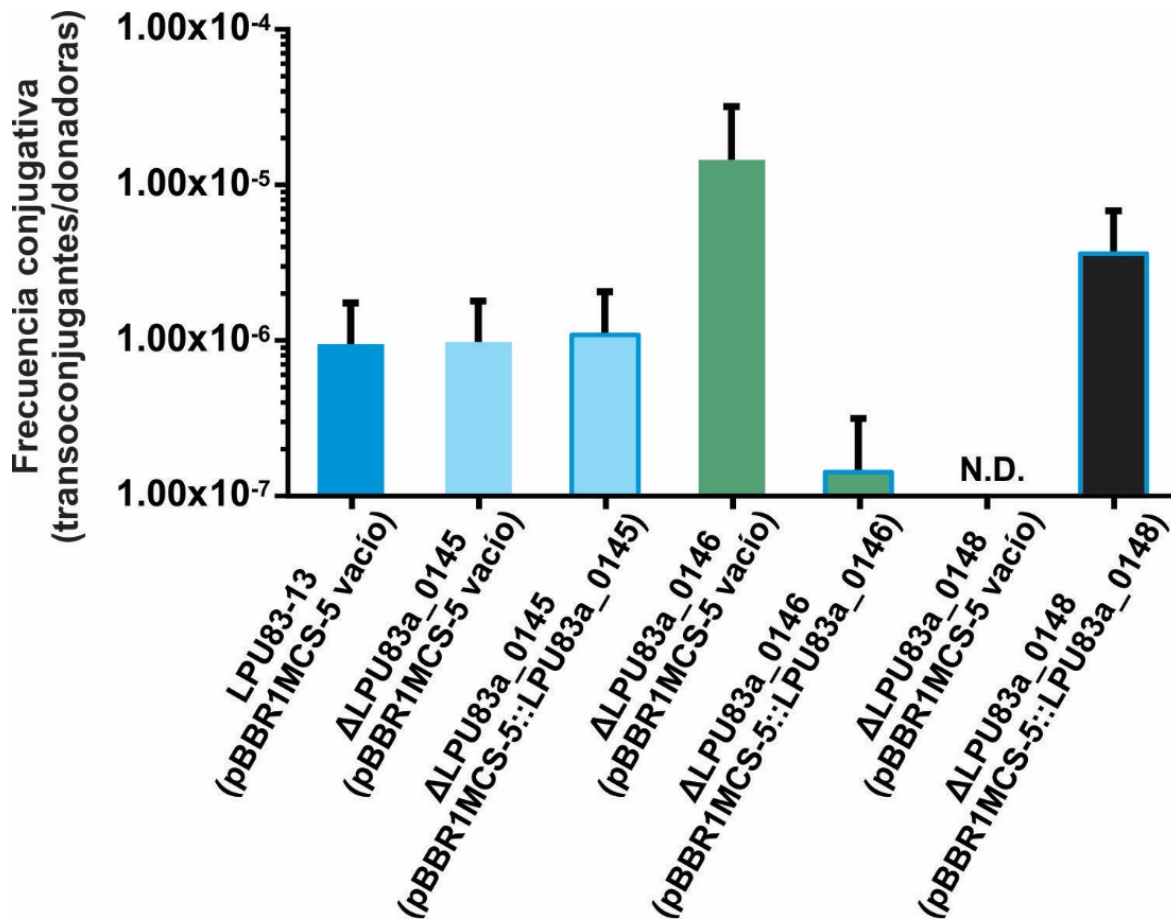


Figura IV.7. Frecuencias conjugativas correspondientes a la complementación de los mutantes. Se muestran las frecuencias conjugativas de la cepa salvaje y de cada uno de los mutantes conteniendo el vector vacío, y de cada uno de los mutantes conteniendo el mismo vector con una copia salvaje del gen deletado. Las barras en cada columna simbolizan la desviación estándar (SD) de cada muestra. N.D.: no detectado.

Con las mismas construcciones, se decidió analizar si la frecuencia conjugativa del plásmido pLPU83a se veía afectada con la presencia de una segunda copia de cada uno de los genes, expresando cada gen mediante el promotor *lac* del vector pBBR1MSC-5. De esta manera esperaríamos una sobreexpresión (al menos pequeña) de cada gen. Para esto, se introdujo cada uno de los plásmidos utilizados para la complementación en la cepa *R. favelukesii* LPU83-13, obteniendo las cepas *R. favelukesii* LPU83-13 (pBBR1MCS-5::0145), LPU83-13 (pBBR1MCS-5::0146) y LPU83-13

(pBBR1MCS-5::0148). Los valores de frecuencias conjugativas fueron comparados con los obtenidos para la cepa LPU83-13 (pBBR1MCS-5) utilizada en el ensayo de complementación. Como es posible observar en la figura IV.8, la sobreexpresión de cada uno de los genes no produjo diferencias significativas en la transferencia del plásmido pLPU83a. A pesar de no observar ningún efecto, no conocemos la medida real en que cada uno de los genes fue sobreexpresado, por lo que no podemos descartar un efecto por parte de los mismos al expresarse en mayor proporción. Para poder analizar la respuesta de la transferencia conjugativa de pLPU83a a la sobreexpresión de cada uno de estos genes, se podrían generar construcciones en donde la expresión de cada gen se encuentre bajo un promotor inducible (por ejemplo, el plásmido pSRK construido utilizado por Khan *et al.* (2008)). De esta forma, se podría estudiar la transferencia conjugativa bajo diferentes niveles de expresión.

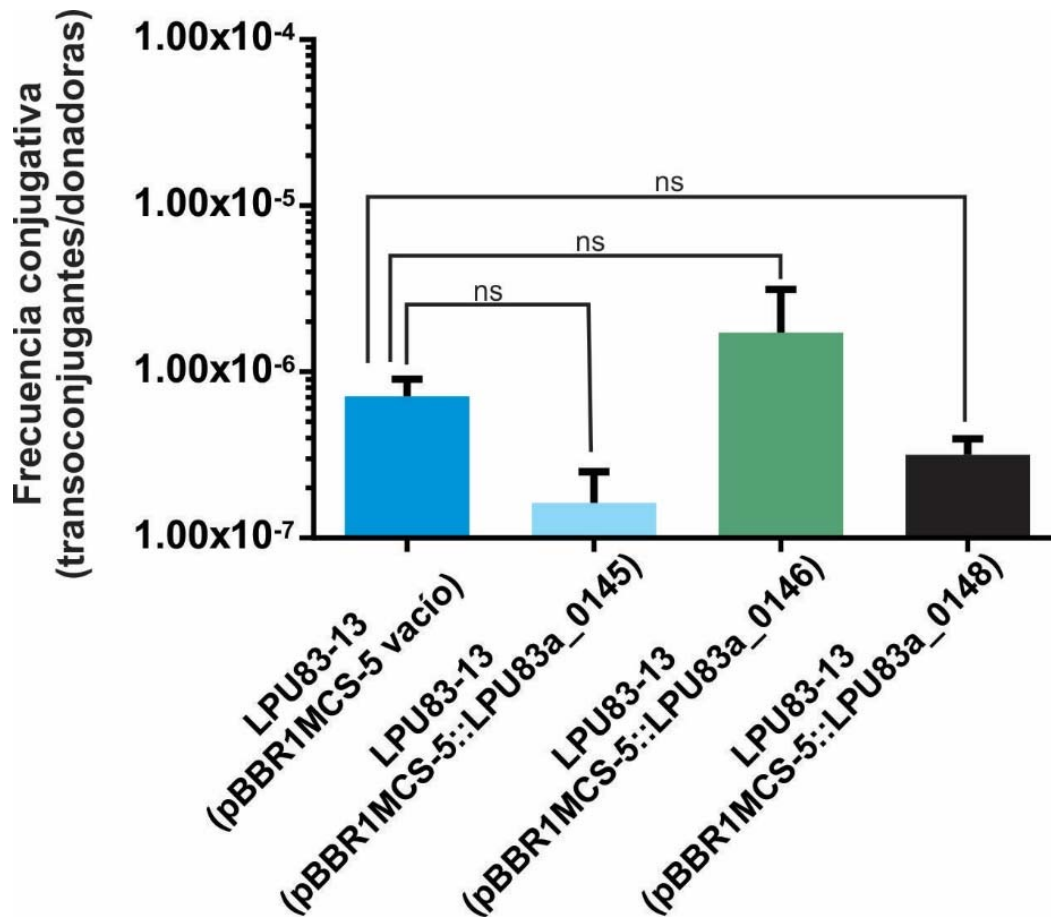


Figura IV.8. Frecuencias conjugativas correspondientes a la sobreexpresión de los genes LPU83a_0145, LPU83a_0146 y LPU83a_0148. Se muestran las frecuencias conjugativas de la cepa salvaje conteniendo los plásmidos pBBR1MCS-5 vacío y pBBR1MCS-5 con una copia entera de los genes LPU83a_0145, LPU83a_0146 y LPU83a_0148. ns: diferencias estadísticas no significativas mediante análisis ANOVA y test de comparaciones múltiples de Dunnett ($p > 0.05$).

Con los datos presentados hasta el momento, es posible afirmar que el plásmido pLPU83a cuenta con dos genes organizados en un mismo operón que codifican proteínas hipotéticas, las cuales tienen un rol crucial en la conjugación de dicho plásmido. La proteína codificada por LPU83a_0148 es esencial para que el proceso ocurra, mientras que aquella codificada por LPU83a_0146 disminuye la transferencia del plásmido por un mecanismo aún desconocido. Ambos genes se encuentran ampliamente conservados entre bacterias correspondientes al grupo de las α -

proteobacterias. El análisis filogenético de ambos genes, por separado, permitió agrupar los plásmidos que poseen homólogos en dos grandes grupos. Uno de ellos contiene a los plásmidos del grupo I-C detallados en el capítulo anterior, mientras que el otro contiene plásmidos caracterizados por la ausencia de *traR* y de *Dtr*, y la presencia de un gen involucrado en la transferencia conjugativa denominado *rptA*. La distribución de los genes hipotéticos en estos dos grupos abre el interrogante acerca de si los genes hipotéticos también están involucrados en la transferencia de los plásmidos de este grupo, y si llevan a cabo la misma función que en pLPU83a. Al mismo tiempo, considerando que algunos genes pueden cumplir una función determinada dependiendo del entorno que los rodee (Pistorio *et al.*, 2013), y habiendo visto que el plásmido pLPU83a puede comportarse de distintas maneras dependiendo del entorno genético en el que se encuentre (Torres Tejerizo *et al.*, 2014), resulta de gran interés estudiar el comportamiento del plásmido y sus derivados mutantes en diferentes entornos genéticos. Asimismo, hasta el momento no ha sido descrito un mecanismo regulatorio que involucre a proteínas similares a las mencionadas, por lo que resulta relevante el estudio de la función que ambas están llevando a cabo en la transferencia de pLPU83a. Por este motivo, en el siguiente capítulo se profundizará el estudio de los mismos, analizando la transferencia del plásmido desde diferentes entornos genéticos, y evaluando si genes homólogos se encuentran también involucrados en la conjugación.

Capítulo V. Estudio de la
transferencia del plásmido
pLPU83a y sus derivados
mutantes desde diferentes
entornos genéticos.

V.1 Introducción

En base a los elementos conjugativos presentes, los plásmidos pueden clasificarse como auto-transmisibles o conjugativos, cuando portan un Dtr y un Mpf completo, o como movilizables cuando codifican su propio Dtr, pero necesitan que otro plásmido les aporte las funciones del Mpf. En base a esta definición, los plásmidos auto-transmisibles son capaces de ser transferidos de forma autónoma, mientras que los plásmidos movilizables sólo pueden hacerlo en presencia de otro plásmido. El plásmido pLPU83a de *R. favelukesii* LPU83 cuenta con un conjunto completo de genes Dtr y codifica su propio Mpf, por lo que ha sido caracterizado como un plásmido auto-transmisible desde ciertos entornos genéticos (Torres Tejerizo *et al.*, 2010), aunque también se ha comportado como un plásmido movilizable en otros entornos (Torres Tejerizo *et al.*, 2010, Torres Tejerizo *et al.*, 2014). Desde su propio entorno y cuando se encuentra presente en *E. meliloti*, el plásmido es capaz de conjugarse hacia otras cepas utilizando su propia maquinaria conjugativa (Torres Tejerizo *et al.*, 2010). Sin embargo, en el entorno de *R. etli* CFN42 necesita de la expresión de algunos elementos codificados por el plásmido pRetCFN42a de dicha cepa para ser transferido. Más específicamente, es necesario que el sistema que regula la transferencia de pRetCFN42a esté activo (Torres Tejerizo *et al.*, 2014). Pistorio *et al.* (2013) describieron un gen presente en la región conjugativa del plásmido pLPU88a de *E. meliloti* LPU88 (y conservado a lo largo de diferentes especies), al cual denominaron *rptA*. En dicho trabajo se observó que, si bien el gen no tenía incidencia alguna en la transferencia del plásmido pLPU88b desde su propio entorno, era necesario para la conjugación de dicho plásmido desde el entorno de *A. tumefaciens* UBAPF2 y de *E. meliloti* 2011. De los ejemplos previamente mencionados, es evidente que, en muchos casos, el comportamiento conjugativo de un plásmido depende del entorno genómico que lo rodea. Dicho comportamiento puede verse afectado por elementos presentes en el cromosoma o en otro plásmido del sistema estudiado (Brom *et al.*, 2000, McAnulla *et al.*, 2007, Cervantes *et al.*, 2019).

Considerando que la interacción entre elementos de los plásmidos y su entorno es relevante para el comportamiento conjugativo de los mismos, en este capítulo se evaluará la transferencia del plásmido pLPU83a y de los mutantes en los genes LPU83a_0145, LPU83a_0146 y LPU83a_0148 desde entornos genéticos con y sin genes homólogos, intentando comprender también si los homólogos cumplen la misma función biológica. De esta manera, se evaluará si los genes predichos bioinformáticamente como ortólogos cumplen la misma función en bacterias con sistemas filogenéticamente cercanos o alejados.

V.2 Estudio de la transferencia del plásmido pLPU83a desde entornos genómicos sin homólogos a LPU83a_0146 y LPU83a_0148.

Para el análisis de la función de los genes LPU83a_0145, LPU83a_0146 y LPU83a_0148 en otros entornos genómicos, se decidió evaluar la transferencia de los plásmidos mutantes desde entornos para los cuales el comportamiento de pLPU83a haya sido descrito previamente. Según lo reportado por Torres Tejerizo *et al.* (2010), cuando dicho plásmido es introducido en *E. meliloti* 2011, pLPU83a se transfiere a frecuencias muy similares a las obtenidas desde su propio entorno. Sin embargo, en el mismo trabajo se describió la ausencia de transconjugantes al realizar conjugaciones desde la cepa libre de plásmidos *A. tumefaciens* UBAPF2 (valores inferiores a 1×10^{-10} transconjugantes por célula receptora), de modo que la transferencia de pLPU83a en este entorno puede necesitar de algún elemento ausente en esta cepa, o puede verse inhibida por alguna molécula propia de *A. tumefaciens*. En un trabajo posterior, Torres Tejerizo *et al.* (2014) analizaron la transferencia de pLPU83a desde el entorno de *R. etli* CFN42, concluyendo que la transferencia desde este entorno sólo ocurre en presencia del plásmido pRetCFN42a. Según lo observado, una fracción de los transconjugantes corresponde al hecho de que el circuito regulatorio presente en

pRetCFN42a es capaz de activar la maquinaria conjugativa de pLPU83a, mientras que el mayor aporte a la transferencia de pLPU83a es realizado por la maquinaria conjugativa de pRetCFN42a.

Considerando que el plásmido pLPU83a se comporta de diferentes maneras en los tres entornos mencionados, se decidió evaluar la transferencia de los plásmidos mutantes desde cepas de *E. meliloti*, *A. tumefaciens* y *R. etli*. Para esto, cada uno de los plásmidos fue transferido a las cepas *E. meliloti* 20MP6 (*E. meliloti* 2011 con resistencia a Tc y GFP en el cromosoma) (Pistorio *et al.*, 2002), *A. tumefaciens* UBAPF2 (Hynes *et al.*, 1985) y *R. etli* CFNX559 (Tejerizo *et al.*, 2015). Cada cepa construida fue chequeada mediante geles de lisis *in situ* para corroborar que el perfil plasmídico se correspondiera con el deseado (figura V.1 A). Una vez obtenidas todas las cepas, se evaluó la transferencia plasmídica utilizando *A. tumefaciens* como cepa receptora.

Como se observa en la figura V.1 B, al conjugar desde el entorno de *E. meliloti* 20MP6, tanto la versión salvaje del plásmido ($2.5 \pm 1.5 \times 10^{-6}$ transconjugantes por célula donadora) como el mutante en LPU83a_0145 ($3.2 \pm 1.4 \times 10^{-6}$ transconjugantes por célula donadora) mostraron frecuencias similares a las descritas para la transferencia desde el entorno de *R. favelukesii* LPU83 ($1.77 \pm 0.84 \times 10^{-6}$ transconjugantes por célula donadora). La transferencia del plásmido mutante en LPU83a_0146 presentó valores superiores a los del plásmido salvaje ($5.2 \pm 1.1 \times 10^{-6}$ transconjugantes por célula donadora). Vale la pena aclarar que las diferencias fueron estadísticamente significativas (valor $p < 0.1$) pero numéricamente menores que las descritas previamente en el entorno nativo. En este sistema, el mutante en LPU83a_0148 tampoco fue capaz de ser transferido.

Al realizar las conjugaciones desde el entorno de *A. tumefaciens* UBAPF2 (en este caso hacia la misma cepa UBAPF2 conteniendo un plásmido pBBR1MCS-5 para aportar resistencia a Gm), sorpresivamente fue posible detectar transconjugantes con el plásmido pLPU83a. Al analizar las frecuencias conjugativas (figura V.1 C), se obtuvieron valores de $2.9 \pm 0.86 \times 10^{-9}$ transconjugantes por célula donadora, valores muy cercanos a los del límite de detección de los experimentos realizados por Torres Tejerizo *et al.* (2010). Dado que la diferencia entre las frecuencias conjugativas y el límite de detección de la técnica es tan pequeña, un mínimo cambio en el experimento (como puede ser la composición de los medios complejos) podría determinar la ausencia de transconjugantes. Para el mutante en LPU83a_0145 no fue posible detectar transconjugantes. Considerando que este mutante suele conjugar a la misma frecuencia que el plásmido salvaje, para el cual se detectó una frecuencia conjugativa muy baja, la falta de transconjugantes del mutante en LPU83a_0145 podría deberse a que la frecuencia se encuentra por debajo del límite de detección de la técnica. El plásmido con la delección en LPU83a_0146 fue capaz de conjugar a frecuencias muy superiores al plásmido salvaje, detectando $1.3 \pm 0.18 \times 10^{-6}$ transconjugantes por célula donadora. De esta forma, es posible afirmar que el mecanismo mediante el cual la proteína codificada por el gen LPU83a_0146 reprime la conjugación también tiene lugar en el entorno de *A. tumefaciens*. Al igual que en el entorno salvaje y en *E. meliloti*, el plásmido mutante en LPU83a_0148 no pudo ser transferido.

Al introducir los plásmidos en *R. etli*, se llevaron a cabo dos estudios diferentes. Por un lado, se evaluó la transferencia de pLPU83a y los mutantes mencionados desde este entorno, mientras que por otro lado se evaluó si la presencia de cada plásmido mutante afectaba la transferencia del plásmido pRetCFN42a, pensando en una interacción entre elementos regulatorios de ambos plásmidos. En la figura V.1 D se muestran las frecuencias obtenidas para la transferencia de pLPU83a y los mutantes en LPU83a_0145, LPU83a_0146 y LPU83a_0148 desde el entorno de *R. etli*. Como es posible observar, para todos los plásmidos se obtuvieron frecuencias de conjugación muy similares, lo cual se corresponde con lo descrito por Torres Tejerizo *et al.* (2014), en donde se comprobó que la transferencia de pLPU83a es llevada a cabo en mayor medida por la maquinaria del plásmido pRetCFN42a. Por lo tanto, a partir de los datos obtenidos, es posible afirmar que las mutaciones en

pLPU83a no afectan la transferencia de dicho plásmido desde *R. etli*. Sin embargo, no es posible determinar si influyen en el mecanismo de transferencia propio de pLPU83a. En la figura V.1 E se observan los valores obtenidos para la transferencia del plásmido pRetCFN42a, en presencia de cada versión de pLPU83a. En este caso, la transferencia de pRetCFN42a fue mayor en presencia del plásmido mutante en LPU83a_0145, mientras que los otros mutantes no mostraron diferencias con la transferencia en presencia del plásmido salvaje. En base a estos resultados, no debe ser descartada una relación entre la expresión del gen LPU83a_0145 y los circuitos regulatorios de la transferencia conjugativa de pRetCFN42a.

V.3 Estudio de la transferencia del plásmido pLPU83a desde entornos genómicos con homólogos a LPU83a_0146 y LPU83a_0148.

Estudios previos permitieron encontrar pares de genes homólogos a LPU83a_0146 y LPU83a_0148 en una gran variedad de plásmidos. Previamente se demostró que ambos genes están involucrados en la transferencia de pLPU83a, por lo que nos preguntamos si cepas que contengan genes homólogos a LPU83_0146 y LPU83_0148 eran capaces de complementar nuestros mutantes. En primer lugar, evaluamos si los replicones que portan dichos homólogos eran capaces de transferirse, para inferir una funcionalidad del sistema en general y luego evaluar la complementación por el entorno completo.

V.3.1 Estudio de la transferencia de plásmidos con genes homólogos

Para decidir en qué cepas se probaría la complementación de los mutantes en a LPU83a_0146 y LPU83a_0148 por el entorno, en primer lugar, se evaluó si los plásmidos que contuvieran dichos homólogos tenían un fenotipo conjugativo y, de esta manera, inferir la funcionalidad del sistema. Para esto se seleccionaron tres cepas, abarcando diferentes rangos de identidad entre las proteínas de esos plásmidos y las de pLPU83a. El plásmido con homólogos más cercanos elegido fue el plásmido pSM11b de *E. meliloti* SM11, con un homólogo a LPU83a_0146 (SmeSM11b_p150) mostrando un 78 % de identidad y un homólogo a LPU83a_0148 (SmeSM11b_p151) con un 71 % de identidad. Otro de los plásmidos elegidos fue el plásmido pLPU88a, de *E. meliloti* LPU88. Este plásmido cuenta con homólogos a LPU83a_0146 (ORF 2, número de acceso AFM35677.1, de ahora en más LPU88a_0146) y LPU83a_0148 (ORF 3, número de acceso AFM35678.1, de ahora en más LPU88a_0148) con un 74 % y 66 % de identidad respectivamente. Además, dicho plásmido pertenece al grupo Y descrito en el capítulo IV, por lo que su análisis nos permitiría conocer el funcionamiento de plásmidos con una organización genética diferente. Por último, se encontraron genes homólogos de identidades del 65% para LPU83a_0146 (SHLA_RS09815) y 57 % para LPU83a_0148 (SHLA_RS09820) en un *contig* perteneciente a la cepa *Shinella* sp. (*Shinella* sp. DD12 SHLA_45c, número de acceso NZ_AYLZ02000070). Suponiendo que dicho *contig* corresponde a un plásmido, de ahora en más nos referiremos a dicho replicón como plásmido pDD12c.

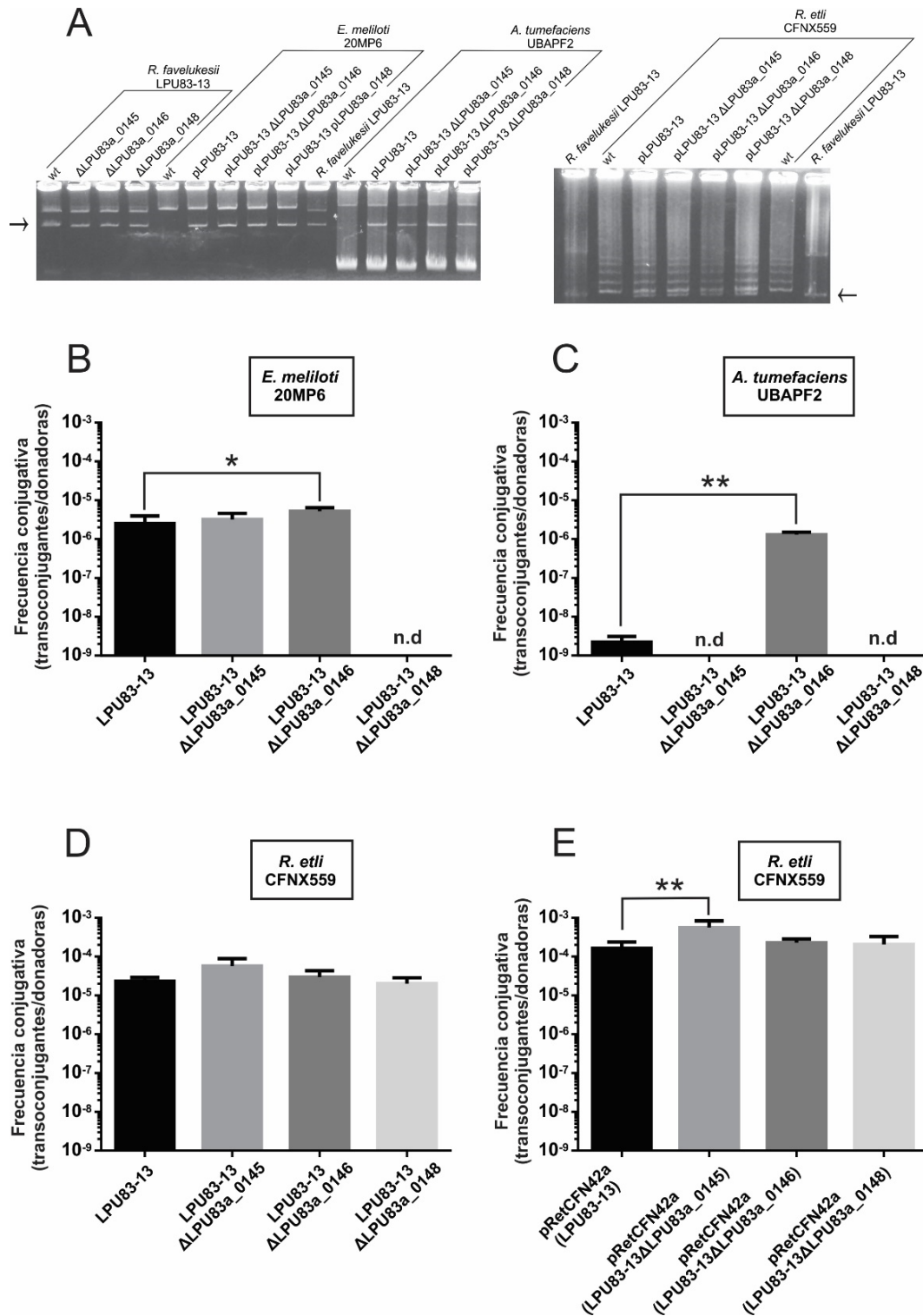


Figura V.1. Transferencia del plásmido pLPU83a y derivados mutantes desde diferentes entornos genómicos. **A.** Perfil plasmídico de las cepas construidas. Las flechas señalan al plásmido pLPU83a. **B-D.** Frecuencias conjugativas de pLPU83a y derivados mutantes desde el entorno de **B.** *E. meliloti* 20MP6. **C.** *A. tumefaciens* UBAPF2. **D.** *R. etli* CFNX559. **E.** Frecuencias conjugativas de pRetCFN42a desde el entorno de *R. etli* CFNX559, en presencia de pLPU83a y cada versión mutante. En recuadros se muestra el entorno desde el cual fue realizada la conjugación. * indica diferencias estadísticas significativas con $p < 0.1$. ** indica diferencias estadísticas significativas con $p < 0.05$. Para todos los valores se realizó el análisis mediante test ANOVA y el test de comparaciones múltiples de Dunnett.

