

Caracterización molecular y funcional de un sistema conjugativo plasmídico presente en *Sinorhizobium meliloti* simbiote de alfalfa.

María de los Ángeles Giusti

Director: Prof. Dr. Antonio Lagares

Codirector: Prof. Dr. Mariano Pistorio

Trabajo de Tesis Doctoral

Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Exactas
Departamento de Ciencias Biológicas



2010

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 de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata bajo la dirección del Profesor Dr. Antonio Lagares y la codirección del Profesor Dr. Mariano Pistorio

A mis hijos, Álvaro y Julián

por ser lo mejor que me pasó en la vida.

Mi reconocimiento:

Al Instituto de Biotecnología y Biología Molecular (IBBM) y a la Facultad de Ciencias Exactas, por haberme brindado el ámbito propicio para desarrollar este trabajo de Tesis Doctoral.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT), por el otorgamiento de las becas que posibilitaron mi dedicación a la Investigación Científica.

A la empresa BIAGRO S.A., por permitir y colaborar con la implementación del ensayo a campo realizado en este trabajo de Tesis Doctoral.

Al Dr. Antonio Lagares por recibirme en su laboratorio, por dirigir tenazmente mi trabajo de Tesis y por poner a mi disposición los elementos necesarios para llevar adelante mi trabajo.

Al Dr. Mariano Pistorio por codirigir mi trabajo en forma crítica.

Mi agradecimiento:

A Tony, por su confianza y apoyo. Por aceptar mis limitaciones, por alentarme y sobre todo por estar siempre, dentro y fuera del laboratorio.

A Mariano, por su paciencia, por su guía y por interpretar lo que quería decir.

A Yani, por acordarse de mí en el momento indicado.

A Floppy, por su ayuda invaluable, por ser mi válvula de escape, y fundamentalmente, por ser un ejemplo de trabajo y de persona. Qué bueno que volviste!

A Mauri, por responder a todas y cada una de mis preguntas, por acompañarme siempre a los muestreos de campo, por las horas frente a la compu, por las imágenes y portada de esta Tesis y por su ayuda infinita.....gracias por todo tu compañerismo y amistad.

A Walter, por transmitir optimismo y por hacerme reír.

A Gonza, por encargarse de “esas” tareas de laboratorio a la que todos le escapan.

A Carla y Eugenia, por su respeto, por las horas dedicadas de trabajo, por “ponerse la camiseta del lab” y por toda su energía.

A la flaca (Bottero), por darme calma con sus Angita! Y por recordarme lo verdaderamente importante.

A Emi, Augusto, Matías, Fede y Juli, por tantas horas compartidas, por escucharme siempre (o por lo menos simularlo), por cooperar con mi proteómica, por su compañerismo y por formar parte de un grupo de trabajo que lo hace todo posible. Gracias de verdad.

A Darío, por las charlas y consejos, por las risas y por su amistad. Vamos Pincha todavía!

A Eugenia, Ariel y Daniela por los oportunos mates y galletitas.

A Celina, por la inspiración transmitida en la cursada de Bioquímica II y por reemplazarme en la cátedra, en la etapa más decisiva.

A Pity, por iniciarme en la docencia, por sus valiosos consejos, por buscarle la vuelta, por todo el tiempo dedicado y por no retrucarme que todavía no conozco a Clarita!

A Cove, por su sencillez y sensibilidad, por la pregunta de cada día y porque aquel Capitán del Espacio que marcó la diferencia.

A Julita, JPG, Flor, Nacho y Elías, por las horas de flujo cedidas y por hacerme sentir uno más.

A Leti, Carito, Ricky, Edu, Marina, Carina, Colo, Mandi y Gabo, por su compañerismo, buena predisposición y por hacer del IBBM un lindo lugar de trabajo.

A los R₄, por su buena onda.

A Ma. Laura García, por sus esfuerzos por cuidar mi silueta.

A Daniela H. y Aníbal, por su confianza.

A Rubén, por todos los mandados.

A Nidia y Ceci, por los nódulos procesados.

A Diego Posik y Luciana Villaverde, por ayudarme en los ensayos de actividad.

A mis mejores amigas: Vanina Favale y Jimena Pérez Alzueta, por mantenerse cerca aún lejos y por aceptarme como soy.

A mis amigos de la vida: Rosarito Mammoni, Lucas Gambarotta, Milagros de Seta, Ezequiel Galán, Rosario Lima y Andrés Mendoza Peña por tratar de entender de qué se trata todo esto y por hacerme la vida más divertida.

