

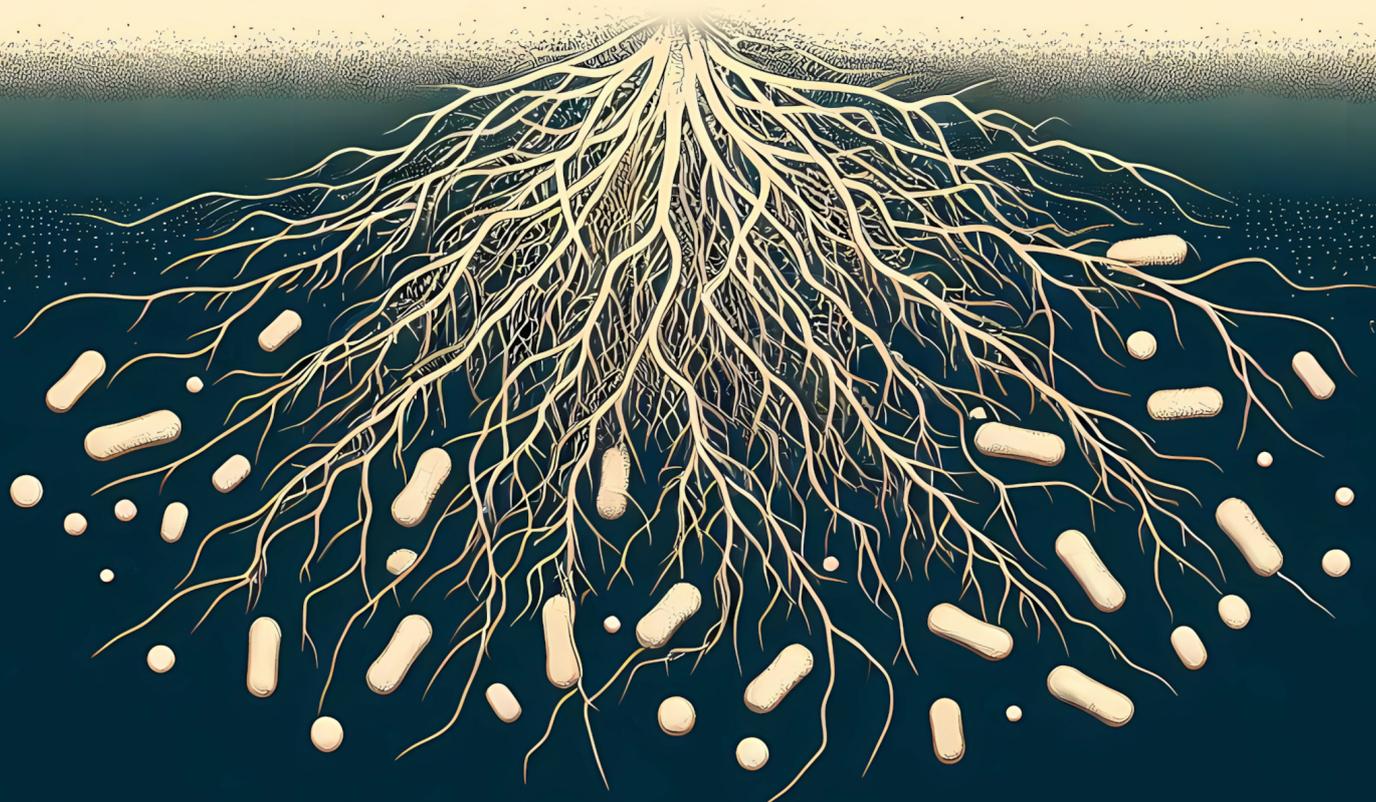
Mejoramiento de biofertilizantes para la agricultura:

Estrategias para el mejoramiento de la supervivencia de *Sinorhizobium meliloti* en preparaciones de bioinoculantes y de su competitividad por la colonización temprana de raíces de alfalfa

Tesista: **Lic. Ezequiel Gerardo Mogro**

Directores: **Dr. Mauricio Javier Lozano**
Dr. Walter Omar Draghi

Julio 2024





UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral:

Mejoramiento de biofertilizantes para la agricultura:

Estrategias para el mejoramiento de la supervivencia de Sinorhizobium meliloti en preparaciones de bioinoculantes y de su competitividad por la colonización temprana de raíces de alfalfa

Tesista: Lic. Ezequiel Gerardo Mogro

Directores: Dr. Mauricio Javier Lozano

Dr. Walter Omar Draghi

Año: 2024

El presente trabajo de Tesis para optar al grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas ha sido realizado en el Instituto de Biotecnología y Biología Molecular (IBBM) de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata – CCT – La Plata –CONICET, bajo la dirección del Dr. Mauricio Javier Lozano y del Dr. Walter Omar Draghi.

Mi reconocimiento,

A la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, por haberme dado la oportunidad de realizar mis estudios de grado como alumno de la carrera de Biotecnología y Biología Molecular y este trabajo de tesis como alumno de posgrado del Doctorado de la Facultad de Ciencias Exactas.

Al Instituto de Biotecnología y Biología Molecular (IBBM), por permitirme utilizar sus instalaciones, equipos y material necesario para desarrollar este trabajo.

Al Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación (MinCyT) y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por el otorgamiento de las becas que posibilitaron mi dedicación a la investigación científica.

A REFRACT y la Unión Europea por darme la posibilidad de conocer dos nuevos institutos y ampliar mis conocimientos.

Mis agradecimientos,

A Mauri y Walter, por dirigir este trabajo, por aceptarme como su primer becario, por todas las enseñanzas, la ayuda y la paciencia que me brindaron todos estos años y por darme la oportunidad de crecer en mi formación académica.

A Lu, que a pesar de que todavía pasamos más tiempo lejos que juntos, siempre estuviste cerca, por todo el amor, la alegría, el apoyo, la calma, la confianza y tantas cosas más que nos dimos desde el primer día, y por acompañarme estas semanas tan complicadas.

A Norma y Pedro, mis viejos, por haberme dado tanto, aunque a veces costaba más, hicieron que nunca me falte nada, en especial su apoyo y ayuda en todo lo que necesite.

Al Chiri y el Edu, por acompañarme, ayudarme y estar siempre, por darme el orgullo y la alegría de ser su hermano.

A la Pelu y a la Cuca, mis compas caninas, por ser infumablemente hermosas, por todas las mordidas y los rayones al auto, un poquito las odio, pero más las quiero.

A Les, por todos los años de soportarnos y acompañarnos, por tu amistad y las vacaciones juntos en el sur y las que nos debemos.

A Nico, por tu amistad, por acompañarme en esa locura viaje que hicimos, por las risas, la compañía y las coquitas después de almorzar.

A Nano, por que después de tantos años seguís siendo ese amigo que siempre está, por todos los recuerdos y por todo el tiempo que compartimos desde la escuela hasta hoy.

A Caro, Abru L., Sofi, Rama, Coti, Delfi, Agus, Abru P., Cata, Gonza, Kei, Pili, por las horas de mesada, mates y almuerzos que compartimos.

A Tony, Flor, Mariano, Gonza, Charly y Martín por las enseñanzas y el apoyo.

A los que conocí desde que llegué al IBBM y me acompañaron desde el inicio, y especialmente a Yuli y Florcita por su amistad.

A todos los que forman parte del IBBM y tuvieron siempre buena onda.

A todos, MUCHAS GRACIAS POR TANTO

ÍNDICE

Publicaciones relacionadas a este trabajo.....	12
I. INTRODUCCIÓN.....	14
I.1. La fijación biológica de nitrógeno y su importancia en el contexto de una agricultura sustentable.....	15
Estrategias actualmente utilizadas para la producción de mejores bioinoculantes.	17
I.2. La simbiosis fijadora de nitrógeno rizobio-leguminosa	19
I.2.1. Generalidades de los rizobios y las plantas leguminosas	19
I.2.2. Los rizobios y su vida libre.....	20
Los eventos de vida libre son determinantes de la competitividad y vida simbiótica del rizobio.	21
I.2.3. Eventos iniciales de la interacción rizobio-leguminosa.	21
Definición, estructura y dinámica de la rizósfera	21
Perfil transcripcional de los rizobios en la rizósfera	23
Llegada a la rizósfera: Quimiotaxis y movilidad.....	24
I.3 Los rizobios y el estrés	25
I.3.1 Sinorhizobium meliloti y el estrés ácido	26
I.4 Identificación de determinantes de la competencia por la competitividad por la colonización rizosférica y la supervivencia en formulaciones de bioinoculantes mediante Signature-Tagged-Mutagénesis (STM)	27
II. OBJETIVOS.....	32
II.1 Objetivo general.....	33
II.2 Objetivos Específicos.....	33
III. MATERIALES Y MÉTODOS	34
III.1. Procedimientos Microbiológicos	35
III.1.1. Cultivos bacterianos.....	35
Condiciones de crecimiento.....	35
Curvas de crecimiento	36
Antibióticos	37
Medios de conservación	37
III.1.2. Cepas bacterianas y plásmidos utilizados.....	37
III.1.3. Transferencia de ADN	38
Transformación - Electroporación	39

Conjugación.....	39
III.2. Técnicas de Biología Molecular.....	40
III.2.1 Construcciones genéticas y manipulación de ADN.....	40
Preparaciones de ADN plasmídico.....	40
Purificación de bandas de gel de agarosa.....	40
Determinación de concentraciones de ADN.....	41
Electroforesis en geles de agarosa.....	41
Tratamientos enzimáticos del ADN.....	41
III.2.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y PCR cuantitativa (qPCR)	42
PCR y oligonucleótidos.....	42
III.3. Ensayos de plantas.....	43
III.3.1 Esterilización y germinación de semillas.....	43
III.3.2 Condiciones de cultivo	43
III.3.3 Ensayo de coinoculación de cepa salvaje y mutante para la evaluación de la competitividad por la colonización de la rizósfera de plantas de alfalfa.....	43
Inóculo inicial y mezcla de entrada.....	43
Ensayos y procesamiento de plantas.....	44
Observación de fluorescencia verde debida a la expresión de GFP	44
Ensayo de sobrevivencia en inoculante tipo turba	44
III.4. Métodos bioinformáticos	46
III.4.1 Búsqueda por similitud secuencial, bases de datos y alineamientos múltiples	46
III.4.2 Modelado molecular y búsquedas por similitud estructural.....	46
III.4.3 Secuencias y genomas utilizados en este trabajo.....	46
III.4.4 Cálculo de distancias genómicas.....	47
III.4.5 Análisis realizados mediante ISCompare	47
Optimización de parámetros y validación del programa.....	47
Identificación de DLIS en rizobios	49
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	51
IV.1 Validación del fenotipo en turba de mutantes STM.....	52
IV.1.2 Ensayos de validación por coinoculación salvaje vs. mutante	52
IV.1.3 Estado fisiológico de las bacterias recuperadas del inoculante tipo turba	56
IV.1.4 Ensayo de validación por crecimiento individual de mutantes en inóculos altos.....	58
IV.2 Selección de genes para sobreexpresión.....	60
IV.2.1 Caracterización bioinformática de los genes seleccionados	63

IV.3 Clonado de los genes seleccionados para sobreexpresión.....	72
IV.4 Evaluación del fenotipo de competencia por la colonización en cepas que sobreexpresan los genes de interés.....	78
IV.5 Selección de condiciones en batch que inducen un estado de alta competitividad por la colonización.	84
IV.6 Análisis de eventos recientes de transposición en rizobios mediante ISCompare	90
IV.6.1. ISCompare.....	91
Algoritmo de ISCompare.....	91
Optimización de parámetros de ISCompare.....	92
Evaluación de ISCompare.....	94
IV.6.2 Identificación y análisis funcional de eventos recientes de transposición de IS en rizobios.	97
V. CONCLUSIONES.....	106
VI. PERSPECTIVAS.....	109
VII. BIBLIOGRAFÍA	111
VIII. APÉNDICES.....	129
A1. Secuencias genómicas utilizadas en este trabajo.....	130
A2. Información obtenida de bases de datos públicas	135
A3. Curvas de crecimiento de los mutantes seleccionados para ensayo de validación del fenotipo en turba.....	139

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.2.3.1. Esquema de una sección de rizósfera. Localización de rizodepósitos.....	22
Figura 1.4.1.1. Esquema de los miniTn5-STM construidos por Pobilgaylo et al. (2006).....	28
Figura 1.4.1.2. Esquema de ensayo de mutagénesis etiquetada por firmas (STM).	28
Figura 1.4.1.3. Clasificación funcional de genes seleccionados por STM por su efecto negativo (A) o positivo (B) sobre la colonización de raíces de alfalfa analizadas a los 3 d.p.i.	29
Figura 1.4.1.4. Distribución funcional de proteínas involucradas en el fitness durante la maduración y almacenamiento de inoculantes tipo turba.....	30
Figura 3.3.3.1. Esquema de ensayo de validación de sobrevida en turba.....	45
Figura 4.1.2.1. Ejemplo de placa de recuentos para el cálculo de la proporción entre la cepa salvaje (GFP, colonias brillantes) y la cepa mutante (Colonias oscuras).	53
Figura 4.1.2.2. Ensayos de validación por coinoculación de las cepas salvaje y mutante en iguales proporciones.	55
Figura 4.1.2.3. Resultado de los experimentos de validación.	56
Figura 4.1.4.1. Evaluación del fenotipo afectado en la sobrevida en inoculante tipo turba.....	59
Figura 4.2.1.1. Análisis bioinformático de SMc03883.....	64
Figura 4.2.1.2. Análisis bioinformático de SMc00810.....	65
Figura 4.2.1.3. Análisis bioinformático de SMa1465.	68
Figura 4.2.1.4. Análisis bioinformático de SMc02702.....	70
Figura 4.3.1. Esquema de la estrategia de clonado por Gibson assembly.....	72
Figura 4.3.2. Esquema de estrategia de clonado inicial en vector pFAJ1708 por el método de Gibson Assembly.	74
Figura 4.3.3. Esquema de estrategia de clonado alternativo en vector pBBRMCS1-Gm.	75
Figura 4.3.4. Esquema de estrategia de subclonado al vector pSRKGm.....	76
Figura 4.3.5. Geles de electroforesis de construcciones en PSRKGm.....	77
Figura 4.4.1. Resultados de los ensayos de competencia por la colonización rizosférica por coinoculación en proporciones 1:1 salvaje mutante para réplicas técnicas.	81
Figura 4.4.2. Resultados de los ensayos de competencia por la colonización rizosférica por coinoculación en proporciones 1:1 salvaje mutante para réplicas biológicas del ensayo valores M para los ensayos de competencia.	82
Figura 4.5.1. Ensayo de competencia con cultivos sometidos a estrés.....	88
Figura 4.6.1.1. Algoritmo de ISCompare.....	93
Figura 4.6.1.2. En verde la sensibilidad y precisión de la identificación de DLIS mediante ISCompare para diferentes largos de región flanqueante.	94
Figura 4.6.1.3. Evaluación de la performance de ISCompare.....	96

Figura 4.6.2.1. Distribución de genes relacionados con transposasas e ISs normalizados.....	98
Figura 4.6.2.2 Distribución de DLIS. Cromosomas vs. plásmidos.....	99
Figura 4.6.2.3. Proporción de IS recientemente activas.	100
Figura 4.6.2.4. Distribución de DLIS en regiones codificantes e intergénicas.	100
Figura 4.6.2.5. Distribución de las categorías funcionales COG.	102

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 3.1.1.1 Composición de medio LB.....	35
Tabla 3.1.1.2. Composición de medio TY.....	35
Tabla 3.1.1.3. Composición de medio Evans.....	36
Tabla 3.1.1.4. Composición de medio mineral Vincent	36
Tabla 3.1.1.5. Antibióticos.	37
Tabla 3.1.1.6. Cepas y plásmidos utilizados.....	38
Tabla 3.1.1.7. Plásmidos utilizados en este trabajo.....	38
Tabla 3.2.2.1. Secuencia de oligonucleótidos utilizado en este trabajo.....	43
Tabla 4.1.2.1 Lista de mutantes evaluados en ensayo de sobrevida en turba.....	54
Tabla 4.1.3.1. Velocidades de crecimiento y tiempo de latencia para cultivos en medio TY.....	57
Tabla 4.1.4.1. Valores M de cada mutante en ensayos STM de sobrevida en turba.....	58
Tabla 4.2.1 Valores de fitness correspondientes al cultivo en medio LB para los genes seleccionados.	61
Tabla 4.2.2. Valores M (log ₂ Fold Change) de inducción/represión en nódulos/planta para los genes seleccionados.....	61
Tabla 4.2.3. Genes seleccionados para validación de fenotipo alterado de colonización rizosférica y para la evaluación del efecto de su sobreexpresión.....	62
Tabla 4.3.1. Condiciones para la obtención de amplicones.....	73
Tabla 4.4.1. Valores M para ensayos en competencia en distintas condiciones.....	79
Tabla 4.5.1 Número de genes inducidos en experimentos transcriptómicos y con un fenotipo alterado de colonización rizosférica y supervivencia en inoculantes tipo turba.....	85
Tabla 4.5.2. Genes sobreexpresados por shock salino.	86
Tabla 4.5.3. Genes sobreexpresados por shock osmótico.....	87
Tabla 4.5.4. Genes sobreexpresados por shock ácido.....	87
Tabla 4.6.2.1 Lista de genes interrumpidos por una DLIS y anotados con un nombre de gen en la cepa de referencia.....	104

Publicaciones relacionadas a este trabajo

Durante la realización de este Trabajo de Tesis Doctoral, parte de los resultados se publicaron en los siguientes artículos en revistas internacionales con referato:

MOGRO, EZEQUIEL G.; AMBROSIS, NICOLÁS M.; LOZANO, MAURICIO J. *Easy identification of insertion sequence mobilization events in related bacterial strains with ISCompare. G3: Genes, Genomes, Genetics.: Genetics Society of America.* 2021; 11(8):jkab181. doi:10.1093/g3journal/jkab181

LOZANO, MAURICIO J.; **MOGRO, EZEQUIEL G.**; SALAS, M. EUGENIA; ERDOZAIN, SOFÍA A.; ZUBER, NICOLÁS E.; BECKER, ANKE; LAGARES, ANTONIO. *Identification of Ensifer meliloti genes required for survival during peat-based bioinoculant maturation by STM-seq.* J Biotechnol. 2023 Jan 20;362:12-23. 2022. doi: 10.1016/j.jbiotec.2022.12.004

EZEQUIEL G. MOGRO, WALTER DRAGHI, ANTONIO LAGARES, MAURICIO J. LOZANO. *Identification and functional analysis of recent IS transposition events in rhizobia.* March 2024. bioRxiv. DOI: 10.1101/2024.03.21.586147

En paralelo se realizaron colaboraciones que fueron publicadas en artículos científicos:

MOGRO, EZEQUIEL G.; CAFIERO, JUAN H.; LOZANO, MAURICIO J.; DRAGHI, WALTER O. *The phylogeny of the genus Azohydromonas supports its transfer to the family Comamonadaceae.* International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2022 vol.72 n°2. doi:10.1099/ijsem.0.005234

MOGRO, EZEQUIEL G.; BOTTERO, D.; LOZANO, MAURICIO J. *Analysis of SARS-CoV-2 synonymous codon usage evolution throughout the COVID-19 pandemic.* Virology. 2022; 568:56-71. doi: 10.1016/j.virol.2022.01.011

NILSSON, JULIET F.; CASTELLANI, LUCAS G.; DRAGHI, WALTER O.; **MOGRO, EZEQUIEL G.**; WIBBERG, DANIEL; WINKLER, ANIKA; HANSEN, L.H.; SCHLUÜTER, ANDREAS; PUÜHLER, ALFRED; KALINOWSKI, JÖRN; TEJERIZO, GONZALO A. TORRES; PISTORIO, MARIANO. *Global transcriptome analysis of Rhizobium favelukesii LPU83 in response to acid stress.* Fems Microbiology Ecology. Wiley-Blackwell Publishing, Inc. 2021;97(1):fiaa235. doi:10.1093/femsec/fiaa235

LOZANO, MAURICIO J.; **MOGRO, EZEQUIEL G.**; DRAGHI, WALTER O. *Phylogenomic analysis supports the reclassification of Burkholderia novacaledonica as Caballeronia novacaledonica comb. nov.* International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2021;72(2). 10.1099/ijsem.0.004843

DRAGHI, WALTER O.; LOZANO, MAURICIO J.; **MOGRO, EZEQUIEL G.**; DEL PAPA, M. FLORENCIA; LAGARES, ANTONIO. *Acid-modulated phenotypes as desirable targets for biofertilizer formulations.* Environmental Sustainability. 2022. doi: 10.1007/s42398-022-00249-2

Publicación de protocolos

EZEQUIEL G. MOGRO, NICOLAS AMBROSIS, MAURICIO LOZANO. Finding insertion sequence mobilization events with ISCompare. Protocols.io (dx.doi.org/10.17504/protocols.io.bst6nere)

I. INTRODUCCIÓN

I.1. La fijación biológica de nitrógeno y su importancia en el contexto de una agricultura sustentable

El nitrógeno, junto con otros elementos como el oxígeno, hidrógeno y carbono, es esencial para la vida celular, formando parte de moléculas fundamentales como aminoácidos, nucleótidos, vitaminas y pigmentos. Aunque abunda en la atmósfera y en rocas sedimentarias, su disponibilidad limitada para las plantas, que solo pueden absorberlo en formas reducidas, afecta su crecimiento. Además, tanto animales como humanos obtienen su nutrición nitrogenada indirectamente de las plantas.

Durante las últimas cinco décadas del siglo XX, la población mundial se duplicó en gran medida debido a nuevas prácticas agrícolas, como el uso extendido de fertilizantes nitrogenados producidos industrialmente mediante el proceso Haber-Bosch (Olivares et al., 2013). Estos fertilizantes han sido clave para aumentar la producción de alimentos, pero su producción y uso masivo tienen impactos ecológicos significativos en el suelo, el agua y el aire. La producción industrial de amonio a partir de nitrógeno molecular requiere grandes cantidades de energía no renovable, y la eficiencia de su absorción por los cultivos es baja, lo que resulta en la liberación de gases nitrogenados que contribuyen al calentamiento global, la degradación de la capa de ozono y la lluvia ácida.

Además, las prácticas agrícolas intensivas pueden provocar la lixiviación del nitrógeno residual hacia aguas superficiales y subterráneas, causando la eutrofización de cuerpos de agua. Se están explorando alternativas como fertilizantes de liberación lenta e inhibidores de la nitrificación, pero el foco principal está en optimizar la fijación biológica de nitrógeno, proceso mediante el cual ciertos organismos convierten el nitrógeno atmosférico en amonio para su utilización por parte de las plantas (Cassman et al., 2002).

La capacidad de bioconvertir el di-nitrógeno atmosférico (N_2) en formas asimilables está limitada a un conjunto de organismos procariontes conocidos como diazótrofos (di: dos; azo: nitrógeno; trofo: alimento). Estos organismos son responsables de aproximadamente el 60% del nitrógeno fijado en el ciclo de este elemento. Los diazótrofos habitan una amplia gama de entornos y, aunque son taxonómicamente diversos, comparten una maquinaria conservada para la reducción del nitrógeno. Esta maquinaria consta de un complejo de metalo-enzimas llamado complejo nitrogenasa. Se ha investigado ampliamente la nitrogenasa a nivel molecular en diversas especies (Halbleib & Ludden, 2000; Kim & Rees, 1994; Rees & Howard, 2000), y se caracteriza por ser muy sensible al oxígeno (O_2), siendo inactivada de manera irreversible por este gas. Por lo tanto, los diazótrofos realizan la fijación únicamente en ambientes anaeróbicos o microaerófilos. Dependiendo del entorno en el que logran reducir los niveles de O_2 , se clasifican en: a) fijadores de vida libre, como bacterias de los géneros *Azotobacter*, *Bacillus*, *Clostridium* y *Klebsiella*; b) fijadores asociados, que solo pueden fijar nitrógeno en entornos de microaerofilia generados por la presencia de la raíz de la planta asociada, como el género *Azospirillum*, capaz de asociarse con varios miembros de la familia

de Poaceae (pastos); y c) fijadores simbióticos, que solo pueden fijar nitrógeno cuando forman parte de una relación simbiótica con una planta huésped. Ejemplos de este grupo incluyen algunos géneros de actinomicetos (*Frankia*) y cianobacterias (*Anabaena* y *Nostoc*), así como el conjunto de α y β -proteobacterias conocido como rizobios, capaces de establecer simbiosis con plantas leguminosas (Wagner, 2011). Aunque todos los diazotrofos mencionados anteriormente desempeñan un papel importante en el ciclo del nitrógeno, la asociación de los rizobios con las plantas leguminosas se considera de mayor importancia ecológica.

Las leguminosas son solo superadas por las gramíneas en términos de importancia alimentaria, representando aproximadamente el 27% de la producción agrícola mundial (Graham & Vance, 2003). Se anticipa que la demanda de nitrógeno en la agricultura aumentará en las próximas décadas. Actualmente, los esfuerzos se centran en reducir la dependencia de la fertilización química mediante prácticas sustentables que promuevan la FBN y el crecimiento vegetal (biofertilización). Las principales líneas de investigación en este ámbito pueden clasificarse en tres áreas:

a) Optimización de sistemas naturales que promueven el crecimiento vegetal: Se investiga la caracterización detallada de los mecanismos de interacción existentes para identificar cepas más competitivas y eficientes en la fijación de nitrógeno. Se dedica un esfuerzo considerable a la búsqueda y caracterización de nuevas cepas de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) que se establecen en el entorno de la raíz y tienen efectos beneficiosos sobre el crecimiento de la planta asociada (Vessey, 2003). Estas bacterias son utilizadas en la formulación de bioproductos cuyo uso creciente frente a la aplicación de agroquímicos, se sustenta en tres pilares básicos que a saber son: a) su seguridad (atento a que recrean interacciones naturalmente existentes), b) su eficiencia, y c) el menor costo de los mismos. Hoy en día el empleo de bioproductos camina de modo firme hacia el uso de microorganismos con cada vez mejores efectos de degradación de la materia orgánica, solubilización y provisión de nutrientes a las plantas (N, P solubilizado del suelo) (biofertilización), producción de fitohormonas, protección frente a estreses abióticos y frente a patógenos (control biológico), entre otros.

b) Transferencia de la capacidad de fijación de nitrógeno a otros organismos: Un nuevo enfoque biotecnológico es la ingeniería de plantas, especialmente cereales, para que expresen su propia nitrogenasa. Sin embargo, lograr una fijación eficiente es un desafío debido a la complejidad, el alto costo energético, la regulación estricta y la necesidad de un ambiente anóxico. Aunque se han logrado avances significativos en este sentido, queda mucho trabajo por hacer (Beatty & Good, 2011; Oldroyd & Dixon, 2014; Olivares et al., 2013).

c) Desarrollo de nuevas asociaciones entre plantas y microorganismos: Se investiga la posibilidad de establecer asociaciones simbióticas eficientes entre organismos fijadores de nitrógeno y plantas no leguminosas de interés agronómico. Aunque los avances en este

campo han mostrado similitudes en las vías de señalización entre cereales y leguminosas, aún queda por comprender completamente estas vías de señalización. Por lo tanto, se requiere más investigación para lograr este objetivo (Charpentier & Oldroyd, 2010; Oldroyd & Dixon, 2014).

Estrategias actualmente utilizadas para la producción de mejores bioinoculantes.

La obtención de un producto biofertilizante microbiano con características destacadas es un proceso multifacético, que implica la consideración de un número importante de variables biológicas y tecnológicas.

La inoculación de microorganismos en condiciones de campo es una práctica que se remonta a los comienzos del siglo XX con el uso de rizobios como promotores de fertilización nitrogenada. La biofertilización con microorganismos eficientes y seguros es hoy –cuando puede ser aplicada– la práctica de elección frente a alternativas de base química.

Si bien en la última década la industria de producción de biofertilizantes ha mejorado sustancialmente la calidad de los productos (formulaciones en soportes variados, altos números de microorganismos viables en las formulaciones, mejor atención a la relación temporal entre producción-momento de la aplicación, mejor entrenamiento del usuario); existen todavía muchas limitaciones en el conocimiento de base del sistema que limitan la implementación de mejoras en los productos sobre base racional (no empírica).

Así, existe hoy una clara necesidad de desarrollar mejores productos biofertilizantes que:

- 1- Garanticen el uso de cepas con actividades biológicas destacadas (programas de screening y selección).
- 2- Maximicen la supervivencia de los microorganismos en el producto comercial hasta su uso en campo.
- 3- Preserven en los microorganismos un estado fisiológico que promueva un vínculo eficiente con la planta y la actividad biológica buscada.

Inoculación de semillas con rizobios

Desde los inicios del siglo XX el uso de rizobios como inoculantes para semillas es una práctica utilizada en sistemas agrícolas (Brockwell & Bottomley, 1995; Stephens & Rask, 2000). Desde entonces, el interés por obtener mejores cepas y soportes para la producción de inoculantes ha sido materia de estudio en muchos laboratorios del mundo. Los inoculantes son hoy comercializados como rizobios envueltos en una matriz líquida (aplicada a las semillas o en los surcos de siembra), o como rizobios dentro de una matriz sólida estéril formada por polvo de Musgo de origen variado (turba) utilizada para tratar las semillas antes de su siembra.

Tales bioproductos son utilizados con adhesivos adecuados para inocular semillas en superficie (inoculación), seguido en muchos casos de un proceso de pildoración/pildorización (pelleting) consistente en agregar una fina capa de un material que favorezca la sobrevivencia de las bacterias inoculadas, el manejo de las semillas, así como la asociación bacteria-raíces inmediatamente después de la germinación.

En este contexto de análisis debe considerarse muy especialmente que el nicho simbiótico en las leguminosas (el espacio para alojar rizobios) es limitado, siendo por tanto crucial conseguir que las raíces nacientes sean colonizadas tempranamente por los rizobios eficientes del inoculante y no por rizobios del suelo de eficiencia fijadora de nitrógeno desconocida. Esto es limitado principalmente por dos causas: la disminución del número de bacterias viables en los productos comerciales al momento de su uso (Catroux et al., 2001; Deaker, 2004; Graham & Vance, 2000), y la ineficiencia para competir con los rizobios locales por el restringido nicho simbiótico (Catroux et al., 2001; Graham & Vance, 2000; Maier & Triplett, 1996; Silva et al., 2007).

Proceso de producción e implementación de bioinoculantes

Entre las etapas más importantes en el desarrollo de formulaciones de bioinoculantes se pueden mencionar principalmente las condiciones de crecimiento de la bacteria, y el proceso de maduración al que es sometido el producto.

En cuanto al crecimiento, se utilizan hoy en la industria tecnologías de cultivo de última generación, aunque centradas casi exclusivamente en la optimización del rendimiento en biomasa. La falta de información sobre la biología molecular de los estados fisiológicos que mejoran las propiedades biofertilizantes y de tolerancia a diferentes estreses, limita la exploración de condiciones de crecimiento que promuevan la entrada de las células en dichos estados.

Una vez crecidas las bacterias a la biomasa deseada, se formula el producto —mezcla con un soporte estéril— y se almacena/estaciona por un periodo de entre 4-5 semanas (Smith, 1992). Es un hecho muy bien reconocido que los microorganismos al ser incorporados al soporte (matriz) y luego almacenados, sufren procesos de cambio denominados de modo genérico como “maduración” (Albareda et al., 2008; Materon & Weaver, 1985; Roughley & Vincent, 1967). Tal proceso de estacionamiento induce una serie de cambios que resultan en aumentos en la capacidad de los rizobios de sobrevivir en las semillas (Dart et al., 1969; Feng et al., 2002). La ausencia o el acortamiento de este periodo de almacenamiento produce efectos negativos sobre la viabilidad de las bacterias en la semilla (Materon & Weaver, 1985).

Los soportes se clasifican groseramente en líquidos y sólidos, los últimos principalmente representados por la turba. Durante mucho tiempo, la turba ha sido considerada como el mejor soporte para inoculantes, un soporte con alta capacidad de retención de agua y nutrientes, y que provee protección física a los rizobios. Sin embargo, en los últimos años,

debido a la escasez de turberas y las consecuencias ambientales de su explotación (destrucción de hábitats y la emisión de CO₂), se impulsó el desarrollo de inoculantes líquidos que mantienen un alto porcentaje de viabilidad al menos hasta 15 días luego de la inoculación de la semilla. La supervivencia de los rizobios en las formulaciones de inoculantes y luego en las semillas inoculadas es variable, dependiendo de muchos factores, entre los que están incluidas las cepas utilizadas. Sin embargo, poco se conoce de los genes de los rizobios asociados a una mejor supervivencia durante la maduración y preservación de los inoculantes (ver más adelante, estudios realizados por nuestro grupo), y una vez que las bacterias han sido inoculadas sobre las semillas. Solo existen unos pocos trabajos en donde se han caracterizado parcialmente los mecanismos moleculares de adaptación de los rizobios en inoculantes tipo turba (Atieno et al., 2018; Casteriano et al., 2013). En el caso particular de inoculantes basados en turba, se ha demostrado que la adaptación en el proceso de “maduración” comprende cambios morfológicos en los rizobios, tales como engrosamiento de la pared celular y oclusión del espacio periplásmico, cambios fisiológicos y cambios en la expresión de proteínas resultado de las condiciones de limitación en nutrientes y oxígeno.

En particular en este trabajo nos dedicaremos al estudio de la interacción rizobio-leguminosa, y la capacidad que posee de fijar el nitrógeno atmosférico como amonio. Esta característica de las simbiosis con rizobios ha promovido el uso cada vez más extendido de los mismos como inoculantes de leguminosas, con el propósito de incorporar N fijado (de origen atmosférico) a los sistemas agrícolas, aumentando la producción vegetal y sosteniendo al mismo tiempo la fertilidad nitrogenada de los suelos.

I.2. La simbiosis fijadora de nitrógeno rizobio-leguminosa

I.2.1. Generalidades de los rizobios y las plantas leguminosas

Los rizobios son α - y β -proteobacterias presentes en el suelo que han adquirido la capacidad de formar simbiosis con las raíces de plantas leguminosas para desarrollar nódulos radiculares capaces de fijar nitrógeno atmosférico (MacLean et al., 2007). Aunque la taxonomía de los rizobios se encuentra en constante revisión, la clasificación actual, basada en criterios moleculares, agrupa a los rizobios en 14 géneros de α -proteobacterias y 3 géneros de β -proteobacterias (Weir, 2012). En el caso de la planta la capacidad de establecer relaciones simbióticas con los rizobios está restringida a la familia *Leguminosae* (*Fabaceae*), con una excepción conocida en el género *Parasponia* de la familia *Cannabaceae* (Trinick & Galbraith, 1980). Además, recientemente se ha encontrado que ciertas bacterias de la familia *Hyphomicrobiaceae* (Ca. *Tectiglobus* spp.) pueden establecer una relación simbiótica estricta fijadora de nitrógeno con algas diatomeas de la familia *Naviculaceae* (Tschitschko et al., 2024).

Las leguminosas constituyen la tercera familia más grande de plantas con flores, comprendidas en tres subfamilias: *Caesalpinioideae*, *Mimosoideae* y *Papilionoideae*, con una diversidad estimada de más de 20,000 especies distribuidas en 730 géneros. Aunque son la segunda familia en importancia agronómica después de las gramíneas, solo una fracción de estas especies se utiliza agronómicamente (Gepts et al., 2005). Los árboles de las selvas tropicales son mayoritariamente leguminosas (Cronk et al., 2006; Wojciechowski et al., 2004).

La asociación entre rizobios y leguminosas implica un complejo proceso de señalización que culmina en la formación de nódulos especializados en la fijación de nitrógeno atmosférico en las raíces de la planta. Esta interacción implica una serie de cambios morfológicos y fisiológicos tanto en el rizobio como en la planta huésped, todos altamente regulados por los participantes e influenciados por el entorno. Además, esta asociación es altamente específica, ya que no todos los rizobios pueden formar simbiosis con una leguminosa determinada.

En las siguientes secciones, describiremos las etapas de este complejo proceso, centrándonos especialmente en los eventos de iniciación de la interacción. Utilizaremos como referencia el sistema modelo de interacción *Sinorhizobium meliloti-Medicago spp.*, que también es nuestro sistema de estudio.

1.2.2. Los rizobios y su vida libre

Los rizobios son organismos saprófitos de vida libre con la capacidad de persistir en el suelo o en las cercanías de las raíces durante períodos prolongados (Brunel et al., 1988). En su forma de vida libre, deben utilizar y asimilar diversas fuentes de carbono presentes en bajas concentraciones, además de tolerar y responder a una variedad de estreses bióticos y abióticos. Dado que estas bacterias no forman esporas, su supervivencia en el suelo puede depender de la existencia de nichos favorables que puedan colonizar.

La estructura del suelo, definida por la textura y la formación de agregados, influye significativamente en la distribución y la supervivencia de los rizobios. Los poros capilares presentes en el suelo, con diámetros que van desde 0,1 hasta 6 μm , pueden servir como microhábitats favorables para estas bacterias (Hillel, 1971). Las interacciones entre las bacterias y las superficies minerales del suelo, mediadas por factores hidrofóbicos o electrostáticos, pueden contribuir a la estabilización y la adhesión de los rizobios al sustrato (van Loosdrecht et al., 1990).

La capacidad de adaptación de los rizobios a este ambiente heterogéneo se refleja en el tamaño de sus genomas, que tienden a ser grandes y multipartitos, con un amplio repertorio de genes asociados a diversos metabolismos, transporte y tolerancia al estrés (MacLean et al., 2007; Mauchline et al., 2006; Prell & Poole, 2006). Los genes relacionados con la infección y la fijación de nitrógeno suelen estar agrupados en plásmidos (pSym) o en islas genómicas

(SIs) (MacLean et al., 2007). Por ejemplo, *Sinorhizobium meliloti* posee un genoma de aproximadamente 6,7 Mb distribuido en tres replicones, que incluyen un cromosoma y dos megaplásmidos, pSymA y pSymB, que contienen genes esenciales para la simbiosis con las plantas (Galibert et al., 2001).

Los eventos de vida libre son determinantes de la competitividad y vida simbiótica del rizobio.

Durante décadas, se ha observado el fenómeno conocido como el "problema de la competición", donde ciertas cepas de rizobios seleccionadas por su capacidad de fijar nitrógeno de manera más eficiente no logran competir con las cepas nativas de rizobios. Estas cepas nativas, aparentemente adaptadas a la vida libre, son más competitivas por los nichos de la planta, incluso cuando los niveles de inóculo exceden los de los rizobios seleccionados (Triplett & Sadowsky, 1992). A pesar de que las características adquiridas durante este periodo parecen dirigir al rizobio hacia la interacción con la planta, los detalles moleculares de este perfil óptimo para una competición eficiente son complejos y difíciles de abordar experimentalmente (Schmidt, 1979).

En las siguientes secciones, exploraremos el entorno complejo en el que habitan los rizobios, centrándonos especialmente en la interfaz de suelo que rodea la raíz (rizósfera) y en los eventos iniciales que tienen lugar allí (llegada a la rizósfera, reconocimiento y adhesión).

I.2.3. Eventos iniciales de la interacción rizobio-leguminosa.

Definición, estructura y dinámica de la rizósfera

La rizósfera se define como el volumen de suelo influenciado por la presencia de la raíz de una planta. Aunque no hay una definición precisa en cuanto a su tamaño o forma, se puede conceptualizar como un gradiente de propiedades químicas, físicas y biológicas que cambian tanto radial como longitudinalmente a lo largo de la raíz (Prashar et al., 2014). La extensión de la rizósfera puede variar según el tipo de suelo, la especie de planta y su edad, entre otros factores. La definición se ha ampliado para incluir los tejidos más externos de la planta que también muestran propiedades distintas debido a la actividad de la raíz. Dentro de la rizósfera se pueden distinguir tres zonas (Figura 1.2.3.1):

- Endorizósfera: Esta zona incluye porciones de la corteza y la endodermis donde la actividad rizosférica ocupa los espacios libres entre las células (espacio apoplástico).
- Rizoplano: Es la zona media directamente adyacente a la raíz, que incluye la epidermis.
- Ectorizósfera: Es la zona de suelo bajo la influencia de la raíz, comenzando desde el rizoplano hacia afuera (Pinton et al., 2001; Prashar et al., 2014).

Las plantas liberan o exudan una variedad de compuestos orgánicos a través de sus raíces, enriqueciendo el entorno rizosférico con nutrientes. Este conjunto de compuestos se conoce como rizodepósito (Figura 1.2.3.1, panel derecho) y está compuesto por moléculas de bajo peso molecular como ácidos orgánicos, aminoácidos, azúcares, compuestos aromáticos, metabolitos secundarios, así como moléculas de alto peso molecular como el mucílago (polisacáridos), proteínas y células vegetales (de las capas más externas de la raíz y de la cofia) (Haichar et al., 2014; Jones et al., 2009; Nguyen, 2003; Philippot et al., 2013). Aunque su estimación es difícil, se cree que entre el 5% y el 20% del carbono fijado por la planta se transfiere a la rizósfera a través de estos exudados (Jones et al., 2009).

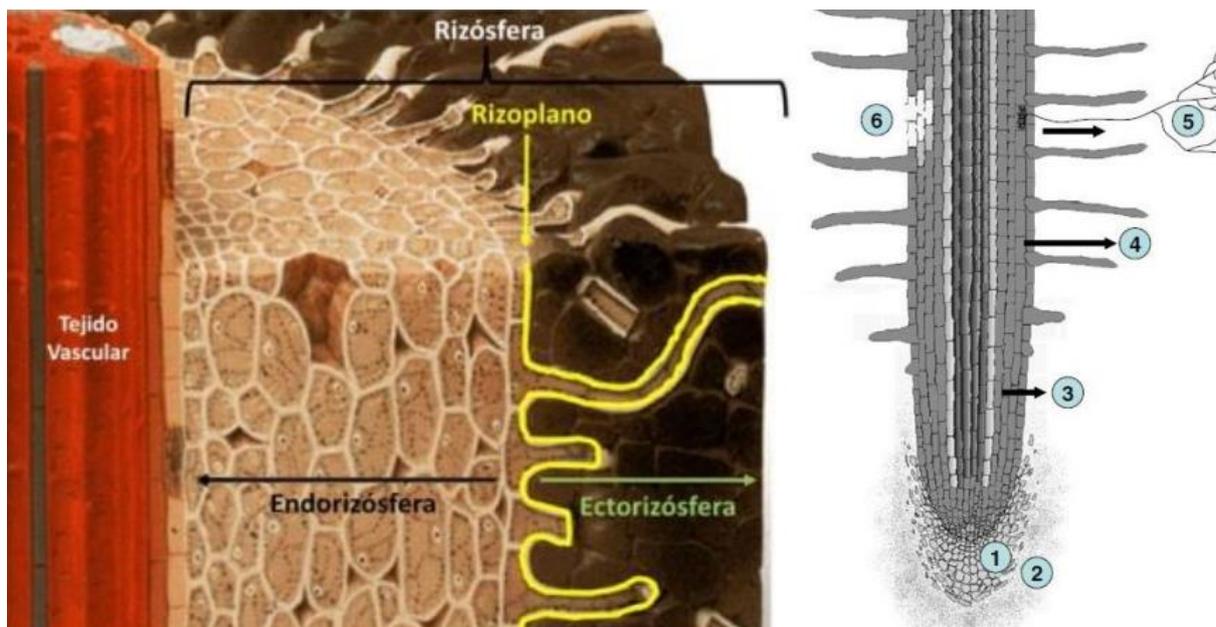


Figura 1.2.3.1. Esquema de una sección de rizósfera. Localización de rizodepósitos. Panel izquierdo. Zonas que componen la rizósfera. La estructura de la rizósfera ha sido subdividida en tres zonas, la endorizósfera, el rizoplano y la ectorizósfera. La gran cantidad de compuestos orgánicos exudados o secretados por la raíz convierten a la rizósfera en una zona de intensa actividad microbiana cuali y cuantitativamente diferente a la que se encuentra por fuera de ella (efecto rizosférico). Imagen adaptada de McNear (2013). Panel derecho. Localización de las mayores fuentes de rizodepósitos. 1. Pérdida de células externas y de la cofia. 2. Mucílago. 3. Exudación de compuestos solubles. 4. Liberación de carbono volátil (mayormente respiración) 5. Flujo de carbono hacia micorrizas o simbiontes. 6. Muerte o lisis celular. Tomado de Jones et al (2009).

La rizósfera, debido a su mayor disponibilidad de nutrientes, proporciona un entorno propicio para el desarrollo microbiano. La concentración de microorganismos en la rizósfera es de uno a dos órdenes de magnitud mayor que en el resto del suelo, lo que se conoce como efecto rizosférico (Clark, 1949). El conjunto de genomas de la comunidad bacteriana que rodea la raíz supera significativamente el tamaño del genoma de la propia planta, lo que ha llevado a que se le denomine el "segundo genoma de la planta" (Berendsen et al., 2012; Turner, James, et al., 2013).

La comunidad microbiana en la rizósfera tiende a ser menos diversa que la del suelo circundante. Parece que las raíces pueden seleccionar y regular los microorganismos que prosperan en su entorno, favoreciendo las interacciones beneficiosas sobre las patógenas mediante la secreción de una variedad de compuestos orgánicos, como aminoácidos, proteínas, azúcares, ácidos orgánicos y metabolitos secundarios (Philippot et al., 2013).

Además, la planta regula activamente los parámetros fisicoquímicos de la rizósfera mediante la liberación o captación de iones y quelantes, la incorporación de agua y la respiración. Esto le permite regular el pH, la disponibilidad de minerales y la concentración de oxígeno en su entorno (Philippot et al., 2013). Es importante destacar que las propiedades biofísicoquímicas de la rizósfera también están influenciadas por el tipo de suelo y las condiciones ambientales (Philippot et al., 2013).

Un estudio realizado por Turner, Ramakrishnan, *et al.* (2013) examinó el metatranscriptoma del microbioma asociado a la rizósfera de tres plantas diferentes, trigo, avena (cereales), y arveja (leguminosa) cultivadas en el mismo suelo. Los resultados mostraron una abundancia hasta cinco veces mayor de eucariotas en las rizósferas de avena y arveja en comparación con el suelo o el trigo. Además, se observaron diferencias significativas en la composición de la comunidad procariota entre las tres rizósferas, lo que sugiere que los microbiomas asociados a la rizósfera son específicos para cada planta. Los procariotas más abundantes fueron del filo *Proteobacteria*, seguidos por *Actinobacterias*, *Firmicutes*, *Acidobacterias*, *Planctomycetes* y *Bacteroidetes* (Turner, Ramakrishnan, et al., 2013). Las clases y órdenes más abundantes de *Proteobacteria* fueron Alfa (que incluye *Rhizobiales*), Beta (que incluye *Burkholderiales*), Gamma (que incluye *Pseudomonadales*) y Delta proteobacterias (Turner, Ramakrishnan, et al., 2013).

Perfil transcripcional de los rizobios en la rizósfera

Pocos estudios han abordado la investigación de los genes de los rizobios implicados en su desarrollo y establecimiento en la rizósfera, principalmente debido a la dificultad de obtener un número suficiente de bacterias que representen el estado fisiológico "promedio" en el que se encuentran. Sin embargo, en un trabajo realizado por Ramachandran et al. (2011), se informó sobre el perfil transcripcional de una cepa de *R. leguminosarum* biovar *viciae* inoculada tanto en guisante (su planta huésped) como en una planta heteróloga, la alfalfa.

En este estudio, los autores identificaron 106 genes que mostraron al menos un triple aumento en su cantidad de transcriptos (regulados positivamente) en todas las rizósferas estudiadas, de los cuales el 70% correspondían a proteínas hipotéticas. El análisis de los mecanismos de transporte, metabolismo y funciones celulares transcripcionalmente activos en estas condiciones reveló un aumento en el transporte de carboxilatos, que son abundantes en la rizósfera. Esto sugiere que el metabolismo central de estas bacterias en la rizósfera está

dominado por el catabolismo de estos ácidos orgánicos. Además, se observó un aumento en los niveles de transcriptos de transportadores de compuestos aromáticos, inositol y sorbitol/manitol, así como de oligosacáridos. En varios casos, la inducción de estos transportadores se asoció con la activación del metabolismo de los compuestos correspondientes.

La vía de degradación de fenilalanina y tirosina resultó positivamente regulada en todas las rizósferas estudiadas. Además, se identificaron varios mecanismos de adaptación principales, que incluyen la degradación de antimicrobianos, la exportación de drogas, el mantenimiento de la homeostasis osmótica, la regulación del quorum-sensing y la respuesta al estrés (Ramachandran et al., 2011). Este estudio proporciona una visión importante sobre los mecanismos moleculares que permiten a los rizobios adaptarse y prosperar en la rizósfera, lo que podría tener implicaciones significativas para la mejora de la inoculación bacteriana y la promoción del crecimiento vegetal.

Más recientemente el grupo “*Rhizosphere Group*” liderado por Philip Poole ha realizado dos estudios por Tn-Seq (Knights et al., 2024; Wheatley et al., 2020) que describen muchos de los genes requeridos por *R. leguminosarum* para el crecimiento en la rizósfera de guisantes, lentejas y *Lathyrus*, y aquellos requeridos para su posterior colonización, y en el caso de guisantes también progresivamente para estadíos tardíos de la interacción. En cuanto a los genes requeridos para la colonización y crecimiento en la rizósfera, las categorías funcionales más representadas fueron la biosíntesis de aminoácidos, ribonucleótidos y cofactores; funciones metabólicas adaptativas, proteínas involucradas en la percepción de estímulos externos y de tolerancia a condiciones de estrés. Adicionalmente las funciones de movilidad por flagelos y quimiotaxis demostraron ser un prerrequisito para la colonización.

Llegada a la rizósfera: Quimiotaxis y movilidad

Los rizobios son bacterias móviles que generalmente poseen un flagelo polar y entre dos y seis flagelos peritricos. Aunque la movilidad no es esencial para la nodulación, confiere una ventaja selectiva a los rizobios en la competencia con bacterias no móviles. En el complejo ambiente rizosférico, la capacidad de detectar y responder eficientemente a los exudados de la planta proporciona una importante ventaja competitiva a los microorganismos.

Los rizobios son capaces de detectar diversos atrayentes presentes en los exudados radiculares, como azúcares, aminoácidos y ácidos dicarboxílicos, a través de sus receptores. El motor flagelar de *S. meliloti* regula la movilidad controlando la velocidad de rotación del flagelo. Una rotación máxima de todos los flagelos impulsa a la célula hacia adelante en tramos rectos, mientras que frente a un estímulo, las bacterias responden disminuyendo la velocidad de rotación individual de cada flagelo, lo que genera movimientos de tumbos (Attmannspacher et al., 2005; Meier et al., 2007; Scharf & Schmitt, 2002).

El regulón flagelar de *S. meliloti*, codificado en el cromosoma, contiene 56 genes responsables de la quimiotaxis, la biosíntesis del flagelo, el motor flagelar y genes reguladores. Además, en diversas regiones del genoma de *S. meliloti* se encuentran codificados siete receptores transmembrana del tipo MCP (Methyl-accepting Chemotaxis Proteins) (Webb et al., 2014). La depleción de cualquiera de estos receptores disminuye la respuesta quimiotáctica frente a aminoácidos, azúcares o ácidos orgánicos, lo que sugiere que estos receptores pueden sensor más de un tipo de molécula y trabajar en conjunto.

Además de los compuestos de bajo peso molecular, ciertos flavonoides a concentraciones muy bajas han demostrado inducir una respuesta quimiotáctica positiva en rizobios. Sin embargo, la señalización mediada por compuestos fenólicos exudados por la planta genera una respuesta más compleja, que es el primer paso de una cascada de señalización e interacción entre la bacteria y la planta (Caetano-Anollés et al., 1988; Munoz Aguilar et al., 1988).

I.3 Los rizobios y el estrés

Las bacterias del suelo, incluidos los rizobios, enfrentan diversos factores de estrés en su entorno, que pueden afectar su desarrollo y su interacción con el medio ambiente. Estos factores incluyen cambios en la temperatura, el pH, la disponibilidad de agua, y la presencia de sales, azúcares, metales u otros compuestos.

Las altas temperaturas pueden inhibir el crecimiento y la actividad metabólica de los rizobios, mientras que las bajas temperaturas pueden reducir su viabilidad y actividad celular (Hungria & Vargas, 2000). La disponibilidad limitada de agua puede interferir con su capacidad para colonizar las raíces de las plantas y establecer una simbiosis eficiente. La salinidad puede afectar la actividad enzimática, incluida la capacidad de fijar nitrógeno. Además, una alta presión osmótica en el medio, causada por compuestos como el manitol, puede inducir la expresión de genes de nodulación regulados por NodD2, que promueve la nodulación en presencia de flavonoides (Cerro et al., 2019).

La exposición a altas concentraciones de metales pesados, como el cadmio, el plomo o el cobre, puede afectar negativamente la función de las enzimas, la integridad de las membranas celulares y la capacidad de fijar nitrógeno (Marino et al., 2013). Tanto un pH ácido como alcalino pueden afectar el crecimiento y la función metabólica de los rizobios. Estudios ómicos en condiciones de estrés ácido indican una amplia red de regulación para adaptarse a ambientes con pH ácido (Guerrero-Castro et al., 2018; Hellweg et al., 2009; Nilsson et al., 2019, 2021).

Los rizobios han desarrollado diversas adaptaciones y mecanismos de defensa para sobrevivir y mantener su viabilidad frente a los factores de estrés mencionados

anteriormente. Estos mecanismos incluyen la producción de enzimas antioxidantes, como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa y peroxidasas, que ayudan a neutralizar los radicales libres y proteger las células bacterianas contra el estrés oxidativo. También producen osmolitos y solutos compatibles, como trehalosa, prolina y glicerol, que actúan como protectores osmóticos y ayudan a mantener el equilibrio osmótico en condiciones de estrés hídrico o salino. Además, ajustan la expresión de genes específicos para adaptarse a condiciones de estrés, lo que les permite producir proteínas y enzimas que los ayudan a enfrentar y superar el estrés. Por ejemplo, la producción de glutatión aumenta en condiciones de estrés por pH ácido (Muglia et al., 2007). Los rizobios también pueden formar biofilms, comunidades bacterianas que proporcionan protección y resistencia frente a factores de estrés externos al adherirse a superficies como las raíces de las plantas.

Por otro lado, los estudios genómicos y transcriptómicos han revelado una serie de genes que se activan en respuesta al estrés, lo que sugiere que los rizobios tienen la capacidad de adaptarse y resistir a condiciones estresantes. La interacción entre los rizobios y las plantas hospedadoras puede ser afectada por factores de estrés, lo que indica que las respuestas de los rizobios al estrés pueden tener consecuencias significativas para la productividad de los cultivos.

En función a ello, el estudio de la interacción entre los rizobios y *Medicago* en respuesta al estrés puede proporcionar información valiosa para comprender los mecanismos subyacentes a la simbiosis planta-microbio bajo condiciones de estrés y mejorar la productividad agrícola.

Aunque existen estudios que se centran en la defensa celular bacteriana contra diferentes tipos de estrés abiótico (Hellweg et al., 2009; Tiricz et al., 2013), aún no se ha logrado un enfoque general que describa una respuesta común a varios estreses. Sin embargo, la investigación en este campo continúa avanzando para comprender mejor cómo las bacterias se adaptan y responden a su entorno variable.

1.3.1 *Sinorhizobium meliloti* y el estrés ácido

La especie *S. meliloti* muestra una alta sensibilidad a pH bajos, lo que afecta su crecimiento y actividad simbiótica (Draghi et al., 2016). La respuesta fisiológica de los rizobios a la acidez puede ser variada, desde la muerte celular hasta cambios moderados, lo que influye en la nodulación de las plantas y la expresión de genes Nod (Zahran, 1999).

Entre los mecanismos de respuesta al estrés ácido, se distinguen dos tipos: específicos y generales. Mientras que los primeros se centran en la adaptación a la condición estresante, los segundos ofrecen protección contra una variedad de estreses (Hengge-Aronis, 2002). Este

enfoque preventivo, característico de las respuestas generales, evita el daño en lugar de repararlo.

Un ejemplo notable de adaptación al estrés ácido es la respuesta adaptativa de tolerancia a la acidez (ATR) observada en rizobios como *S. meliloti*. Esta respuesta, que implica síntesis proteica y cambios en la permeabilidad de la membrana celular, protege a las células frente a condiciones severas de acidez (Foster & Hall, 1990). En el contexto de la simbiosis rizobio-alfalfa, la inducción de la respuesta ATR aumenta la infectividad en las plantas, lo que sugiere un potencial biotecnológico para desarrollar inoculantes adaptados a ambientes ácidos (Draghi et al., 2010). A pesar de estos avances, aún falta comprender completamente los determinantes genéticos de esta respuesta.

I.4 Identificación de determinantes de la competencia por la competitividad por la colonización rizosférica y la supervivencia en formulaciones de bioinoculantes mediante Signature-Tagged-Mutagénesis (STM)

El método de mutagénesis por mutantes etiquetados (STM, Signature Tagged Mutagenesis) es un método que permite la determinación del fenotipo de cientos de mutantes en diferentes genes de forma simultánea. En nuestro laboratorio, este método fue utilizado en conjunto con secuenciación de segunda generación (Illumina), por Salas et al. para identificar determinantes genéticos en *S. meliloti* 2011 que están involucrados en la colonización temprana de la rizósfera de alfalfa (Pobigaylo et al., 2006; Salas, 2015; Salas et al., 2017). Esta técnica aprovecha un conjunto de mutantes portadores de transposones mini-Tn5, cada uno etiquetado con una secuencia de nucleótidos única (firma), lo que permite determinar la cantidad relativa de cada mutante en presencia de los otros (Figura 1.4.1.1).

El proceso implica desafiar a este conjunto de mutantes con una condición de interés, como la colonización de la rizósfera de alfalfa, y luego evaluar la proporción de cada firma al inicio y al final del experimento. De esta manera, se pueden identificar qué mutaciones resultan en efectos negativos o positivos sobre la condición estudiada. En su versión original, la proporción relativa de cada firma era determinada mediante microarreglos de ADN (Figura 1.4.1.2).