Para el estudio de la transferencia de cada plásmido, se diseñó una estrategia para marcar los mismos con una resistencia a Gm mediante la integración de un plásmido suicida con esta resistencia. Dicha integración fue diseñada de forma tal que se produzca en regiones intergénicas de genes enfrentados (zonas de los C-terminales aledañas), para evitar la mutación de genes y la generación de efectos polares. Luego de confirmar la correcta integración por PCR, se procedió a evaluar la transferencia de cada plásmido utilizando *A. tumefaciens* UBAPF2 como cepa receptora. Los plásmidos pDD12c y pLPU88a mostraron la capacidad de ser transferidos, mientras que en el caso del plásmido pSM11b no fue posible observar transconjugantes. En la figura V.2 se muestran los perfiles plasmídicos de las cepas donadoras y de las receptoras luego de haber recibido el plásmido correspondiente. Al analizar en detalle las regiones del Dtr y Mpf de pSM11b observamos un *frameshift* en el gen *trbE*. Este gen resulta esencial para la conjugación (codifica una de las ATPasas que aportan energía al proceso conjugativo). Debido a los problemas inherentes de la secuenciación masiva, amplificamos la región de *trbE* y corroboramos el *frameshift*. Teniendo en cuenta que el plásmido cuenta con la maquinaria completa para la transferencia, ese *frameshift* sería el causante de la falta de conjugación. Es posible suponer que la complementación con una copia funcional del gen resultaría en un fenotipo conjugativo. Para el posterior análisis descartamos esta cepa ya que no garantizaba la funcionalidad del sistema conjugativo.

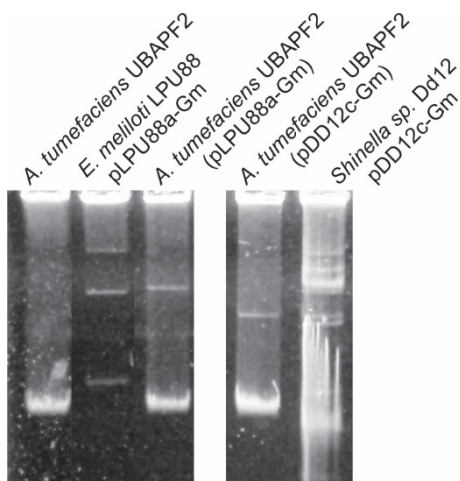


Figura V.2. Análisis de la transferencia de los plásmidos pLPU88a y pDD12c. Se muestran los perfiles plasmídicos de las cepas donadoras de pLPU88a y pDD12c y de *A. tumefaciens* UBAPF2 conteniendo ambos plásmidos.

V.3.2. Análisis de complementación de los mutantes en LPU83a_0146 y LPU83a_0148 por el entorno

El hecho de que plásmidos con genes homólogos a LPU83a_0146 y LPU83a_0148 hayan demostrado la habilidad de conjugar, nos permitió preguntarnos si dichos homólogos están involucrados en la transferencia de cada plásmido, y si la función que llevan a cabo es similar a la realizada por LPU83a_0146 y LPU83a_0148 en la transferencia de pLPU83a.

Con el objetivo de determinar si los genes homólogos presentes en los plásmidos pDD12c y pLPU88a poseen la misma actividad biológica que LPU83a_0146 y LPU83a_0148, se analizó la frecuencia conjugativa del plásmido pLPU83a y de los mutantes en LPU83a_0146 y LPU83a_0148 desde el entorno de las cepas *E. meliloti* LPU88 y *Shinella* sp. DD12. Para esto, se introdujo el plásmido pLPU83a y sus derivados mutantes en las cepas mencionadas marcadas previamente. Luego de corroborar la presencia de cada plásmido en ambas cepas (figura V.3 A), se realizaron ensayos de conjugación hacia *A. tumefaciens* UBAPF2, con la misma metodología utilizada para la transferencia desde LPU83. En la figura V.3 B se muestran las frecuencias de transferencia obtenidas para el plásmido pLPU83a y sus mutantes desde la cepa *E. meliloti* LPU88. Lo primero que se puede

observar es que la conjugación de pLPU83a desde *E. meliloti* LPU88 es llevada a cabo a una frecuencia relativamente más baja en comparación con la obtenida desde el entorno parental o desde la cepa *E. meliloti* 20MP6. Una explicación posible es que la presencia del gen LPU88a_0146 en el plásmido pLPU88a actúe de la misma forma que LPU83a_0146, aumentando (más aún) la represión de la conjugación. Al analizar el comportamiento del plásmido pLPU83a Δ LPU83a_0146 desde la cepa *E. meliloti* LPU88, se obtuvieron frecuencias muy similares a las de la transferencia de pLPU83a desde el mismo entorno. Dado que, tanto en el entorno parental como en los entornos de *E. meliloti* 20MP6 y *A. tumefaciens* UBAPF2, el mutante en LPU83a_0146 mostró frecuencias conjugativas superiores al plásmido salvaje, era de esperar el mismo comportamiento en este sistema. Sin embargo, como se mencionó previamente, es posible que el gen LPU88a_0146 presente en pLPU88a actúe reprimiendo la transferencia de pLPU83a. De esta forma, el gen presente en pLPU88a estaría complementando al mutante en LPU83a_0146. En cuanto a la transferencia del mutante en LPU83a_0148 desde *E. meliloti* LPU88, tampoco se obtuvieron frecuencias conjugativas diferentes a la de *E. meliloti* LPU88 (pLPU83a). Considerando que dicho gen es necesario para la transferencia de pLPU83a, es posible suponer que el gen LPU88a_0148 de pLPU88a lleva a cabo una función similar y es capaz de complementar al mutante en LPU83a_0148, permitiendo la conjugación. Sin embargo, no debemos descartar la posibilidad de que la transferencia de pLPU83a sea llevada a cabo por elementos propios de *E. meliloti* LPU88 (de una manera similar a la que ocurre en el entorno de *R. etli* CFN42), lo que no permitiría observar el efecto de los mutantes en las condiciones evaluadas.

Para obtener más información acerca del comportamiento de pLPU83a en presencia de los genes homólogos presentes en pLPU88a, se decidió evaluar la conjugación de pLPU83a y sus respectivos mutantes en presencia de pLPU88a, desde un entorno diferente al de *E. meliloti* LPU88. Para esto, ambos plásmidos fueron introducidos en la cepa *E. meliloti* 2011 (figura V.3 A), en donde el comportamiento del plásmido pLPU83a y sus derivados mutantes ya había sido evaluado previamente (ver sección V.2). Tanto *E. meliloti* 2011 (pLPU88a -pLPU83a) como *E. meliloti* 2011 (pLPU88a -pLPU83a Δ LPU83a_0146) mostraron valores superiores a los obtenidos desde el entorno de LPU88, aunque no lograron conjugarse a las frecuencias obtenidas desde *E. meliloti* 20MP6 (pLPU83a) (figura V.3 C), indicando que la sola presencia de pLPU88a afecta a la transferencia de pLPU83a, ya sea por algún elemento propio de pLPU88a o por alguna deficiencia energética de la célula generada por la presencia de ambos plásmidos. Es remarcable que no se detectaron diferencias entre los valores de transferencia de pLPU83a y el mutante en LPU83a_0146 desde el entorno *E. meliloti* 2011 (pLPU88a), indicando nuevamente una posible complementación por parte del homólogo codificado en pLPU88a. Para el mutante en LPU83a_0148 no fue posible obtener transconjugantes, descartando la complementación heteróloga de este gen en el entorno de la cepa 20MP6 (pLPU88a). Esto podría sugerir la presencia de algún elemento en el entorno de *E. meliloti* LPU88 pero no en el de *E. meliloti* 20MP6 (pLPU88a) que permita la conjugación de pLPU83a en ausencia de LPU83a_0148. Al mismo tiempo, este resultado sugiere que la transferencia de pLPU83a desde el entorno de *E. meliloti* 20MP6 es llevada a cabo por su propia maquinaria y no mediante la maquinaria de pLPU88a como se sugirió previamente, ya que requiere la presencia del gen LPU83a_0148.

Al llevar a cabo el mismo estudio en la cepa *Shinella* sp. DD12 (figura V.3 D), tanto pLPU83a como pLPU83a Δ LPU83a_0146 fueron transferidos a frecuencias muy bajas, y no mostraron diferencias significativas entre sus valores. Por este motivo, podríamos suponer una complementación por parte del gen SHLA_RS09815 codificado en el plásmido pDD12c. Desde este entorno, tampoco fue posible obtener transconjugantes de pLPU83a Δ LPU83a_0148, dando indicios de que el gen SHLA_RS09820 presente en pDD12c no es capaz de restablecer el fenotipo conjugativo.

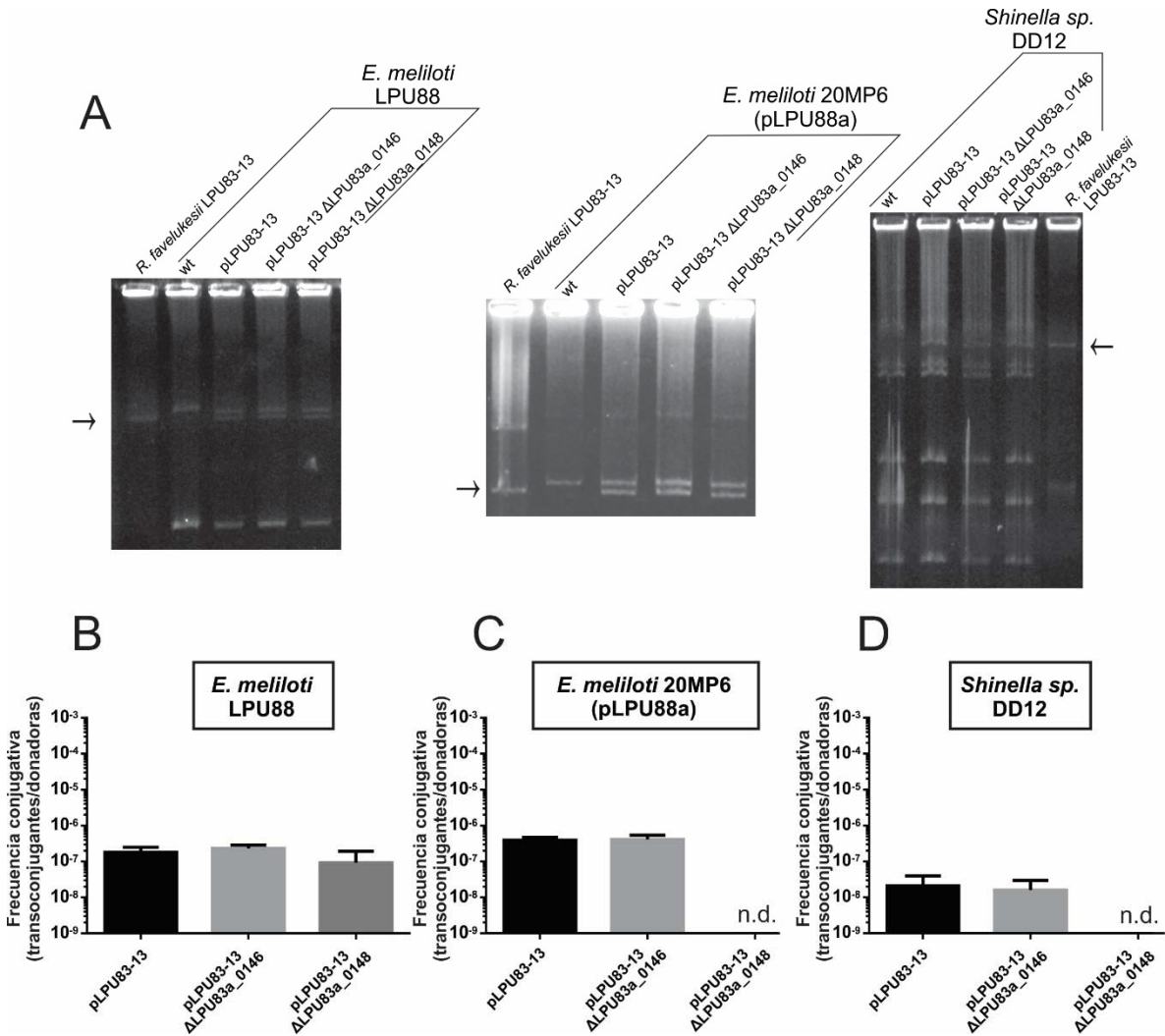


Figura V.3. Análisis de la transferencia de pLPU83a desde entornos con genes homólogos a LPU83a_0146 y LPU83a_0148. A. Perfil plasmídico de las cepas utilizadas. Las flechas marcan al plásmido pLPU83a B-D. Transferencia desde el entorno de B. *E. meliloti* LPU88. C. *E. meliloti* 20MP6 (pLPU88a) D. *Shinella* sp. DD12. n.d.: no detectado.

V.4 Complementación heteróloga de LPU83a_0146

Hemos observado que el plásmido pLPU88a es capaz de mantener la represión de la conjugación en pLPU83a ΔLPU83a_0146. Para precisar aún más este aspecto, se diseñó un ensayo de complementación del mutante en LPU83a_0146 en el entorno parental utilizando únicamente una copia del gen de pLPU88a. Para esto, el gen LPU88a_0146 fue amplificado por PCR y clonado en el plásmido pBBR1MCS-5 (el mismo vector utilizado para la complementación de los mutantes). Luego, el plásmido construido fue introducido en la cepa mutante de *R. favelukesii* LPU83 ΔLPU83a_0146 y se evaluó la transferencia del plásmido mutante en presencia del homólogo perteneciente a pLPU88a. La presencia del gen LPU88a_0146 *en trans* fue suficiente para disminuir la frecuencia conjugativa del plásmido pLPU83a mutante en el gen LPU83a_0146 (figura V.4), mostrando un comportamiento similar al gen LPU83a_0146. De esta forma, la complementación heteróloga fue confirmada en el entorno de *R. favelukesii* LPU83.

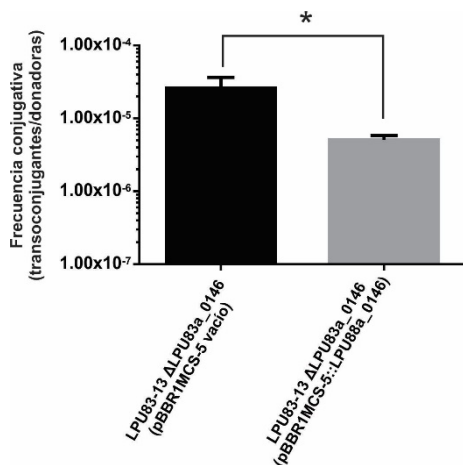


Figura V.4. Ensayo de complementación heteróloga de *R. favelukesii* LPU83-13 ΔLPU83a_0146 por el gen LPU88a_0146. Se muestran las frecuencias conjugativas obtenidas para la cepa *R. favelukesii* LPU83-13 ΔLPU83a_0146 conteniendo el plásmido pBBR1MCS-5 vacío o el plásmido con una copia del gen LPU88a_0146. El símbolo * indica diferencias estadísticamente significativas mediante test t de Student ($p < 0.05$).

En este capítulo se evaluó la transferencia del plásmido pLPU83a y de los mutantes en los genes hipotéticos descritos previamente desde diferentes entornos genéticos. Específicamente, se evaluó la transferencia desde los entornos de *E. meliloti* 20MP6, *A. tumefaciens* UBAPF2 y *R. etli* CFN42, observándose que, en los dos primeros casos, los genes LPU83a_0146 y LPU83a_0148 tienen un rol activo en la transferencia de pLPU83a. En el caso de *R. etli*, no fue posible determinar la función de los genes ya que la transferencia es llevada a cabo por la maquinaria del plásmido pCFN42a presente en dicho entorno. Además, se estudió la transferencia del plásmido y sus derivados mutantes desde entornos en donde fuera posible encontrar genes homólogos a LPU83a_0146 y LPU83a_0148. Para esto, se introdujeron los plásmidos en las cepas *E. meliloti* LPU88 y *Shinella* sp. DD12. En el entorno de *Shinella* sp. DD12, se obtuvieron frecuencias conjugativas similares entre el plásmido salvaje y el mutante en LPU83a_0146, pero no se detectaron transconjugantes del mutante en LPU83a_0148, por lo que un gen podría complementar mientras que el otro no. En el entorno de LPU88, se obtuvieron frecuencias conjugativas similares entre el plásmido salvaje y los mutantes en LPU83a_0146 y LPU83a_0148, indicando una posible complementación por parte de los genes homólogos codificados en dicho entorno. Al analizar la transferencia desde otro entorno conteniendo los plásmidos pLPU88a y pLPU83a, fue posible observar la complementación por parte del gen LPU88a_0146, pero no por LPU88a_0148, indicando que algún otro elemento presente en la cepa LPU88 puede llevar a cabo la función del último. La complementación por parte de LPU88a_0146 fue confirmada al expresar dicho gen en el entorno de *R. favelukesii* LPU83 ΔLPU83a_0146, observando una disminución de la frecuencia conjugativa en presencia de dicho gen.

Como parte de la caracterización de la función de las proteínas codificadas por LPU83a_0146 y LPU83a_0148, en el siguiente capítulo se profundizarán estudios moleculares para entender su función en la regulación del proceso conjugativo mediante técnicas ómicas.

Capítulo VI. Análisis
metabolómico y
transcriptómico de los
mutantes en los genes
LPU83a_0145, LPU83a_0146 y
LPU83a_0148.

VI.1 Introducción

El avance de las técnicas ómicas en los últimos años ha permitido la obtención de gran cantidad de información, ya sea a nivel de metabolitos, proteínas, DNA o RNA (Barsch *et al.*, 2004, Schneider & Orchard, 2011, Draghi *et al.*, 2016, Nilsson *et al.*, 2019). La técnica que estudia la concentración de metabolitos en el interior celular es conocida como metabolómica. Esta técnica permite comparar los niveles de diversos metabolitos celulares en diferentes condiciones, pudiendo detectar cambios en rutas metabólicas en respuesta ante un estímulo o una dada condición, como puede ser una mutación. En un estudio realizado por Shi *et al.* (2017), se observó que la mutación de diversos reguladores transcripcionales de *Synechocystis* sp. PCC 6803 derivaba en cambios en el perfil metabólico de dicho organismo. Por otro lado, Gibert *et al.* (2016) relacionaron la regulación de la conjugación de la transferencia del plásmido R27 desde *E. coli* con la fase de crecimiento del cultivo donador. En dicho estudio, observaron que la transferencia del plásmido se reprimía en una fase estacionaria temprana, mediante modificaciones en los niveles de cAMP.

El secuenciamiento masivo de RNA (*RNA-seq*) es una técnica mediante la cual es posible evaluar los niveles de expresión de todos los transcritos expresados en una determinada condición. De esta forma, la utilización de esta técnica para comparar un organismo en dos o más condiciones diferentes, permite relacionar los cambios de comportamiento observados con las modificaciones en los niveles de los transcritos que ocurren en respuesta a la condición estudiada.

En nuestro grupo, como hemos mencionado, se ha estudiado un plásmido capaz de ser transferido y cuyo mecanismo regulatorio pareciera diferir a los mecanismos descritos previamente. En estudios previos, comprobamos que la transferencia del plásmido pLPU83a no es regulada por la acumulación de AHLs, y tampoco responde a un mecanismo de QS. Sin embargo, necesita de la expresión de *traR* para ser transferido (Torres Tejerizo *et al.*, 2014). Al realizar un análisis filogenético utilizando las secuencias de aminoácidos de las proteínas TraR de diferentes plásmidos, se observó que la distribución de las diferentes proteínas homólogas formaba diferentes grupos. El análisis de la organización genética de las regiones de genes conjugativos de los plásmidos de cada grupo mostró características en común entre ellos (ver sección III.4). Dentro del grupo conformado por pLPU83a, fue posible observar dos genes hipotéticos conservados en el resto de los plásmidos del grupo. Mediante la mutagénesis de los genes LPU83a_0146 y LPU83a_0148 hemos demostrado que están directamente relacionados con la transferencia del plásmido pLPU83a, ya sea desde el entorno salvaje como desde otros entornos genéticos. Más específicamente, se demostró que LPU83a_0148 es un gen esencial para que la conjugación del plásmido ocurra, mientras que LPU83a_0146 codifica una proteína que, con la información obtenida hasta el momento, reprime la transferencia de dicho plásmido por un mecanismo desconocido.

Habiendo demostrado que los genes LPU83a_0146 y LPU83a_0148 están involucrados en la modulación de la transferencia de pLPU83a, en este capítulo llevaremos a cabo estudios metabolómicos y transcriptómicos de los mutantes en ambos genes, como también del mutante en LPU83a_0145, buscando cambios metabólicos y/o variaciones en los niveles de transcritos que puedan explicar de qué manera los genes mencionados influyen en el proceso regulatorio de la transferencia de pLPU83a.

VI.2 Selección de las condiciones óptimas de los cultivos para la preparación de las muestras a analizar

Como se describió en el capítulo III, la transferencia del plásmido pLPU83a varía en relación a la DO del cultivo donador. Por este motivo, se consideró necesario encontrar las condiciones en las que el efecto observado por la mutagénesis de los genes hipotéticos fuera más notorio, suponiendo

que una diferencia mayor en las frecuencias conjugativas se vería reflejada en diferencias más notorias a la hora de analizar los metabolitos celulares y los niveles de transcritos. Para esto, se realizaron conjugaciones de la cepa salvaje y de los tres mutantes a bajas (<0.9) y altas (>1.2) DOs. El mutante en LPU83a_0145 no presentó diferencias con la cepa salvaje en ninguna condición. Para el mutante en el gen LPU83a_0148, como era de esperar si el gen es esencial para la conjugación, no fue posible observar transconjugantes en ninguna de las condiciones. Para el mutante en LPU83a_0146, en ambas condiciones fue posible observar el aumento en la frecuencia conjugativa. Sin embargo, la diferencia entre los valores obtenidos para la cepa salvaje y aquellos obtenidos para el mutante en LPU83a_0146 fue notablemente mayor a densidades superiores a 1.2, por lo que se decidió utilizar esta condición para la obtención de las células de todas las cepas necesarias para la extracción de metabolitos y de RNA. En la figura VI.1 se muestran los resultados de uno de los experimentos realizado a ambas DOs para la cepa salvaje y el mutante en LPU83a_0146. Para observar las diferencias entre ambas cepas, se analizó el cociente entre la frecuencia de la cepa mutante y la frecuencia de la cepa salvaje, obteniendo un cociente más elevado para los cultivos a altas DOs.

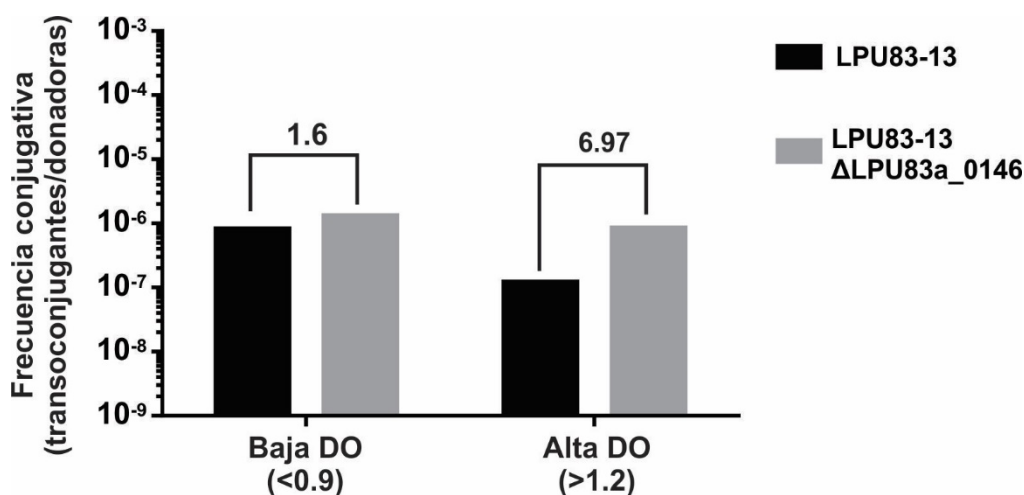


Figura VI.1. Comparación de la frecuencia conjugativa de la cepa salvaje y el mutante en pLPU83_0146 a diferentes DOs. Se muestran los valores de frecuencias conjugativas utilizando cultivos de cepas donadoras de plásmido a bajas y altas DOs. Los números sobre cada corchete muestran el valor del cociente entre la cepa mutante (gris) y la cepa salvaje (negro).