A mis amigas: Marialaura D' Gregorio, Carolina Blanksman, Iliana Zamora, Luz Font, Sofía Gambarotta y Marisa Pereyra, por tantos buenos ratos compartidos y por cuidar de mis hijos como si fueran suyos.

A mi prima y amiga Mariju, por ser una persona clave en toda mi carrera.

A mi suegro, por no abandonarnos en el momento más difícil.

A Eduardo Repetto, por adoptar nuevos nietos que lo llevan de aquí para allá.

A mi familia, por su respaldo constante.

A mi MAMÁ, por enseñarme a remar, por ser mi compañera y sencillamente, porque sin ella sería imposible.....

Y por último, porque lo mejor merece un espacio especial. A Diego, por aguantar mis malos ratos y manías, por apoyarme, por valorarme y por amarme como nadie.

Abreviaturas

ADN:	Ácido Desoxirribonucleico	PCR:	<i>“Polymerase Chain Reaction”</i> , reacción en cadena de la polimerasa.
Ap:	Ampicilina	pH:	Potencial Hidrógeno
Aprox.:	Aproximadamente	R:	célula receptora
BrEt:	Bromuro de etidio	Rnasa:	Ribonucleasa
°C:	Grados Celsius	rpm:	Revoluciones por minuto
Ca:	Calcio	p/v:	gramos/100ml
Cm:	cicloheximida	Sp:	Espectinomicina
D:	célula donadora	SDS:	Dodecil sulfato de sodio
D.O.:	Densidad Óptica	T:	célula transconjugante
EtOH:	alcohol etílico	TBE:	Tris 89mM, EDTA Na ₂ 2,5mM, BO ₃ H ₃ 89mM, pH=8,2
Fig.:	Figura	Tc:	Tetraciclina
g/grs:	gramo/gramos	TE:	Solución tampón (Tris50mM, EDTA20mM, pH=8,0)
h:	Hora	Tn5:	Transposón Tn5
Ha:	Hectárea	TY:	Medio de cultivo triptona extracto de levadura
IS:	Secuencia de Inserción	ufc:	unidades formadoras de colonias bacterianas.
Kpb:	Kilopares de bases	UV:	Ultravioleta
Km:	Antibiótico Kanamicina	v/v:	ml/100ml
KV:	Kilo voltios	Wt:	Tipo salvaje
l:	Litro	X-gal:	5-bromo-4cloro-3indolil-β-galactopiranósido
mts:	Metros	μg:	Microgramo
M:	Molar	μM:	Micromolar
mg:	Miligramo	μl:	Microlitro
min.:	Minuto	%:	Porcentaje
ml:	Mililitro		
mm:	Milímetro		
mM:	Milimolar		
nM:	Nano Molar		
N ₂ :	Nitrógeno.		
ng:	Nanogramo		
nm:	Nanometro		
Nm:	neomicina		
NMP:	Recuento de rizobios por medio del Número Más Probable.		
pb:	Pares de bases		
PBS:	“Phosphate Buffer saline”, solución salina.		

Índice.

CAPÍTULO I	1
Introducción	1
I.1. Características genómicas.	3
I.2. Plásmidos	5
I.2.1. Los plásmidos simbióticos.	6
I.2.2. Plásmidos no simbióticos.	8
I.3. Transferencia horizontal de genes (HGT).	10
I.3.1. Mecanismos de transferencia genética en bacterias.	12
I.3.3. Plásmidos crípticos transmisibles en <i>S. meliloti</i> .	23
I.4. Replicación y estabilidad de plásmidos de rizobios.	25
Objetivos	29
CAPÍTULO II	33
Materiales y Métodos	33
II.1. Procedimientos microbiológicos	35
II.1. Cepas bacterianas y plásmidos.	35
II.1.2. Medios de cultivo, condiciones de crecimiento y conservación de los microorganismos.	36
II.1.3. Obtención de mutantes espontáneos resistentes a antibióticos.	38
II.1.4. Métodos de conjugación.	39
II.1.5. Preparación de células electrocompetentes. Electrotransformación de <i>E.coli</i> .	39
II.2. Técnicas de biología molecular.	40
II.2.1. Reacción en cadena de polimerasa (PCR).	40
II.2.2. Oligonucleótidos.	41
II.2.3. Preparación de ADN plasmídico.	42
II.2.4. Purificación del plásmido pSmeLPU88b. Técnica Juanin et al., 1981.	42