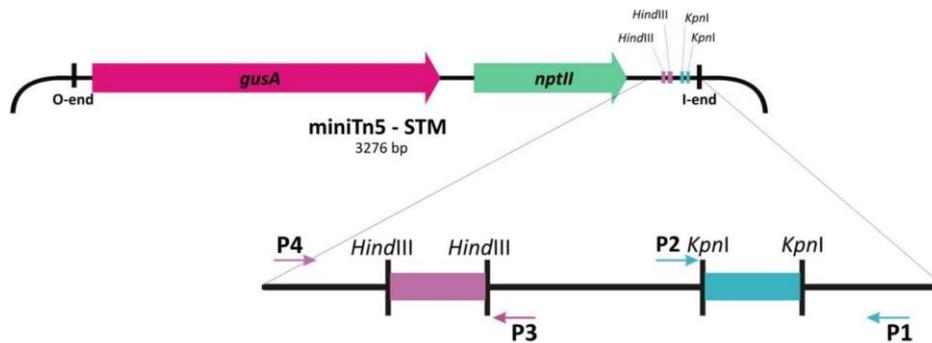


Figura 1.4.1.1. Esquema de los miniTn5-STM construidos por Pobligaylo et al. (2006). Las 412 firmas fueron incorporadas a los transposones como fragmentos *HindIII* (para la firma H) y fragmentos *KpnI* (para la firma K). Las firmas presentes en cada muestra fueron amplificadas con oligonucleótidos P1 y P2 (firma K) y P3 y P4 (firma H). Los extremos 5' de cada cebador llevan una secuencia única ("marca") de 4pb que permite asociar el producto de amplificación a una mezcla/experimento/réplica en particular.

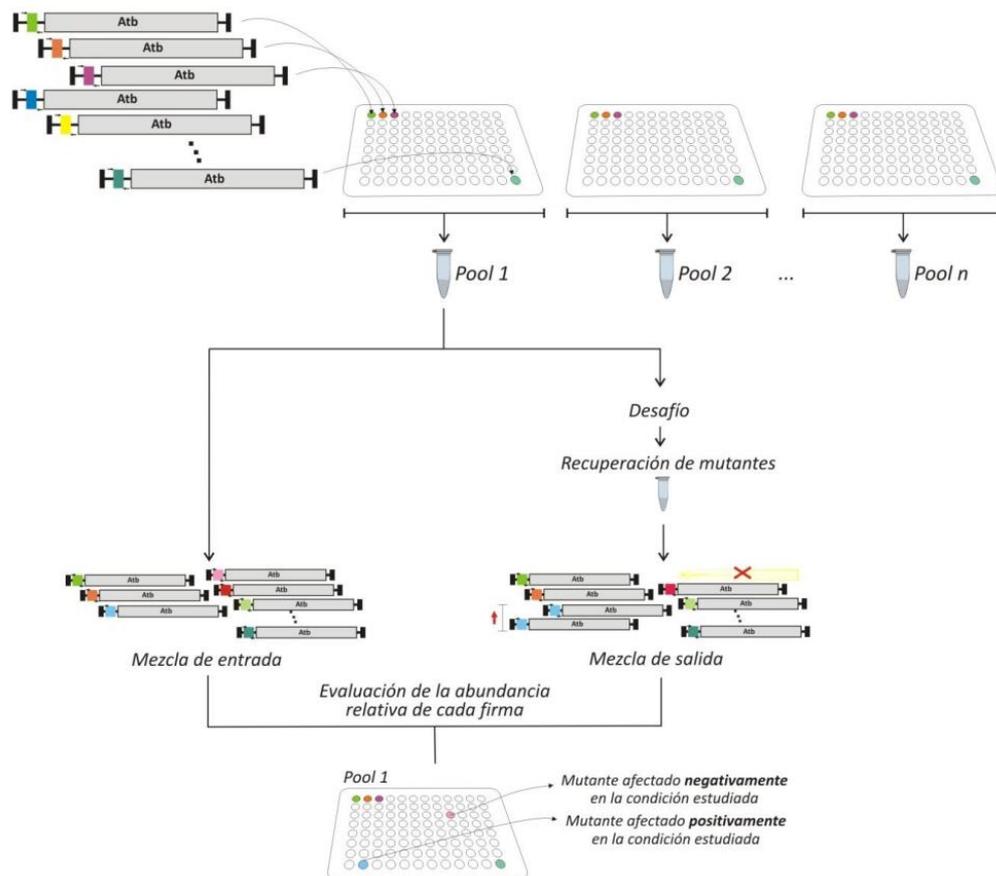


Figura 1.4.1.2. Esquema de ensayo de mutagénesis etiquetada por firmas (STM). A partir de transposones con firmas variables se generan mezclas de mutantes (pools), que son desafiados a la condición de interés. Después del desafío los mutantes son recuperados y la proporción de cada firma es evaluada en la mezcla inicial (entrada) y en la mezcla de salida. La comparación de la cantidad relativa de cada firma en ambas mezclas permite identificar mutantes que durante el desafío disminuyeron (afectados negativamente) o aumentaron (afectados positivamente) su representatividad. Como la composición de la mezcla inicial es definida y conocida, los mutantes que resultan de interés, pueden posteriormente ser utilizados en experimentos individuales.

En el trabajo de Salas et al. (2017) utilizaron STM acoplado a la secuenciación de alta penetración lo que permitió un análisis más exhaustivo, más preciso, y de múltiples condiciones de forma simultánea. Para ello, luego del desafío de cada mezcla en la condición de interés (ej. competencia por la colonización de la rizósfera de alfalfa) los segmentos del mini-Tn5 que contienen las firmas fueron amplificados por PCR agregando una etiqueta adicional de 4 nucleótidos, permitiendo la clasificación de cada lectura de secuenciación según el mutante, la condición y la réplica correspondiente. Los resultados obtenidos mediante este enfoque proporcionaron una comprensión más profunda de los factores genéticos que influyen en la capacidad de colonización de los rizobios en la rizósfera de alfalfa, lo que puede tener implicaciones significativas para la productividad agrícola y la optimización de las interacciones simbióticas planta-microbio.

Se encontró un total de 151 mutantes que mostraron efectos negativos en la colonización temprana de alfalfa a los 3 días después de la inoculación (dpi). Este número aumentó a 157 mutantes afectados a los 7 dpi, de los cuales 47 no exhibieron afectación a los 3 dpi. Además, se identificaron 28 mutantes afectados en alfalfa, pero no en las plantas de arveja (no huésped), mientras que solo 6 mutantes fueron afectados en arveja pero no en alfalfa. En términos generales, los mutantes más afectados mostraron asignaciones funcionales relacionadas con la movilidad, genes de transporte, metabolismo de aminoácidos y proteínas de función desconocida (Salas, 2015; Salas et al., 2017), ver Figura 1.4.1.3.

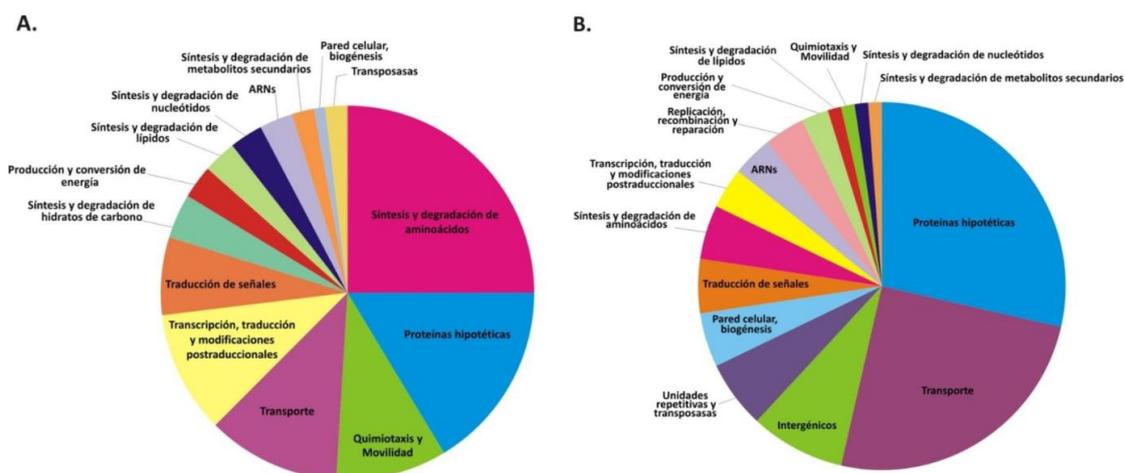


Figura 1.4.1.3. Clasificación funcional de genes seleccionados por STM por su efecto negativo (A) o positivo (B) sobre la colonización de raíces de alfalfa analizadas a los 3 d.p.i.. Esta clasificación está basada en el análisis de grupos de ortólogos. Los gráficos fueron realizados en base a 104 (A) y 84 (B) genes.

Además, se llevaron a cabo experimentos STM para investigar los factores genéticos de *S. meliloti* implicados en la viabilidad en formulaciones de inoculantes de turba (IT). En estos experimentos se evaluó el fitness de una colección de mutantes de STM en inoculantes de

turba proporcionados por Biagro-Bayer. Se inocularon un total de 30 conjuntos de 412 mutantes independientes (totalizando 12,700 mutantes) en bolsas conteniendo inoculantes de turba, que fueron incubadas a 22 °C durante 2 meses para considerar el período de maduración del inoculante y el almacenamiento previo a su uso. Como resultado, se identificaron 471 mutantes, de los cuales 393 tenían un sitio de inserción conocido, mostrando un fenotipo alterado en la viabilidad en IT, lo que involucraba al menos 300 genes diferentes. De estos, 176 mutaciones presentaron una desventaja para la viabilidad en IT. Las categorías funcionales más afectadas (*Clusters of orthologous groups*, COGs) en este estudio estaban relacionadas con el transporte y metabolismo de aminoácidos e hidratos de carbono, la transcripción y la energía celular. Se observó un perfil diferenciado entre mutantes con efectos positivos y negativos. En el primer caso, las categorías más afectadas incluyeron la biosíntesis de la pared celular y membrana, el transporte y metabolismo de aminoácidos, la transcripción, así como la conversión y producción de energía. Mientras que, en el segundo caso, las categorías más afectadas fueron el transporte y metabolismo de hidratos de carbono, la replicación, y la recombinación y reparación.

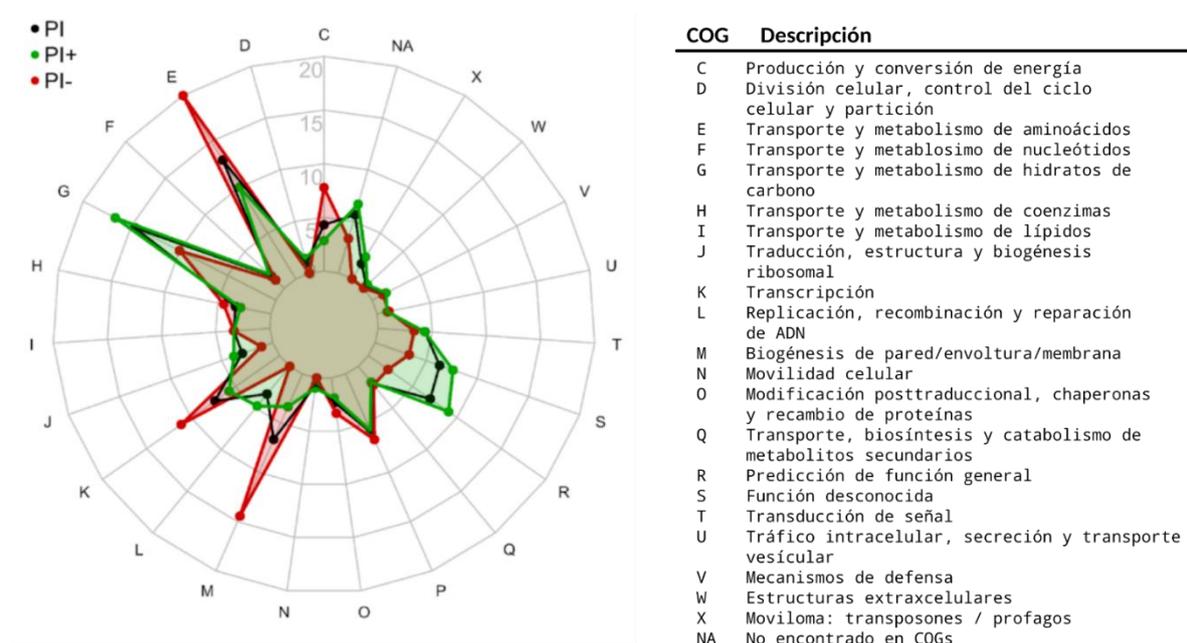


Figura 1.4.1.4. Distribución funcional de proteínas involucradas en el fitness durante la maduración y almacenamiento de inoculantes tipo turba. Diagrama de radar mostrando los clusters de genes ortólogos (cluster of orthologous groups; COGs). PI (Negro): todas las proteínas que al ser mutadas produjeron con un fenotipo alterado. PI+ (Verde): proteínas que al ser mutadas produjeron una desventaja en el fitness. PI- (Rojo): proteínas que al ser mutadas produjeron una ventaja en el fitness. El radio corresponde al porcentaje para cada categoría.

Los resultados de los ensayos STM arrojaron un gran número de genes candidatos a mejorar la eficacia de la interacción temprana de la relación simbiótica y la sobrevivencia en turba, aunque no todos ellos pudieron ser validados en ensayos utilizando mutantes individuales. Por lo tanto, la validación de estos resultados se realizó en la etapa inicial de este trabajo de investigación.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

El desarrollo de bioinoculantes basados en rizobios que posean una mayor supervivencia y competitividad es el objetivo central de esta investigación. Se plantea que la sobreexpresión de genes específicos en rizobios, ya sea mediante su introducción en vectores o mediante la inducción de su expresión por condiciones ambientales, podría generar un estado fisiológico de mayor competitividad por la colonización rizosférica y/o que permita incrementar su viabilidad en formulaciones comerciales de bioinoculantes.

En relación con los resultados previamente obtenidos por la metodología STM, se considera que esta técnica permitió identificar y caracterizar funcionalmente los genes de *S. meliloti* que intervienen en la colonización temprana de las raíces y en la maduración de los inoculantes. En función a ello, se propone que la sobreexpresión de estos genes mejoraría su capacidad de colonización y supervivencia. Además, se postula que bajo condiciones específicas de cultivo *in vitro* se podría inducir la expresión de un subconjunto de estos genes, y que el cultivo de *S. meliloti* bajo dichas condiciones podría mejorar significativamente su competencia en formulaciones de bioinoculantes.

II. OBJETIVOS

Los rizobios poseen la capacidad de asociarse en simbiosis con raíces de plantas leguminosas y fijar nitrógeno atmosférico como amonio. Esta característica ha promovido su utilización como inoculantes de leguminosas aumentando la producción y sosteniendo la fertilidad nitrogenada de los suelos. Sin embargo, la existencia en el suelo de cepas que presentan una mayor competitividad y, menor capacidad de fijación de nitrógeno, disminuye en muchos casos la eficiencia de los inoculantes. Otro de los factores influyentes en la efectividad del uso de inoculantes es la pérdida de viabilidad microbiana entre la producción y el uso del biofertilizante a campo. Por lo tanto, resulta de interés mejorar la calidad de los inoculantes en base a conocimiento que permita delinear estrategias que mejoren la supervivencia de los rizobios en los productos comerciales, y que promuevan la competencia simbiótica temprana frente a la raíz en crecimiento de la semilla recién germinada. En este marco, nos planteamos los siguientes objetivos:

II.1 Objetivo general

Obtener bioinoculantes a base de rizobios que presenten un fenotipo de mayor supervivencia en las formulaciones comerciales y/o una mayor competitividad por la colonización rizosférica, mediante la sobreexpresión y/o inducción de genes previamente identificados y asociados a dichos fenotipos.

II.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar funcional y molecularmente genes de *S. meliloti* asociados al desempeño de los rizobios en los estadios tempranos de la simbiosis (competitividad por la colonización rizosférica) y durante la maduración de preparaciones de inoculantes comerciales.
- Sobreexpresar en vectores de amplio rango de huéspedes genes de *S. meliloti* ubicuos en diferentes especies de rizobios, y que se presenten como candidatos para una mejora de la competitividad por la colonización rizosférica y/o la sobrevivencia en preparaciones comerciales de bioinoculantes.
- Evaluar el efecto del cultivo de *S. meliloti* en condiciones inductoras de los genes de interés en el fenotipo de competición por la colonización radicular y sobrevivencia en formulaciones inoculantes.
- Identificar y analizar eventos recientes de transposición de secuencias de inserción en diferentes cepas de rizobios.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1. Procedimientos Microbiológicos

III.1.1. Cultivos bacterianos

Condiciones de crecimiento

Para el crecimiento de cepas de *Escherichia coli* se utilizó el medio de cultivo LB (Bertani, 1951), de la siguiente composición:

Medio LB
NaCl 5 g/l
Triptona 10 g/l
Extracto de levadura 5 g/l
Agar 15 g/l (sólo para medio sólido)

Tabla 3.1.1.1 Composición de medio LB.

Los cultivos fueron incubados a 37 °C con agitación a 180 rpm toda la noche. La estimación del número de bacterias se llevó a cabo mediante la medición fotométrica de la densidad óptica a 600 nm (una $DO_{600} = 0,1$ correspondiendo aproximadamente a 1×10^8 UFC/ml) o mediante el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) después de plaquear diluciones seriadas de los cultivos a determinar.

En el caso de *S. meliloti*, los cultivos se incubaron a 28 °C con agitación a 180 rpm. Se empleó medio rico TY (Beringer, 1974) para el crecimiento, cuya composición se detalla en la siguiente tabla:

Medio TY
CaCl ₂ .2H ₂ O 0,9 g/l
Triptona 5 g/l
Extracto de levadura 3 g/l
Agar 15 g/l (sólo para medio sólido)

Tabla 3.1.1.2. Composición de medio TY.

La estimación del número de bacterias se realizó por mediciones de DO_{600} (utilizando la relación de que una $DO_{600} = 0,1$ corresponde a aproximadamente 1×10^8 UFC/ml).

En estos casos, el material a utilizar se esterilizó en 3 ciclos de 20 minutos a 120 °C en autoclave.

Curvas de crecimiento

Se empleó el medio Evans pH 7 (Evans, 1970) para analizar el desempeño de las cepas mutantes en condiciones nutricionales mínimas. La composición detallada de este medio se muestra a continuación:

Medio Mínimo Evans		
Glucosa 10 g/l	Soluciones Micronutrientes (5ml/l) 200X	Solución Vitaminas 1000X
PO ₄ H ₂ Na anhidro 0,6 g/l	FeCl ₃ .6H ₂ O 5,4 g	FeSO ₄ .7H ₂ O 274 mg
CINH ₄ 0,7 g/l	MnCl ₂ .4H ₂ O 2 g	Riboflavina 20 mg
KCl 0,3725 g/l	ZnO 0,412 g	Ac. p-aminobenzoico 20 mg
Na ₂ SO ₄ 0,142 g/l	CuSO ₄ .5H ₂ O 0,219 g	Piridoxina-HCl 20 mg
Ac. Cítrico 0,21 g/l	CoCl ₂ .6H ₂ O 0,452 g	Tiamina-HCl 20 mg
Cl ₂ Mg.6H ₂ O 0,127 g/l	H ₃ BO ₃ 64 mg	Biotina 20 mg
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O 4 mg	H ₂ O 1000 ml
	HCl 8 ml	Esterilización por filtración
Solución Micronutrientes 5ml	H ₂ O hasta 1000 ml	
Solución Calcio 1ml		
Solución Vitaminas 1ml	Solución Ca⁺² 1000 X	
PIPES (pKa: 6,8) 20 mM 6,048 g/l	CaCl ₂ .2H ₂ O 294 g	
	H ₂ O 1000 ml	

Tabla 3.1.1.3. Composición de medio Evans.

Las curvas de crecimiento se generaron utilizando diluciones 1:100 de cultivos previamente crecidos en medio rico, en pocillos de placas multiwell. La incubación y la medición se llevaron a cabo en un lector de microplacas multifuncional de la marca BMG Labtech. Las lecturas de la absorbancia a 600 nm (DO₆₀₀) se efectuaron en intervalos de 60 minutos.

Para evaluar el crecimiento en distintas condiciones de estrés se utilizó el Medio Mineral Vincent (VMM) (Vincent, 1970) cuya composición se detalla a continuación:

Medio Mineral Vincent	
MgSO ₄ .7H ₂ O 0,150 g/l	Manitol 10g/l
CaCl ₂ .2H ₂ O 0,050 g/l	Biotina 0,0002 g/l
FeCl ₃ 0,006 g/l	Tiamina 0,0001 g/l
NaCl 0,050 g/l	Pantotenato de Calcio 0,0001 g/l
K ₂ HPO ₄ 0,300 g/l	PIPES (pKa: 6,8) 20 mM 6,048 g/l
KH ₂ PO ₄ 0,300 g/l	MES (pKa: 6,1) 20 mM 3,904 g/l
Ácido glutámico 1,1g/l	

Tabla 3.1.1.4. Composición de medio mineral Vincent

Antibióticos

Las soluciones de antibióticos se prepararon en agua y se esterilizaron por filtración a través de membranas de nitrocelulosa con un tamaño de poro 0,2 µm antes de su uso en medios de cultivo. Las concentraciones de las soluciones stock de antibióticos, así como las concentraciones finales utilizadas en los medios de cultivo para *E. coli* y *S. meliloti*, se resumen a continuación:

Antibiótico	Solución Stock	<i>E. coli</i>	<i>S. meliloti</i>
Kanamicina (Km)	50 mg/ml	50 µg/ml	150 µg/ml
Ampicilina (Ap)	200 mg/ml	200 µg/ml	-
Tetraciclina (Tc)	2 mg/ml	10 µg/ml	5 µg/ml
Estreptomicina (Sm)	400 mg/ml	100 µg/ml	400 µg/ml
Neomicina (Nm)	120 mg/ml	-	120 µg/ml
Gentamicina (Gm)	50 mg/ml	10 µg/ml	50 µg/ml
Ac. Nalidíxico (Nal)	20 mg/ml	10 µg/ml	10 µg/ml

Tabla 3.1.1.5. Antibióticos. Soluciones stock y concentraciones utilizadas en cultivos de *E. coli* y *S. meliloti*

Medios de conservación

La conservación a largo plazo de las cepas bacterianas se llevó a cabo resuspendiendo cultivos crecidos hasta la fase logarítmica tardía en glicerol estéril, ajustando la concentración final a 20% (V/V) o 50% (V/V) en medio rico, dependiendo de si el almacenamiento se realizaba a -20°C o a -80°C, respectivamente.

III.1.2. Cepas bacterianas y plásmidos utilizados

Las cepas bacterianas utilizadas en este trabajo se listan en la Tabla 3.1.1.6.

Cepas	Descripción	Fuente
<i>E. coli</i> Top10	<i>F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC)</i> <i>φ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1</i> <i>araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16</i> <i>rpsL(StrR) endA1 λ</i>	Invitrogen
<i>E. coli</i> DH5α	<i>recA, vlacU169, F80dlac ZDM15</i>	Bethesda Res. Lab.
<i>E. coli</i> S17-1	<i>E. coli</i> 294 RP4-2-Tc: :Mu-Km: :Tn7	Simon et al., 1983

Cepas	Descripción	Fuente
<i>S. meliloti</i> 2011	Sm R , Nod+ Fix+ en alfalfa, derivada de J. Dénarié., France la cepa SU47	
<i>S. meliloti</i> 2011 MP6	Cepa 2011 conteniendo la proteína GFP bajo el control del promotor del gen <i>nptII</i> en región <i>recA-alaS</i>	Pistorio et al., 2002
2011mTn5STM.1.01.C09	Mutante en gen SMc03883	Pobigaylo et al., 2006
2011mTn5STM.2.14.E09	Mutante en gen SMc00810	Pobigaylo et al., 2006
2011mTn5STM.3.11.E07	Mutante en gen SMc04340	Pobigaylo et al., 2006
2011mTn5STM.2.08.E08	Mutante en gen SM_b20757	Pobigaylo et al., 2006
2011mTn5STM.4.12.C04	Mutante en gen SMa1465	Pobigaylo et al., 2006
2011mTn5STM.4.13.D04	Mutante en gen SM_b20723	Pobigaylo et al., 2006
2011mTn5STM.4.03.B06	Mutante en gen SMc00781	Pobigaylo et al., 2006
2011mTn5STM.2.06.G03	Mutante en gen SMc03044	Pobigaylo et al., 2006
2011mTn5STM.3.13.G01	Mutante en gen SMc02702	Pobigaylo et al., 2006
2011mTn5STM.1.10.H02	Mutante en gen SMa2077	Pobigaylo et al., 2006

Tabla 3.1.1.6. Cepas y plásmidos utilizados

Los plásmidos utilizados en este trabajo se detallan en la Tabla 3.1.1.7

Plásmido	Descripción	Fuente
pFAJ1708	Vector de amplio rango de huésped, Tc ^R , contiene el promotor <i>nptII</i> .	Dombrecht et al., 2001
pK18mob	Km ^R . Vector de clonado de alto número de copias.	Schäfer et al., 1994
pBBR1MCS-5	Gm ^R . Vector de clonado de bajo número de copias, con promotor <i>lac</i> , replicativo en rizobios.	Kovach et al., 1995
pSRKGm	Gm ^R . Vector de clonado de bajo número de copias, con promotor <i>lac</i> inducible por IPTG, replicativo en rizobios.	Khan et al., 2008

Tabla 3.1.1.7. Plásmidos utilizados en este trabajo.

III.1.3. Transferencia de ADN

La incorporación de moléculas de ADN foráneo en células de *E. coli* se realizó por electrotransformación (electroporación). La transferencia de ADN entre *E. coli* y *S. meliloti* se realizó por conjugación.

Los protocolos utilizados para cada uno de los casos se encuentran a continuación:

Transformación - Electroporación

La preparación del cultivo bacteriano de *E. coli* electrocompetente se llevó a cabo basándonos en la técnica de Tung y Chow (Tung & Chow, 1995). Brevemente, se inocularon 200 ml de medio LB con 1 ml de un cultivo saturado durante 24 horas a 37 °C y con vigorosa agitación. Cuando la DO₆₀₀ del cultivo llegó a un valor cercano a 0,6 el cultivo se enfrió en hielo durante 30 min. De aquí en adelante todo el procedimiento se realizó en frío. Las bacterias fueron centrifugadas a 1600 g por 10 min a 4 °C y se lavaron 2 veces con glicerol 10% a 4 °C. Finalmente, se resuspendieron suavemente en 0,2 ml de 10% glicerol en agua bi-distilada y se fraccionaron en alícuotas de a 50 µl.

La electrotransformación fue llevada a cabo usando un equipo Gene Pulser (BioRad) en cubetas de 0,2 ml bajo las condiciones recomendadas por los fabricantes (25 µF, 200Ω, 2,5 kV). Luego de la electrotransformación se adicionó inmediatamente 1 ml de medio LB y se incubó por 1 hora a 37 °C para permitir la expresión de fenotipos de resistencia a antibióticos que se hayan incorporado en la transformación. Finalmente, las células se plaquearon en medio LB selectivo y se incubaron por toda la noche a 37 °C.

Conjugación

Las conjugaciones fueron realizadas según el método de Simon et al., 1983. El procedimiento experimental utilizado fue el siguiente: a 0,7 ml de un cultivo de la cepa donadora, en este caso cepas de *E. coli* S17-1 portadoras del plásmido a transferir, crecidos hasta una de DO₆₀₀ = 0,4 - 0,5 se le agregaron 0,7 ml de un cultivo de igual densidad óptica de la cepa aceptora, en nuestro caso la cepa *S. meliloti* 2011, o alguna cepa derivada de la misma. La mezcla se centrifugó a 800 g por 8 minutos y el pellet se resuspendió suavemente en aproximadamente 50 µl de medio TY líquido. Una gota de la suspensión bacteriana se colocó en una caja con medio TY sólido. La incubación se realizó a 28 °C durante toda la noche. La totalidad del crecimiento bacteriano fue resuspendido en medio TY líquido y plaqueado en medio TY suplementado con los antibióticos adecuados. En todos los casos se incluyeron controles con la cepa donadora y la cepa receptora procesadas por separado.

III.2. Técnicas de Biología Molecular

III.2.1 Construcciones genéticas y manipulación de ADN

Las metodologías generales de ingeniería genética se realizaron según Sambrook et al. (1989).

Preparaciones de ADN plasmídico

Las preparaciones de ADN plasmídico se realizaron por el método de lisis alcalina a mini escala (miniprep) y el ADN fue purificado utilizando un protocolo basado en unión a sílica (SiO₂) (Rapple, 2004).

Purificación de ADN plasmídico basado en unión a sílica: Para este procedimiento se requieren 2 soluciones adicionales a las utilizadas en el método de la lisis alcalina:

- Suspensión de sílica: a 2 g de sílica se le agregan 15 ml de agua y se centrifuga a 2000 x g por 2 minutos. Esta etapa se repite 3 veces y se resuspende en un volumen final de 2 veces el volumen de sílica.
- Solución de lavado: 50 mM NaCl, 10 mM Tris(pH = 7,5), 2,5 mM EDTA, 50% Etanol

La lisis bacteriana se realiza según el protocolo de lisis alcalina (Sambrook et al., 1989). Luego de la precipitación con acetato de potasio 3M pH = 5,4, se recoge el sobrenadante y a este se le agrega la cantidad apropiada de sílica (capacidad de unión de aprox. 200 ng de ADN / µl de suspensión). Se centrifuga 10 segundos a máxima velocidad y se lava tres veces con 500 µl solución de lavado. Se centrifuga a máxima velocidad y se seca el precipitado al aire. Para la elución se agrega el volumen deseado de *buffer* TE (10 mM de TRIS-HCl a pH=8, 1mM de EDTA a pH=8) o agua, y se incuba 5 minutos a 60 °C. Finalmente, se centrifuga y se guarda el sobrenadante a -20 °C hasta su uso.

Purificación de bandas de gel de agarosa

La recuperación de ADN a partir de bandas de gel de agarosa se realizó utilizando el método basado en unión a sílica, con las siguientes modificaciones:

La banda a recuperar se cortó con un bisturí y se colocó en un tubo de polipropileno de 1,5 ml. A continuación, para disolver la agarosa, se agregó 5 veces el volumen de la banda de solución de NaI 6M. Luego se incubó a 55 °C hasta disolución completa de la agarosa y se agregó 1/10 volúmenes de acetato de sodio 3M pH=5. Luego se agregó el volumen apropiado

de suspensión de sílica (capacidad de unión de aprox. 200 ng de ADN / μl de suspensión). Se centrifuga 10 segundos a máxima velocidad y se lava tres veces con 500 μl solución de lavado. Luego, se centrifuga nuevamente a máxima velocidad y se seca el precipitado al aire. Para la elución se agrega el volumen deseado de agua y se incuba 5 minutos a 60 °C. Finalmente, se centrifuga y se guarda el sobrenadante a -20 °C hasta su uso.

Determinación de concentraciones de ADN

Para determinar la concentración y calidad de las preparaciones de ADN se midió la absorbancia a 260 y 280 nm. Para ello se utilizó un equipo Nanodrop ND1000 (Nanodrop Technologies) según las especificaciones del fabricante.

Electroforesis en geles de agarosa

La verificación de las preparaciones de ADN y la separación de fragmentos de restricción se llevó a cabo mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa de concentración entre 0,8% y 1,5% en tampón TBE (Tris 89 mM, EDTA- Na_2 2,5 mM, H_3BO_3 89 mM, pH 8,2). Para la visualización del ADN, los geles de agarosa se prepararon con bromuro de etidio (0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$). El voltaje de trabajo se varió entre 5 y 12 volts/cm según los tamaños a separar. Como solución de carga se utilizó sacarosa 40% y azul de bromofenol 0,25% en una relación 5 μl solución de ADN/1 μl solución de carga.

Posteriormente la presencia de bandas de ADN se observó con luz UV de 260 nm en transiluminador. El registro de los geles se realizó por fotografía con una cámara digital.

El tamaño de los fragmentos de restricción se determinó por interpolación gráfica en curvas de calibración en las que se representó el logaritmo del peso molecular de los fragmentos de ADN frente a la movilidad relativa de los mismos. Como patrón se empleó los marcadores de peso molecular comerciales Ladder 100pb y Lambda-HindIII (PB-L).

Tratamientos enzimáticos del ADN

Las digestiones con enzimas de restricción se realizaron en las condiciones óptimas para las enzimas, siguiendo las indicaciones de temperatura y buffer indicadas por los proveedores comerciales (Fermentas, PROMEGA, Invitrogen, PB-L), y las recomendaciones descritas por Sambrook et al. (Sambrook et al., 1989).

III.2.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y PCR cuantitativa (qPCR)

PCR y oligonucleótidos

Las reacciones de PCR consistieron en una mezcla de:

- Obtención de amplicones para clonado: 1x buffer de reacción Q5, 200 μ M dNTPS, 0,5 μ M de cada cebador y 0,02 U/ μ l de Q5 High-Fidelity ADN polimerasa (NEB).
- Verificación de tamaño de los amplicones clonados: 1x buffer Tris-HCl, 2 mM MgCl₂; 200 μ M dNTPS; 0,5 μ M de cada cebador y 1 U de Taq polimerasa (PB-L).

Los ensayos de PCR fueron realizados en un termociclador Bioer Thermal Cycler.

La amplificación de los productos fue visualizada en geles de agarosa tal como fue indicado en la sección III.2.1.

Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados en este trabajo (Genbiotech, Macrogen) se presentan en la Tabla 3.2.2.1.

Nombre	Secuencia
SMc03883 fw	tgatcaagagacaggattCATATGAGAGGGTGAATG
SMc03883 rev	gctttttttgttggtacTAATCATAAAGGCACGT
SMc00810 fw	tgatcaagagacaggattGCAAGCGCGCCGGCGTTG
SMc00810 rev	gctttttttgttggtacTCATGCCTCGGTTCTTC
SMc04340 fw	tgatcaagagacaggattCATTGCTGCGGGCCTTCC
SMc04340 rev	gctttttttgttggtacTCAATGCGGGTGGTGCGC
SM_b20757 fw	tgatcaagagacaggattCTTGGAGTGAACCAATG
SM_b20757 rev	gctttttttgttggtacTTACACGTTTCGCCGCTT
SMA1465 fw	tgatcaagagacaggattTTACACGTTTCGCCGCTT
SMA1465 rev	gctttttttgttggtacTTATCGCAGCGGATTGAT
SM_b20723 fw	tgatcaagagacaggattAGGCATTGTGAATTCATG
SM_b20723 rev	gctttttttgttggtacTCACTGCAGGCGCAGCAT
SMc00781 fw	tgatcaagagacaggattTCAGGAGGAACACTCATG
SMc00781 rev	gctttttttgttggtacTTACCGCATCGTCGGTAT
SMc03044 fw	tgatcaagagacaggattGAAGGGGAAGGACAATG
SMc03044 rev	gctttttttgttggtacCTACATGTAGACGTGGCC
SMc02702 fw	tgatcaagagacaggattTGTGATCAAGGGAACATG
SMc02702 rev	gctttttttgttggtacTCATCGGGACAAAGCTTC
SMA2077 fw	tgatcaagagacaggattAAATGGAGAACTTGAATG

Nombre	Secuencia
SMa2077 rev	gctttttttgttggtacTCAGGCGACGCGCTGCGA
M13 fw	GTAAAACGACGGCCAG
M13 rev	CAGGAAACAGCTATGAC

Tabla 3.2.2.1. Secuencia de oligonucleótidos utilizado en este trabajo. Letras en mayúscula hacen referencia a las secciones del primer que hibridan con el ADN molde, mientras que las letras en minúscula hacen referencia a los adaptadores

III.3. Ensayos de plantas

III.3.1 Esterilización y germinación de semillas

En los distintos experimentos se utilizó *Medicago sativa* (alfalfa) cultivar Monarca o Sardi 10, según disponibilidad, como planta huésped. Las semillas fueron en primer lugar desgrasadas por inmersión en etanol 96% durante 1 minuto. Transcurrido este tiempo se descartó el etanol y se trató a las semillas con solución 20% (V/V) de lavandina comercial durante 10 minutos (concentración de NaClO equivalente a 55 g.l⁻¹ de Cl₂ activo). A continuación, las semillas se lavaron 5-6 veces con abundante agua estéril. Luego, se extendieron en condiciones asépticas sobre placas de Petri con agar-agua 1,5% (P/V), y se dejaron finalmente en oscuridad a 28 °C por 24 hs para la germinación.

III.3.2 Condiciones de cultivo

Todos los ensayos fueron realizados en una cámara de cultivo con un fotoperiodo de 16/8 hs luz/oscuridad, 25/18 °C de temperatura (día/noche), y 50% de humedad relativa.

III.3.3 Ensayo de coinoculación de cepa salvaje y mutante para la evaluación de la competitividad por la colonización de la rizósfera de plantas de alfalfa

Inóculo inicial y mezcla de entrada

Para la preparación del inóculo inicial las cepas correspondientes a los mutantes de *S. meliloti* a ser analizados (conservadas a -80 °C) y su cepa parental fueron crecidas durante pocas generaciones (no más de 4), hasta una DO₆₀₀ aproximada de 0,2 – 0,3. Estos cultivos, se utilizaron para preparar mezclas en proporción 1:1 de las cepas salvaje (marcada con GFP) y mutante, diluidas en medio mineral de Fåhraeus a concentración aproximada de 1x10⁵ UFC/ml. Estas mezclas representan las mezclas de entrada. Las mezclas de entrada fueron

plaqueadas en medio TY sólido selectivo para determinar la proporción inicial salvaje/mutante contando el número de colonias fluorescentes (salvajes) presentes cada 100 colonias (totales) en una zona aleatoria de la placa.

Ensayos y procesamiento de plantas

Los ensayos de plantas se realizaron utilizando macetas plásticas de 180 ml y vermiculita o perlita estéril como soporte. Las macetas fueron agujereadas en su base y se llenaron hasta aproximadamente los 160 ml con vermiculita/perlita estéril. Posteriormente se procedió a inocular las macetas por inundación con aproximadamente 100 ml de cultivo de bacterias (diluido a concentración aproximada de 1×10^5 UFC/ml en medio mineral Fåhraeus). El inóculo excedente fue descartado. Sobre cada maceta se colocaron correctamente 5 semillas de alfalfa previamente germinadas por incubación en medio agar agua a 28 °C en oscuridad por 18hs. Las macetas fueron cultivadas en una cámara de cultivo con un fotoperiodo de 16/8 hs luz/oscuridad, 25/18 °C de temperatura (día/noche), y 50% de humedad relativa por un período de 7 días (7 dpi).

Luego de 7 días, se extrajeron las plantas del material de soporte, se les cortó la parte aérea y sus raíces fueron resuspendidas en 10 ml de medio Fåhraeus y tratadas en vórtex durante 20 s, esto constituyó la mezcla de salida. Del mismo modo que en las mezclas de entrada se determinó la proporción salvaje/mutante.

Observación de fluorescencia verde debida a la expresión de GFP

La observación del desarrollo de fluorescencia verde en colonias bacterianas fue realizada mediante la utilización de un transiluminador de luz azul y un filtro naranja. Para la cuantificación de la proporción salvaje/mutante se tomaron fotografías de los plaques de las muestras de entrada y salida, de las cuales se contaron las colonias fluorescentes y no fluorescentes manualmente o con el uso del software FIJI.

Ensayo de sobrevivencia en inoculante tipo turba

Para validar los resultados fenotípicos obtenidos por STM, se evaluó individualmente la supervivencia en inoculante de turba (IT/PI) de un conjunto de mutantes seleccionados. Con este fin, se inoculó turba estéril con aproximadamente 10^8 UFC de *S. meliloti* 2011 de tipo salvaje o de un mutante (o una mezcla de ellos con la cepa salvaje marcada con GFP+) específico en tubos de polipropileno de 1,5 ml. Estas muestras se incubaron en general durante 30 días a 10°C. Las bacterias de los tratamientos de turba se recuperaron en los

tiempos 0 y 30 días posteriormente añadiendo 500 µl de medio TY a la turba inoculada, mezclando con vortex y tomando 100 µl del sobrenadante después de la sedimentación de la turba. Las bacterias recuperadas se diluyeron y se sembraron en placas de agar TY suplementadas con Sm para contar las células viables que habían sobrevivido al tratamiento. Se contaron las UFC para el inóculo y las muestras tratadas, y se calculó la proporción de bacterias supervivientes y en el caso de la co-inoculación se determinó el cambio en la proporción de mutantes en las mezclas. Un esquema de este ensayo se muestra en la Figura 3.3.3.1.

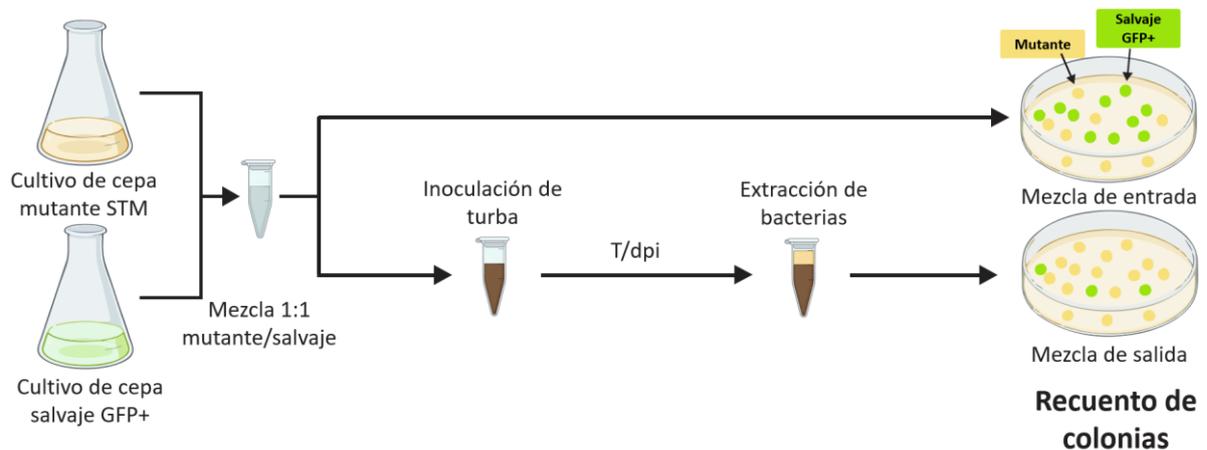


Figura 3.3.3.1. Esquema de ensayo de validación de supervivencia en turba.

Alternativamente, se utilizó otro protocolo correspondiente a un lote de turba procedente de otra fuente, el cual requiere el uso de un protector para el inóculo y una mayor concentración de bacterias. El inóculo, con una concentración final de 1×10^9 , se mezcló con una solución protectora a una concentración final de 5% v/v. Se cargaron tubos Eppendorf con 28 gramos de turba y luego con 280 µl de inóculo más protector. Posteriormente, se centrifugaron suavemente para lograr mezclar la solución de inoculante y la turba, y luego se mezclaron de forma mecánica con una punta descartable estéril de micropipeta para asegurar la completa homogeneización.

Las bacterias se recuperaron en los tiempos 0 (inoculante posterior al agregado de solución protectora) y 15 días. Para la muestra final, a los 15 días, se inundaron los tubos con 1 ml de medio TY, los cuales, luego de ser agitados en vortex, fueron centrifugados a 500 g y se recuperó el sobrenadante. Tanto las muestras iniciales como las finales se plaquearon para el recuento de células viables y se calculó la proporción de bacterias supervivientes.

III.4. Métodos bioinformáticos

III.4.1 Búsqueda por similitud secuencial, bases de datos y alineamientos múltiples

Para la búsqueda de proteínas homólogas por similitud secuencial se utilizó el programa blastp (Protein Blast, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>, Altschul et al., 1990) en el servidor de Blast del NCBI con parámetros por defecto y la base de datos nr (No redundante). Cuando fue necesario se limitó la búsqueda utilizando la opción *ORGANISM* y eligiendo el género especie y cepa bacteriana de interés.

La información correspondiente a las proteínas de interés (cuando estaba disponible), y los dominios que estas presentan fue obtenida de la base de datos UniProt (<https://www.uniprot.org/>, The UniProt Consortium, 2023) . Adicionalmente se obtuvo información sobre los dominios en la base de datos InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>, Paysan-Lafosse et al., 2023).

Los alineamientos múltiples se realizaron con el servidor MUSCLE de EMBL-EBI (<https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/muscle>, Madeira et al., 2024).

III.4.2 Modelado molecular y búsquedas por similitud estructural

La búsqueda de homólogos por similitud estructural se realizó utilizando el servidor FoldSeek (<https://search.foldseek.com/search>, van Kempen et al., 2024) con las predicciones de ESMfold (Lin et al., 2023), estas predicciones permitieron obtener las estructuras tridimensionales utilizando solo la secuencia aminoacídica, que luego fueron comparadas por FoldSeek con la base de datos PDB100 que agrupa las estructuras proteicas de modo que no haya más del 90% de similitud de secuencia entre ninguna de ellas. Así mismo, este servidor fue utilizado para el cálculo de los valores de TM-Score, de los cuales se considera una alta similitud a valores mayor a 0,5.

Los dominios transmembrana fueron predichos mediante el uso del servidor DeepTMHMM (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/DeepTMHMM-1.0/>, Hallgren et al., 2022)

III.4.3 Secuencias y genomas utilizados en este trabajo

Las secuencias genómicas utilizadas en este trabajo fueron descargadas de la base de datos de ensamblados de genomas del NCBI (Assembly, Kitts et al., 2016) y sus números de acceso se listan en el apéndice A1 (Secuencias genómicas utilizadas en este trabajo). Como base de

datos de secuencias de inserción (ISs) se utilizó la base de datos ISFinder. En particular se bajaron todas las secuencias de nucleótidos de las ISs de esta base de datos de la página <https://github.com/thanhleviet/ISfinder-sequences>.

III.4.4 Cálculo de distancias genómicas

Las distancias entre secuencias genómicas se calcularon por el método de *Average Nucleotide Identity* (ANI) y mediante *digital DNA-DNA hybridization* (dDDH) en los servidores ANI/AAI-Matrix Genome-based distance matrix calculator (<http://enve-omics.ce.gatech.edu/g-matrix/>, Goris et al., 2007) y GGDC Genome-to-Genome Distance Calculator 2.1 (<http://ggdc.dsmz.de/ggdc.php>, Auch et al., 2010), respectivamente. Los árboles fueron calculados en los mismos servidores mediante el método UPGMA a partir de las matrices de distancia derivadas de la matriz de similitud por ANI/dDDH. Los árboles se visualizaron en el servidor ITOL (<https://itol.embl.de>, Letunic & Bork, 2019) y cuando fue necesario se editaron con Inkscape (v1.0, inkscape.org).

III.4.5 Análisis realizados mediante ISCompare

Optimización de parámetros y validación del programa

El programa ISCompare fue escrito por el Dr. Lozano y no se describe en detalle en este trabajo de Tesis. Si se describen el ajuste de parámetros por defecto, la validación en tres sistemas modelo, y su uso para la identificación de secuencias de inserción de localización diferencial (Differentially located ISs; DLIS) en cepas bacterianas cercanas evolutivamente. Para este análisis se utilizaron las secuencias genómicas detalladas en el apéndice A1 (Tabla suplementaria 3.4.5.1)

Salvo en la etapa de ajuste de parámetros en las que se variaron diferentes opciones para optimizar los resultados obtenidos, el programa ISCompare se ejecutó según las instrucciones provistas en Protocols.io ([dx.doi.org/10.17504/protocols.io.bst6nere](https://doi.org/10.17504/protocols.io.bst6nere)) y la página web (<https://github.com/maurijlozano/ISCompare>).

Las opciones disponibles pueden obtenerse con el comando:

```
./ISCompare.py -h

usage: ISCompare.py [-h] [-q QFILES [QFILES ...]] [-r RFILES [RFILES ...]]
                  [-i ISFILE] [-I] [-Q QACC [QACC ...]] [-R RACC [RACC ...]]
                  [-e YOUREMAIL] [-E EVALUE] [-o OUTPUT] [-x]
```

```

[-l MINALNLENGTH] [-m MINLENGTH] [-s SURROUNDINGLEN]
[-s2 SURROUNDINGLEN2] [-S SHIFT] [-d ISDIFF]
[-f SCAFFOLDDIFF] [-p] [-c] [-rs]

```

ISCompare is a program designed to look for and compare insertion sequence position between a query and a reference genomes (or WGS Assembly)..

optional arguments:

```

-h, --help          show this help message and exit
-q QFILES [QFILES ...], --QueryFiles QFILES [QFILES ...]
                    Query genome in Genbank format...
-r RFILES [RFILES ...], --RefFiles RFILES [RFILES ...]
                    Reference genome in Genbank format...
-i ISFILE, --ISfile ISFILE
                    IS database file [Multifasta nucleotide file]...
-I, --ISscan        Scan IS on query and reference genomes using ISFinder
                    [Generates IS.fna file in results folder]...
-Q QACC [QACC ...], --QueryACC QACC [QACC ...]
                    Accession numbers for the query genome to download
                    from NCBI.
-R RACC [RACC ...], --RefACC RACC [RACC ...]
                    Accession numbers for the reference genome to download
                    from NCBI.
-e YOUREMAIL, --email YOUREMAIL
                    User email. Required for accession number download
                    mode.
-E EVALUE, --evaluate EVALUE
                    E-value cutoff for blastn search.
-o OUTPUT, --OutputDir OUTPUT
                    Output folder.
-x, --IDScaffolds  OMIT the remove identical scaffolds steps.
-l MINALNLENGTH, --minAlnLength MINALNLENGTH
                    Minimal required length of the alignment of the QIFs
                    to the reference genome.
-m MINLENGTH, --minLength MINLENGTH
                    Minimum QIFS length to be considered in the analysis.
                    For complete genomes it should be < 2*surroundingLen.
                    For genome assemblies with scaffolds/contigs it should
                    be < surroundingLen.
-s SURROUNDINGLEN, --surroundingLen SURROUNDINGLEN
                    Nucleotides to extract from upstream and downstream IS
                    blast hits [QIFs].
-s2 SURROUNDINGLEN2, --surroundingLen2 SURROUNDINGLEN2
                    Nucleotides to extract from QIFs blast hits [RAFs].
-S SHIFT, --shift SHIFT
                    Shifts the start and end of the QIFs an specified
                    number of nucleotides from the IS.
-d ISDIFF, --ISdiff ISDIFF
                    ISdiff: minimal difference in nucloetids between qlen
                    and IS alingment length (discard IS scaffolds).
-f SCAFFOLDDIFF, --scaffoldDiff SCAFFOLDDIFF
                    scaffoldDiff --> maximal difference in nucloetides for
                    two scaffolds to be considered identical.
-p, --plot          Plot IS surroundings with genomic features in both
                    query and reference genomes...
-c, --clean         Clean files...
-rs, --SLIS        Report IS with the same location (SLIS)...

```

En el estadio de optimización se variaron los parámetros del programa, en especial se realizaron pruebas para diferentes largos de la región flanqueante a analizar (ver descripción del algoritmo, sección 4.6.1) -s SURROUNDINGLEN. Una vez optimizado dicho parámetro se probaron diferentes valores de -l MINALNLENGTH, -m MINLENGTH, -d ISDIFF, y -f SCAFFOLDDIFF. Adicionalmente se realizaron estudios utilizando diferentes valores de -S SHIFT.

Las secuencias con inserciones artificiales fueron generadas con el programa ISsimulator escrito por el Dr. Lozano y fueron utilizadas para obtener genomas en donde la localización de las secuencias de inserción es conocida con precisión, y el background genómico es el mismo, o muy similar (Ver resultados, sección 4.6.1).

ISsimulator se puede ejecutar con las siguientes opciones:

```
usage: ISsimulator.py [-h] -i INPUT -s IS [-o OUTPUT] [-dr DIRECTREPEATS]
                        [-n NINSERTIONS]
```

ISsimulator is a program designed to randomly insert a desired IS into a provided genome.

optional arguments:

```
-h, --help            show this help message and exit
-i INPUT, --input INPUT
                        Genome in genbank format...
-s IS, --IS IS        Insertion sequence.
-o OUTPUT, --Output OUTPUT
                        Output Genbank file name (e.g. name.gb).
-dr DIRECTREPEATS, --directRepeat DIRECTREPEATS
                        Direct repeat length [Default 0].
-n NINSERTIONS, --ninsertions NINSERTIONS
                        Number of Is insertions [Default 30].
```

Los diagramas circulares fueron obtenidos con el programa Circos (<https://circos.ca/>, Krzywinski et al., 2009).

Identificación de DLIS en rizobios

Para la identificación de DLIS en rizobios se descargaron los genomas detallados en el apéndice A1 (Tabla suplementaria 3.4.5.2) pertenecientes a las especies *Sinorhizobium meliloti*, *Sinorhizobium fredii*, *Mesorhizobium loti*, *Mesorhizobium ciceri*, *Rhizobium etli*, *Rhizobium leguminosarum*, *Bradyrhizobium diazoefficiens* y *Bradyrhizobium japonicum*. Para cada especie se seleccionó un genoma de referencia y se realizaron todas las comparaciones de a pares con ISCompare con las opciones por defecto. Para el análisis solo se tomaron las

secuencias de inserción clasificadas como DLIS y con un hit completo a una de las ISs en la base de datos usada.

El número de DLIS identificadas fue normalizado por el largo promedio del replicón – cromosoma o genoma accesorio– y se expresa como Número normalizado de DLIS / 100.000 nucleótidos.

Para comparar con el número de DLIS con el número total de ISs en cada genoma, las últimas fueron contadas a partir de los datos de anotación genómica mediante un script en Python a través de la búsqueda de las palabras clave: “transposase” o “insertion seq”.

La discriminación del sitio de inserción de las DLIS en las categorías “dentro de un gen”, “Intergénico” u “operón”, al igual que la distinción de posibles inserciones en secuencias promotoras, se realizó utilizando scripts en Python y el programa Bedtools (Quinlan & Hall, 2010). Brevemente, las DLIS insertadas dentro de genes se determinaron directamente a partir de la anotación genómica y la posición de inserción provista por ISCompare. Luego se buscaron las dos secuencias codificantes más cercanas a la posición en donde está insertada una determinada DLIS usando el comando “closest” de Bedtools. Si la DLIS estaba insertada a menos de 150 nucleótidos del extremo 5’ de un determinado gen, se consideró como insertada en un promotor. Por otro lado, se analizó la distancia y orientación de los dos genes más cercanos, y si estos se encontraban en la misma orientación y a menos de 100 nucleótidos de distancia, entonces se consideró a la DLIS como insertada en un operón.

Para las DLIS insertadas dentro de genes se realizó un análisis funcional utilizando clusters of orthologous groups (COGs, Galperin et al., 2021). Para cada uno de los genes afectados, se extrajo la secuencia de aminoácidos y se anotó utilizando el servidor EggNOG 5 (Huerta-Cepas et al., 2019). Luego se realizó el análisis utilizando scripts en lenguaje Python y las librerías pandas, matplotlib, seaborn y numpy.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.1 Validación del fenotipo en turba de mutantes STM

Como se describió en la introducción de este trabajo, en nuestro laboratorio se realizó la evaluación simultánea del fenotipo de competencia por la colonización de la rizosfera de plantas de alfalfa, y de la supervivencia en formulaciones para bioinoculantes, de miles de mutantes de *S. meliloti* mediante la tecnología de mutagénesis por mutantes etiquetados (Signature tagged mutagenesis, STM, por sus siglas en inglés) acoplado a secuenciación masiva mediante la tecnología Illumina. A partir de dicho trabajo se lograron identificar cientos de genes cuya mutación produjo un efecto negativo en la capacidad de la bacteria de colonizar la rizosfera de plantas de alfalfa (*Medicago sativa*) y/o con un fenotipo alterado de supervivencia en formulaciones de inoculantes líquidos o tipo turba. Como resultado del experimento STM-seq para identificar determinantes de importancia para la supervivencia en inoculantes tipo turba (STM-Turba) se lograron identificar 471 mutantes de *S. meliloti* cuyo fenotipo de supervivencia se encontró aumentado o disminuido.

En el caso del ensayo de competencia por la colonización rizosférica, el fenotipo de muchos de estos mutantes pudo validarse mediante experimentos de competencia en proporciones 1:1 de la cepa salvaje en relación a cada mutante en particular (Salas et al., 2017). Sin embargo, los primeros intentos para validar el fenotipo de mutantes para los cuales se encontraba afectado el fenotipo de supervivencia en formulaciones de inoculantes tipo turba o líquido no fueron exitosos. En función a ello, este primer capítulo describimos nuevos ensayos realizados para la validación de los resultados obtenidos por STM-Turba.

IV.1.2 Ensayos de validación por coinoculación salvaje vs. mutante

Al igual que se había realizado con el experimento STM para identificar genes implicados en la competencia por la colonización rizosférica, se intentó en primera instancia validar los resultados del experimento STM-Turba mediante ensayos de competencia por la supervivencia en inoculantes tipo turba (IT) mediante la coinoculación en iguales proporciones de un mutante determinado y la cepa salvaje marcada con fluorescencia verde (expresión de la proteína verde fluorescente, GFP).

Lamentablemente, debido a diferentes factores que afectaron la variabilidad de estos ensayos no se logró obtener resultados contundentes. Entre estos factores, el más importante pudo haber sido la utilización de sistemas en tubos de 1,5 ml los cuales fueron utilizados en reemplazo de la inoculación en bolsas de IT que fue lo que se había utilizado originalmente en el ensayo STM-Turba (Bolsas de IT provistas por la empresa Biagro-Bayer). Esto fue debido en parte a la falta de disponibilidad de IT luego de que la empresa dejara de fabricar formulaciones de inoculantes de tipo turba.

Otro factor relevante fue la temperatura de incubación durante la maduración en el experimento STM-Turba. En un principio se había entendido que el proceso se había realizado a temperatura ambiente, pero luego se nos comunicó que había sido en cámara a 10 °C. Finalmente se probaron otras variables como el agregado o no de la solución diluyente para IT provisto por la empresa, y el ajuste de la cámara de aire en los tubos (con/sin cámara de aire). Finalmente, para la realización de los últimos experimentos logramos obtener turba de otro proveedor.

Los ensayos de validación se desarrollaron entre los años 2017 y 2020. En los ensayos se utilizaron diferentes números de mutantes y fueron realizados por triplicado o cuadruplicado. Cada experimento en sí consistió en inocular mezclas en proporciones 1:1 salvaje (GFP) - mutante, en cantidades de aproximadamente 6×10^6 UFC finales por cepa, en un tubo de 1,5 ml lleno hasta la marca de 1 ml con turba estéril. Luego del periodo de incubación, se recuperaron las bacterias mediante el agregado de 500 μ l de medio TY, seguido por vortex, y sedimentación de la turba. Del sobrenadante se plaquearon diluciones seriadas para realizar los recuentos de cepas salvajes y mutantes mediante observación a luz azul (colonias verdes, GFP, salvajes; colonias blancas, mutantes; Figura 4.1.2.1).