VI.3 Análisis de los mutantes mediante metabolómica

Como punto de partida para el análisis metabólico de *R. favelukesii* LPU83 y de los mutantes mencionados, se colectaron los *pellet* de cultivos de cada cepa a una DO aproximada de 1.5, crecidos en un medio definido como es el VMM (Vincent, 1970), ya que conocer la composición exacta del medio utilizado permitiría un análisis metabólico con menor error asociado al medio utilizado. Como describen Korman *et al.* (2012), cada uno de los pasos involucrados en el estudio de una muestra (recolección de la muestra, almacenamiento, preparación de la muestra y detección de metabolitos) aportan a la varianza de los resultados. Inevitablemente, diferentes muestras biológicas presentarán diferencias en la composición de metabolitos, incluso cuando las muestras sean tomadas de la forma más estandarizada posible. Al colectar las células, la concentración de los metabolitos puede modificarse, debido a conversión en otros metabolitos, degradación o volatilización de los mismos, por lo que resulta indispensable frenar las reacciones lo más rápido

posible, generalmente mediante el congelamiento de las muestras en nitrógeno líquido. Durante la preparación de las muestras, es posible introducir errores a través de malas medidas de volumen, homogenización incompleta o solubilización de metabolitos, además de la inestabilidad mencionada previamente. En cuanto a la detección de los metabolitos, es posible obtener errores en la inyección de las muestras (ya sea por fallas del equipo o por la presencia de partículas insolubles) y diferencias en la movilidad y/o eficiencia de ionización de los metabolitos dada por la interferencia de otros metabolitos de la muestra (Korman *et al.*, 2012). Considerando todo lo mencionado previamente, es posible afirmar que la técnica usada para la detección de metabolitos celulares lleva asociado un error importante. Por este motivo, se decidió realizar cuatro réplicas biológicas de cada muestra, y cuatro réplicas técnicas a partir de cada muestra biológica, obteniendo un número suficiente de medidas para obtener resultados confiables.

El *pellet* obtenido a partir de cada muestra fue congelado en nitrógeno líquido inmediatamente después de remover el sobrenadante de la muestra, intentando detener el metabolismo de las células lo más rápido posible. Una vez obtenidos los *pellet* de todas las muestras, fueron liofilizados y divididos en las respectivas réplicas técnicas. Las mismas fueron procesadas para la extracción de los metabolitos. Junto con las soluciones necesarias para preparar las muestras, se agregó una concentración conocida de ribitol, el cual funciona como un patrón interno, y permite la detección de pérdidas de muestra durante el procesamiento (Barsch *et al.*, 2004, Terpolilli *et al.*, 2016).

El sistema de detección del equipo utilizado (GC-MS/MS) permite la detección de picos correspondientes a más de 40 metabolitos diferentes, incluyendo aminoácidos, azúcares y moléculas intermediarias de diversas rutas metabólicas, como son la glucólisis, la ruta de las pentosas fosfato o el ciclo de Krebs, entre otras. Los valores de concentración intracelular obtenidos para cada metabolito en cada condición fueron compilados en una tabla, la cual fue analizada mediante el *software clustvis* (<https://biit.cs.ut.ee/clustvis/>) (Metsalu & Vilo, 2015). A partir del mismo, fue posible realizar un análisis de componentes principales (PCA, *principal component analysis*) de todos los datos obtenidos. Como se observa en la figura VI.2A, no es posible agrupar los datos pertenecientes a una misma cepa, sin incluir datos correspondientes a otra condición. El PCA mostrado sugiere que no habría diferencias significativas entre las cepas. Con el objetivo de visualizar el comportamiento de cada metabolito, a partir del mismo *software* se realizó un *heatmap* de todos los valores obtenidos para comparar todas las condiciones (figura VI.2 B). En este caso, tampoco fue posible observar un comportamiento diferencial para alguna cepa particular. De esta forma, a partir del análisis metabolómico de las cepas mutantes descartamos una relación entre los genes LPU83a_0145, LPU83a_0146 y LPU83a_0148 y el circuito metabólico evaluado de *R. favelukesii* LPU83.

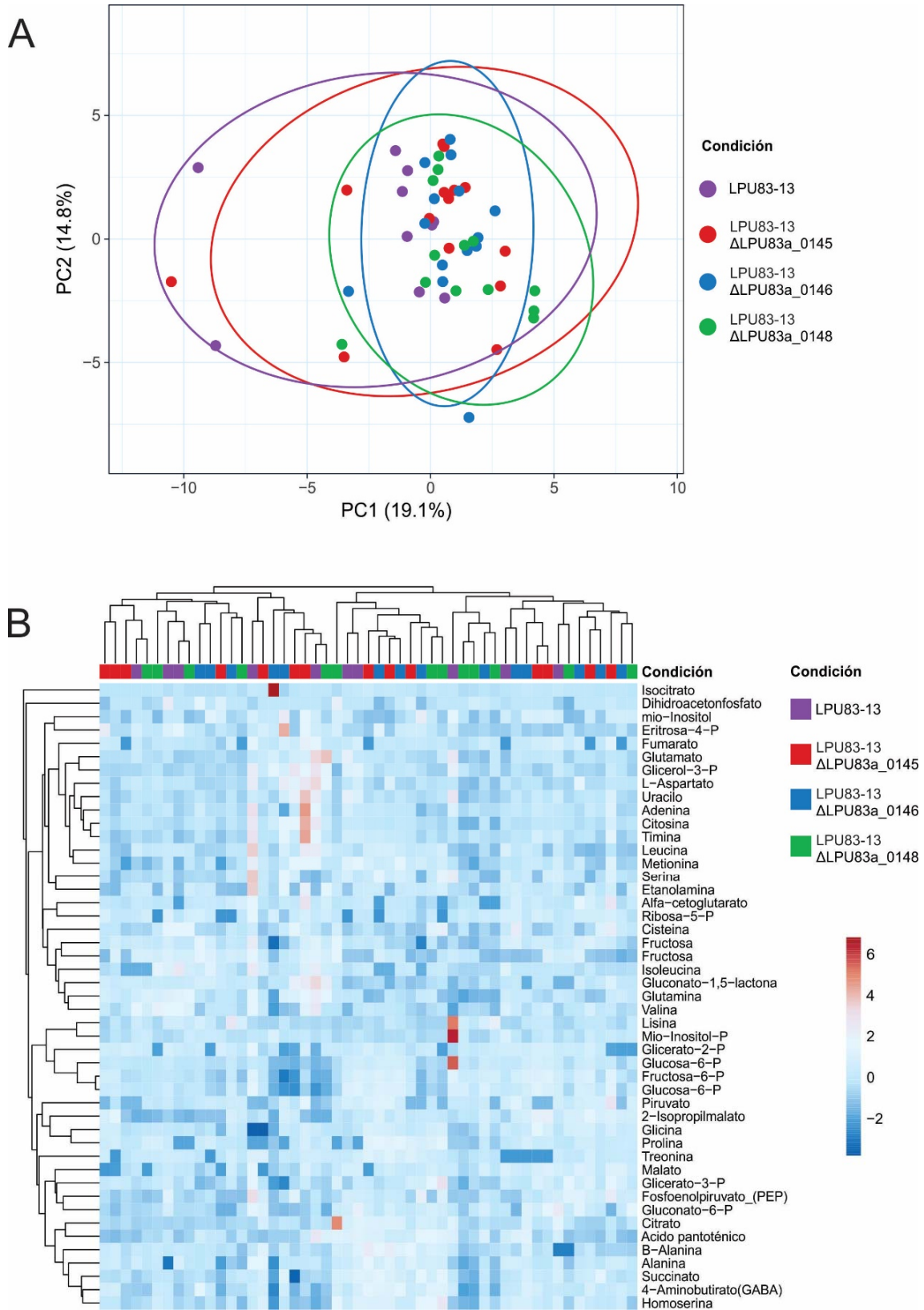


Figura VI.2. Análisis metabolómico de las muestras. A. Análisis de componentes principales. Se muestra la distribución de componentes principales del estudio metabolómico realizado sobre los mutantes en LPU83a_0145, LPU83a_0146 y LPU83a_0148 **B. Heatmap.** Análisis de la concentración relativa de cada metabolito en cada una de las condiciones estudiadas.

VI.4 Análisis de los mutantes mediante RNAseq

Para llevar a cabo el secuenciamiento de RNA, se obtuvieron tres cultivos independientes de cada cepa, los cuales alcanzaron una DO de aproximadamente 1.4. Antes de colectar el *pellet* de cada cultivo, se realizó una conjugación con cada uno de ellos, para corroborar que las células utilizadas presentaran el fenotipo deseado. A partir de los *pellet* colectados se procedió a la extracción de RNA y luego a la preparación de las bibliotecas de cDNA a utilizar en el secuenciamiento.

El secuenciamiento se realizó mediante la plataforma Illumina HiSeq. Las lecturas arrojadas por el secuenciador fueron analizadas y mapeadas con el programa Bowtie2 (Langmead & Salzberg, 2012), en donde se descartaron las lecturas de baja calidad y aquellas que no pudieron ser mapeadas en el genoma de referencia. Luego, las lecturas mapeadas fueron analizadas mediante la herramienta bioinformática ReadXplorer (Hilker *et al.*, 2014). En la tabla 6.1 es posible observar la cantidad de lecturas obtenidas y mapeadas disponibles para cada una de las muestras.

Tabla VI.1. Resultados del secuenciamiento, procesamiento y mapeo de lecturas. En la tabla se muestran los promedios de: los pares de lecturas totales (segunda columna), los pares de lecturas con calidad suficiente para el análisis (tercera columna), las lecturas mapeadas contra el genoma de referencia (cuarta columna) y los porcentajes de lecturas mapeadas (quinta columna) obtenidos para cada cepa.

Cepa	Pares de lecturas obtenidas	Pares de lecturas de buena calidad	Lecturas mapeadas por ReadXplorer	% de lecturas mapeadas
LPU83-13	8,591,261 ± 201,017.3	8,543,112 ± 198,510.3	16,833,696 ± 411,183.4	98.52 ± 0.12
LPU83-13 ΔLPU83a_0145	8,154,145 ± 516,740.2	8,107,116 ± 511,130.6	15,935,089 ± 1,026,782	98.27 ± 0.14
LPU83-13 ΔLPU83a_0146	7,227,690 ± 369,302.5	7,181,513 ± 362,485.3	14,103,257 ± 702,281.4	98.19 ± 0.07
LPU83-13 ΔLPU83a_0148	8,295,647 ± 860,566.6	8,242,919 ± 848,432.9	16,234,055 ± 1,680,609	98.47 ± 0.06

Al analizar en detalle las lecturas que mapearon contra el plásmido pLPU83a, se encontraron lecturas correspondientes a los 160 ORF predichos bioinformáticamente. Utilizando la herramienta de predicción de operones presente en el programa ReadXplorer, fue posible inferir la presencia de 33 operones en el plásmido. Dentro de los operones predichos por el programa, fue posible encontrar aquel conformado por los genes LPU83a_0146 y LPU83a_0148, corroborando los resultados experimentales mostrados en la sección IV.5.

Como un primer análisis del secuenciamiento, a partir de una matriz de distancias de los datos de todas las muestras, se generó un *heatmap*. A partir de este tipo de gráficos, es posible visualizar si las diferentes muestras analizadas presentan similitudes en su comportamiento. Como se observa en la figura VI.3, las tres réplicas del mutante en LPU83a_0146 se agrupan entre sí, mientras que todas las réplicas correspondientes a las tres cepas restantes forman otro grupo. Este resultado es un buen indicio de que el mutante en LPU83a_0146 presenta cambios significativos en el transcriptoma, al ser comparado con la cepa salvaje. Además, es posible observar una similitud entre réplicas de la cepa salvaje y réplicas de los mutantes en LPU83a_0145 y LPU83a_0148, sugiriendo la ausencia de diferencias notables entre las tres condiciones.

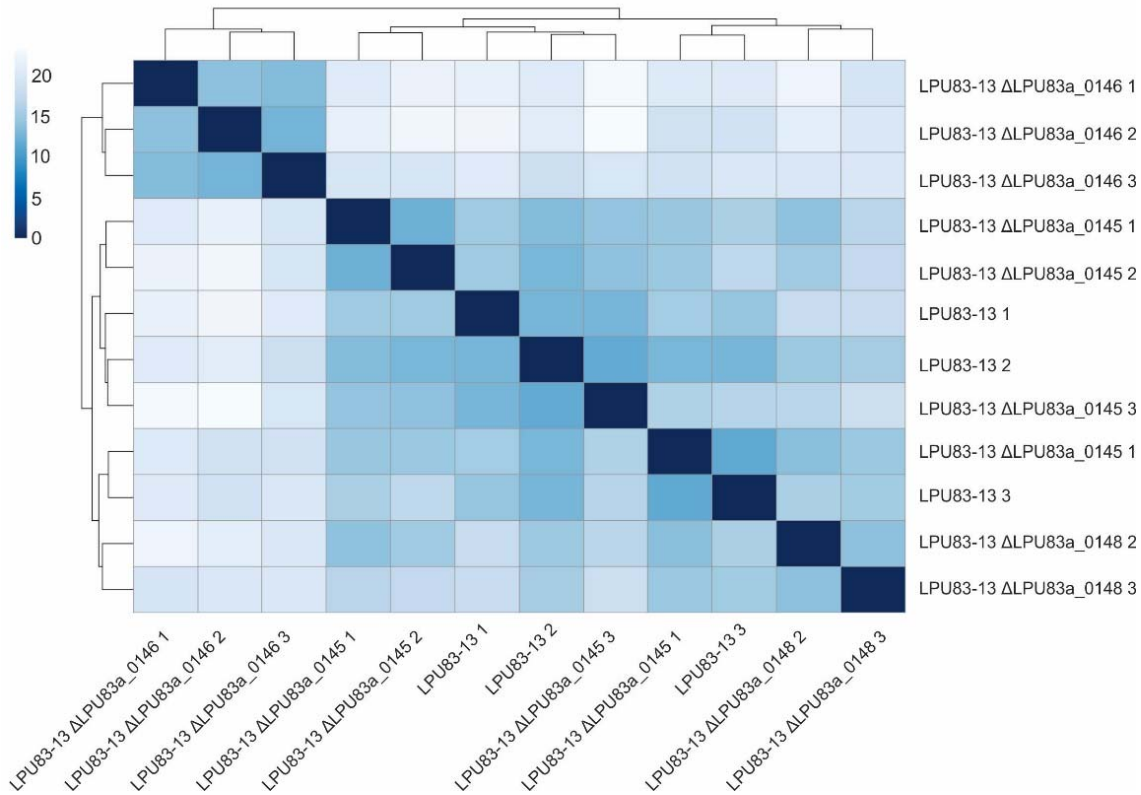


Figura VI.3. Heatmap de las cepas secuenciadas. Heatmap realizado a partir de la matriz de distancias de las diferencias de varianza de cada gen.

Para llevar a cabo el análisis de expresión diferencial entre la cepa salvaje y las cepas mutantes, los datos se analizaron mediante el método estadístico DESeq2 (Love *et al.*, 2014). De todos los genes obtenidos, se decidió continuar únicamente con aquellos que mostraran un *p adjusted value* menor a 0,05 y un *log2foldchange* superior a 1 o inferior a -1. El *p value* es un valor estadístico, que indica la probabilidad de encontrar un cambio igual o mayor al observado bajo una hipótesis nula, es decir, un falso positivo. Al llevar a cabo un análisis de expresión diferencial, las comparaciones realizadas son demasiadas, por lo que la posibilidad de encontrar falsos positivos aumenta notablemente. Por este motivo, para el análisis se “corrige” el *p value*, obteniendo un nuevo valor (*p adjusted value*) que permite interpretar de una forma más confiable los resultados obtenidos (Jafari & Ansari-Pour, 2019). Cuanto más cercano a 0 sea el *p adjusted value*, más confiable será el resultado. El *log2foldchange* es un valor que indica el cambio en los valores de expresión de la condición “tratada” contra la condición “sin tratar”. Dicho valor se traduce como un cambio multiplicativo de $2^{\log2foldchange}$. De esta forma, un *log2foldchange* de 1 implicaría aumentar al doble de transcritos, mientras que un valor de -1 significaría una disminución a la mitad. Por lo tanto, los valores de *p adjusted value* y *log2foldchange* utilizados como puntos de corte eliminan los genes en los cuales no es tan clara una expresión diferencial en las condiciones de trabajo.

En la tabla VI.2 se muestran los genes de cada mutante que presentaron una expresión diferencial en comparación con la cepa salvaje. La cepa con la delección en LPU83a_0145 mostró tres genes cromosomales con una disminución en la expresión. Sin embargo, la expresión de dichos genes se vio afectada de igual manera en los mutantes en LPU83a_0146 y LPU83a_0148. Probablemente, la expresión diferencial sea consecuencia de la metodología con la que los mutantes fueron generados, o debido a una mutación en la cepa de referencia *R. favelukesii* LPU83-

13 utilizada para mapear los transcriptomas. Por este motivo, no serán considerados como genes regulados por las proteínas estudiadas.

La cepa mutante en LPU83a_0148 mostró cuatro genes expresados diferencialmente (además de los tres genes cromosomales mencionados previamente), todos ellos sobreexpresados en esta condición. Uno de ellos es un transportador de compuestos de amonio cuaternario, codificado en el cromosoma. Otro de los genes se ubica en el plásmido pLPU83c, y codifica una cisteína hidrolasa. Los dos genes restantes se ubican en diferentes regiones del plásmido pLPU83d, y codifican una proteína hipotética y un transportador ABC. Dado que ninguno de los genes cuenta con un gen ubicado *downstream* en la misma orientación, se descarta la posibilidad de que sean el primer gen de un operón, y, por lo tanto, que haya genes diferencialmente expresados que hayan sido enmascarados por la disminución de síntesis de RNA a lo largo de un operón.

La cepa delecionada en el gen LPU83a_0146 fue la que presentó la mayor cantidad de genes con diferencias estadísticamente significativas en relación a la cepa salvaje. Específicamente, todos los genes involucrados en el proceso conjugativo de pLPU83a, ubicados dentro del mismo plásmido, mostraron niveles de expresión notablemente superiores a los de la cepa salvaje. Entre estos genes se encuentran aquellos pertenecientes al Mpf (genes *trb*) y al Dtr (genes *tra*), incluyendo también al regulador transcripcional *traR*, el cual mostró la mayor tasa de cambio. El único gen implicado en conjugación cuyos valores no se vieron afectados fue *traM*, que codifica una proteína involucrada en la inhibición de TraR (ver sección I.6) y, por lo tanto, de la conjugación. Un dato llamativo fue el hecho de que disminuyera la expresión del gen LPU83a_0148, siendo éste un gen esencial para la conjugación. En la figura VI.4 se muestra un esquema de los genes afectados en esta condición, y la medida en que sus valores se modifican ante la ausencia de LPU83a_0146.

Además de los genes correspondientes al Dtr y al Mpf, la cepa mutante en LPU83a_0146 presentó una expresión diferencial de otros genes. La mayoría de ellos codificados en el mismo plásmido, aunque también se observaron elementos del plásmido pLPU83d. En pLPU83a se observaron cinco genes sobreexpresados. Cuatro de ellos codifican proteínas hipotéticas, mientras que LPU83a_0136 codifica una proteína de la familia de las termonucleasas, y está predicho que forma parte de un operón junto con una de las proteínas hipotéticas mencionadas (LPU83a_0137). En el plásmido pLPU83d se encontraron cuatro genes con una expresión diferencial, detectando niveles de transcriptos inferiores a los de la cepa salvaje en todos los casos. Si bien los cuatro genes se encuentran en tándem, sólo los primeros tres están predichos dentro de un operón (LPU83d_1478/1479/1480), y codifican una proteína hipotética, una proteína de la familia YcaO y una toxina, respectivamente. El gen restante se expresa independientemente, y codifica otra proteína hipotética. Si bien la naturaleza de las proteínas codificadas en el plásmido pLPU83d no permite una asociación directa con la regulación de la conjugación, no debemos descartar una interacción entre elementos de los plásmidos pLPU83a y pLPU83d al momento de regular el proceso conjugativo.

Tabla VI.2. Genes expresados diferencialmente en los mutantes en LPU83-13 Δ LPU83_0145, LPU83-13 Δ LPU83_0148 y LPU83-13 Δ LPU83_0146. Se muestran los genes expresados diferencialmente en cada condición, la función predicha para cada gen, la tasa de cambio (*log₂foldchange*) y el *p adjusted value*.

Cepa	Gen	Función	<i>log₂foldchange</i>	<i>padj value</i>
LPU83-13 ΔLPU83_0145				
	LPU83_0946	Nucleósido deaminasa	-1.8312579	1.13E-08
	LPU83_0947	Pseudouridina sintasa	-2.8801936	9.91E-53
	LPU83_0948	16S rRNA (guanina(966)-N(2))-metiltransferasa	-2.6301112	1.15E-23
LPU83-13 ΔLPU83_0148				
	LPU83_0946	Nucleósido deaminasa	-1.8236476	5.11E-09
	LPU83_0947	Pseudouridina sintasa	-2.910410	2.16E-54
	LPU83_0948	16S rRNA (guanina(966)-N(2))-metiltransferasa	-2.3778678	1.20E-20
	LPU83_3136	Transportador de compuestos de amonio cuaternario	1.1493396	0.033736
	LPU83_pLPU83c_0723	Cisteína hidrolasa	1.1380396	0.0073209
	LPU83_pLPU83d_1034	Proteína hipotética	1.0649076	0.0418973
	LPU83_pLPU83d_1825	Transportador ABC	1.0928120	0.0420067
LPU83-13 ΔLPU83_0146				
	LPU83_0946	Nucleósido deaminasa	-1.3014846	3.07E-05
	LPU83_0947	Pseudouridina sintasa	-3.2522196	2.46E-64
	LPU83_0948	16S rRNA (guanina(966)-N(2))-metiltransferasa	-2.553034	5.18E-23
	LPU83a_0111	Proteína hipotética	1.3912931	0.0087377
	LPU83a_0119	Proteína con dominio DUF3991	2.7688194	1.25E-29
	LPU83a_0123	Proteína hipotética	1.1406627	0.0299582
	LPU83a_0136	Proteína de la familia de las termonucleasas	1.1685697	1.60E-15
	LPU83a_0137	Proteína hipotética conteniendo dominio WGR	1.7109406	3.34E-41
	LPU83a_0138	<i>traG</i>	3.9858065	1.72E-113
	LPU83a_0139	<i>traD</i>	5.1961643	2.29E-44
	LPU83a_0140	<i>traC</i>	4.512253	6.17E-81
	LPU83a_0141	<i>traA</i>	4.3212498	1.02E-184
	LPU83a_0142	<i>traF</i>	4.6397688	3.02E-13
	LPU83a_0143	<i>traB</i>	3.5660911	2.40E-64
	LPU83a_0144	<i>traH</i>	3.2763558	4.10E-65
	LPU83a_0148	Proteína hipotética	-1.1920125	6.90E-19
	LPU83a_0149	<i>traR</i>	7.7916370	0
	LPU83a_0151	<i>trbI</i>	3.8901769	8.43E-191
	LPU83a_0152	<i>trbH</i>	4.5517781	7.27E-106
	LPU83a_0153	<i>trbG</i>	4.7560465	1.43E-145
	LPU83a_0154	<i>trbF</i>	5.3346104	5.64E-162
	LPU83a_0155	<i>trbL</i>	5.2527145	1.46E-196
	LPU83a_0156	<i>trbK</i>	5.5280214	8.80E-79
	LPU83a_0157	<i>trbJ</i>	5.2813047	0
	LPU83a_0158	<i>trbE</i>	5.7772552	0
	LPU83a_0159	<i>trbD</i>	6.2752695	1.20E-116
	LPU83a_0160	<i>trbC</i>	5.9322896	4.82E-116
	LPU83a_0161	<i>trbB</i>	6.7400132	2.11E-253
	LPU83d_1478	Proteína hipotética	-2.3124249	0.0128330
	LPU83d_1479	Proteína de la familia YcaO-like	-2.4287059	0.0148970
	LPU83d_1480	Toxina	-2.3577469	0.0148970
	LPU83d_1481	Proteína hipotética	-2.866015	0.0056421

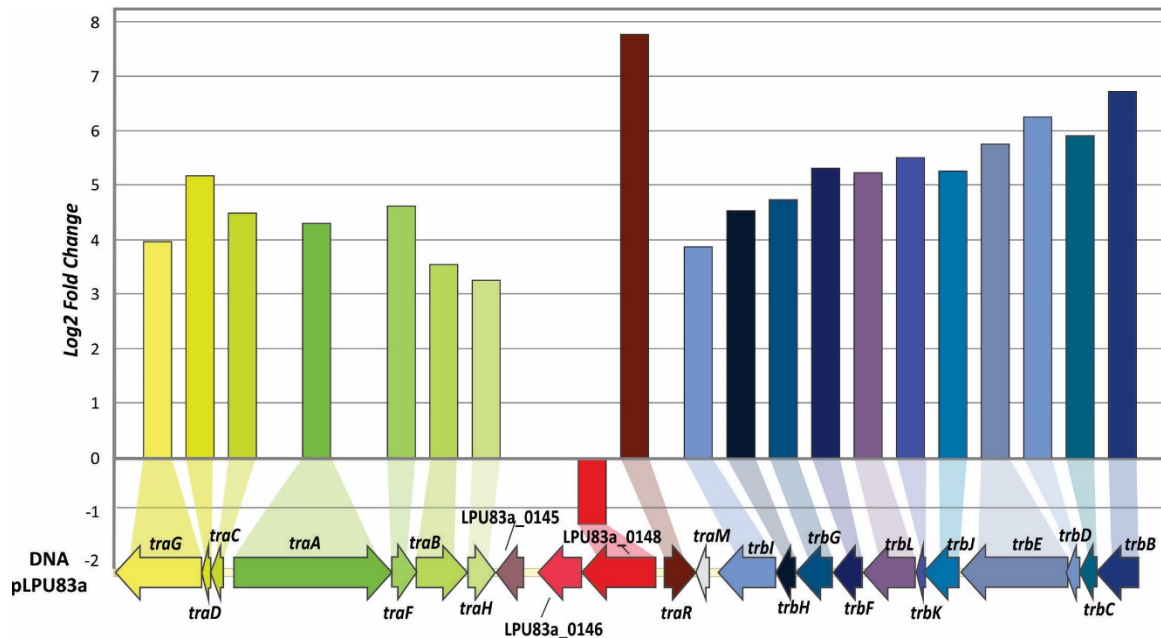


Figura VI.4. Expresión diferencial de genes en la cepa mutante en LPU83a_0146. En la figura se muestran los genes afectados por la delección del gen LPU83a_0146. En el eje Y se grafica el logaritmo en base 2 del *fold change*. En gamas de azules se muestran los genes del Mpf y en gamas de verdes aquellos pertenecientes al Dtr. Los *p-adj* de cada gen se encuentran en la tabla VI.2.