II.2.5. Extracción de ADN genómico.	43
II.2.6. Determinación de la concentración de ADN.	44
II.2.7. Tratamientos enzimáticos del ADN	44
II.2.8. Electroforesis de ADN.	44
II.2.9. Construcción de la biblioteca parcial de los plásmidos pLPU88a y pLPU88b.	46
II.2.10. Clonado	46
II.2.10.1. Clonado de la zona intergénica (INT) del plásmido pLPU88b. Localización posible del origen de transferencia (<i>oriT</i>).	46
II.2.10.2. Clonado de los fragmentos C3, C5 y Asm del plásmido pLPU88b. Determinación de la secuencia mínima con capacidad de promover la movilización.	47
II.2.10.3. Clonado de las regiones de replicación del plásmido pSmeLPU88b.	48
II.2.11. Mutagénesis	49
II.2.11.1. Interrupción del gen <i>mobZ</i> por simple recombinación homóloga.	49
II.2.11.2. Interrupción de los genes <i>repABC</i> y <i>repC</i> por simple recombinación homóloga.	50
II.2.12. Expresión y purificación de proteínas.	50
II.2.12.1. Sobre-expresión y purificación de MobZ.	50
II.2.12.2. Sobre-expresión y purificación del extremo N-terminal de MobZ.	51
II.2.13. Análisis de proteínas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida.	51
II.2.14. Retardo electroforético en gel de poliacrilamida (EMSA)	52
II.2.15. Determinación de la habilidad de las regiones de replicación para mantener estable un plásmido suicida en rizobios.	52
II.2.16. Secuenciamiento de ADN.	52
II.3. Ensayos con plantas.	53
II.3.1. Plantas, esterilización de semillas en superficie y germinación.	53
II.3.2. Condiciones de cultivo.	53
II.3.3. Estimación del número de microorganismos autóctonos noduladores de alfalfa presentes en el suelo en estudio. Técnica del número más probable (NMP).	53
II.3.4. Determinación de pH en suelos.	54

II.4. Ensayo a campo.	54
II.4.1. Siembra e inoculación de la cepa <i>SmeLPU88AII</i> .	54
II.4.2. Recolección y procesamiento de nódulos.	55
II.4.3. Determinación de la presencia del plásmido <i>pSmeLPU88b</i> en bacterias sensibles a Sm aisladas de nódulos provenientes de plantas trampa.	55
II.5. Ensayo de microcosmos.	56
II.5.1. Procesamiento de las muestras. Recuentos bacterianos en microcosmos	56
II.5.2. Recuentos bacterianos en rizósfera.	57
CAPÍTULO III	59
III.1. Introducción.	61
III.2. Purificación de los plásmidos <i>pSmeLPU88b::Tn5</i> y <i>pSmeLPU88a::Tn5B13</i> .	62
III.3. Construcción de una biblioteca parcial del plásmido <i>pSmeLPU88b::Tn5</i> . Secuenciamiento de la misma.	63
III.4. Organización genética del plásmido <i>pSmeLPU88b</i> .	66
III.5. Identificación de funciones conjugativas (Mpf, T4SS) en el plásmido <i>pSmeLPU88a</i> .	69
CAPÍTULO IV	73
IV.1. Introducción: Las relaxasas y el proceso conjugativo. El gen <i>mobZ</i> presente en el plásmido <i>pSmeLPU88b</i> .	75
IV.3. Fenotipo de movilización de un mutante <i>mobZ</i> insercional diseñado para generar un producto MobZ con 300 aminoácidos del extremo N terminal.	80
IV.4. Caracterización bioquímica de la hipotética relaxasa MobZ.	81
IV.4.1. Expresión y purificación de la proteína MobZ.	81
IV.4.2. Ensayos para evaluar el reconocimiento del <i>oriT</i> por la proteína MobZ Δ Not.	84
IV.5. Búsqueda de secuencias homólogas a <i>mobZ</i> presentes en aislamientos de <i>S. meliloti</i> proveniente de aislamientos locales.	86
IV.6. Localización del <i>oriT</i> del plásmido <i>pLSmeLPU88b</i> en la región intergénica entre los genes <i>parA</i> y <i>mobC</i> .	88
IV.7. Búsqueda de una secuencia reducida dentro del fragmento INT con capacidad de promover la movilización conjugativa de plásmidos en la cepa LPU88.	90
CAPÍTULO V	97