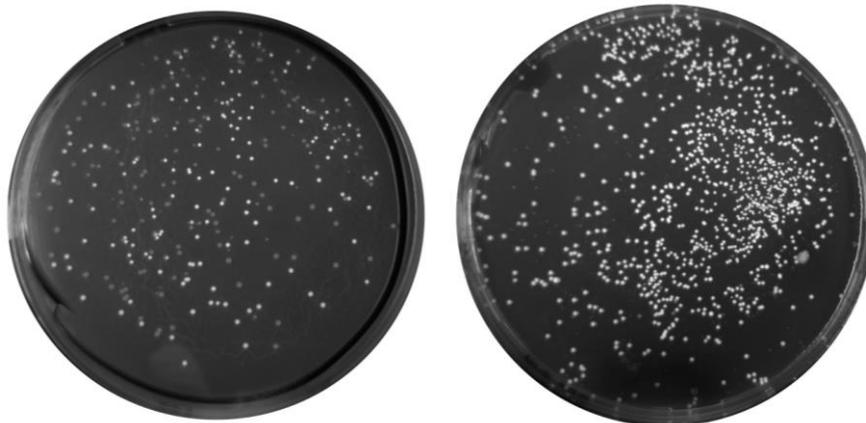


Figura 4.1.2.1. Ejemplo de placa de recuentos para el cálculo de la proporción entre la cepa salvaje (GFP, colonias brillantes) y la cepa mutante (Colonias oscuras).

A continuación se describen brevemente los ensayos realizados durante este trabajo de tesis (Tabla 4.1.2.1), sin tener en cuenta un ensayo de validación realizado previamente utilizando tubos de 1,5 mL conteniendo turba estéril inoculados con 60 μ L de mezclas en proporción 1:1 - salvaje:mutante con una concentración de aproximadamente 2×10^9 UFC/mL.

Para la realización de este experimento, se analizaron un total de 33 mutantes por triplicado/cuadruplicado, en 4 ensayos de 1 mes de duración cada uno, y a partir del recuento y clasificación en verde/blanco de al menos 100 colonias por réplica.

En la Figura 4.1.2.2 se muestran las proporciones en la muestra de entrada y salida (luego del tratamiento en IT) para cada uno de los mutantes y ensayos realizados. Como puede observarse, si bien en muchos casos se obtuvieron diferencias significativas en las proporciones ($p\text{-value} < 0,05$, el análisis estadístico se realizó utilizando *Chi2*), la variabilidad de los valores calculados de M (M-Value; \log_2FC) fue grande, y en solo un poco menos de la mitad de los tratamientos se obtuvieron valores compatibles con los obtenidos en el experimento STM-Turba (Figura 4.1.2.3, M-STM).

Adicionalmente, los valores M para un mismo mutante variaron mucho entre ensayos, incluso con tendencia contraria en algunos casos (ver Figura 4.1.2.3, por ejemplo, A11, Sm_b20757, Sma1229, Smc03113, Smc03140).

Ensayo	Características del ensayo	Mutantes ensayados
Marzo 2017	Idem Diciembre 2016 (trabajo previo), 60 μL de inóculo de 1×10^9 UFC/ml (aprox. 6×10^6 UFC finales), 1 mes a temperatura ambiente (aprox. 25 °C). Reducción de la capa de O_2 del tubo.	A2 (SMa1229,fixL); A23 (SM_b21087,traA2); A4(SMc03113,TRm5N); A54(SMa1229,fixL); A56(SM_b21662,exol2); B33 (SM_b20757,bhbA); B42(SMc01431,ilvI); B45(SMc03979,gap); C45(SM_b20941,exsA); C72(SM_b21555,kefB2); C76(SMc03140); D23(SMc01431,ilvI); D52(SMc02181,putA); D6(SMc01139_rpoN); F2(SM_b20834,rkpZ1); F23(SMc01620,eryB); F63(SMc00761,ordL2); F68(SMc02271,rkpH)
Abril 2017	1×10^6 UFC finales, 1 mes a temperatura ambiente (aprox. 25 °C), agregado de diluyente para turba	A2 (SMa1229,fixL); A23 (SM_b21087,traA2); A4 (SMc03113,TRm5N); A46 (SMc02228,fadA); A54 (SMa1229,fixL); A56 (SM_b21662,exol2); A58 (SMc02450,argI); B33 (SM_b20757,bhbA); B42 (SMc01431,ilvI); B43 (SMc00188,fbcb); B45 (SMc03979,gap); C27 (SMc03849,ccmC); C42 (SMc03025,flil); C45 (SM_b20941,exsA); C72 (SM_b21555,kefB2); C76 (SMc03140); D23 (SMc01431,ilvI); D33 (SMc02435,hemK1); D52 (SMc02181,putA); D6 (SMc01139,rpoN); F2 (SM_b20834,rkpZ1); F23 (SMc01620,eryB); F63 (SMc00761,ordL2); F64 (SMc01843,metF); F66; F68 (SMc02271,rkpH)
Febrero 2018	1×10^6 UFC finales, 1 mes 10 °C, agregado de diluyente para turba.	A1, A11, A18, A2 (SMa1229,fixL), A4 (SMc03113,TRm5N), B20, B33 (SM_b20757,bhbA), B45 (SMc03979,gap), C23, F23 (SMc01620,eryB), F25, F59
Diciembre 2019	28gr de turba y 280 μL de inoculante de 1×10^9 UFC finales, 15 días a 10 °C, agregado de protector al inoculante.	A1 (SM_b20562), C23 (SMc00963), A11 (SMc01977), A4 (SMc03113), B45 (SMc03979)

Tabla 4.1.2.1. Lista de mutantes evaluados en ensayo de sobrevida en turba.

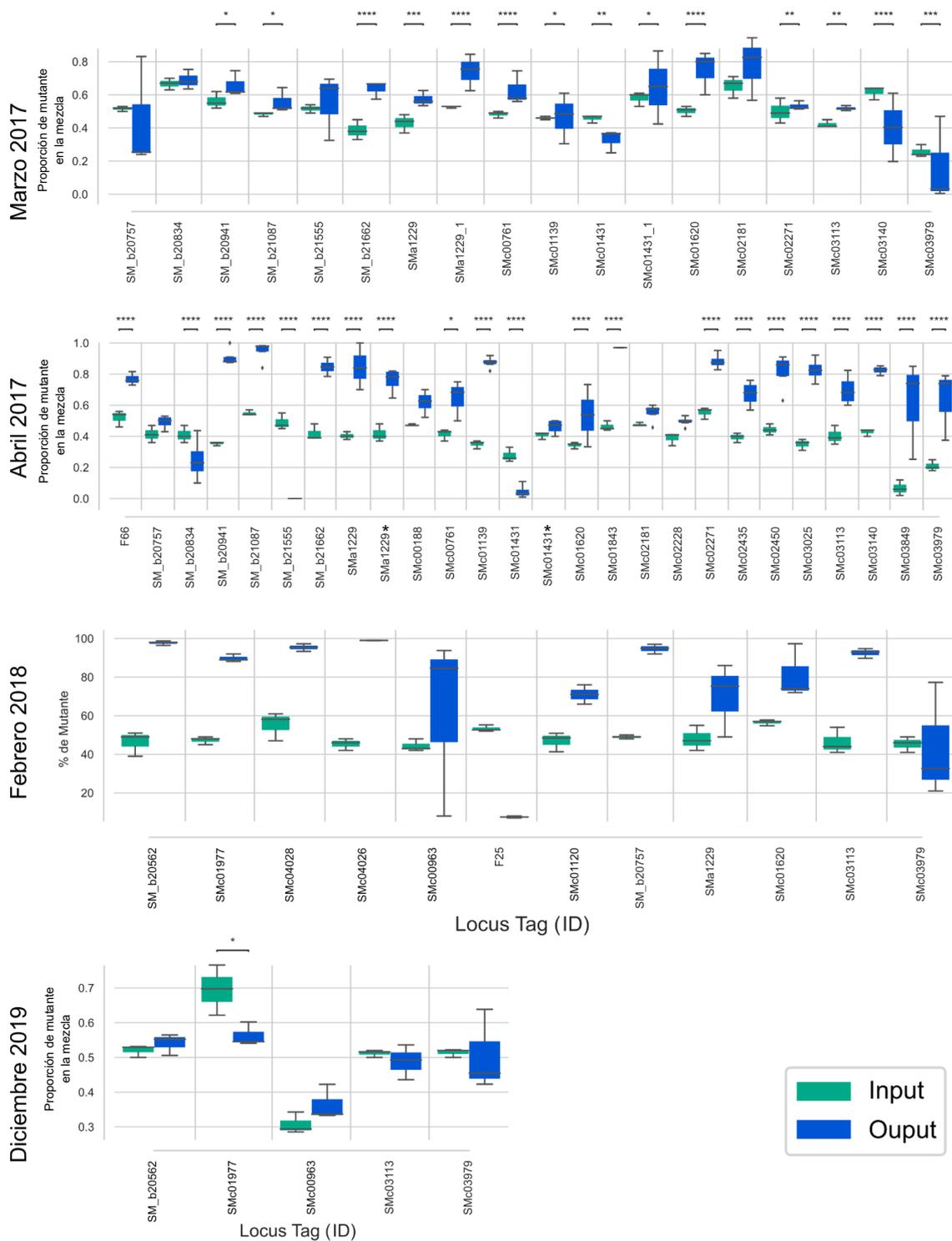


Figura 4.1.2.2. Ensayos de validación por coinoculación de las cepas salvaje y mutante en iguales proporciones. Las comparaciones entre las muestras de entrada y salida se realizaron utilizando *Chi2*, salvo en el experimento Febrero 2018 para el que no pudo realizarse. (*: $1,00e-02 < p \leq 5,00e-02$; **: $1,00e-03 < p \leq 1,00e-02$; ***: $1,00e-04 < p \leq 1,00e-03$; ****: $p \leq 1,00e-04$).

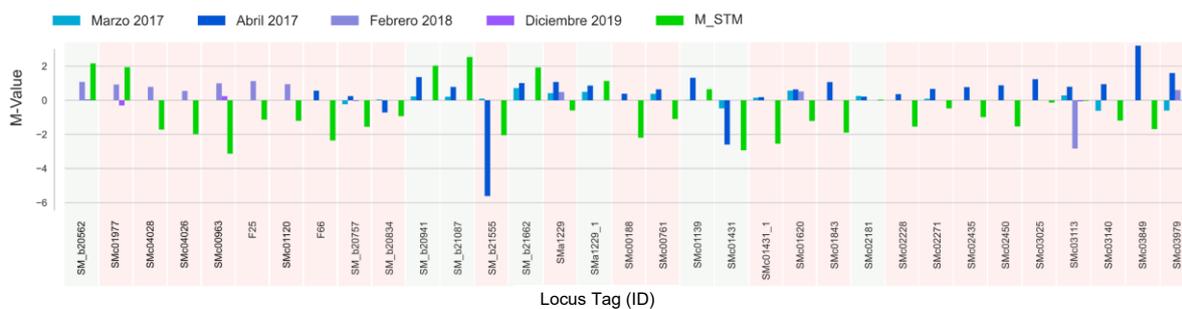


Figura 4.1.2.3. Resultado de los experimentos de validación. Las cepas marcadas con fondo verde claro son las únicas para las que los M-Values fueron coincidentes con el experimento STM-Turba y consistentes entre réplicas.

Analizando los datos del ensayo STM-turba encontramos que en general se recuperaban más de 10^8 UFC/ml de las bolsas inoculadas. Mayoritariamente obtuvimos recuentos para plaqueos directos, diluciones 10^{-1} o a lo sumo 10^{-2} . Esto nos sugirió que en estos experimentos de validación estábamos recuperando pocas bacterias, y por lo tanto, los resultados difícilmente representan la población en la turba. Una causa posible en la disminución de la carga bacteriana podría estar vinculada a la modificación de la turba por el paso del tiempo (debido al lapso pasado desde la realización del experimento STM-Turba y la validación, sumado al hecho de que Biagro-Bayer no pudo proveernos con nuevos stocks de turba). En función a lo ocurrido, decidimos realizar ensayos dirigidos a investigar el estado fisiológico de las bacterias recuperadas de la turba.

IV.1.3 Estado fisiológico de las bacterias recuperadas del inoculante tipo turba

Una de las hipótesis que nos planteamos fue que los resultados no podían ser validados correctamente debido a que los mutantes recuperados presentaban estados fisiológicos diferentes no directamente relacionados con su fenotipo de sobrevivencia en IT. Durante el experimento STM-Turba se recuperaron recuentos altos de bacterias (mayores a los iniciales, presentaron un crecimiento neto). Además, los mutantes recuperados de la turba eran crecidos en medio TY por unas pocas generaciones debido a que era necesario eliminar la turba, ya que inhibe parcialmente la reacción de PCR necesaria para la amplificación de las firmas en el experimento STM. Esto pudo haber aumentado parcialmente los recuentos de mutantes sobrevivientes que se encontraban en un estado tal que les permitió crecer inmediatamente en el medio rico, mientras que otros mutantes pueden haber experimentado una fase *lag* en el crecimiento. Si ese fuera el caso, podría explicarse la falta de resultados satisfactorios en los experimentos de validación.

Para analizar esta hipótesis se realizó un experimento en el cual la cepa salvaje y diferentes mutantes fueron inoculados de forma independiente en tubos de 1,5 ml con IT. Brevemente, se inocularon 10^8 UFC de la cepa salvaje o de los diferentes mutantes en solución diluyente

para IT y se determinó la velocidad de crecimiento en medio TY (A3, Tabla suplementaria 4.1.3.1). Adicionalmente, tubos con 1 ml de IT se inocularon con 10^8 UFC de estas diluciones, se incubó por 15 días a 10 °C, y se recuperaron las bacterias en medio TY de igual forma que en los ensayos de competición. A las bacterias recuperadas se les determinó la velocidad de crecimiento en medio TY (A3, Tabla suplementaria 4.1.3.1).

VELOCIDAD DE CRECIMIENTO						
Cepa	Inicial			Final		
	Media	Dif	Stdev	Media	Dif	Stdev
2011	0,2831	-	0,015	0,3137	-	0,0370
SM_b20562	0,3322	***	0,017	0,3305	ns	0,0408
SM_a1229	0,2871	ns	0,010	0,334	ns	0,0381
SMc01977	0,3276	**	0,006	0,3214	ns	0,0498
SMc04028	0,2712	ns	0,012	0,3269	ns	0,0444
SMc04026	0,2869	ns	0,001	0,308	ns	0,0396
SM_b20757	0,2728	ns	0,006	0,2868	ns	0,0192
SMc03979	0,221	****	0,005	0,354	ns	0,0248
SMc00963	0,2543	*	0,006	0,2893	ns	0,0217
SMc01620	0,3088	ns	0,005	0,3669	ns	0,0369
SMc02311	0,2985	ns	0,007	0,284	ns	0,0202
SMc01120	0,2868	ns	0,001	0,3486	ns	0,0142

TIEMPO DE FASE LAG						
Cepa	Inicial			Final		
	Media (hs)	Dif	Stdev	Media (hs)	Dif	Stdev
2011	7,928	-	0,3497	47,42	-	2,6828
SM_b20562	7,71	ns	0,7125	46,97	ns	1,5533
SM_a1229	8,609	ns	0,2903	42,46	ns	0,6982
SMc01977	8,351	ns	0,4149	45,98	ns	4,1399
SMc04028	9,002	ns	0,6873	43,19	ns	7,5828
SMc04026	9,365	*	0,1599	43,26	ns	1,7022
SM_b20757	8,382	ns	0,5616	53,75	ns	7,1490
SMc03979	7,232	ns	0,9424	43,08	ns	1,8588
SMc00963	8,083	ns	0,3012	49,15	ns	5,8559
SMc01620	7,64	ns	0,1971	43,29	ns	2,7520
SMc02311	8,489	ns	0,6146	45,29	ns	4,0095
SMc01120	7,922	ns	0,2687	42	ns	4,7954

Tabla 4.1.3.1. Velocidades de crecimiento y tiempo de latencia para cultivos en medio TY.

En estos experimentos se pudo observar que tras ser recuperadas de la turba las bacterias, incluida la cepa salvaje, experimentaron una fase *lag* de aproximadamente 40-50 horas sin presentar diferencias significativas con la cepa salvaje. Si bien no se encontraron diferencias estadísticas en las velocidades de crecimiento, si se registraron valores significativos en las curvas para diluyente de IT.

Un factor constante observado en estos experimentos fue la baja recuperación de bacterias a partir de los tratamientos IT. Por ello se procedió a realizar un último ensayo de validación que se describe en la próxima sección, utilizando un mayor inóculo bacteriano.

IV.1.4 Ensayo de validación por crecimiento individual de mutantes en inóculos altos

Ante la hipótesis de que la falta de reproducibilidad se debió al bajo recuento de UFC luego del desafío por 15 días / 1 mes en el inoculante tipo turba (aproximadamente 100 colonias en la siembra directa) se decidió evaluar de forma individual la supervivencia en IT de los diferentes mutantes, utilizando inóculos finales de 10^8 UFC por tubo de 1.5 ml relleno hasta la marca de 1 ml con turba estéril (se utilizó a su vez turba nueva obtenida de otra fuente). Las muestras en este caso fueron incubadas por 15 días a 10 °C. La recuperación se realizó como en los ensayos previos por agregado de 500 µl de medio TY, mezcla por agitación fuerte en vortex y sedimentación de la turba. A continuación, se plaquearon diluciones seriadas, obtenidas a partir de 100 µl del sobrenadante, en medio TY suplementado con Sm. Se contaron las UFC para el inóculo y los tratamientos en IT, y se calculó para cada cepa la proporción de bacterias a los 15 días con respecto al inóculo inicial. La comparación se realizó con respecto a *S. meliloti* 2011.

Se seleccionaron diez mutantes de *S. meliloti* afectados en la supervivencia en turba para su validación individual.

Cepa	Gen	Anotación	M
SM_b20562	SM_b20562	Proteína hipotética	2,1
SM_a1229	fixL	Quinasa de histidina regulada por oxígeno FixL	-0,60
SMc01977	SMc01977	Proteína transportadora ABC periplásmica que se une a azúcares	1,94
SMc04028	gltB	Sintasa de glutamato	-1,72
SMc04026	gltD	Sintasa de glutamato	-1,98
SM_b20757	bhbA	Mutasa de metilmalonil-CoA	-1,54
SMc03979	gap	Deshidrogenasa de gliceraldehído-3-fosfato	-3,42
SMc00963	SMc00963	Proteína hipotética	-3,14
SMc01620	eryB	Deshidrogenasa de glicerol-3-fosfato	-1,21
Región intergénica cerca de SMc02311	maf	Proteína similar a Maf	-1,16
SMc01120	SMc01120	Proteína hipotética	-1,2

Tabla 4.1.4.1. Valores M de cada mutante en ensayos STM de sobrevida en turba.

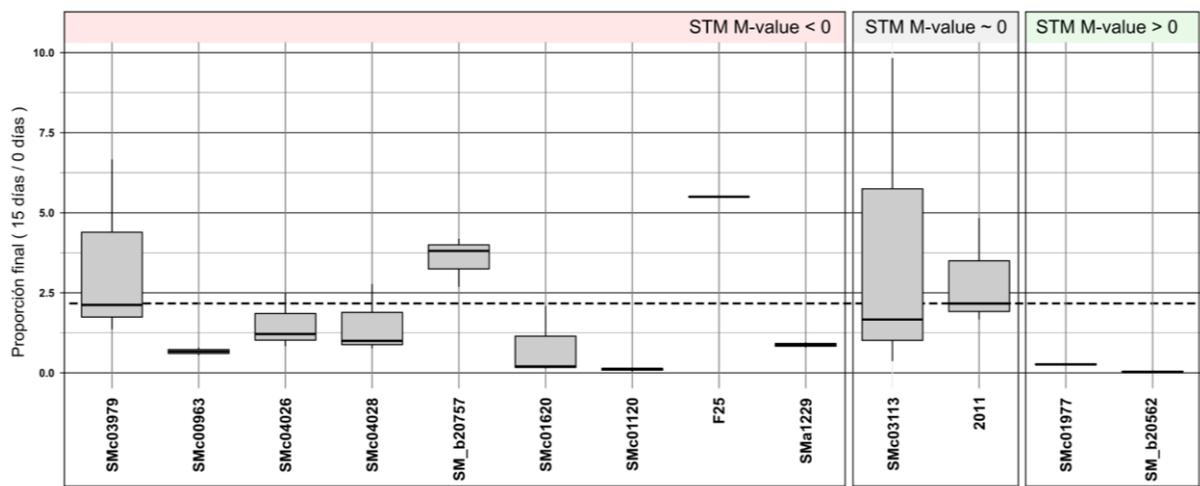


Figura 4.1.4.1. Evaluación del fenotipo afectado en la sobrevivencia en inoculante tipo turba. La línea punteada marca el valor promedio de la cepa salvaje *S. meliloti* 2011

Como puede observarse en la Figura 4.1.4.1 se obtuvo un fenotipo compatible con el obtenido en los ensayos STM-Turba para la mayoría de los mutantes evaluados que presentaban un fenotipo de menor supervivencia en IT (Lozano et al., 2023).

IV.2 Selección de genes para sobreexpresión

La exploración de la diversidad en las características de relevancia en organismos como parte de los procesos de colonización y crecimiento en el ambiente rizosférico constituye un aspecto fundamental en la comprensión de las interacciones microbianas y su aplicabilidad en sistemas agrícolas. En este contexto, la presente investigación se enfoca en la identificación y caracterización de mutantes afectados en la colonización y con potencial relevancia agronómica. Uno de los objetivos particulares de este trabajo fue la evaluación del fenotipo de colonización de la rizosfera de plantas de alfalfa por cepas que sobreexpresan genes para los cuales hay evidencia previa de su implicancia en dicho proceso. En este capítulo se describe la selección y análisis bioinformático de genes individuales para su posterior sobreexpresión mediante su clonado en vectores de amplio rango de hospedadores y su posterior conjugación a *S. meliloti* 2011.

La selección de los genes candidatos se llevó a cabo mediante un proceso de filtrado basado en criterios multifacéticos, diseñados para identificar aquellos genotipos con fenotipos específicos de interés en los contextos de colonización y crecimiento en medios diversos.

En primer lugar, se realizó una selección teniendo en cuenta el fenotipo de colonización observado en los ensayos STM de competencia por la colonización rizosférica, utilizando como parámetro de referencia el valor M (\log_2 *fold change*) del ensayo STM realizado en nuestro laboratorio, que representa la reducción en la capacidad de colonización en comparación con el tipo salvaje. Se estableció un umbral crítico para la selección, donde se consideraron los mutantes con un índice de colonización negativo ($M < -0,7$) para la rizosfera de plantas de alfalfa. 6 de los 10 genes seleccionados presentaron a su vez un $M < -0,7$ para la colonización de la rizosfera de plantas de arveja. Adicionalmente se utilizó la información de fenotipo de crecimiento de mutantes de *S. meliloti* de un ensayo TnSeq incluyendo más de 80 condiciones de crecimiento en batch (*Fitness Browser*, <https://fit.genomics.lbl.gov/cgi-bin/myFrontPage.cgi>, Price et al., 2018).

Además, se priorizó la presencia de ortólogos en otras especies de rizobios utilizadas en la producción de bioinoculantes. Dichos ortólogos fueron asignados previamente en la plataforma EDGAR (Salas et al., 2017). Esta estrategia se fundamenta en la premisa de que los genes conservados entre especies pueden tener funciones biológicas similares, lo que aumenta la relevancia y la aplicabilidad potencial de los resultados obtenidos en esta investigación.

Un aspecto crítico en la selección fue la evaluación del crecimiento en un medio de cultivo rico, específicamente el medio LB, como indicador de la viabilidad general de los mutantes en condiciones óptimas de nutrición, y de que el fenotipo observado no corresponde con un defecto en una vía fundamental para el crecimiento normal de esta cepa. Aquellos mutantes que no mostraron diferencias significativas en el fitness en comparación con el tipo salvaje en

este medio se consideraron para su inclusión en este estudio. Los resultados obtenidos por Price et al. (2018) se muestran en la Tabla 4.2.1 donde los valores mayores a -1 y menores a 1 corresponden a fenotipos que no son claramente afectados en esta condición.

Gen	LB	LB_2	LB_3
SMc00781	0,318	0,509	0,661
SMa1465	0,035	0,246	-0,335
SMa2077	0,608	0,09	0,405
SMc02702	-0,008	-0,143	-0,169
SMc03044	0,04	-0,093	0,046
SMc03883	0,843	0,011	-0,063
SMc04340	-0,393	-0,469	-0,866
SM_b20757	0,801	0,981	1,14

Tabla 4.2.1 Valores de fitness correspondientes al cultivo en medio LB para los genes seleccionados. No se encontraron datos para SMc00810.

Finalmente, se evaluó el perfil transcripcional de los genes candidatos en diferentes condiciones de estrés y durante la interacción simbiótica (Datos extraídos de la base de datos EMMA2, Becker et al., 2009; Capela et al., 2006; Chao et al., 2005; Domínguez-Ferreras et al., 2006; Dondrup et al., 2009; Hellweg et al., 2009), prestando especial atención a que la transcripción de los genes seleccionados no fuera inhibida en nódulos. Esto se hizo con el objetivo de descartar genes que al ser sobreexpresados pudieran tener efectos adversos en la función nodular, lo que podría comprometer su funcionamiento en etapas posteriores a la infección durante la relación simbiótica, ya sea en la supervivencia, diferenciación o actividad fijadora de nitrógeno en el nódulo (Tabla 4.2.2).

Gen	M Medicago sativa Site1	M Medicago truncatula	M Medicago sativa Europe	M 5 dpi M sativa Europe	M 8 dpi M sativa Europe	M 14-18 dpi M sativa europe
SMc00781	0,5446	0,7849	0,7335	0,4014	0,8258	0,2977
SMc00810	-0,0895	-0,0433	-0,4497	-0,0423	-0,5426	-1,0178
SMa1465	1,8913	1,3196	2,1868	3,1396	1,6189	1,0214
SMa2077	0,1309	0,4379	0,2234	0,1573	1,0694	0,3201
SMc02702	-0,1712	-0,3778	-0,1510	-0,2542	0,0385	-0,1884
SMc03044	1,4960	0,7233	1,5115	2,2677	1,0803	0,7402
SMc03883	-0,5258	-0,6792	-0,7081	-0,2240	-0,1205	-0,4265
SMc04340	1,7641	2,3325	2,3899	1,7804	1,8528	2,0209
SM_b20723	0,1657	0,3860	0,4716	0,4856	2,1924	1,3806

Tabla 4.2.2. Valores M (log2 Fold Change) de inducción/represión en nódulos/planta para los genes seleccionados. No se encontraron datos para SM_b20757.

Tras la aplicación de estos criterios, se seleccionaron diez genes que cumplieran con los requisitos establecidos (Tabla 4.2.3). Cada uno de estos genes se someterá a un exhaustivo análisis fenotípico para determinar su contribución específica a los procesos de colonización y crecimiento en medios diversos.

En resumen, la selección de los genes para este estudio se basó en una combinación de criterios genéticos, fenotípicos y funcionales, con el objetivo de seleccionar genes de interés que puedan ser potencialmente aplicables en el mejoramiento de la agricultura mediante la manipulación de interacciones microbianas beneficiosas.

Gen	Función	Categoría
SMc00781	Reductasa de Acil-CoA	Producción y conversión de energía
SMc00810	Exopolifosfatasa/fosfohidrolasa pppGpp	Metabolismo y transporte de nucleótidos
SMA1465	Sistema de transporte ABC tipo prolina/glicina betaína	Metabolismo y transporte de aminoácidos
SMA2077	Oxidoreductasa predicha	Predicción funcional general solamente
SMc02702	Proteína no caracterizada	Función desconocida
SMc03044	Proteína de control de la longitud del gancho flagelar FliK	Movilidad celular
SMc03883	Carboxipeptidasa de membrana	Biogénesis de la pared/membrana/envoltura celular
SMc04340	5,10-metilentetrahidrofolato reductasa	Metabolismo y transporte de aminoácidos
SM_b20723	Proteína de unión a soluto periplásmico de un posible transportador de hierro tipo ABC	-
SM_b20757	Mutasa de metilmalonil-CoA	Transporte y metabolismo de lípidos

Tabla 4.2.3. Genes seleccionados para validación de fenotipo alterado de colonización rizosférica y para la evaluación del efecto de su sobreexpresión

De los genes seleccionados SM_b20757, SMc00781, SMc00810, SMc03883 y SMc02702 presentan ortólogos en la mayoría de los rizobios analizados; SMA2077 y SMc04340 están conservados sólo en algunos géneros; SMc03044 solo fue encontrado en *Sinorhizobium*; y finalmente ortólogos de SMA1465 fueron solo encontrados en *S. meliloti*. Solo SMc00810 presentó una represión transcripcional en plantas a 14-18 dpi ((Capela et al., 2006) , Tabla 4.2.2).

IV.2.1 Caracterización bioinformática de los genes seleccionados

Para la caracterización bioinformática nos apoyamos en parte en la disponibilidad de la base de datos *Fitness Browser* una base de datos que recauda información de un experimento Rb-TnSeq que incluye resultados del comportamiento de mutantes de *S. meliloti* 1021 en distintas condiciones entre las que se encuentra el crecimiento en medio LB, medios definidos con distintas fuentes de carbono, distintas fuentes de nitrógeno y distintas condiciones de estrés, como pH o altas concentraciones salinas.

SMc03883

SMc03883, también conocido como *mtgA*, codifica para una proteína integral de membrana asociada con la biosíntesis del peptidoglicano, una estructura crucial en la pared celular de bacterias. La anotación fue inferida por homología con la proteína presente en *E. coli* y está incluida en la base de datos de Swiss-Prot, una base de datos de proteínas curada manualmente. Esta proteína ha sido identificada como una polimerasa de peptidoglicano que cataliza la elongación de la cadena glicana a partir de precursores unidos a lípidos (Derouaux et al., 2008; Di Berardino et al., 1996), lo que la convierte en un componente esencial para el mantenimiento de la integridad estructural de la pared celular bacteriana.

La caracterización bioinformática de SMC03883 revela la presencia de un único dominio transmembrana, lo que sugiere su anclaje a la membrana celular, congruente con la información bibliográfica de su homólogo en *E. coli*. El extremo C-terminal alberga el dominio transglicosilasa, que se presume está directamente involucrado en la transferencia de grupos glicosilo durante la síntesis de peptidoglicano. Este dominio transglicosilasa exhibe una conservación estructural notable al modelar su estructura tridimensional y comparándola con la de su homólogo en *E. coli*.

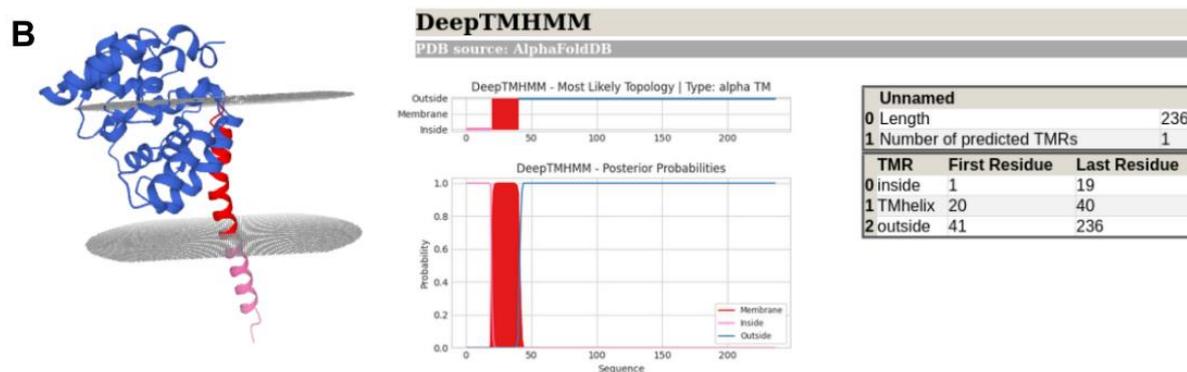
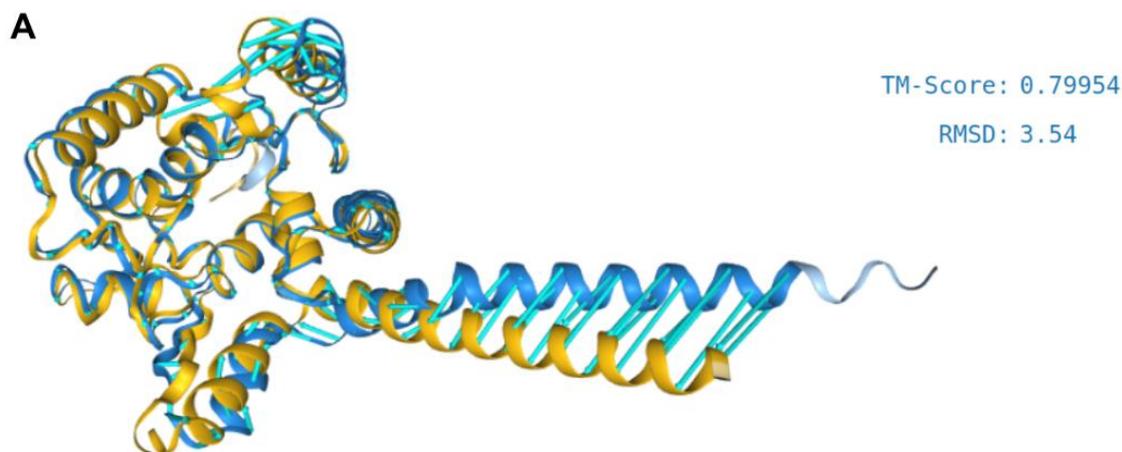


Figura 4.2.1.1. Análisis bioinformático de SMc03883. A) Superposición de estructuras predichas de *mtgA* de *S. meliloti* 2011 (azul) y *E. coli* (amarillo), donde se observa un valor de TM-Score mayor a 0,5. B) Predicción de sitios transmembrana donde se muestra en color rosa la región interna, en rojo la región transmembrana y en azul la región externa.

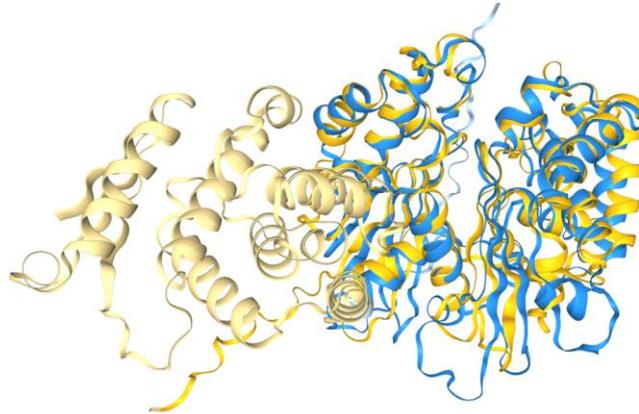
Según la bibliografía consultada, el análisis funcional de SMc03883 ha revelado su función como una glicosiltransferasa específica de peptidoglicano. Esta enzima pertenece a la subclase de glicosiltransferasas que transfieren grupos glicosilo a polisacáridos bacterianos, lo que subraya su relevancia en la biosíntesis de la pared celular bacteriana.

SMc00810

SMc00810, también conocido como Ppx, desempeña un papel fundamental en el metabolismo del fósforo y la señalización celular en *S. meliloti*. Ppx está anotada como una proteína con posible actividad guanosina-5'-trifosfato,3'-difosfato difosfatasa (inferida por homología), involucrada en la regulación de la respuesta estricta (*Stringent response*), e involucrada en la respuesta rápida a condiciones de estrés como la escasez de nutrientes. Esta enzima, junto con otros factores como ppGpp (guanosina tetrafosfato) y los reguladores globales VisN y VisR, juega un papel crítico en la regulación de procesos importantes como la quimiotaxis, la formación de flagelos y la motilidad bacteriana.

TM-Score: 0.82823

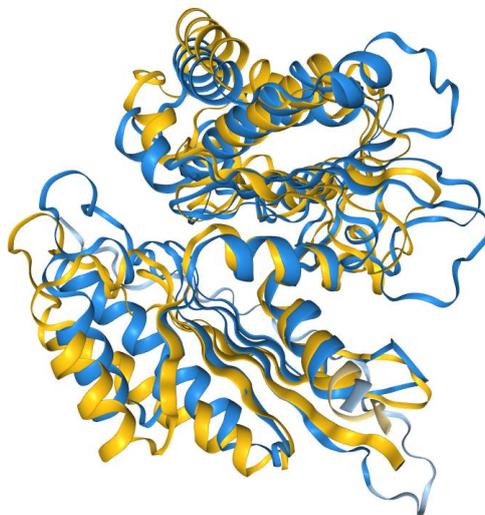
RMSD: 6.67



Pseudomonas aeruginosa PAO1

TM-Score: 0.81222

RMSD: 3.45



Aquifex aeolicus VF5

Figura 4.2.1.2. Análisis bioinformático de SMC00810. Superposición de estructuras tridimensionales de ppx presentes en *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 y *Aquifex aeolicus* VF5 (amarillo) con *S. meliloti* 2011 (azul).

Durante el proceso de análisis de similitud estructural mediante el uso de FoldSeek, se identificaron dos proteínas, Ppx de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 y Ppx de *Aquifex aeolicus* VF5, que exhiben similitudes significativas en su estructura tridimensional (Figura 4.2.1.2) y que resultaron de interés para la profundizar en la función de SMC00810 en *S. meliloti*. Se observó la presencia de motivos secuenciales conservados en la región de unión al sustrato en Ppx, presentes en diversas especies, lo que sugiere una conservación funcional. En particular, hemos identificado un motivo conservado con la secuencia [D/E]-X-G-G-[G/A]-S-X-E, que se encuentra presente en varias especies de forma consistente, y el cual fue descrito

como sitio de unión al sustrato pppGpp en el sitio catalítico de la enzima (Beassoni et al., 2015; Kristensen et al., 2004).

Además, hemos observado que el aminoácido Glu119, presente en la proteína de *Aquifex aeolicus* VF5, se conserva en estas 2 especies relacionadas. Éste fue propuesto como un residuo que proporciona una base para el sitio activo (Beassoni et al., 2015; Kristensen et al., 2004). Esta conservación de Glu119 nos permite hipotetizar sobre la posibilidad de que estas proteínas comparten un sustrato común. Considerando estas similitudes estructurales y secuenciales, así como la conservación de Glu119, es plausible suponer que estas proteínas podrían estar involucradas en la misma función biológica.

En el siguiente alineamiento se muestran las secuencias de *ppx* homólogas en *A. aeolicus* (O67040), *P. aeruginosa* (Q9ZN70) y *S. meliloti* (Q92KM3) resaltando las regiones de interés:

```

A. aeolicus -----
P. aeruginosa MDL-----
S. meliloti MDAALSDKKGQKRNKRARHRRGLQGRPLASAGNPTTSLRPGGRPGERPGRPGERPGRD

A. aeolicus -----MSLDNKPIMRV-----ASIDIGSYSVRLTIAQ-IKDGKLSII
P. aeruginosa -----QSMQKPAEAF-----PLIAALDLGSNSFHLCLAKANIHGEVRIL
S. meliloti ARPRNGEAAAQQARPERLQAPFVAPGEPAPLYAALDLGTNCRLLVAQPTRPGQFRVV
          : :. . *:*:* . . * :* : * : . :

A. aeolicus LERGRITSLGTVKVTGRLQEDRIEETIQVLKEYKKLIDEFKVERVKAVATEAIRRAKNA
P. aeruginosa ERLGEKVQLAAGLDEERNLSEEATQRGLDCLRRFAQFISGMPQGSVRRVATNALREARNR
S. meliloti DAFSRIVRLGEGLGASGRLSDDAMERSVEALKVCAAKLGARSIRRRRLIATEAARAAAANG
          . . * . : . * . : : * . : . : * : * * * *

A. aeolicus EEFLERVKREVGLVVEVITPEQEGRYAYLAVAYSLKPEG-EVCVVDQGGGSTEYV---FG
P. aeruginosa SDFIRRAEEVLGHPVEVISGREEARLIYLGVANSPDGGRRVSDIGGGSTEFI---IG
S. meliloti EAFMKRVAEETGLELEIIDREEARLAVSGCSSLVDTRETRSVVLFDIGGGSSEIAVIRIG
          . * : * . * : * * * . : : . : * * * * * * : *

A. aeolicus KGYKVREVI-----SLPIGIVNLTETFFKQDPPTTEEVKRFEFLEKELSKVKKPV-DT
P. aeruginosa QGFESELRE-----SLQMGCVSYTRQYFRDGKITPARYAQAYTAARLELMGIE----NS
S. meliloti ENRSSRLANHITHWTSLPVGVVTLSERH-GGEHVTPQSFEVMVREVEAMLGFESPSVDA
          : . . * * : * * . : . * * : . :

A. aeolicus I-----VGLGGTITTLAALYVNPYPDPQKVHGKVLTYGQIKKWFDTFKEIPSE
P. aeruginosa LRLGWQQA---VGASGTIRAVA---LAIKAGGHGNGE---ISPDGLAWLKRKVLKLDV
S. meliloti LASGSYDGFHLLIGTSGVTTLAGVHLDLPRYDRRRVDGLWLSDEVSAMQARLLSWDFA
          : * . * : * : . . : . : . :

A. aeolicus ERSKRFRQVEDRRRAKVLGIGIFLKTLEIFEKDCDIVSDWGLREGVL-----
P. aeruginosa EKLD-LEGIKPDRRTIFPAGLAILAIFDALELEQMVHSEGALREGVLYDLVGRHQHEDV
S. meliloti ARAA-NPCIGPDRADLVLAGCAILEAIRRRWPSSRMVADRGLREGLLTD-----
          . : * . : * * . * : . : : * * * * :

A. aeolicus -----VSEVLKENHS-----
P. aeruginosa RERTISSLMQRYHVDPEQASRVEAKKVLAEVGDWELNGELHRDLLSWGARVHEIGLD
S. meliloti -----MADDG-AWR-RGRPRRHQRSFGS-----
          . . *

A. aeolicus -----
P. aeruginosa IAHYHYHKHGAYLIEHSDLAGFSRQDQQLSLLVRGHRNIPADKLAFAEEGDKLVRLC
S. meliloti -----AQAGEERVK--

A. aeolicus -----
P. aeruginosa IVLRFAILFHHRGTQEMPSVRLKAEPKLSVTFPEGWLEANPLTQADFAQEAEWLKRVG
S. meliloti -----RHGTEA-----

A. aeolicus -----
P. aeruginosa YSLNVR
S. meliloti -----

```

Estudios han demostrado que ppGpp, producido por *S. meliloti*, tiene un efecto positivo en la capacidad de formar nódulos en la planta huésped, pero también ejerce un efecto negativo en la producción de un exopolisacárido crítico para la simbiosis (Wells & Long, 2002). Esto sugiere una conexión entre la capacidad de la bacteria para colonizar y su capacidad para producir compuestos esenciales para la simbiosis.

SMc04340

SMc04340, una metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR), desempeña un rol crucial en *S. meliloti* relacionado con procesos metabólicos de aminoácidos como la metionina. Esta enzima está implicada en la síntesis de metionina y cisteína a través de la remetilación de homocisteína a metionina y la síntesis de S-adenosil L-homocisteína (SAH), un intermediario esencial en la formación de cisteína.

El 5,10-metilentetrahidrofolato, sustrato de MTHFR, es un cofactor esencial en la biosíntesis de timidina y juega un papel vital en la transferencia de grupos metilo en procesos de metilación de ácidos nucleicos y proteínas. Esta enzima también contribuye al ciclo del grupo metilo, reduciendo irreversiblemente el 5,10-metilentetrahidrofolato a 5-metiltetrahidrofolato, un paso limitante en la síntesis de metionina y la producción de timidina.

Si bien no se tiene información sobre la posible función de este gen en la competencia rizosférica, la implicancia en la síntesis de aminoácidos nos permite suponer que tiene un rol importante en competencia cuando se presentan condiciones nutricionales escasas.

Adicionalmente, esta enzima presentó valores altos de inducción en diversos experimentos transcriptómicos en *Medicago truncatula* y *M. sativa* (Capela et al., 2006) indicando un posible rol en el metabolismo del bacteroide.

SM_b20757

SM_b20757, o *bhbA*, codifica la proteína mutasa de metilmalonil-CoA, una enzima clave en el metabolismo de *S. meliloti*. Esta proteína juega un papel fundamental en varias vías metabólicas, como se indica en la base de datos KEGG.

Las vías metabólicas en las que participa incluyen la degradación de valina, leucina e isoleucina, el metabolismo del glioxilato y dicarboxilato, y el metabolismo del propanoato. Además, está involucrada en rutas metabólicas más generales, como las vías metabólicas principales y el metabolismo microbiano en diversos ambientes.

Es importante destacar que estas vías metabólicas están conectadas al ciclo de Krebs, lo que subraya la importancia de SM_b20757 en el metabolismo energético y la síntesis de precursores metabólicos en *S. meliloti*. Así como con el ciclo del glioxilato el cual está involucrado en la acumulación de fuente de carbono como poli-β-hidroxibutirato (PHB) por división celular y en la supervivencia a largo tiempo en condiciones de escasez de nutrientes.

A pesar de la importancia de esta enzima, su mutación en un estudio de TnSeq no produjo fenotipos alterados significativamente de crecimiento en diversas fuentes de carbono y nitrógeno, lo que podría explicarse por redundancia funcional, sin embargo, en una búsqueda por similitud secuencial no encontramos ninguna proteína paróloga en *S. meliloti*.

SMa1465

SMa1465 es un transportador ABC permeasa que desempeña un papel significativo en la tolerancia al estrés salino y osmótico en *S. meliloti* (Domínguez-Ferreras et al., 2006). Esta proteína presenta similitud secuencial y estructural con OsmY presente en *Salmonella enterica*, y perteneciente al sistema de transporte de osmoprotectores, OsmU (Frossard et al., 2012).

El análisis de secuencias de SMa1465 mediante BLAST revela su conservación en diferentes organismos, con un alto grado de homología con la proteína OsmY, identificada en el sistema de transporte de osmoprotectores de *Salmonella enterica*. Y comparando las estructuras tridimensionales se observa que de la misma forma la similitud predicha anteriormente (Figura 4.2.1.3).

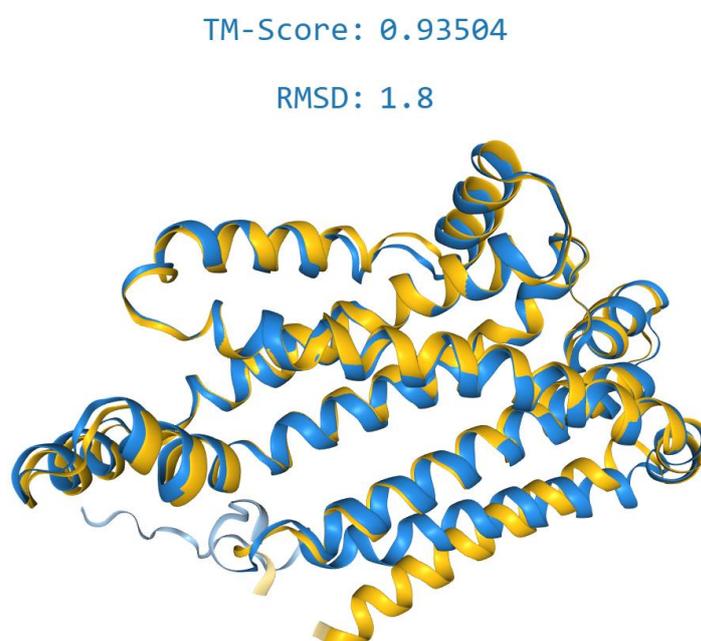


Figura 4.2.1.3. Análisis bioinformático de SMa1465. Superposición de estructuras tridimensionales de OsmY presentes en *S. enterica* (amarillo) con *S. meliloti* 2011 (azul)

El sistema de transporte de osmoprotectores es esencial para la adaptación de las bacterias a condiciones de alta salinidad y osmolaridad. Ayuda a mantener el equilibrio osmótico de la célula al transportar compuestos protectores, como aminoácidos compatibles y otros solutos osmoprotectores, a través de la membrana celular.

Como se mencionó previamente Domínguez-Ferreras et al. (2006) demostraron que este gen es inducido en condiciones de estrés osmótico mediante la utilización de microarrays de ADN para investigar las respuestas transcripcionales de *S. meliloti* 1021 durante respuesta ante un repentino aumento en la osmolaridad o salinidad externa. Este aumento fue provocado por la adición de NaCl o sacarosa a cultivos en crecimiento exponencial. Durante estos experimentos, se observaron aumentos en la expresión del gen SMa1465 en la cepa *S. meliloti* 1021 en respuesta a situaciones de estrés salino (0,3M de NaCl) y osmótico (0,5M de sacarosa) (A2, Tabla suplementaria 4.2.1.1).

Adicionalmente, este gen presentó altos niveles de inducción en plantas, sugiriendo que podría tener importancia para la interacción simbiótica.

SMc00781

SMc00781 codifica la enzima Metilmalonato semialdehído deshidrogenasa (mmsAiolA) en *S. meliloti*. Esta enzima está involucrada en la degradación de varios compuestos, incluidos valina, leucina e isoleucina, a través de la vía de degradación de aminoácidos. También participa en el metabolismo de beta-alanina, el metabolismo de los fosfatos de inositol y el metabolismo del propanoato.

Según los datos de la base de datos *Fitness Browser* (Price et al., 2018), correspondientes a experimentos de *Transposon Insertion Sequencing* (TIS), se observa que la cepa mutante en SMc00781 se encuentra afectada en el crecimiento en medios donde se utiliza mio-inositol como fuente de carbono, así como cuando se utiliza uridina como fuente de carbono y nitrógeno.

SMc03044

SMc03044 codifica la proteína de control de longitud del gancho FliK en *S. meliloti*. La función de FliK es crucial en el proceso de ensamblaje del flagelo bacteriano. Regula la longitud del gancho, que es la parte filiforme del flagelo que conecta la estructura basal con la parte externa del flagelo (Eggenhofer et al., 2006). Esta regulación es vital para garantizar la funcionalidad adecuada del flagelo y su capacidad para mediar en procesos como la motilidad y la quimiotaxis.

Se ha observado que SMc03044 está inhibido por el estrés salino y osmótico (Domínguez-Ferreras et al., 2006), lo que sugiere su posible implicación en la adaptación de *S. meliloti* a

condiciones adversas. La correcta formación del flagelo puede ser crucial para la supervivencia y la capacidad de colonización de la bacteria en la rizósfera (Bernabéu-Roda et al., 2021). En particular, la cepa *S. meliloti* 1021 presentó disminución en la expresión del gen SMc03044 cuando se sometió a estrés por shock de estrés salino y osmótico causado por NaCl 0,3M, así como estrés osmótico por sacarosa 0,5M. Estos datos son presentados en la Tabla Suplementaria 4.2.1.1 del Apéndice A2. Llamativamente este gen asociado a movilidad se presentó inducido en ensayos de transcriptómica en plantas.

SMc02702

SMc02702 es una proteína hipotética conservada en *S. meliloti* con una función aún no caracterizada.

TM-Score: 0.89086

RMSD: 3.12

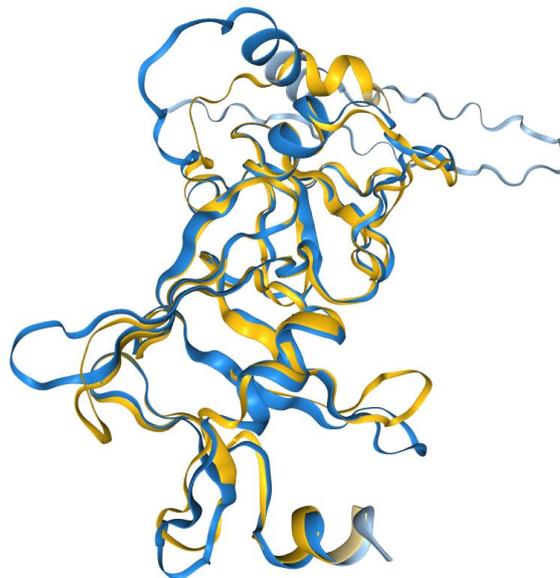


Figura 4.2.1.4. Análisis bioinformático de SMc02702. Superposición de estructuras tridimensionales de la proteína codificada por SMc02702 en *S. meliloti* 2011 (azul) y su homóloga en *R. pomeroyi* (amarillo).

Sin embargo, una búsqueda por comparación de predicciones estructurales sugiere que la proteína presenta homología con un precursor de un proteofosfoglicano en *Ruegeria pomeroyi*, la cual presenta una estructura tridimensional resuelta en la base de datos PDB con el código 2RE3 (Figura 4.2.1.4). Lo cual sugiere una posible función relacionada con la biosíntesis de proteoglicanos en *S. meliloti*.

Ambas secuencias presentan un dominio predicho perteneciente a la familia PF06938, un dominio de función desconocida. Aunque se conoce que podría estar implicada la unión a un derivado de nucleótido pequeño en condiciones de estrés oxidativo.

SMa2077

SMa2077 es una proteína oxidoreductasa en *S. meliloti* con una función aún no caracterizada. Aunque se ha identificado como una oxidoreductasa, se requiere más investigación para comprender su función específica y su papel en la fisiología de la bacteria.

En cuanto a su estructura y motivos de Pfam, SMa2077 contiene un motivo Pfam llamado Aldo_ket_red, que está asociado con enzimas que catalizan reacciones de oxidación y reducción de aldehídos y cetonas. Además, se ha encontrado asociado con el motivo ThiC, que sugiere una posible implicación en la biosíntesis de tiamina.

Comparando con la proteína MocA de *Ensifer adhaerens* OV14, se ha observado una alta similitud, lo que sugiere una posible relación funcional entre estas proteínas. La familia de proteínas MocA se caracteriza por compartir un dominio *Rossmann fold* en el extremo N-terminal y un dominio α/β en el C-terminal, implicados en la unión y oligomerización del sustrato, respectivamente. Estas enzimas participan en una variedad de reacciones de oxidación y reducción, utilizando NAD(P) como aceptor y dador de H⁺. Aunque la secuencia de aminoácidos puede variar significativamente entre las proteínas MocA, la estructura tridimensional es similar.

SM_b20723

Este gen está anotado como codificante de una proteína posiblemente implicada en el transporte de hierro (Iron ABC transporter periplasmic solute-binding protein), perteneciente a la familia Bacterial-type extracellular solute-binding protein (Interpro: IPR006059), y acordemente posee un péptido señal. Los miembros de esta familia son predominantemente proteínas periplásmicas que se unen a ligandos específicos con alta afinidad, que pueden incluir iones de hierro, tiamina, 2-aminoetilfosfonato, ácido gamma-aminobutírico (GABA) y potencialmente otros sustratos. En la base de datos CDD se encontró un hit específico para ABC-type Fe³⁺ transport system, periplasmic component.

Este gen presentó en ensayos de transcriptómica inducción en plantas, particularmente a más de 8 días post inoculación.

IV.3 Clonado de los genes seleccionados para sobreexpresión.

Habiendo seleccionado diez genes basándonos en sus perfiles de expresión y el fenotipo producido por su mutación, tanto en experimentos de competencia por la colonización rizosférica como en diferentes condiciones de crecimiento en batch, se procedió al clonado de los mismos en vectores replicativos en rizobios para su sobreexpresión. En este capítulo se describe el procedimiento y verificación de las construcciones utilizadas.

La técnica de clonación Gibson (Gibson Assembly) fue el método seleccionado para generar las construcciones necesarias para la sobreexpresión de los genes seleccionados. Este método elimina la necesidad de utilizar enzimas de restricción y permite la inserción precisa de uno o varios fragmentos de ADN de forma ordenada, y en una determinada dirección, en vectores de clonado. Este proceso se basa en la amplificación de los fragmentos de ADN de interés a los que se les debe agregar (si no existe naturalmente) una secuencia que se solapa parcialmente en sus extremos con la secuencia en los extremos del vector de destino. El método de Gibson depende de la acción de tres enzimas: una exonucleasa 5' que degrada ADN del extremo 5' al 3' dejando extremos cohesivos 3' largos, de modo que los segmentos a clonar hibridan en las regiones simple cadena generadas, por su complementariedad. Luego la segunda enzima, una polimerasa, se utiliza para rellenar los gaps, y finalmente una ligasa genera los enlaces fosfodiéster uniendo los fragmentos. Todo el proceso se realiza en una única reacción isotérmica.

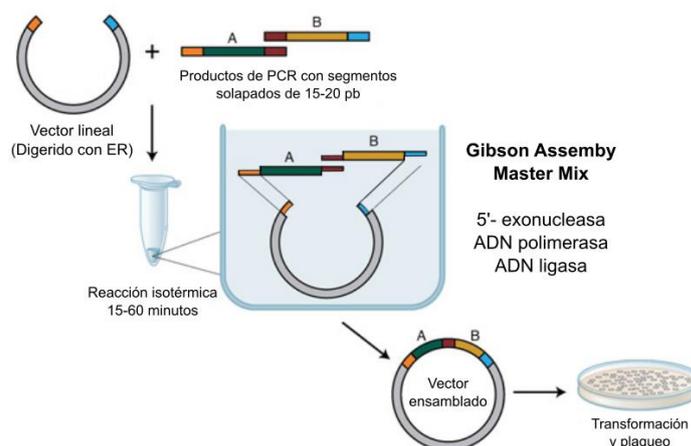


Figura 4.3.1. Esquema de la estrategia de clonado por Gibson assembly.

Para el clonado por el método de Gibson se utilizó el sistema NEBuilder® HiFi DNA Assembly de New England Biolabs® junto con la polimerasa de alta fidelidad Q5® del mismo fabricante.

Utilizando secuencias adaptadoras compatibles con los sitios de clonado del vector pFAJ1708 (Dombrecht et al. (2001), plásmido de amplio rango de hospedadores replicativo en rizobios) se buscó integrar los amplicones generados por PCR de los genes de interés. Estos

adaptadores fueron diseñados teniendo en cuenta que el contenido CG de esta secuencia no sea excesivo, con el fin de que la temperatura de hibridación de los *primers* necesarios para la amplificación de los genes de interés se mantenga en el rango óptimo para su amplificación según el protocolo utilizado para la enzima polimerasa Q5. A su vez, fueron diseñados para incluir al menos un sitio de restricción para permitir el clonado por enzimas de restricción de forma alternativa.