VI.5 Detección de inicios de transcripción de los *clusters* de genes conjugativos

A partir de los datos del secuenciamiento, el programa ReadXplorer es capaz de predecir sitios de inicio de transcripción (TSS, *transcription start sites*) probables. Para obtener un mayor conocimiento acerca de cómo es la expresión de los genes conjugativos, los TSS predichos fueron mapeados en la región de genes conjugativos. A la vez, se analizaron en detalle las lecturas obtenidas para la región *upstream* de cada gen. En la figura VI.5 A se muestra la ubicación de los TSS predichos, y los cambios en los niveles de RNA a lo largo de la región conjugativa (figura VI.5 D a I). A partir de esta información, se realizó un esquema de los mRNA sintetizados a partir de genes conjugativos (figura VI.5 C). Como es posible observar, los genes del Mpf se expresan en una única unidad transcripcional, el operón *trbBCDEJKLFGHI*. Los genes del Dtr se dividen en dos operones, el operón *traCDG* y el operón *traAFBH*. Confirmando los resultados del capítulo IV, LPU83a_0146 y LPU83a_0148 conforman otro operón, mientras que LPU83a_0145 se expresa independientemente. Además, es posible visualizar el inicio de la transcripción probable de *traR* y el de *traM*. Es llamativo que, previo a los codones de inicio predichos para *traR*, LPU83a_0145 y el operón *traCDG* (figura VI.5 E, G y H, respectivamente), se observa un elevado nivel de lecturas que caen abruptamente al comenzar el gen en cuestión. No descartamos que pueda existir algún RNA pequeño en dichas zonas, cuya expresión aumente considerablemente el número de lecturas en dicha región. Otra posible explicación de los elevados niveles de RNA en el inicio de estos mensajeros podría ser la presencia de *riboswitches*, fragmentos de RNA no codificante capaces de formar una estructura secundaria que genere una terminación de la transcripción prematura (o impidan la transcripción del gen al secuestrar la secuencia Shine-Dalgarno), permitiendo la síntesis de pequeños fragmentos del mensajero (Nudler & Mironov, 2004). Este tipo de regulación ha sido descrita en varios microorganismos, incluso en rizobios. En *R. etli*, se describió que la regulación del operón que codifica para la síntesis de timina es regulado, en parte, por una secuencia de RNA (propia del mismo transcripto) que adopta una conformación que bloquea la transcripción en presencia de timina (Miranda-Rios *et al.*, 2001).

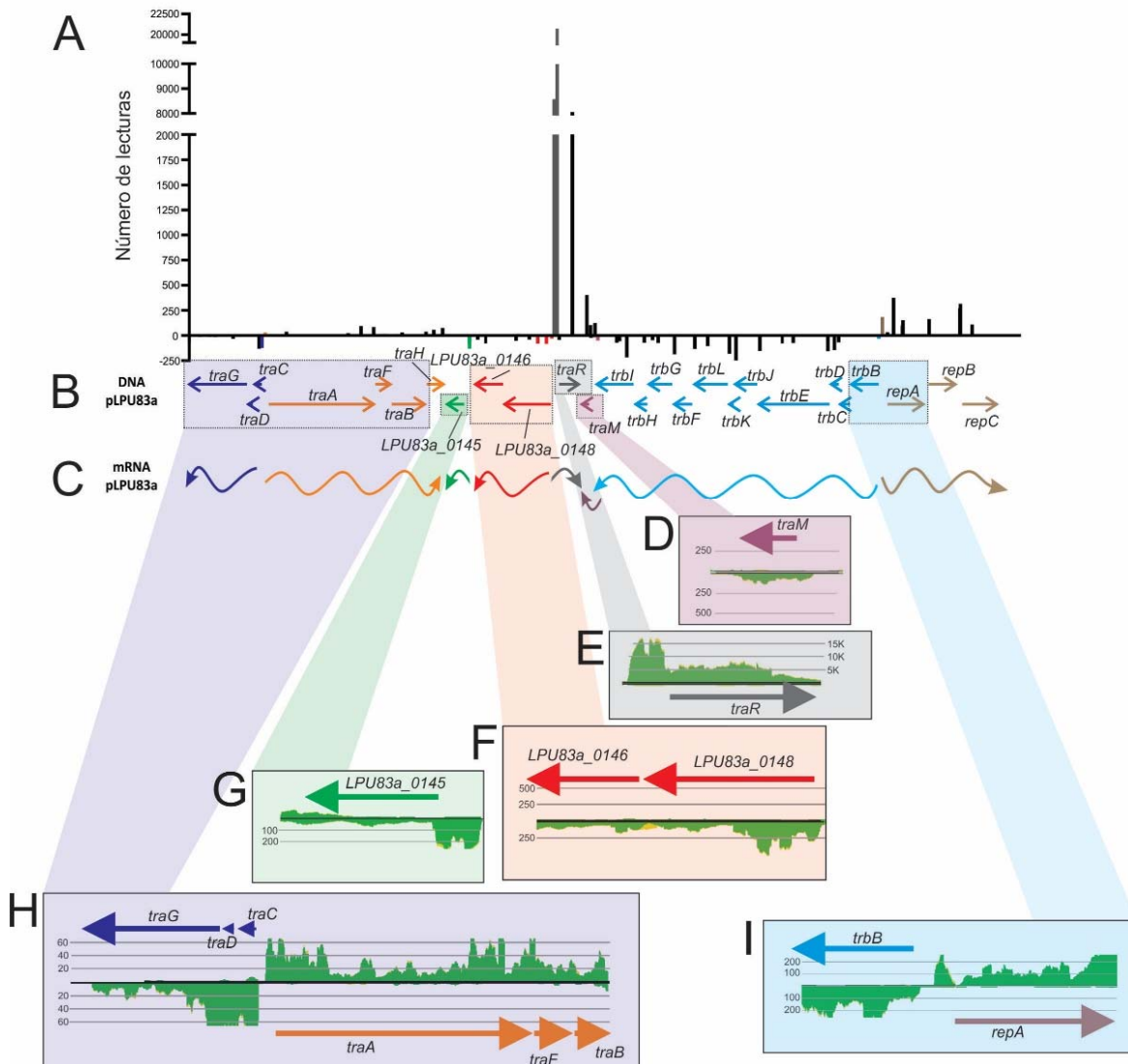


Figura VI.5. Detección de TSS en la región conjugativa de pLPU83a. **A.** Número de lecturas mapeadas para cada TSS predicho (utilizando las lecturas obtenidas del mutante en LPU83a_0146). **B.** Organización a nivel DNA de los genes involucrados en conjugación. **C.** Probable organización a nivel RNA de los genes involucrados en conjugación. **D-I.** Lecturas correspondientes al inicio de transcripción del gen u operón *traM* (**D**), *traR* (**E**), LPU83a_0146/LPU83a_0148 (**F**), LPU83a_0145 (**G**), *traCDG* y *traAFBH* (**H**) y *trbBCDEJKLFGHI* y *repABC* (**I**).

VI.6 Correlación entre los datos transcriptómicos y el fenotipo de los mutantes

En el caso de la cepa mutante en LPU83a_0145, la cual no mostró un fenotipo conjugativo diferente a la cepa salvaje, tampoco fue posible encontrar genes diferencialmente expresados.

En el análisis del mutante en LPU83a_0148, fue posible encontrar unos pocos genes expresados diferencialmente, ubicados en diferentes sectores del genoma. Dado que ninguno de ellos se relaciona directamente con genes ya conocidos del proceso conjugativo, ni ha sido estudiado previamente, queda abierto el interrogante sobre si el gen LPU83a_0148 codifica una proteína involucrada en la regulación de la conjugación (mediante un mecanismo que no afecta los niveles de expresión de genes conjugativos), o si su función está ligada a un aspecto más estructural de la transferencia plasmídica.

El mutante en LPU83a_0146 presentó la relación más notoria entre el fenotipo observado y los datos arrojados por el secuenciamiento de RNA. Como ya se mencionó, dicho mutante mostró un fenotipo con mayores frecuencias conjugativas que el plásmido salvaje, lo que puede ser correlacionado con el aumento en la expresión de genes conjugativos. Cuando el plásmido posee una copia intacta del gen, la expresión de los genes necesarios para la conjugación se encuentra disminuida. En la cepa delecionada en LPU83a_0146, los genes conjugativos se encuentran más expresados. Por ende, la ausencia de la proteína LPU83a_0146 permite que la cepa produzca mayor cantidad de mensajeros, los cuales aportarían a la célula una mayor cantidad de proteínas involucradas en la conjugación, dando como resultado mayores frecuencias de transferencia del plásmido. Además de los genes involucrados en conjugación, el mutante en LPU83a_0146 mostró algunos otros genes con una expresión diferencial. Sin embargo, es necesario profundizar el estudio de los mismos para determinar si son parte del circuito regulatorio de la conjugación, o si son regulados por LPU83a_0146 como parte de otro sistema regulatorio.

En este capítulo se llevaron a cabo estudios metabolómicos y transcriptómicos de mutantes en los tres genes seleccionados del plásmido pLPU83a. Mientras que el análisis metabolómico no arrojó evidencia acerca de la función de alguno de los tres genes, el análisis transcriptómico mostró cambios en los niveles de expresión de algunos genes en cada condición. En particular, se observó que el mutante en el gen LPU83a_0146 presentaba mayores niveles de mRNAs de los genes involucrados en la conjugación de pLPU83a, confirmando que dicho gen era partícipe de la regulación de este proceso. Además, en los mutantes en LPU83a_0146 y LPU83a_0148 se observaron cambios en la expresión de otros genes, que todavía deben ser estudiados. En el siguiente capítulo, con el objetivo de dilucidar el mecanismo regulatorio de la transferencia del plásmido pLPU83a, y de qué manera el mismo se ve afectado por los genes en estudio, plantearemos diversos modelos de funcionamiento y realizaremos diversas técnicas de biología molecular para aclarar dicho mecanismo.

Capítulo VII. Aproximaciones
para comprender el
mecanismo de acción de
LPU83a_0146 y LPU83a_0148.

VII.1 Introducción

Como se ha descrito en capítulos anteriores, la regulación de la conjugación puede darse por mecanismos muy diversos. En rizobios, particularmente, el proceso conjugativo puede responder a dos mecanismos principales, *quorum sensing* (Cha *et al.*, 1998, Tun-Garrido *et al.*, 2003) y *rctA/rctB* (Pérez-Mendoza *et al.*, 2005, Sepúlveda *et al.*, 2008). En estos casos, la regulación se da por la unión de proteínas a secuencias de DNA, permitiendo la expresión o inhibición de otros genes. La afinidad de dichas proteínas a la región de DNA a la que se unen puede verse afectada por la presencia de diferentes moléculas señal u otras proteínas. Como ejemplos pueden destacarse las acil homoserina lactonas que se unen a TraR para inducir la conjugación en sistemas de QS, o la proteína TraM, que se une a TraR inhibiendo el proceso conjugativo (Hwang *et al.*, 1999), o la señal molecular aún desconocida, cuyo efecto finaliza con la represión en el sistema *rctA/rctB* (ver detalles en sección I.6) (Pérez-Mendoza *et al.*, 2005, Nogales *et al.*, 2013). Sin embargo, en plásmidos pertenecientes a bacterias de otros géneros se han descrito otros mecanismos regulatorios (ver sección I.6). Además de las interacciones DNA-proteína y proteína-proteína, o la interacción de estos elementos con moléculas señal, las diferencias en las frecuencias conjugativas pueden deberse a mecanismos relacionados a la estabilidad plasmídica o la localización de los plásmidos dentro de las células. Guynet *et al.* (2011) describieron un gen del plásmido R388, involucrado en la estabilidad del mismo, cuya ausencia genera aumentos en las frecuencias conjugativas debido a la relocalización de los plásmidos en los polos de la célula. En el mismo trabajo, se observó que la ausencia de otro gen genera un fenotipo no conjugativo, al no poder transportar los plásmidos hacia los polos de la célula.

En capítulos previos, hemos identificado dos genes hipotéticos presentes en el plásmido pLPU83a de *R. favelukesii* LPU83, ubicados entre las regiones Dtr y Mpf de dicho plásmido, y hemos demostrado su relevancia en el proceso conjugativo. En particular, comprobamos que el gen LPU83a_0148 es esencial para que la conjugación ocurra, mientras que el gen LPU83a_0146 actúa como un inactivador. Más específicamente, mediante ensayos transcriptómicos encontramos que la inhibición mediada por LPU83a_0146 es llevada a cabo alterando niveles transcripcionales, mientras que la ausencia de LPU83a_0148 no afecta los niveles de transcritos. Además de la función de LPU83a_0146 y LPU83a_0148, hemos caracterizado un tercer gen, LPU83a_0145, el cual no parece estar relacionado con la conjugación de pLPU83a desde su propio entorno, pero podría afectar el proceso desde otros. En este capítulo, intentaremos abordar el mecanismo mediante el cual las proteínas codificadas por LPU83a_0146 y LPU83a_0148 afectan el proceso conjugativo.

VII.2 Estabilidad de los plásmidos mutantes

En un trabajo realizado por Guynet *et al.* (2011), se identificaron tres genes codificados en un mismo operón (*stbABC*), localizados adyacentemente al origen de transferencia del plásmido R388 de *E. coli*. Al delecionar cada uno de los genes, se observó que la ausencia de *stbA* incrementa la frecuencia conjugativa, mientras que la delección de *stbB* genera un fenotipo no conjugativo. La delección del *stbC* no presentó diferencias en el fenotipo conjugativo. Al avanzar en la caracterización de los dos genes involucrados en la conjugación, observaron que *stbA* está involucrado en la estabilidad del plásmido, ya que los plásmidos mutantes eran inestables a lo largo de sucesivas generaciones, y que *stbB* tiene una función relacionada con el transporte del plásmido hacia los polos de la célula, siendo los fenotipos conjugativos observados consecuencia de la falta de estas funciones. Si bien las proteínas analizadas en el trabajo mencionado no tienen similitud con las codificadas por LPU83a_0145, LPU83a_0146 y LPU83a_0148, la ubicación en tándem y la similitud en los fenotipos presentados permitía imaginar una función similar en ambos organismos. De este modo, la ausencia de LPU83a_0148 podría resultar en la pérdida del plásmido, llevando a un

fenotipo no conjugativo, mientras que la ausencia de LPU83a_0146 podría localizar al plásmido en los polos de la célula, resultando en una mayor conjugación pero una menor estabilidad. Para evaluar si alguno de los genes de pLPU83a estaba involucrado en la estabilidad del plásmido, se llevó a cabo un experimento de estabilidad plasmídica utilizando el plásmido salvaje y cada uno de los mutantes. Para ello, se adaptó la técnica descrita por Pistorio *et al.* (2002). Se inocularon cultivos sin antibiótico de cada cepa y, luego de 40 generaciones, se evaluó la pérdida del plásmido. Como es posible observar en la figura VII.1, ninguna de las deleciones generó diferencias significativas en la estabilidad del plásmido, ya que se obtuvieron valores de estabilidad similares para cada cepa.

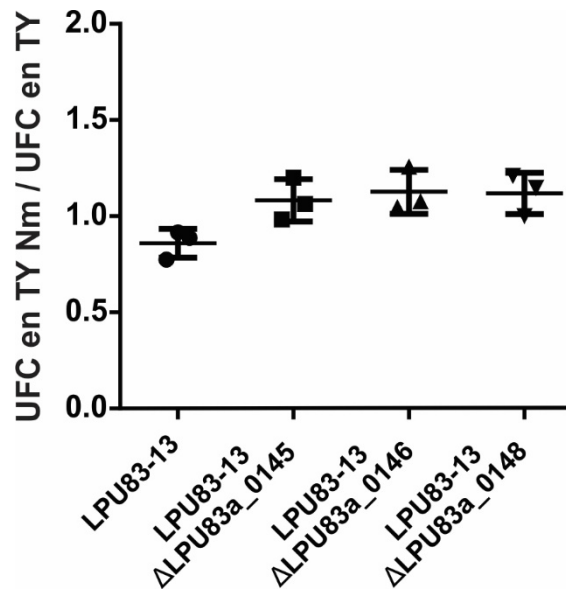


Figura VII.1 Estabilidad del plásmido pLPU83a y sus derivados mutantes. Se muestra el cociente entre el recuento de las UFC en medio suplementado con antibiótico y medio sin antibiótico obtenidas para cada cepa, luego de 40 generaciones. El análisis estadístico mediante ANOVA y el test de comparaciones múltiples de Tukey no arrojó diferencias significativas al comparar entre cada cepa ($p > 0.05$).

VII.3 Efecto de la delección de *traMa*

Como se mencionó previamente, el gen *traM* codifica una proteína que usualmente está involucrada en la represión de la conjugación. En los sistemas descriptos, dímeros de TraM se unen a dímeros de TraR, impidiendo la unión de este último a las cajas *tra* del DNA (Chen *et al.*, 2007). La incapacidad de TraR de unirse al DNA genera la disminución de la expresión de genes conjugativos. Dado que la proteína codificada por LPU83a_0146 genera una disminución de la expresión de los genes *tra/trb*, nos preguntamos si el efecto de esta proteína podía estar ligado a la función de TraM, interaccionando con ella en la unión a TraR o generando un complejo más estable. Para abordar esta hipótesis, se generaron mutantes delecionales del gen *traM* localizado en pLPU83a (de ahora en adelante, *traMa*) en la cepa salvaje y en la cepa delecionada en LPU83a_0146, y se analizó la frecuencia conjugativa de ambas cepas. Llamativamente, la delección de *traMa* no mostró un aumento de la frecuencia conjugativa de pLPU83a salvaje, y tampoco modificó la del mutante en LPU83a_0146 (figura VII.2), demostrando que la proteína codificada por *traMa* no sería funcional en el sistema estudiado. Los resultados obtenidos permiten descartar, también, la posibilidad de una interacción entre TraMa y LPU83a_0146.

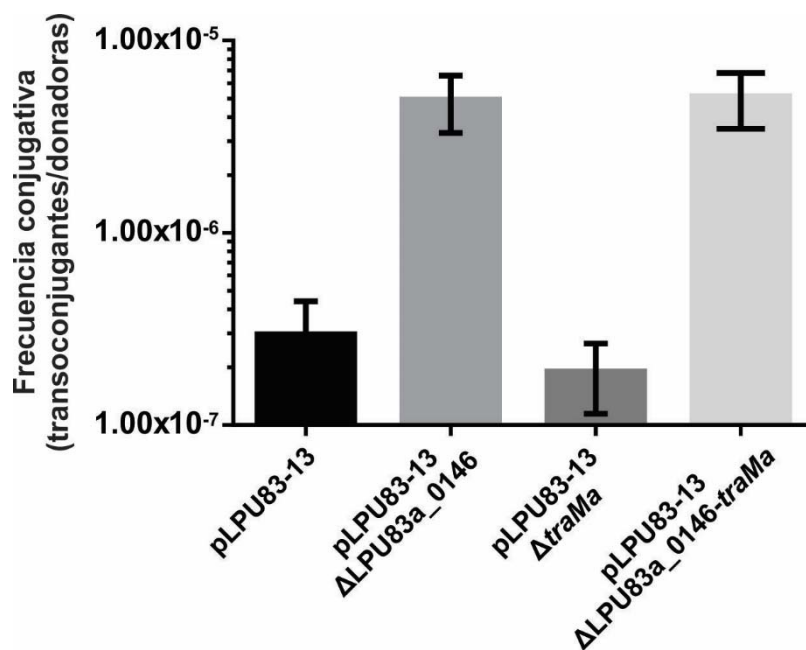


Figura VII.2. Efecto de la delección de *traMa* sobre las cepas salvaje y mutante en LPU83a_0146. Se muestran las frecuencias conjugativas obtenidas para la cepa mutante en *traMa* y doble mutante LPU83a_0146-*traMa*. El análisis estadístico mediante ANOVA no arrojó diferencias significativas entre la cepa salvaje y la mutante en *traMa*, como así tampoco entre la cepa mutante en LPU83a_0146 y la doble mutante LPU83a_0146-*traMa*.

VII.4 Efecto de la delección de *traR*

Como se demostró en trabajos previos, la expresión de *traR* es necesaria para la transferencia del plásmido pLPU83a desde su propio entorno (Torres Tejerizo *et al.*, 2014). Sin embargo, la ausencia de transconjugantes podría ser explicada mediante una disminución en los niveles de expresión de genes conjugativos generada por la ausencia del regulador transcripcional que las induce. Dado que previamente se comprobó que la ausencia de LPU83a_0146 se traduce en aumentos de los niveles de transcritos de genes conjugativos, nos preguntamos si una cepa con delecciones en LPU83a_0146 y en *traR* podría mostrar un fenotipo conjugativo, al elevar los niveles de expresión de genes conjugativos independientemente de *traR*. El estudio de la cepa mutada en ambos genes mostró que se comporta de la misma manera que la cepa mutante en *traR*, ya que no fue posible observar transconjugantes. De esta forma, se confirmó la importancia de *traR* para la transferencia del plásmido pLPU83a. Al mismo tiempo, los resultados obtenidos permiten pensar en una función de LPU83a_0146 relacionada a la modulación de TraR, ya sea interaccionando con la proteína como lo hace TraM en algunos sistemas de QS, o interfiriendo en su expresión mediante el bloqueo del promotor de *traR*, como ocurre en los sistemas *rctA/rctB*. Tampoco puede ser descartada la participación de LPU83a_0146 en la producción de una molécula inhibidora de la conjugación, como ocurre en algunos sistemas de bacterias Gram positivas.

VII.5 Ensayos de interacción entre LPU83a_0146 y la región intergénica entre *traR* y LPU83a_0148

Con los resultados obtenidos hasta el momento, confirmamos que el gen LPU83a_0146 codifica una proteína que reprime la conjugación del plásmido pLPU83a, mediante la disminución de la expresión de genes conjugativos. Al mismo tiempo, sabemos que dicho comportamiento sólo es posible en presencia de TraR, ya que un doble mutante ΔLPU83a_0146-Δ*traR* no es capaz de conjugar. En los estudios transcriptómicos realizados, se observó, justamente, que el principal

afectado en presencia de LPU83a_0146 es *traR*, ya que es el gen con la mayor expresión diferencial en la cepa mutante. De este modo, una opción posible es suponer al producto de LPU83a_0146 como una proteína que, de manera directa o indirecta, interfiere en la transcripción del gen *traR*. Como resultado, *traR* se expresaría en bajas cantidades, disminuyendo la expresión de genes conjugativos. Para abordar esta hipótesis, se diseñaron diferentes ensayos incluyendo al gen de la GFP como gen reportero. En primer lugar, construimos un vector conteniendo al gen de la GFP bajo la expresión del promotor *lac*, y en el mismo clonamos la región intergénica presente entre los genes *traR* y LPU83a_0148, obteniendo una construcción *plac*-región intergénica-GFP. Un esquema de la construcción realizada para este ensayo puede observarse en la figura VII.3 A. Dicha construcción fue introducida en *E. coli* DH5 α , para evaluar la expresión de la GFP en presencia y ausencia de un plásmido expresando la proteína codificada por LPU83a_0146 (pBBR1MCS-5::LPU83a_0146). En las figuras VII.3 B y C se muestran los modelos que explican el funcionamiento del ensayo, en base a la hipótesis propuesta previamente.

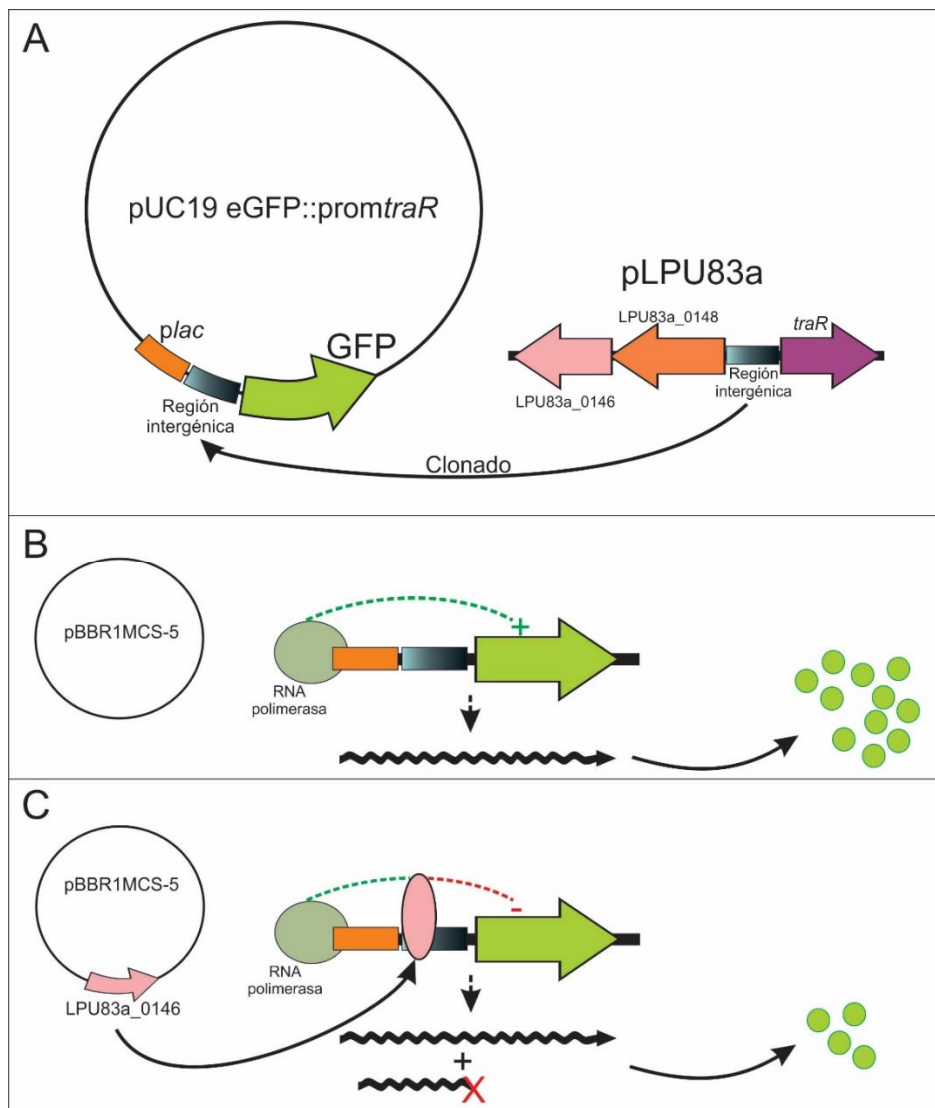


Figura VII.3. Esquema del ensayo de interferencia transcripcional mediada por LPU83a_0146. A. Esquema de la construcción realizada para evaluar la expresión de la proteína GFP. B y C. Modelos del comportamiento esperado de la construcción realizada en presencia de los plásmidos pBBR1MCS-5 vacío (B) y pBBR1MCS-5::LPU83a_0146 (C).