V.1. Introducción.	99
V.2. Mapa físico de las regiones de replicación del plásmido pLPU88b.	100
V.2.1. Análisis comparativo con otros miembros de las familias <i>repABC</i> y <i>repC</i> .	102
V.3. Caracterización funcional de los dos módulos de replicación del plásmido pLPU88b.	104
V.4. Identificación de Sistemas de adicción plasmídica.	107
CAPÍTULO VI	111
VI.1. Introducción.	113
VI.2. Inoculación de alfalfa con <i>S. meliloti</i> en condiciones de campo. Búsqueda de eventos de transferencia plasmídica a rizobios alóctonos que nodulen plantas trampa. Objetivo y diseño del ensayo.	114
VI.3. Ensayo de microcosmos con muestras de suelo para la búsqueda de eventos de transferencia del plásmido pSmeLPU88b desde una cepa de <i>S. meliloti</i> a bacterias receptoras introducidas al suelo. Objetivos y diseño del ensayo.	118
VI.3.1. Evaluación de la transferencia del plásmido pSmeLPU88b::Tn5 en la masa de suelo.	119
VI.3.2. Evaluación de la transferencia del plásmido pSmeLPU88b::Tn5 en el ambiente y suelo rizosférico.	122
Referencias Bibliográfica	133

Índice de Figuras.

Fig. III.1: Patrón de restricción de los plásmidos purificados.	62
Fig. III.2: Estrategia general de <i>plasmid walking</i> .	65
Fig. III.3: <i>Contigs</i> construidos luego del secuenciamiento realizado sobre el plásmido pLPU88b.	66
Fig. III.4: Regiones Dtr de plásmidos relacionados.	68
Fig. III.5: Alineamiento de la región que contiene al <i>oriT</i> de distintos plásmidos.	69
Fig. III.6: Mapa genético de la región de transferencia del plásmido pSmeLPU88a.	70
Fig. III.7: Mapa genético de las regiones Dtr y Mpf de los distintos sistemas conjugativos plasmídicos de rizobios.	71
Fig. IV.1: Secuencia nucleotídica completa de <i>mobZ</i> y de su producto propuesto de traducción.	76
Fig. IV.2: Motivos I, II y III presentes en la proteína MobZ.	78
Fig. IV.3: Análisis de distancias para establecer la posición filogenética de MobZ respecto de otras relaxasas plasmídicas.	79
Fig. IV.4: Esquema de la integración del vector pB6 Δ Sac en el gen <i>mobZ</i> .	80
Fig. IV.5: SDS-PAGE correspondiente a la evaluación de la expresión de la proteína MobZ-Hisx6 en la cepa <i>E. coli</i> BL21.	82
Fig. IV.6: SDS-PAGE correspondiente a la evaluación de la purificación nativa de la proteína MobZ-Hisx6.	82
Fig. IV.7: SDS-PAGE correspondiente a la evaluación de la purificación en condiciones desnaturalizantes en presencia de urea 8M de la proteína MobZ-Hisx6 obtenida de la cepa <i>E. coli</i> BL21.	83
Fig. IV.8: Secuencia y localización de los 2 péptidos trípticos comunes a los productos de expresión de 45KDa y 90KDa, y a la proteína MobZ detectados por análisis UV-MALDI-TOF.	83
Fig. IV.9: SDS-PAGE correspondiente a la evaluación de la purificación de la proteína MobZ Δ Not-Hisx6 en la cepa <i>E. coli</i> BL21.	84
Fig. IV.10: Análisis de la movilidad electroforética en gel de poliacrilamida del producto de PCR INT y del oligonucleótido POT en ausencia y en presencia de extractos de MobZ Δ Not.	85
Fig. IV.11: Esquema del ensayo utilizado para evaluar si el fragmento INT es reconocido como origen de transferencia conjugativo en la cepa LPU88.	89