Para amplificar los fragmentos correspondientes a cada gen de interés (GDI) se utilizaron las siguientes temperaturas y tiempos de extensión para las PCR según las recomendaciones del fabricante. Para la etapa de hibridación, se realizaron los primeros 5 ciclos a la primera temperatura y últimos 30 ciclos a la segunda temperatura con el fin de beneficiar el pegado de los *primers* al molde (Tabla 4.3.1).

DGI	Temperatura de hibridación (°C)		Tamaño de amplicón (pb)	Tiempo de extensión (seg)
	Ciclos 1-5	Ciclos 6-35		
SMc00781	62	72	1548	60
SMc00810	72	72	1435	45
SMA1465	62	72	807	30
SMA2077	54	70	1113	45
SMc02702	60	72	735	30
SMc03044	63	72	1479	45
SMc03883	57	71	840	30
SMc04340	71	72	1143	45
SM_b20723	58	72	1146	45
SM_b20757	61	72	2190	75

Tabla 4.3.1. Condiciones para la obtención de amplicones. Temperaturas de hibridación y tiempos de extensión utilizados para las reacciones de PCR para obtener los amplicones necesarios para las construcciones que permitan la sobreexpresión de los GDI.

Según el diseño de este protocolo, una purificación del plásmido pFAJ1708 (Figura 4.3.2) digerido con las enzimas de restricción *XbaI* y *KpnI* sería suficiente para lograr el clonado, sin embargo, no pudimos obtener clones positivos para la integración de los genes de interés. En esta etapa del trabajo de tesis ocurrieron diferentes problemas que dificultaron la obtención de los clones en el tiempo deseado, en especial la baja eficiencia de *E. coli* electrocompetentes, y el bajo rendimiento en la obtención del plásmido pFAJ1708.

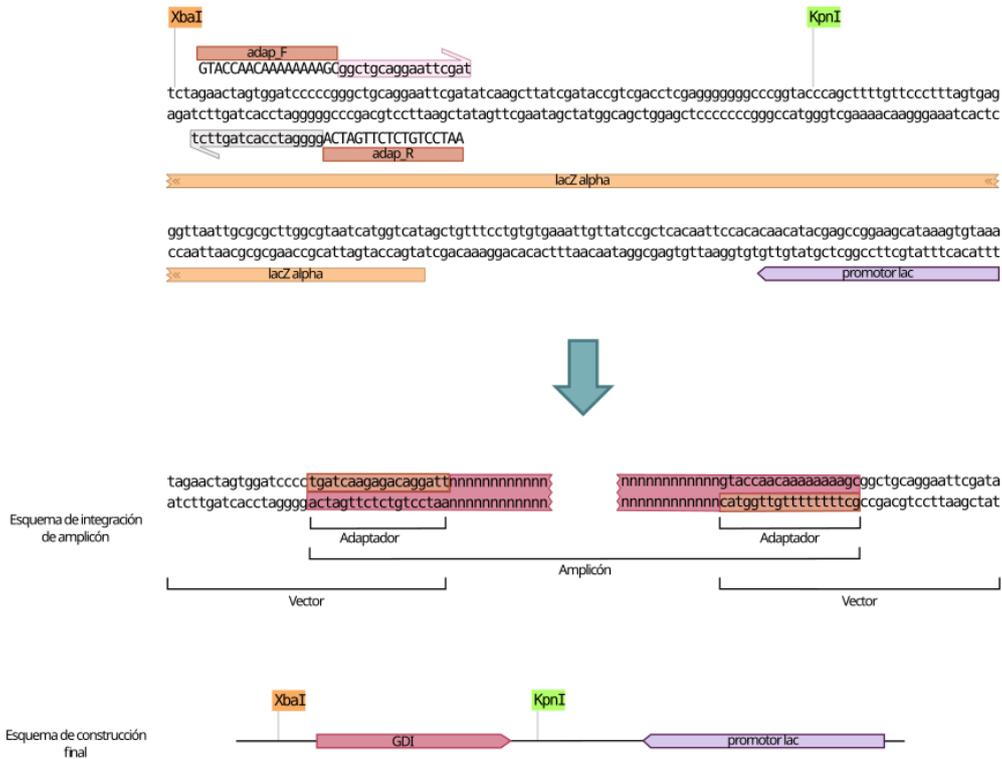


Figura 4.3.3. Esquema de estrategia de clonado alternativo en vector pBBRMCS1-Gm. GDI: gen de interés en rosa oscuro. Adaptador, *adapt_F*, *adapt_R*: secuencias de los extremos de los *primers* utilizados para amplificar los GDI para el clonado por el método de Gibson. *promotor-lac*: *promotor del operón lactosa*. *lacZalpha*: gen codificante de la enzima β -galactosidasa. Sitios de reconocimiento de las enzimas *kpnI* y *XbaI*.

Algunas de las construcciones obtenidas fueron secuenciadas por el método de Sanger por electroforesis capilar realizado por la empresa Macrogen, donde se comprobó exitosamente que la secuencia de las construcciones correspondientes a los genes SMC00781, SMC00810, SMA1465, SMA2077, SMC02702, SM_b20723, SM_b20757 fue clonada sin errores en el vector pBBRMCS1-Gm. A pesar de que las construcciones de los genes SMC03044, SMC03883 no pudieron ser comprobadas por este método, dado que fue utilizada la misma enzima polimerasa de alta fidelidad para todos los clonados podemos esperar que en estos casos tampoco haya errores en la secuencia nucleotídica.

Dado que estas construcciones presentaban la orientación incorrecta (*antisense* al promotor *lac* presente en el vector) las mismas fueron subclonadas con la orientación deseada al vector pSRKGm (Kovach et al., 1995), un vector derivado del pBBR1MCS5 (Gm^R), que también presenta un promotor inducible por IPTG, lo que permite además una mejor regulación de la expresión. Con este fin se utilizaron las enzimas de restricción *XbaI* y *KpnI* para liberar los fragmentos deseados y linealizar el vector, seguido de una purificación en gel de agarosa dado que ambos plásmidos generan resistencia a Gentamicina como marcador de selección. Luego, los fragmentos fueron ligados utilizando el protocolo de ligasa como se describe en la sección

de materiales y métodos, dando como producto final una construcción como se describe en la siguiente figura.

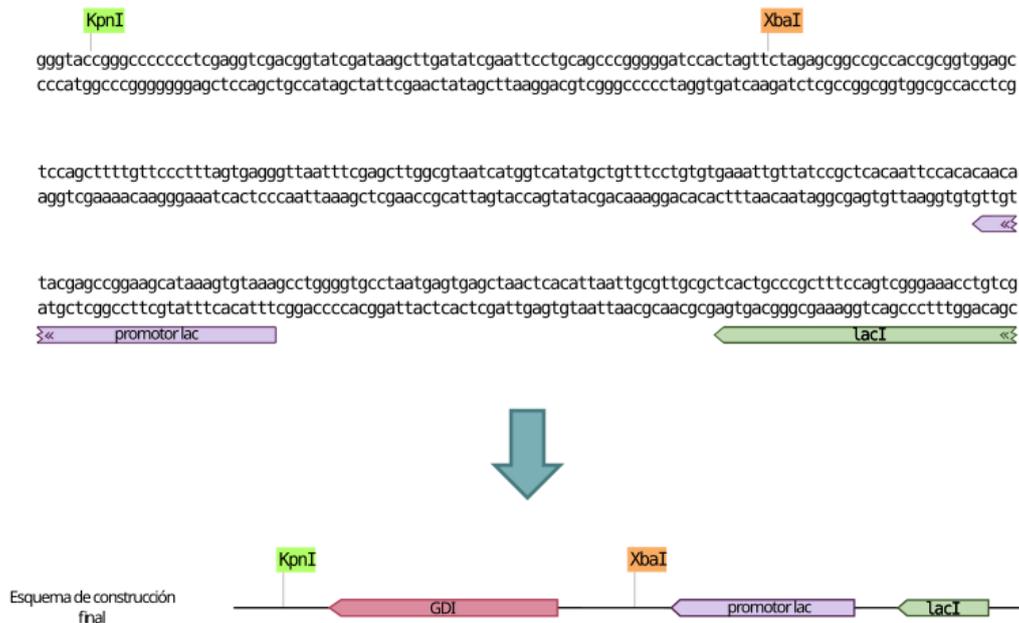


Figura 4.3.4. Esquema de estrategia de subclonado al vector pSRKGm. GDI: Gen de interés. *lacI*: inhibidor del promotor lactosa, *promotor lac*: promotor del operón lactosa, Sitios de reconocimiento de las enzimas *kpnI* y *XbaI*.

Las construcciones obtenidas se clonaron inicialmente en células competentes de *E. coli* DH5 α , seleccionando aquellas colonias que mostraron resistencia a Gentamicina y color blanco. Tras la confirmación de la presencia de las construcciones mediante PCR, los plásmidos fueron purificados y transferidos por transformación a la cepa *E. coli* S17-1, con el fin de ser transferidos por conjugación biparental a las cepas de *Sinorhizobium meliloti* de interés. Así mismo los plásmidos purificados fueron tratados con las enzimas *XbaI* y *KpnI* para confirmar la presencia del inserto por digestión con enzimas de restricción.

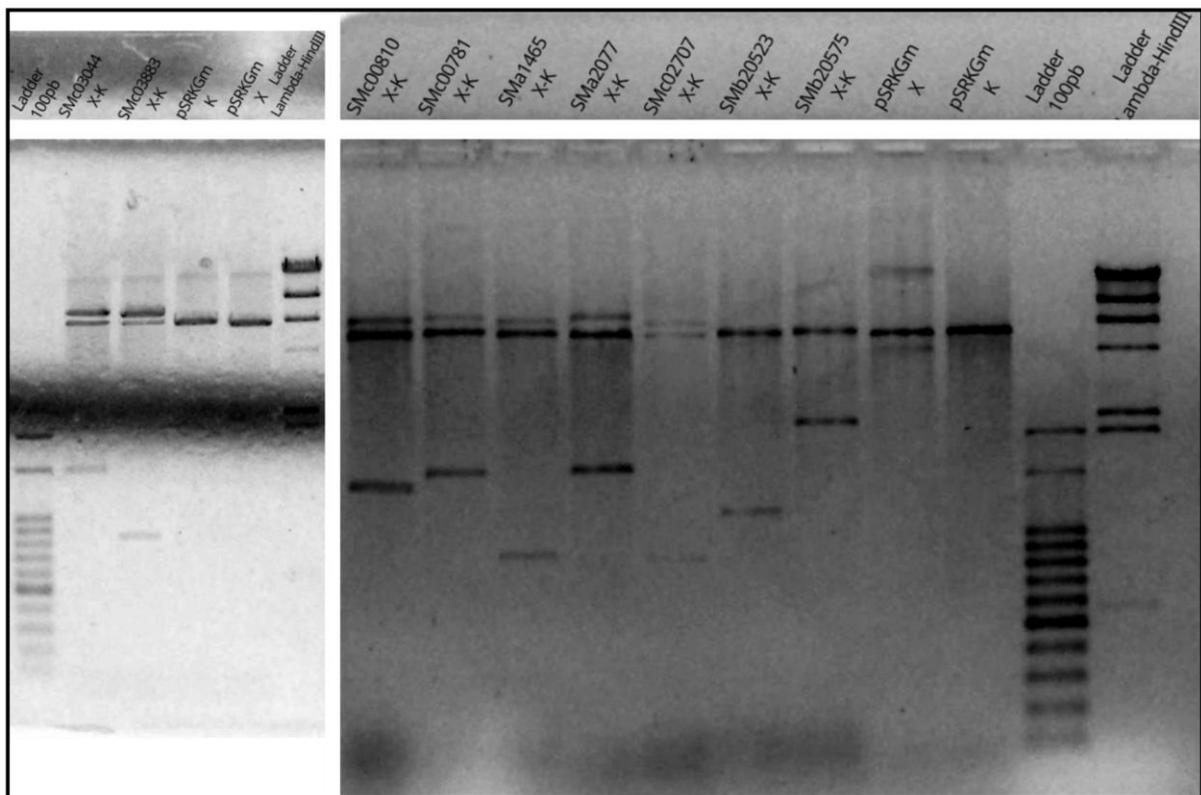


Figura 4.3.5. Geles de electroforesis de construcciones en pSRKGm. Los geles de electroforesis corresponden a las digestiones con las enzimas de restricción con *Xba*I y *Kpn*I para las construcciones con los insertos correspondientes a los genes SMc00781 (1628 pb), SMc00810 (1440 pb), SMa1465 (887 pb), SMa2077 (1193 pb), SMc02702 (815 pb), SM_b20723 (1226 pb), SM_b20757 (2270 pb), SMc03044 (1484 pb) y SMc03883 (845 pb) en el vector pSRKGm, y el vector pSRKGm digerido con *Xba*I y *Kpn*I por separado (5739 pb) y finalmente los marcadores de peso molecular Ladder 100pb y Ladder Lambda-*Hind*III.

Posteriormente, se llevó a cabo el proceso de conjugación biparental utilizando las cepas de *E. coli* S17-1 conteniendo las diferentes construcciones como dadoras y las cepas mutantes correspondientes (diferentes cepas de *S. meliloti* 2011 de la colección STM con mutaciones por inserción de un transposón mini-Tn5 en los GDI), así como a la cepa salvaje 2011, como receptoras. El plásmido pSRKGm, al ser un derivado del pBBR1MCS-5, es de amplio rango de hospedadores y replicativo en rizobios, permitiendo de esta forma el estudio de la sobreexpresión de los genes de interés.

IV.4 Evaluación del fenotipo de competencia por la colonización en cepas que sobreexpresan los genes de interés

Uno de los objetivos principales de este trabajo de tesis fue el de evaluar si la sobreexpresión de genes identificados como importantes en el proceso de colonización de la rizosfera generaba una ventaja competitiva para el rizobio, lo que podría mejorar la competencia por la ocupación del nicho simbiótico frente a las bacterias presentes en el suelo, y de esta forma lograr una mayor eficiencia de los bioinoculantes.

En el capítulo anterior describimos la construcción de los vectores para la sobreexpresión de 10 genes seleccionados por su relevancia para el proceso de colonización rizosférica y su transferencia conjugativa a las diferentes cepas utilizadas de *S. meliloti*. En este capítulo describimos brevemente los resultados obtenidos al complementar los mutantes con el gen salvaje, y al sobreexpresar cada gen en la cepa salvaje de *S. meliloti* 2011.

Dicho esto, una vez obtenidas las cepas sobreexpresantes de los genes de interés se procedió a evaluar su fenotipo de competencia por la colonización rizosférica. Para ello se llevaron a cabo ensayos de inoculación en una proporción de 1:1 utilizando la cepa salvaje – o la cepa salvaje portadora del vector pSRKGm vacío– con una de las siguientes cepas para cada uno de los genes:

- a) Cepa mutante (obtenida de la colección STM).
- b) Cepa mutante con el vector pSRKGm vacío.
- c) Cepa mutante con el vector pSRKGm con el gen de interés.
- d) Cepa salvaje con el vector pSRKGm con el gen de interés.

Todos los ensayos se realizaron por triplicado, aunque es necesario discriminar dos tipos de réplicas utilizadas.

El primero que llamaremos réplicas técnicas se realizó como se describe a continuación:

- Para cada experimento de competición se preparó un único inóculo con proporciones iguales de cultivos crecidos hasta una $DO_{600} \sim 0,3$ y a una dilución final equivalente a 1×10^5 UFC/ml (materiales y métodos, sección 3.3.4). La proporción inicial se calculó por plaqueo de diluciones apropiadas y recuento de colonias verdes bajo iluminación con luz azul/UV (Cepa salvaje, GFP) y blancas.
- Con esta dilución se inocularon tres macetas independientes, cada una con 5 plántulas de alfalfa y utilizando perlita estéril como soporte.
- Las plantas se cultivaron en cámara de cultivo a $25/18$ °C, y a los 7 días post inoculación se recuperaron las bacterias laxamente adheridas a la raíz por medio de lavado en 10

ml de medio mineral de Fåhraeus y vorteadado durante 20s (Materiales y métodos, Sección 3.3.4)

- En todos los casos, para las cepas con el vector pSRKGm se utilizó una concentración 0,1 mM de IPTG como inductor de la expresión durante 1 hora previo a la inoculación en la maceta y en el medio con el que se saturan las macetas con el fin que la inducción permanezca durante el proceso.

El segundo tipo de réplica, que denominaremos réplica biológica se realizó de forma similar, pero partiendo de cultivos iniciales independientes. Es decir, se utilizaron tres cultivos iniciales, y cada uno se utilizó para inocular una única maceta.

Es importante tener en cuenta que los ensayos en planta realizados tienen en general una gran variabilidad (observable en nuestras réplicas técnicas) a la que se suma la variabilidad de la constitución de la mezcla inicial (réplicas biológicas), del recuento de colonias, y otros factores, principalmente asociado a variaciones ambientales en las diferentes cámaras de plantas (si bien el fotoperiodo y la temperatura fueron configuradas de la misma manera, la humedad relativa en las diferentes cámaras resultó ser un problema, incluso a nivel de macetas ubicadas en diferentes estantes o posiciones dentro de la cámara), y a la necesidad de cambiar de soporte de vermiculita a perlita por problemas con la calidad de la primera. También se probaron diferentes sistemas a la cámara de planta, en los cuales se utilizó un cuarto de cultivos y un invernadero.

Gen	STM	Cámara de plantas (vermiculita)	Cámara de planta (perlita)	Cuarto de cultivo de plantas (perlita)	Invernadero (perlita)	Cámara de planta 2 (perlita)
SMc03113	0,00	0,07	-0,27			
SMc03044	-1,29	0,30	-0,08			
SM_b20757	-0,66	0,04	-0,22			
SMc00810	-1,47	0,12	0,07			
SMc04340		0,11	-0,35			
SMc00781	-0,92	0,36	-0,23			
SM_b20723	-0,87	0,39	0,69			
SMA2077	-0,67	-0,27	-0,25			-0,25
SMc02702	-0,52	-0,01	0,03			0,03
SMA1465	-0,79	0,09	0,09	0,01	0,45	0,09

Tabla 4.4.1. Valores M para ensayos en competencia en distintas condiciones.

De esta forma, la estrategia de complementación implementada en este estudio ha permitido una evaluación exhaustiva del efecto de la sobreexpresión de cada gen tanto en los mutantes como en la cepa salvaje, proporcionando una visión de cómo esta sobreexpresión impacta la competencia relativa entre las cepas bacterianas.

Los resultados obtenidos de estos experimentos se han plasmado en dos gráficos (Figuras 4.4.1 y 4.4.2). La Figura 4.4.1 resume los resultados de los experimentos realizados utilizando réplicas técnicas.

Puede observarse que a pesar de la variabilidad la mayoría de los mutantes presentaron un fenotipo coincidente en signo (si bien no en magnitud) con los resultados del ensayo STM. Esto en parte es esperable por las diferencias entre el ensayo de competencia 1:1 y el ensayo STM en donde cada cepa compite con 412, muchas de las cuales se comportan como la cepa salvaje, lo cual ya había sido observado con anterioridad (Salas et al., 2017).

Otra observación interesante es que el portar el vector pSRKGm, aunque vacío, presentó un efecto negativo en algunos de los mutantes (SMc00810, SMc02702, SMc03883) en comparación con la cepa salvaje.

En cuanto a los mutantes complementados, pudimos observar un fenotipo complementado en la mayoría de los mutantes, aunque no se llega a los valores de la cepa salvaje, posiblemente por un efecto adicional debido a la presencia del vector.

Finalmente observamos una tendencia que indica que la mayoría de las cepas salvajes que sobreexpresan el gen de interés competirían mejor que las cepas salvajes portadoras del vector vacío.

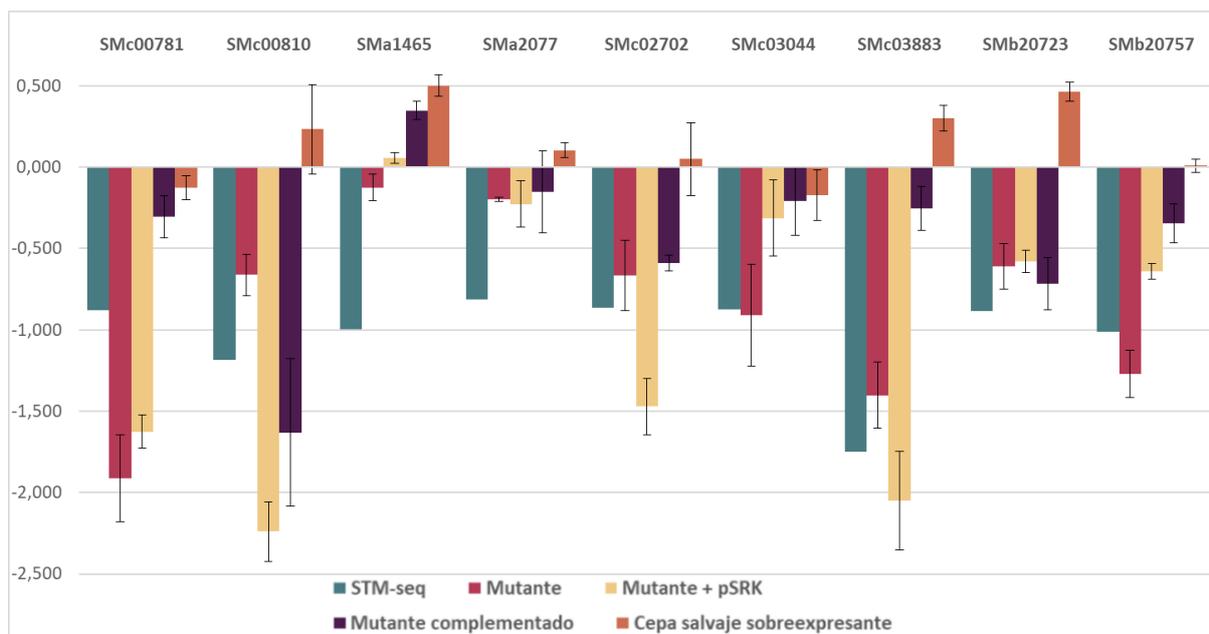


Figura 4.4.1. Resultados de los ensayos de competencia por la colonización rizosférica por coinoculación en proporciones 1:1 salvaje mutante para réplicas técnicas. STM corresponde a los valores M para la cepa salvaje vs. mutante en los ensayos STM; Mutante corresponde a los valores M de la cepa salvaje vs. mutante en ensayos de coinoculación; mutante+pSRK corresponde a los valores M de la cepa salvaje portadora del vector pSRKGm vacío vs. la cepa mutante portadora del vector pSRKGm vacío; mutante comp (complementado) corresponde a la cepa salvaje portadora del vector pSRKGm vacío vs. la cepa mutante con la construcción pSRKGm:GDI; cepa salvaje sobreexpresante corresponde a la cepa salvaje portadora del vector pSRKGm vs. la cepa salvaje con la construcción pSRKGm:GDI.

En la Figura 4.4.2 se resumen los datos acumulados de varios experimentos en los que se utilizaron réplicas técnicas, conformando cada set de experimentos las réplicas biológicas. Solo pudieron completarse las réplicas biológicas para SMa1464, SMa2077, SMc03044 y SM_b20757.

Lo primero que puede observarse es que las réplicas biológicas presentaron una variabilidad mucho mayor a la de las réplicas técnicas, aunque en términos generales mostraron un comportamiento similar. Parte de esta variabilidad se debe a que estas réplicas no fueron realizadas de forma sincrónica, y en las distintas repeticiones se utilizaron distintas cámaras de plantas.

El promedio de los valores M para los mutantes analizados, aunque fue el experimento que mostró mayor variabilidad entre las réplicas biológicas, en general se correspondió al del experimento STM confirmando la importancia de estos genes para la competencia por la colonización rizosférica. Solo en 2 de los 4 mutantes para los que se pudo evaluar réplicas biológicas se observó una tendencia positiva de la sobre expresión.

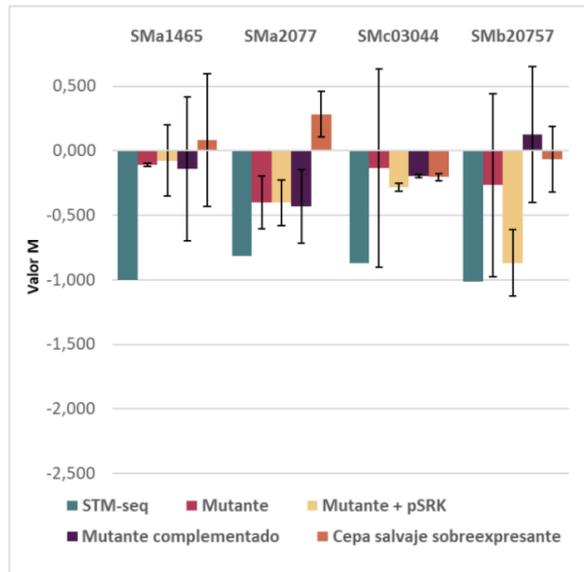


Figura 4.4.2. Resultados de los ensayos de competencia por la colonización rizosférica por coinoculación en proporciones 1:1 salvaje mutante para réplicas biológicas del ensayo valores M para los ensayos de competencia. STM corresponde a los valores M para la cepa salvaje vs. mutante en los ensayos STM; Mutante corresponde a los valores M de la cepa salvaje vs. mutante en ensayos de coinoculación; mutante+pSRK corresponde a los valores M de la cepa salvaje portadora del vector pSRKGm vacío vs. la cepa mutante portadora del vector pSRKGm vacío; mutante comp (complementado) corresponde a la cepa salvaje portadora del vector pSRKGm vacío vs. la cepa mutante con la construcción pSRKGm:GDI; cepa salvaje sobreexpresante corresponde a la cepa salvaje portadora del vector pSRKGm vs. la cepa salvaje con la construcción pSRKGm:GDI.

A pesar de la gran variabilidad en estos últimos experimentos, se pudieron observar tendencias que sugieren que la sobreexpresión de estos genes confiere a *S. meliloti* 2011 una capacidad mejorada para competir por la colonización de la rizósfera de alfalfa. El efecto más fuerte se vio para los genes SMc00810, SMA1465, SMc03883 y SM_b20723.

El gen SMc00810 fue anotado como Ppx, una enzima involucrada en la respuesta estricta (*stringent response*) que tiene un rol en la señalización de condiciones de estrés, en especial por falta de nutrientes, y relacionada a la regulación de quimiotaxis y movilidad celular. Hay que tener en cuenta que cuando nos referimos a sobreexpresión hablamos de una expresión constitutiva que no está sujeta a los mecanismos de regulación de la expresión propios de estos genes, lo que implica no solo la generación de una mayor cantidad de la proteína codificada por el gen de interés, sino también que esta estará presente en todo momento. En casos como SMc00810, esto podría estar afectando los niveles intracelulares de segundos mensajeros como pppGpp/ppGpp y acelerando la respuesta a diferentes tipos de estrés otorgando una ventaja competitiva frente a la cepa salvaje.

La sobreexpresión de SMA1465 (cuya función es la de transportar diferentes moléculas con actividad osmoprotectora, y que en *S. meliloti* 1021 fue encontrada inducida en condiciones de estrés osmótico) podría ayudar a prevenir condiciones de estrés osmótico durante la

colonización de la rizosfera. En el caso de SM_b20723 que codifica para la permeasa de un transportador ABC de hierro, su sobreexpresión podría favorecer la captación de hierro. Finalmente, en el caso de SMc03883 (MtgA, glicosiltransferasa específica de peptidoglicano) una posible explicación del efecto de la sobreexpresión de este gen podría ser a través de la modificación de la pared celular, lo que podría afectar la resistencia de la bacteria o su capacidad de adhesión a la superficie de la raíz.

En conjunto, estos resultados subrayan la importancia de la regulación génica en la competencia bacteriana y sugieren que la sobreexpresión de genes seleccionados puede ser una estrategia prometedora para mejorar la capacidad competitiva de las cepas en entornos específicos. Sin embargo, también es crucial tener en cuenta las posibles consecuencias negativas de la desregulación genética en ciertos contextos, lo que destaca la necesidad de un enfoque equilibrado y cuidadoso en la manipulación genética para aplicaciones prácticas. Adicionalmente, si bien el comportamiento de las cepas sobreexpresantes es alentador, resta verificar el efecto de la sobreexpresión en etapas intermedias y tardías de la simbiosis.

IV.5 Selección de condiciones en batch que inducen un estado de alta competitividad por la colonización.

Nuestro grupo de trabajo ha investigado activamente los fenotipos asociados con la respuesta adaptativa de tolerancia al estrés (ATR) en *S. meliloti*. Hemos observado que las bacterias pueden adaptarse para sobrevivir en condiciones adversas, como la acidez del medio, y que esta adaptación no solo mejora la supervivencia en condiciones estresantes, sino que también aumenta la competencia para infectar las raíces de la alfalfa.

Estos hallazgos son particularmente relevantes para nuestros objetivos de investigación, ya que buscamos identificar condiciones de crecimiento *in vitro* fácilmente escalables que puedan inducir un fenotipo más competitivo para la colonización radicular y la supervivencia en inoculantes. En este capítulo describimos los avances, si bien preliminares, que hemos logrado en la obtención de un estado fisiológico de mayor competitividad para la competencia por la colonización rizosférica.

En primera instancia, nos valimos de la gran cantidad de datos disponibles en bases de datos públicas, en particular datos de transcriptomas de *S. meliloti* obtenidos por microarreglos de ADN en una amplia variedad de condiciones, ya sea comparando diferentes mutantes con su cepa parental, o diferentes condiciones de crecimiento. Estos datos fueron obtenidos de la base de datos EMMA2. Como nuestro objetivo requiere una condición que sea escalable y barata, nos focalizamos en los datos de experimentos en donde se varía la composición del medio de cultivo para, por ejemplo, inducir algún tipo de estrés en particular.

Nuestro análisis se centró en contrastar estos datos de transcriptomas con los obtenidos en ensayos de STM, con el objetivo de identificar condiciones en las que el cultivo de nuestra cepa pueda inducir un estado de mayor competitividad para la colonización rizosférica. Para ello se seleccionaron condiciones en las que un alto porcentaje de los genes identificados con un valor M negativo en el ensayo STM de competencia por la colonización rizosférica presentaran niveles aumentados en sus transcritos. Los resultados de los transcriptomas fueron filtrados para seleccionar solo aquellos que tuvieran un valor M mayor a 2, un valor-p menor a 0,05 y un número de réplicas mayor 5. Los mismos fueron comparados con los resultados de los ensayos de STM que presentaron un valor M menor a -0,7, los cuales consideramos como afectados en el fenotipo estudiado, para los desafíos de competencia por la colonización rizosférica a 3dpi y sobrevida en turba. La cantidad de coincidencias se reporta en la Tabla 4.5.1.

Condición de transcriptoma	STM-3dpi	STM-turba
atmosphere_less_than_1_μM_dissolved_oxygen	1	4
media_NaCl_0.3M-timepoint_t015	6	15
media_NaCl_0.3M-timepoint_t030	9	17
media_NaCl_0.3M-timepoint_t060	11	20
media_NaCl_0.4M-timepoint_t0	0	0
media_NaCl_0.4M-timepoint_t015	3	1
media_NaCl_0.4M-timepoint_t030	8	5
media_NaCl_0.4M-timepoint_t060	7	9
media_NaCl_0.4M-timepoint_tolerance	0	0
media_Sucrose_0.5M-timepoint_t015	7	6
media_Sucrose_0.5M-timepoint_t030	4	6
media_Sucrose_0.5M-timepoint_t060	5	7
media_Sucrose_0.5M-timepoint_t240	0	1
media_Sucrose_0.7M-timepoint_t015	3	7
media_Sucrose_0.7M-timepoint_t030	9	14
media_Sucrose_0.7M-timepoint_t060	6	18
media_Sucrose_0.7M-timepoint_t240	9	12
media_TY_Dip_200_vs_0uM	2	1
media_VMM_FeCl3_0,37_vs_37uM	0	1
media_VMM_vs_TY	0	1
pH_5.75-time_13	3	3
pH_5.75-time_18	3	4
pH_5.75-time_3	0	1
pH_5.75-time_33	1	2
pH_5.75-time_63	2	4
pH_5.75-time_8	0	1
population_density_OD0,3	0	0
population_density_OD0,6	0	0
population_density_OD0,8	0	0
population_density_OD1,0	0	0
population_density_OD1,5	0	0
population_density_OD2,0	0	0
population_density_OD_higher_3,0	0	1
strain_or_line_1021-gene_knock_out_wt-nutrients_100_vs_2000μM_phosphate	4	0
strain_or_line_2011-gene_knock_out_wt-nutrients_100_vs_2000μM_phosphate	8	0
Time_T2	0	0
Time_T4	0	0
Time_T6	0	0

Tabla 4.5.1 Número de genes inducidos en experimentos transcriptómicos y con un fenotipo alterado de colonización rizosférica y supervivencia en inoculantes tipo turba. En negrita se resaltan las condiciones elegidas.

Esta comparación reveló un conjunto de condiciones que podrían potencialmente mejorar la capacidad de competencia de nuestra cepa en la rizósfera. Entre las cuales seleccionamos estrés por shock ácido a pH 5,75 por 63 minutos, salino inducido por NaCl a concentración 0,3M por 60 minutos y osmótico por sacarosa en concentración 0,7M por 30 minutos. Además, se plantea que la combinación simultánea de estas condiciones podría generar la inducción de un mayor número de genes que mostraron ser de importancia en la colonización rizosférica, considerando que diferentes genes son sobreexpresados en cada una de ellas (Tabla 4.5.2, Tabla 4.5.3 y Tabla 4.5.4).

Gen	media_NaCl_0 3M-timepoint_t060			
	STM	Transcriptoma		
	Valor M	Valor M	Valor-p	Réplicas
SMc01701	-1,72	5,44	3,21E-06	9
SM_b20955	-1,43	2,64	3,23E-08	9
SM_b20238	-0,77	2,43	0,000323	9
SMc04232	-0,85	2,36	7,68E-09	9
SM_b20099	-0,88	2,25	1,39E-07	9
SMc02123	-3,18	2,16	2,17E-06	9
SMc02123	-1,19	2,16	2,17E-06	9
SMc02229	-0,85	3,41	2,10E-06	9
SMc02229	-1,13	3,41	2,10E-06	9
SM_b21270	-0,86	2,07	2,56E-07	9
SMc02435	-1,9	4,46	1,36E-07	9
SMc02228	-0,91	2,22	3,15E-06	9
SMA1465	-0,78	3,18	5,53E-08	9

Tabla 4.5.2. Genes sobreexpresados por shock salino. Conjunto de genes que se observaron sobreexpresados luego de estrés por shock salino con NaCl 0,3M durante 60 minutos para lo que se muestran el valor M, valor-p y número de réplicas, y valores M de los ensayos STM de colonización rizosférica.

Gen	media_Sucrose_0.7M-timepoint_t030			
	STM	Transcriptoma		
	Valor M	Valor M	Valor-p	Réplicas
SMc01701	-1,72	5,25	4,09E-07	9
SMc02877	-1,76	2,21	4,62E-04	9
SMc04232	-0,85	3,25	4,39E-09	9
SMc02229	-0,85	3,82	3,35E-07	9
SMc02229	-1,13	3,82	3,35E-07	9
SMc01026	-0,85	2,24	2,70E-05	9
SMc02435	-1,9	3,22	1,35E-09	9
SMA1465	-0,78	2,11	6,34E-06	9
SMA0414	-0,8	3,96	7,28E-08	9
SMc02717	-4,91	4,05	1,73E-06	9

Tabla 4.5.3. Genes sobreexpresados por shock osmótico. Conjunto de genes que se observaron sobreexpresados luego de estrés por shock osmótico con sacarosa 0,7M durante 30 minutos para lo que se muestran el valor M, valor-p y número de réplicas, y valores M de los ensayos STM de colonización rizosférica.

Gen	pH_5 75-time_63			
	STM	Transcriptoma		
	Valor M	Valor M	Valor-p	Réplicas
SMc02255	-1,42	3,03	1,16E-04	6
SM_b20955	-1,43	3,31	3,75E-12	9

Tabla 4.5.4. Genes sobreexpresados por shock ácido. Conjunto de genes que se observaron sobreexpresados luego de estrés por shock ácido con pH 5,75 durante 63 minutos para lo que se muestran el valor M, valor-p y número de réplicas, y valores M de los ensayos STM de colonización rizosférica.

Luego, se crecieron cultivos de *S. meliloti* 2011 y *S. meliloti* 2011-MP6 (GFP) en la condición de control (TY o VMM pH7), los cuales al llegar a una $DO_{600} \sim 0,3$ fueron centrifugados y el sobrenadante reemplazado por medio fresco ya sea en las mismas condiciones para los cultivos que se mantienen en TY o VMM pH7, o en las diferentes condiciones seleccionadas, para luego seguir con el crecimiento a las mismas condiciones de agitación y temperatura por el tiempo necesario para cada ensayo. Posteriormente se realizaron mezclas en proporciones 1:1 según las siguientes combinaciones:

- TY (1 hr) vs. TY (1 hr)
- VMM pH7 (1 hr) vs. VMM pH7 (1 hr)
- VMM pH7 (1 hr) vs. VMM NaCl 0,3M (1 hr)

- VMM pH7 (1 hr) vs. VMM Sacarosa 0,7M (30 min)
- VMM pH7 (1 hr) vs. VMM pH5,75 (1 hr)
- VMM pH7 (1 hr) vs. VMM Sacarosa 0,7M-pH5,75 (1 hr)
- VMM pH7 (1 hr) vs. VMM Sacarosa 0,7M-pH5,75-NaCl 0,3M (1 hr)

Para todas las combinaciones se realizaron tres réplicas biológicas (sincrónicas solo para las combinaciones de más de una condición) y se cuantificó la proporción de colonias blancas/verdes bajo luz azul/UV (Proporción inicial). Luego se inocularon 5 plantas por maceta para cada réplica, se cultivaron por 7 días en cámara de plantas, y se recuperaron las bacterias para su plaqueo y cálculo de la proporción final. Los resultados se muestran en la Figura 4.5.1.

Durante este ensayo, observamos que los cultivos sometidos a estrés, tanto pH ácido como estrés osmótico, mostraron un beneficio significativo en términos de colonización de la rizosfera en comparación con la cepa salvaje no tratada. Este hallazgo sugiere que las bacterias sometidas a condiciones de estrés pueden exhibir una mayor capacidad para competir y colonizar el ambiente radicular, posiblemente debido a adaptaciones fisiológicas que les permiten sobrevivir y prosperar en condiciones adversas.

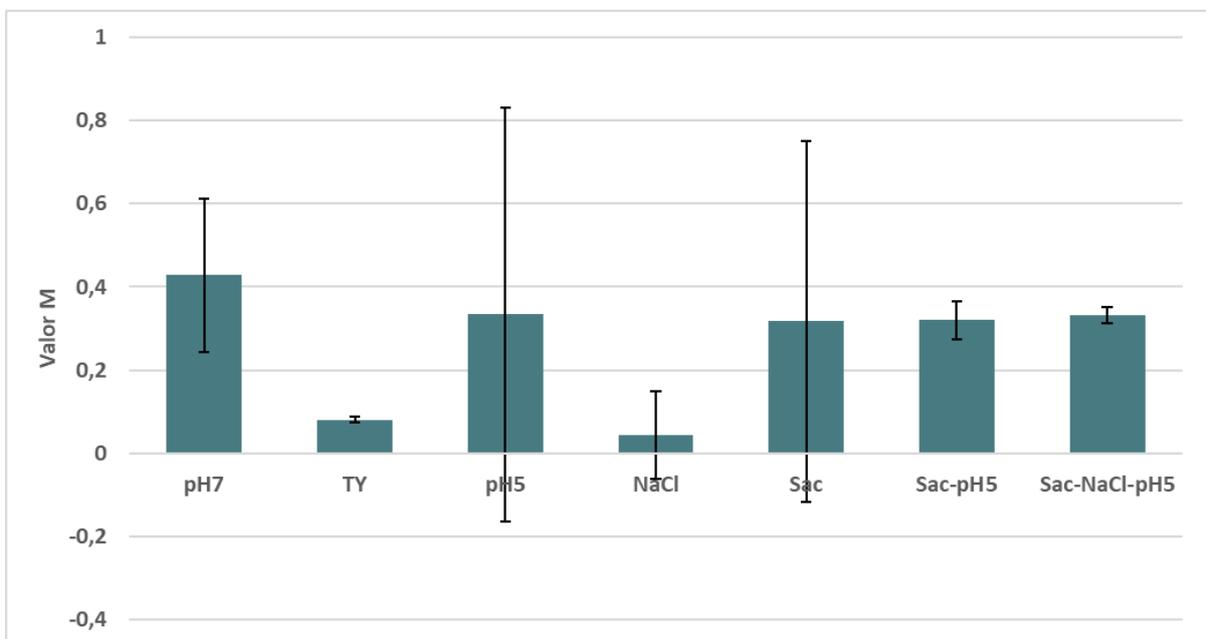


Figura 4.5.1. Ensayo de competencia con cultivos sometidos a estrés. Valores M para los ensayos de competencia entre cepas salvajes de *S. meliloti* 2011 sometidas a estrés ácido, osmótico, salino o combinación de estos contra la cepa salvaje sin tratar.

Estos resultados respaldan nuestra hipótesis inicial de que las condiciones de estrés pueden inducir cambios en la expresión génica y la fisiología bacteriana que contribuyen a una mayor competencia por la colonización rizosférica. Además, destacan la importancia de comprender

cómo los factores ambientales pueden modular la interacción entre las bacterias y las plantas hospederas en el suelo, lo que tiene implicaciones significativas para el desarrollo de estrategias de inoculación y biofertilización en la agricultura.

IV.6 Análisis de eventos recientes de transposición en rizobios mediante ISCompare

Durante la pandemia por SARS-CoV-2 nos vimos forzados a dejar los experimentos líquidos, lo que propició la realización de diferentes estudios bioinformáticos. Entre ellos se desarrolló el programa ISCompare, un programa escrito en Python para la identificación de secuencias de inserción que cambiaron de posición en cepas bacterianas estrechamente relacionadas (Mogro et al., 2021).

A modo de introducción, los genomas bacterianos son un mosaico compuesto por genes muy conservados –en muchos casos esenciales– que forman lo que se conoce como *genoma core*, y un *genoma accesorio* formado por genes menos conservados de adquisición más reciente, y enriquecido en elementos genéticos móviles que incluyen plásmidos, bacteriófagos y elementos transponibles (TE, Transposable elements) (Siguier et al., 2014). Entre los TE, los más sencillos son las secuencias de inserción (IS, Insertion sequences) que usualmente están constituidos solamente por la secuencia codificante de la transposasa – enzima responsable de la transposición– y secuencias repetidas invertidas (IRs) generalmente imperfectas. Las ISs se clasifican según el tipo de transposasa que presentan, el tamaño de las IR, las características de las secuencias repetidas que generan como consecuencia de su integración, los sitios blanco y su organización génica (Mahillon & Chandler, 1998).

Una vez adquiridas, las ISs pueden migrar en un genoma mediante transposición, causando la interrupción de genes, lo que puede generar efectos deletéreos (mutación de un gen esencial), neutrales (mutación de genes, o regiones genómicas, sin una función de elevada importancia) o ventajosos (Schneider & Lenski, 2004). Adicionalmente juegan un rol crucial en la evolución y plasticidad de los genomas actuando como sitios calientes de recombinación, y pueden influir en la expresión de regiones codificantes. Un ejemplo de la importancia de las ISs es su participación en la modificación de diferentes rasgos fenotípicos como resistencia a antibióticos, virulencia, patogenicidad, catabolismo (Vandecraen et al., 2017), y adaptación a estrategias vacunales (Carriquiriborde et al., 2019; Pawloski et al., 2014) entre otras. Por ello es importante investigar los sitios genómicos en los que se encuentran las ISs y los posibles efectos en el fenotipo bacteriano.

Si bien existen diversos programas y servidores que permiten identificar ISs, muchos integrados en las *pipelines* de anotación genómica, nos encontramos con que no existían programas diseñados para encontrar ISs que hubieran cambiado de lugar, es decir que en un genoma están presente en un entorno genómico dado mientras que en otro genoma no. Por este motivo, se desarrolló ISCompare. Solo encontramos un programa con capacidades similares a las de ISCompare, el programa ISseeker desarrollado por Adams et al. (2016).

En la primera parte de este capítulo describiremos brevemente el programa ISCompare. El algoritmo de ISCompare fue desarrollado y escrito en lenguaje Python principalmente por el

Dr. Lozano, habiendo yo participado en los ajustes finales del algoritmo, testeo y validación con datos simulados y reales, y en el benchmarking y comparación con ISSeeker.

IV.6.1. ISCompare

Algoritmo de ISCompare

El algoritmo de ISCompare está esquematizado en la Figura 4.6.1.1 ISCompare fue escrito en Python haciendo uso de las librerías Biopython, pandas, numpy, mechanize, y DNA features viewer. En esta sección describiremos brevemente, y sin entrar en demasiado detalle, el algoritmo que utiliza el programa para identificar lo que llamamos secuencias de inserción de localización diferencial, o DLIS por sus siglas en inglés (*Differentially Located ISs*).

ISComapre requiere como datos un genoma que utilizará como referencia y uno o varios genomas que tomará como blancos para el análisis. ISCompare hace además uso de una base de datos de secuencias de inserción (archivo fasta con secuencias nucleotídicas de las secuencias de inserción que se desea buscar, en este trabajo utilizamos todas las secuencias de inserción disponibles en ISFinder; Siguier et al. (2014), <http://www-is.biotoul.fr>), para identificar las ISs en ambos genomas. En una primera etapa se utiliza el programa blastn para eliminar replicones 100% idénticos en los dos genomas a ser comparados. Luego, mediante el programa blastn se buscan las ISs en el genoma de referencia, y se extraen las regiones flanqueantes (unos 500 nucleótidos, aunque este parámetro se puede ajustar). Estas regiones flanqueantes son extraídas del genoma de referencia, concatenadas, y la secuencia concatenada –como debería ser si no hubiera habido una inserción de una IS– es buscada en el genoma blanco, y contra la base de datos de ISs (para etiquetar casos de ISs consecutivas, o ISs insertadas en otras ISs). Los resultados se utilizan para clasificar las ISs en: DLIS en la secuencia de referencia (si la secuencias flanqueantes concatenadas dan un hit completo en el genoma blanco). Adicionalmente se buscan con blastn las secuencias flanqueantes pero ahora sin concatenar. Si las dos secuencias flanqueantes se encuentran a una distancia corta (<< al largo de una IS) se considera que hay una DLIS en el genoma de referencia. Como medida adicional, si las regiones flanqueantes están alejadas entre sí, se analiza la región del genoma blanco central a las regiones flanqueantes para determinar si hay una IS. En ese caso se considera que la IS está en la misma región en ambos genomas. Luego el genoma de referencia y el genoma blanco se intercambian y se repite el procedimiento, de forma de detectar DLISs presentes únicamente en uno u otro genoma.

Como resultado ISCompare produce diferentes tablas con los resultados y un archivo en formato pdf con las figuras de las regiones en donde se diagnosticó una DLIS para verificación manual.

Optimización de parámetros de ISCompare

A lo largo del desarrollo del algoritmo se fue evaluando la performance del programa utilizando genomas a los que se les insertaron ISs artificialmente (mediante el programa ISSimulator desarrollado por el Dr. Lozano) en posiciones conocidas seleccionadas al azar. Para ello se utilizaron los genomas de *E. coli* str. K-12 substr. MG1655 y *Sinorhizobium meliloti* 2011 (A1, Tabla suplementaria 3.4.5.1, Secuencias utilizadas en este trabajo.) a los que se les introdujeron artificialmente 100 copias de la IS IS30 o ISRm5 respectivamente. Luego se realizaron comparaciones de estos genomas contra los genomas sin ISs agregadas artificialmente. En el caso de *S. meliloti*, se utilizó *S. meliloti* 1021, cepa estrechamente relacionada a *S. meliloti* 2011 para incluir cierta variabilidad genómica.

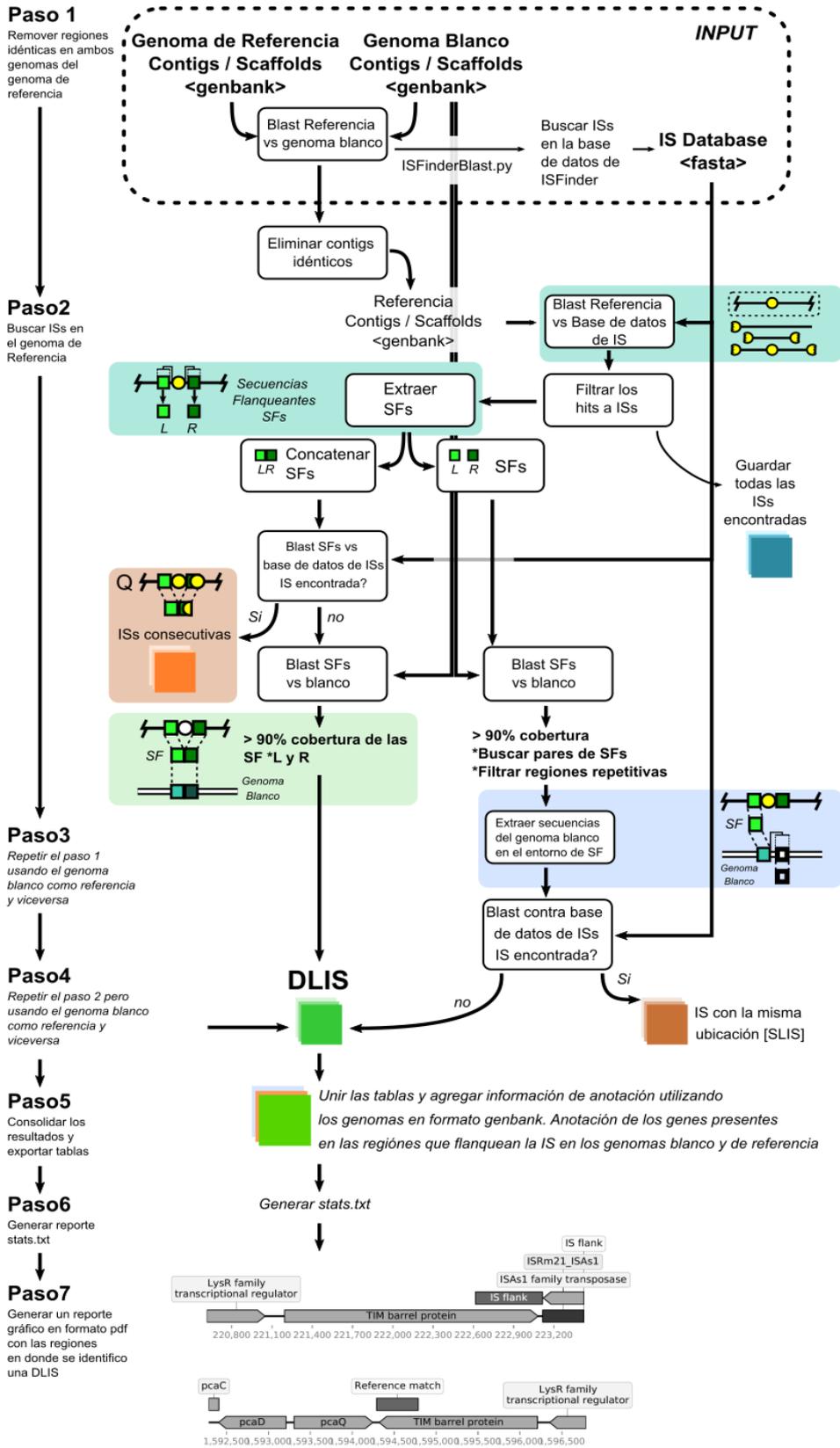


Figura 4.6.1.1. Algoritmo de ISCompare.

En esta etapa se probaron diferentes largos de la región flanqueante, desde 100 a 2000 nucleótidos, en pasos de 100. En el caso de *E. coli* (igual contexto genómico) se obtuvieron los mejores resultados con largos en el rango 200-500 (100% de precisión y 99% de sensibilidad). En el caso de *S. meliloti* los mejores resultados se obtuvieron en el rango de 400-1100 nucleótidos (Figura 4.6.1.2). Por ello como recomendación general y como valor por defecto se eligió un largo de 500 nucleótidos. Habiendo elegido el largo óptimo, se optimizaron el resto de los parámetros (minAlnLength, minlength, ISdiff, scaffoldDiff) mediante pruebas y error fijándose los valores por defecto en minLength = 50, minAlnLength = 50, ISdiff = 50, y scaffoldDiff = 20.

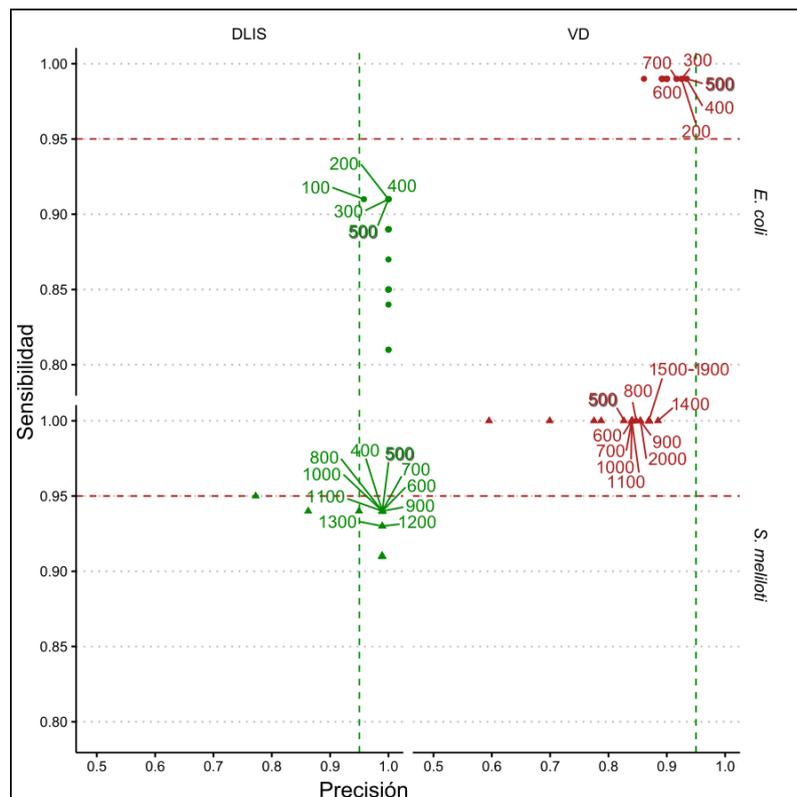


Figura 4.6.1.2. Sensibilidad y precisión de ISCompare utilizando diferentes valores de SurroundingLen. En verde la sensibilidad y precisión de la identificación de DLIS mediante ISCompare para diferentes largos de región flanqueante. En rojo, los resultados tras tomar como verdaderas, además de los resultados clasificados como DLIS, a todas las ISs etiquetadas para verificación manual (en donde se espera que haya mayor número de falsos positivos).

Evaluación de ISCompare

Una vez elegidos los valores para los parámetros del programa se continuó a evaluar la sensibilidad y precisión en la detección de DLIS utilizando genomas de *E. coli* con inserciones al azar de IS30. En este caso se utilizaron 3000 inserciones para acumular suficientes datos, de modo que cada genoma tenía 100 inserciones en posiciones al azar. Para el caso de genomas clonales con solo diferencias en la ubicación las ISs obtuvimos un 100% de precisión con un 94% de sensibilidad. En el caso de considerar como verdaderas todas las predicciones

etiquetadas para validación manual, la sensibilidad fue de 99% a coste de una disminución en la precisión (92%). Las predicciones marcadas para verificación manual (aproximadamente el 12%) son las menos confiables y demostraron tener un 40% de error (falsos positivos).

A continuación, se evaluó el funcionamiento de ISCompare utilizando genomas reales, progresivamente más diferentes (Como medida de distancia utilizamos dDDH, hibridación DNA-DNA digital), de *S. meliloti* (1021 como referencia) y *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1 como referencia). Los resultados fueron analizados manualmente para identificar los casos verdaderos/falsos positivos (Figura 4.6.1.3).

En el caso de *P. aeruginosa* se encontraron en promedio 4.6 DLIS por genoma (min = 0, max = 9) con una precisión de 100% para las ISs clasificadas como DLIS pero con mucho mayor error para las etiquetadas para verificación manual (29% de precisión). Como esperábamos, a mayor distancia entre los genomas un mayor número de secuencias flanqueantes fue descartado ($R=0,82$, $P\text{-value}=0,012$) por diversos motivos, incluyendo entre los más observados, la conservación del entorno genómico en una sola dirección, posiblemente por eventos de recombinación mediados por las ISs.

Dado que *P. aeruginosa* presentó pocas DLIS decidimos realizar el mismo tipo de análisis en *S. meliloti*, bacteria para la cual es conocido que poseen un gran número de ISs. En este caso se utilizaron 26 genomas (completos/borrador) y se encontraron en promedio 40 DLIS por genoma (min = 0, max = 86). *S. meliloti* presenta un genoma compuesto por un cromosoma, dos megaplásmidos simbióticos (pSymA y pSymB) y un número variable de plásmidos accesorios. Un total de DLIS fue identificado por ISCompare, distribuidas de la siguiente manera: 632 (27/cepa) en cromosoma, 263 (11/cepa) en pSymA, and 226 (10/cepa) en pSymB. La cantidad de DLISs relativa al tamaño del genoma (densidad de DLIS) según este análisis no mostró diferencias significativas, pero sí una leve tendencia a ser mayor para plásmidos pSymA, que como veremos más adelante no pudimos validar en un estudio más extenso en rizobios. Como en el caso de *P. aeruginosa* se encontró una correlación entre la dDDH y el número de secuencias flanqueantes que se descartaron del análisis, siendo esta mayor en el caso de genomas completos-cerrados ($r = 0,8920158$, $P = 0,00052$ contra $r = 0,44$, $P = 0,032$ para todos los genomas utilizados). En promedio la precisión fue de 89% (para genomas completos-cerrados los valores variaron en el rango entre 66 y 100%).

En este caso, una de las fuentes de error pudo ser asociada a los intrones de tipo II, ribozimas retro-transponibles que tienen alta tendencia a insertarse dentro de ISs del tipo ISRm2011-2 (intrón RmInt1) o ISRm17 (intrón RmInt2). Para solucionar este tipo de error en particular, así como errores causados por inserción en secuencias repetitivas, se implementó el modo *shift* el cual extrae las secuencias flanqueantes a una distancia fija y configurable del sitio de inserción.