La expresión de la proteína GFP se evaluó mediante la cuantificación de la fluorescencia en presencia de cada plásmido. Como controles, se evaluaron la expresión de la GFP en ausencia de la región intergénica clonada entre dicha proteína y el promotor *lac*, y la expresión de la GFP de la construcción realizada, en presencia del plásmido pBBR1MCS-5 vacío. Los resultados obtenidos (figura VII.4) evidencian que la expresión del gen LPU83a_0146 genera una interferencia en la expresión de GFP, mostrando niveles inferiores de fluorescencia que el resto de las construcciones. El modelo propuesto para esta interacción se ajustaría al mostrado en la figura VII.3 C, en donde la proteína codificada por LPU83a_0146 interaccionaría con un segmento de la región intergénica de los genes *traR* y LPU83a_0148, generando una interferencia que deriva en una disminución de la expresión del gen ubicado *downstream*. En el plásmido pLPU83a, el gen ubicado *downstream* a la región estudiada es *traR*, por lo que, en nuestro sistema de estudio, la proteína codificada por LPU83a_0146 generaría una interferencia en la expresión de *traR*, reprimiendo la conjugación.

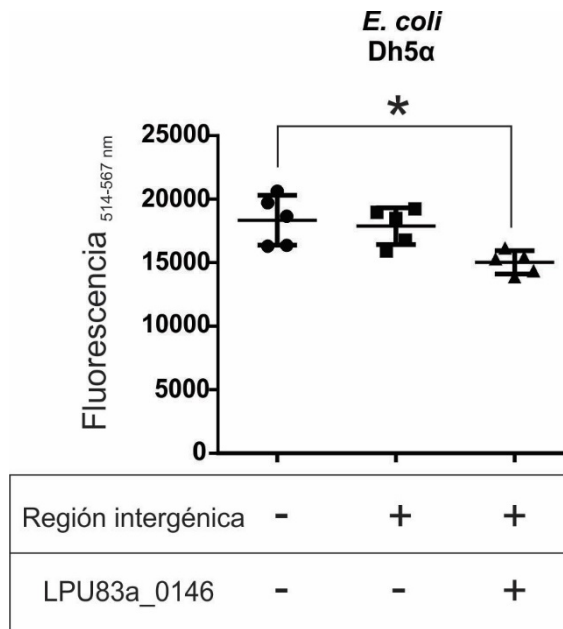


Figura VII.4. Resultados del ensayo de interferencia transcripcional mediada por LPU83a_0146. Se muestran los valores de fluorescencia obtenidos en cepas de *E. coli* que contenían el vector pUC19 que expresa la GFP (conteniendo o no la región intergénica, + y - correspondientes) y la expresión, o no, de LPU83a_0146 desde un pBBR1MCS-5 (+ y -, respectivamente). El símbolo * expresa una diferencia estadísticamente significativa mediante el test t de Student ($p < 0.05$).

Para evaluar cómo varía la expresión del gen *traR* en respuesta a la interacción entre la proteína codificada por LPU83a_0146 y la región intergénica analizada previamente, generamos una fusión transcripcional entre la misma región intergénica utilizada en el ensayo anterior y la proteína GFP, utilizando el plásmido para fusiones transcripcionales pHU231 (McIntosh *et al.*, 2008). La expresión de dicha proteína fue evaluada en el entorno de *R. favelukesii* LPU83 Δ LPU83a_0146 y en *A. tumefaciens* UBAPF2, en presencia de los plásmidos pBBR1MCS-5 vacío, pBBR1MCS-5::LPU83a_0146 y pBBR1MCS-5::*traR*. Suponíamos que en el entorno *R. favelukesii* LPU83 Δ LPU83a_0146, en el cual se libera la represión de *traR*, la expresión de nuestra fusión debería ser elevada. A su vez, evaluar el sistema con el plásmido pBBR1MCS-5::LPU83a_0146 nos permitiría determinar si la presencia de LPU83a_0146 es suficiente para reprimir la actividad del promotor de *traR*, o si es necesaria la presencia de otro elemento codificado en *R. favelukesii* LPU83. Además, pBBR1MCS-5::*traR* nos proporcionaría un control positivo de la inducción. En la figura VII.5 se muestra un esquema del modelo propuesto para este ensayo.

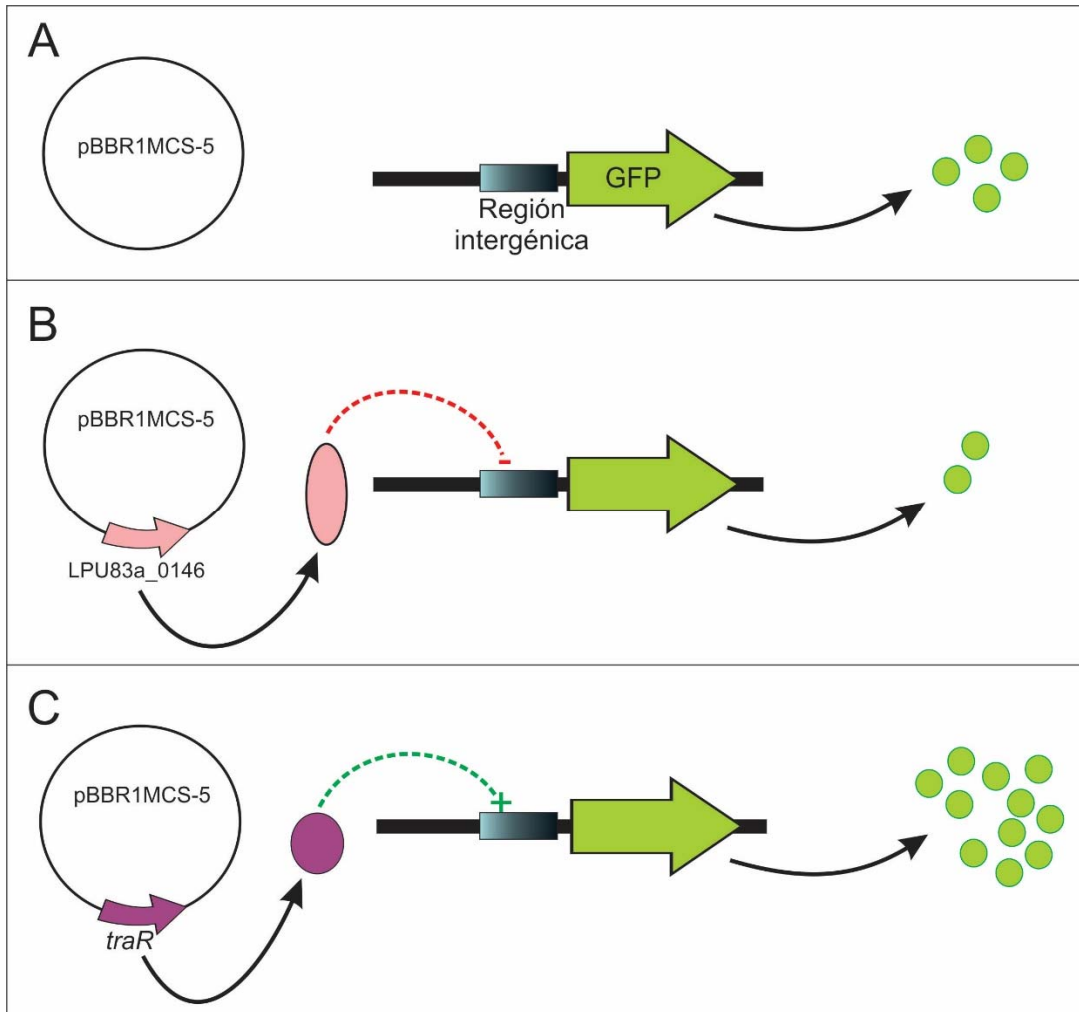


Figura VII.5. Esquema del ensayo diseñado para evaluar la actividad de la región promotora del gen *traR*. Modelos del comportamiento esperado de la fusión transcripcional construida en presencia de los plásmidos pBBR1MCS-5 vacío (A), pBBR1MCS-5::LPU83a_0146 (B) y pBBR1MCS-5::traR (C).

La evaluación del sistema reportero en el entorno de *R. favelukesii* LPU83 Δ LPU83a_0146 (figura VII.6 A) arrojó valores de fluorescencia similares para todas las construcciones. El hecho de no haber observado diferencias significativas entre las construcciones con y sin promotor implica que esta fusión transcripcional no está funcionando en el entorno analizado. Al mismo tiempo, sabiendo que la proteína codificada por *traR* es capaz de unirse a su promotor, generando un *loop* de retroalimentación positiva, hubiéramos esperado un incremento de la fluorescencia en presencia de *traR*, lo que no se observó. Probablemente, tanto la membrana celular como el EPS producido por la cepa puedan estar enmascarando la fluorescencia producida, aunque también existe la posibilidad de que la región intergénica utilizada para la fusión transcripcional no sea suficiente para permitir la expresión del gen reportero en este entorno.

Al evaluar el sistema en el entorno de *A. tumefaciens* UBAPF2 (figura VII.6 B), observamos que la fluorescencia de la fusión transcripcional a la región intergénica aumenta en comparación con la obtenida para el vector sin región promotora, confirmando la expresión del gen reportero en este sistema. La presencia de *traR* mostró un aumento estadísticamente significativo de la fluorescencia. Estos resultados indican que el sistema reportero es funcional en el entorno de *A. tumefaciens* UBAPF2, y que *traR* es capaz de estimular su propia transcripción. Sin embargo, la sola

presencia de LPU83a_0146 en este entorno no es capaz de disminuir la expresión de la fusión transcripcional.

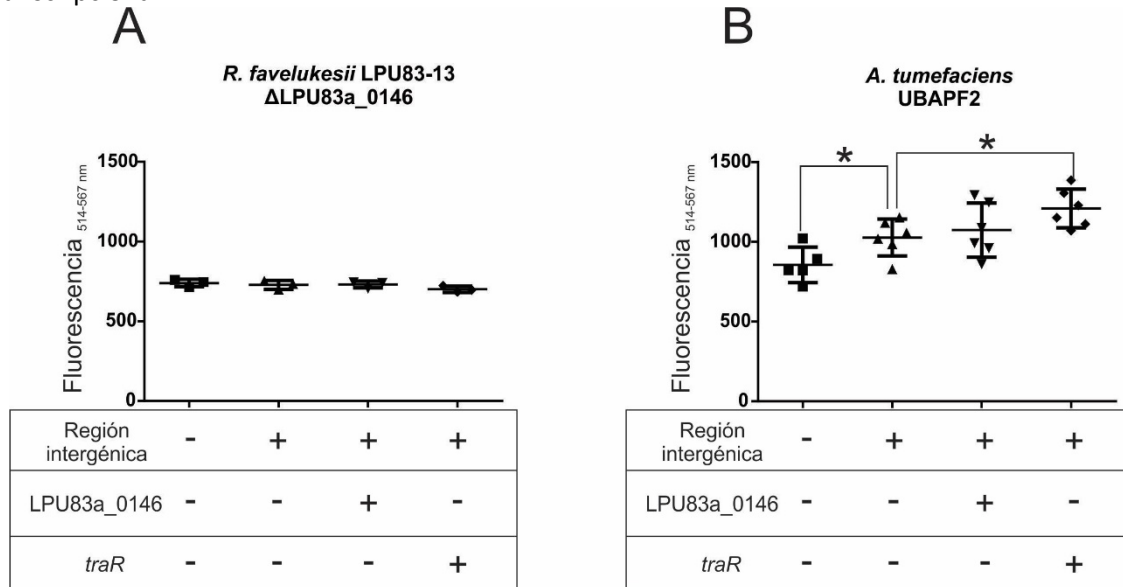


Figura VII.6. Resultados de los ensayos utilizando la fusión transcripcional entre la región promotora de *traR* y el gen que codifica la GFP. Valores de fluorescencia obtenidos en el entorno de (A) *R. favelukesii* LPU83 Δ LPU83a_0146 y (B) *A. tumefaciens* UBAPF2 para el vector pHU231 que expresa la GFP (conteniendo o no la región intergénica, + y -, respectivamente) y la expresión, o no, de LPU83a_0146 o *traR* desde un pBBR1MCS-5 (+ y -, respectivamente). El símbolo * expresa una diferencia estadísticamente significativa mediante el test t de Student ($p < 0.05$).

VII.6 Localización celular de LPU83a_0145, LPU83a_0146 y LPU83a_0148

Con el objetivo de obtener información que nos permitiera profundizar el conocimiento sobre la posible función de los genes LPU83a_0146 y LPU83a_0148, diseñamos construcciones que nos permitieran visualizar la localización celular de las proteínas codificadas por ambos genes. Dentro del análisis, también incluimos a la proteína codificada por LPU83a_0145, ya que también es una proteína hipotética cuya función es desconocida. Para esto, generamos fusiones traduccionales de cada uno de los genes a His-tag y a la proteína GFP, con el objetivo de estudiar la localización mediante *western-blot* y microscopía de fluorescencia, respectivamente. Para la construcción de las fusiones a GFP, se utilizó la técnica de *crossover*-PCR descrita por Sukdeo & Charles (2003), diseñando *primers* con regiones de solapamiento entre el extremo C terminal de los genes seleccionados y el extremo N terminal de la GFP. Además, se introdujo entre las secuencias de los dos genes a fusionar una secuencia codificando un conector aminoacídico flexible, descrito por Chen *et al.* (2013). En el caso de la fusión a His-tag, la secuencia codificando los seis residuos de histidina se agregó en los *primers* que hibridan con la región C terminal de cada gen. Una vez obtenidos todos los fragmentos, se clonaron en el mismo vector utilizado para la complementación de los mutantes (pBBR1MCS-5). Luego, los vectores generados fueron introducidos en las cepas mutantes correspondientes para corroborar la funcionalidad de cada construcción mediante ensayos de complementación. Como se observa en la figura VII.7, la presencia tanto de las fusiones a His-tag como a GFP fueron capaces de restablecer el fenotipo salvaje en las cepas mutantes en LPU83a_0146 y LPU83a_0148, confirmando que las proteínas expresadas llevan a cabo su función correctamente.

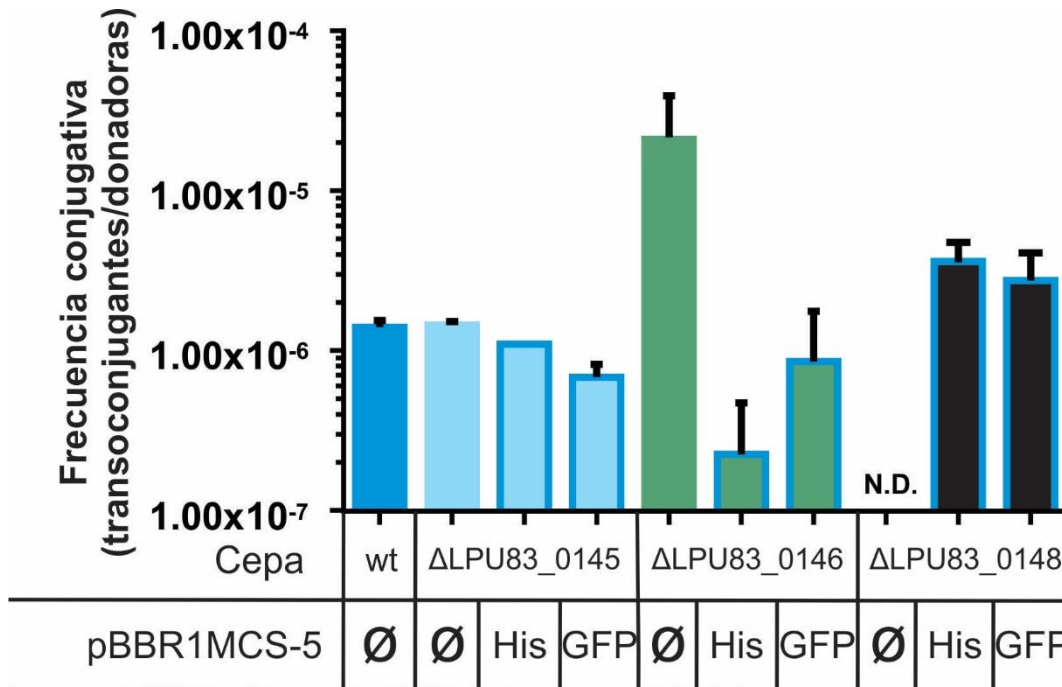


Figura VII.7. Ensayo de complementación utilizando las fusiones a His-tag y GFP. Se muestran las frecuencias conjugativas correspondientes a las cepas mutantes complementadas con los genes correspondientes fusionados a His-tag y GFP. En la tabla inferior se detalla la cepa utilizada y la construcción introducida en la misma. wt significa cepa salvaje. El símbolo ∅ significa plásmido vacío.

VII.6.a. Ensayos de localización celular mediante *western-blot*

Con el objetivo de comprender en qué fracción de proteínas era posible purificar los productos de LPU83a_0145, LPU83a_0146 y LPU83a_0148, se realizaron purificaciones de proteínas de cultivos de cada cepa conteniendo las fusiones a His-Tag, y se realizó un ensayo de *western blot* sobre cada fracción, utilizando un anticuerpo anti-His. Estos ensayos presentaron dificultades durante el revelado, por lo que decidimos llevar a cabo nuevos ensayos utilizando las fusiones a GFP, usando los anticuerpos anti-GFP. Luego de cuantificar y corroborar la correcta purificación de las fracciones proteicas obtenidas para cada cepa (figura VII.8 A), realizamos el ensayo de *western-blot*. Como se observa en la figura VII.8 B, la proteína GFP libre (26.95 KDa) mostró señal en la fracción citosólica y en la de membrana, al igual que la fusión a la proteína codificada por LPU83a_146 (64.57 KDa). La proteína codificada por LPU83a_0145 (49.98 Kda) se localizó en la fracción de membrana, aunque con baja intensidad. Para la fusión a la proteína codificada por LPU83a_0148 (89.55 KDa), observamos una banda en la fracción de proteínas de membrana, aunque con un peso molecular del doble del esperado. Este resultado podría indicar que la proteína se encuentra en una forma oligomérica, y que las condiciones del ensayo no fueron adecuadas para separarla en monómeros. Igualmente, sólo se detectó en la fracción de membrana. Vale destacar que parece haber un arrastre de proteínas desde la fracción citosólica a la fracción de membrana, evidenciado principalmente por la aparición de GFP en membranas.

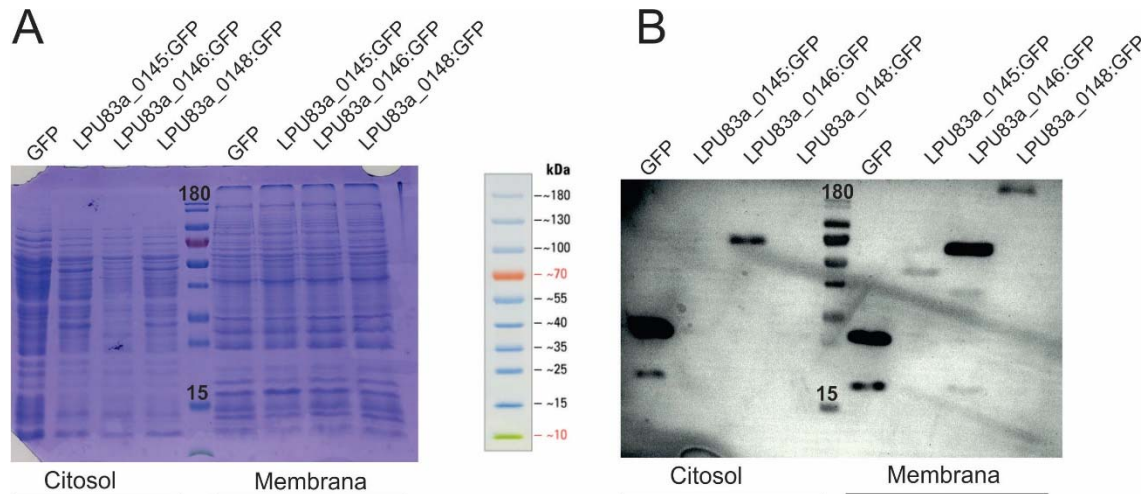


Figura VII.8. Extracción de fracciones proteicas y ensayo de localización celular mediante *western-blot*. A. SDS-PAGE de las fracciones proteicas de *R. favelukesii* LPU83 conteniendo fusiones a GFP. B. Ensayo de *western-blot* sobre las fracciones proteicas de *R. favelukesii* LPU83 conteniendo fusiones a GFP, detectadas con el anticuerpo primario GFP antibody [3H9] (Chromotek).

VII.6.b. Ensayos de localización celular mediante microscopía de fluorescencia

Continuando con el estudio de la localización celular de las proteínas, analizamos las células conteniendo las fusiones a GFP mediante microscopía de fluorescencia. En primer lugar, utilizamos las construcciones junto a una sonda comercial que se une específicamente a membranas (*FM™ 4-64 Dye*), permitiendo la localización de las mismas. Como se observa en la figura VII.9 K, la proteína codificada por LPU83a_0145 tiene una localización citoplasmática. Dicho resultado es opuesto al observado en el ensayo de *western-blot*, en donde posiblemente ocurrió un arrastre de proteínas desde la fracción citosólica a la fracción de membrana. Llamativamente, en ese caso no se observó ninguna señal en la fracción citosólica. El caso de la proteína LPU83a_0146 es más complejo, ya que su distribución no es homogénea, pudiendo ubicarse en los polos de la célula, co-localizando con la membrana (figura VII.9 M), o distribuida en el citosol (figuras 7.9 L y N). Para el producto del gen LPU83a_0148, observamos la co-localización con la sonda de membrana (figura VII.9 O). Los resultados obtenidos a partir de los ensayos de microscopía de fluorescencia confirman los datos obtenidos en los ensayos de *western-blot*.

Dada la organización en operón de los genes LPU83a_0146 y LPU83a_0148, evaluamos la posibilidad de una función conjunta y, por ende, de una co-localización entre los productos de ambos genes. Para ello, generamos una fusión traduccional entre LPU83a_0146 y la proteína mCherry. Luego de comprobar su funcionalidad mediante un ensayo de complementación como se describió en la sección VII.6, construimos una cepa conteniendo las fusiones LPU83a_0146::mCherry y LPU83a_0148::GFP para evaluar la localización de ambas proteínas en un mismo sistema. Las imágenes obtenidas se muestran en la figura VII.10. Como es posible observar en la figura VII.10 L, la cepa conteniendo ambas fusiones mostró una localización citoplasmática para la proteína codificada por LPU83a_0146 (similar a la proteína GFP libre mostrada en la figura VII.10 J) y una distribución en la membrana para la proteína codificada por LPU83a_0148, demostrando que las mismas no co-localizan dentro de la célula. Si bien no hay co-localización específica, no podemos descartar que puedan interactuar en cierta proporción.

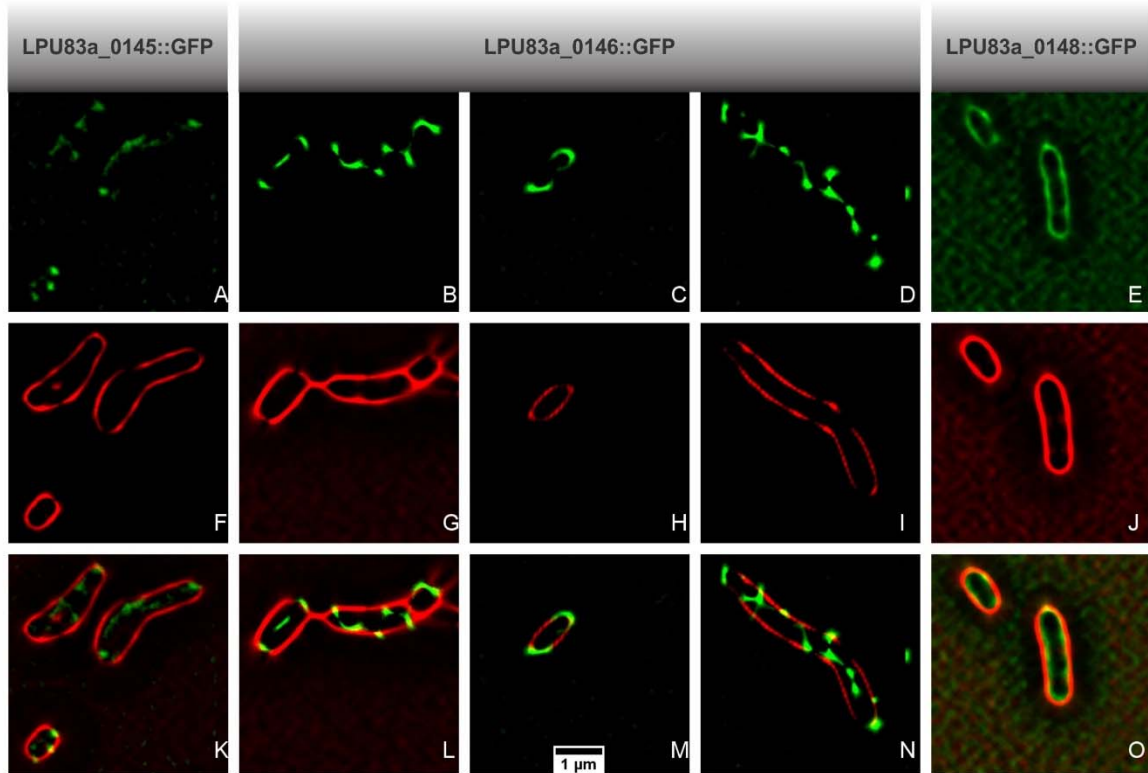


Figura VII.9. Ensayo de localización celular mediante microscopía de fluorescencia. Se muestran las imágenes obtenidas con el microscopio ONI Nanoimager S. La primera fila (A, B, C, D y E) corresponde a la excitación con láser de 473 nm (excitación de GFP). La segunda fila (F, G, H, I y J) corresponde a la excitación con láser de 561 nm (excitación de sonda de membrana FM4-64). La tercera fila (K, L, M, N y O) muestra la combinación entre los campos mencionados previamente. La escala mostrada es la misma para todas las imágenes.