Fig. IV.12: Región intergénica <i>parAlike</i> – <i>mobC</i> (INT) y esquema de los fragmentos internos a la misma generados por PCR y clonados en el vector pBBR1MCS5 para evaluar su movilización conjugativa desde la cepa LPU88.	90
Fig. V.1: Solapamiento entre la región de replicación del plásmido pSmeLPU88b y la región de replicación reportada para el plásmido pMBA9.	100
Fig. V.2: Alineamiento de regiones intergénicas <i>repB-repC</i> codificantes de posibles ctARNs.	102
Fig. V.3: Análisis filogenético de las distintas replicasas reportadas.	103
Fig. V.4: Habilidad de los plásmidos pGrepABC y pKrepC para mantener la replicación de un vector suicida en <i>Sme2011</i> .	105
Fig. V.5: Habilidad de los plásmidos pGrepABC y pKrepC para desplazar al pLPU88b.	106
Fig. V.6: Comportamiento de ambos sistemas de replicación en el entorno de la cepa <i>Sme2011</i> .	106
Fig. V.7: Estructura genética propuesta para el sistema de adición plasmídica del plásmido pSmeLPU88b.	107
Fig. VI.1: Esquema del ensayo a campo diseñado para la búsqueda, en nódulos de alfalfa, de transconjugantes alóctonos que hayan recibido el plásmido pSmeLPU88b desde la cepa inoculada <i>S. meliloti</i> LPU88AII.	115
Fig. VI.2: Proporción de los nódulos de alfalfa portadores de rizobios resistentes a estreptomycin colectados en los muestreos M1, M2 y M3.	117
Fig. VI.3: Fotografía del sistema de microcosmos utilizado.	120
Fig. VI.4: Evolución en los microcosmos del recuento de la cepa dadora <i>S. meliloti</i> LPU88 (pSmeLPU88b::Tn5), de la receptora <i>A. tumefaciens</i> UBA PF2 (gráfica en panel A) , y de los transconjugantes (tabla en panel panel B) a lo largo de 35 días post inoculación.	121
Fig. VI.5: Caracterización del clon resistente a Nm y Rif aislado de la rizósfera de una planta de alfalfa 15 días luego de la inoculación de los microcosmos con la cepa dadora <i>S. meliloti</i> LPU88 (pSmeLPU88b::Tn5) (Nm ^r) y la receptora <i>A. tumefaciens</i> UBA PF2 (Rif ^r).	124

Índice de tablas

Tabla II-1: Cepas bacterianas más usadas.	35
Tabla II-2: Plásmidos utilizados.	35
Tabla II-3: Oligonucleótidos.	41
Tabla III-1: Análisis <i>in silico</i> de las secuencias de los clones de la biblioteca del plásmido pLPU88b.	64
Tabla IV-1: Evaluación de la presencia de secuencias <i>mobZ</i> homólogas en la colección de cepas de <i>S. meliloti</i> .	87
Tabla IV-2: Cuantificación de la transferencia de los plásmidos pC3, pC5 y pSmeLPU88b::Tn5 desde la cepa LPU88 a la cepa receptora <i>A. tumefaciens</i> UBA PF2.	91
Tabla V-1: Comparación de secuencias de la región <i>rep</i> del plásmido pLPU88b contra el GenBank.	101
Tabla VI-1: Recuento de rizobios donadores, de <i>A. tumefaciens</i> receptores, y de transconjugantes en la rizósfera de plantas de alfalfa descalzadas de los suelos de microcosmos inoculados.	123

CAPÍTULO I

Introducción

Los géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Ensifer* (*Sinorhizobium*), *Mesorhizobium* y *Azorhizobium*, pertenecientes a la familia Rhizobiaceae, son capaces de desarrollar una simbiosis fijadora de nitrógeno con plantas leguminosas. Entre las características importantes de estas asociaciones se destacan los altos niveles de nitrógeno molecular fijado, la eficiencia del proceso y el interés económico y ecológico de las plantas involucradas. La fijación de nitrógeno tiene lugar en estructuras especializadas, los nódulos originados en la leguminosa como consecuencia de una organogénesis inducida por el microsimbionte. En los nódulos, las bacterias se diferencian en bacteroides, los que utilizan los fotosintatos como fuente de energía y poder reductor para llevar a cabo la reducción del N₂ a amonio. Luego de este proceso, el amonio es incorporado al metabolismo de la planta. Todos estos procesos involucran una interacción muy compleja y ordenada entre la bacteria y la planta huésped (Fang, Y. y A. M. Hirsch, 1998, Klein, S., et al., 1988). Si bien la mayoría de los rizobios son capaces de establecer una relación simbiótica, se han aislado recientemente especies rizobianas no simbióticas (Segovia, L., et al., 1991). Los rizobios son bacterias que habitan el suelo, difíciles de aislar directamente del mismo o de la rizósfera que usualmente se aíslan de las plantas leguminosas con las cuales establecen una simbiosis fijadora de nitrógeno.

Los rizobios antiguamente se clasificaban en grupos de inoculación, es decir, de acuerdo a sus habilidades específicas de infectar y fijar N₂ en un determinado conjunto de leguminosas (Fred, E. B., et al., 1937). Más recientemente, las especies bacterianas se comenzaron a delinear utilizando análisis fenotípicos, genotípicos y filogenéticos. La taxonomía rizobiana ha experimentado una revisión substancial y aunque se encuentra todavía en discusión. En la actualidad los rizobios no forman un grupo único taxonómico. En cambio se distribuyen en los grupos de α y β de proteobacteria. Además, los rizobios se encuentran entremezclados con patógenos de plantas y animales, bacterias fotosintéticas y muchas bacterias no simbióticas están más estrechamente relacionadas con rizobios que los rizobios entre sí.