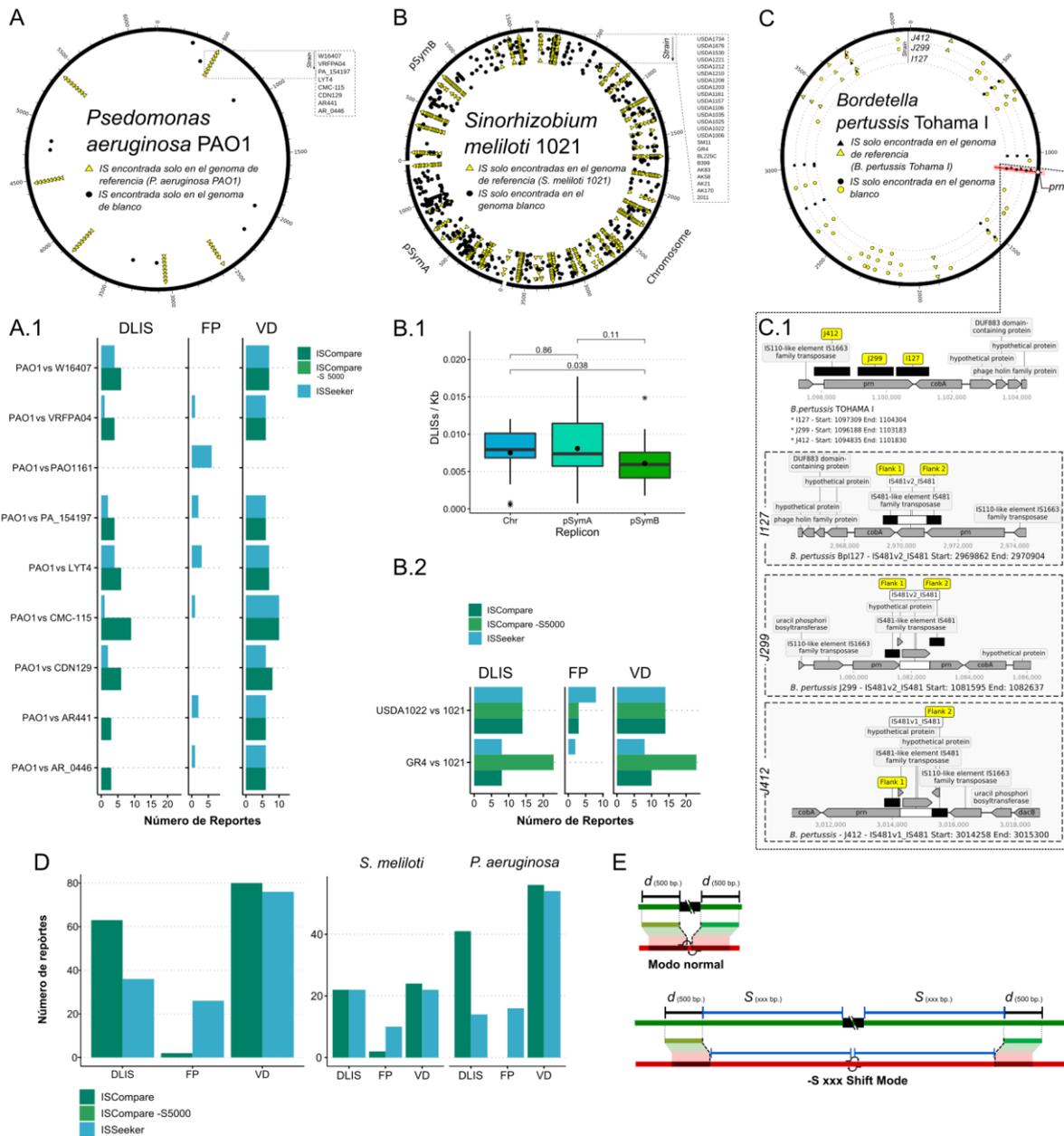


Figura 4.6.1.3. Evaluación de la performance de ISCompare. A, B, C. Circos Plots. Los círculos internos concéntricos indican las posiciones en el genoma de referencia. Los triángulos corresponden a DLIS encontradas en el genoma de referencia, y los círculos a DLIS encontradas en el genoma blanco. En C, en color negro se muestran las DLIS identificadas con alto grado de confianza. En amarillo, DLIS etiquetadas para verificación manual. A.1. Estudios en *P. aeruginosa*, comparación con ISSeeker. B.1. Distribución de DLIS en los diferentes replicones de *S. meliloti*. B.2. Comparación de las predicciones de DLIS entre ISCompare e ISSeeker en *S. meliloti*. C.1. Identificación de las DLIS interrumpiendo al gen de la pertactina en *B. pertussis* por ISCompare. Esquema adaptado de la visualización de los resultados generada por el programa. D. Resultados generales de la comparación entre ISCompare e ISSeeker. E. Esquema representando las variaciones en el algoritmo en el modo shift (-S).

Utilizando este modo con un parámetro -s de 3000-5000 nucleótidos se mejoró notablemente la predicción en estos casos. Específicamente se compararon las cepas 1021 y

GR4 en donde 12 de 21 intrones tipo II fueron encontrados en diferente localización, 2 fueron encontrados en la misma ubicación, y el resto fue descartado por diversos motivos. Finalmente, en una comparación de las cepas GR4 y G4 (el genoma fue descargado del Short Read Archive, SRR2078187; ensamblado con SPAdes y anotado con Prokka) estudiadas por Toro et al. (2016) encontramos 6 DLIS, incluyendo las previamente reportadas en dicho trabajo, con la excepción de una diferencia en un intrón tipo II.

Como última etapa de validación, estudiamos las DLIS en *Bordetella pertussis*, agente causante de la tos convulsa, para la cual se ha demostrado un rol de las DLIS en mecanismos de evasión de la respuesta inmune. En particular, el uso de vacunas acelulares basadas en componentes ha generado la selección de cepas con mutaciones en el antígeno pertactina (Pawloski et al., 2014), dentro de las cuales, las más comunes se deben a la inserción de una IS (*IS481*). Para verificar la capacidad de ISCompare para encontrar estas DLIS comparamos *B. pertussis* TOHAMA I con los genomas de las cepas I127, J412, y J299, los cuales fueron seleccionados por poseer un gen de pertactina interrumpido por IS481 (búsqueda por blast utilizando las secuencias de pertactina interrumpidas por IS481 KF804023.1, KC445198.1, y KC445197.1). ISCompare identificó correctamente las mutaciones por DLIS en pertactina y DLIS adicionales en estos genomas.

Finalmente, se comparó ISCompare con ISSeeker, el programa con las características más similares (basado en comparación de regiones flanqueantes), utilizando genomas de *S. meliloti* completos-cerrados (GR4 vs. 1021) y genomas borrador (USDA1022 vs. 1021). Como diferencias notables entre ISSeeker e ISCompare, pueden mencionarse que, a pesar de ser más rápido en su tiempo de ejecución, ISSeeker puede analizar una IS por corrida, y que debe correrse dos veces, ya que no realiza automáticamente la búsqueda utilizando el genoma blanco como genoma de referencia.

En cuanto a la performance, ISCompare obtuvo resultados comparables, siendo las mayores diferencias en el número de falsos positivos que fue mayor en el caso de ISSeeker. Para las comparaciones realizadas con los genomas de *P. aeruginosa* ISCompare demostró mejores resultados que ISSeeker. En cuanto a los recursos de hardware, ambos programas tienen bajos requisitos pudiendo ser corridos en una notebook.

IV.6.2 Identificación y análisis funcional de eventos recientes de transposición de IS en rizobios.

En esta sección, se presenta un análisis detallado de la distribución de secuencias de inserción localizadas diferencialmente (DLIS) en diferentes especies de rizobios. Se utilizó un enfoque bioinformático para identificar patrones de distribución de DLIS en los genomas de

estas bacterias simbióticas al compararlo con la cepa de referencia correspondiente a cada especie, así como para explorar las funciones celulares afectadas por las inserciones de DLIS.

Los genomas de varias cepas de *B. diazoefficiens*, *B. japonicum*, *M. ciceri*, *M. loti*, *R. etli*, *R. leguminosarum* y *S. meliloti* (A1, Tabla suplementaria 3.4.5.2) fueron analizados para identificar la presencia de DLIS mediante comparaciones pareadas realizadas utilizando el software ISCompare descrito en la sección anterior. Las DLIS representan secuencias de inserción que se localizan diferencialmente en diferentes cepas, y por ende, se las puede considerar IS activas. Con el objetivo de obtener diferentes métricas para evaluar la relevancia de las DLIS fue necesario tener una estimación del número total de ISs en cada una de las cepas estudiadas. Este número se obtuvo directamente de los datos de anotación genómica. De acuerdo con lo que es ya conocido para cepas de rizobios se observó que en general, los replicones cromosomales tienden a tener un menor número de IS en comparación con los plásmidos (Figura 4.6.2.1).

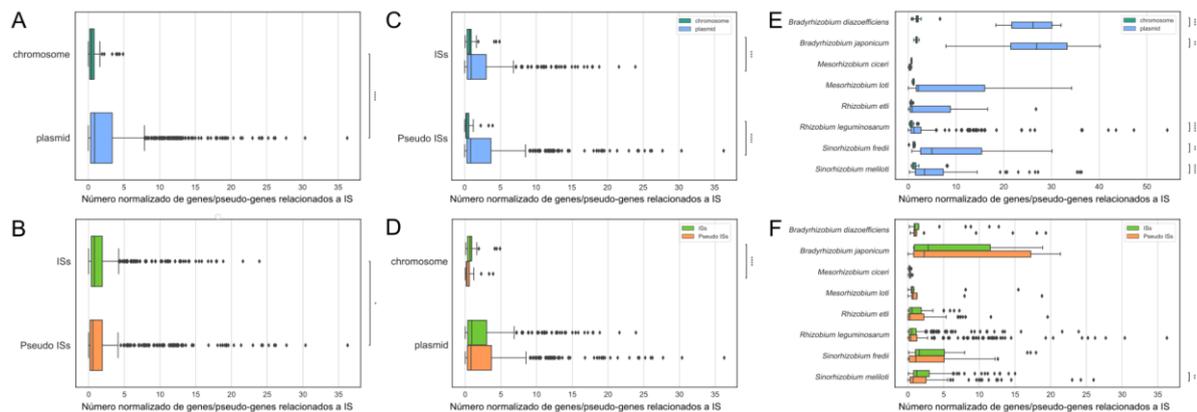


Figura 4.6.2.1. Distribución de genes relacionados con transposasas e ISs normalizados. La normalización se realizó utilizando el tamaño promedio de los replicones por especie y se expresa como número de IS por cada 100.000 nucleótidos. A. Número normalizado de elementos IS por replicón. B. Recuento normalizado de IS y pseudo IS. C-D. Números normalizados de IS y pseudo IS por replicón. E. Número normalizado de elementos IS por especie y replicón. F. Número normalizado de IS y pseudo IS por especie. El número de transposasas y genes relacionados con IS se estimó a partir de las anotaciones de los archivos GenBank utilizando scripts personalizados en Python que buscaron los términos 'transposasa' y 'seq de inserción' en las descripciones de productos de secuencias de codificación y pseudogenes. Los recuentos normalizados se calcularon como IS / 100,000 pb. La significancia se determinó utilizando la prueba de Mann-Whitney y los recuentos normalizados (*: $1,00e-02 < p \leq 5,00e-02$; **: $1,00e-03 < p \leq 1,00e-02$; ***: $1,00e-04 < p \leq 1,00e-03$; ****: $p \leq 1,00e-04$).

Inicialmente esperábamos encontrar un comportamiento similar para las DLIS (misma tendencia observada en el análisis anterior de *S. meliloti*), sin embargo, estas se detectaron con una frecuencia comparable en plásmidos y replicones cromosómicos (Figura 4.6.2.2). Las cepas de *Sinorhizobium* y *Bradyrhizobium* son las que mostraron el mayor número de DLIS, lo que coincide con el alto número de IS en sus genomas. Este resultado sugiere una actividad más significativa de las IS en los replicones cromosómicos. Sin embargo, podría ser que el

número de DLIS en plásmidos está siendo subestimado por ISCompare, en parte por la mayor dificultad que implica su identificación de forma confiable debido al alto número de pseudo-IS y mayor frecuencia de recombinación en estos replicones. En este análisis solo se tuvieron en cuenta las DLIS que fueron identificadas por ISCompare en la categoría de mayor confianza, y además se exigió una coincidencia completa con las secuencias de inserción de la base de datos.

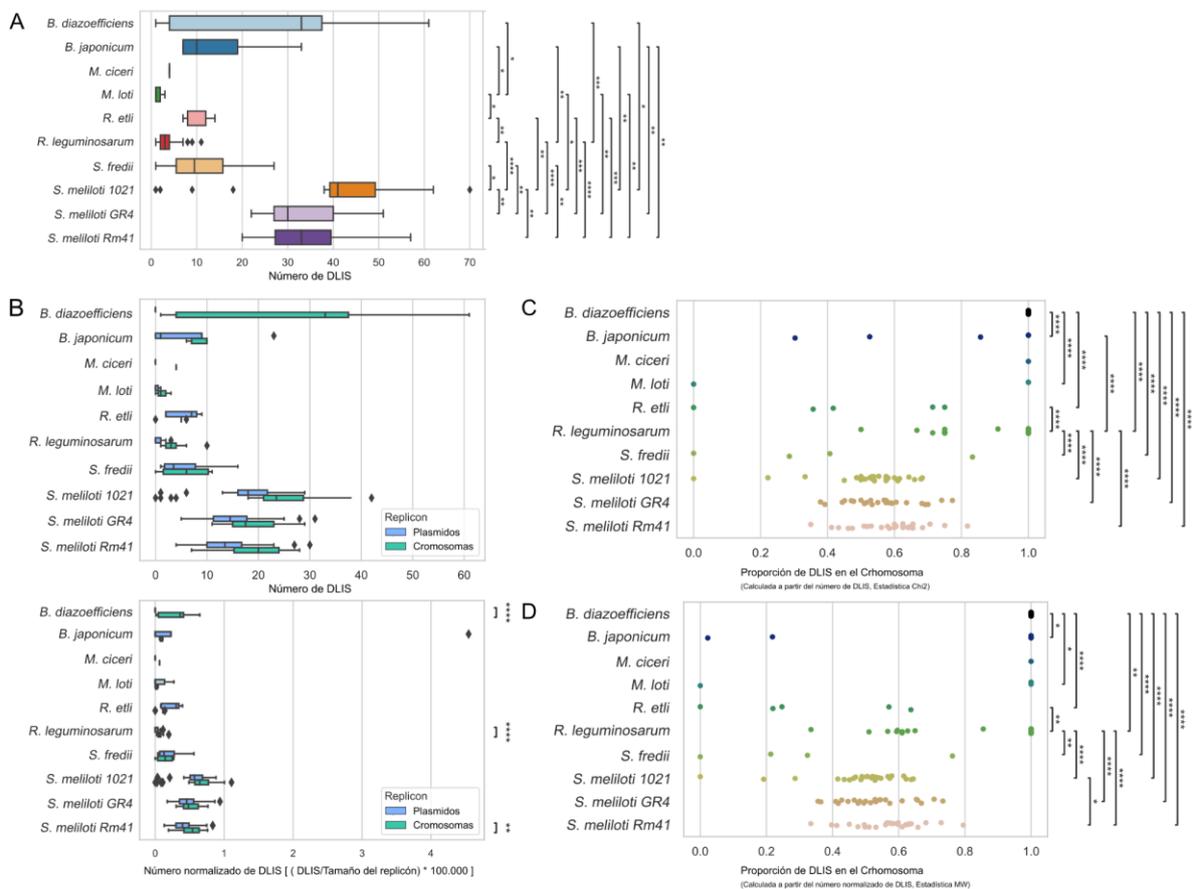


Figura 4.6.2.2 Distribución de DLIS. Cromosomas vs. plásmidos. A. Recuentos totales de DLIS. B. Recuentos de DLIS y recuentos normalizados de DLIS discriminados por rizobios y tipo de replicón. C. Proporciones de DLIS en replicones cromosómicos, calculadas a partir de los recuentos de DLIS. D. Proporciones de DLIS en replicones cromosómicos, calculadas a partir de los recuentos normalizados de DLIS. MW: Mann-Whitney.

Además, se encontró una correlación débil pero significativa entre el número total de DLIS y el número total de IS en cada cepa (Figura 4.6.2.3).

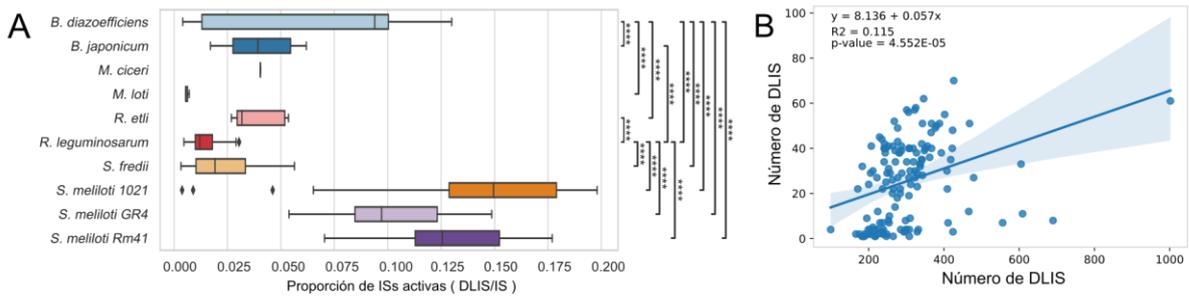


Figura 4.6.2.3. Proporción de IS recientemente activas. A. Proporción de IS activas. La proporción de IS recientemente activas se estimó como la relación de DLIS sobre el recuento total de IS. La significancia se determinó utilizando la prueba de Mann-Whitney y las proporciones de IS activas (DLIS / IS). *: $1,00e-02 < p \leq 5,00e-02$; **: $1,00e-03 < p \leq 1,00e-02$; ***: $1,00e-04 < p \leq 1,00e-03$; ****: $p \leq 1,00e-04$. B. Correlación de Pearson de los recuentos de IS y los recuentos de DLIS.

A continuación, se determinó la distribución de los sitios de inserción de DLIS dentro de genes, regiones intergénicas y posibles operones. A diferencia de las IS, las DLIS representan inserciones que se localizan diferencialmente en diferentes cepas. Nuestros resultados muestran que la mayoría de las DLIS se insertaron en regiones intergénicas, mientras que una proporción menor se observó en operones (Figura 4.6.2.4). Solo para algunas cepas particulares se observó una proporción más alta de DLIS insertadas dentro de secuencias codificantes, aunque estas cepas también presentaron el menor número de DLIS en general.

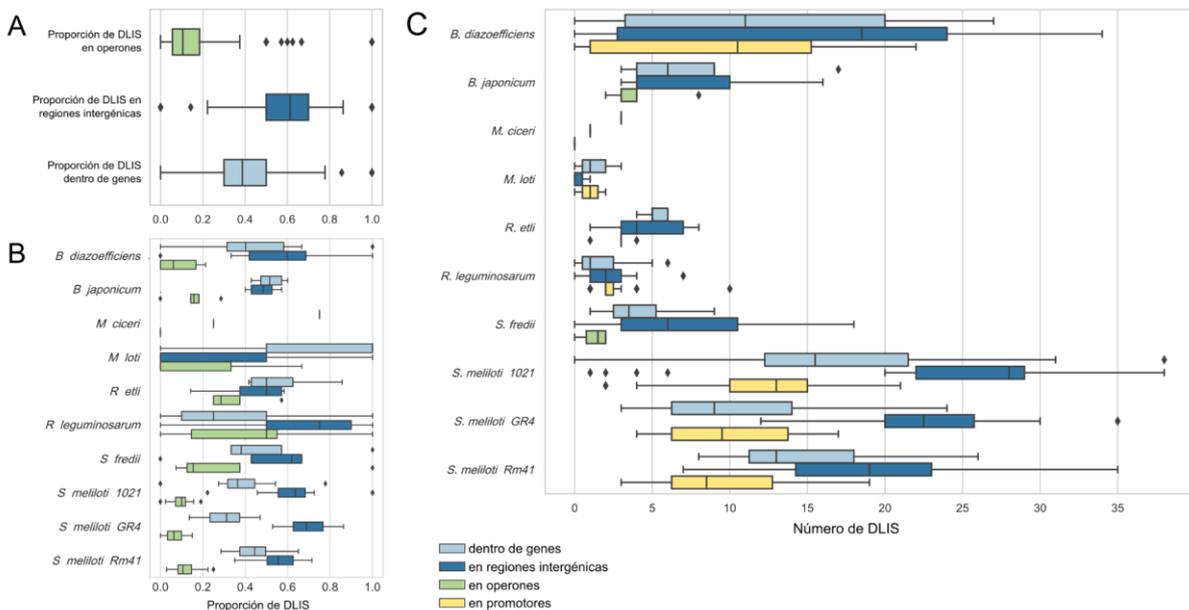


Figura 4.6.2.4. Distribución de DLIS en regiones codificantes e intergénicas. A. Proporción de DLIS insertadas dentro de genes, regiones intergénicas y posibles operones. B. Proporción de DLIS insertadas dentro de genes, regiones intergénicas y posibles operones discriminadas por especies de rizobios. C. Números absolutos de DLIS dentro de genes, regiones intergénicas y posibles regiones promotoras. El recuento de las regiones promotoras es un subconjunto de los recuentos de regiones intergénicas. Cuando una DLIS se insertó dentro de una región intergénica corta entre dos genes divergentes, se contó dos veces ya que podría afectar la transcripción de ambos genes. La ubicación de las DLIS se determinó utilizando scripts personalizados en Python y el software bedtools, como se describe en Materiales y métodos. La significancia se determinó utilizando la prueba de Mann-Whitney y los recuentos normalizados.

Luego se realizó un análisis de las funciones celulares afectadas por las inserciones de DLIS utilizando la clasificación de Clusters de Ortología de Genes (COGs). Se observó que las principales categorías COG afectadas por DLIS incluían funciones desconocidas, transcripción, replicación, recombinación y reparación, biogénesis de la pared celular/membrana/envoltura y biosíntesis de metabolitos secundarios. Se identificaron varias proteínas con funciones importantes relacionadas con la biosíntesis de celulosa, una quitinasa, y una cinasa de dihidroxiacetona e hidratación de nitrilos, entre otras.

El hecho de que la gran mayoría de las DLIS se encuentra en regiones no codificantes (al menos no anotadas como codificantes) o en genes de función hipotética o desconocida parece indicar que el rol de las IS en la adaptación, al menos en tiempos evolutivos cortos, podría desarrollarse principalmente por medio de su función como sitios calientes de recombinación. Hay que destacar sin embargo, que bajo una presión de selección fuerte contra la inactivación de un gen, las DLIS podrían tener un rol de mayor importancia, como es el caso previamente descrito en *B. pertussis*, en donde la interrupción del gen codificante de la pertactina por una DLIS proporciona una ventaja a la bacteria, facilitando su escape de la protección provista por vacunas acelulares a componentes purificados.

Adicionalmente, los sitios de inserción de las DLIS identificadas podrían representar un conjunto relativamente seguro de sitios para la inserción genómica de marcadores, sin afectar el fenotipo de la cepa en cuestión.

Dicho esto, hemos encontrado que en algunos casos las DLIS se encontraron interrumpiendo genes posiblemente vinculados a funciones simbióticas (*lpxK*, *lpsB2*, *kdsD*, *kdgK*, *nodD1*, *nifA*) o que podrían estar implicadas en la supervivencia en el suelo (*gabD*, *modC*, *corA*, *rhiA*). Una lista con los genes con una función descrita con mayor profundidad se muestra en la Tabla 4.6.2.1.

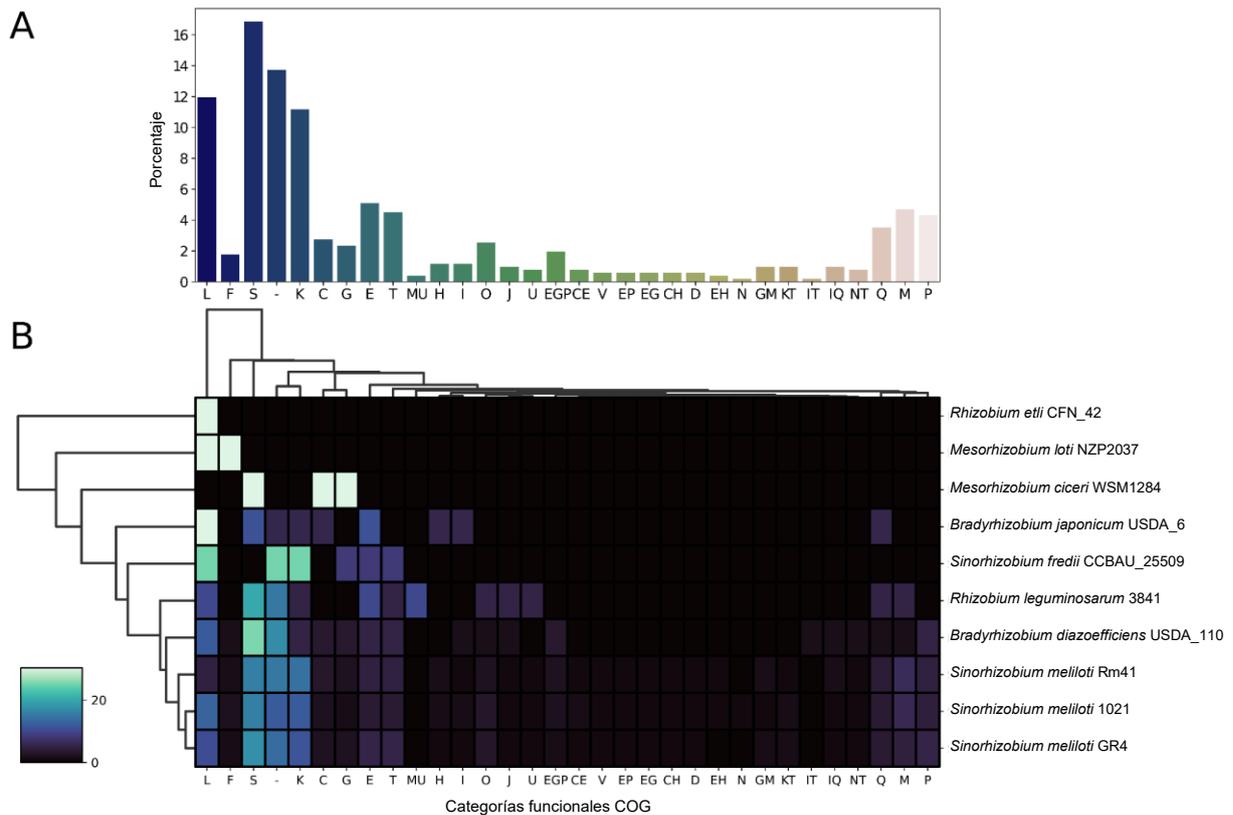


Figura 4.6.2.5. Distribución de las categorías funcionales COG. A. Distribución de genes interrumpidos por una DLIS según la categoría funcional COG. B. El mapa de calor fue generado con un script personalizado en Python utilizando seaborn. Las categorías funcionales COG son las siguientes: -: No asignado; A: Procesamiento y modificación de ARN; B: Estructura y dinámica de la cromatina; C: Producción y conversión de energía; D: Control del ciclo celular y mitosis; E: Metabolismo y transporte de aminoácidos; F: Metabolismo y transporte de nucleótidos; G: Metabolismo y transporte de carbohidratos; H: Metabolismo de coenzimas; I: Metabolismo de lípidos; J: Traducción; K: Transcripción; L: Replicación y reparación; M: Biogénesis de la pared celular/membrana/envoltura; N: Motilidad celular; O: Modificación post-traduccional, degradación de proteínas, funciones de chaperonas; P: Transporte y metabolismo de iones inorgánicos; Q: Biosíntesis, transporte y catabolismo de metabolitos secundarios; R: Predicción funcional general solamente; S: Función desconocida; T: Transducción de señales; U: Tráfico intracelular y secreción; V: Mecanismos de defensa; W: Estructuras extracelulares; X: Mobiloma: profagos, transposones; Y: Estructura nuclear; Z: Citoesqueleto.

Gene Name	Product	Species
<i>acaP</i>	Anhidrasa carbónica	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
<i>acsA1</i>	Acil-coenzima A sintetasa AMP-ligasas de ácidos grasos, proteína hipotética	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
<i>afuA</i>	Sistema de transporte de Fe ³⁺ tipo ABC, componente periplásmico	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
<i>aglR</i>	Regulador transcripcional tipo HTH, AgIR	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
<i>aspB</i>	Aspartato/tirosina/aminotransferasa aromática	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
<i>corA</i>	Proteína transportadora de magnesio y cobalto, CorA	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
<i>cydB</i>	Citocromo d ubiquinol oxidasa subunidad II	<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i>
<i>degP4</i>	Serina proteasa similar a tripsina, periplásmica, dominio PDZ C-terminal	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
<i>deoR1</i>	Proteína reguladora transcripcional, dominio putativo de unión a azúcar	<i>Sinorhizobium meliloti</i>

<i>dinB</i>	ADN polimerasa IV 2, ADN polimerasa propensa a errores	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
<i>dnaB</i>	ADN helicasa replicativa putativa	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
<i>eutB</i>	Subunidad grande de etanolamina amoniaco liasa	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
<i>fhs</i>	Formiato tetrahidrofolato ligasa	<i>Mesorhizobium loti</i>
<i>flaR</i>	Adenilato quinasa y quinasas relacionadas; ATPasa AAA, proteína Cas3 asociada al sistema CRISPR/Cas; cl41983, proteína hipotética conservada	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
<i>gabD</i>	Succinato-semialdehído deshidrogenasa [NAD(+)], GabD	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
<i>glcF</i>	subunidad hierro-azufre de glicolato oxidasa putativa	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
<i>groS</i>	co-chaperona GroES	<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i>
<i>gshA</i>	Glutación sintetasa	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>
<i>idnO</i>	Gluconato 5-deshidrogenasa	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
<i>kdgK</i>	2-deshidro-3-deoxigluconocinasa, familia de quinasas de carbohidratos pfkB	<i>Mesorhizobium ciceri</i>
<i>kdsD</i>	Isomerasa de arabinosa-5-fosfato, familia SIS, subfamilia GutQ KpsF	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
<i>lpsB2</i>	Proteína biosintética de polisacáridos, CapD	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
<i>lpxK</i>	Tetraacildisacárido 4'-quinasa	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
<i>luxR</i>	Regulador transcripcional, proteína que contiene dominio de unión a autoinductor	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
<i>MA20_06130</i>	Proteína de la familia de la indolpiruvato ferredoxina oxidoreductasa	<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i>
<i>MA20_08550</i>	Proteína relacionada con el transportador de la membrana interna Tim44	<i>Rhizobium etli</i>
<i>MA20_09650</i>	Proteína de la familia de la glutación espermidina sintetasa	<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i>
<i>MA20_15575</i>	Proteína hipotética de la familia UPF0260	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
<i>MA20_16935</i>	Hidratasa/isomerasa de Enoyl-CoA, proteína hipotética	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>
<i>MA20_22895</i>	Proteína de unión periplásmica, proteína hipotética	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>
<i>MA20_22950</i>	Subunidad biotina carboxilasa de la acetil-CoA carboxilasa	<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i>
<i>MA20_24460</i>	Proteína exportadora de sulfito, familia TauE/SafE	<i>Rhizobium leguminosarum</i>
<i>MA20_31720</i>	Peptidasa de cisteína tipo transglutaminasa	<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i>
<i>MA20_35415</i>	Oxidoreductasa de la familia SDR	<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i>
<i>MA20_36515</i>	Proteína hipotética, repetición TPR del FOG, subfamilia SEL1, COG0790	<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i>
<i>MA20_40030</i>	Proteasa dependiente de Zn	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>
<i>macA</i>	Subunidad MFP del transportador de eflujo de tipo ABC	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
<i>metB</i>	Gamma-sintasa de cistationina	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
<i>modC</i>	Proteína ModC de unión a ATP para la importación de molibdeno	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
<i>msmE</i>	Proteína de unión al sustrato del transportador ABC de azúcares múltiples	<i>Sinorhizobium fredii</i>
<i>nhaA</i>	Antiportador Na ⁺ /H ⁺	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
<i>nifA</i>	Proteína reguladora específica de Nif	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
<i>nirB</i>	Reductasa de nitrito [NAD(P)H]	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
<i>nodD1</i>	Regulador transcripcional de la familia LysR	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>
<i>norG</i>	Aspartato aminotransferasa, reguladores transcripcionales que contienen un dominio de unión a ADN HTH y un dominio aminotransferasa (familia MocR)	<i>Sinorhizobium meliloti</i>

<i>nthA</i>	Subunidad alfa de nitrilo hidratasa	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
<i>parB</i>	Proteína de partición de la familia ParB/RepB/Spo0J	<i>Rhizobium leguminosarum</i>
<i>pepT</i>	Peptidasa T	<i>Rhizobium leguminosarum</i>
<i>pstS</i>	Proteína de unión al sustrato del transportador ABC de fosfato PstS	<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i>
<i>psuG</i>	Enzima putativa involucrada en la biosíntesis de pigmentos, vía de degradación de pseudouridina	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
<i>pyk</i>	Piruvato quinasa	<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i>
<i>QU41_18010</i>	Regulador transcripcional, dominio de unión a ligando Lrp/AsnC	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
<i>rbn</i>	Ribonucleasa BN (exoribonucleasa), proteína de membrana putativa	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
<i>rhcU</i>	Proteína de cambio del aparato T3SS de la familia EscU/YscU/HrcU	<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i>
<i>rhiA</i>	RhiA, proteína expresada en la rizósfera	<i>Rhizobium leguminosarum</i>
<i>rkpl</i>	Proteína de biosíntesis de polisacáridos capsulares rkpl, sulfatasa	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
<i>sbcD</i>	Subunidad D del exonucleasa SbcCD	<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i>
<i>sqr</i>	Oxidoreductasa dependiente de NAD(P)/FAD	<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i>
<i>surF</i>	Proteína de la familia del locus de exceso 1, similar a SURF1	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
<i>tauZ</i>	Proteína de membrana UPF0324, familia TIGR00698, exportador de sulfato putativo	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
<i>terC</i>	Proteína transmembrana	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
<i>tyrS</i>	Tirosina--tRNA ligasa	<i>Rhizobium leguminosarum</i>
<i>usg</i>	Proteína Usg, proteína hipotética	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
<i>virB6</i>	Proteína de secreción tipo IV VirB6	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
<i>ybaL</i>	Proteína de membrana interna ybaL, antiportador de protones cationes monovalentes 2	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
<i>yceA</i>	Transferasa de azufre relacionada con la rodanasa putativa, dominio similar a acilfosfatasa UPF0176, proteína hipotética	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
<i>ykuE</i>	Fosfoesterasa similar a la calcineurina, proteína hipotética	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
<i>yqaA</i>	Proteína de membrana hipotética	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
<i>ytfG</i>	Proteína hipotética de la familia NmrA-like	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
<i>zapE</i>	Proteína de división celular ZapE, ATPasa similar a AFG1	<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i>

Tabla 4.6.2.1 Lista de genes interrumpidos por una DLIS y anotados con un nombre de gen en la cepa de referencia.

Adicionalmente, buscamos si alguno de los genes que se encontraron interrumpidos por una DLIS estaban relacionados a la colonización rizosférica. De los genes identificados en nuestro experimento STM solo el gen SMC3123 (un probable regulador transcripcional) presentó un homólogo interrumpido por una DLIS en *S. meliloti* USDA1157.

En resumen, nuestros resultados sugieren que si bien las DLIS podrían no desempeñar un papel crucial en la adaptación de los rizobios (al menos en tiempos evolutivos cortos), podrían igualmente tener un efecto significativo en la plasticidad del genoma y en la expresión de genes relacionados con la interacción simbiótica y la competencia en la rizosfera.

Adicionalmente los genes interrumpidos por DLIS conforman un conjunto de genes potencialmente mutables sin influir el fenotipo de la bacteria.

Sin embargo, para comprender mejor el papel de las DLIS en la evolución de los rizobios, se requieren estudios experimentales adicionales, como la evolución experimental de aislados individuales, que podrían proporcionar una visión más clara de la dinámica de la transposición y la recombinación mediadas por IS.

V. CONCLUSIONES

El uso de biofertilizantes es una alternativa común a los fertilizantes químicos en la agricultura, considerando el impacto ambiental de estos últimos. Los rizobios, un grupo de bacterias empleadas para este propósito, tienen la capacidad de estimular el desarrollo de nódulos donde el N₂ puede ser fijado como amonio cuando están asociados simbióticamente con las raíces de plantas leguminosas. Además de esta característica, estas bacterias pueden encontrarse en el suelo a granel en un estado de vida libre, y presentes en concentraciones más altas en la rizosfera (el volumen de suelo directamente afectado por las raíces de las plantas).

El éxito de los inoculantes a menudo se ve reducido por la presencia de cepas nativas del suelo con una mayor competencia para la colonización de la rizosfera y una menor capacidad de fijación de nitrógeno. Por lo tanto, es esencial determinar los mecanismos que actúan en las interacciones tempranas de las raíces y desarrollar productos comerciales que preserven, en los microorganismos, un fenotipo de competencia para la colonización de las raíces.

Utilizando la Mutagénesis con mutantes etiquetados en combinación con la secuenciación de segunda generación (STM-seq), nuestro laboratorio ha identificado cientos de mutantes de *S. meliloti* 2011 que mostraron un fenotipo alterado en la competencia por la colonización de la rizosfera de *Medicago Sativa* y en la supervivencia en formulaciones de inoculantes.

Como primera parte de este trabajo nos hemos enfocado en completar la validación del experimento STM-turba, lo que permitió el desarrollo de una publicación científica (Lozano et al., 2023) de los resultados en los que se describen con detalle, además de la validación de los genes realizada como parte de este trabajo de tesis, los genes relevantes para la supervivencia de *S. meliloti* durante la maduración y almacenamiento de inoculantes tipo turba.

Luego, hemos seleccionado diez genes cuyos mutantes se encontraron afectados negativamente en la colonización rizosférica de la planta de alfalfa para su sobreexpresión. Nuestra hipótesis fue que, si la mutación de estos genes impide la colonización de la rizosfera, su aporte en una mayor cantidad podría mejorar la colonización. Los mutantes en los genes seleccionados fueron reevaluados individualmente en ensayos de competencia por la colonización de la rizosfera mediante su coinoculación con la cepa salvaje de *S. meliloti* 2011 en una proporción de 1:1. Notablemente, en muchos casos, los mutantes exhibieron un comportamiento consistente con el observado en los ensayos de STM-seq.

Para continuar con la caracterización de los genes seleccionados, evaluamos el efecto de la complementación de sus mutantes y de su sobreexpresión en la competitividad para la colonización de las raíces. Para ello, incorporamos plásmidos (pSRKGm) que llevaban las secuencias codificantes y el TSS de los genes seleccionados, tanto en las cepas mutantes correspondientes como en las cepas salvajes. En ocho de los nueve casos probados,

observamos una mayor capacidad de colonización para las cepas sobreexpresantes de los genes de interés.

En su conjunto los resultados obtenidos demuestran el potencial de las metodologías TnSeq/TIS/STM-seq para la identificación de genes relevantes para diferentes procesos fisiológicos en bacterias, y para la selección de genes blanco para la modificación genética como estrategia de mejoramiento racional de cepas para la formulación de bioinoculantes. Si bien esta estrategia es de difícil implementación en la práctica por los riesgos que implica la liberación de organismos modificados genéticamente al ambiente y las normativas vigentes, los marcadores identificados podrían utilizarse en la selección de cepas naturalmente más competentes para la colonización radicular, por ejemplo, seleccionando cepas que porten estos genes y que naturalmente los expresen en mayor cantidad.

Como método alternativo para el mejoramiento de bioinoculantes, se propuso el diseño de medios de cultivo formulados de forma que induzcan la expresión de muchos de los genes involucrados en la competencia por la colonización radicular. Para ello se utilizaron datos de experimentos de transcriptómica realizados en diferentes condiciones de cultivo en *batch*, con el objetivo de seleccionar las condiciones de crecimiento que generaban una mayor inducción de los genes de interés. Los hallazgos reportados en este trabajo, si bien todavía preliminares, respaldan nuestra hipótesis inicial de que las condiciones de estrés pueden desencadenar cambios en la expresión génica y la fisiología bacteriana que contribuyen a una competencia más fuerte por la colonización de la rizosfera. Además, resaltan la importancia de comprender cómo los factores ambientales pueden modular la interacción entre las bacterias y las plantas hospederas en el suelo, lo que tiene implicaciones significativas para el desarrollo de estrategias de inoculación y biofertilización en la agricultura.

Finalmente, como parte del trabajo realizado durante la pandemia por SARS-Cov-2, desarrollamos un software –ISCompare– para la identificación de secuencias de inserción que muestran signos de actividad reciente, a las que llamamos DLIS (*Differentially located insertion sequences*). El software es de código abierto y libremente accesible en el portal Github. Para evaluar el posible rol de las DLIS en la colonización de la rizosfera y en el estilo de vida rizobiano en general, utilizamos ISCompare para identificar DLIS en las especies más estudiadas de rizobios. Nuestros hallazgos sugieren que, aunque las DLIS mayoritariamente parecen no ser determinantes en la adaptación de los rizobios –la mayoría se encontró en regiones intergénicas–, podrían tener un impacto considerable en la plasticidad del genoma actuando como sitios calientes de recombinación, y en algunos casos particulares en la expresión de genes relacionados con la interacción simbiótica y la competencia en la rizosfera. Para profundizar en el papel de las DLIS en la evolución de los rizobios, se necesitan sin embargo estudios experimentales adicionales, como la evolución experimental de aislamientos individuales, los cuales podrían arrojar una visión más clara de la dinámica de la transposición y la recombinación mediadas por IS.

VI. PERSPECTIVAS

Uno de los retos más presentes durante el desarrollo de esta tesis fue encontrar las condiciones propicias para disminuir la variabilidad entre las réplicas biológicas de los ensayos de competencia por la colonización rizosférica. Si bien este problema es evidente en este tipo de ensayos, la variabilidad no pudo ser atribuida a causas que comprendemos con claridad.

Para abordar este problema, es imperativo encontrar las condiciones propicias que minimicen esta variabilidad. La naturaleza cambiante de los factores que influyen en estos ensayos hace que esta tarea sea exhaustiva. Por lo tanto, sostenemos que es necesario desarrollar un enfoque experimental diferente que permita minimizar la variabilidad observada y, al mismo tiempo, refleje con precisión los fenómenos biológicos estudiados. Además, la transición a un nuevo sistema experimental podría conducir a otros descubrimientos que permitan ampliar el conocimiento sobre la interacción rizobio-leguminosa.

Un sistema experimental alternativo deber tener en cuenta un control sumamente riguroso de los factores variables como son la temperatura, humedad, luz, propiedades del soporte sólido para las plantas y el agua de riego dentro de las cámaras de cultivo.

Por otro lado, una medida que podría implicar un menor error experimental es la competencia por la infección, ya que Salas et al., (2017) han reportado que se correlaciona con la competencia por la colonización rizosférica.

Adicionalmente resultaría interesante evaluar fenotipos simbióticos más tardíos con el objetivo de corroborar que la sobreexpresión de los genes seleccionados que no tienen ningún efecto perjudicial en la fijación de nitrógeno. Para esto, con los recursos disponibles en el laboratorio se podrían evaluar cinéticas de nodulación y medidas indirectas de la fijación de nitrógeno como el peso seco de la parte aérea.

Con respecto a los ensayos para la inducción de un estado fisiológico de mayor competitividad se propone la determinación por qPCR de los niveles de expresión de varios de los genes de *S. meliloti* más relevantes para la colonización rizosférica, para determinar el nivel de inducción en las condiciones evaluadas.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Adams, M. D., Bishop, B., & Wright, M. S. (2016). Quantitative assessment of insertion sequence impact on bacterial genome architecture. *Microbial Genomics*, 2(7).
<https://doi.org/10.1099/mgen.0.000062>
- Albareda, M., Rodríguez-Navarro, D. N., Camacho, M., & Temprano, F. J. (2008). Alternatives to peat as a carrier for rhizobia inoculants: Solid and liquid formulations. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(11), 2771–2779.
<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.07.021>
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403–410.
[https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Atieno, M., Wilson, N., Casteriano, A., Crossett, B., Lesueur, D., & Deaker, R. (2018). Aqueous peat extract exposes rhizobia to sub-lethal stress which may prime cells for improved desiccation tolerance. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(17), 7521–7539. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9086-2>
- Atmannspacher, U., Scharf, B., & Schmitt, R. (2005). Control of speed modulation (chemokinesis) in the unidirectional rotary motor of *Sinorhizobium meliloti*. *Molecular Microbiology*, 56(3), 708–718. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04565.x>
- Auch, A. F., von Jan, M., Klenk, H.-P., & Göker, M. (2010). Digital DNA-DNA hybridization for microbial species delineation by means of genome-to-genome sequence comparison. *Standards in Genomic Sciences*, 2(1), 117–134.
<https://doi.org/10.4056/sigs.531120>
- Beassoni, P. R., Gallarato, L. A., Boetsch, C., Garrido, M. N., & Lisa, A. T. (2015). *Pseudomonas aeruginosa* Exopolyphosphatase Is Also a Polyphosphate: ADP Phosphotransferase. *Enzyme Research*, 2015, 404607.
<https://doi.org/10.1155/2015/404607>
- Beatty, P. H., & Good, A. G. (2011). Future Prospects for Cereals That Fix Nitrogen. *Science*, 333(6041), 416–417. <https://doi.org/10.1126/science.1209467>

- Becker, A., Barnett, M. J., Capela, D., Dondrup, M., Kamp, P.-B., Krol, E., Linke, B., Rüberg, S., Runte, K., Schroeder, B. K., Weidner, S., Yurgel, S. N., Batut, J., Long, S. R., Pühler, A., & Goesmann, A. (2009). A portal for rhizobial genomes: *RhizoGATE* integrates a *Sinorhizobium meliloti* genome annotation update with postgenome data. *Journal of Biotechnology*, *140*(1), 45–50. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2008.11.006>
- Berendsen, R. L., Pieterse, C. M. J., & Bakker, P. A. H. M. (2012). The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in Plant Science*, *17*(8), 478–486. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.04.001>
- Beringer, J. E. (1974). R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *Journal of General Microbiology*, *84*(1), 188–198. <https://doi.org/10.1099/00221287-84-1-188>
- Bernabéu-Roda, L. M., López-Ráez, J. A., & Soto, M. J. (2021). Analyzing the Effect of Strigolactones on the Motility Behavior of Rhizobia. In C. Prandi & F. Cardinale (Eds.), *Strigolactones: Methods and Protocols* (pp. 91–103). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1429-7_8
- Bertani, G. (1951). Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, *62*(3), 293–300. <https://doi.org/10.1128/jb.62.3.293-300.1951>
- Brockwell, J., & Bottomley, P. J. (1995). Recent advances in inoculant technology and prospects for the future. *Soil Biology and Biochemistry*, *27*(4–5), 683–697. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(95\)98649-9](https://doi.org/10.1016/0038-0717(95)98649-9)
- Brunel, B., Cleyet-Marel, J.-C., Normand, P., & Bardin, R. (1988). Stability of *Bradyrhizobium japonicum* Inoculants after Introduction into Soil. *Applied and Environmental Microbiology*, *54*(11), 2636–2642.
- Caetano-Anollés, G., Crist-Estes, D. K., & Bauer, W. D. (1988). Chemotaxis of *Rhizobium meliloti* to the plant flavone luteolin requires functional nodulation genes. *Journal of Bacteriology*, *170*(7), 3164–3169. <https://doi.org/10.1128/jb.170.7.3164-3169.1988>

- Capela, D., Filipe, C., Bobik, C., Batut, J., & Bruand, C. (2006). Sinorhizobium meliloti Differentiation During Symbiosis with Alfalfa: A Transcriptomic Dissection. *Molecular Plant-Microbe Interactions*®, 19(4), 363–372. <https://doi.org/10.1094/MPMI-19-0363>
- Carriquiriborde, F., Regidor, V., Aispuro, P. M., Magali, G., Bartel, E., Bottero, D., & Hozbor, D. (2019). Rare Detection of *Bordetella pertussis* Pertactin-Deficient Strains in Argentina. *Emerging Infectious Diseases*, 25(11), 2048–2054. <https://doi.org/10.3201/eid2511.190329>
- Cassman, K. G., Dobermann, A., & Walters, D. T. (2002). Agroecosystems, nitrogen-use efficiency, and nitrogen management. *Ambio*, 31(2), 132–140. <https://doi.org/10.1579/0044-7447-31.2.132>
- Casteriano, A., Wilkes, M. A., & Deaker, R. (2013). Physiological Changes in Rhizobia after Growth in Peat Extract May Be Related to Improved Desiccation Tolerance. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(13), 3998–4007. <https://doi.org/10.1128/AEM.00082-13>
- Catroux, G., Hartmann, A., & Revellin, C. (2001). Trends in rhizobial inoculant production and use. *Plant and Soil*, 230(1), 21–30. <https://doi.org/10.1023/A:1004777115628>
- Cerro, P. del, Megías, M., López-Baena, F. J., Gil-Serrano, A., Pérez-Montaño, F., & Ollero, F. J. (2019). Osmotic stress activates nif and fix genes and induces the Rhizobium tropici CIAT 899 Nod factor production via NodD2 by up-regulation of the nodA2 operon and the nodA3 gene. *PLOS ONE*, 14(3), e0213298. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213298>
- Chao, T.-C., Buhrmester, J., Hansmeier, N., Pühler, A., & Weidner, S. (2005). Role of the Regulatory Gene *rirA* in the Transcriptional Response of Sinorhizobium meliloti to Iron Limitation. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(10), 5969–5982. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.10.5969-5982.2005>
- Charpentier, M., & Oldroyd, G. (2010). How close are we to nitrogen-fixing cereals? *Current Opinion in Plant Biology*, 13(5), 556–564. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2010.08.003>

- Clark, F. E. (1949). Soil Microorganisms and Plant Roots. In A. G. Norman (Ed.), *Advances in Agronomy* (Vol. 1, pp. 241–288). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(08\)60750-6](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(08)60750-6)
- Cronk, Q., Ojeda, I., & Pennington, R. T. (2006). Legume comparative genomics: Progress in phylogenetics and phylogenomics. *Current Opinion in Plant Biology*, 9(2), 99–103. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2006.01.011>
- Dart, P. J., Roughley, R. J., & Chandler, M. R. (1969). Peat Culture of *Rhizobium trifolii*: An Examination by Electron Microscopy. *Journal of Applied Bacteriology*, 32(3), 352–357. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1969.tb00983.x>
- Deaker, R. (2004). Legume seed inoculation technology—A review. *Soil Biology and Biochemistry*, 36(8), 1275–1288. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.04.009>
- Derouaux, A., Wolf, B., Fraipont, C., Breukink, E., Nguyen-Distèche, M., & Terrak, M. (2008). The monofunctional glycosyltransferase of *Escherichia coli* localizes to the cell division site and interacts with penicillin-binding protein 3, FtsW, and FtsN. *Journal of Bacteriology*, 190(5), 1831–1834. <https://doi.org/10.1128/JB.01377-07>
- Di Berardino, M., Dijkstra, A., Stüber, D., Keck, W., & Gubler, M. (1996). The monofunctional glycosyltransferase of *Escherichia coli* is a member of a new class of peptidoglycan-synthesising enzymes. *FEBS Letters*, 392(2), 184–188. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(96\)00809-5](https://doi.org/10.1016/0014-5793(96)00809-5)
- Dombrecht, B., Vanderleyden, J., & Michiels, J. (2001). Stable RK2-derived cloning vectors for the analysis of gene expression and gene function in gram-negative bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI*, 14(3), 426–430. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2001.14.3.426>
- Domínguez-Ferreras, A., Pérez-Arnedo, R., Becker, A., Olivares, J., Soto, M. J., & Sanjuán, J. (2006). Transcriptome profiling reveals the importance of plasmid pSymB for osmoadaptation of *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology*, 188(21), 7617–7625. <https://doi.org/10.1128/JB.00719-06>

- Dondrup, M., Albaum, S. P., Griebel, T., Henckel, K., Jünemann, S., Kahlke, T., Kleindt, C. K., Küster, H., Linke, B., Mertens, D., Mittard-Runte, V., Neuweger, H., Runte, K. J., Tauch, A., Tille, F., Pühler, A., & Goesmann, A. (2009). EMMA 2 – A MAGE-compliant system for the collaborative analysis and integration of microarray data. *BMC Bioinformatics*, *10*(1), 50. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-50>
- Draghi, W. O., Del Papa, M. F., Hellweg, C., Watt, S. A., Watt, T. F., Barsch, A., Lozano, M. J., Lagares, A., Salas, M. E., López, J. L., Albicoro, F. J., Nilsson, J. F., Torres Tejerizo, G. A., Luna, M. F., Pistorio, M., Boiardi, J. L., Pühler, A., Weidner, S., Niehaus, K., & Lagares, A. (2016). A consolidated analysis of the physiologic and molecular responses induced under acid stress in the legume-symbiont model-soil bacterium *Sinorhizobium meliloti*. *Scientific Reports*, *6*(1), 29278. <https://doi.org/10.1038/srep29278>
- Draghi, W. O., Del Papa, M. F., Pistorio, M., Lozano, M., de Los Angeles Giusti, M., Torres Tejerizo, G. A., Jofré, E., Boiardi, J. L., & Lagares, A. (2010). Cultural conditions required for the induction of an adaptive acid-tolerance response (ATR) in *Sinorhizobium meliloti* and the question as to whether or not the ATR helps rhizobia improve their symbiosis with alfalfa at low pH. *FEMS Microbiology Letters*, *302*(2), 123–130. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01846.x>
- Eggenhofer, E., Rachel, R., Haslbeck, M., & Scharf, B. (2006). MotD of *Sinorhizobium meliloti* and Related α -Proteobacteria Is the Flagellar-Hook-Length Regulator and Therefore Reassigned as FliK. *Journal of Bacteriology*, *188*(6), 2144–2153. <https://doi.org/10.1128/JB.188.6.2144-2153.2006>
- Evans, M. G. (1970). The effects of supervisory behavior on the path-goal relationship. *Organizational Behavior and Human Performance*, *5*(3), 277–298. [https://doi.org/10.1016/0030-5073\(70\)90021-8](https://doi.org/10.1016/0030-5073(70)90021-8)
- Feng, L., Roughley, R. J., & Copeland, L. (2002). Morphological Changes of Rhizobia in Peat Cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, *68*(3), 1064–1070. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.3.1064-1070.2002>

- Foster, J. W., & Hall, H. K. (1990). Adaptive acidification tolerance response of *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology*, *172*(2), 771–778.
<https://doi.org/10.1128/jb.172.2.771-778.1990>
- Frossard, S. M., Khan, A. A., Warrick, E. C., Gately, J. M., Hanson, A. D., Oldham, M. L., Sanders, D. A., & Csonka, L. N. (2012). Identification of a Third Osmoprotectant Transport System, the OsmU System, in *Salmonella enterica*. *Journal of Bacteriology*, *194*(15), 3861–3871. <https://doi.org/10.1128/JB.00495-12>
- Galibert, F., Finan, T. M., Long, S. R., Puhler, A., Abola, P., Ampe, F., Barloy-Hubler, F., Barnett, M. J., Becker, A., Boistard, P., Bothe, G., Boutry, M., Bowser, L., Buhrmester, J., Cadieu, E., Capela, D., Chain, P., Cowie, A., Davis, R. W., ... Batut, J. (2001). The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Science (New York, N.Y.)*, *293*(5530), 668–672.
<https://doi.org/10.1126/science.1060966>
- Galperin, M. Y., Wolf, Y. I., Makarova, K. S., Vera Alvarez, R., Landsman, D., & Koonin, E. V. (2021). COG database update: Focus on microbial diversity, model organisms, and widespread pathogens. *Nucleic Acids Research*, *49*(D1), D274–D281.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1018>
- Gepts, P., Beavis, W. D., Brummer, E. C., Shoemaker, R. C., Stalker, H. T., Weeden, N. F., & Young, N. D. (2005). Legumes as a model plant family. Genomics for food and feed report of the Cross-Legume Advances Through Genomics Conference. *Plant Physiology*, *137*(4), 1228–1235. <https://doi.org/10.1104/pp.105.060871>
- Goris, J., Konstantinidis, K. T., Klappenbach, J. A., Coenye, T., Vandamme, P., & Tiedje, J. M. (2007). DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *57*(Pt 1), 81–91. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64483-0>
- Graham, P. H., & Vance, C. P. (2000). Nitrogen fixation in perspective: An overview of research and extension needs. *Field Crops Research*, *65*(2–3), 93–106.
[https://doi.org/10.1016/S0378-4290\(99\)00080-5](https://doi.org/10.1016/S0378-4290(99)00080-5)

- Graham, P. H., & Vance, C. P. (2003). Legumes: Importance and Constraints to Greater Use. *Plant Physiology*, 131(3), 872–877. <https://doi.org/10.1104/pp.017004>
- Guerrero-Castro, J., Lozano, L., & Sohlenkamp, C. (2018). Dissecting the Acid Stress Response of *Rhizobium tropici* CIAT 899. *Frontiers in Microbiology*, 9, 846. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00846>
- Haichar, F. el Z., Santaella, C., Heulin, T., & Achouak, W. (2014). Root exudates mediated interactions belowground. *Soil Biology and Biochemistry*, 77, 69–80. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2014.06.017>
- Halbleib, C. M., & Ludden, P. W. (2000). Regulation of Biological Nitrogen Fixation. *The Journal of Nutrition*, 130(5), 1081–1084. <https://doi.org/10.1093/jn/130.5.1081>
- Hallgren, J., Tsirigos, K. D., Pedersen, M. D., Armenteros, J. J. A., Marcatili, P., Nielsen, H., Krogh, A., & Winther, O. (2022). *DeepTMHMM predicts alpha and beta transmembrane proteins using deep neural networks* (p. 2022.04.08.487609). bioRxiv. <https://doi.org/10.1101/2022.04.08.487609>
- Hellweg, C., Pühler, A., & Weidner, S. (2009). The time course of the transcriptomic response of *Sinorhizobium meliloti*1021 following a shift to acidic pH. *BMC Microbiology*, 9(1), 37. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-37>
- Hengge-Aronis, R. (2002). Recent insights into the general stress response regulatory network in *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 4(3), 341–346.
- Hillel, D. (1971). *Soil and Water: Physical Principles and Processes*. Academic Press.
- Huerta-Cepas, J., Szklarczyk, D., Heller, D., Hernández-Plaza, A., Forslund, S. K., Cook, H., Mende, D. R., Letunic, I., Rattei, T., Jensen, L. J., von Mering, C., & Bork, P. (2019). eggNOG 5.0: A hierarchical, functionally and phylogenetically annotated orthology resource based on 5090 organisms and 2502 viruses. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D309–D314. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1085>