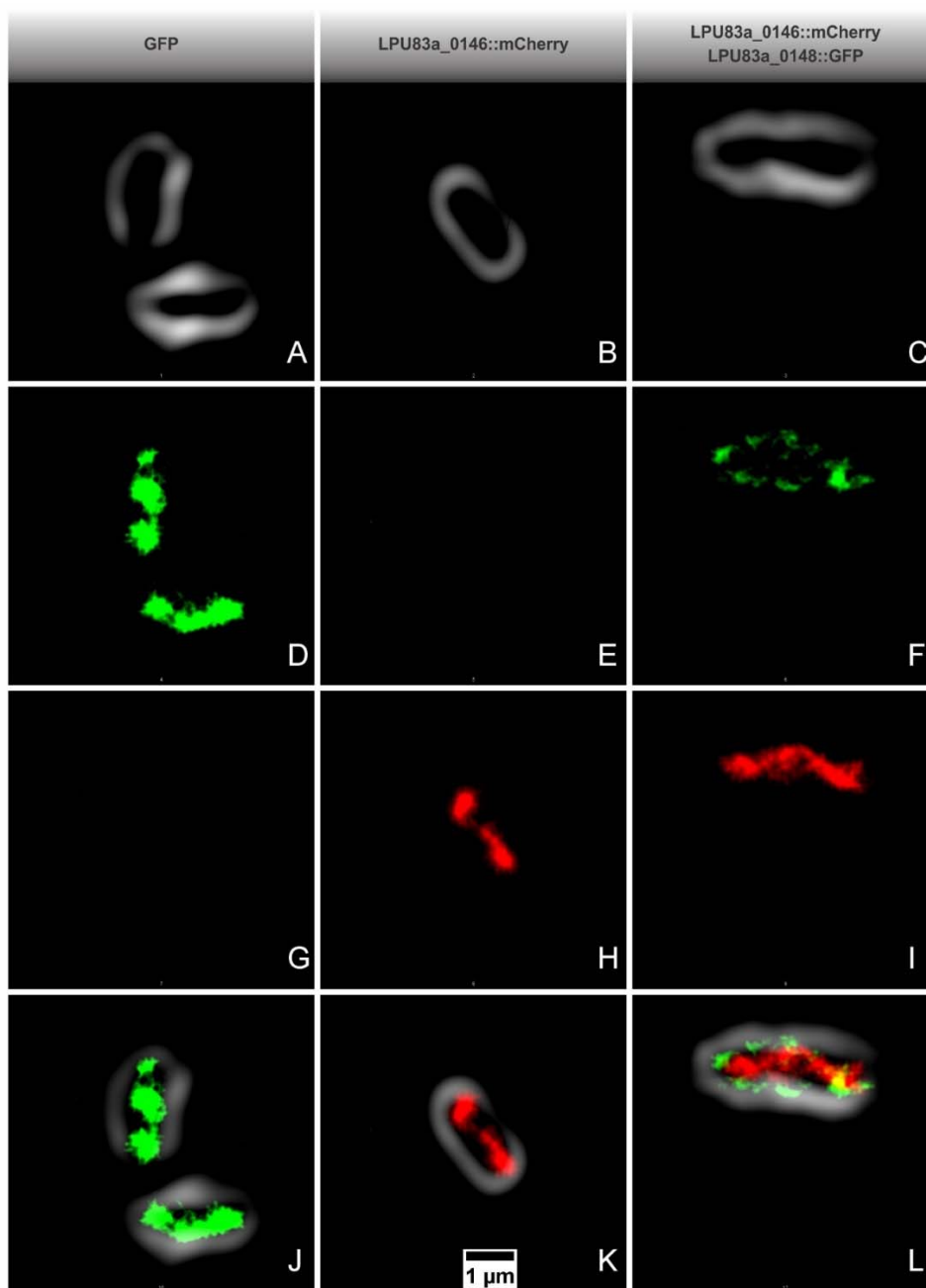


Figura VII.10. Ensayo de co-localización de las proteínas codificadas por LPU83a_0146 y LPU83a_0148 mediante microscopía de fluorescencia. Se muestran las imágenes de súper-resolución obtenidas mediante un microscopio TIRF Olympus Invertido IX81. El halo blanco difuso corresponde al borde de la célula capturado desde el campo claro. La escala es la misma en todas las imágenes. La segunda fila (D, E, y F) corresponde a la excitación con láser de 473 nm (excitación de GFP). La tercera fila (G, H, e I) corresponde a la excitación con láser de 561 nm (excitación de mCherry). La cuarta fila muestra combinación entre los campos mencionados previamente.

Los estudios realizados en este capítulo permitieron obtener nueva información acerca de la función de los genes LPU83a_0146 y LPU83a_0148. En primer lugar, descartamos que sean necesarios para la estabilidad del plásmido, lo que podía suponerse en base a bibliografía. Luego, descartamos que la regulación mediada por LPU83a_0146 esté relacionada con la actividad del antiactivador de la conjugación TraM. Por otro lado, comprobamos la existencia de un mecanismo

de interferencia transcripcional, dado entre la proteína codificada por LPU83a_0146 y la región intergénica de los genes *traR* y LPU83a_0148. Este modelo de interferencia permitiría explicar el fenotipo observado para el mutante en LPU83a_0146 y relacionarlo con los datos obtenidos a partir del *RNA-seq*. Sin embargo, las fusiones transcripcionales generadas no permitieron confirmar dicho comportamiento en el entorno de *R. favelukesii* LPU83 y *A. tumefaciens* UBAPF2. Al mismo tiempo, en cuanto a la localización celular de esta proteína, mediante diferentes técnicas observamos que su distribución no es homogénea y puede hallarse tanto en citosol como en membrana. El gen descrito como esencial para la conjugación, LPU83a_0148, codifica una proteína que se localiza específicamente en la membrana celular, y no co-localiza con aquella codificada por LPU83a_0146.

De este modo, hemos detectado un nuevo circuito regulatorio de la transferencia de plásmidos en rizobios, el cual incluye al gen LPU83a_0146 modulando transcripcionalmente. Al mismo tiempo, obtuvimos información sobre la localización celular de un gen esencial para la conjugación, LPU83_0148, el cual no ha sido descrito previamente. Estos resultados sientan las bases para profundizar los mecanismos de este nuevo sistema regulatorio.

Capítulo VIII. Discusión general, conclusiones y perspectivas.

VIII.1. Discusión general

La transferencia horizontal de material genético entre diferentes organismos es la principal fuerza que dirige la evolución y adaptación bacteriana (Soucy *et al.*, 2015). Entre los mecanismos involucrados en este proceso, la transferencia de genes por conjugación entre bacterias es considerado como uno de los mecanismos más relevantes. La adquisición de un plásmido conlleva, en muchos casos, la adquisición de nuevas funciones que pueden aportar a la célula receptora capacidades que le permitan adaptarse a un nuevo ambiente o generar una ventaja ante otros organismos (Groisman & Ochman, 1997, Chistoserdova *et al.*, 1998, Gogarten *et al.*, 2002, Bailly *et al.*, 2007). Entre las funciones que un plásmido puede codificar, resultan de gran interés agronómico aquellas que permiten a un grupo particular de bacterias, los rizobios, interaccionar de manera simbiótica con plantas leguminosas, aportando el nitrógeno que limita su crecimiento. La utilización de estos microorganismos permite evitar el uso de inoculantes químicos. Los rizobios pueden portar diferente número de plásmidos (Mercado-Blanco & Toro, 1996). Entre ellos, los plásmidos que poseen funciones involucradas en la simbiosis rizobio-leguminosa son denominados plásmidos simbióticos, mientras que los plásmidos que codifican otro tipo de funciones se denominan plásmidos crípticos o accesorios (Mercado-Blanco & Toro, 1996). Algunos de éstos pueden afectar al proceso simbiótico de manera positiva o negativa, como también pueden estar involucrados en la transferencia de plásmidos simbióticos entre organismos (Skorupska *et al.*, 1991, Baldani *et al.*, 1992, Brom *et al.*, 1992, Velazquez *et al.*, 1995, Brom *et al.*, 2004, Torres Tejerizo *et al.*, 2010). Teniendo en cuenta los cambios que la transferencia de material genético entre bacterias del suelo puede generar, el estudio de la transferencia de plásmidos de rizobios con capacidad de ser utilizados como inoculantes, resulta sumamente relevante. Comprender de qué manera la transferencia plasmídica es regulada ayudará a evaluar, de forma más eficiente, los procesos que puedan tener lugar al momento de liberar, en forma masiva, un microorganismo al ambiente.

Dentro de los plásmidos de rizobios, han sido descritos dos mecanismos principales que regulan la transferencia de los mismos: regulación mediada por el par de genes *rctA/rctB* y regulación mediada por *quorum sensing* (ver sección I.6). Vale destacar que en los sistemas de *quorum sensing* de rizobios descritos hasta el momento, el regulador transcripcional implicado en la respuesta a la densidad poblacional es el codificado por el gen *traR*, una proteína de la familia de los reguladores *luxR*. De esta forma, la presencia de un gen *traR* en un plásmido es frecuentemente asociada a una regulación de la conjugación mediada por QS (Fuqua & Winans, 1994, Fuqua *et al.*, 1994, Danino *et al.*, 2003, Tun-Garrido *et al.*, 2003).

Estudios previos de nuestro laboratorio, han permitido identificar un plásmido perteneciente a la cepa *Rhizobium favelukesii* LPU83, en el cual se ha confirmado la presencia del gen *traR* (necesario para que la conjugación ocurra), ubicado entre el *Dtr* y el *Mpf* de dicho plásmido. Sin embargo, no se ha encontrado una copia del gen *traI* (encargado de la síntesis de AHLs) en dicha región (Torres Tejerizo *et al.*, 2014). Dado que, por lo general, los sistemas de QS codifican a *traR* y *traI* en una misma región, la organización genética del plásmido pLPU83a abre nuevos interrogantes acerca de los mecanismos que regulan la transferencia conjugativa. En particular, esta información nos llevó a preguntarnos si dicho plásmido responde a un mecanismo de QS a pesar de no contar con el gen involucrado en la síntesis de AHLs, utilizando algún otro tipo de molécula señal (Subramoni *et al.*, 2011, Brachmann *et al.*, 2013), o si la proteína TraR responde a algún otro mecanismo regulatorio no descrito hasta el momento. En este trabajo de tesis realizamos la caracterización molecular de los mecanismos que regulan la transferencia de plásmidos en rizobios, utilizando como modelo el plásmido pLPU83a.

Como un primer paso, llevamos a cabo la caracterización genética del plásmido pLPU83a, utilizando la secuencia publicada por Wibberg *et al.* (2014). Al analizar manualmente todos los elementos codificados en el plásmido, encontramos un homólogo a la proteína TraI codificada en el plásmido pRetCFN42a de *R. etli* (ver sección III.2). Teniendo en cuenta que el gen *traI* de *R. etli* codifica la AHL sintasa que forma parte del circuito regulatorio de QS de dicho plásmido (Tun-

Garrido *et al.*, 2003), la presencia de un homólogo en el plásmido pLPU83a nos permitió pensar en la posibilidad de un mecanismo regulatorio similar. Si bien comprobamos que la proteína Tral codificada en pLPU83a es funcional y encargada de producir AHLs, la ausencia de la misma no afecta el fenotipo conjugativo, mostrando que, en esas condiciones, Tral no forma parte del circuito regulatorio (ver sección III.5). Considerando que en algunos sistemas, la regulación por QS puede estar dada por otro tipo de moléculas señal (Subramoni *et al.*, 2011, Brachmann *et al.*, 2013, Singh *et al.*, 2013), analizamos el comportamiento del plásmido en respuesta a la cantidad de bacterias presentes en el cultivo. Así, observamos que la frecuencia conjugativa de pLPU83a disminuye levemente al aumentar la cantidad de bacterias, comportamiento opuesto a los sistemas de QS regulados por *traR* previamente descritos (ver sección III.6). Si bien no se ha reportado un sistema que responda de la misma manera en rizobios, se han observado otros plásmidos cuya transferencia disminuye al aumentar la cantidad de bacterias donadoras. Bandyopadhyay *et al.* (2016) han observado, en algunos sistemas de enterococos, un mecanismo en el cual la acumulación de una pequeña molécula genera la inhibición de la conjugación, pudiendo existir un mecanismo similar en la regulación de pLPU83a. Sin embargo, el fenómeno observado también podría generarse como una respuesta al estado metabólico de la bacteria, como se ha reportado para la transferencia del plásmido R27 desde *Escherichia coli* (Gibert *et al.*, 2016). En dicho estudio, se ha comprobado que la transferencia del plásmido es activa cuando las células donadoras se encuentran en una fase de crecimiento exponencial, pero disminuye drásticamente cuando el cultivo ingresa en fase estacionaria, sugiriendo un mecanismo regulatorio que controla la transferencia conjugativa en función del estado metabólico de la bacteria.

El análisis filogenético de la proteína TraR codificada en pLPU83a nos llevó a encontrar plásmidos con una distribución de genes conjugativos muy similar, caracterizados por la presencia de *traR* entre el Dtr y el Mpf, y por la ausencia de *tral* en dicha región (ver secciones III.3 y III.4). Además, nos permitió observar la presencia de dos genes hipotéticos muy conservados, organizados en tándem y ubicados *upstream* a *traR* en cada uno de los plásmidos analizados. En trabajos previos, el análisis de genes hipotéticos ubicados entre las regiones del Dtr y del Mpf han resultado en la asignación de funciones ligadas al proceso conjugativo (Lopez-Fuentes *et al.*, 2015, Wathugala *et al.*, 2020). La ubicación de los genes hipotéticos conservados en pLPU83a (LPU83a_0146 y LPU83a_0148), y la falta de un mecanismo que explique la regulación de la TC del plásmido, nos alentaron a suponer que la función de ambos genes podía estar relacionada a este fenómeno. A continuación de estos dos genes se encontró un tercer gen (LPU83a_0145), también hipotético, presente sólo en pLPU83a y unos pocos plásmidos, al cual también decidimos caracterizar. Realizamos la mutagénesis de los genes LPU83a_0145, LPU83a_0146 y LPU83a_0148 y evaluamos el fenotipo conjugativo de los plásmidos mutantes. Para ello, en primer lugar, determinamos que LPU83a_0146 y LPU83a_0148 componen un operón, mientras que LPU83a_0145 se expresa independientemente (ver sección IV.5). Posteriormente, llevamos a cabo la delección por doble recombinación de cada gen. El análisis de los mutantes demostró que tanto LPU83a_0146 como LPU83a_0148 están involucrados en el proceso conjugativo (ver sección IV.6). Llamativamente, a pesar de ser expresados en una misma unidad transcripcional, el efecto observado para cada gen fue opuesto. En el caso del gen LPU83a_0148, la delección mostró que dicho gen es esencial para la conjugación. El mutante en LPU83a_0146 mostró frecuencias conjugativas superiores a las del plásmido salvaje, evidenciando que dicho gen reprime la conjugación. De este modo, encontramos dos genes cuya expresión responde a un mismo promotor, en donde uno de ellos es necesario para la conjugación, pero el otro la reprime. Para el gen LPU83a_0145 no fue posible encontrar diferencias entre las frecuencias conjugativas del plásmido mutante y las del plásmido salvaje.

Analizamos la distribución taxonómica de los genes hipotéticos mediante una búsqueda *in silico* de genes homólogos (ver sección IV.2). En dicho análisis, observamos que el gen LPU83a_0148 se distribuye exclusivamente en α -proteobacterias, dentro de las cuales es predominante el grupo Rhizobiales. El gen LPU83a_0146 también se distribuye mayormente

dentro de α -proteobacterias (Rhizobiales en su gran mayoría), aunque también se encuentran homólogos en Acidobacterias. Los homólogos de LPU83a_0145 tienen una distribución más heterogénea, incluyendo α -, β -, γ -y δ -proteobacterias. Dados estos resultados, la presencia del par de homólogos a los genes LPU83a_0146 y LPU83a_0148 parece ser una característica acotada mayoritariamente a las α -proteobacterias, donde, en la mayor proporción de los casos, se ubican en tándem. Si bien en algunos casos pudimos localizar dichos genes dentro de plásmidos (o cerca de elementos conjugativos), conocer si su función biológica está ligada a la conjugación en dichas especies sigue siendo aún una incógnita. La distribución predominante de ambos genes dentro del grupo Rhizobiales permite suponer que tienen una función específica en rizobios, que no se ha extendido a otros organismos. Además, el hecho de que mayoritariamente ambos genes se ubiquen en tándem, implicaría una evolución conjunta de los mismos como se ha descrito para otros genes involucrados en la TC (Wetzel *et al.*, 2015).

Al observar la presencia conjunta de los homólogos a LPU83a_0148 y LPU83a_0146, realizamos un análisis filogenético de homólogos de ambos genes (ver sección IV.3). Llamativamente, el análisis individual de cada proteína condujo a la formación de dos grandes clados dentro de cada árbol filogenético, conteniendo los mismos plásmidos en cada caso. El análisis de las regiones conjugativas de cada plásmido permitió encontrar características conservadas en cuanto a la organización genética de dichas regiones. En el grupo conteniendo a pLPU83a (grupo X) fue posible encontrar plásmidos pertenecientes al grupo I-C observado en el análisis filogenético de TraR (ver sección III.4), mientras que en el otro grupo (grupo Y) se ubicaron plásmidos pertenecientes en su mayoría a bacterias del género *Ensifer*. Los plásmidos del grupo Y se caracterizan por la ausencia de *traR* en la región analizada y por la presencia de un Mpf diferente al de los plásmidos pertenecientes al grupo I-C. Además, en todos los plásmidos del grupo Y, *upstream* a LPU83a_0148 se encuentra el gen *rptA*, importante para la transferencia del plásmido pLPU88b de *E. meliloti* LPU88 desde entornos no nativos (Pistorio *et al.*, 2013).

Considerando que el plásmido pLPU83a es capaz de modificar su comportamiento conjugativo dependiendo del entorno genómico en el que se encuentre (Torres Tejerizo *et al.*, 2014), y existiendo evidencias de genes involucrados en la conjugación, cuya función varía entre un entorno y otro (Pistorio *et al.*, 2013), evaluamos el fenotipo conjugativo de pLPU83a y sus derivados mutantes desde diferentes entornos genómicos (ver sección V.2). Los ensayos realizados muestran que la función de los genes LPU83a_0146 y LPU83a_0148 se conserva en los entornos en los cuales pLPU83a se transfiere utilizando su propia maquinaria. Un dato llamativo en estos ensayos fue el comportamiento observado en el entorno genómico de *A. tumefaciens* UBAPF2. En dicho entorno, el plásmido salvaje se transfiere a frecuencias conjugativas muy bajas ($2.9 \pm 0.86 \times 10^{-9}$ transconjugantes por célula donadora), mientras que el plásmido mutante en LPU83a_0146 muestra frecuencias conjugativas tres órdenes de magnitud superiores. El hecho de que la delección de LPU83a_0146 permita obtener estos valores de transferencia, da cuenta de que pLPU83a posee todos los elementos necesarios para ser transferido desde *A. tumefaciens* UBAPF2, pero el proceso se encuentra regulado negativamente en este entorno.

Con el objetivo de determinar si genes homólogos a LPU83a_0146 y LPU83a_0148 evolutivamente alejados llevan a cabo una función similar, la transferencia de pLPU83a también fue evaluada desde entornos en donde hubiera presentes plásmidos con genes homólogos a los mencionados (ver sección V.3). Para este ensayo, las cepas donadoras elegidas fueron *Shinella sp.* DD12 y *E. meliloti* LPU88, observando que la transferencia de pLPU83a es posible desde cada una de ellas. Desde el entorno genético de *Shinella sp.* DD12, el plásmido mutante en LPU83a_0148 no fue transferido, pero el mutante en LPU83a_0146 se transfirió a la misma frecuencia que el plásmido salvaje. Los resultados obtenidos sugieren la complementación heteróloga de dicho gen desde *Shinella sp.* DD12; dicho comportamiento debe ser confirmado complementando específicamente el mutante *R. favelukesii* LPU83 Δ LPU83a_0146. Al analizar la transferencia desde *E. meliloti* LPU88, se obtuvieron transconjugantes del plásmido mutante

en LPU83a_0148, por lo que habría una complementación heteróloga. Para el mutante en LPU83a_0146, nuevamente se obtuvieron frecuencias similares a las del plásmido salvaje. Para evaluar si la complementación es exclusivamente llevada a cabo desde pLPU88a, evaluamos la transferencia de pLPU83a y sus derivados mutantes en presencia de dicho plásmido, pero desde *E. meliloti* 2011. Este ensayo mostró que el plásmido mutante en LPU83a_0148 no es complementado por pLPU88a. Al mismo tiempo, el mutante en LPU83a_0146 se transfirió a la misma frecuencia que el plásmido salvaje. Dado que la función de los genes LPU83a_0146 y LPU83a_0148 en el entorno de *E. meliloti* 2011 ya había sido comprobada, los resultados obtenidos en presencia del plásmido pLPU88a evidencian la complementación del mutante en LPU83a_0146 por parte del homólogo presente en dicho plásmido. Sin embargo, no esclarecen si el gen LPU88a_0148 presente en pLPU88a es funcional. Los resultados sugieren la presencia de otro gen que complementa la función de LPU83a_0148 desde el entorno de *E. meliloti* LPU88. Si bien pensamos que la posibilidad es remota, no debemos descartar que quizás la expresión de LPU88a_0148 no sea adecuada desde *E. meliloti* 2011. La similitud entre las frecuencias conjugativas de pLPU83a y sus derivados mutantes desde el entorno de *E. meliloti* LPU88 podría indicar la presencia de un Dtr propio de esta cepa que esté llevando a cabo la transferencia de pLPU83a, de forma similar a lo descrito por Torres Tejerizo *et al.* (2014) para la transferencia de pLPU83a desde el entorno de *R. etli* CFN42. Con el objetivo de discernir fehacientemente si LPU88a_0146 es capaz de complementar a nuestro mutante en el entorno de *R. favelukesii* LPU83, evaluamos la transferencia del plásmido pLPU83a Δ LPU83a_0146 en presencia de una copia en *trans* del gen LPU88a_0146. Al observar una disminución de la frecuencia conjugativa en presencia de este gen, confirmamos su capacidad de complementar al mutante en LPU83a_0146, mostrando que lleva a cabo la misma función biológica.

Luego de confirmar la influencia de los genes LPU83a_0146 y LPU83a_0148 en la TC de pLPU83a, el siguiente paso fue abordar el estudio del mecanismo mediante el cual ambos genes podían estar llevando a cabo su función. Suponiendo que alguno de los genes podía estar involucrado en la regulación de la conjugación, utilizamos diferentes enfoques ómicos para determinarlo. El análisis transcriptómico de los mutantes mediante *RNA-seq* (ver sección VI.4) descartó una función regulatoria a nivel transcripcional por parte de LPU83a_0148, ya que prácticamente no se observaron genes expresados diferencialmente. Distinto fue el caso para el mutante en el gen LPU83a_0146, para el cual detectamos el aumento de la expresión de todos los genes involucrados en la conjugación de pLPU83a. Específicamente, encontramos sobreexpresados a los genes del Mpf y del Dtr, como así también al regulador transcripcional *traR*. Estos resultados explican el fenotipo descrito para la cepa mutante en LPU83a_0146. Llamativamente, el análisis también permitió observar una disminución de la expresión del gen LPU83a_0148. El análisis transcriptómico nos permitió observar que LPU83a_0146 inhibe la conjugación al disminuir la transcripción de los genes necesarios para la misma. Estudios previos han descrito diversos mecanismos de represión de la conjugación de plásmidos de rizobios. Dentro de algunos sistemas regulados por QS, se ha caracterizado la función del antiactivador de la conjugación codificado por *traM* (Fuqua *et al.*, 1995). En este tipo de sistemas, la proteína TraM interacciona directamente con el regulador TraR, generando un cambio conformacional que no permite la unión de las AHLs, impidiendo de esta forma la unión de TraR a los promotores de genes conjugativos (Hwang *et al.*, 1999). Como resultado del efecto de TraM, se observa una disminución de la expresión de TraR, debido a la falta de autoinducción, como así también de los genes conjugativos, debido a la incapacidad de TraR de interaccionar con los promotores del Dtr y Mpf (Hwang *et al.*, 1999). La presencia de *traR* en el plásmido pLPU83a, y las diferencias con respecto al comportamiento de otros plásmidos regulados por este gen, nos permitirían proponer al producto del gen LPU83a_0146 como una proteína con una función similar a TraM, interaccionando directamente con TraR, o incluso asistiendo a TraM o a alguna otra proteína en su función. Por otro lado, también se han identificado sistemas supresores de la conjugación mediados por la interacción de proteínas con secuencias de DNA, como es el caso de *rctA* (ver sección I.6) (Pérez-Mendoza *et al.*, 2005, Nogales *et al.*, 2013). Se ha comprobado que en

pRetCFN42d, RctA interacciona con la región promotora del operón *virB*, generando una interferencia que impide la transcripción del mismo (Sepúlveda *et al.*, 2008). Dado que la ubicación de *rctA* es *upstream* y de sentido opuesto al operón *virB*, dicha interacción favorece la transcripción de *rctA*. En condiciones que impiden la unión de RctA, la transcripción del operón *virB* genera una interferencia, disminuyendo la expresión de *rctA*. Comparando este sistema con el presente en pLPU83a, podemos observar que el regulador *traR* y el gen LPU83a_0146 se encuentran adyacentes, compartiendo la región genómica donde se ubican sus promotores. Esta estructura, similar a la observada para *rctA* y el operón *virB*, permitiría imaginar un modelo en el que la proteína codificada por LPU83a_0146 se una a su propio promotor, generando una interferencia que impide la transcripción de *traR*. Como consecuencia, en estas condiciones, el nivel de TraR disminuiría notablemente, afectando los niveles de expresión de los genes conjugativos. El hecho de observar una disminución en los niveles de LPU83a_0148 en ausencia de LPU83a_0146, favorece la hipótesis de una autoinducción por parte de la proteína codificada por LPU83a_0146. Sin embargo, podría suceder que la unión de TraR a su propio promotor genere una interferencia que afecte la expresión del operón LPU83a_0148/LPU83a_0146. Si la interacción de la proteína codificada por LPU83a_0146 se diera con el promotor de *traR*, impidiendo la unión de TraR a esta región, la expresión del operón LPU83a_0148/LPU83a_0146 aumentaría en estas condiciones. El análisis bioinformático de la proteína codificada por LPU83a_0146 no mostró evidencias de la presencia de dominios conservados asociados a la interacción con DNA (ver sección IV.4), por lo que, de tratarse de una interacción proteína-DNA, la misma sería llevada a cabo a través de un nuevo motivo no descrito previamente. En el mismo análisis, se observó la presencia de un fragmento de un dominio α/β hidrolasa, lo que dio lugar a pensar también en un mecanismo en el que LPU83a_0146 tenga una función asociada a dicho dominio. De esta manera, podría procesar una nueva molécula involucrada en la conjugación. Mecanismos de este estilo han sido descritos en sistemas como el plásmido pLS20 de *Bacillus subtilis*, en donde la regulación de la transferencia plasmídica responde a un pequeño péptido resultante del procesamiento de un pre-péptido (Singh *et al.*, 2013, Singh *et al.*, 2020).