I.1. Características genómicas.

Los genomas rizobianos son complejos, están compuestos por un cromosoma o “core” y por componentes “accesorios” correspondientes a ADN extracromosomal, que se presenta en forma de plásmidos heterogéneos en cuanto a su tamaño, número y función.

El incremento del secuenciamiento de los genomas pertenecientes a las α -proteobacterias ha permitido realizar estudios de genómica comparativa entre muchas

especies. Ha sido reportado el secuenciamiento completo de muchos genomas. En la actualidad se cuenta con el genoma completo de: *Mesorhizobium loti* MAFF303099 (Kaneko, T., et al., 2000); *Sinorhizobium meliloti* 1021 (Galibert, F., et al., 2001); *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 (Kaneko, T., et al., 2002) y *A. tumefaciens* C58 (Goodner, B., et al., 2001), *B. japonicum* BTAI1, y ORS278; *Rhizobium sp.* NGR234 (Schmeisser, C., et al., 2009); *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 3841 (Young, J. P., et al., 2006); *R. etli* CFN42 (Gonzalez, V., et al., 2010) y CIAT652; *Azorhizobium caulinodans* ORS571 (Lee, K. B., et al., 2008); *S. medicae* WSM419 y *Mesorhizobium sp.* BNC1, entre otros. No todos han sido publicados pero sus secuencias se encuentran disponibles en las bases de datos.

Del análisis de las secuencias se ha encontrado que los cromosomas son marcadamente conservados en cuanto a su composición genética y organización (independientemente de las diferencias de tamaño), su contenido de G+C es alto y posee una filogenia consistente. Mientras que los plásmidos, son de naturaleza y distribución muy variada, bajo contenido de G+C y aunque pueden existir genes comunes entre ellos o entre ellos y el cromosoma, en general tienen diferente composición nucleotídica y pueden no presentar sintenia aún cuando se comparan especies filogenéticamente cercanas (Gonzalez, V., et al., 2010). Análisis de este tipo han revelado que los cromosomas de *Mesorhizobium loti*, *Sinorhizobium meliloti* y *Agrobacterium tumefaciens* tienen más del 50% de genes ortólogos en común como también la existencia de una clara sintenia entre el cromosoma circular de *A. tumefaciens* y el de *S. meliloti*. Contrariamente, en la cepa recientemente secuenciada *R. leguminosarum* bv. *viciae* 3841 (Rlv3841), al menos 2/3 de sus genes son considerados accesorios debido a que no son universalmente compartidos con especies relacionadas (Young, J. P., et al., 2006).

Los plásmidos presentes en rizobios poseen tamaños que oscilan entre las 100Kpb y 2 Mpb, y pueden hallarse hasta 10 plásmidos diferentes dentro de la misma célula. Tal es así, que en muchos rizobios, como es el caso de *R. etli*, el contenido de ADN plasmídico constituye un alto porcentaje del ADN bacteriano total (Gonzalez, V., et al., 2006). Es común que los genes esenciales para el proceso simbiótico (nodulación y fijación de nitrógeno) se encuentren localizados, en compartimientos específicos (SGC, *Symbiotic Genome Compartments*), ya sea como replicones independientes (plásmidos simbióticos, pSym) o en islas simbióticas dentro del cromosoma (Mercado-Blanco, J. y N. Toro, 1996). Además de los pSym, los rizobios portan los plásmidos denominados no simbióticos o crípticos debido a que sus genes no son indispensables para la simbiosis, o a que su función no ha sido definida aún (Mercado-Blanco, J. y N. Toro, 1996).

Como mencionamos previamente, el común denominador de la composición genética de los plásmidos es su variabilidad. A pesar de ello, la obtención de la secuencia de gran cantidad de plásmidos permitió observar la presencia de regiones homólogas muy

conservadas, aún en el caso de plásmidos aislados de bacterias poco relacionadas. En general se observa que los genes necesarios para la simbiosis están bien conservados en las SGC, mientras que genes ortólogos no involucrados en la simbiosis están distribuidos en plásmidos no simbióticos o en el cromosoma. Otra característica común de los SGC es la presencia de sistemas de transporte conocidos como Sistemas de Secreción Tipo III y Tipo IV.