- Hungria, M., & Vargas, M. A. T. (2000). Environmental factors affecting N₂ fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. *Field Crops Research*, 65(2), 151–164. [https://doi.org/10.1016/S0378-4290\(99\)00084-2](https://doi.org/10.1016/S0378-4290(99)00084-2)
- Jones, D. L., Nguyen, C., & Finlay, R. D. (2009). Carbon flow in the rhizosphere: Carbon trading at the soil–root interface. *Plant and Soil*, 321(1), 5–33. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-9925-0>
- Khan, S. R., Gaines, J., Roop, R. M., & Farrand, S. K. (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. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(16), 5053–5062. <https://doi.org/10.1128/AEM.01098-08>
- Kim, J., & Rees, D. C. (1994). Nitrogenase and biological nitrogen fixation. *Biochemistry*, 33(2), 389–397. <https://doi.org/10.1021/bi00168a001>
- Kitts, P. A., Church, D. M., Thibaud-Nissen, F., Choi, J., Hem, V., Sapojnikov, V., Smith, R. G., Tatusova, T., Xiang, C., Zherikov, A., DiCuccio, M., Murphy, T. D., Pruitt, K. D., & Kimchi, A. (2016). Assembly: A resource for assembled genomes at NCBI. *Nucleic Acids Research*, 44(Database issue), D73–D80. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1226>
- Knights, H. E., Ramachandran, V. K., Jorin, B., Ledermann, R., Parsons, J. D., Aroney, S. T. N., & Poole, P. S. (2024). Rhizobium determinants of rhizosphere persistence and root colonization. *The ISME Journal*, 18(1), wræ072. <https://doi.org/10.1093/ismejo/wrae072>
- Kovach, M. E., Elzer, P. H., Steven Hill, D., Robertson, G. T., Farris, M. A., Roop, R. M., & Peterson, K. M. (1995). Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene*, 166(1), 175–176. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(95\)00584-1](https://doi.org/10.1016/0378-1119(95)00584-1)
- Kristensen, O., Laurberg, M., Liljas, A., Kastrup, J. S., & Gajhede, M. (2004). Structural Characterization of the Stringent Response Related Exopolyphosphatase/Guanosine

- Pentaphosphate Phosphohydrolase Protein Family,. *Biochemistry*, 43(28), 8894–8900. <https://doi.org/10.1021/bi049083c>
- Krzywinski, M. I., Schein, J. E., Birol, I., Connors, J., Gascoyne, R., Horsman, D., Jones, S. J., & Marra, M. A. (2009). Circos: An information aesthetic for comparative genomics. *Genome Research*. <https://doi.org/10.1101/gr.092759.109>
- Letunic, I., & Bork, P. (2019). Interactive Tree Of Life (iTOL) v4: Recent updates and new developments. *Nucleic Acids Research*, 47(W1), W256–W259. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz239>
- Lin, Z., Akin, H., Rao, R., Hie, B., Zhu, Z., Lu, W., Smetanin, N., Verkuil, R., Kabeli, O., Shmueli, Y., Dos Santos Costa, A., Fazel-Zarandi, M., Sercu, T., Candido, S., & Rives, A. (2023). Evolutionary-scale prediction of atomic-level protein structure with a language model. *Science (New York, N.Y.)*, 379(6637), 1123–1130. <https://doi.org/10.1126/science.ade2574>
- Lozano, M. J., Mogro, E. G., Eugenia Salas, M., Erdozain, S. A., Zuber, N. E., Becker, A., & Lagares, A. (2023). Identification of *Ensifer meliloti* genes required for survival during peat-based bioinoculant maturation by STM-seq. *Journal of Biotechnology*, 362, 12–23. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2022.12.004>
- MacLean, A. M., Finan, T. M., & Sadowsky, M. J. (2007). Genomes of the Symbiotic Nitrogen-Fixing Bacteria of Legumes. *Plant Physiology*, 144(2), 615–622. <https://doi.org/10.1104/pp.107.101634>
- Madeira, F., Madhusoodanan, N., Lee, J., Eusebi, A., Niewielska, A., Tivey, A. R. N., Lopez, R., & Butcher, S. (2024). The EMBL-EBI Job Dispatcher sequence analysis tools framework in 2024. *Nucleic Acids Research*, 52(W1), W521–W525. <https://doi.org/10.1093/nar/gkae241>
- Mahillon, J., & Chandler, M. (1998). Insertion Sequences. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(3), 725–774. <https://doi.org/10.1128/mubr.62.3.725-774.1998>

- Maier, R. J., & Triplett, E. W. (1996). Toward More Productive, Efficient, and Competitive Nitrogen-Fixing Symbiotic Bacteria. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 15(3), 191–234. <https://doi.org/10.1080/07352689609701941>
- Marino, D., Damiani, I., Gucciardo, S., Mijangos, I., Pauly, N., & Puppo, A. (2013). Inhibition of nitrogen fixation in symbiotic *Medicago truncatula* upon Cd exposure is a local process involving leghaemoglobin. *Journal of Experimental Botany*, 64(18), 5651–5660. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert334>
- Materon, L. A., & Weaver, R. W. (1985). Inoculant Maturity Influences Survival of Rhizobia on Seed. *Applied and Environmental Microbiology*, 49(2), 465–467. <https://doi.org/10.1128/aem.49.2.465-467.1985>
- Mauchline, T. H., Fowler, J. E., East, A. K., Sartor, A. L., Zaheer, R., Hosie, A. H. F., Poole, P. S., & Finan, T. M. (2006). Mapping the *Sinorhizobium meliloti* 1021 solute-binding protein-dependent transportome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(47), 17933–17938. <https://doi.org/10.1073/pnas.0606673103>
- McNear, D. (2013). *The Rhizosphere—Roots, Soil and Everything In Between* | Learn Science at Scitable. <https://www.nature.com/scitable/knowledge/library/the-rhizosphere-roots-soil-and-67500617/>
- Meier, V. M., Muschler, P., & Scharf, B. E. (2007). Functional analysis of nine putative chemoreceptor proteins in *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology*, 189(5), 1816–1826. <https://doi.org/10.1128/JB.00883-06>
- Mogro, E. G., Ambrosio, N. M., & Lozano, M. J. (2021). Easy identification of insertion sequence mobilization events in related bacterial strains with ISCompare. *G3 Genes|Genomes|Genetics*, 11(8), jkab181. <https://doi.org/10.1093/g3journal/jkab181>
- Muglia, C. I., Grasso, D. H., & Aguilar, O. M. (2007). *Rhizobium tropici* response to acidity involves activation of glutathione synthesis. *Microbiology (Reading, England)*, 153(Pt 4), 1286–1296. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2006/003483-0>
- Munoz Aguilar, J. M., Ashby, A. M., Richards, A. J. M., Loake, G. J., Watson, M. D., & Shaw, C. H. (1988). Chemotaxis of *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* towards

- Flavonoid Inducers of the Symbiotic Nodulation Genes. *Microbiology*, 134(10), 2741–2746. <https://doi.org/10.1099/00221287-134-10-2741>
- Nguyen, C. (2003). Rhizodeposition of organic C by plants: Mechanisms and controls. *Agronomie*, 23(5–6), 375–396. <https://doi.org/10.1051/agro:2003011>
- Nilsson, J. F., Castellani, L. G., Draghi, W. O., Mogro, E. G., Wibberg, D., Winkler, A., Hansen, L. H., Schlüter, A., Pühler, A., Kalinowski, J., Torres Tejerizo, G. A., & Pistorio, M. (2021). Global transcriptome analysis of *Rhizobium favelukesii* LPU83 in response to acid stress. *FEMS Microbiology Ecology*, 97(1), fiae235. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiae235>
- Nilsson, J. F., Castellani, L. G., Draghi, W. O., Pérez-Giménez, J., Torres Tejerizo, G. A., & Pistorio, M. (2019). Proteomic Analysis of *Rhizobium favelukesii* LPU83 in Response to Acid Stress. *Journal of Proteome Research*, 18(10), 3615–3629. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.9b00275>
- Oldroyd, G. E. D., & Dixon, R. (2014). Biotechnological solutions to the nitrogen problem. *Current Opinion in Biotechnology*, 26, 19–24. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.08.006>
- Olivares, J., Bedmar, E. J., & Sanjuán, J. (2013). Biological Nitrogen Fixation in the Context of Global Change. *Molecular Plant-Microbe Interactions*®, 26(5), 486–494. <https://doi.org/10.1094/MPMI-12-12-0293-CR>
- Pawloski, L. C., Queenan, A. M., Cassidy, P. K., Lynch, A. S., Harrison, M. J., Shang, W., Williams, M. M., Bowden, K. E., Burgos-Rivera, B., Qin, X., Messonnier, N., & Tondella, M. L. (2014). Prevalence and Molecular Characterization of Pertactin-Deficient *Bordetella pertussis* in the United States. *Clinical and Vaccine Immunology*, 21(2), 119–125. <https://doi.org/10.1128/CVI.00717-13>
- Paysan-Lafosse, T., Blum, M., Chuguransky, S., Grego, T., Pinto, B. L., Salazar, G. A., Bileschi, M. L., Bork, P., Bridge, A., Colwell, L., Gough, J., Haft, D. H., Letunić, I., Marchler-Bauer, A., Mi, H., Natale, D. A., Orengo, C. A., Pandurangan, A. P., Rivoire,

- C., ... Bateman, A. (2023). InterPro in 2022. *Nucleic Acids Research*, 51(D1), D418–D427. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac993>
- Philippot, L., Raaijmakers, J. M., Lemanceau, P., & van der Putten, W. H. (2013). Going back to the roots: The microbial ecology of the rhizosphere. *Nature Reviews Microbiology*, 11(11), 789–799. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3109>
- Pinton, R., Varanini, Z., & Nannipieri, P. (2001). The rhizosphere as a site of biochemical interactions among soil components. *Plant and Microorganisms. The Rhizosphere, Biochemistry and Organic Substances at the Soil-Plant Interface*, 1–17.
- Pistorio, M., Balagué, L. J., Del Papa, M. F., Pich-Otero, A., Lodeiro, A., Hozbor, D. F., & 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 Microbiology Letters*, 214(2), 165–170. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2002.tb11341.x>
- Pobigaylo, N., Wetter, D., Szymczak, S., Schiller, U., Kurtz, S., Meyer, F., Nattkemper, T. W., & Becker, A. (2006). Construction of a large signature-tagged mini-Tn5 transposon library and its application to mutagenesis of *Sinorhizobium meliloti*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(6), 4329–4337. <https://doi.org/10.1128/AEM.03072-05>
- Prashar, P., Kapoor, N., & Sachdeva, S. (2014). Rhizosphere: Its structure, bacterial diversity and significance. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 13(1), 63–77. <https://doi.org/10.1007/s11157-013-9317-z>
- Prell, J., & Poole, P. (2006). Metabolic changes of rhizobia in legume nodules. *Trends in Microbiology*, 14(4), 161–168. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2006.02.005>
- Price, M. N., Wetmore, K. M., Waters, R. J., Callaghan, M., Ray, J., Liu, H., Kuehl, J. V., Melnyk, R. A., Lamson, J. S., Suh, Y., Carlson, H. K., Esquivel, Z., Sadeeshkumar, H., Chakraborty, R., Zane, G. M., Rubin, B. E., Wall, J. D., Visel, A., Bristow, J., ... Deutschbauer, A. M. (2018). Mutant phenotypes for thousands of bacterial genes of

- unknown function. *Nature*, 557(7706), 503–509. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0124-0>
- Quinlan, A. R., & Hall, I. M. (2010). BEDTools: A flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics*, 26(6), 841–842.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq033>
- Ramachandran, V. K., East, A. K., Karunakaran, R., Downie, J. A., & Poole, P. S. (2011). Adaptation of *Rhizobium leguminosarum* to pea, alfalfa and sugar beet rhizospheres investigated by comparative transcriptomics. *Genome Biology*, 12(10), R106.
<https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-10-r106>
- Rappleye, C. (2004). *Silica Clean-up of DNA*. Aroian Lab Protocols, University of California, San Diego.
- Rees, D. C., & Howard, J. B. (2000). Nitrogenase: Standing at the crossroads. *Current Opinion in Chemical Biology*, 4(5), 559–566. [https://doi.org/10.1016/s1367-5931\(00\)00132-0](https://doi.org/10.1016/s1367-5931(00)00132-0)
- Roughley, R. J., & Vincent, J. M. (1967). Growth and Survival of *Rhizobium* spp. In Peat Culture. *Journal of Applied Bacteriology*, 30(2), 362–376.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1967.tb00310.x>
- Salas, M. E. (2015). *La simbiosis fijadora de nitrógeno Sinorhizobium meliloti-alfalfa: Aproximaciones ómicas aplicadas a la identificación y caracterización de determinantes genéticos del rizobio asociados a la colonización temprana de la raíz de alfalfa (Medicago sativa)* [Tesis, Universidad Nacional de La Plata].
<https://doi.org/10.35537/10915/46558>
- Salas, M. E., Lozano, M. J., López, J. L., Draghi, W. O., Serrania, J., Torres Tejerizo, G. A., Albicoro, F. J., Nilsson, J. F., Pistorio, M., Del Papa, M. F., Parisi, G., Becker, A., & Lagares, A. (2017). Specificity traits consistent with legume-rhizobia coevolution displayed by *Ensifer meliloti* rhizosphere colonization. *Environmental Microbiology*, 19(9), 3423–3438. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13820>

- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- 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*(1), 69–73. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(94\)90324-7](https://doi.org/10.1016/0378-1119(94)90324-7)
- Scharf, B., & Schmitt, R. (2002). Sensory transduction to the flagellar motor of *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, *4*(3), 183–186.
- Schmidt, E. L. (1979). Initiation of Plant Root-Microbe Interactions. *Annual Review of Microbiology*, *33*(Volume 33, 1979), 355–376. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.33.100179.002035>
- Schneider, D., & Lenski, R. E. (2004). Dynamics of insertion sequence elements during experimental evolution of bacteria. *Research in Microbiology*, *155*(5), 319–327. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2003.12.008>
- Siguiier, P., Goubeyre, E., & Chandler, M. (2014). Bacterial insertion sequences: Their genomic impact and diversity. *FEMS Microbiology Reviews*, *38*(5), 865–891. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12067>
- Silva, C., Kan, F. L., & Martínez-Romero, E. (2007). Population genetic structure of *Sinorhizobium meliloti* and *S. medicae* isolated from nodules of *Medicago* spp. in Mexico: Genetic structure of *Sinorhizobium* from alfalfa in Mexico. *FEMS Microbiology Ecology*, *60*(3), 477–489. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2007.00301.x>
- 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*(9), Article 9. <https://doi.org/10.1038/nbt1183-784>
- Smith, R. S. (1992). Legume inoculant formulation and application. *Canadian Journal of Microbiology*, *38*(6), 485–492. <https://doi.org/10.1139/m92-080>

- Stephens, J. H. G., & Rask, H. M. (2000). Inoculant production and formulation. *Field Crops Research*, 65(2–3), 249–258. [https://doi.org/10.1016/S0378-4290\(99\)00090-8](https://doi.org/10.1016/S0378-4290(99)00090-8)
- The UniProt Consortium. (2023, January 6). *UniProt: The Universal Protein Knowledgebase in 2023 | Nucleic Acids Research | Oxford Academic*.
<https://academic.oup.com/nar/article/51/D1/D523/6835362?login=false>
- Tiricz, H., Szucs, A., Farkas, A., Pap, B., Lima, R. M., Maróti, G., Kondorosi, É., & Kereszt, A. (2013). Antimicrobial nodule-specific cysteine-rich peptides induce membrane depolarization-associated changes in the transcriptome of *Sinorhizobium meliloti*. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(21), 6737–6746.
<https://doi.org/10.1128/AEM.01791-13>
- Toro, N., Martínez-Abarca, F., & Fernández-López, M. (2016). The early events underlying genome evolution in a localized *Sinorhizobium meliloti* population. *BMC Genomics*, 17(1), 556. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2878-9>
- Trinick, M. J., & Galbraith, J. (1980). The Rhizobium Requirements of the Non-Legume *Parasponia* in Relationship to the Cross-Inoculation Group Concept of Legumes. *New Phytologist*, 86(1), 17–26. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1980.tb00775.x>
- Triplett, E. W., & Sadowsky, M. J. (1992). Genetics of competition for nodulation of legumes. *Annual Review of Microbiology*, 46, 399–428.
<https://doi.org/10.1146/annurev.mi.46.100192.002151>
- Tschitschko, B., Esti, M., Philippi, M., Kidane, A. T., Littmann, S., Kitzinger, K., Speth, D. R., Li, S., Kraberg, A., Tienken, D., Marchant, H. K., Kartal, B., Milucka, J., Mohr, W., & Kuypers, M. M. M. (2024). Rhizobia–diatom symbiosis fixes missing nitrogen in the ocean. *Nature*, 630(8018), 899–904. <https://doi.org/10.1038/s41586-024-07495-w>
- Tung, W. L., & Chow, K. C. (1995). A modified medium for efficient electrotransformation of *E. coli*. *Trends in Genetics: TIG*, 11(4), 128–129. [https://doi.org/10.1016/s0168-9525\(00\)89022-8](https://doi.org/10.1016/s0168-9525(00)89022-8)
- Turner, T. R., James, E. K., & Poole, P. S. (2013). The plant microbiome. *Genome Biology*, 14(6), 209. <https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-6-209>

- Turner, T. R., Ramakrishnan, K., Walshaw, J., Heavens, D., Alston, M., Swarbreck, D., Osbourn, A., Grant, A., & Poole, P. S. (2013). Comparative metatranscriptomics reveals kingdom level changes in the rhizosphere microbiome of plants. *The ISME Journal*, 7(12), 2248–2258. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.119>
- van Kempen, M., Kim, S. S., Tumescheit, C., Mirdita, M., Lee, J., Gilchrist, C. L. M., Söding, J., & Steinegger, M. (2024). Fast and accurate protein structure search with Foldseek. *Nature Biotechnology*, 42(2), 243–246. <https://doi.org/10.1038/s41587-023-01773-0>
- van Loosdrecht, M. C., Lyklema, J., Norde, W., & Zehnder, A. J. (1990). Influence of interfaces on microbial activity. *Microbiological Reviews*, 54(1), 75–87.
- Vandecraen, J., Chandler, M., Aertsen, A., & Houdt, R. V. (2017). The impact of insertion sequences on bacterial genome plasticity and adaptability. *Critical Reviews in Microbiology*. <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/1040841X.2017.1303661>
- Vessey, J. K. (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*, 255(2), 571–586. <https://doi.org/10.1023/A:1026037216893>
- Vincent, J. M. (1970). *A Manual for the Practical Study of Root-nodule Bacteria*. [Published for the] International Biological Programme [by] Blackwell Scientific. <https://books.google.com.br/books?id=dcQcAQAAIAAJ>
- Wagner, S. (2011). *Biological nitrogen fixation*. 2(14).
- Webb, B. A., Hildreth, S., Helm, R. F., & Scharf, B. E. (2014). Sinorhizobium meliloti Chemoreceptor McpU Mediates Chemotaxis toward Host Plant Exudates through Direct Proline Sensing. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(11), 3404–3415. <https://doi.org/10.1128/AEM.00115-14>
- Weir, B. (2012). The current taxonomy of rhizobia. *NZ Rhizobia Website*. <http://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia>
- Wells, D. H., & Long, S. R. (2002). The Sinorhizobium meliloti stringent response affects multiple aspects of symbiosis. *Molecular Microbiology*, 43(5), 1115–1127. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02826.x>

- Wheatley, R. M., Ford, B. L., Li, L., Aroney, S. T. N., Knights, H. E., Ledermann, R., East, A. K., Ramachandran, V. K., & Poole, P. S. (2020). Lifestyle adaptations of *Rhizobium* from rhizosphere to symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *117*(38), 23823–23834. <https://doi.org/10.1073/pnas.2009094117>
- Wojciechowski, M. F., Lavin, M., & Sanderson, M. J. (2004). A phylogeny of legumes (Leguminosae) based on analysis of the plastid *matK* gene resolves many well-supported subclades within the family. *American Journal of Botany*, *91*(11), 1846–1862. <https://doi.org/10.3732/ajb.91.11.1846>
- Zahran, H. H. (1999). *Rhizobium*-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, *63*(4), 968–989, table of contents. <https://doi.org/10.1128/MMBR.63.4.968-989.1999>

VIII. APÉNDICES

A1. Secuencias genómicas utilizadas en este trabajo

Tabla suplementaria 3.4.5.1. Genomas utilizados en la validación de ISCompare

Secuencias de NCBI Assembly DB

Género y especie	Cepa	Número de acceso de Assembly DB
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	320	GCA_004011235.1
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	1021	GCA_000006965.1
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	2011	GCA_000346065.1
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	2119	GCA_004004685.1
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	AK170	GCA_003692735.1
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	AK21	GCA_009664245.1
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	AK58	GCA_000473425.1
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	AK83	GCA_000147795.3
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	B399	GCA_002302375.1
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	BL225C	GCA_000147775.3
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	GR4	GCA_000320385.2
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	SM11	GCA_000218265.1
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	USDA1006	GCA_004004215.1
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	USDA1022	GCA_004004435.1
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	USDA1025	GCA_004004125.1
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	USDA1035	GCA_004004405.1
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	USDA1106	GCA_002197065.1
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	USDA1157	GCA_002197025.1
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	USDA1161	GCA_004004345.1
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	USDA1203	GCA_004003765.1
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	USDA1208	GCA_004003505.1
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	USDA1210	GCA_004003515.1
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	USDA1212	GCA_004003475.1
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	USDA1221	GCA_004003445.1
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	USDA1530	GCA_004002805.1
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	USDA1676	GCA_004002165.1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AR441	ASM307369v1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CMC-115	NZ_CP046602.1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AR_0446	NZ_CP029660.1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	VRFPA04	NZ_CP008739.1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PA_154197	NZ_CP014866.1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CDN129	NZ_CP056774.1

Género y especie	Cepa	Número de acceso de Assembly DB
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	LYT4	ASM1297170v1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	W16407	NZ_CP008869.2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PAO1161	NZ_CP032126.1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PAO1	NC_002516.2
<i>Escherichia coli</i>	K-12 substr. MG1655	NC_000913,3
<i>Bordetella pertussis</i>	Tohama I	NC_002929
<i>Bordetella pertussis</i>	I127	CP011721.1
<i>Bordetella pertussis</i>	H915	CP011239.1
<i>Bordetella pertussis</i>	J299	CP046994.1
<i>Bordetella pertussis</i>	J412	CP046989.1

Secuencias de SRA DB

ID	Description	Organism
SRX1072829	Insights into forces driving evolution of a local <i>Sinorhizobium meliloti</i> population	<i>Sinorhizobium meliloti</i>

Secuencias de EMBL-EBI

Study Accession	Sample Accession	Experiment Accession
PRJEB18624	SAMEA41193418	ERX1840137

Tabla suplementaria 3.4.5.2. Secuencias utilizadas en el estudio de DLIS en rizobios.

Género y especie	Cepa	Número de acceso de Asembly DB
<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i>	USDA_110	GCF_001642675.1
<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i>	110spc4	GCF_004359355.1
<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i>	113-2	GCF_013390305.1
<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i>	172S4	GCF_011604625.1
<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i>	36_1	GCF_016616885.1
<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i>	38_8	GCF_016616235.1
<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i>	41_2	GCF_016616425.1
<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i>	65_7	GCF_016599855.1
<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i>	CB1809	GCF_021052285.1
<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i>	F07S3	GCF_014163475.1
<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i>	H12S4	GCF_014163435.1
<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i>	HF08	GCF_014163455.1
<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i>	HH15	GCF_014163415.1
<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i>	NK6	GCF_001549695.1
<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i>	USDA_122	GCF_001908315.1
<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i>	USDA_122-Bd	GCF_023278165.1
<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i>	USDA110	GCF_000011365.1
<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i>	XF7	GCF_003183845.2

Género y especie	Cepa	Número de acceso de Assembly DB
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	5038	GCF_013752735.1
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	CC829	GCF_021052365.1
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	E109	GCF_000807315.1
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	J5	GCF_001887695.1
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	S06B-BJ	GCF_023278145.1
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	USDA_6	GCA_000284375.1
<i>Mesorhizobium ciceri</i>	CC1192	GCF_001618825.1
<i>Mesorhizobium ciceri</i>	R30	GCF_024371385.1
<i>Mesorhizobium ciceri</i>	WSM1271	GCF_000185905.1
<i>Mesorhizobium ciceri</i>	WSM1284	GCF_001618845.1
<i>Mesorhizobium loti</i>	582	GCF_014189435.1
<i>Mesorhizobium loti</i>	NZP2037	GCF_001676765.1
<i>Mesorhizobium loti</i>	NZP2042	GCF_013170705.1
<i>Mesorhizobium loti</i>	R88b	GCF_013170845.1
<i>Mesorhizobium loti</i>	SU343	GCF_013170865.1
<i>Rhizobium etli</i>	8C-3	GCF_001908375.1 / GCA_001908375.1
<i>Rhizobium etli</i>	CFN_42	GCF_000092045.1 / GCA_000092045.1
<i>Rhizobium etli</i>	CIAT_652	GCF_000020265.1
<i>Rhizobium etli</i>	IE4803	GCF_000816125.1
<i>Rhizobium etli</i>	Mim1	GCF_000442435.1
<i>Rhizobium etli</i>	NXC12	GCF_002119845.1
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	22B	GCF_011604525.1
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	23B	GCF_011604505.1
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	248	GCF_010365265.1
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	31B	GCF_011604465.1
<i>Rhizobium leguminosarum</i> [<i>Rhizobium johnstonii</i> sp. nov]	3841	GCF_000009265.1
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	3B	GCF_011604545.1
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	4B	GCF_011604565.1
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	9B	GCF_011604485.1
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	A1	GCA_011128975.2
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	ATCC_14479	GCF_003290405.1
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	BIHB_1148	GCA_002240185.1
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	BIHB_1217	GCF_002243365.1
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	CB782	GCF_000520875.1
<i>Rhizobium leguminosarum</i> [<i>Rhizobium brockwellii</i> sp. nov]	CC275e	GCF_000769405.2
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	CC511	GCA_025200795.1
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	GLR17	GCF_017357305.1
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	Gr_12_7	GCF_021391595.1
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	Norway	GCF_002953715.1
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	OyaliB	GCF_017348875.1
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	RCAM0610	GCA_014189555.1

Género y especie	Cepa	Número de acceso de Asembly DB
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	RCAM0626	GCA_014189575.1
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	RCAM1365	GCA_014189635.1
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	RCAM2802	GCA_014189655.1
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	SRDI969	GCF_025152725.1
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	SU303	GCF_021052345.1
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	TA1	GCF_000430465.3
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	Ta1k	GCA_021391655.1
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	Ta6	GCA_021391615.1
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	Ta6k	GCA_021397605.1
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	Ta9k	GCA_021391695.1
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	Tp73_4	GCF_021391715.1
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	TpK	GCA_021484745.1
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	UPM791	GCF_002948295.1 / GCA_002948295.1
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	Vaf-108	GCF_001890425.1
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	Vaf10	GCF_001679785.1
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	WSM1274	GCF_025200775.1
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	WSM1325	GCF_000023185.1
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	WSM1689	GCF_000517605.1
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	WSM2304	GCF_000021345.1
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	WSM4643	GCF_025152745.1
<i>Sinorhizobium fredii</i>	CCBAU_25509	GCF_003177055.1 / GCA_003177055.1
<i>Sinorhizobium fredii</i>	CCBAU_45436	GCF_003100575.1
<i>Sinorhizobium fredii</i>	CCBAU_83666	GCF_002288485.1
<i>Sinorhizobium fredii</i>	NGR234	GCF_000018545.1
<i>Sinorhizobium fredii</i>	NXT3	GCF_002944405.1
<i>Sinorhizobium fredii</i>	SMH12	GCF_024400375.1
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	1021	GCF_000006965.1 / GCA_000006965.1
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	2011	GCF_000346065.1 / GCA_000346065.1
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	ABS7	GCA_024205805.1
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	AK21	GCF_009664245.1 / GCA_009664245.1
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	Ak57	GCA_021391635.1
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	AK76	GCF_016406285.1 / GCA_016406285.1
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	AK83	GCF_000147795.2 / GCA_000147795.2
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	B399	GCF_002302375.1 / GCA_002302375.1
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	B401	GCF_002302355.1 / GCA_002302355.1
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	BL225C	GCF_000147775.2
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	GR4	GCF_000320385.2 / GCA_000320385.2
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	HM006	GCF_002197165.1 / GCA_002197165.1
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	KH35c	GCF_002197105.1 / GCA_002197105.1
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	KH46	GCF_002197465.1 / GCA_002197465.1
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	L6-AK89	GCF_020684825.1 / GCA_020684825.1
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	M162	GCF_002197125.1 / GCA_002197125.1
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	M270	GCF_002197085.1

Género y especie	Cepa	Número de acceso de Asembly DB
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	RCAM1115	GCA_014189595.1
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	RCAM1750	GCA_014189615.1
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	Rm41	GCF_000304415.1 / GCA_000304415.1
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	RMO17	GCF_000747295.1 / GCA_000747295.1
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	RRI128	GCF_021052665.1
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	RU11_001	GCF_001050915.2 / GCA_001050915.2
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	S35m	GCF_015689095.1
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	SM11	GCF_000218265.1 / GCA_000218265.1
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	T073	GCF_002197145.1 / GCA_002197145.1
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	USDA1021	GCF_002197445.1 / GCA_002197445.1
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	USDA1106	GCF_002197065.1 / GCA_002197065.1
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	USDA1157	GCF_002197025.1 / GCA_002197025.1

A2. Información obtenida de bases de datos públicas

Tabla suplementaria 4.2.1.1. Resultados de transcriptomas y ensayos de fitness en distintas condiciones de estudio para los genes seleccionados.

gene-ID	SMc 03883	SMc 00810	SMc 04340	SM_b 20757	SMA 1465	SM_b 20723	SMc 00781	SMc 03044	SMc 02702	SMA 2077
D-Glucose (C)	0,017		-0,524	0,026	-0,025		-0,124	-0,026	0,009	0,137
D-Fructose (C)	-0,117		-0,455	-0,022	-0,170		0,076	0,019	0,031	-0,038
Sucrose (C)	-0,174		-0,243	0,214	0,297		0,255	0,173	-0,093	0,075
L-Arabinose (C)	-0,236		-0,330	0,313	-0,081		-0,021	-0,316	0,006	-0,107
D-Arabinose (C)	-0,254		-0,417	0,253	0,161		0,182	-0,012	-0,060	-0,158
D-Maltose (C)	-0,181		-0,322	0,175	-0,108		-0,258	0,109	-0,033	-0,068
D-Xylose (C)	0,059		-0,486	0,155	0,135		-0,250	-0,037	-0,101	-0,060
D-Galactose (C)	-0,234		-0,255	0,167	-0,010		0,143	0,199	0,135	0,039
D-Raffinose (C)	-0,200		-0,348	-0,173	-0,117		0,210	0,157	0,038	0,043
L-Rhamnose (C)	-0,152		-0,288	0,235	-0,357		-0,184	0,063	-0,184	-0,099
D-Ribose (C)	0,189		-0,510	-0,080	0,120		-0,279	0,090	-0,088	-0,046
L-Fucose (C)	-0,129		-0,775	0,437	0,070		0,042	0,130	-0,018	0,024
D-Cellobiose (C)	0,009		-0,110	0,194	0,159		-0,277	0,020	-0,091	0,058
L-Lactate (C)	0,036		-0,137	0,349	0,246		-0,016	0,354	-0,052	-0,225
D,L-Lactate (C)	0,034		-0,234	0,047	0,123		-0,046	0,025	-0,208	-0,026
pyruvate (C)	0,027		-0,162	0,019	0,050		0,292	0,033	0,149	-0,123
succinate (C)	-0,440		-0,049	0,092	0,331		0,210	0,034	0,019	0,068
D-Mannitol (C)	-0,307		-0,045	0,203	-0,281		-0,686	-0,110	-0,039	-0,151
m-Inositol (C)	-0,072		-0,162	0,243	0,061		-4,598	-0,015	0,078	-0,224
Glycerol (C)	-0,063		-0,107	0,150	0,038		0,233	0,014	-0,134	-0,095
D-Sorbitol (C)	0,121		-0,102	0,201	-0,186		0,224	0,041	-0,156	-0,035
L-Malic (C)	-0,473		-0,079	0,171	0,148		0,257	-0,124	-0,197	-0,062
D-Trehalose (C)	-0,143		-0,010	0,198	-0,018		-0,177	-0,054	-0,141	0,016
L-Histidine (C)	0,022		-0,085	-0,240	-0,316		-0,685	0,082	-0,065	0,078
L-Lysine (C)	0,031		-0,053	-0,105	-0,329		0,271	0,244	-0,093	-0,042
L-Glutamine (C)	-0,091		-0,025	-0,503	-0,132		-0,615	-0,161	-0,211	0,125
L-Proline (C)	-0,295		-0,050	-0,058	-0,132		-0,103	-0,072	0,040	0,076
L-Leucine (C)	-0,139		0,038	-4,665	-0,272		-0,424	0,182	-0,662	-0,178
NAG (C)	-0,040		-0,088	0,118	-0,032		-0,182	0,013	-0,233	-0,123
D-Glucosamine Hydrochloride (C)	-0,114		-0,149	-0,272	-0,110		-0,318	-0,083	-0,109	-0,089
Uridine (C)	0,066		-0,208	0,113	-0,257		-2,413	-0,147	-0,101	-0,008
D-Salicin (C)	-0,096		-0,074	0,338	-0,257		-0,624	0,200	-0,142	-0,099
Beta-Lactose (C)	-0,177		0,023	-0,428	-0,242		-0,374	-0,159	0,019	-0,006
D-Mannose (C)	-0,154		-0,113	0,049	0,267		-0,595	0,175	-0,078	0,006
D-Tagatose (C)	-0,193		-0,480	-0,095	0,035		0,050	0,220	-0,059	-0,061
LB	0,843		-0,393	0,801	0,035		0,318	0,040	-0,008	0,608
LB_2	0,011		-0,469	0,981	0,246		0,509	-0,093	-0,143	0,090

gene-ID	SMc 03883	SMc 00810	SMc 04340	SM_b 20757	SMA 1465	SM_b 20723	SMc 00781	SMc 03044	SMc 02702	SMA 2077
LB_3	-0,063		-0,866	1,140	-0,335		0,661	0,046	-0,169	0,405
LB, pH6	-0,671		0,038	0,378	0,188		-0,108	0,066	-0,359	-0,045
LB, pH6_2	-0,066		0,212	0,584	0,372		0,051	-0,184	-0,452	0,214
LB, pH7	-0,133		-0,041	0,091	0,155		0,347	0,148	-0,249	0,191
LB, pH7_2	-0,129		-0,062	0,087	0,147		-0,182	0,061	-0,174	0,030
LB, pH8	-0,265		-1,494	0,514	-0,351		0,763	-0,025	-0,386	0,242
LB, pH8_2	-0,270		-1,470	0,664	-0,599		0,694	0,118	-0,360	0,206
LB, 23C	-0,373		0,007	0,176	-0,186		0,173	-0,045	-0,192	0,049
LB, 23C_2	-0,204		-0,019	0,227	-0,101		0,161	-0,048	-0,222	0,041
LB, 30C	-0,187		-0,264	0,433	-0,356		-0,034	-0,021	-0,077	0,121
LB, 30C_2	-0,165		-0,272	0,260	0,100		0,123	-0,229	-0,286	0,077
L-Arginine (N)	-0,426		-0,267	0,878	-0,309		0,260	-0,153	-0,068	-0,009
L-Histidine (N)	-0,761		-0,225	-0,097	0,313		0,129	0,239	0,181	0,128
L-Serine (N)	0,475		-0,077	-0,244	0,039		0,352	0,486	-0,221	0,008
L-Asparagine (N)	-0,962		-0,397	0,384	0,153		0,316	-0,010	-0,414	-0,229
L-Glutamine (N)	0,111		-0,084	0,134	-0,129		0,235	0,180	-0,078	-0,368
L-Leucine (N)	0,009		-0,118	-0,211	0,576		0,536	0,149	-0,343	0,110
Gly-DL-Asp (N)	0,130		-0,120	0,144	0,120		0,226	0,294	-0,245	0,077
Gelatin (N)	0,035		0,104	0,256	0,009		0,277	-0,040	-0,042	0,123
NAG (N)	0,476		-0,104	0,292	0,324		0,520	0,428	-0,248	-0,197
D-Glucosamine Hydrochloride (N)	-0,081		-0,154	0,042	0,257		0,352	0,148	-0,287	-0,085
Uridine (N)	0,287		-0,059	0,312	0,261		-2,929	0,324	-0,018	0,087
Cytosine (N)	0,386		0,848	-0,233	0,102		-0,141	0,220	-0,174	0,000
nitrate (N)	1,363		0,026	-0,029	0,475		0,296	0,550	-0,176	0,364
copper (II) chloride 1 mM	-0,237		-0,136	0,809	0,129		0,128	0,007	-0,325	0,218
copper (II) chloride 1 mM_2	0,303		0,247	0,267	0,448		-0,034	0,114	-0,511	0,069
Nickel (II) chloride 0,5 mM	-0,212		-0,328	0,741	-0,054		0,127	0,038	-0,179	-0,005
Nickel (II) chloride 1 mM	-0,367		-0,078	0,501	0,242		-0,536	0,074	-0,252	0,092
Cobalt chloride 0,16 mM	-0,239		-0,417	1,195	0,089		0,317	-0,037	-0,232	0,094
sodium fluoride 100 mM	-0,021		-0,023	-0,498	-0,188		-0,007	0,164	-0,002	-0,035
perchlorate 10 mM	-0,210		-0,523	1,010	0,273		0,499	-0,170	-0,308	0,709
Chlorite 0,1 mM	-0,470		0,054	1,287	0,539		0,097	0,043	-0,249	-0,606
Chloride 200 mM	-0,350		-0,451	-0,665	0,198		0,251	-0,212	-0,247	0,002
Fusidic 0,0001 mg/ml	-0,117		-1,226	0,758	-0,042		0,376	-0,079	-0,197	-0,136
A22 0,02 mg/ml	-0,143		-0,031	0,168	0,156		0,284	-0,205	-0,172	0,100
D-Cycloserine 0,05 mg/ml	0,003		-0,546	1,055	-0,199		0,330	0,003	-0,108	0,245

gene-ID	SMc 03883	SMc 00810	SMc 04340	SM_b 20757	SMA 1465	SM_b 20723	SMc 00781	SMc 03044	SMc 02702	SMA 2077
Paraquat dichloride 0,05 mg/ml	0,072		-0,082	0,857	-0,134		0,455	-0,030	0,005	0,095
Paraquat dichloride 0,2 mg/ml	0,339		-0,250	0,579	-0,105		0,565	-0,075	-0,066	0,035
Paraquat dichloride 0,2 mg/ml_2	0,041		-0,267	0,455	-0,365		0,685	-0,678	-0,330	-0,121
Paraquat dichloride 0,3 mg/ml	-0,009		-0,238	0,583	-0,066		0,484	-0,590	-0,272	-0,086
Thallium(I) acetate 0,001 mg/ml	-0,185		-0,268	0,773	0,457		0,441	-0,139	0,060	0,009
Thallium(I) acetate 0,0025 mg/ml	0,129		-0,390	0,909	0,029		0,413	-0,635	-0,081	0,095
Cisplatin 0,0005 mg/ml	-0,048		-0,311	0,654	0,358		0,272	-0,084	-0,581	-0,023
Cisplatin 0,001 mg/ml	0,123		-0,282	0,417	0,732		0,249	-0,403	-0,324	0,116
nitrite 20 mM	-0,025		-0,015	0,646	0,150		0,141	-0,101	-0,032	0,024
nitrate 40 mM	-0,381		-0,318	0,313	0,121		0,546	-0,462	-0,188	-0,081
Sisomicin 0,004 mg/ml	0,079		-0,168	-0,588	-0,456		0,476	-0,208	-0,198	-0,202
Polymyxin B sulfate 0,00005 mg/ml	-0,101		-0,394	0,676	0,684		0,319	0,528	-0,456	-0,132
Aluminum chloride	-0,340		-0,273	-0,180	0,178		0,173	0,141	-0,104	0,303
M VMM vs:TY	0,217	0,172	-0,177		0,181	0,257	-0,904	-0,512	-0,125	0,171
M 1021 wt 100 vs. 2000µM phosphate	-0,267	-0,949	0,167		0,063	0,714	0,685	-1,549	0,059	-0,190
M 1021(wt) vs. RmH406(phoB)100µM phosphate	-0,327	0,073	-0,019		-1,269	-0,412	-0,160	0,254	0,458	-0,543
M TY OD 0.6	-0,199	0,316	-0,183		0,311	0,791	-0,016	0,082	-0,002	0,247
M TY OD 0.8	-0,350	-0,486	-0,143		0,310	0,889	-0,077	0,064	-0,010	0,214
M TY OD 1.0	-0,424	-1,194	-0,263		0,172	-0,276	0,045	0,017	-0,006	0,459
M TY OD 1.5	-0,401	-0,253	-0,189		0,115	0,484	0,048	0,027	-0,034	0,191
M TY OD 2.0	-0,413	-0,057	-0,112		0,498	0,587	0,250	0,484	-0,137	0,024
M TY OD 0.3	-0,271	-0,285	-0,114		0,119	0,051	0,204	0,212	0,019	0,157
M TY OD >3.0	-0,398	0,351	-0,131		0,213	0,575	-0,294	-0,454	-0,226	0,269
M NaCl 0,3M t015	-0,333	0,750	0,052		1,483	-0,491	0,187	-1,423	-0,107	0,872
M NaCl 0,3M t030	-0,513	1,094	-0,035		2,731	0,503	0,398	-1,435	-0,220	1,140
M NaCl 0,3M t060	-0,589	1,492	-0,158		3,182		0,559	-0,416	-0,017	0,726
M NaCl 0,4M tolerance	0,096	0,783	-0,162		0,600	-0,139	0,379	-1,845	0,188	-0,091
M NaCl 0,4M t0	-0,098	0,114	0,338		-0,702		0,193	0,479	0,041	-0,301
M NaCl 0,4M t015	-0,185	0,832	0,586		-0,054		-0,021	0,618	0,107	0,005
M NaCl 0,4M t030	-0,044	0,703	0,351		0,242		0,636	-0,396	0,365	0,266
M NaCl 0,4M t060	-0,033	0,237	-0,197		0,803		0,395	-2,226	0,208	0,523
M Sucrose 0,5M t015	0,004	0,573	-0,142		0,594		0,631	-0,557	0,427	0,470
M Sucrose 0,5M t030	-0,220	0,592	-0,046		0,336	-0,513	0,341	-3,834	0,220	0,614
M Sucrose 0,5M t060	0,098	0,345	-0,444		0,390		-0,316	-6,396	0,257	0,649
M Sucrose 0,5M t240	-0,140	-0,181	-0,932		0,560	-0,464	0,416	0,793	0,055	1,058

gene-ID	SMc 03883	SMc 00810	SMc 04340	SM_b 20757	SMA 1465	SM_b 20723	SMc 00781	SMc 03044	SMc 02702	SMA 2077
M Sucrose 0,7M t015	-0,722	0,653	-0,813		0,682	-0,459	0,482	-0,459	0,006	0,788
M Sucrose 0,7M t030	-0,190	2,315	-0,188		2,112	-0,699	0,192	-0,967	-0,380	0,973
M Sucrose 0,7M t060	-0,950	1,164	-0,421		1,603		0,357	0,365	-0,094	0,623
M Sucrose 0,7M t240	0,283	0,765	-0,520		1,741	-0,108	0,258	-1,462	0,207	1,419
M pH: 5,75 t3	-0,307	0,127	-1,074		0,095		0,236	0,246	0,287	-0,547
M pH: 5,75 t8	-0,536	-0,090	-0,668		-0,137	0,223	0,910	-0,176	0,299	-0,564
M pH: 5,75 t13	-0,719	-0,131	-0,821		0,046		0,190	-0,051	0,124	-0,542
M pH: 5,75 t18	-0,658	-0,271	-0,681		0,040		0,223	-0,157	0,173	-0,374
M pH: 5,75 t33	-0,343	-0,115	-0,903		0,048	-0,619	0,168	-0,305	0,254	-0,382
M : : pH: 5,75 t63	-0,382	-0,157	-1,390		-0,189		0,044	-1,010	0,383	-0,568
M pH: 6 tcontinuous	0,073	-1,424	-0,661		-1,015	-0,772	0,536	-0,926	0,526	0,137
M VMM FeCl3 0 37 vs. 37 µM	0,052	-0,107	-0,869		0,044	-0,239	0,385	-2,968	0,131	-0,184
M TY Dip 200 vs. 0 µM	0,013	-0,168	-0,102		-0,250	-0,078	1,005	-2,997	0,101	-0,393
M VMM T0 (t=0hs)	-0,160	-0,184	0,005		0,061	-0,031	-0,828	-0,473	0,196	0,080
M VMM T2 (t=3hs)	0,013	-0,116	-0,089		0,286	0,060	-0,106	-0,227	0,014	0,477
M VMM T6 (t=24hs)	0,222	-1,040	1,083		1,363	0,390	-1,011	-1,457	-1,426	1,813
M VMM T4 (t=6hs)	-0,121	-1,397	0,378		0,614	1,590	1,850	-1,407	0,129	1,283
M Medicago sativa Sitel IT	-0,526	-0,089	1,764		1,891	0,166	0,545	1,496	-0,171	0,131
M Medicago truncatula IT	-0,679	-0,043	2,332		1,320	0,386	0,785	0,723	-0,378	0,438
M Medicago sativa Europe IT	-0,708	-0,450	2,390		2,187	0,472	0,734	1,512	-0,151	0,223
M 5 dpi M sativa Europe	-0,224	-0,042	1,780		3,140	0,486	0,401	2,268	-0,254	0,157
M 8 dpi M sativa Europe	-0,121	-0,543	1,853		1,619	2,192	0,826	1,080	0,038	1,069
14-18 dpi M sativa europe	-0,426	-1,018	2,021		1,021	1,381	0,298	0,740	-0,188	0,320

* En celeste datos extraídos de Fitness Browser (M value, experimentos Rb-TnSeq). En verde, datos extraídos de EMMA2 (Transcriptómica).

* IT: Infection thread (hilos de infección) *S. meliloti* BacA-

A3. Curvas de crecimiento de los mutantes seleccionados para ensayo de validación del fenotipo en turba

Tabla suplementaria 4.1.3.1. Curvas de crecimiento de los mutantes a tiempo inicial y a tiempo final del ensayo de validación del fenotipo en turba.

Cepa	Réplica	Condición	Tiempo (horas)										
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Blanco		Inicial	0,379	0,368	0,36	0,363	0,366	0,361	0,362	0,365	0,364	0,365	0,356
2011	1	Inicial	0,32	0,346	0,339	0,349	0,354	0,362	0,378	0,393	0,418	0,448	0,486
2011	2	Inicial	0,32	0,346	0,339	0,349	0,354	0,362	0,378	0,393	0,418	0,448	0,486
2011	3	Inicial	0,32	0,346	0,339	0,349	0,354	0,362	0,378	0,393	0,418	0,448	0,486
2011	1	Inicial	0,332	0,366	0,377	0,391	0,396	0,411	0,426	0,442	0,468	0,502	0,543
2011	2	Inicial	0,332	0,366	0,377	0,391	0,396	0,411	0,426	0,442	0,468	0,502	0,543
2011	3	Inicial	0,332	0,366	0,377	0,391	0,396	0,411	0,426	0,442	0,468	0,502	0,543
2011	1	Inicial	0,334	0,364	0,375	0,385	0,386	0,398	0,407	0,428	0,449	0,477	0,529
2011	2	Inicial	0,334	0,364	0,375	0,385	0,386	0,398	0,407	0,428	0,449	0,477	0,529
2011	3	Inicial	0,334	0,364	0,375	0,385	0,386	0,398	0,407	0,428	0,449	0,477	0,529
SM b20562	1	Inicial	0,324	0,352	0,347	0,351	0,352	0,364	0,38	0,402	0,427	0,462	0,52
SM b20562	2	Inicial	0,324	0,352	0,347	0,351	0,352	0,364	0,38	0,402	0,427	0,462	0,52
SM b20562	3	Inicial	0,324	0,352	0,347	0,351	0,352	0,364	0,38	0,402	0,427	0,462	0,52
SM b20562	1	Inicial	0,337	0,387	0,407	0,41	0,424	0,43	0,443	0,463	0,488	0,521	0,573
SM b20562	2	Inicial	0,337	0,387	0,407	0,41	0,424	0,43	0,443	0,463	0,488	0,521	0,573
SM b20562	3	Inicial	0,337	0,387	0,407	0,41	0,424	0,43	0,443	0,463	0,488	0,521	0,573
SM b20562	1	Inicial	0,32	0,354	0,354	0,358	0,362	0,371	0,38	0,405	0,431	0,467	0,519
SM b20562	2	Inicial	0,32	0,354	0,354	0,358	0,362	0,371	0,38	0,405	0,431	0,467	0,519
SM b20562	3	Inicial	0,32	0,354	0,354	0,358	0,362	0,371	0,38	0,405	0,431	0,467	0,519
SM a1229	1	Inicial	0,343	0,363	0,361	0,362	0,368	0,373	0,387	0,399	0,421	0,448	0,489
SM a1229	2	Inicial	0,343	0,363	0,361	0,362	0,368	0,373	0,387	0,399	0,421	0,448	0,489
SM a1229	3	Inicial	0,343	0,363	0,361	0,362	0,368	0,373	0,387	0,399	0,421	0,448	0,489
SM a1229	1	Inicial	0,343	0,379	0,381	0,386	0,39	0,403	0,417	0,43	0,448	0,477	0,519
SM a1229	2	Inicial	0,343	0,379	0,381	0,386	0,39	0,403	0,417	0,43	0,448	0,477	0,519
SM a1229	3	Inicial	0,343	0,379	0,381	0,386	0,39	0,403	0,417	0,43	0,448	0,477	0,519
SM a1229	1	Inicial	0,323	0,365	0,353	0,363	0,363	0,374	0,386	0,4	0,422	0,449	0,492
SM a1229	2	Inicial	0,323	0,365	0,353	0,363	0,363	0,374	0,386	0,4	0,422	0,449	0,492
SM a1229	3	Inicial	0,323	0,365	0,353	0,363	0,363	0,374	0,386	0,4	0,422	0,449	0,492
SMc01977	1	Inicial	0,322	0,355	0,351	0,354	0,36	0,369	0,385	0,401	0,425	0,451	0,498
SMc01977	2	Inicial	0,322	0,355	0,351	0,354	0,36	0,369	0,385	0,401	0,425	0,451	0,498
SMc01977	3	Inicial	0,322	0,355	0,351	0,354	0,36	0,369	0,385	0,401	0,425	0,451	0,498
SMc01977	1	Inicial	0,354	0,388	0,382	0,383	0,384	0,407	0,422	0,439	0,452	0,486	0,532
SMc01977	2	Inicial	0,354	0,388	0,382	0,383	0,384	0,407	0,422	0,439	0,452	0,486	0,532
SMc01977	3	Inicial	0,354	0,388	0,382	0,383	0,384	0,407	0,422	0,439	0,452	0,486	0,532
SMc01977	1	Inicial	0,344	0,366	0,371	0,379	0,375	0,393	0,408	0,423	0,438	0,474	0,517
SMc01977	2	Inicial	0,344	0,366	0,371	0,379	0,375	0,393	0,408	0,423	0,438	0,474	0,517
SMc01977	3	Inicial	0,344	0,366	0,371	0,379	0,375	0,393	0,408	0,423	0,438	0,474	0,517
SMc04028	1	Inicial	0,329	0,355	0,345	0,354	0,348	0,362	0,37	0,381	0,391	0,412	0,443
SMc04028	2	Inicial	0,329	0,355	0,345	0,354	0,348	0,362	0,37	0,381	0,391	0,412	0,443
SMc04028	3	Inicial	0,329	0,355	0,345	0,354	0,348	0,362	0,37	0,381	0,391	0,412	0,443
SMc04028	1	Inicial	0,342	0,377	0,383	0,386	0,389	0,396	0,412	0,414	0,425	0,448	0,473
SMc04028	2	Inicial	0,342	0,377	0,383	0,386	0,389	0,396	0,412	0,414	0,425	0,448	0,473
SMc04028	3	Inicial	0,342	0,377	0,383	0,386	0,389	0,396	0,412	0,414	0,425	0,448	0,473
SMc04028	1	Inicial	0,333	0,378	0,374	0,369	0,368	0,383	0,394	0,403	0,417	0,433	0,454
SMc04028	2	Inicial	0,333	0,378	0,374	0,369	0,368	0,383	0,394	0,403	0,417	0,433	0,454
SMc04028	3	Inicial	0,333	0,378	0,374	0,369	0,368	0,383	0,394	0,403	0,417	0,433	0,454
SMc04026	1	Inicial	0,337	0,36	0,352	0,357	0,356	0,368	0,382	0,394	0,413	0,433	0,469
SMc04026	2	Inicial	0,337	0,36	0,352	0,357	0,356	0,368	0,382	0,394	0,413	0,433	0,469
SMc04026	3	Inicial	0,337	0,36	0,352	0,357	0,356	0,368	0,382	0,394	0,413	0,433	0,469
SMc04026	1	Inicial	0,339	0,378	0,376	0,375	0,377	0,394	0,401	0,415	0,429	0,446	0,481
SMc04026	2	Inicial	0,339	0,378	0,376	0,375	0,377	0,394	0,401	0,415	0,429	0,446	0,481
SMc04026	3	Inicial	0,339	0,378	0,376	0,375	0,377	0,394	0,401	0,415	0,429	0,446	0,481
SMc04026	1	Inicial	0,338	0,363	0,358	0,368	0,377	0,38	0,395	0,403	0,42	0,442	0,47
SMc04026	2	Inicial	0,338	0,363	0,358	0,368	0,377	0,38	0,395	0,403	0,42	0,442	0,47