La información obtenida sobre LPU83a_0148 nos permitió descartar su influencia a nivel metabólico y transcriptómico, acotando las posibles funciones del gen. El hecho de no haber observado genes expresados diferencialmente en el mutante en dicho gen, sumado a la predicción de dominios transmembrana y la ausencia de transconjugantes en el mutante, nos condujo a pensar principalmente que esta proteína tenga una función estructural. Si bien los elementos que conforman el sistema de secreción tipo IV han sido ampliamente descritos (Christie *et al.*, 2014, Chandran Darbari & Waksman, 2015, Bergé *et al.*, 2017), otras proteínas podrían participar en el ensamblado del mismo, de modo que la ausencia de alguna de estas proteínas resultaría en la incapacidad de formar el poro conjugativo. Estudios sobre plásmidos de rizobios han caracterizado genes hipotéticos relevantes para la conjugación. Wathugala *et al.* (2020) encontraron, en el plásmido pRleVF39b de *R. leguminosarum* VF39SM, seis genes hipotéticos con roles importantes en la movilización de dicho plásmido; dichos autores sugieren que asistirían a la relaxasa en la formación del relaxosoma, aunque la conjugación nunca fue totalmente interrumpida. En pLPU83a, podría plantearse un modelo en donde LPU83a_0148 tenga una función esencial en el procesamiento del DNA.

Considerando que tanto LPU83a_0146 como LPU83a_0148 están codificados en un mismo operón, no sería extraño proponer un modelo en donde la función de ambos genes esté conectada. En este contexto, bajo la hipótesis de que LPU83a_0146 se encarga de procesar/degradar una molécula señal, LPU83a_0148 podría codificar un transportador de dicha molécula, permitiéndole el ingreso a la célula. De esta forma, la ausencia de LPU83a_0148 no permitiría el ingreso de la molécula inductora de la conjugación, resultando en la incapacidad para transferir el plásmido. Sin embargo, hubiésemos esperado que el perfil transcripcional del mutante en LPU83a_0148 cambie, lo cual no fue así.

Para descartar o corroborar las diferentes hipótesis, realizamos los siguientes experimentos (ver Cap VII).

-En base a lo descrito por Guynet *et al.* (2011), quienes caracterizaron un gen cuya delección genera la inestabilidad del plásmido R388, causando como consecuencia un aumento de la frecuencia conjugativa de dicho plásmido, decidimos evaluar la estabilidad plasmídica de cada derivado mutante de pLPU83a. El resultado de este ensayo no arrojó diferencias entre la estabilidad del plásmido salvaje y la de cada derivado mutante (ver sección VII.2).

-Evaluamos si la función del producto de LPU83a_0146 podía estar asociada a la actividad represora del gen *traMa*. Para esto, obtuvimos una cepa delecionada en *traMa* y una cepa con delecciones en LPU83a_0146 y *traMa*. Para ambos plásmidos, observamos frecuencias conjugativas similares a aquellas obtenidas para los mismos plásmidos sin la delección en *traMa* (ver sección VII.3). Este resultado demostró que *traMa* no está involucrado en la conjugación de pLPU83a ni afecta el rol del gen LPU83a_0146.

-Habiendo observado que la delección de LPU83a_0146 genera incrementos en la expresión de genes conjugativos, estudiamos si el efecto observado es independiente de *traR*. Para ello, evaluamos el comportamiento de un plásmido con delecciones en LPU83a_0146 y en *traR*. No fue posible obtener transconjugantes con el plásmido doble mutante (ver sección VII.4), confirmando que *traR* es indispensable y sugiriendo que la función represora de LPU83a_0146 podría ser ejercida sobre la expresión o la función de *traR*.

-Con el fin de determinar una posible interacción entre la proteína codificada por LPU83a_0146 y la región de DNA que contiene la secuencia promotora del gen *traR* y del operón LPU83a_0148/LPU83a_0146, realizamos un ensayo de interferencia transcripcional en *E. coli*, para el cual construimos un vector conteniendo la región intergénica entre LPU83a_0148 y *traR* clonada entre la proteína GFP y el promotor *lac*. La presencia de LPU83a_0146 demostró una posible interacción con la secuencia de DNA clonada, dando los primeros indicios de una interferencia generada por la proteína codificada por dicho gen y la región intergénica. Dado que la región intergénica clonada contendría tanto la secuencia promotora de *traR* como del operón que contiene a los genes hipotéticos, aún debe estudiarse cómo se produce la interferencia. A continuación, generamos una fusión transcripcional entre la misma región intergénica evaluada previamente y la proteína GFP, para evaluar la expresión del gen reportero en presencia y en ausencia del gen represor y de *traR*. El sistema generado fue evaluado tanto en el entorno de *R. favelukesii* LPU83 Δ LPU83a_0146 como en *A. tumefaciens* UBAPF2, intentando descifrar si la sola presencia de LPU83a_0146 es suficiente para inhibir la expresión de *traR*. Sin embargo, los ensayos realizados no permitieron observar la interferencia generada por LPU83a_0146 en la expresión del gen reportero (ver sección VII.5).

Finalmente, como parte de la caracterización de los genes hipotéticos presentes en pLPU83a, evaluamos la localización celular de cada proteína realizando ensayos de *western-blot* (ver sección VII.6.1) y microscopía de fluorescencia (ver sección VII.6.2), utilizando en ambos casos fusiones traduccionales a GFP. La proteína codificada por LPU83a_0148 se localizó en la fracción de proteínas de membrana, con una distribución bastante uniforme a lo largo de la misma. Este resultado podría ser explicado por un modelo en donde la proteína codificada por LPU83a_0148 tenga influencia en el ensamblado del poro conjugativo en la membrana, como propusimos previamente. En tanto, la proteína codificada por LPU83a_0146 se observó tanto en membrana como en citosol. Llamativamente, la distribución de esta proteína presentó variaciones en las distintas imágenes de la microscopía obtenidas. En algunos casos, se distribuyó uniformemente a lo largo del citoplasma, mientras que en algunas células se visualizó acumulada en los polos, confirmando así los datos obtenidos por *western-blot*. La relación entre la localización de la proteína y su función todavía debe ser determinada.

En base a los resultados expuestos previamente, proponemos los modelos esquematizados en la figura VIII.1 para explicar la función de los genes LPU83a_0146 y LPU83a_0148. Cabe aclarar que las hipótesis pueden no ser excluyentes.

-LPU83a_0146 disminuye la TC mediante uno de los siguientes mecanismos (cada inciso se corresponde con los números de la figura VIII.1.A):

1. LPU83a_0146 interfiere directamente con la transcripción de *traR*, y por ende disminuye la cantidad de TraR. Así, se termina produciendo una menor transcripción de los genes del Dtr y Mpf, disminuyendo la TC.
2. LPU83a_0146 se une e inactiva TraR (similar a lo descrito para el antiactivador TraM), y por ende disminuye la cantidad de TraR. Nuevamente, se termina produciendo una menor transcripción de los genes del Dtr y Mpf, disminuyendo la TC.
3. LPU83a_0146 interfiere directamente con la transcripción de *traR* y los genes del Dtr y Mpf.
4. LPU83a_0146 junto con una proteína aún desconocida realizan en conjunto la represión de *traR* y los genes del Dtr y Mpf.
5. LPU83a_0146 activa su transcripción, generando una activación del operón LPU83a_0148-LPU83a_0146, aumentando su cantidad y su efecto regulatorio.
6. LPU83a_0146 procesa una molécula señal relevante para la conjugación.
 - LPU83a_0148 es esencial para la TC ya que (cada inciso se corresponde con los números de la Fig. VIII.1.B):
7. LPU83a_0148 es un transportador de membrana y está involucrado en el transporte de una molécula, hasta ahora desconocida, indispensable para la TC.
8. LPU83a_0148 cumple un rol estructural asociado al ensamblaje o estabilidad del Mpf.
9. LPU83a_0148 cumple un rol de acoplar/ayudar al relaxosoma a unirse al Mpf (similar a una proteína acopladora).

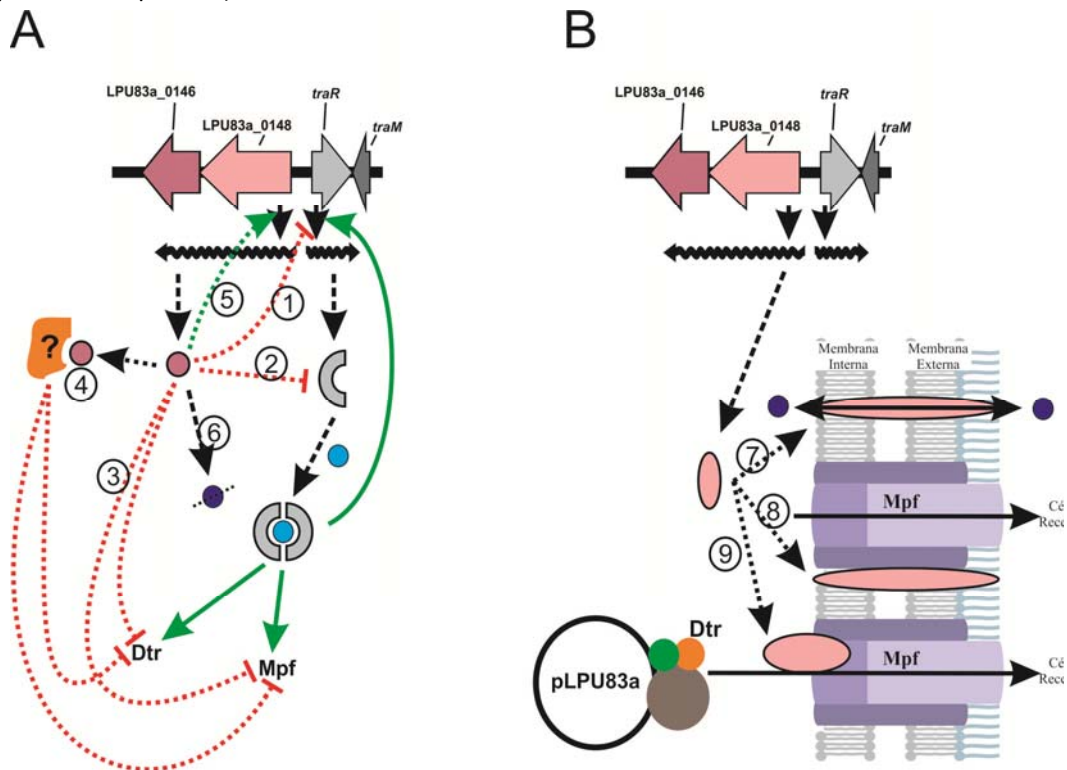


Figura VIII.1. Posibles modelos de funcionamiento de las proteínas codificadas por LPU83a_0146 y LPU83a_0148. A.

Se ha descrito en la bibliografía que TraR activa su transcripción y la de los genes del Dtr y Mpf (flechas verdes continuas) al dimerizarse en presencia de una molécula señal (círculo celeste). Conocemos que LPU83a_0146 disminuye la transcripción de los genes involucrados en la TC de pLPU83a y los mecanismos propuestos comprenden: (1) Inactivación de la transcripción de *traR*; (2) Inactivación de TraR; (3) Inactivación de la transcripción de los genes del Dtr, Mpf y *traR*; (4) Unión a una proteína desconocida formando un complejo que reprime la expresión del Dtr, Mpf y *traR*; (5) Formación de un *loop* positivo que aumenta su expresión; (6) Procesamiento de una molécula señal (círculo azul) relevante para la conjugación. **B.** En el caso de LPU83a_0148, su rol no altera la transcripción, pero es esencial para la TC. Su localización en la membrana celular permite proponer los siguientes mecanismos: (7) Transportador que permite el paso de una molécula indispensable para la TC (círculo azul); (8) Rol estructural asociado al Mpf; (9) Rol de acoplar/ayudar al relaxosoma a asociarse al Mpf. Las moléculas señal indicadas con círculos de distinto color, podrían ser, o no, la misma molécula.

VIII.2. Conclusiones

Los avances en las tecnologías de secuenciación masiva de DNA han permitido conocer una gran cantidad de genomas bacterianos. Sin embargo, cuantas más secuencias se acumulan, mayor es la proporción de genes con una función desconocida que aparecen. Si bien la información obtenida a partir del secuenciamiento de microorganismos es indispensable, resulta crucial complementar dicha información con análisis bioquímicos, que permitan comprender el rol que llevan a cabo los genes predichos, pero sin una función asociada.

Las herramientas bioinformáticas, junto a las prácticas microbiológicas y técnicas moleculares utilizadas en este trabajo, han permitido identificar genes previamente catalogados como hipotéticos y asignarles relación con una función biológica determinada. A su vez, a través de la búsqueda de estos genes, hasta ahora ignorados, en otros organismos, posibilita evaluar y predecir dicha función en los organismos que lo posean.

Específicamente, hemos caracterizado la función de dos genes involucrados en el proceso conjugativo. Uno de ellos, LPU83a_0146, reprime la conjugación al generar una disminución de la expresión de genes conjugativos. A partir de los ensayos realizados, hemos aportado los primeros indicios sobre un nuevo mecanismo regulatorio de la conjugación en rizobios, basado en la interferencia generada por el producto de este gen en la función de un regulador transcripcional maestro de la conjugación. El otro gen caracterizado, LPU83a_0148, resulta esencial para que el proceso ocurra. La proteína codificada por este gen se localiza en la membrana celular, pero no presenta similitudes a proteínas estudiadas previamente. Ambos genes se encuentran en una amplia variedad de rizobios, ubicados en tándem, y permiten pensar en un mecanismo molecular específico que regula la conjugación de este tipo de microorganismos, diferente a los descritos previamente para este grupo de bacterias.

De esta forma, el trabajo aquí realizado aporta evidencias relacionadas a nuevos circuitos regulatorios de la transferencia plasmídica. Al mismo tiempo, deja en claro la necesidad de continuar el estudio de genes hipotéticos, ya que, en muchos casos, resultan esenciales para ciertos procesos celulares.

VIII.3. Perspectivas

La HGT ha sido caracterizada como una de las principales fuerzas que llevan a la evolución biológica de los microorganismos. Dentro de los rizobios, la incorporación de material genético a través de la conjugación ha contribuido a la especiación de muchos organismos. Los conocimientos generados en este trabajo abren la posibilidad a nuevos mecanismos regulatorios de la transferencia conjugativa, dejando ver que, si bien el proceso ha sido ampliamente estudiado en microorganismos modelo, todavía quedan numerosos aspectos por dilucidar.

La caracterización de los genes LPU83a_0146 y LPU83a_0148 realizada en esta tesis, y la presencia de homólogos a estos genes en otros plásmidos, incluidos algunos plásmidos simbióticos de organismos de interés agronómico, ayudará a comprender cómo ocurren algunos fenómenos de transferencia horizontal de genes entre organismos que habitan la rizósfera. Al mismo tiempo, comprender de qué manera dichos fenómenos se regulan, permitirá mejorar el uso de estos microorganismos como inoculantes.

Para profundizar la caracterización del circuito regulatorio propuesto, es necesario diseñar nuevas estrategias que permitan determinar todos los elementos con los que interacciona la proteína codificada por LPU83a_0146. Además, deberá ser evaluada la interacción entre la proteína codificada por LPU83a_0148 y otras moléculas, para determinar la función que la misma lleva a cabo en la transferencia plasmídica. Para esto, deseamos realizar la identificación del interactoma de LPU83a_0146 y LPU83a_0148, estudiar el efecto de LPU83a_0146 sobre la actividad de los promotores de genes del Dtr y Mpf y determinar la localización de LPU83a_0148 en relación a las proteínas que componen el Dtr y el Mpf de

pLPU83a. De esta manera, esperamos continuar avanzando en la comprensión de este novedoso mecanismo regulatorio.

Bibliografía

Abascal F, Zardoya R & Posada D (2005) ProtTest: selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics* **21**: 2104-2105.

Alt-Morbe J, Stryker JL, Fuqua C, Li PL, Farrand SK & Winans SC (1996) The conjugal transfer system of *Agrobacterium tumefaciens* octopine-type Ti plasmids is closely related to the transfer system of an IncP plasmid and distantly related to Ti plasmid vir genes. *J Bacteriol* **178**: 4248-4257.

Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W & Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**: 3389-3402.

Alvarez-Martinez CE & Christie PJ (2009) Biological diversity of prokaryotic type IV secretion systems. *Microbiol Mol Biol Rev* **73**: 775-808.

Aly KA & Baron C (2007) The VirB5 protein localizes to the T-pilus tips in *Agrobacterium tumefaciens*. *Microbiology* **153**: 3766-3775.

Andrews M & Andrews ME (2017) Specificity in Legume-Rhizobia Symbioses. *Int J Mol Sci* **18**.

Bailly X, Olivieri I, Brunel B, Cleyet-Marel JC & Béna G (2007) Horizontal gene transfer and homologous recombination drive the evolution of the nitrogen-fixing symbionts of *Medicago* species. *J Bacteriol* **189**: 5223-5236.

Baldani JJ, Weaver RW, Hynes MF & Eardly BD (1992) Utilization of Carbon Substrates, Electrophoretic Enzyme Patterns, and Symbiotic Performance of Plasmid-Cured Clover Rhizobia. *Appl Environ Microbiol* **58**: 2308-2314.

Bandyopadhyay A, O'Brien S, Frank KL, Dunny GM & Hu WS (2016) Antagonistic Donor Density Effect Conserved in Multiple Enterococcal Conjugative Plasmids. *Appl Environ Microbiol* **82**: 4537-4545.

Bañuelos-Vazquez LA, Torres Tejerizo G & Brom S (2017) Regulation of conjugative transfer of plasmids and integrative conjugative elements. *Plasmid* **91**: 82-89.

Bañuelos-Vazquez LA, Torres Tejerizo G, Cervantes-De La Luz L, Girard L, Romero D & Brom S (2019) Conjugative transfer between *Rhizobium etli* endosymbionts inside the root nodule. *Environ Microbiol*.

Bañuelos-Vazquez LA, Castellani LG, Luchetti A, Romero D, Torres Tejerizo GA & Brom S (2020) Role of plant compounds in the modulation of the conjugative transfer of pRet42a. *Plos One* **15**: e0238218.

Bañuelos-Vazquez LA, Cazares D, Rodríguez S, Cervantes-De la Luz L, Sánchez-López R, Castellani LG, Tejerizo GT & Brom S (2020) Transfer of the Symbiotic Plasmid of *Rhizobium etli* CFN42 to Endophytic Bacteria Inside Nodules. *Frontiers in Microbiology* **11**.

Barsch A, Patschkowski T & Niehaus K (2004) Comprehensive metabolite profiling of *Sinorhizobium meliloti* using gas chromatography-mass spectrometry. *Funct Integr Genomics* **4**: 219-230.

Baur B, Hanselmann K, Schlimme W & Jenni B (1996) Genetic transformation in freshwater: *Escherichia coli* is able to develop natural competence. *Appl Environ Microbiol* **62**: 3673-3678.

Becker A, Ruberg S, Kuster H, Roxlau AA, Keller M, Ivashina T, Cheng HP, Walker GC & Puhler A (1997) The 32-kilobase *exp* gene cluster of *Rhizobium meliloti* directing the biosynthesis of galactoglucan: genetic organization and properties of the encoded gene products. *J Bacteriol* **179**: 1375-1384.

Bergé C, Waksman G & Terradot L (2017) Structural and Molecular Biology of Type IV Secretion Systems. *Type IV Secretion in Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria*, (Backert S & Grohmann E, eds.), p. 31-60. Springer International Publishing, Cham.

Beringer JE (1974) R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *J Gen Microbiol* **84**: 188-198.

Blokesch M (2016) Natural competence for transformation. *Curr Biol* **26**: R1126-R1130.

Boivin C, Camut S, Malpica CA, Truchet G & Rosenberg C (1990) *Rhizobium meliloti* Genes Encoding Catabolism of Trigonelline Are Induced under Symbiotic Conditions. *Plant Cell* **2**: 1157-1170.

- Brachmann AO, Brameyer S, Kresovic D, Hitkova I, Kopp Y, Manske C, Schubert K, Bode HB & Heermann R (2013) Pyrones as bacterial signaling molecules. *Nat Chem Biol*.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Brom S, Pistorio M, Romero D & Torres-Tejerizo G (2014) Boundaries for Conjugative Transfer of Rhizobial Plasmids: Restraining and Releasing Factors. 43-54.
- Brom S, Pistorio M, Romero D & Torres-Tejerizo G (2014) Boundaries for Conjugative Transfer of Rhizobial Plasmids: Restraining and Releasing Factors. *Plasticity in Plant-Growth-Promoting and Phytopathogenic Bacteria*, (Katsy IE, ed.) p. 43-54. Springer New York, New York, NY.
- Brom S, García-de los Santos A, Cervantes L, Palacios R & Romero D (2000) In *Rhizobium etli* symbiotic plasmid transfer, nodulation competitiveness and cellular growth require interaction among different replicons. *Plasmid* **44**: 34-43.
- Brom S, García de los Santos A, Stepkowsky T, Flores M, Dávila G, Romero D & Palacios R (1992) Different plasmids of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* are required for optimal symbiotic performance. *J Bacteriol* **174**: 5183-5189.
- Brom S, Girard L, Tun-Garrido C, García-de los Santos A, Bustos P, González V & Romero D (2004) Transfer of the symbiotic plasmid of *Rhizobium etli* CFN42 requires cointegration with p42a, which may be mediated by site-specific recombination. *J Bacteriol* **186**: 7538-7548.
- Cascales E & Christie PJ (2004) *Agrobacterium* VirB10, an ATP energy sensor required for type IV secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 17228-17233.
- Cervantes L, Miranda-Sanchez F, Torres Tejerizo G, Romero D & Brom S (2019) Plasmid pSfr64a and the symbiotic plasmid pSfr64b of *Sinorhizobium fredii* GR64 control each other's conjugative transfer through quorum-sensing elements. *Plasmid* **106**: 102443.
- Clarke M, Maddera L, Harris RL & Silverman PM (2008) F-pili dynamics by live-cell imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 17978-17981.
- Clewell DB (2013) *Bacterial Conjugation*. Springer US.
- Cook DM, Li PL, Ruchaud F, Padden S & Farrand SK (1997) Ti plasmid conjugation is independent of vir: reconstitution of the *tra* functions from pTiC58 as a binary system. *J Bacteriol* **179**: 1291-1297.
- Crook MB, Lindsay DP, Biggs MB, Bentley JS, Price JC, Clement SC, Clement MJ, Long SR & Griffiths JS (2012) Rhizobial plasmids that cause impaired symbiotic nitrogen fixation and enhanced host invasion. *Mol Plant Microbe Interact* **25**: 1026-1033.
- Cha C, Gao P, Chen YC, Shaw PD & Farrand SK (1998) Production of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by gram-negative plant-associated bacteria. *Mol Plant Microbe Interact* **11**: 1119-1129.
- Chandran Darbari V & Waksman G (2015) Structural Biology of Bacterial Type IV Secretion Systems. *Annu Rev Biochem* **84**: 603-629.
- Chen G, Jeffrey PD, Fuqua C, Shi Y & Chen L (2007) Structural basis for antiactivation in bacterial quorum sensing. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**: 16474-16479.
- Chen I & Dubnau D (2004) DNA uptake during bacterial transformation. *Nat Rev Microbiol* **2**: 241-249.
- Chen X, Zaro JL & Shen WC (2013) Fusion protein linkers: property, design and functionality. *Advanced drug delivery reviews* **65**: 1357-1369.
- Chistoserdova L, Vorholt JA, Thauer RK & Lidstrom ME (1998) C1 transfer enzymes and coenzymes linking methylotrophic bacteria and methanogenic Archaea. *Science* **281**: 99-102.
- Cho H, Pinto UM & Winans SC (2009) Transsexuality in the rhizosphere: quorum sensing reversibly converts *Agrobacterium tumefaciens* from phenotypically female to male. *J Bacteriol* **191**: 3375-3383.
- Christie PJ, Whitaker N & Gonzalez-Rivera C (2014) Mechanism and structure of the bacterial type IV secretion systems. *Biochim Biophys Acta* **1843**: 1578-1591.

Danino VE, Wilkinson A, Edwards A & Downie JA (2003) Recipient-induced transfer of the symbiotic plasmid pRL1J1 in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* is regulated by a quorum-sensing relay. *Mol Microbiol* **50**: 511-525.

Del Papa MF, Balagué LJ, Sowinski SC, *et al.* (1999) Isolation and characterization of alfalfa-nodulating rhizobia present in acidic soils of central argentina and uruguay. *Appl Environ Microbiol* **65**: 1420-1427.

Del Papa MF, Pistorio M, Draghi WO, *et al.* (2007) Identification and characterization of a *nodH* ortholog from the alfalfa-nodulating Or191-like rhizobia. *Mol Plant Microbe Interact* **20**: 138-145.

Ding H & Hynes MF (2009) Plasmid transfer systems in the rhizobia. *Can J Microbiol* **55**: 917-927.

Ding H, Yip CB & Hynes MF (2013) Genetic characterization of a novel rhizobial plasmid conjugation system in *R. leguminosarum* bv. *viciae* strain VF39SM. *J Bacteriol* **195**: 328-339.

Draghi WO, Del Papa MF, Hellweg C, *et al.* (2016) A consolidated analysis of the physiologic and molecular responses induced under acid stress in the legume-symbiont model-soil bacterium *Sinorhizobium meliloti*. *Sci Rep* **6**: 29278.

Eckhardt T (1978) A rapid method for the identification of plasmid desoxyribonucleic acid in bacteria. *Plasmid* **1**: 584-588.

Eisenbrandt R, Kalkum M, Lai EM, Lurz R, Kado CI & Lanka E (1999) Conjugative pili of IncP plasmids, and the Ti plasmid T pilus are composed of cyclic subunits. *J Biol Chem* **274**: 22548-22555.