Algunos pSym comparten una importante relación de secuencias con plásmidos Ti de *Agrobacterium tumefaciens*. Esta observación sugiere la presencia de eventos de transferencia y recombinación muy activos entre cepas ya sean de un mismo, o diferentes género y especie.

Además, la existencia de regiones muy conservadas sugiere la importancia de las mismas, ya sea para la mejor adaptabilidad de las bacterias a un nicho dado, o como simples mediadores de eventos de recombinación que conducen a la generación de nuevas estructuras plasmídicas.

La gran cantidad de información que poseen los plásmidos y el impacto que el contenido plasmídico ejerce sobre la especiación bacteriana hacen de los plásmidos herramientas útiles para el estudio de la evolución y la genómica rizobiana.

Una característica adicional, que involucra tanto a plásmidos como a cromosomas, es la presencia de numerosas secuencias de inserción (IS), pequeñas entidades móviles (tamaño < 2,5kb) de ADN que codifican solamente las funciones requeridas para su transposición. Estas IS están ampliamente distribuidos en bacterias Gram negativas y positivas (Galas, D. J. y M. Chandler, 1989, Kleckner, N., 1981, Murphy, E., 1989), al punto que en ciertos casos, más de 15 copias de la misma IS pueden estar presente en el genoma (Simon, R., et al., 1991). Debido a que las IS se encuentran en número y localización variables las mismas pueden ser utilizadas como marcadores en la tipificación de bacterias. Así, las cepas pueden ser agrupadas de acuerdo a la presencia/ausencia de determinadas IS (*handprint*) (Schneiker, S., et al., 1999) o al patrón de hibridación de una IS dada con el ADN genómico de la bacteria digerido con una endonucleasa de restricción (*IS-fingerprint*) (Wheatcroft, R. y R. J. Watson, 1988). En particular, el genoma de *Sinorhizobium meliloti*, contiene baja abundancia de estos elementos y su distribución es asimétrica localizándose mayormente en el plásmido simbiótico pSymA, especialmente cerca de los genes simbióticos.

I.2. Plásmidos

Como se describió en la sección precedente, los rizobios poseen gran cantidad de ADN extracromosómico, generalmente en forma de plásmidos, la mayoría de gran tamaño y

que pueden poseer una función conocida (plásmidos simbióticos) o no (plásmidos crípticos). Estos plásmidos debido a su tamaño y a su frecuente bajo número de copias son más difíciles de aislar que los plásmidos pequeños utilizados como vectores de clonado. Varias técnicas diferentes han sido utilizadas para visualizar y aislar plásmidos de los miembros de la familia Rhizobiaceae. Muchas de estas técnicas están basadas en la utilización de condiciones de lisis alcalinas que permiten separar el ADN plasmídico del cromosomal (Hirsch, P. R., et al., 1980, Kado, C. I. y S. T. Liu, 1981, Ledebor, A. M., et al., 1976). Todas estas técnicas usadas a escala preparativa resultan en el aislamiento, con muy buenos rendimientos, de varios tipos de plásmido. Sin embargo en el caso de plásmidos de tamaño mayor a 300 Kpb dichas metodologías no resultan de utilidad. Para estos casos se puede utilizar una técnica desarrollada por Schwinghamer et al. (Schwinghamer, M. W. y R. J. Shepherd, 1980) que permite obtener el ADN de megaplásmidos intactos (se considera megaplásmido cuando su peso molecular supera los 1000MDa) (Burkhardt, B., et al., 1987). En cuanto a la observación de la presencia y la estimación del tamaño de plásmidos de gran tamaño, la metodología más conveniente es la desarrollada por Eckhardt et al. (Eckhardt, T., 1978). Esta se basa en la lisis de las células, con la consecuente liberación de los plásmidos intactos (el daño físico, por fuerzas de cizalla, es mínimo en estas condiciones) dentro de las fosas de un gel de agarosa (lisis *in situ*) en el cual estos serán separados electroforéticamente. Actualmente, existen varias modificaciones a la técnica original (Banfalvi, Z., et al., 1981, Rosenberg, C., et al., 1981, Wheatcroft, R., et al., 1990). La utilización de las técnicas de lisis *in situ* permite de esta forma, la visualización de replicones desde unas pocas Kpb hasta 3000Kpb (Hynes, M. F. y T. M. Finan, 1997). En su conjunto, el desarrollo de estas técnicas permitió el aislamiento y purificación, y la consecuente identificación y caracterización molecular y funcional de gran variedad de plásmidos.