SMc04026	3	Inicial	0,338	0,363	0,358	0,368	0,377	0,38	0,395	0,403	0,42	0,442	0,47
SM b20757	1	Inicial	0,327	0,363	0,378	0,379	0,38	0,382	0,396	0,403	0,419	0,441	0,484
SM b20757	2	Inicial	0,327	0,363	0,378	0,379	0,38	0,382	0,396	0,403	0,419	0,441	0,484
SM b20757	3	Inicial	0,327	0,363	0,378	0,379	0,38	0,382	0,396	0,403	0,419	0,441	0,484
SM b20757	1	Inicial	0,324	0,366	0,366	0,372	0,373	0,386	0,392	0,407	0,425	0,45	0,487
SM b20757	2	Inicial	0,324	0,366	0,366	0,372	0,373	0,386	0,392	0,407	0,425	0,45	0,487
SM b20757	3	Inicial	0,324	0,366	0,366	0,372	0,373	0,386	0,392	0,407	0,425	0,45	0,487
SM b20757	1	Inicial	0,324	0,366	0,359	0,356	0,366	0,377	0,38	0,404	0,413	0,43	0,463
SM b20757	2	Inicial	0,324	0,366	0,359	0,356	0,366	0,377	0,38	0,404	0,413	0,43	0,463
SM b20757	3	Inicial	0,324	0,366	0,359	0,356	0,366	0,377	0,38	0,404	0,413	0,43	0,463
SMc03979	1	Inicial	0,319	0,354	0,359	0,358	0,363	0,38	0,386	0,412	0,432	0,458	0,5
SMc03979	2	Inicial	0,319	0,354	0,359	0,358	0,363	0,38	0,386	0,412	0,432	0,458	0,5
SMc03979	3	Inicial	0,319	0,354	0,359	0,358	0,363	0,38	0,386	0,412	0,432	0,458	0,5
SMc03979	1	Inicial	0,314	0,362	0,362	0,376	0,373	0,385	0,397	0,421	0,442	0,475	0,516
SMc03979	2	Inicial	0,314	0,362	0,362	0,376	0,373	0,385	0,397	0,421	0,442	0,475	0,516
SMc03979	3	Inicial	0,314	0,362	0,362	0,376	0,373	0,385	0,397	0,421	0,442	0,475	0,516
SMc03979	1	Inicial	0,329	0,379	0,375	0,381	0,379	0,4	0,419	0,436	0,454	0,488	0,535
SMc03979	2	Inicial	0,329	0,379	0,375	0,381	0,379	0,4	0,419	0,436	0,454	0,488	0,535
SMc03979	3	Inicial	0,329	0,379	0,375	0,381	0,379	0,4	0,419	0,436	0,454	0,488	0,535
SMc00963	1	Inicial	0,319	0,355	0,359	0,358	0,37	0,37	0,38	0,4	0,413	0,437	0,48
SMc00963	2	Inicial	0,319	0,355	0,359	0,358	0,37	0,37	0,38	0,4	0,413	0,437	0,48
SMc00963	3	Inicial	0,319	0,355	0,359	0,358	0,37	0,37	0,38	0,4	0,413	0,437	0,48
SMc00963	1	Inicial	0,328	0,368	0,367	0,372	0,376	0,386	0,403	0,415	0,43	0,459	0,497
SMc00963	2	Inicial	0,328	0,368	0,367	0,372	0,376	0,386	0,403	0,415	0,43	0,459	0,497
SMc00963	3	Inicial	0,328	0,368	0,367	0,372	0,376	0,386	0,403	0,415	0,43	0,459	0,497
SMc00963	1	Inicial	0,323	0,374	0,368	0,375	0,379	0,392	0,412	0,419	0,443	0,465	0,507
SMc00963	2	Inicial	0,323	0,374	0,368	0,375	0,379	0,392	0,412	0,419	0,443	0,465	0,507
SMc00963	3	Inicial	0,323	0,374	0,368	0,375	0,379	0,392	0,412	0,419	0,443	0,465	0,507
SMc01620	1	Inicial	0,317	0,355	0,356	0,362	0,375	0,375	0,4	0,414	0,445	0,477	0,538
SMc01620	2	Inicial	0,317	0,355	0,356	0,362	0,375	0,375	0,4	0,414	0,445	0,477	0,538
SMc01620	3	Inicial	0,317	0,355	0,356	0,362	0,375	0,375	0,4	0,414	0,445	0,477	0,538
SMc01620	1	Inicial	0,331	0,363	0,362	0,371	0,378	0,38	0,406	0,434	0,457	0,495	0,548
SMc01620	2	Inicial	0,331	0,363	0,362	0,371	0,378	0,38	0,406	0,434	0,457	0,495	0,548
SMc01620	3	Inicial	0,331	0,363	0,362	0,371	0,378	0,38	0,406	0,434	0,457	0,495	0,548
SMc01620	1	Inicial	0,324	0,375	0,37	0,37	0,376	0,389	0,411	0,439	0,459	0,5	0,561
SMc01620	2	Inicial	0,324	0,375	0,37	0,37	0,376	0,389	0,411	0,439	0,459	0,5	0,561
SMc01620	3	Inicial	0,324	0,375	0,37	0,37	0,376	0,389	0,411	0,439	0,459	0,5	0,561
SMc02311	1	Inicial	0,33	0,358	0,348	0,357	0,357	0,368	0,39	0,393	0,41	0,435	0,471
SMc02311	2	Inicial	0,33	0,358	0,348	0,357	0,357	0,368	0,39	0,393	0,41	0,435	0,471
SMc02311	3	Inicial	0,33	0,358	0,348	0,357	0,357	0,368	0,39	0,393	0,41	0,435	0,471
SMc02311	1	Inicial	0,31	0,362	0,356	0,361	0,362	0,37	0,391	0,397	0,417	0,441	0,477
SMc02311	2	Inicial	0,31	0,362	0,356	0,361	0,362	0,37	0,391	0,397	0,417	0,441	0,477
SMc02311	3	Inicial	0,31	0,362	0,356	0,361	0,362	0,37	0,391	0,397	0,417	0,441	0,477
SMc02311	1	Inicial	0,321	0,367	0,367	0,362	0,371	0,371	0,389	0,407	0,412	0,445	0,479
SMc02311	2	Inicial	0,321	0,367	0,367	0,362	0,371	0,371	0,389	0,407	0,412	0,445	0,479
SMc02311	3	Inicial	0,321	0,367	0,367	0,362	0,371	0,371	0,389	0,407	0,412	0,445	0,479
SMc01120	1	Inicial	0,33	0,362	0,375	0,368	0,372	0,389	0,41	0,427	0,453	0,483	0,531
SMc01120	2	Inicial	0,33	0,362	0,375	0,368	0,372	0,389	0,41	0,427	0,453	0,483	0,531
SMc01120	3	Inicial	0,33	0,362	0,375	0,368	0,372	0,389	0,41	0,427	0,453	0,483	0,531
SMc01120	1	Inicial	0,329	0,368	0,369	0,374	0,383	0,393	0,407	0,436	0,455	0,494	0,543
SMc01120	2	Inicial	0,329	0,368	0,369	0,374	0,383	0,393	0,407	0,436	0,455	0,494	0,543
SMc01120	3	Inicial	0,329	0,368	0,369	0,374	0,383	0,393	0,407	0,436	0,455	0,494	0,543
SMc01120	1	Inicial	0,327	0,365	0,362	0,367	0,377	0,393	0,408	0,424	0,45	0,48	0,532
SMc01120	2	Inicial	0,327	0,365	0,362	0,367	0,377	0,393	0,408	0,424	0,45	0,48	0,532
SMc01120	3	Inicial	0,327	0,365	0,362	0,367	0,377	0,393	0,408	0,424	0,45	0,48	0,532
Blanco		Final	0,371	0,392	0,387	0,387	0,379	0,379	0,379	0,384	0,38	0,381	0,385
2011	1	Final	0,399	0,396	0,383	0,385	0,387	0,388	0,387	0,39	0,386	0,389	0,392
2011	2	Final	0,399	0,396	0,383	0,385	0,387	0,388	0,387	0,39	0,386	0,389	0,392
2011	3	Final	0,399	0,396	0,383	0,385	0,387	0,388	0,387	0,39	0,386	0,389	0,392
2011	1	Final	0,383	0,379	0,376	0,384	0,385	0,39	0,378	0,385	0,379	0,388	0,392
2011	2	Final	0,383	0,379	0,376	0,384	0,385	0,39	0,378	0,385	0,379	0,388	0,392
2011	3	Final	0,383	0,379	0,376	0,384	0,385	0,39	0,378	0,385	0,379	0,388	0,392
2011	1	Final	0,366	0,385	0,39	0,389	0,389	0,394	0,39	0,396	0,389	0,398	0,394

2011	2	Final	0,366	0,385	0,39	0,389	0,389	0,394	0,39	0,396	0,389	0,398	0,394
2011	3	Final	0,366	0,385	0,39	0,389	0,389	0,394	0,39	0,396	0,389	0,398	0,394
SM_b20562	1	Final	0,361	0,367	0,381	0,37	0,375	0,377	0,366	0,376	0,368	0,368	0,376
SM_b20562	2	Final	0,361	0,367	0,381	0,37	0,375	0,377	0,366	0,376	0,368	0,368	0,376
SM_b20562	3	Final	0,361	0,367	0,381	0,37	0,375	0,377	0,366	0,376	0,368	0,368	0,376
SM_b20562	1	Final	0,356	0,37	0,366	0,368	0,376	0,373	0,363	0,368	0,362	0,365	0,371
SM_b20562	2	Final	0,356	0,37	0,366	0,368	0,376	0,373	0,363	0,368	0,362	0,365	0,371
SM_b20562	3	Final	0,356	0,37	0,366	0,368	0,376	0,373	0,363	0,368	0,362	0,365	0,371
SM_b20562	1	Final	0,363	0,368	0,366	0,363	0,367	0,37	0,375	0,37	0,37	0,378	0,371
SM_b20562	2	Final	0,363	0,368	0,366	0,363	0,367	0,37	0,375	0,37	0,37	0,378	0,371
SM_b20562	3	Final	0,363	0,368	0,366	0,363	0,367	0,37	0,375	0,37	0,37	0,378	0,371
SM_a1229	1	Final	0,368	0,371	0,366	0,362	0,37	0,376	0,372	0,373	0,364	0,368	0,373
SM_a1229	2	Final	0,368	0,371	0,366	0,362	0,37	0,376	0,372	0,373	0,364	0,368	0,373
SM_a1229	3	Final	0,368	0,371	0,366	0,362	0,37	0,376	0,372	0,373	0,364	0,368	0,373
SM_a1229	1	Final	0,364	0,376	0,369	0,369	0,37	0,37	0,364	0,371	0,365	0,37	0,371
SM_a1229	2	Final	0,364	0,376	0,369	0,369	0,37	0,37	0,364	0,371	0,365	0,37	0,371
SM_a1229	3	Final	0,364	0,376	0,369	0,369	0,37	0,37	0,364	0,371	0,365	0,37	0,371
SM_a1229	1	Final	0,445	0,431	0,426	0,417	0,423	0,416	0,403	0,413	0,409	0,415	0,412
SM_a1229	2	Final	0,445	0,431	0,426	0,417	0,423	0,416	0,403	0,413	0,409	0,415	0,412
SM_a1229	3	Final	0,445	0,431	0,426	0,417	0,423	0,416	0,403	0,413	0,409	0,415	0,412
SMc01977	1	Final	0,407	0,377	0,377	0,371	0,376	0,387	0,38	0,374	0,371	0,376	0,384
SMc01977	2	Final	0,407	0,377	0,377	0,371	0,376	0,387	0,38	0,374	0,371	0,376	0,384
SMc01977	3	Final	0,407	0,377	0,377	0,371	0,376	0,387	0,38	0,374	0,371	0,376	0,384
SMc01977	1	Final	0,365	0,386	0,379	0,389	0,381	0,383	0,384	0,38	0,374	0,38	0,379
SMc01977	2	Final	0,365	0,386	0,379	0,389	0,381	0,383	0,384	0,38	0,374	0,38	0,379
SMc01977	3	Final	0,365	0,386	0,379	0,389	0,381	0,383	0,384	0,38	0,374	0,38	0,379
SMc01977	1	Final	0,37	0,384	0,383	0,384	0,391	0,389	0,385	0,385	0,381	0,388	0,388
SMc01977	2	Final	0,37	0,384	0,383	0,384	0,391	0,389	0,385	0,385	0,381	0,388	0,388
SMc01977	3	Final	0,37	0,384	0,383	0,384	0,391	0,389	0,385	0,385	0,381	0,388	0,388
SMc04028	1	Final	0,392	0,376	0,381	0,379	0,389	0,384	0,377	0,381	0,377	0,376	0,386
SMc04028	2	Final	0,392	0,376	0,381	0,379	0,389	0,384	0,377	0,381	0,377	0,376	0,386
SMc04028	3	Final	0,392	0,376	0,381	0,379	0,389	0,384	0,377	0,381	0,377	0,376	0,386
SMc04028	1	Final	0,382	0,387	0,384	0,383	0,386	0,386	0,379	0,383	0,381	0,385	0,383
SMc04028	2	Final	0,382	0,387	0,384	0,383	0,386	0,386	0,379	0,383	0,381	0,385	0,383
SMc04028	3	Final	0,382	0,387	0,384	0,383	0,386	0,386	0,379	0,383	0,381	0,385	0,383
SMc04028	1	Final	0,373	0,403	0,397	0,399	0,398	0,404	0,391	0,396	0,394	0,394	0,4
SMc04028	2	Final	0,373	0,403	0,397	0,399	0,398	0,404	0,391	0,396	0,394	0,394	0,4
SMc04028	3	Final	0,373	0,403	0,397	0,399	0,398	0,404	0,391	0,396	0,394	0,394	0,4
SMc04026	1	Final	0,404	0,384	0,385	0,37	0,383	0,38	0,377	0,381	0,378	0,377	0,386
SMc04026	2	Final	0,404	0,384	0,385	0,37	0,383	0,38	0,377	0,381	0,378	0,377	0,386
SMc04026	3	Final	0,404	0,384	0,385	0,37	0,383	0,38	0,377	0,381	0,378	0,377	0,386
SMc04026	1	Final	0,374	0,385	0,378	0,374	0,379	0,371	0,372	0,372	0,37	0,377	0,372
SMc04026	2	Final	0,374	0,385	0,378	0,374	0,379	0,371	0,372	0,372	0,37	0,377	0,372
SMc04026	3	Final	0,374	0,385	0,378	0,374	0,379	0,371	0,372	0,372	0,37	0,377	0,372
SMc04026	1	Final	0,364	0,384	0,386	0,385	0,391	0,386	0,385	0,386	0,39	0,387	0,384
SMc04026	2	Final	0,364	0,384	0,386	0,385	0,391	0,386	0,385	0,386	0,39	0,387	0,384
SMc04026	3	Final	0,364	0,384	0,386	0,385	0,391	0,386	0,385	0,386	0,39	0,387	0,384
SM_b20757	1	Final	0,36	0,37	0,379	0,381	0,378	0,375	0,372	0,378	0,373	0,368	0,373
SM_b20757	2	Final	0,36	0,37	0,379	0,381	0,378	0,375	0,372	0,378	0,373	0,368	0,373
SM_b20757	3	Final	0,36	0,37	0,379	0,381	0,378	0,375	0,372	0,378	0,373	0,368	0,373
SM_b20757	1	Final	0,357	0,374	0,366	0,373	0,367	0,367	0,357	0,367	0,361	0,37	0,371
SM_b20757	2	Final	0,357	0,374	0,366	0,373	0,367	0,367	0,357	0,367	0,361	0,37	0,371
SM_b20757	3	Final	0,357	0,374	0,366	0,373	0,367	0,367	0,357	0,367	0,361	0,37	0,371
SM_b20757	1	Final	0,352	0,37	0,364	0,374	0,368	0,367	0,363	0,362	0,366	0,363	0,368
SM_b20757	2	Final	0,352	0,37	0,364	0,374	0,368	0,367	0,363	0,362	0,366	0,363	0,368
SM_b20757	3	Final	0,352	0,37	0,364	0,374	0,368	0,367	0,363	0,362	0,366	0,363	0,368
SMc03979	1	Final	0,347	0,361	0,347	0,347	0,35	0,354	0,355	0,355	0,357	0,352	0,358
SMc03979	2	Final	0,347	0,361	0,347	0,347	0,35	0,354	0,355	0,355	0,357	0,352	0,358
SMc03979	3	Final	0,347	0,361	0,347	0,347	0,35	0,354	0,355	0,355	0,357	0,352	0,358
SMc03979	1	Final	0,353	0,376	0,369	0,372	0,374	0,369	0,381	0,375	0,371	0,367	0,373
SMc03979	2	Final	0,353	0,376	0,369	0,372	0,374	0,369	0,381	0,375	0,371	0,367	0,373
SMc03979	3	Final	0,353	0,376	0,369	0,372	0,374	0,369	0,381	0,375	0,371	0,367	0,373
SMc03979	1	Final	0,344	0,373	0,368	0,364	0,376	0,375	0,369	0,374	0,368	0,369	0,368

SMc03979	2	Final	0,344	0,373	0,368	0,364	0,376	0,375	0,369	0,374	0,368	0,369	0,368
SMc03979	3	Final	0,344	0,373	0,368	0,364	0,376	0,375	0,369	0,374	0,368	0,369	0,368
SMc00963	1	Final	0,347	0,357	0,36	0,348	0,359	0,363	0,361	0,354	0,358	0,365	0,359
SMc00963	2	Final	0,347	0,357	0,36	0,348	0,359	0,363	0,361	0,354	0,358	0,365	0,359
SMc00963	3	Final	0,347	0,357	0,36	0,348	0,359	0,363	0,361	0,354	0,358	0,365	0,359
SMc00963	1	Final	0,347	0,369	0,364	0,361	0,368	0,366	0,36	0,367	0,368	0,366	0,368
SMc00963	2	Final	0,347	0,369	0,364	0,361	0,368	0,366	0,36	0,367	0,368	0,366	0,368
SMc00963	3	Final	0,347	0,369	0,364	0,361	0,368	0,366	0,36	0,367	0,368	0,366	0,368
SMc00963	1	Final	0,346	0,378	0,373	0,363	0,373	0,376	0,366	0,369	0,368	0,371	0,37
SMc00963	2	Final	0,346	0,378	0,373	0,363	0,373	0,376	0,366	0,369	0,368	0,371	0,37
SMc00963	3	Final	0,346	0,378	0,373	0,363	0,373	0,376	0,366	0,369	0,368	0,371	0,37
SMc01620	1	Final	0,361	0,36	0,361	0,359	0,366	0,368	0,361	0,364	0,359	0,365	0,369
SMc01620	2	Final	0,361	0,36	0,361	0,359	0,366	0,368	0,361	0,364	0,359	0,365	0,369
SMc01620	3	Final	0,361	0,36	0,361	0,359	0,366	0,368	0,361	0,364	0,359	0,365	0,369
SMc01620	1	Final	0,358	0,376	0,369	0,374	0,367	0,37	0,363	0,374	0,364	0,371	0,376
SMc01620	2	Final	0,358	0,376	0,369	0,374	0,367	0,37	0,363	0,374	0,364	0,371	0,376
SMc01620	3	Final	0,358	0,376	0,369	0,374	0,367	0,37	0,363	0,374	0,364	0,371	0,376
SMc01620	1	Final	0,344	0,372	0,377	0,373	0,379	0,375	0,377	0,374	0,373	0,379	0,378
SMc01620	2	Final	0,344	0,372	0,377	0,373	0,379	0,375	0,377	0,374	0,373	0,379	0,378
SMc01620	3	Final	0,344	0,372	0,377	0,373	0,379	0,375	0,377	0,374	0,373	0,379	0,378
SMc02311	1	Final	0,353	0,38	0,374	0,376	0,376	0,374	0,367	0,374	0,372	0,374	0,377
SMc02311	2	Final	0,353	0,38	0,374	0,376	0,376	0,374	0,367	0,374	0,372	0,374	0,377
SMc02311	3	Final	0,353	0,38	0,374	0,376	0,376	0,374	0,367	0,374	0,372	0,374	0,377
SMc02311	1	Final	0,356	0,39	0,378	0,391	0,385	0,376	0,378	0,385	0,377	0,375	0,383
SMc02311	2	Final	0,356	0,39	0,378	0,391	0,385	0,376	0,378	0,385	0,377	0,375	0,383
SMc02311	3	Final	0,356	0,39	0,378	0,391	0,385	0,376	0,378	0,385	0,377	0,375	0,383
SMc02311	1	Final	0,337	0,385	0,382	0,372	0,379	0,376	0,377	0,386	0,379	0,395	0,378
SMc02311	2	Final	0,337	0,385	0,382	0,372	0,379	0,376	0,377	0,386	0,379	0,395	0,378
SMc02311	3	Final	0,337	0,385	0,382	0,372	0,379	0,376	0,377	0,386	0,379	0,395	0,378
SMc01120	1	Final	0,349	0,38	0,377	0,394	0,387	0,393	0,385	0,389	0,392	0,389	0,397
SMc01120	2	Final	0,349	0,38	0,377	0,394	0,387	0,393	0,385	0,389	0,392	0,389	0,397
SMc01120	3	Final	0,349	0,38	0,377	0,394	0,387	0,393	0,385	0,389	0,392	0,389	0,397
SMc01120	1	Final	0,363	0,385	0,381	0,392	0,386	0,392	0,377	0,385	0,381	0,39	0,392
SMc01120	2	Final	0,363	0,385	0,381	0,392	0,386	0,392	0,377	0,385	0,381	0,39	0,392
SMc01120	3	Final	0,363	0,385	0,381	0,392	0,386	0,392	0,377	0,385	0,381	0,39	0,392
SMc01120	1	Final	0,358	0,376	0,374	0,381	0,38	0,385	0,381	0,387	0,388	0,379	0,385
SMc01120	2	Final	0,358	0,376	0,374	0,381	0,38	0,385	0,381	0,387	0,388	0,379	0,385
SMc01120	3	Final	0,358	0,376	0,374	0,381	0,38	0,385	0,381	0,387	0,388	0,379	0,385

Tiempo (horas)														
11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
0,354	0,356	0,361	0,356	0,362	0,359	0,356	0,369	0,358	0,36	0,359	0	0	0	0
0,546	0,629	0,737	0,899	1,084	1,311	1,572	1,847	2,141	2,445	2,762	0	0	0	0
0,546	0,629	0,737	0,899	1,084	1,311	1,572	1,847	2,141	2,445	2,762	0	0	0	0
0,546	0,629	0,737	0,899	1,084	1,311	1,572	1,847	2,141	2,445	2,762	0	0	0	0
0,597	0,681	0,787	0,928	1,111	1,346	1,593	1,867	2,163	2,477	2,809	0	0	0	0
0,597	0,681	0,787	0,928	1,111	1,346	1,593	1,867	2,163	2,477	2,809	0	0	0	0
0,597	0,681	0,787	0,928	1,111	1,346	1,593	1,867	2,163	2,477	2,809	0	0	0	0
0,576	0,655	0,752	0,886	1,064	1,289	1,534	1,801	2,107	2,409	2,731	0	0	0	0
0,576	0,655	0,752	0,886	1,064	1,289	1,534	1,801	2,107	2,409	2,731	0	0	0	0
0,576	0,655	0,752	0,886	1,064	1,289	1,534	1,801	2,107	2,409	2,731	0	0	0	0
0,589	0,706	0,858	1,084	1,381	1,707	2,035	2,362	2,704	3,034	3,312	0	0	0	0
0,589	0,706	0,858	1,084	1,381	1,707	2,035	2,362	2,704	3,034	3,312	0	0	0	0
0,589	0,706	0,858	1,084	1,381	1,707	2,035	2,362	2,704	3,034	3,312	0	0	0	0
0,641	0,762	0,911	1,116	1,398	1,73	2,039	2,374	2,704	3,047	3,35	0	0	0	0
0,641	0,762	0,911	1,116	1,398	1,73	2,039	2,374	2,704	3,047	3,35	0	0	0	0
0,641	0,762	0,911	1,116	1,398	1,73	2,039	2,374	2,704	3,047	3,35	0	0	0	0
0,584	0,685	0,829	1,035	1,311	1,626	1,95	2,27	2,602	2,94	3,243	0	0	0	0
0,584	0,685	0,829	1,035	1,311	1,626	1,95	2,27	2,602	2,94	3,243	0	0	0	0
0,584	0,685	0,829	1,035	1,311	1,626	1,95	2,27	2,602	2,94	3,243	0	0	0	0
0,539	0,617	0,709	0,837	1,004	1,226	1,461	1,722	2,009	2,312	2,625	0	0	0	0
0,539	0,617	0,709	0,837	1,004	1,226	1,461	1,722	2,009	2,312	2,625	0	0	0	0
0,539	0,617	0,709	0,837	1,004	1,226	1,461	1,722	2,009	2,312	2,625	0	0	0	0
0,567	0,649	0,728	0,866	1,032	1,243	1,479	1,732	2,026	2,325	2,646	0	0	0	0
0,567	0,649	0,728	0,866	1,032	1,243	1,479	1,732	2,026	2,325	2,646	0	0	0	0
0,567	0,649	0,728	0,866	1,032	1,243	1,479	1,732	2,026	2,325	2,646	0	0	0	0
0,54	0,604	0,699	0,823	0,991	1,197	1,436	1,687	1,953	2,26	2,569	0	0	0	0
0,54	0,604	0,699	0,823	0,991	1,197	1,436	1,687	1,953	2,26	2,569	0	0	0	0
0,54	0,604	0,699	0,823	0,991	1,197	1,436	1,687	1,953	2,26	2,569	0	0	0	0
0,56	0,656	0,798	0,98	1,231	1,53	1,831	2,15	2,479	2,805	3,115	0	0	0	0
0,56	0,656	0,798	0,98	1,231	1,53	1,831	2,15	2,479	2,805	3,115	0	0	0	0
0,56	0,656	0,798	0,98	1,231	1,53	1,831	2,15	2,479	2,805	3,115	0	0	0	0
0,596	0,691	0,817	1,002	1,248	1,535	1,84	2,144	2,466	2,807	3,118	0	0	0	0
0,596	0,691	0,817	1,002	1,248	1,535	1,84	2,144	2,466	2,807	3,118	0	0	0	0
0,596	0,691	0,817	1,002	1,248	1,535	1,84	2,144	2,466	2,807	3,118	0	0	0	0
0,581	0,682	0,803	0,967	1,205	1,504	1,793	2,1	2,423	2,748	3,079	0	0	0	0
0,581	0,682	0,803	0,967	1,205	1,504	1,793	2,1	2,423	2,748	3,079	0	0	0	0
0,581	0,682	0,803	0,967	1,205	1,504	1,793	2,1	2,423	2,748	3,079	0	0	0	0
0,475	0,527	0,596	0,689	0,809	0,969	1,154	1,381	1,631	1,916	2,239	0	0	0	0
0,475	0,527	0,596	0,689	0,809	0,969	1,154	1,381	1,631	1,916	2,239	0	0	0	0
0,475	0,527	0,596	0,689	0,809	0,969	1,154	1,381	1,631	1,916	2,239	0	0	0	0
0,512	0,561	0,621	0,714	0,819	0,971	1,158	1,375	1,611	1,894	2,21	0	0	0	0
0,512	0,561	0,621	0,714	0,819	0,971	1,158	1,375	1,611	1,894	2,21	0	0	0	0
0,512	0,561	0,621	0,714	0,819	0,971	1,158	1,375	1,611	1,894	2,21	0	0	0	0
0,491	0,547	0,606	0,69	0,81	0,948	1,139	1,351	1,585	1,853	2,164	0	0	0	0
0,491	0,547	0,606	0,69	0,81	0,948	1,139	1,351	1,585	1,853	2,164	0	0	0	0
0,491	0,547	0,606	0,69	0,81	0,948	1,139	1,351	1,585	1,853	2,164	0	0	0	0
0,51	0,573	0,65	0,761	0,905	1,09	1,307	1,558	1,828	2,128	2,45	0	0	0	0
0,51	0,573	0,65	0,761	0,905	1,09	1,307	1,558	1,828	2,128	2,45	0	0	0	0
0,51	0,573	0,65	0,761	0,905	1,09	1,307	1,558	1,828	2,128	2,45	0	0	0	0
0,521	0,58	0,655	0,755	0,895	1,061	1,275	1,509	1,763	2,063	2,378	0	0	0	0
0,521	0,58	0,655	0,755	0,895	1,061	1,275	1,509	1,763	2,063	2,378	0	0	0	0
0,521	0,58	0,655	0,755	0,895	1,061	1,275	1,509	1,763	2,063	2,378	0	0	0	0
0,512	0,565	0,642	0,742	0,868	1,048	1,249	1,493	1,746	2,042	2,356	0	0	0	0
0,512	0,565	0,642	0,742	0,868	1,048	1,249	1,493	1,746	2,042	2,356	0	0	0	0

0,512	0,565	0,642	0,742	0,868	1,048	1,249	1,493	1,746	2,042	2,356	0	0	0	0
0,519	0,578	0,646	0,742	0,88	1,056	1,268	1,5	1,751	2,036	2,344	0	0	0	0
0,519	0,578	0,646	0,742	0,88	1,056	1,268	1,5	1,751	2,036	2,344	0	0	0	0
0,519	0,578	0,646	0,742	0,88	1,056	1,268	1,5	1,751	2,036	2,344	0	0	0	0
0,524	0,592	0,657	0,765	0,896	1,083	1,29	1,542	1,793	2,079	2,383	0	0	0	0
0,524	0,592	0,657	0,765	0,896	1,083	1,29	1,542	1,793	2,079	2,383	0	0	0	0
0,524	0,592	0,657	0,765	0,896	1,083	1,29	1,542	1,793	2,079	2,383	0	0	0	0
0,503	0,577	0,645	0,749	0,885	1,066	1,288	1,533	1,782	2,067	2,368	0	0	0	0
0,503	0,577	0,645	0,749	0,885	1,066	1,288	1,533	1,782	2,067	2,368	0	0	0	0
0,503	0,577	0,645	0,749	0,885	1,066	1,288	1,533	1,782	2,067	2,368	0	0	0	0
0,557	0,622	0,706	0,82	0,945	1,101	1,27	1,462	1,604	1,761	1,905	0	0	0	0
0,557	0,622	0,706	0,82	0,945	1,101	1,27	1,462	1,604	1,761	1,905	0	0	0	0
0,557	0,622	0,706	0,82	0,945	1,101	1,27	1,462	1,604	1,761	1,905	0	0	0	0
0,568	0,648	0,732	0,84	0,969	1,124	1,309	1,492	1,65	1,811	1,959	0	0	0	0
0,568	0,648	0,732	0,84	0,969	1,124	1,309	1,492	1,65	1,811	1,959	0	0	0	0
0,568	0,648	0,732	0,84	0,969	1,124	1,309	1,492	1,65	1,811	1,959	0	0	0	0
0,586	0,662	0,744	0,842	0,973	1,135	1,302	1,499	1,672	1,82	1,96	0	0	0	0
0,586	0,662	0,744	0,842	0,973	1,135	1,302	1,499	1,672	1,82	1,96	0	0	0	0
0,586	0,662	0,744	0,842	0,973	1,135	1,302	1,499	1,672	1,82	1,96	0	0	0	0
0,528	0,582	0,65	0,754	0,885	1,059	1,267	1,483	1,694	1,955	2,248	0	0	0	0
0,528	0,582	0,65	0,754	0,885	1,059	1,267	1,483	1,694	1,955	2,248	0	0	0	0
0,528	0,582	0,65	0,754	0,885	1,059	1,267	1,483	1,694	1,955	2,248	0	0	0	0
0,541	0,608	0,683	0,795	0,927	1,106	1,309	1,528	1,744	2,012	2,315	0	0	0	0
0,541	0,608	0,683	0,795	0,927	1,106	1,309	1,528	1,744	2,012	2,315	0	0	0	0
0,541	0,608	0,683	0,795	0,927	1,106	1,309	1,528	1,744	2,012	2,315	0	0	0	0
0,553	0,616	0,69	0,807	0,941	1,124	1,322	1,539	1,761	2,019	2,323	0	0	0	0
0,553	0,616	0,69	0,807	0,941	1,124	1,322	1,539	1,761	2,019	2,323	0	0	0	0
0,553	0,616	0,69	0,807	0,941	1,124	1,322	1,539	1,761	2,019	2,323	0	0	0	0
0,609	0,715	0,856	1,049	1,292	1,583	1,876	2,187	2,5	2,825	3,139	0	0	0	0
0,609	0,715	0,856	1,049	1,292	1,583	1,876	2,187	2,5	2,825	3,139	0	0	0	0
0,609	0,715	0,856	1,049	1,292	1,583	1,876	2,187	2,5	2,825	3,139	0	0	0	0
0,629	0,733	0,887	1,082	1,352	1,637	1,933	2,243	2,567	2,894	3,196	0	0	0	0
0,629	0,733	0,887	1,082	1,352	1,637	1,933	2,243	2,567	2,894	3,196	0	0	0	0
0,629	0,733	0,887	1,082	1,352	1,637	1,933	2,243	2,567	2,894	3,196	0	0	0	0
0,637	0,747	0,888	1,097	1,347	1,649	1,951	2,248	2,576	2,909	3,202	0	0	0	0
0,637	0,747	0,888	1,097	1,347	1,649	1,951	2,248	2,576	2,909	3,202	0	0	0	0
0,637	0,747	0,888	1,097	1,347	1,649	1,951	2,248	2,576	2,909	3,202	0	0	0	0
0,515	0,577	0,661	0,78	0,943	1,157	1,404	1,665	1,947	2,242	2,57	0	0	0	0
0,515	0,577	0,661	0,78	0,943	1,157	1,404	1,665	1,947	2,242	2,57	0	0	0	0
0,515	0,577	0,661	0,78	0,943	1,157	1,404	1,665	1,947	2,242	2,57	0	0	0	0
0,527	0,597	0,687	0,81	0,974	1,21	1,455	1,723	2,009	2,308	2,638	0	0	0	0
0,527	0,597	0,687	0,81	0,974	1,21	1,455	1,723	2,009	2,308	2,638	0	0	0	0
0,527	0,597	0,687	0,81	0,974	1,21	1,455	1,723	2,009	2,308	2,638	0	0	0	0
0,521	0,599	0,685	0,804	0,977	1,192	1,445	1,71	1,99	2,277	2,609	0	0	0	0
0,521	0,599	0,685	0,804	0,977	1,192	1,445	1,71	1,99	2,277	2,609	0	0	0	0
0,521	0,599	0,685	0,804	0,977	1,192	1,445	1,71	1,99	2,277	2,609	0	0	0	0
0,593	0,689	0,796	0,951	1,159	1,397	1,659	1,942	2,227	2,531	2,851	0	0	0	0
0,593	0,689	0,796	0,951	1,159	1,397	1,659	1,942	2,227	2,531	2,851	0	0	0	0
0,593	0,689	0,796	0,951	1,159	1,397	1,659	1,942	2,227	2,531	2,851	0	0	0	0
0,607	0,711	0,827	0,985	1,205	1,455	1,721	2,007	2,287	2,608	2,934	0	0	0	0
0,607	0,711	0,827	0,985	1,205	1,455	1,721	2,007	2,287	2,608	2,934	0	0	0	0
0,607	0,711	0,827	0,985	1,205	1,455	1,721	2,007	2,287	2,608	2,934	0	0	0	0
0,587	0,676	0,795	0,937	1,135	1,382	1,63	1,908	2,178	2,484	2,804	0	0	0	0
0,587	0,676	0,795	0,937	1,135	1,382	1,63	1,908	2,178	2,484	2,804	0	0	0	0
0,587	0,676	0,795	0,937	1,135	1,382	1,63	1,908	2,178	2,484	2,804	0	0	0	0
0,385	0,382	0,388	0,385	0,378	0,382	0,381	0,385	0,386	0,382	0,38	0,377	0,38	0,382	0,391
0,393	0,39	0,391	0,388	0,385	0,388	0,387	0,39	0,389	0,396	0,392	0,383	0,386	0,385	0,388
0,393	0,39	0,391	0,388	0,385	0,388	0,387	0,39	0,389	0,396	0,392	0,383	0,386	0,385	0,388
0,393	0,39	0,391	0,388	0,385	0,388	0,387	0,39	0,389	0,396	0,392	0,383	0,386	0,385	0,388
0,387	0,38	0,391	0,385	0,386	0,38	0,387	0,384	0,378	0,385	0,376	0,381	0,381	0,386	0,382
0,387	0,38	0,391	0,385	0,386	0,38	0,387	0,384	0,378	0,385	0,376	0,381	0,381	0,386	0,382
0,387	0,38	0,391	0,385	0,386	0,38	0,387	0,384	0,378	0,385	0,376	0,381	0,381	0,386	0,382
0,39	0,394	0,399	0,394	0,391	0,397	0,389	0,392	0,391	0,396	0,387	0,387	0,399	0,392	0,392

0,39	0,394	0,399	0,394	0,391	0,397	0,389	0,392	0,391	0,396	0,387	0,387	0,399	0,392	0,392
0,39	0,394	0,399	0,394	0,391	0,397	0,389	0,392	0,391	0,396	0,387	0,387	0,399	0,392	0,392
0,369	0,369	0,378	0,374	0,371	0,364	0,373	0,371	0,365	0,372	0,375	0,369	0,365	0,365	0,372
0,369	0,369	0,378	0,374	0,371	0,364	0,373	0,371	0,365	0,372	0,375	0,369	0,365	0,365	0,372
0,369	0,369	0,378	0,374	0,371	0,364	0,373	0,371	0,365	0,372	0,375	0,369	0,365	0,365	0,372
0,367	0,367	0,375	0,377	0,367	0,368	0,373	0,37	0,383	0,374	0,37	0,365	0,365	0,366	0,369
0,367	0,367	0,375	0,377	0,367	0,368	0,373	0,37	0,383	0,374	0,37	0,365	0,365	0,366	0,369
0,376	0,372	0,377	0,371	0,369	0,363	0,369	0,368	0,372	0,366	0,367	0,362	0,367	0,37	0,373
0,376	0,372	0,377	0,371	0,369	0,363	0,369	0,368	0,372	0,366	0,367	0,362	0,367	0,37	0,373
0,376	0,372	0,377	0,371	0,369	0,363	0,369	0,368	0,372	0,366	0,367	0,362	0,367	0,37	0,373
0,378	0,368	0,377	0,375	0,37	0,371	0,381	0,367	0,369	0,377	0,373	0,375	0,369	0,37	0,372
0,378	0,368	0,377	0,375	0,37	0,371	0,381	0,367	0,369	0,377	0,373	0,375	0,369	0,37	0,372
0,378	0,368	0,377	0,375	0,37	0,371	0,381	0,367	0,369	0,377	0,373	0,375	0,369	0,37	0,372
0,37	0,366	0,375	0,371	0,366	0,372	0,366	0,366	0,374	0,369	0,365	0,368	0,374	0,368	0,378
0,37	0,366	0,375	0,371	0,366	0,372	0,366	0,366	0,374	0,369	0,365	0,368	0,374	0,368	0,378
0,37	0,366	0,375	0,371	0,366	0,372	0,366	0,366	0,374	0,369	0,365	0,368	0,374	0,368	0,378
0,417	0,406	0,423	0,411	0,411	0,418	0,411	0,407	0,415	0,409	0,414	0,404	0,407	0,417	0,41
0,417	0,406	0,423	0,411	0,411	0,418	0,411	0,407	0,415	0,409	0,414	0,404	0,407	0,417	0,41
0,417	0,406	0,423	0,411	0,411	0,418	0,411	0,407	0,415	0,409	0,414	0,404	0,407	0,417	0,41
0,38	0,376	0,38	0,383	0,379	0,376	0,382	0,379	0,38	0,375	0,378	0,382	0,372	0,38	0,379
0,38	0,376	0,38	0,383	0,379	0,376	0,382	0,379	0,38	0,375	0,378	0,382	0,372	0,38	0,379
0,38	0,376	0,38	0,383	0,379	0,376	0,382	0,379	0,38	0,375	0,378	0,382	0,372	0,38	0,379
0,38	0,374	0,377	0,38	0,377	0,386	0,386	0,374	0,377	0,379	0,378	0,378	0,391	0,381	0,383
0,38	0,374	0,377	0,38	0,377	0,386	0,386	0,374	0,377	0,379	0,378	0,378	0,391	0,381	0,383
0,38	0,374	0,377	0,38	0,377	0,386	0,386	0,374	0,377	0,379	0,378	0,378	0,391	0,381	0,383
0,379	0,38	0,38	0,383	0,38	0,383	0,379	0,381	0,383	0,38	0,38	0,38	0,383	0,384	0,38
0,379	0,38	0,38	0,383	0,38	0,383	0,379	0,381	0,383	0,38	0,38	0,38	0,383	0,384	0,38
0,379	0,38	0,38	0,383	0,38	0,383	0,379	0,381	0,383	0,38	0,38	0,38	0,383	0,384	0,38
0,381	0,38	0,38	0,379	0,375	0,38	0,385	0,372	0,376	0,38	0,376	0,383	0,37	0,374	0,382
0,381	0,38	0,38	0,379	0,375	0,38	0,385	0,372	0,376	0,38	0,376	0,383	0,37	0,374	0,382
0,381	0,38	0,38	0,379	0,375	0,38	0,385	0,372	0,376	0,38	0,376	0,383	0,37	0,374	0,382
0,377	0,377	0,383	0,381	0,373	0,377	0,38	0,377	0,38	0,391	0,384	0,381	0,389	0,382	0,387
0,377	0,377	0,383	0,381	0,373	0,377	0,38	0,377	0,38	0,391	0,384	0,381	0,389	0,382	0,387
0,377	0,377	0,383	0,381	0,373	0,377	0,38	0,377	0,38	0,391	0,384	0,381	0,389	0,382	0,387
0,386	0,391	0,397	0,396	0,393	0,393	0,39	0,395	0,392	0,395	0,39	0,397	0,388	0,399	0,397
0,386	0,391	0,397	0,396	0,393	0,393	0,39	0,395	0,392	0,395	0,39	0,397	0,388	0,399	0,397
0,386	0,391	0,397	0,396	0,393	0,393	0,39	0,395	0,392	0,395	0,39	0,397	0,388	0,399	0,397
0,379	0,38	0,394	0,38	0,387	0,375	0,384	0,379	0,381	0,379	0,381	0,384	0,376	0,376	0,38
0,379	0,38	0,394	0,38	0,387	0,375	0,384	0,379	0,381	0,379	0,381	0,384	0,376	0,376	0,38
0,379	0,38	0,394	0,38	0,387	0,375	0,384	0,379	0,381	0,379	0,381	0,384	0,376	0,376	0,38
0,373	0,374	0,38	0,379	0,375	0,378	0,369	0,378	0,374	0,379	0,376	0,371	0,373	0,376	0,377
0,373	0,374	0,38	0,379	0,375	0,378	0,369	0,378	0,374	0,379	0,376	0,371	0,373	0,376	0,377
0,373	0,374	0,38	0,379	0,375	0,378	0,369	0,378	0,374	0,379	0,376	0,371	0,373	0,376	0,377
0,39	0,385	0,39	0,39	0,388	0,39	0,394	0,378	0,384	0,389	0,386	0,38	0,379	0,383	0,393
0,39	0,385	0,39	0,39	0,388	0,39	0,394	0,378	0,384	0,389	0,386	0,38	0,379	0,383	0,393
0,39	0,385	0,39	0,39	0,388	0,39	0,394	0,378	0,384	0,389	0,386	0,38	0,379	0,383	0,393
0,369	0,377	0,378	0,38	0,376	0,369	0,379	0,378	0,369	0,383	0,379	0,379	0,375	0,39	0,383
0,369	0,377	0,378	0,38	0,376	0,369	0,379	0,378	0,369	0,383	0,379	0,379	0,375	0,39	0,383
0,369	0,377	0,378	0,38	0,376	0,369	0,379	0,378	0,369	0,383	0,379	0,379	0,375	0,39	0,383
0,367	0,371	0,372	0,371	0,375	0,368	0,38	0,364	0,371	0,371	0,367	0,364	0,369	0,373	0,371
0,367	0,371	0,372	0,371	0,375	0,368	0,38	0,364	0,371	0,371	0,367	0,364	0,369	0,373	0,371
0,359	0,36	0,362	0,363	0,358	0,359	0,368	0,361	0,365	0,364	0,362	0,363	0,368	0,366	0,369
0,359	0,36	0,362	0,363	0,358	0,359	0,368	0,361	0,365	0,364	0,362	0,363	0,368	0,366	0,369
0,359	0,36	0,362	0,363	0,358	0,359	0,368	0,361	0,365	0,364	0,362	0,363	0,368	0,366	0,369
0,354	0,353	0,353	0,355	0,354	0,349	0,354	0,35	0,351	0,358	0,349	0,351	0,351	0,352	0,356
0,354	0,353	0,353	0,355	0,354	0,349	0,354	0,35	0,351	0,358	0,349	0,351	0,351	0,352	0,356
0,354	0,353	0,353	0,355	0,354	0,349	0,354	0,35	0,351	0,358	0,349	0,351	0,351	0,352	0,356
0,374	0,373	0,376	0,387	0,368	0,375	0,399	0,385	0,381	0,377	0,393	0,394	0,371	0,4	0,378
0,374	0,373	0,376	0,387	0,368	0,375	0,399	0,385	0,381	0,377	0,393	0,394	0,371	0,4	0,378
0,374	0,373	0,376	0,387	0,368	0,375	0,399	0,385	0,381	0,377	0,393	0,394	0,371	0,4	0,378
0,373	0,366	0,369	0,37	0,367	0,366	0,373	0,367	0,366	0,367	0,362	0,365	0,368	0,401	0,375

0,373	0,366	0,369	0,37	0,367	0,366	0,373	0,367	0,366	0,367	0,362	0,365	0,368	0,401	0,375
0,373	0,366	0,369	0,37	0,367	0,366	0,373	0,367	0,366	0,367	0,362	0,365	0,368	0,401	0,375
0,363	0,362	0,373	0,366	0,361	0,362	0,369	0,364	0,362	0,356	0,358	0,359	0,348	0,36	0,356
0,363	0,362	0,373	0,366	0,361	0,362	0,369	0,364	0,362	0,356	0,358	0,359	0,348	0,36	0,356
0,363	0,366	0,373	0,368	0,361	0,361	0,369	0,363	0,364	0,374	0,362	0,373	0,372	0,372	0,373
0,363	0,366	0,373	0,368	0,361	0,361	0,369	0,363	0,364	0,374	0,362	0,373	0,372	0,372	0,373
0,363	0,366	0,373	0,368	0,361	0,361	0,369	0,363	0,364	0,374	0,362	0,373	0,372	0,372	0,373
0,372	0,37	0,379	0,369	0,368	0,377	0,364	0,374	0,363	0,374	0,37	0,374	0,37	0,37	0,372
0,372	0,37	0,379	0,369	0,368	0,377	0,364	0,374	0,363	0,374	0,37	0,374	0,37	0,37	0,372
0,372	0,37	0,379	0,369	0,368	0,377	0,364	0,374	0,363	0,374	0,37	0,374	0,37	0,37	0,372
0,366	0,363	0,377	0,362	0,368	0,368	0,367	0,352	0,364	0,361	0,353	0,363	0,359	0,364	0,371
0,366	0,363	0,377	0,362	0,368	0,368	0,367	0,352	0,364	0,361	0,353	0,363	0,359	0,364	0,371
0,366	0,363	0,377	0,362	0,368	0,368	0,367	0,352	0,364	0,361	0,353	0,363	0,359	0,364	0,371
0,371	0,367	0,372	0,369	0,366	0,368	0,367	0,37	0,374	0,375	0,366	0,369	0,37	0,368	0,377
0,371	0,367	0,372	0,369	0,366	0,368	0,367	0,37	0,374	0,375	0,366	0,369	0,37	0,368	0,377
0,371	0,367	0,372	0,369	0,366	0,368	0,367	0,37	0,374	0,375	0,366	0,369	0,37	0,368	0,377
0,374	0,374	0,377	0,371	0,373	0,378	0,377	0,374	0,373	0,38	0,379	0,382	0,377	0,376	0,376
0,374	0,374	0,377	0,371	0,373	0,378	0,377	0,374	0,373	0,38	0,379	0,382	0,377	0,376	0,376
0,374	0,374	0,377	0,371	0,373	0,378	0,377	0,374	0,373	0,38	0,379	0,382	0,377	0,376	0,376
0,377	0,377	0,38	0,378	0,372	0,371	0,378	0,373	0,379	0,376	0,374	0,379	0,368	0,371	0,378
0,377	0,377	0,38	0,378	0,372	0,371	0,378	0,373	0,379	0,376	0,374	0,379	0,368	0,371	0,378
0,377	0,377	0,38	0,378	0,372	0,371	0,378	0,373	0,379	0,376	0,374	0,379	0,368	0,371	0,378
0,376	0,38	0,375	0,379	0,376	0,375	0,383	0,379	0,383	0,38	0,378	0,374	0,371	0,38	0,385
0,376	0,38	0,375	0,379	0,376	0,375	0,383	0,379	0,383	0,38	0,378	0,374	0,371	0,38	0,385
0,376	0,38	0,375	0,379	0,376	0,375	0,383	0,379	0,383	0,38	0,378	0,374	0,371	0,38	0,385
0,384	0,384	0,378	0,379	0,388	0,376	0,387	0,372	0,386	0,381	0,373	0,378	0,383	0,389	0,379
0,384	0,384	0,378	0,379	0,388	0,376	0,387	0,372	0,386	0,381	0,373	0,378	0,383	0,389	0,379
0,384	0,384	0,378	0,379	0,388	0,376	0,387	0,372	0,386	0,381	0,373	0,378	0,383	0,389	0,379
0,395	0,386	0,39	0,398	0,387	0,387	0,392	0,396	0,386	0,394	0,388	0,385	0,392	0,387	0,396
0,395	0,386	0,39	0,398	0,387	0,387	0,392	0,396	0,386	0,394	0,388	0,385	0,392	0,387	0,396
0,395	0,386	0,39	0,398	0,387	0,387	0,392	0,396	0,386	0,394	0,388	0,385	0,392	0,387	0,396
0,391	0,385	0,385	0,391	0,388	0,385	0,389	0,387	0,386	0,389	0,387	0,376	0,384	0,392	0,395
0,391	0,385	0,385	0,391	0,388	0,385	0,389	0,387	0,386	0,389	0,387	0,376	0,384	0,392	0,395
0,391	0,385	0,385	0,391	0,388	0,385	0,389	0,387	0,386	0,389	0,387	0,376	0,384	0,392	0,395
0,383	0,38	0,391	0,382	0,383	0,388	0,395	0,389	0,39	0,386	0,39	0,38	0,387	0,39	0,392
0,383	0,38	0,391	0,382	0,383	0,388	0,395	0,389	0,39	0,386	0,39	0,38	0,387	0,39	0,392
0,383	0,38	0,391	0,382	0,383	0,388	0,395	0,389	0,39	0,386	0,39	0,38	0,387	0,39	0,392

0,391	0,395	0,387	0,394	0,392	0,388	0,396	0,389	0,393	0,394	0,396	0,399	0,393	0,399	0,388
0,391	0,395	0,387	0,394	0,392	0,388	0,396	0,389	0,393	0,394	0,396	0,399	0,393	0,399	0,388
0,369	0,373	0,369	0,368	0,373	0,375	0,374	0,361	0,381	0,37	0,368	0,375	0,369	0,367	0,365
0,369	0,373	0,369	0,368	0,373	0,375	0,374	0,361	0,381	0,37	0,368	0,375	0,369	0,367	0,365
0,369	0,373	0,369	0,368	0,373	0,375	0,374	0,361	0,381	0,37	0,368	0,375	0,369	0,367	0,365
0,366	0,365	0,378	0,369	0,367	0,364	0,371	0,372	0,373	0,366	0,369	0,371	0,36	0,371	0,362
0,366	0,365	0,378	0,369	0,367	0,364	0,371	0,372	0,373	0,366	0,369	0,371	0,36	0,371	0,362
0,366	0,365	0,378	0,369	0,367	0,364	0,371	0,372	0,373	0,366	0,369	0,371	0,36	0,371	0,362
0,366	0,373	0,372	0,375	0,373	0,367	0,369	0,361	0,372	0,372	0,366	0,372	0,362	0,365	0,364
0,366	0,373	0,372	0,375	0,373	0,367	0,369	0,361	0,372	0,372	0,366	0,372	0,362	0,365	0,364
0,366	0,373	0,372	0,375	0,373	0,367	0,369	0,361	0,372	0,372	0,366	0,372	0,362	0,365	0,364
0,372	0,372	0,37	0,374	0,375	0,374	0,372	0,361	0,381	0,371	0,37	0,38	0,367	0,373	0,374
0,372	0,372	0,37	0,374	0,375	0,374	0,372	0,361	0,381	0,371	0,37	0,38	0,367	0,373	0,374
0,372	0,372	0,37	0,374	0,375	0,374	0,372	0,361	0,381	0,371	0,37	0,38	0,367	0,373	0,374
0,373	0,367	0,373	0,376	0,369	0,364	0,371	0,369	0,374	0,367	0,367	0,372	0,361	0,368	0,362
0,373	0,367	0,373	0,376	0,369	0,364	0,371	0,369	0,374	0,367	0,367	0,372	0,361	0,368	0,362
0,373	0,367	0,373	0,376	0,369	0,364	0,371	0,369	0,374	0,367	0,367	0,372	0,361	0,368	0,362
0,405	0,4	0,411	0,413	0,419	0,404	0,408	0,392	0,403	0,402	0,401	0,406	0,389	0,396	0,394
0,405	0,4	0,411	0,413	0,419	0,404	0,408	0,392	0,403	0,402	0,401	0,406	0,389	0,396	0,394
0,405	0,4	0,411	0,413	0,419	0,404	0,408	0,392	0,403	0,402	0,401	0,406	0,389	0,396	0,394
0,374	0,378	0,382	0,379	0,38	0,373	0,385	0,378	0,385	0,383	0,381	0,382	0,387	0,384	0,376
0,374	0,378	0,382	0,379	0,38	0,373	0,385	0,378	0,385	0,383	0,381	0,382	0,387	0,384	0,376
0,374	0,378	0,382	0,379	0,38	0,373	0,385	0,378	0,385	0,383	0,381	0,382	0,387	0,384	0,376
0,378	0,384	0,378	0,382	0,388	0,382	0,392	0,4	0,438	0,502	0,606	0,771	0,901	1,008	1,124
0,378	0,384	0,378	0,382	0,388	0,382	0,392	0,4	0,438	0,502	0,606	0,771	0,901	1,008	1,124
0,378	0,384	0,378	0,382	0,388	0,382	0,392	0,4	0,438	0,502	0,606	0,771	0,901	1,008	1,124
0,378	0,38	0,384	0,388	0,384	0,384	0,393	0,376	0,385	0,386	0,391	0,385	0,387	0,383	0,375
0,378	0,38	0,384	0,388	0,384	0,384	0,393	0,376	0,385	0,386	0,391	0,385	0,387	0,383	0,375
0,378	0,38	0,384	0,388	0,384	0,384	0,393	0,376	0,385	0,386	0,391	0,385	0,387	0,383	0,375
0,373	0,381	0,38	0,383	0,384	0,382	0,383	0,374	0,382	0,382	0,381	0,38	0,379	0,386	0,374
0,373	0,381	0,38	0,383	0,384	0,382	0,383	0,374	0,382	0,382	0,381	0,38	0,379	0,386	0,374
0,373	0,381	0,38	0,383	0,384	0,382	0,383	0,374	0,382	0,382	0,381	0,38	0,379	0,386	0,374
0,378	0,382	0,382	0,381	0,387	0,376	0,385	0,374	0,386	0,384	0,383	0,38	0,381	0,386	0,375
0,378	0,382	0,382	0,381	0,387	0,376	0,385	0,374	0,386	0,384	0,383	0,38	0,381	0,386	0,375
0,378	0,382	0,382	0,381	0,387	0,376	0,385	0,374	0,386	0,384	0,383	0,38	0,381	0,386	0,375
0,391	0,386	0,391	0,391	0,393	0,394	0,403	0,386	0,395	0,398	0,391	0,399	0,389	0,408	0,39
0,391	0,386	0,391	0,391	0,393	0,394	0,403	0,386	0,395	0,398	0,391	0,399	0,389	0,408	0,39
0,391	0,386	0,391	0,391	0,393	0,394	0,403	0,386	0,395	0,398	0,391	0,399	0,389	0,408	0,39
0,382	0,384	0,382	0,38	0,381	0,379	0,381	0,375	0,394	0,377	0,371	0,387	0,38	0,377	0,379
0,382	0,384	0,382	0,38	0,381	0,379	0,381	0,375	0,394	0,377	0,371	0,387	0,38	0,377	0,379
0,382	0,384	0,382	0,38	0,381	0,379	0,381	0,375	0,394	0,377	0,371	0,387	0,38	0,377	0,379
0,374	0,375	0,377	0,373	0,381	0,369	0,374	0,372	0,384	0,375	0,372	0,379	0,365	0,375	0,379
0,374	0,375	0,377	0,373	0,381	0,369	0,374	0,372	0,384	0,375	0,372	0,379	0,365	0,375	0,379
0,374	0,375	0,377	0,373	0,381	0,369	0,374	0,372	0,384	0,375	0,372	0,379	0,365	0,375	0,379
0,39	0,39	0,396	0,39	0,392	0,383	0,382	0,372	0,387	0,382	0,385	0,395	0,382	0,384	0,38
0,39	0,39	0,396	0,39	0,392	0,383	0,382	0,372	0,387	0,382	0,385	0,395	0,382	0,384	0,38
0,39	0,39	0,396	0,39	0,392	0,383	0,382	0,372	0,387	0,382	0,385	0,395	0,382	0,384	0,38
0,373	0,37	0,38	0,375	0,377	0,374	0,384	0,374	0,38	0,378	0,374	0,378	0,375	0,376	0,37
0,373	0,37	0,38	0,375	0,377	0,374	0,384	0,374	0,38	0,378	0,374	0,378	0,375	0,376	0,37
0,373	0,37	0,38	0,375	0,377	0,374	0,384	0,374	0,38	0,378	0,374	0,378	0,375	0,376	0,37
0,364	0,365	0,369	0,372	0,372	0,367	0,372	0,363	0,367	0,367	0,365	0,372	0,361	0,368	0,358
0,364	0,365	0,369	0,372	0,372	0,367	0,372	0,363	0,367	0,367	0,365	0,372	0,361	0,368	0,358
0,364	0,365	0,369	0,372	0,372	0,367	0,372	0,363	0,367	0,367	0,365	0,372	0,361	0,368	0,358
0,364	0,364	0,362	0,371	0,369	0,361	0,361	0,359	0,37	0,377	0,358	0,375	0,356	0,36	0,354
0,364	0,364	0,362	0,371	0,369	0,361	0,361	0,359	0,37	0,377	0,358	0,375	0,356	0,36	0,354
0,364	0,364	0,362	0,371	0,369	0,361	0,361	0,359	0,37	0,377	0,358	0,375	0,356	0,36	0,354
0,349	0,353	0,355	0,359	0,365	0,357	0,356	0,35	0,358	0,35	0,354	0,356	0,348	0,349	0,348
0,349	0,353	0,355	0,359	0,365	0,357	0,356	0,35	0,358	0,35	0,354	0,356	0,348	0,349	0,348
0,349	0,353	0,355	0,359	0,365	0,357	0,356	0,35	0,358	0,35	0,354	0,356	0,348	0,349	0,348
0,37	0,366	0,369	0,366	0,382	0,372	0,369	0,368	0,372	0,37	0,379	0,369	0,368	0,363	0,37
0,37	0,366	0,369	0,366	0,382	0,372	0,369	0,368	0,372	0,37	0,379	0,369	0,368	0,363	0,37
0,37	0,366	0,369	0,366	0,382	0,372	0,369	0,368	0,372	0,37	0,379	0,369	0,368	0,363	0,37
0,377	0,385	0,369	0,394	0,385	0,363	0,371	0,378	0,373	0,375	0,37	0,371	0,361	0,363	0,375