Ellis JG, Kerr A, Petit A & Tempe J (1982) Conjugal transfer of nopaline and agropine Ti-plasmids —The role of agrocinopines. *Molecular and General Genetics MGG* **186**: 269-274-274.

Farrand SK (1998) Conjugal Plasmids and Their Transfer. *The Rhizobiaceae: Molecular Biology of Model Plant-Associated Bacteria*, (Spaink HP, Kondorosi A & Hooykaas PJJ, eds.), p. 199-233. Springer Netherlands, Dordrecht.

Figurski DH & Helinski DR (1979) Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76**: 1648-1652.

Finan TM, Weidner S, Wong K, *et al.* (2001) The complete sequence of the 1,683-kb pSymb megaplasmid from the N₂-fixing endosymbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 9889-9894.

Francia MV, Varsaki A, Garcillán-Barcia MP, Latorre A, Drainas C & De La Cruz F (2004) A classification scheme for mobilization regions of bacterial plasmids. *FEMS Microbiology Reviews* **28**: 79-100.

Freese HM & Schink B (2011) Composition and stability of the microbial community inside the digestive tract of the aquatic crustacean *Daphnia magna*. *Microb Ecol* **62**: 882-894.

Freiberg C, Fellay R, Bairoch A, Broughton WJ, Rosenthal A & Perret X (1997) Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes. *Nature* **387**: 394-401.

Fuqua C, Burbea M & Winans SC (1995) Activity of the *Agrobacterium* Ti plasmid conjugal transfer regulator TraR is inhibited by the product of the *traM* gene. *J Bacteriol* **177**: 1367-1373.

Fuqua WC & Winans SC (1994) A LuxR-LuxI type regulatory system activates *Agrobacterium* Ti plasmid conjugal transfer in the presence of a plant tumor metabolite. *J Bacteriol* **176**: 2796-2806.

Fuqua WC, Winans SC & Greenberg EP (1994) Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol* **176**: 269-275.

Gage DJ (2004) Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**: 280-300.

Galibert F, Finan TM, Long SR, *et al.* (2001) The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Science* **293**: 668-672.

Garcia-Aljaro C, Balleste E & Muniesa M (2017) Beyond the canonical strategies of horizontal gene transfer in prokaryotes. *Curr Opin Microbiol* **38**: 95-105.

García de los Santos A, Brom S & D. R (1996) *Rhizobium* plasmids in bacteria-legume interactions. *World Journal Microbiology Biotechnology* **12**: 119-125.

Garcillan-Barcia MP, Francia MV & de la Cruz F (2009) The diversity of conjugative relaxases and its application in plasmid classification. *FEMS Microbiol Rev* **33**: 657-687.

Gibert M, Paytubi S, Beltran S, Juarez A, Balsalobre C & Madrid C (2016) Growth phase-dependent control of R27 conjugation is mediated by the interplay between the plasmid-encoded regulatory circuit TrhR/TrhY-HtdA and the cAMP regulon. *Environ Microbiol* **18**: 5277-5287.

Giusti ML, Pistorio M, Lozano MJ, *et al.* (2012) Genetic and functional characterization of a yet-unclassified rhizobial Dtr (DNA-transfer-and-replication) region from a ubiquitous plasmid conjugal system present in *Sinorhizobium meliloti*, in *Sinorhizobium medicae*, and in other nonrhizobial Gram-negative bacteria. *Plasmid* **67**: 199-210.

Gogarten JP, Doolittle WF & Lawrence JG (2002) Prokaryotic evolution in light of gene transfer. *Mol Biol Evol* **19**: 2226-2238.

González V, Santamaría RI, Bustos P, *et al.* (2006) The partitioned *Rhizobium etli* genome: Genetic and metabolic redundancy in seven interacting replicons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 3834-3839.

Grant JR & Stothard P (2008) The CGView Server: a comparative genomics tool for circular genomes. *Nucleic Acids Res* **36**: W181-184.

Groisman EA & Ochman H (1997) How Salmonella became a pathogen. *Trends Microbiol* **5**: 343-349.

Guindon S & Gascuel O (2003) A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol* **52**: 696-704.

Guynet C, Cuevas A, Moncalian G & de la Cruz F (2011) The *stb* operon balances the requirements for vegetative stability and conjugative transfer of plasmid R388. *PLoS Genet* **7**: e1002073.

Gyaneshwar P, Hirsch AM, Moulin L, *et al.* (2011) Legume-nodulating betaproteobacteria: diversity, host range, and future prospects. *Mol Plant Microbe Interact* **24**: 1276-1288.

Haase J, Kalkum M & Lanka E (1996) TrbK, a small cytoplasmic membrane lipoprotein, functions in entry exclusion of the IncP alpha plasmid RP4. *J Bacteriol* **178**: 6720-6729.

He X, Chang W, Pierce DL, Seib LO, Wagner J & Fuqua C (2003) Quorum sensing in *Rhizobium* sp. strain NGR234 regulates conjugal transfer (*tra*) gene expression and influences growth rate. *J Bacteriol* **185**: 809-822.

Herigstad B, Hamilton M & Heersink J (2001) How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. *J Microbiol Methods* **44**: 121-129.

Hilker R, Stadermann KB, Doppmeier D, Kalinowski J, Stoye J, Straube J, Winnebald J & Goesmann A (2014) ReadXplorer--visualization and analysis of mapped sequences. *Bioinformatics* **30**: 2247-2254.

Hirsch PR (1979) Plasmid-determined Bacteriocin Production by *Rhizobium leguminosarum*. *Journal of General Microbiology* **113**: 219-228.

Holloway P, McCormick W, Watson RJ & Chan YK (1996) Identification and analysis of the dissimilatory nitrous oxide reduction genes, *nosRZDFY*, of *Rhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **178**: 1505-1514.

Hwang I, Smyth AJ, Luo ZQ & Farrand SK (1999) Modulating quorum sensing by antiactivation: TraM interacts with TraR to inhibit activation of Ti plasmid conjugal transfer genes. *Mol Microbiol* **34**: 282-294.

Hwang I, Li PL, Zhang L, Piper KR, Cook DM, Tate ME & Farrand SK (1994) TraI, a LuxI homologue, is responsible for production of conjugation factor, the Ti plasmid N-acylhomoserine lactone autoinducer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 4639-4643.

Hynes MF, Simon R & Pühler A (1985) The development of plasmid-free strains of *Agrobacterium tumefaciens* by using incompatibility with a *Rhizobium meliloti* plasmid to eliminate pAtC58. *Plasmid* **13**: 99-105.

- Jafari M & Ansari-Pour N (2019) Why, When and How to Adjust Your P Values? *Cell journal* **20**: 604-607.
- Johnston AWB, Hombrecher G, Brewin NJ & Cooper MC (1982) Two transmissible plasmids in *Rhizobium leguminosarum* strain 300. *J Gen Microbiol* **128**: 85-93.
- Johnston C, Martin B, Fichant G, Polard P & Claverys JP (2014) Bacterial transformation: distribution, shared mechanisms and divergent control. *Nat Rev Microbiol* **12**: 181-196.
- Jones KM, Kobayashi H, Davies BW, Taga ME & Walker GC (2007) How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium-Medicago* model. *Nat Rev Microbiol* **5**: 619-633.
- Kessler B, de Lorenzo V & Timmis KN (1992) A general system to integrate lacZ fusions into the chromosomes of gram-negative eubacteria: regulation of the Pm promoter of the TOL plasmid studied with all controlling elements in monocopy. *Mol Gen Genet* **233**: 293-301.
- Khan SR, Gaines J, Roop RM, 2nd & Farrand SK (2008) Broad-host-range expression vectors with tightly regulated promoters and their use to examine the influence of TraR and TraM expression on Ti plasmid quorum sensing. *Appl Environ Microbiol* **74**: 5053-5062.
- Kirchner O & Tauch A (2003) Tools for genetic engineering in the amino acid-producing bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Biotechnology* **104**: 287-299.
- Korman A, Oh A, Raskind A & Banks D (2012) Statistical methods in metabolomics. *Methods Mol Biol* **856**: 381-413.
- Kovach ME, Elzer PH, Hill DS, Robertson GT, Farris MA, Roop RM, 2nd & Peterson KM (1995) Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* **166**: 175-176.
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C & Tamura K (2018) MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol Biol Evol* **35**: 1547-1549.
- Lagares A, Sanjuán J & Pistorio M (2015) The Plasmid Mobilome of the Model Plant-Symbiont *Sinorhizobium meliloti*: Coming up with New Questions and Answers. *Plasmids: Biology and Impact in Biotechnology and Discovery*, p. App. American Society of Microbiology.
- Langmead B & Salzberg SL (2012) Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods* **9**: 357-359.
- Lessl M, Balzer D, Pansegrau W & Lanka E (1992) Sequence similarities between the RP4 Tra2 and the Ti VirB region strongly support the conjugation model for T-DNA transfer. *J Biol Chem* **267**: 20471-20480.
- Leyva A, Palacios JM & Ruiz-Argueso T (1987) Conserved Plasmid Hydrogen-Uptake (hup)-Specific Sequences within Hup *Rhizobium leguminosarum* Strains. *Appl Environ Microbiol* **53**: 2539-2543.
- Li PL, Everhart DM & Farrand SK (1998) Genetic and sequence analysis of the pTic58 trb locus, encoding a mating-pair formation system related to members of the type IV secretion family. *Journal of Bacteriology* **180**: 6164-6172.
- Lopez-Fuentes E, Torres-Tejerizo G, Cervantes L & Brom S (2015) Genes encoding conserved hypothetical proteins localized in the conjugative transfer region of plasmid pRet42a from *Rhizobium etli* CFN42 participate in modulating transfer and affect conjugation from different donors. *Front Microbiol* **5**: 793.
- Lorenz MG & Wackernagel W (1994) Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiol Rev* **58**: 563-602.
- Love MI, Huber W & Anders S (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* **15**: 550.
- Luo ZQ & Farrand SK (1999) Signal-dependent DNA binding and functional domains of the quorum-sensing activator TraR as identified by repressor activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 9009-9014.
- Masson-Boivin C, Giraud E, Perret X & Batut J (2009) Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes? *Trends Microbiol* **17**: 458-466.

- McAnulla C, Edwards A, Sanchez-Contreras M, Sawers RG & Downie JA (2007) Quorum-sensing-regulated transcriptional initiation of plasmid transfer and replication genes in *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*. *Microbiology* **153**: 2074-2082.
- McIntosh M, Krol E & Becker A (2008) Competitive and cooperative effects in quorum-sensing-regulated galactoglucan biosynthesis in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **190**: 5308-5317.
- Mercado-Blanco J & Toro N (1996) Plasmids in Rhizobia: the role of nonsymbiotic plasmids. *Molecular Plant Microbe Interaction* **9**: 535-545.
- Metsalu T & Vilo J (2015) ClustVis: a web tool for visualizing clustering of multivariate data using Principal Component Analysis and heatmap. *Nucleic Acids Res* **43**: W566-570.
- Meyer F, Goesmann A, McHardy AC, *et al.* (2003) GenDB--an open source genome annotation system for prokaryote genomes. *Nucleic Acids Res* **31**: 2187-2195.
- Miller RV (2004) Bacteriophage-mediated transduction: An engine for change and evolution. *Microbial Evolution: Gene Establishment, Survival, and Exchange*, (Miller RV DM, ed.) p. 144-157. ASM Press, Washington DC.
- Miranda-Rios J, Navarro M & Soberon M (2001) A conserved RNA structure (*thi* box) is involved in regulation of thiamin biosynthetic gene expression in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**: 9736-9741.
- Moscoso M & Claverys JP (2004) Release of DNA into the medium by competent *Streptococcus pneumoniae*: kinetics, mechanism and stability of the liberated DNA. *Mol Microbiol* **54**: 783-794.
- Nealson KH (1977) Autoinduction of bacterial luciferase. Occurrence, mechanism and significance. *Arch Microbiol* **112**: 73-79.
- Nealson KH, Platt T & Hastings JW (1970) Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *J Bacteriol* **104**: 313-322.
- Niehaus K & Becker A (1998) The role of microbial surface polysaccharides in the *Rhizobium*-legume interaction. *Subcell Biochem* **29**: 73-116.
- Nielsen KM, Bones AM & Van Elsas JD (1997) Induced natural transformation of *Acinetobacter calcoaceticus* in soil microcosms. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY* **63**: 3972-3977.
- Nilsson JF, Castellani LG, Draghi WO, Pérez-Giménez J, Torres Tejerizo GA & Pistorio M (2019) Proteomic Analysis of *Rhizobium favelukesii* LPU83 in Response to Acid Stress. *Journal of Proteome Research* **18**: 3615-3629.
- Nilsson JF, Castellani LG, Draghi WO, *et al.* (2020) Global transcriptome analysis of *Rhizobium favelukesii* LPU83 in response to acid stress. *FEMS Microbiol Ecol* **97**.
- Nogales J, Blanca-Ordóñez H, Olivares J & Sanjuán J (2013) Conjugal transfer of the *Sinorhizobium meliloti* 1021 symbiotic plasmid is governed through the concerted action of one- and two-component signal transduction regulators. *Environmental Microbiology* **15**: 811-821.
- Nudler E & Mironov AS (2004) The riboswitch control of bacterial metabolism. *Trends in biochemical sciences* **29**: 11-17.
- Ochman H & Moran NA (2001) Genes lost and genes found: evolution of bacterial pathogenesis and symbiosis. *Science* **292**: 1096-1099.
- Ochman H, Lawrence JG & Grolsman EA (2000) Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature* **405**: 299-304.
- Oldroyd GE (2013) Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nat Rev Microbiol* **11**: 252-263.
- Ollis DL, Cheah E, Cygler M, *et al.* (1992) The alpha/beta hydrolase fold. *Protein engineering* **5**: 197-211.
- Pappas KM & Winans SC (2003) A LuxR-type regulator from *Agrobacterium tumefaciens* elevates Ti plasmid copy number by activating transcription of plasmid replication genes. *Mol Microbiol* **48**: 1059-1073.
- Peoples MB & Herridge DF (1990) Nitrogen fixation by legumes in tropical and sub-tropical agriculture. *Adv Agron* **44**: 155-224.

Peoples MB & Craswell ET (1992) Biological nitrogen fixation: Investments, expectations and actual contributions to agriculture. *Plant Soil* **141**: 13-39.

Perez-Mendoza D, Lucas M, Munoz S, Herrera-Cervera JA, Olivares J, de la Cruz F & Sanjuan J (2006) The relaxase of the *Rhizobium etli* symbiotic plasmid shows *nic* site cis-acting preference. *J Bacteriol* **188**: 7488-7499.

Pérez-Mendoza D, Sepúlveda E, Pando V, *et al.* (2005) Identification of the *rctA* gene, which is required for repression of conjugative transfer of rhizobial symbiotic megaplasmids. *J Bacteriol* **187**: 7341-7350.

Piper KR, Beck von Bodman S & Farrand SK (1993) Conjugation factor of *Agrobacterium tumefaciens* regulates Ti plasmid transfer by autoinduction. *Nature* **362**: 448-450.

Pistorio M, Del Papa MF, Balagué LJ & Lagares A (2003) Identification of a transmissible plasmid from an Argentine *Sinorhizobium meliloti* strain which can be mobilised by conjugative helper functions of the European strain *S. meliloti* GR4. *FEMS Microbiol Lett* **225**: 15-21.

Pistorio M, Torres Tejerizo GA, Del Papa MF, de Los Angeles Giusti M, Lozano M & Lagares A (2013) *rptA*, a novel gene from *Ensifer (Sinorhizobium) meliloti* involved in conjugal transfer. *FEMS Microbiol Lett* **345**: 22-30.

Pistorio M, Balagué LJ, Del Papa MF, Pich-Otero A, Lodeiro A, Hozbor DF & Lagares A (2002) Construction of a *Sinorhizobium meliloti* strain carrying a stable and non-transmissible chromosomal single copy of the green fluorescent protein GFP-P64L/S65T. *FEMS Microbiol Lett* **214**: 165-170.

Pistorio M, Giusti MA, Del Papa MF, Draghi WO, Lozano MJ, Tejerizo GT & Lagares A (2008) Conjugal properties of the *Sinorhizobium meliloti* plasmid mobilome. *FEMS Microbiol Ecol* **65**: 372-382.

Poehlein A, Freese H, Daniel R & Simeonova DD (2016) Genome sequence of *Shinella* sp. strain DD12, isolated from homogenized guts of starved *Daphnia magna*. *Stand Genomic Sci* **11**: 14.

Pueppke SG & Broughton WJ (1999) *Rhizobium* sp. strain NGR234 and *R. fredii* USDA257 share exceptionally broad, nested host ranges. *Mol Plant Microbe Interact* **12**: 293-318.

Quandt J & Hynes MF (1993) Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in gram-negative bacteria. *Gene* **127**: 15-21.

Romero D & Brom S (2004) The symbiotic plasmids of the *Rhizobiaceae*. *Plasmid Biology* (Phillips G & Funnell B, eds.), p.. 271–290. ASM Press, Washington DC.

Rosenberg C & Huguet T (1984) The pAtC58 plasmid of *Agrobacterium tumefaciens* is not essential for tumour induction. *Molecular and General Genetics MGG* **196**: 533-536.

Rost B (1999) Twilight zone of protein sequence alignments. *Protein engineering* **12**: 85-94.

Roy S, Liu W, Nandety RS, Crook A, Mysore KS, Pislariu CI, Frugoli J, Dickstein R & Udvardi MK (2020) Celebrating 20 Years of Genetic Discoveries in Legume Nodulation and Symbiotic Nitrogen Fixation. *Plant Cell* **32**: 15-41.

Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Second Edition)*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

Schäfer A, Tauch A, Jäger W, Kalinowski J, Thierbach G & Pühler A (1994) Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* **145**: 69-73.

Schneider MV & Orchard S (2011) Omics technologies, data and bioinformatics principles. *Methods Mol Biol* **719**: 3-30.

Segundo E, Martínez-Abarca F, Dillewijn Pv, Fernández-López M, Lagares A, Martínez-Drets G, Niehaus K, Pühler A & Toro N (1999) Characterisation of symbiotically efficient alfalfa-nodulating rhizobia isolated from acid soils of Argentina and Uruguay. *FEMS Microbiology Ecology* **28**: 169-176.

Sepúlveda E, Pérez-Mendoza D, Ramírez-Romero MA, Soto MJ, López-Lara IM, Geiger O, Sanjuán J, Brom S & Romero D (2008) Transcriptional interference and repression modulate the conjugative ability of the symbiotic plasmid of *Rhizobium etli*. *J Bacteriol* **190**: 4189-4197.

Shaw PD, Ping G, Daly SL, Cha C, Cronan JE, Jr., Rinehart KL & Farrand SK (1997) Detecting and characterizing N-acyl-homoserine lactone signal molecules by thin-layer chromatography. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 6036-6041.

Shi M, Zhang X, Pei G, Chen L & Zhang W (2017) Functional Diversity of Transcriptional Regulators in the *Cyanobacterium Synechocystis* sp. PCC 6803. *Front Microbiol* **8**: 280.

Simon R, Priefer U & Pühler A (1983) A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: Transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Bio/Technology* **1**: 784-791.

Singh PK, Ramachandran G, Ramos-Ruiz R, Peiro-Pastor R, Abia D, Wu LJ & Meijer WJ (2013) Mobility of the Native *Bacillus subtilis* Conjugative Plasmid pLS20 Is Regulated by Intercellular Signaling. *PLoS Genet* **9**: e1003892.

Singh PK, Serrano E, Ramachandran G, et al. (2020) Reversible regulation of conjugation of *Bacillus subtilis* plasmid pLS20 by the quorum sensing peptide responsive anti-repressor RappLS20. *Nucleic Acids Res* **48**: 10785-10801.

Skorupska A, Derylo M & Golinowski W (1991) The region for exopolysaccharide synthesis in *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* is located on the non-symbiotic plasmid. *Acta biochimica Polonica* **38**: 423-435.

Smillie C, Garcillan-Barcia MP, Francia MV, Rocha EP & de la Cruz F (2010) Mobility of plasmids. *Microbiol Mol Biol Rev* **74**: 434-452.

Sonnhammer EL, von Heijne G & Krogh A (1998) A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. *Proceedings International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology* **6**: 175-182.

Soucy SM, Huang J & Gogarten JP (2015) Horizontal gene transfer: building the web of life. *Nat Rev Genet* **16**: 472-482.

Stiens M, Schneiker S, Keller M, Kuhn S, Pühler A & Schlüter A (2006) Sequence analysis of the 144-kilobase accessory plasmid pSmeSM11a, isolated from a dominant *Sinorhizobium meliloti* strain identified during a long-term field release experiment. *Appl Environ Microbiol* **72**: 3662-3672.

Subramoni S, González JF, Johnson A, Pechy-Tarr M, Rochat L, Paulsen I, Loper JE, Keel C & Venturi V (2011) Bacterial subfamily of LuxR regulators that respond to plant compounds. *Appl Environ Microbiol* **77**: 4579-4588.

Sukdeo N & Charles TC (2003) Application of crossover-PCR-mediated deletion-insertion mutagenesis to analysis of the bdhA-xdhA2-xdhB2 mixed-function operon of *Sinorhizobium meliloti*. *Arch Microbiol* **179**: 301-304.

Sullivan JT & Ronson CW (1998) Evolution of rhizobia by acquisition of a 500-kb symbiosis island that integrates into a phe-tRNA gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 5145-5149.

Sullivan JT, Patrick HN, Lowther WL, Scott DB & Ronson CW (1995) Nodulating strains of *Rhizobium loti* arise through chromosomal symbiotic gene transfer in the environment. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 8985-8989.

Tepfer D, Goldmann A, Pamboukdjian N, Maille M, Lepingle A, Chevalier D, Denarie J & Rosenberg C (1988) A plasmid of *Rhizobium meliloti* 41 encodes catabolism of two compounds from root exudate of *Calystegium sepium*. *J Bacteriol* **170**: 1153-1161.

Terpolilli JJ, Masakapalli SK, Karunakaran R, Webb IU, Green R, Watmough NJ, Kruger NJ, Ratcliffe RG & Poole PS (2016) Lipogenesis and Redox Balance in Nitrogen-Fixing Pea Bacteroids. *J Bacteriol* **198**: 2864-2875.

Thomas CM & Nielsen KM (2005) Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nat Rev Microbiol* **3**: 711-721.

Torres Tejerizo G, Del Papa MF, Giusti MA, Draghi W, Lozano M, Lagares A & Pistorio M (2010) Characterization of extrachromosomal replicons present in the extended host range *Rhizobium* sp. LPU83. *Plasmid* **64**: 177-185.

Torres Tejerizo G, Giusti MA, Del Papa MF, Lozano M, Draghi W, Jofre E, Lagares A & Pistorio M (2010) *Horizontal Gene Transfer, generalities and lessons from rhizobia*.

Torres Tejerizo G, Pistorio M, Althabegoiti MJ, Cervantes L, Wibberg D, Schluter A, Puhler A, Lagares A, Romero D & Brom S (2014) Rhizobial plasmid pLPU83a is able to switch between different transfer machineries depending on its genomic background. *FEMS Microbiol Ecol* **88**: 565–578.

Torres Tejerizo G, Banuelos LA, Cervantes L, Gaytan P, Pistorio M, Romero D & Brom S (2015) Development of molecular tools to monitor conjugative transfer in rhizobia. *J Microbiol Methods* **117**: 155-163.

Torres Tejerizo G, Del Papa MF, Draghi W, *et al.* (2011) First genomic analysis of the broad-host-range *Rhizobium* sp. LPU83 strain, a member of the low-genetic diversity Oregon-like *Rhizobium* sp. group. *Journal of Biotechnology* **155**: 3-10.

Tun-Garrido C, Bustos P, González V & Brom S (2003) Conjugative transfer of p42a from *Rhizobium etli* CFN42, which is required for mobilization of the symbiotic plasmid, is regulated by quorum sensing. *J Bacteriol* **185**: 1681-1692.

Tung WL & Chow KC (1995) A modified medium for efficient electrotransformation of *E. coli*. *Trends Genet* **11**: 128-129.

Vanderlinde EM, Hynes MF & Yost CK (2014) Homoserine catabolism by *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 3841 requires a plasmid-borne gene cluster that also affects competitiveness for nodulation. *Environ Microbiol* **16**: 205-217.

Velazquez E, Mateos PF, Pedrero P, Dazzo FB & Martinez-Molina E (1995) Attenuation of Symbiotic Effectiveness by *Rhizobium meliloti* SAF22 Related to the Presence of a Cryptic Plasmid. *Appl Environ Microbiol* **61**: 2033-2036.

Vieira J & Messing J (1982) The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* **19**: 259-268.

Vincent JM (1970) *A Manual for the Practical Study of the Root-Nodule Bacteria*. IBP Handbook No. 15, Blackwell Scientific, Oxford.

von Bodman SB, McCutchan JE & Farrand SK (1989) Characterization of conjugal transfer functions of *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid pTiC58. *J Bacteriol* **171**: 5281-5289.

Waksman G (2019) From conjugation to T4S systems in Gram-negative bacteria: a mechanistic biology perspective. *EMBO Rep* **20**.

Waters CM & Bassler BL (2005) Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**: 319-346.

Wathugala ND, Hemananda KM, Yip CB & Hynes MF (2020) Defining the requirements for the conjugative transfer of *Rhizobium leguminosarum* plasmid pRleVF39b. *Microbiology* **166**: 318-331.

Wegener C, Schröder S, Kapp D, *et al.* (2001) Genetic uniformity and symbiotic properties of acid-tolerant alfalfa-nodulating rhizobia isolated from dispersed locations throughout Argentina. *Symbiosis* **30**: 141-162.

Wetzel ME, Olsen GJ, Chakravartty V & Farrand SK (2015) The *repABC* Plasmids with Quorum-Regulated Transfer Systems in Members of the Rhizobiales Divide into Two Structurally and Separately Evolving Groups. *Genome biology and evolution* **7**: 3337-3357.

Wibberg D, Torres Tejerizo G, Del Papa MF, Martini C, Puhler A, Lagares A, Schluter A & Pistorio M (2014) Genome sequence of the acid-tolerant strain *Rhizobium* sp. LPU83. *J Biotechnol* **176C**: 40-41.

Zhang S & Meyer R (1997) The relaxosome protein MobC promotes conjugal plasmid mobilization by extending DNA strand separation to the nick site at the origin of transfer. *Mol Microbiol* **25**: 509-516.