0,377	0,385	0,369	0,394	0,385	0,363	0,371	0,378	0,373	0,375	0,37	0,371	0,361	0,363	0,375
0,377	0,385	0,369	0,394	0,385	0,363	0,371	0,378	0,373	0,375	0,37	0,371	0,361	0,363	0,375
0,362	0,369	0,358	0,361	0,368	0,362	0,359	0,36	0,367	0,368	0,357	0,366	0,356	0,359	0,352
0,362	0,369	0,358	0,361	0,368	0,362	0,359	0,36	0,367	0,368	0,357	0,366	0,356	0,359	0,352
0,362	0,369	0,358	0,361	0,368	0,362	0,359	0,36	0,367	0,368	0,357	0,366	0,356	0,359	0,352
0,369	0,367	0,364	0,366	0,372	0,364	0,37	0,359	0,367	0,378	0,37	0,371	0,361	0,366	0,358
0,369	0,367	0,364	0,366	0,372	0,364	0,37	0,359	0,367	0,378	0,37	0,371	0,361	0,366	0,358
0,369	0,367	0,364	0,366	0,372	0,364	0,37	0,359	0,367	0,378	0,37	0,371	0,361	0,366	0,358
0,373	0,374	0,375	0,371	0,369	0,36	0,371	0,37	0,38	0,379	0,369	0,373	0,368	0,364	0,363
0,373	0,374	0,375	0,371	0,369	0,36	0,371	0,37	0,38	0,379	0,369	0,373	0,368	0,364	0,363
0,373	0,374	0,375	0,371	0,369	0,36	0,371	0,37	0,38	0,379	0,369	0,373	0,368	0,364	0,363
0,366	0,368	0,371	0,365	0,36	0,366	0,367	0,362	0,366	0,37	0,363	0,373	0,365	0,373	0,369
0,366	0,368	0,371	0,365	0,36	0,366	0,367	0,362	0,366	0,37	0,363	0,373	0,365	0,373	0,369
0,366	0,368	0,371	0,365	0,36	0,366	0,367	0,362	0,366	0,37	0,363	0,373	0,365	0,373	0,369
0,366	0,375	0,368	0,371	0,369	0,371	0,372	0,365	0,371	0,371	0,377	0,371	0,369	0,373	0,375
0,366	0,375	0,368	0,371	0,369	0,371	0,372	0,365	0,371	0,371	0,377	0,371	0,369	0,373	0,375
0,366	0,375	0,368	0,371	0,369	0,371	0,372	0,365	0,371	0,371	0,377	0,371	0,369	0,373	0,375
0,379	0,377	0,382	0,377	0,383	0,372	0,38	0,372	0,374	0,376	0,373	0,378	0,372	0,378	0,371
0,379	0,377	0,382	0,377	0,383	0,372	0,38	0,372	0,374	0,376	0,373	0,378	0,372	0,378	0,371
0,379	0,377	0,382	0,377	0,383	0,372	0,38	0,372	0,374	0,376	0,373	0,378	0,372	0,378	0,371
0,371	0,376	0,376	0,375	0,389	0,377	0,373	0,365	0,377	0,391	0,376	0,381	0,371	0,375	0,37
0,371	0,376	0,376	0,375	0,389	0,377	0,373	0,365	0,377	0,391	0,376	0,381	0,371	0,375	0,37
0,371	0,376	0,376	0,375	0,389	0,377	0,373	0,365	0,377	0,391	0,376	0,381	0,371	0,375	0,37
0,378	0,38	0,372	0,376	0,384	0,383	0,384	0,376	0,381	0,382	0,379	0,386	0,373	0,382	0,377
0,378	0,38	0,372	0,376	0,384	0,383	0,384	0,376	0,381	0,382	0,379	0,386	0,373	0,382	0,377
0,378	0,38	0,372	0,376	0,384	0,383	0,384	0,376	0,381	0,382	0,379	0,386	0,373	0,382	0,377
0,384	0,382	0,378	0,386	0,391	0,381	0,381	0,376	0,382	0,381	0,372	0,376	0,375	0,382	0,372
0,384	0,382	0,378	0,386	0,391	0,381	0,381	0,376	0,382	0,381	0,372	0,376	0,375	0,382	0,372
0,384	0,382	0,378	0,386	0,391	0,381	0,381	0,376	0,382	0,381	0,372	0,376	0,375	0,382	0,372
0,388	0,386	0,389	0,392	0,401	0,381	0,385	0,39	0,39	0,384	0,39	0,392	0,383	0,383	0,38
0,388	0,386	0,389	0,392	0,401	0,381	0,385	0,39	0,39	0,384	0,39	0,392	0,383	0,383	0,38
0,388	0,386	0,389	0,392	0,401	0,381	0,385	0,39	0,39	0,384	0,39	0,392	0,383	0,383	0,38
0,381	0,383	0,382	0,385	0,392	0,387	0,384	0,378	0,387	0,387	0,389	0,391	0,384	0,388	0,385
0,381	0,383	0,382	0,385	0,392	0,387	0,384	0,378	0,387	0,387	0,389	0,391	0,384	0,388	0,385
0,381	0,383	0,382	0,385	0,392	0,387	0,384	0,378	0,387	0,387	0,389	0,391	0,384	0,388	0,385
0,398	0,384	0,396	0,394	0,39	0,383	0,386	0,384	0,39	0,383	0,386	0,388	0,374	0,382	0,38
0,398	0,384	0,396	0,394	0,39	0,383	0,386	0,384	0,39	0,383	0,386	0,388	0,374	0,382	0,38
0,398	0,384	0,396	0,394	0,39	0,383	0,386	0,384	0,39	0,383	0,386	0,388	0,374	0,382	0,38

0,392	0,396	0,399	0,392	0,394	0,394	0,403	0,398	0,402	0,391	0,395	0,404	0,403	0,411	0,41
0,392	0,396	0,399	0,392	0,394	0,394	0,403	0,398	0,402	0,391	0,395	0,404	0,403	0,411	0,41
0,369	0,374	0,373	0,374	0,372	0,378	0,369	0,372	0,374	0,372	0,376	0,381	0,375	0,395	0,391
0,369	0,374	0,373	0,374	0,372	0,378	0,369	0,372	0,374	0,372	0,376	0,381	0,375	0,395	0,391
0,369	0,374	0,373	0,374	0,372	0,378	0,369	0,372	0,374	0,372	0,376	0,381	0,375	0,395	0,391
0,367	0,366	0,366	0,36	0,367	0,374	0,363	0,372	0,367	0,366	0,367	0,372	0,366	0,378	0,373
0,367	0,366	0,366	0,36	0,367	0,374	0,363	0,372	0,367	0,366	0,367	0,372	0,366	0,378	0,373
0,367	0,366	0,366	0,36	0,367	0,374	0,363	0,372	0,367	0,366	0,367	0,372	0,366	0,378	0,373
0,365	0,377	0,367	0,371	0,372	0,378	0,368	0,377	0,381	0,38	0,385	0,401	0,411	0,433	0,457
0,365	0,377	0,367	0,371	0,372	0,378	0,368	0,377	0,381	0,38	0,385	0,401	0,411	0,433	0,457
0,365	0,377	0,367	0,371	0,372	0,378	0,368	0,377	0,381	0,38	0,385	0,401	0,411	0,433	0,457
0,366	0,367	0,379	0,371	0,371	0,379	0,371	0,382	0,386	0,382	0,391	0,401	0,404	0,419	0,433
0,366	0,367	0,379	0,371	0,371	0,379	0,371	0,382	0,386	0,382	0,391	0,401	0,404	0,419	0,433
0,366	0,367	0,379	0,371	0,371	0,379	0,371	0,382	0,386	0,382	0,391	0,401	0,404	0,419	0,433
0,368	0,367	0,371	0,376	0,369	0,372	0,372	0,371	0,374	0,367	0,367	0,377	0,384	0,382	0,381
0,368	0,367	0,371	0,376	0,369	0,372	0,372	0,371	0,374	0,367	0,367	0,377	0,384	0,382	0,381
0,368	0,367	0,371	0,376	0,369	0,372	0,372	0,371	0,374	0,367	0,367	0,377	0,384	0,382	0,381
0,398	0,399	0,399	0,408	0,402	0,412	0,41	0,399	0,407	0,402	0,415	0,421	0,421	0,416	0,434
0,398	0,399	0,399	0,408	0,402	0,412	0,41	0,399	0,407	0,402	0,415	0,421	0,421	0,416	0,434
0,398	0,399	0,399	0,408	0,402	0,412	0,41	0,399	0,407	0,402	0,415	0,421	0,421	0,416	0,434
0,38	0,379	0,382	0,381	0,386	0,393	0,39	0,393	0,406	0,414	0,433	0,451	0,48	0,534	0,587
0,38	0,379	0,382	0,381	0,386	0,393	0,39	0,393	0,406	0,414	0,433	0,451	0,48	0,534	0,587
0,38	0,379	0,382	0,381	0,386	0,393	0,39	0,393	0,406	0,414	0,433	0,451	0,48	0,534	0,587
1,245	1,28	1,167	1,093	1,044	1,004	0,975	0,936	0,914	0,879	0,869	0,869	0,876	0,907	0,936
1,245	1,28	1,167	1,093	1,044	1,004	0,975	0,936	0,914	0,879	0,869	0,869	0,876	0,907	0,936
1,245	1,28	1,167	1,093	1,044	1,004	0,975	0,936	0,914	0,879	0,869	0,869	0,876	0,907	0,936
0,38	0,383	0,391	0,381	0,379	0,387	0,38	0,384	0,386	0,388	0,382	0,386	0,381	0,386	0,385
0,38	0,383	0,391	0,381	0,379	0,387	0,38	0,384	0,386	0,388	0,382	0,386	0,381	0,386	0,385
0,38	0,383	0,391	0,381	0,379	0,387	0,38	0,384	0,386	0,388	0,382	0,386	0,381	0,386	0,385
0,386	0,383	0,384	0,383	0,383	0,379	0,383	0,386	0,388	0,376	0,379	0,382	0,38	0,386	0,377
0,386	0,383	0,384	0,383	0,383	0,379	0,383	0,386	0,388	0,376	0,379	0,382	0,38	0,386	0,377
0,386	0,383	0,384	0,383	0,383	0,379	0,383	0,386	0,388	0,376	0,379	0,382	0,38	0,386	0,377
0,377	0,378	0,381	0,384	0,387	0,387	0,384	0,382	0,384	0,376	0,374	0,379	0,383	0,388	0,382
0,377	0,378	0,381	0,384	0,387	0,387	0,384	0,382	0,384	0,376	0,374	0,379	0,383	0,388	0,382
0,377	0,378	0,381	0,384	0,387	0,387	0,384	0,382	0,384	0,376	0,374	0,379	0,383	0,388	0,382
0,395	0,395	0,399	0,397	0,397	0,398	0,395	0,398	0,397	0,395	0,403	0,406	0,405	0,416	0,405
0,395	0,395	0,399	0,397	0,397	0,398	0,395	0,398	0,397	0,395	0,403	0,406	0,405	0,416	0,405
0,395	0,395	0,399	0,397	0,397	0,398	0,395	0,398	0,397	0,395	0,403	0,406	0,405	0,416	0,405
0,38	0,385	0,384	0,377	0,377	0,386	0,378	0,379	0,388	0,379	0,39	0,387	0,386	0,396	0,402
0,38	0,385	0,384	0,377	0,377	0,386	0,378	0,379	0,388	0,379	0,39	0,387	0,386	0,396	0,402
0,38	0,385	0,384	0,377	0,377	0,386	0,378	0,379	0,388	0,379	0,39	0,387	0,386	0,396	0,402
0,369	0,372	0,376	0,377	0,375	0,386	0,37	0,381	0,377	0,373	0,376	0,376	0,38	0,386	0,39
0,369	0,372	0,376	0,377	0,375	0,386	0,37	0,381	0,377	0,373	0,376	0,376	0,38	0,386	0,39
0,369	0,372	0,376	0,377	0,375	0,386	0,37	0,381	0,377	0,373	0,376	0,376	0,38	0,386	0,39
0,384	0,382	0,386	0,388	0,383	0,398	0,383	0,387	0,393	0,384	0,388	0,388	0,387	0,391	0,38
0,384	0,382	0,386	0,388	0,383	0,398	0,383	0,387	0,393	0,384	0,388	0,388	0,387	0,391	0,38
0,384	0,382	0,386	0,388	0,383	0,398	0,383	0,387	0,393	0,384	0,388	0,388	0,387	0,391	0,38
0,381	0,371	0,378	0,375	0,371	0,381	0,372	0,379	0,378	0,364	0,378	0,378	0,373	0,374	0,365
0,381	0,371	0,378	0,375	0,371	0,381	0,372	0,379	0,378	0,364	0,378	0,378	0,373	0,374	0,365
0,381	0,371	0,378	0,375	0,371	0,381	0,372	0,379	0,378	0,364	0,378	0,378	0,373	0,374	0,365
0,363	0,365	0,372	0,367	0,368	0,375	0,371	0,372	0,372	0,367	0,376	0,375	0,378	0,39	0,391
0,363	0,365	0,372	0,367	0,368	0,375	0,371	0,372	0,372	0,367	0,376	0,375	0,378	0,39	0,391
0,363	0,365	0,372	0,367	0,368	0,375	0,371	0,372	0,372	0,367	0,376	0,375	0,378	0,39	0,391
0,363	0,362	0,365	0,364	0,376	0,374	0,361	0,359	0,372	0,353	0,366	0,368	0,369	0,377	0,364
0,363	0,362	0,365	0,364	0,376	0,374	0,361	0,359	0,372	0,353	0,366	0,368	0,369	0,377	0,364
0,363	0,362	0,365	0,364	0,376	0,374	0,361	0,359	0,372	0,353	0,366	0,368	0,369	0,377	0,364
0,35	0,353	0,361	0,357	0,354	0,368	0,349	0,358	0,358	0,352	0,357	0,363	0,354	0,36	0,365
0,35	0,353	0,361	0,357	0,354	0,368	0,349	0,358	0,358	0,352	0,357	0,363	0,354	0,36	0,365
0,35	0,353	0,361	0,357	0,354	0,368	0,349	0,358	0,358	0,352	0,357	0,363	0,354	0,36	0,365
0,375	0,37	0,369	0,367	0,359	0,376	0,368	0,374	0,376	0,372	0,385	0,39	0,39	0,389	0,392
0,375	0,37	0,369	0,367	0,359	0,376	0,368	0,374	0,376	0,372	0,385	0,39	0,39	0,389	0,392
0,375	0,37	0,369	0,367	0,359	0,376	0,368	0,374	0,376	0,372	0,385	0,39	0,39	0,389	0,392
0,375	0,367	0,375	0,383	0,379	0,387	0,368	0,368	0,364	0,367	0,376	0,375	0,365	0,376	0,375

0,375	0,367	0,375	0,383	0,379	0,387	0,368	0,368	0,364	0,367	0,376	0,375	0,365	0,376	0,375
0,375	0,367	0,375	0,383	0,379	0,387	0,368	0,368	0,364	0,367	0,376	0,375	0,365	0,376	0,375
0,357	0,361	0,36	0,359	0,364	0,366	0,368	0,363	0,361	0,35	0,36	0,359	0,362	0,363	0,361
0,357	0,361	0,36	0,359	0,364	0,366	0,368	0,363	0,361	0,35	0,36	0,359	0,362	0,363	0,361
0,365	0,371	0,367	0,363	0,365	0,375	0,363	0,366	0,37	0,364	0,363	0,37	0,367	0,364	0,365
0,365	0,371	0,367	0,363	0,365	0,375	0,363	0,366	0,37	0,364	0,363	0,37	0,367	0,364	0,365
0,369	0,362	0,375	0,37	0,368	0,371	0,378	0,373	0,375	0,369	0,376	0,371	0,377	0,372	0,365
0,369	0,362	0,375	0,37	0,368	0,371	0,378	0,373	0,375	0,369	0,376	0,371	0,377	0,372	0,365
0,369	0,362	0,375	0,37	0,368	0,371	0,378	0,373	0,375	0,369	0,376	0,371	0,377	0,372	0,365
0,363	0,365	0,368	0,36	0,371	0,38	0,358	0,37	0,368	0,365	0,367	0,375	0,377	0,379	0,38
0,363	0,365	0,368	0,36	0,371	0,38	0,358	0,37	0,368	0,365	0,367	0,375	0,377	0,379	0,38
0,363	0,365	0,368	0,36	0,371	0,38	0,358	0,37	0,368	0,365	0,367	0,375	0,377	0,379	0,38
0,367	0,371	0,374	0,364	0,373	0,379	0,376	0,369	0,368	0,363	0,369	0,367	0,369	0,368	0,372
0,367	0,371	0,374	0,364	0,373	0,379	0,376	0,369	0,368	0,363	0,369	0,367	0,369	0,368	0,372
0,367	0,371	0,374	0,364	0,373	0,379	0,376	0,369	0,368	0,363	0,369	0,367	0,369	0,368	0,372
0,376	0,372	0,374	0,376	0,374	0,387	0,382	0,381	0,375	0,372	0,376	0,377	0,378	0,377	0,378
0,376	0,372	0,374	0,376	0,374	0,387	0,382	0,381	0,375	0,372	0,376	0,377	0,378	0,377	0,378
0,376	0,372	0,374	0,376	0,374	0,387	0,382	0,381	0,375	0,372	0,376	0,377	0,378	0,377	0,378
0,376	0,388	0,373	0,372	0,375	0,385	0,383	0,378	0,375	0,367	0,376	0,376	0,377	0,38	0,368
0,376	0,388	0,373	0,372	0,375	0,385	0,383	0,378	0,375	0,367	0,376	0,376	0,377	0,38	0,368
0,376	0,388	0,373	0,372	0,375	0,385	0,383	0,378	0,375	0,367	0,376	0,376	0,377	0,38	0,368
0,38	0,389	0,386	0,376	0,383	0,39	0,376	0,39	0,379	0,379	0,38	0,378	0,382	0,381	0,373
0,38	0,389	0,386	0,376	0,383	0,39	0,376	0,39	0,379	0,379	0,38	0,378	0,382	0,381	0,373
0,38	0,389	0,386	0,376	0,383	0,39	0,376	0,39	0,379	0,379	0,38	0,378	0,382	0,381	0,373
0,383	0,378	0,375	0,377	0,378	0,388	0,38	0,378	0,381	0,372	0,383	0,384	0,392	0,385	0,383
0,383	0,378	0,375	0,377	0,378	0,388	0,38	0,378	0,381	0,372	0,383	0,384	0,392	0,385	0,383
0,383	0,378	0,375	0,377	0,378	0,388	0,38	0,378	0,381	0,372	0,383	0,384	0,392	0,385	0,383
0,391	0,401	0,385	0,397	0,388	0,4	0,392	0,391	0,399	0,399	0,422	0,416	0,422	0,439	0,46
0,391	0,401	0,385	0,397	0,388	0,4	0,392	0,391	0,399	0,399	0,422	0,416	0,422	0,439	0,46
0,391	0,401	0,385	0,397	0,388	0,4	0,392	0,391	0,399	0,399	0,422	0,416	0,422	0,439	0,46
0,387	0,388	0,379	0,388	0,383	0,392	0,387	0,393	0,394	0,387	0,399	0,409	0,407	0,416	0,426
0,387	0,388	0,379	0,388	0,383	0,392	0,387	0,393	0,394	0,387	0,399	0,409	0,407	0,416	0,426
0,387	0,388	0,379	0,388	0,383	0,392	0,387	0,393	0,394	0,387	0,399	0,409	0,407	0,416	0,426
0,382	0,386	0,386	0,389	0,385	0,398	0,382	0,385	0,398	0,385	0,392	0,396	0,392	0,391	0,387
0,382	0,386	0,386	0,389	0,385	0,398	0,382	0,385	0,398	0,385	0,392	0,396	0,392	0,391	0,387
0,382	0,386	0,386	0,389	0,385	0,398	0,382	0,385	0,398	0,385	0,392	0,396	0,392	0,391	0,387

0,419	0,434	0,445	0,464	0,486	0,521	0,558	0,619	0,688	0,793	0,893	1,043	1,235	1,462	1,721
0,419	0,434	0,445	0,464	0,486	0,521	0,558	0,619	0,688	0,793	0,893	1,043	1,235	1,462	1,721
0,404	0,412	0,428	0,459	0,49	0,544	0,6	0,703	0,841	1,019	1,252	1,531	1,865	2,218	2,647
0,404	0,412	0,428	0,459	0,49	0,544	0,6	0,703	0,841	1,019	1,252	1,531	1,865	2,218	2,647
0,404	0,412	0,428	0,459	0,49	0,544	0,6	0,703	0,841	1,019	1,252	1,531	1,865	2,218	2,647
0,371	0,381	0,379	0,383	0,39	0,406	0,408	0,431	0,445	0,479	0,529	0,592	0,681	0,8	0,955
0,371	0,381	0,379	0,383	0,39	0,406	0,408	0,431	0,445	0,479	0,529	0,592	0,681	0,8	0,955
0,371	0,381	0,379	0,383	0,39	0,406	0,408	0,431	0,445	0,479	0,529	0,592	0,681	0,8	0,955
0,492	0,551	0,627	0,734	0,89	1,092	1,336	1,663	2,036	2,443	2,918	3,374	3,545	3,668	3,775
0,492	0,551	0,627	0,734	0,89	1,092	1,336	1,663	2,036	2,443	2,918	3,374	3,545	3,668	3,775
0,492	0,551	0,627	0,734	0,89	1,092	1,336	1,663	2,036	2,443	2,918	3,374	3,545	3,668	3,775
0,452	0,491	0,525	0,585	0,652	0,754	0,853	1,003	1,192	1,435	1,715	2,02	2,348	2,611	2,764
0,452	0,491	0,525	0,585	0,652	0,754	0,853	1,003	1,192	1,435	1,715	2,02	2,348	2,611	2,764
0,452	0,491	0,525	0,585	0,652	0,754	0,853	1,003	1,192	1,435	1,715	2,02	2,348	2,611	2,764
0,395	0,4	0,419	0,433	0,446	0,485	0,516	0,577	0,64	0,724	0,838	0,967	1,145	1,376	1,642
0,395	0,4	0,419	0,433	0,446	0,485	0,516	0,577	0,64	0,724	0,838	0,967	1,145	1,376	1,642
0,395	0,4	0,419	0,433	0,446	0,485	0,516	0,577	0,64	0,724	0,838	0,967	1,145	1,376	1,642
0,441	0,448	0,463	0,485	0,509	0,551	0,596	0,665	0,747	0,827	0,952	1,131	1,334	1,568	1,83
0,441	0,448	0,463	0,485	0,509	0,551	0,596	0,665	0,747	0,827	0,952	1,131	1,334	1,568	1,83
0,441	0,448	0,463	0,485	0,509	0,551	0,596	0,665	0,747	0,827	0,952	1,131	1,334	1,568	1,83
0,678	0,797	0,97	1,207	1,494	1,867	2,268	2,743	3,226	3,492	3,62	3,726	3,778	3,856	3,938
0,678	0,797	0,97	1,207	1,494	1,867	2,268	2,743	3,226	3,492	3,62	3,726	3,778	3,856	3,938
0,678	0,797	0,97	1,207	1,494	1,867	2,268	2,743	3,226	3,492	3,62	3,726	3,778	3,856	3,938
0,99	1,06	1,142	1,253	1,388	1,579	1,783	2,006	2,271	2,46	2,673	2,849	2,986	3,103	3,231
0,99	1,06	1,142	1,253	1,388	1,579	1,783	2,006	2,271	2,46	2,673	2,849	2,986	3,103	3,231
0,99	1,06	1,142	1,253	1,388	1,579	1,783	2,006	2,271	2,46	2,673	2,849	2,986	3,103	3,231
0,377	0,384	0,379	0,387	0,391	0,385	0,389	0,391	0,385	0,381	0,386	0,384	0,383	0,392	0,389
0,377	0,384	0,379	0,387	0,391	0,385	0,389	0,391	0,385	0,381	0,386	0,384	0,383	0,392	0,389
0,377	0,384	0,379	0,387	0,391	0,385	0,389	0,391	0,385	0,381	0,386	0,384	0,383	0,392	0,389
0,382	0,383	0,382	0,389	0,384	0,386	0,383	0,381	0,381	0,379	0,381	0,382	0,381	0,383	0,377
0,382	0,383	0,382	0,389	0,384	0,386	0,383	0,381	0,381	0,379	0,381	0,382	0,381	0,383	0,377
0,382	0,383	0,382	0,389	0,384	0,386	0,383	0,381	0,381	0,379	0,381	0,382	0,381	0,383	0,377
0,386	0,388	0,392	0,39	0,399	0,4	0,4	0,411	0,417	0,435	0,441	0,467	0,486	0,525	0,571
0,386	0,388	0,392	0,39	0,399	0,4	0,4	0,411	0,417	0,435	0,441	0,467	0,486	0,525	0,571
0,386	0,388	0,392	0,39	0,399	0,4	0,4	0,411	0,417	0,435	0,441	0,467	0,486	0,525	0,571
0,42	0,425	0,44	0,451	0,48	0,503	0,533	0,578	0,637	0,719	0,827	0,945	1,094	1,305	1,537
0,42	0,425	0,44	0,451	0,48	0,503	0,533	0,578	0,637	0,719	0,827	0,945	1,094	1,305	1,537
0,42	0,425	0,44	0,451	0,48	0,503	0,533	0,578	0,637	0,719	0,827	0,945	1,094	1,305	1,537
0,407	0,407	0,424	0,446	0,46	0,5	0,54	0,591	0,652	0,739	0,848	0,979	1,158	1,388	1,646
0,407	0,407	0,424	0,446	0,46	0,5	0,54	0,591	0,652	0,739	0,848	0,979	1,158	1,388	1,646
0,407	0,407	0,424	0,446	0,46	0,5	0,54	0,591	0,652	0,739	0,848	0,979	1,158	1,388	1,646
0,393	0,407	0,403	0,423	0,436	0,46	0,481	0,518	0,567	0,624	0,711	0,806	0,918	1,082	1,272
0,393	0,407	0,403	0,423	0,436	0,46	0,481	0,518	0,567	0,624	0,711	0,806	0,918	1,082	1,272
0,393	0,407	0,403	0,423	0,436	0,46	0,481	0,518	0,567	0,624	0,711	0,806	0,918	1,082	1,272
0,383	0,384	0,385	0,389	0,393	0,386	0,388	0,378	0,383	0,388	0,381	0,387	0,388	0,382	0,388
0,383	0,384	0,385	0,389	0,393	0,386	0,388	0,378	0,383	0,388	0,381	0,387	0,388	0,382	0,388
0,383	0,384	0,385	0,389	0,393	0,386	0,388	0,378	0,383	0,388	0,381	0,387	0,388	0,382	0,388
0,386	0,383	0,381	0,387	0,387	0,394	0,392	0,396	0,404	0,411	0,423	0,436	0,474	0,498	0,536
0,386	0,383	0,381	0,387	0,387	0,394	0,392	0,396	0,404	0,411	0,423	0,436	0,474	0,498	0,536
0,386	0,383	0,381	0,387	0,387	0,394	0,392	0,396	0,404	0,411	0,423	0,436	0,474	0,498	0,536
0,406	0,419	0,434	0,461	0,494	0,543	0,59	0,665	0,764	0,863	1,023	1,198	1,416	1,689	1,984
0,406	0,419	0,434	0,461	0,494	0,543	0,59	0,665	0,764	0,863	1,023	1,198	1,416	1,689	1,984
0,406	0,419	0,434	0,461	0,494	0,543	0,59	0,665	0,764	0,863	1,023	1,198	1,416	1,689	1,984
0,374	0,372	0,373	0,384	0,385	0,395	0,407	0,42	0,434	0,465	0,498	0,547	0,607	0,682	0,781
0,374	0,372	0,373	0,384	0,385	0,395	0,407	0,42	0,434	0,465	0,498	0,547	0,607	0,682	0,781
0,374	0,372	0,373	0,384	0,385	0,395	0,407	0,42	0,434	0,465	0,498	0,547	0,607	0,682	0,781
0,363	0,365	0,374	0,38	0,401	0,417	0,425	0,451	0,491	0,532	0,585	0,663	0,748	0,84	0,978
0,363	0,365	0,374	0,38	0,401	0,417	0,425	0,451	0,491	0,532	0,585	0,663	0,748	0,84	0,978
0,363	0,365	0,374	0,38	0,401	0,417	0,425	0,451	0,491	0,532	0,585	0,663	0,748	0,84	0,978
0,391	0,388	0,391	0,393	0,4	0,406	0,389	0,39	0,39	0,391	0,403	0,399	0,397	0,375	0,399
0,391	0,388	0,391	0,393	0,4	0,406	0,389	0,39	0,39	0,391	0,403	0,399	0,397	0,375	0,399
0,391	0,388	0,391	0,393	0,4	0,406	0,389	0,39	0,39	0,391	0,403	0,399	0,397	0,375	0,399
0,364	0,373	0,368	0,373	0,376	0,374	0,378	0,386	0,372	0,376	0,386	0,376	0,385	0,387	0,392

0,364	0,373	0,368	0,373	0,376	0,374	0,378	0,386	0,372	0,376	0,386	0,376	0,385	0,387	0,392
0,364	0,373	0,368	0,373	0,376	0,374	0,378	0,386	0,372	0,376	0,386	0,376	0,385	0,387	0,392
0,369	0,358	0,359	0,362	0,373	0,366	0,368	0,379	0,372	0,38	0,379	0,388	0,389	0,4	0,405
0,369	0,358	0,359	0,362	0,373	0,366	0,368	0,379	0,372	0,38	0,379	0,388	0,389	0,4	0,405
0,369	0,358	0,359	0,362	0,373	0,366	0,368	0,379	0,372	0,38	0,379	0,388	0,389	0,4	0,405
0,362	0,368	0,369	0,374	0,376	0,372	0,366	0,385	0,371	0,373	0,37	0,379	0,38	0,384	0,387
0,362	0,368	0,369	0,374	0,376	0,372	0,366	0,385	0,371	0,373	0,37	0,379	0,38	0,384	0,387
0,362	0,368	0,369	0,374	0,376	0,372	0,366	0,385	0,371	0,373	0,37	0,379	0,38	0,384	0,387
0,367	0,37	0,366	0,376	0,368	0,37	0,37	0,376	0,37	0,365	0,375	0,374	0,374	0,369	0,377
0,367	0,37	0,366	0,376	0,368	0,37	0,37	0,376	0,37	0,365	0,375	0,374	0,374	0,369	0,377
0,367	0,37	0,366	0,376	0,368	0,37	0,37	0,376	0,37	0,365	0,375	0,374	0,374	0,369	0,377
0,394	0,395	0,421	0,448	0,483	0,53	0,598	0,695	0,818	0,997	1,184	1,448	1,767	2,088	2,479
0,394	0,395	0,421	0,448	0,483	0,53	0,598	0,695	0,818	0,997	1,184	1,448	1,767	2,088	2,479
0,394	0,395	0,421	0,448	0,483	0,53	0,598	0,695	0,818	0,997	1,184	1,448	1,767	2,088	2,479
0,373	0,375	0,362	0,37	0,371	0,38	0,374	0,373	0,37	0,369	0,37	0,372	0,373	0,371	0,369
0,373	0,375	0,362	0,37	0,371	0,38	0,374	0,373	0,37	0,369	0,37	0,372	0,373	0,371	0,369
0,373	0,375	0,362	0,37	0,371	0,38	0,374	0,373	0,37	0,369	0,37	0,372	0,373	0,371	0,369
0,373	0,382	0,369	0,38	0,378	0,373	0,372	0,383	0,379	0,372	0,374	0,377	0,376	0,373	0,375
0,373	0,382	0,369	0,38	0,378	0,373	0,372	0,383	0,379	0,372	0,374	0,377	0,376	0,373	0,375
0,373	0,382	0,369	0,38	0,378	0,373	0,372	0,383	0,379	0,372	0,374	0,377	0,376	0,373	0,375
0,368	0,373	0,377	0,377	0,387	0,382	0,372	0,373	0,372	0,378	0,371	0,375	0,384	0,379	0,377
0,368	0,373	0,377	0,377	0,387	0,382	0,372	0,373	0,372	0,378	0,371	0,375	0,384	0,379	0,377
0,368	0,373	0,377	0,377	0,387	0,382	0,372	0,373	0,372	0,378	0,371	0,375	0,384	0,379	0,377
0,39	0,387	0,381	0,382	0,385	0,388	0,386	0,377	0,381	0,385	0,381	0,378	0,382	0,374	0,373
0,39	0,387	0,381	0,382	0,385	0,388	0,386	0,377	0,381	0,385	0,381	0,378	0,382	0,374	0,373
0,39	0,387	0,381	0,382	0,385	0,388	0,386	0,377	0,381	0,385	0,381	0,378	0,382	0,374	0,373
0,385	0,395	0,387	0,398	0,402	0,408	0,421	0,441	0,453	0,486	0,53	0,599	0,67	0,767	0,916
0,385	0,395	0,387	0,398	0,402	0,408	0,421	0,441	0,453	0,486	0,53	0,599	0,67	0,767	0,916
0,385	0,395	0,387	0,398	0,402	0,408	0,421	0,441	0,453	0,486	0,53	0,599	0,67	0,767	0,916
0,481	0,522	0,561	0,635	0,72	0,848	1,005	1,195	1,458	1,772	2,117	2,543	2,986	3,306	3,511
0,481	0,522	0,561	0,635	0,72	0,848	1,005	1,195	1,458	1,772	2,117	2,543	2,986	3,306	3,511
0,481	0,522	0,561	0,635	0,72	0,848	1,005	1,195	1,458	1,772	2,117	2,543	2,986	3,306	3,511
0,446	0,467	0,495	0,531	0,585	0,652	0,738	0,855	0,99	1,172	1,4	1,677	1,994	2,353	2,731
0,446	0,467	0,495	0,531	0,585	0,652	0,738	0,855	0,99	1,172	1,4	1,677	1,994	2,353	2,731
0,446	0,467	0,495	0,531	0,585	0,652	0,738	0,855	0,99	1,172	1,4	1,677	1,994	2,353	2,731
0,395	0,404	0,401	0,417	0,405	0,416	0,432	0,452	0,464	0,489	0,526	0,578	0,636	0,711	0,815
0,395	0,404	0,401	0,417	0,405	0,416	0,432	0,452	0,464	0,489	0,526	0,578	0,636	0,711	0,815
0,395	0,404	0,401	0,417	0,405	0,416	0,432	0,452	0,464	0,489	0,526	0,578	0,636	0,711	0,815

1,997	2,318	2,646	2,876	3,066	3,171	3,244	3,33	3,407	3,492	3,555	3,62	3,65	3,663	3,688
1,997	2,318	2,646	2,876	3,066	3,171	3,244	3,33	3,407	3,492	3,555	3,62	3,65	3,663	3,688
3,003	3,191	3,33	3,425	3,5	3,578	3,663	3,714	3,742	3,766	3,784	3,766	3,75	3,732	3,721
3,003	3,191	3,33	3,425	3,5	3,578	3,663	3,714	3,742	3,766	3,784	3,766	3,75	3,732	3,721
3,003	3,191	3,33	3,425	3,5	3,578	3,663	3,714	3,742	3,766	3,784	3,766	3,75	3,732	3,721
1,118	1,348	1,614	1,933	2,284	2,719	3,019	3,191	3,315	3,388	3,443	3,492	3,553	3,588	3,618
1,118	1,348	1,614	1,933	2,284	2,719	3,019	3,191	3,315	3,388	3,443	3,492	3,553	3,588	3,618
1,118	1,348	1,614	1,933	2,284	2,719	3,019	3,191	3,315	3,388	3,443	3,492	3,553	3,588	3,618
3,847	3,953	4,038	4,096	4,138	4,149	4,131	4,121	4,107	4,101	4,09	4,066	4,051	4,033	4,001
3,847	3,953	4,038	4,096	4,138	4,149	4,131	4,121	4,107	4,101	4,09	4,066	4,051	4,033	4,001
3,847	3,953	4,038	4,096	4,138	4,149	4,131	4,121	4,107	4,101	4,09	4,066	4,051	4,033	4,001
2,895	2,993	3,052	3,113	3,173	3,246	3,306	3,365	3,397	3,429	3,437	3,447	3,473	3,48	3,488
2,895	2,993	3,052	3,113	3,173	3,246	3,306	3,365	3,397	3,429	3,437	3,447	3,473	3,48	3,488
2,895	2,993	3,052	3,113	3,173	3,246	3,306	3,365	3,397	3,429	3,437	3,447	3,473	3,48	3,488
1,93	2,254	2,628	2,832	2,987	3,103	3,188	3,26	3,329	3,405	3,471	3,539	3,593	3,635	3,644
1,93	2,254	2,628	2,832	2,987	3,103	3,188	3,26	3,329	3,405	3,471	3,539	3,593	3,635	3,644
1,93	2,254	2,628	2,832	2,987	3,103	3,188	3,26	3,329	3,405	3,471	3,539	3,593	3,635	3,644
2,106	2,37	2,553	2,737	2,891	2,986	3,057	3,119	3,194	3,282	3,358	3,408	3,456	3,48	3,499
2,106	2,37	2,553	2,737	2,891	2,986	3,057	3,119	3,194	3,282	3,358	3,408	3,456	3,48	3,499
2,106	2,37	2,553	2,737	2,891	2,986	3,057	3,119	3,194	3,282	3,358	3,408	3,456	3,48	3,499
4	4,035	4,074	4,052	4,064	4,047	4,022	4,041	4,014	3,993	3,978	3,961	3,943	3,932	3,914
4	4,035	4,074	4,052	4,064	4,047	4,022	4,041	4,014	3,993	3,978	3,961	3,943	3,932	3,914
4	4,035	4,074	4,052	4,064	4,047	4,022	4,041	4,014	3,993	3,978	3,961	3,943	3,932	3,914
3,358	3,461	3,539	3,573	3,602	3,607	3,605	3,597	3,591	3,582	3,566	3,56	3,563	3,542	3,534
3,358	3,461	3,539	3,573	3,602	3,607	3,605	3,597	3,591	3,582	3,566	3,56	3,563	3,542	3,534
3,358	3,461	3,539	3,573	3,602	3,607	3,605	3,597	3,591	3,582	3,566	3,56	3,563	3,542	3,534
0,385	0,391	0,39	0,386	0,386	0,389	0,389	0,386	0,391	0,384	0,39	0,393	0,388	0,388	0,393
0,385	0,391	0,39	0,386	0,386	0,389	0,389	0,386	0,391	0,384	0,39	0,393	0,388	0,388	0,393
0,385	0,391	0,39	0,386	0,386	0,389	0,389	0,386	0,391	0,384	0,39	0,393	0,388	0,388	0,393
0,383	0,383	0,383	0,385	0,386	0,381	0,385	0,392	0,385	0,379	0,387	0,382	0,386	0,385	0,384
0,383	0,383	0,383	0,385	0,386	0,381	0,385	0,392	0,385	0,379	0,387	0,382	0,386	0,385	0,384
0,383	0,383	0,383	0,385	0,386	0,381	0,385	0,392	0,385	0,379	0,387	0,382	0,386	0,385	0,384
0,62	0,694	0,798	0,903	1,029	1,216	1,434	1,71	2,018	2,354	2,725	2,928	3,075	3,157	3,207
0,62	0,694	0,798	0,903	1,029	1,216	1,434	1,71	2,018	2,354	2,725	2,928	3,075	3,157	3,207
0,62	0,694	0,798	0,903	1,029	1,216	1,434	1,71	2,018	2,354	2,725	2,928	3,075	3,157	3,207
1,791	2,088	2,444	2,811	3,038	3,21	3,316	3,401	3,46	3,545	3,637	3,711	3,77	3,812	3,826
1,791	2,088	2,444	2,811	3,038	3,21	3,316	3,401	3,46	3,545	3,637	3,711	3,77	3,812	3,826
1,791	2,088	2,444	2,811	3,038	3,21	3,316	3,401	3,46	3,545	3,637	3,711	3,77	3,812	3,826
1,921	2,231	2,583	2,781	2,983	3,102	3,185	3,261	3,332	3,43	3,508	3,574	3,615	3,646	3,664
1,921	2,231	2,583	2,781	2,983	3,102	3,185	3,261	3,332	3,43	3,508	3,574	3,615	3,646	3,664
1,921	2,231	2,583	2,781	2,983	3,102	3,185	3,261	3,332	3,43	3,508	3,574	3,615	3,646	3,664
1,509	1,771	2,052	2,378	2,589	2,823	3,026	3,138	3,203	3,28	3,37	3,465	3,539	3,603	3,635
1,509	1,771	2,052	2,378	2,589	2,823	3,026	3,138	3,203	3,28	3,37	3,465	3,539	3,603	3,635
1,509	1,771	2,052	2,378	2,589	2,823	3,026	3,138	3,203	3,28	3,37	3,465	3,539	3,603	3,635
0,393	0,397	0,392	0,395	0,39	0,393	0,39	0,403	0,393	0,393	0,392	0,391	0,398	0,392	0,39
0,393	0,397	0,392	0,395	0,39	0,393	0,39	0,403	0,393	0,393	0,392	0,391	0,398	0,392	0,39
0,393	0,397	0,392	0,395	0,39	0,393	0,39	0,403	0,393	0,393	0,392	0,391	0,398	0,392	0,39
0,589	0,655	0,74	0,824	0,947	1,094	1,289	1,546	1,824	2,114	2,407	2,548	2,663	2,749	2,802
0,589	0,655	0,74	0,824	0,947	1,094	1,289	1,546	1,824	2,114	2,407	2,548	2,663	2,749	2,802
0,589	0,655	0,74	0,824	0,947	1,094	1,289	1,546	1,824	2,114	2,407	2,548	2,663	2,749	2,802
2,293	2,49	2,646	2,81	2,932	3,013	3,027	3,062	3,076	3,114	3,138	3,156	3,179	3,206	3,194
2,293	2,49	2,646	2,81	2,932	3,013	3,027	3,062	3,076	3,114	3,138	3,156	3,179	3,206	3,194
2,293	2,49	2,646	2,81	2,932	3,013	3,027	3,062	3,076	3,114	3,138	3,156	3,179	3,206	3,194
0,889	1,027	1,205	1,416	1,684	1,964	2,268	2,451	2,629	2,799	2,899	2,941	2,961	2,976	2,998
0,889	1,027	1,205	1,416	1,684	1,964	2,268	2,451	2,629	2,799	2,899	2,941	2,961	2,976	2,998
0,889	1,027	1,205	1,416	1,684	1,964	2,268	2,451	2,629	2,799	2,899	2,941	2,961	2,976	2,998
1,14	1,334	1,569	1,818	2,105	2,322	2,53	2,718	2,867	2,948	2,991	3,068	3,137	3,203	3,254
1,14	1,334	1,569	1,818	2,105	2,322	2,53	2,718	2,867	2,948	2,991	3,068	3,137	3,203	3,254
1,14	1,334	1,569	1,818	2,105	2,322	2,53	2,718	2,867	2,948	2,991	3,068	3,137	3,203	3,254
0,401	0,395	0,413	0,415	0,413	0,425	0,414	0,455	0,461	0,476	0,513	0,564	0,609	0,681	0,772
0,401	0,395	0,413	0,415	0,413	0,425	0,414	0,455	0,461	0,476	0,513	0,564	0,609	0,681	0,772
0,401	0,395	0,413	0,415	0,413	0,425	0,414	0,455	0,461	0,476	0,513	0,564	0,609	0,681	0,772
0,387	0,392	0,389	0,407	0,419	0,429	0,447	0,473	0,511	0,546	0,6	0,673	0,76	0,859	1,002

0,387	0,392	0,389	0,407	0,419	0,429	0,447	0,473	0,511	0,546	0,6	0,673	0,76	0,859	1,002
0,387	0,392	0,389	0,407	0,419	0,429	0,447	0,473	0,511	0,546	0,6	0,673	0,76	0,859	1,002
0,419	0,445	0,464	0,494	0,525	0,574	0,627	0,696	0,787	0,88	0,99	1,126	1,296	1,508	1,744
0,419	0,445	0,464	0,494	0,525	0,574	0,627	0,696	0,787	0,88	0,99	1,126	1,296	1,508	1,744
0,419	0,445	0,464	0,494	0,525	0,574	0,627	0,696	0,787	0,88	0,99	1,126	1,296	1,508	1,744
0,402	0,414	0,417	0,435	0,453	0,479	0,502	0,548	0,595	0,655	0,727	0,805	0,91	1,03	1,188
0,402	0,414	0,417	0,435	0,453	0,479	0,502	0,548	0,595	0,655	0,727	0,805	0,91	1,03	1,188
0,402	0,414	0,417	0,435	0,453	0,479	0,502	0,548	0,595	0,655	0,727	0,805	0,91	1,03	1,188
0,368	0,368	0,373	0,374	0,373	0,377	0,372	0,378	0,374	0,377	0,372	0,38	0,379	0,377	0,375
0,368	0,368	0,373	0,374	0,373	0,377	0,372	0,378	0,374	0,377	0,372	0,38	0,379	0,377	0,375
0,368	0,368	0,373	0,374	0,373	0,377	0,372	0,378	0,374	0,377	0,372	0,38	0,379	0,377	0,375
2,94	3,231	3,412	3,535	3,619	3,703	3,789	3,863	3,915	3,953	3,953	3,953	3,944	3,936	3,918
2,94	3,231	3,412	3,535	3,619	3,703	3,789	3,863	3,915	3,953	3,953	3,953	3,944	3,936	3,918
2,94	3,231	3,412	3,535	3,619	3,703	3,789	3,863	3,915	3,953	3,953	3,953	3,944	3,936	3,918
0,37	0,365	0,368	0,377	0,37	0,374	0,369	0,376	0,375	0,377	0,371	0,373	0,371	0,374	0,373
0,37	0,365	0,368	0,377	0,37	0,374	0,369	0,376	0,375	0,377	0,371	0,373	0,371	0,374	0,373
0,37	0,365	0,368	0,377	0,37	0,374	0,369	0,376	0,375	0,377	0,371	0,373	0,371	0,374	0,373
0,386	0,369	0,372	0,384	0,373	0,381	0,369	0,377	0,38	0,377	0,379	0,376	0,387	0,384	0,38
0,386	0,369	0,372	0,384	0,373	0,381	0,369	0,377	0,38	0,377	0,379	0,376	0,387	0,384	0,38
0,386	0,369	0,372	0,384	0,373	0,381	0,369	0,377	0,38	0,377	0,379	0,376	0,387	0,384	0,38
0,38	0,371	0,386	0,373	0,374	0,383	0,371	0,382	0,372	0,376	0,378	0,38	0,389	0,379	0,384
0,38	0,371	0,386	0,373	0,374	0,383	0,371	0,382	0,372	0,376	0,378	0,38	0,389	0,379	0,384
0,38	0,371	0,386	0,373	0,374	0,383	0,371	0,382	0,372	0,376	0,378	0,38	0,389	0,379	0,384
0,376	0,381	0,377	0,384	0,385	0,371	0,377	0,382	0,384	0,39	0,383	0,376	0,394	0,386	0,384
0,376	0,381	0,377	0,384	0,385	0,371	0,377	0,382	0,384	0,39	0,383	0,376	0,394	0,386	0,384
0,376	0,381	0,377	0,384	0,385	0,371	0,377	0,382	0,384	0,39	0,383	0,376	0,394	0,386	0,384
1,081	1,285	1,543	1,848	2,173	2,569	3,019	3,251	3,365	3,45	3,496	3,548	3,605	3,666	3,697
1,081	1,285	1,543	1,848	2,173	2,569	3,019	3,251	3,365	3,45	3,496	3,548	3,605	3,666	3,697
1,081	1,285	1,543	1,848	2,173	2,569	3,019	3,251	3,365	3,45	3,496	3,548	3,605	3,666	3,697
3,628	3,71	3,794	3,881	3,954	4,035	4,078	4,081	4,072	4,059	4,043	4,037	4,012	3,998	3,978
3,628	3,71	3,794	3,881	3,954	4,035	4,078	4,081	4,072	4,059	4,043	4,037	4,012	3,998	3,978
3,628	3,71	3,794	3,881	3,954	4,035	4,078	4,081	4,072	4,059	4,043	4,037	4,012	3,998	3,978
3,017	3,244	3,386	3,476	3,555	3,642	3,729	3,816	3,882	3,935	3,928	3,917	3,9	3,889	3,871
3,017	3,244	3,386	3,476	3,555	3,642	3,729	3,816	3,882	3,935	3,928	3,917	3,9	3,889	3,871
3,017	3,244	3,386	3,476	3,555	3,642	3,729	3,816	3,882	3,935	3,928	3,917	3,9	3,889	3,871
0,925	1,06	1,242	1,453	1,698	1,955	2,257	2,615	2,819	2,965	3,078	3,126	3,193	3,255	3,346
0,925	1,06	1,242	1,453	1,698	1,955	2,257	2,615	2,819	2,965	3,078	3,126	3,193	3,255	3,346
0,925	1,06	1,242	1,453	1,698	1,955	2,257	2,615	2,819	2,965	3,078	3,126	3,193	3,255	3,346

3,699	3,7	3,706	3,683	3,662	3,654	3,653	3,657	3,651	3,653	3,651	3,645
3,699	3,7	3,706	3,683	3,662	3,654	3,653	3,657	3,651	3,653	3,651	3,645
3,705	3,686	3,672	3,664	3,661	3,651	3,647	3,643	3,647	3,636	3,636	3,628
3,705	3,686	3,672	3,664	3,661	3,651	3,647	3,643	3,647	3,636	3,636	3,628
3,705	3,686	3,672	3,664	3,661	3,651	3,647	3,643	3,647	3,636	3,636	3,628
3,632	3,629	3,641	3,636	3,622	3,642	3,636	3,638	3,633	3,642	3,651	3,658
3,632	3,629	3,641	3,636	3,622	3,642	3,636	3,638	3,633	3,642	3,651	3,658
3,632	3,629	3,641	3,636	3,622	3,642	3,636	3,638	3,633	3,642	3,651	3,658
3,998	3,988	3,979	3,982	3,986	3,981	3,986	3,994	3,989	3,995	3,997	3,992
3,998	3,988	3,979	3,982	3,986	3,981	3,986	3,994	3,989	3,995	3,997	3,992
3,998	3,988	3,979	3,982	3,986	3,981	3,986	3,994	3,989	3,995	3,997	3,992
3,48	3,458	3,453	3,441	3,428	3,44	3,432	3,435	3,432	3,428	3,428	3,421
3,48	3,458	3,453	3,441	3,428	3,44	3,432	3,435	3,432	3,428	3,428	3,421
3,48	3,458	3,453	3,441	3,428	3,44	3,432	3,435	3,432	3,428	3,428	3,421
3,673	3,667	3,68	3,689	3,678	3,699	3,699	3,686	3,682	3,673	3,681	3,686
3,673	3,667	3,68	3,689	3,678	3,699	3,699	3,686	3,682	3,673	3,681	3,686
3,673	3,667	3,68	3,689	3,678	3,699	3,699	3,686	3,682	3,673	3,681	3,686
3,52	3,532	3,544	3,549	3,515	3,508	3,497	3,484	3,483	3,478	3,477	3,471
3,52	3,532	3,544	3,549	3,515	3,508	3,497	3,484	3,483	3,478	3,477	3,471
3,52	3,532	3,544	3,549	3,515	3,508	3,497	3,484	3,483	3,478	3,477	3,471
3,911	3,894	3,897	3,887	3,869	3,879	3,872	3,864	3,864	3,864	3,865	3,863
3,911	3,894	3,897	3,887	3,869	3,879	3,872	3,864	3,864	3,864	3,865	3,863
3,911	3,894	3,897	3,887	3,869	3,879	3,872	3,864	3,864	3,864	3,865	3,863
3,532	3,529	3,513	3,5	3,486	3,496	3,485	3,489	3,489	3,482	3,48	3,478
3,532	3,529	3,513	3,5	3,486	3,496	3,485	3,489	3,489	3,482	3,48	3,478
3,532	3,529	3,513	3,5	3,486	3,496	3,485	3,489	3,489	3,482	3,48	3,478
0,386	0,388	0,394	0,391	0,379	0,393	0,395	0,399	0,398	0,39	0,401	0,402
0,386	0,388	0,394	0,391	0,379	0,393	0,395	0,399	0,398	0,39	0,401	0,402
0,386	0,388	0,394	0,391	0,379	0,393	0,395	0,399	0,398	0,39	0,401	0,402
0,393	0,385	0,391	0,389	0,388	0,4	0,401	0,406	0,404	0,404	0,409	0,411
0,393	0,385	0,391	0,389	0,388	0,4	0,401	0,406	0,404	0,404	0,409	0,411
0,393	0,385	0,391	0,389	0,388	0,4	0,401	0,406	0,404	0,404	0,409	0,411
3,261	3,309	3,365	3,432	3,514	3,555	3,596	3,639	3,654	3,666	3,675	3,689
3,261	3,309	3,365	3,432	3,514	3,555	3,596	3,639	3,654	3,666	3,675	3,689
3,261	3,309	3,365	3,432	3,514	3,555	3,596	3,639	3,654	3,666	3,675	3,689
3,852	3,843	3,838	3,825	3,817	3,81	3,796	3,791	3,777	3,775	3,776	3,76
3,852	3,843	3,838	3,825	3,817	3,81	3,796	3,791	3,777	3,775	3,776	3,76
3,852	3,843	3,838	3,825	3,817	3,81	3,796	3,791	3,777	3,775	3,776	3,76
3,676	3,668	3,665	3,648	3,64	3,64	3,627	3,62	3,612	3,597	3,598	3,578
3,676	3,668	3,665	3,648	3,64	3,64	3,627	3,62	3,612	3,597	3,598	3,578
3,676	3,668	3,665	3,648	3,64	3,64	3,627	3,62	3,612	3,597	3,598	3,578
3,663	3,676	3,705	3,693	3,669	3,669	3,667	3,651	3,644	3,632	3,629	3,62
3,663	3,676	3,705	3,693	3,669	3,669	3,667	3,651	3,644	3,632	3,629	3,62
3,663	3,676	3,705	3,693	3,669	3,669	3,667	3,651	3,644	3,632	3,629	3,62
0,396	0,391	0,397	0,396	0,385	0,405	0,402	0,404	0,4	0,388	0,4	0,4
0,396	0,391	0,397	0,396	0,385	0,405	0,402	0,404	0,4	0,388	0,4	0,4
0,396	0,391	0,397	0,396	0,385	0,405	0,402	0,404	0,4	0,388	0,4	0,4
2,821	2,823	2,835	2,85	2,87	2,898	2,922	2,94	2,955	2,977	2,978	2,984
2,821	2,823	2,835	2,85	2,87	2,898	2,922	2,94	2,955	2,977	2,978	2,984
2,821	2,823	2,835	2,85	2,87	2,898	2,922	2,94	2,955	2,977	2,978	2,984
3,193	3,179	3,176	3,157	3,146	3,143	3,122	3,106	3,097	3,073	3,057	3,052
3,193	3,179	3,176	3,157	3,146	3,143	3,122	3,106	3,097	3,073	3,057	3,052
3,193	3,179	3,176	3,157	3,146	3,143	3,122	3,106	3,097	3,073	3,057	3,052
3,024	3,04	3,061	3,063	3,079	3,078	3,068	3,061	3,063	3,044	3,021	3,016
3,024	3,04	3,061	3,063	3,079	3,078	3,068	3,061	3,063	3,044	3,021	3,016
3,024	3,04	3,061	3,063	3,079	3,078	3,068	3,061	3,063	3,044	3,021	3,016
3,312	3,336	3,355	3,369	3,38	3,398	3,409	3,414	3,407	3,401	3,385	3,368
3,312	3,336	3,355	3,369	3,38	3,398	3,409	3,414	3,407	3,401	3,385	3,368
3,312	3,336	3,355	3,369	3,38	3,398	3,409	3,414	3,407	3,401	3,385	3,368
0,891	1,031	1,223	1,447	1,718	2,026	2,358	2,608	2,753	2,814	2,884	2,931
0,891	1,031	1,223	1,447	1,718	2,026	2,358	2,608	2,753	2,814	2,884	2,931
0,891	1,031	1,223	1,447	1,718	2,026	2,358	2,608	2,753	2,814	2,884	2,931
1,179	1,399	1,67	1,956	2,276	2,528	2,69	2,812	2,921	2,959	3,001	3,06

1,179	1,399	1,67	1,956	2,276	2,528	2,69	2,812	2,921	2,959	3,001	3,06
1,179	1,399	1,67	1,956	2,276	2,528	2,69	2,812	2,921	2,959	3,001	3,06
2,035	2,363	2,589	3,022	3,08	3,024	3,077	3,143	3,358	3,246	3,315	3,375
2,035	2,363	2,589	3,022	3,08	3,024	3,077	3,143	3,358	3,246	3,315	3,375
2,035	2,363	2,589	3,022	3,08	3,024	3,077	3,143	3,358	3,246	3,315	3,375
1,391	1,624	1,892	2,177	2,373	2,563	2,753	2,847	2,922	2,992	3,066	3,149
1,391	1,624	1,892	2,177	2,373	2,563	2,753	2,847	2,922	2,992	3,066	3,149
1,391	1,624	1,892	2,177	2,373	2,563	2,753	2,847	2,922	2,992	3,066	3,149
0,376	0,37	0,375	0,372	0,365	0,38	0,369	0,378	0,386	0,38	0,374	0,381
0,376	0,37	0,375	0,372	0,365	0,38	0,369	0,378	0,386	0,38	0,374	0,381
0,376	0,37	0,375	0,372	0,365	0,38	0,369	0,378	0,386	0,38	0,374	0,381
3,923	3,912	3,904	3,891	3,866	3,862	3,841	3,822	3,804	3,791	3,784	3,777
3,923	3,912	3,904	3,891	3,866	3,862	3,841	3,822	3,804	3,791	3,784	3,777
3,923	3,912	3,904	3,891	3,866	3,862	3,841	3,822	3,804	3,791	3,784	3,777
0,383	0,373	0,371	0,375	0,369	0,376	0,373	0,381	0,38	0,375	0,38	0,382
0,383	0,373	0,371	0,375	0,369	0,376	0,373	0,381	0,38	0,375	0,38	0,382
0,383	0,373	0,371	0,375	0,369	0,376	0,373	0,381	0,38	0,375	0,38	0,382
0,381	0,379	0,384	0,379	0,376	0,378	0,377	0,385	0,38	0,381	0,379	0,384
0,381	0,379	0,384	0,379	0,376	0,378	0,377	0,385	0,38	0,381	0,379	0,384
0,381	0,379	0,384	0,379	0,376	0,378	0,377	0,385	0,38	0,381	0,379	0,384
0,379	0,38	0,38	0,378	0,372	0,387	0,383	0,389	0,39	0,379	0,383	0,385
0,379	0,38	0,38	0,378	0,372	0,387	0,383	0,389	0,39	0,379	0,383	0,385
0,379	0,38	0,38	0,378	0,372	0,387	0,383	0,389	0,39	0,379	0,383	0,385
0,384	0,385	0,388	0,382	0,383	0,39	0,394	0,39	0,39	0,383	0,388	0,394
0,384	0,385	0,388	0,382	0,383	0,39	0,394	0,39	0,39	0,383	0,388	0,394
0,384	0,385	0,388	0,382	0,383	0,39	0,394	0,39	0,39	0,383	0,388	0,394
3,732	3,747	3,77	3,756	3,744	3,708	3,693	3,688	3,666	3,655	3,635	3,635
3,732	3,747	3,77	3,756	3,744	3,708	3,693	3,688	3,666	3,655	3,635	3,635
3,732	3,747	3,77	3,756	3,744	3,708	3,693	3,688	3,666	3,655	3,635	3,635
3,95	3,925	3,916	3,893	3,882	3,87	3,852	3,837	3,835	3,815	3,802	3,797
3,95	3,925	3,916	3,893	3,882	3,87	3,852	3,837	3,835	3,815	3,802	3,797
3,95	3,925	3,916	3,893	3,882	3,87	3,852	3,837	3,835	3,815	3,802	3,797
3,853	3,827	3,807	3,787	3,757	3,752	3,738	3,735	3,72	3,699	3,696	3,686
3,853	3,827	3,807	3,787	3,757	3,752	3,738	3,735	3,72	3,699	3,696	3,686
3,853	3,827	3,807	3,787	3,757	3,752	3,738	3,735	3,72	3,699	3,696	3,686
3,418	3,468	3,527	3,549	3,562	3,586	3,575	3,574	3,565	3,548	3,529	3,514
3,418	3,468	3,527	3,549	3,562	3,586	3,575	3,574	3,565	3,548	3,529	3,514
3,418	3,468	3,527	3,549	3,562	3,586	3,575	3,574	3,565	3,548	3,529	3,514