1.2.1. Los plásmidos simbióticos.

Los plásmidos simbióticos (pSym) son aquellos que contienen genes esenciales para el establecimiento de un estado simbiótico completo. Entre otros, estos plásmidos codifican los genes necesarios para la nodulación, genes ***nod***; para la nitrogenasa, genes ***nif***; para la fijación de nitrógeno, genes ***fix***; para la síntesis de polisacáridos, genes ***exo/lps*** (Banfalvi, Z., et al., 1981, Finan, T. M., et al., 1988, Hirsch, P. R., et al., 1980, Hooykaas, P. J. J. S., F. G. M. y R. A. Schilperoort, 1982, Huguet, T. R., C., et al., 1983, Hynes, M. F., et al., 1986, Johnston, A. W. B., et al., 1978, Nuti, M. P., et al., 1979, Rosenberg, C., et al., 1981). Los pSym presentan además varios genes no simbióticos, entre ellos un gran número de genes involucrados en procesos catabólicos (Finan et al., 1988, Watson et al., 1988), de utilización de fosfonato (Bardin, S., et al., 1996), genes de

producción de bacteriocinas (Hirsch, P. R., et al., 1980), genes para la producción de melanina (Hynes, M. F., et al., 1988, Lamb, J. W., et al., 1982, Mercado-Blanco, J. y J. Olivares, 1993), etc. En las especies de *M. loti* y *B. japonicum*, los genes simbióticos se encuentran en islas simbióticas en el ADN cromosomal.

El secuenciamiento completo del genoma de *Sinorhizobium meliloti* 1021 (6,7Mpb), mostró la organización génica correspondiente a los tres replicones del rizobio (pSymA, pSymB, cromosoma) y permitió postular la función de aproximadamente el 60% de los genes. Sus dos megaplásmidos (pSymA y pSymB) de 1350 y 1680 Kpb respectivamente, representan alrededor del 40% del genoma de *S. meliloti* (Barnett, M. J., et al., 2001, Finan, T. M., et al., 2001, Galibert, F., et al., 2001). En el caso del mayor de los megaplásmidos, pSymB, ha sido demostrado que porta los genes para la síntesis de exopolisacáridos (*exo*) y lipopolisacáridos (*lps*), biosíntesis de tiamina (*thi*), el transporte de fosfato de alta afinidad, y el transporte de ácidos dicarboxílicos (*dct*) (Bardin, S., et al., 1996, Charles, T. C. y T. M. Finan, 1991, Glazebrook, J. y G. C. Walker, 1989, Hynes, M. F., et al., 1986, Watson, R. J., et al., 1988, Yarosh, O. K., et al., 1989) así como la identificación y localización de varios loci catabólicos (Charles, T. C. y T. M. Finan, 1991, Charles, T. C. y T. M. Finan, 1990) posiblemente involucrados en la metabolización de compuestos presentes en el suelo.

Los hallazgos genéticos descritos para el pSymA comprenden a los genes involucrados en la nodulación y en la fijación de nitrógeno así como los necesarios para mantener sus funciones dentro del nódulo donde el contenido de O₂ es bajo (Banfalvi, Z., et al., 1981, Barnett, M. J. y S. R. Long, 1997, Batut, J., et al., 1985, Boivin, C., et al., 1990, David, M., et al., 1988, Ogawa, J. y S. R. Long, 1995, Renalier, M.-H., et al., 1987, Rosenberg, C., et al., 1981).

Otras características generales fueron descritas en cuanto a la composición genética de los plásmidos de *S. meliloti*. Por ejemplo, la proporción de ORFans (genes sin homólogos en otro genomas) encontrada supera a la del cromosoma así como también el número de genes que codifican sistemas de transporte, principalmente del tipo ABC y la cantidad de proteínas con funciones regulatorias. En cuanto a la presencia de genes esenciales, esta se limita al pSymB que, contrariamente a lo que sucede con el pSymA, además registra un bajo porcentaje de IS. Estos registros permiten inferir a cerca de sus orígenes evolutivos. Mientras pSymA presenta claras características plasmídicas típicas, pSymB se relaciona más con las cromosomales lo que sumado a que pSymA hace uso diferente de codones (*codon usage*), hacen suponer que estos plásmidos se adquirieron por separado y que el primero en incorporarse fue pSymB (Galibert, F., et al., 2001).

Con respecto a lo hallado en plásmidos de otras especies rizobianas, el plásmido p42d de *R. etli* CFN42, además de los genes *nod* y *nif* posee secuencias *rpoN* conocidas por

ejercer su regulación en los genes *nif*. Es importante mencionar que la región que contiene a los genes *nod* y *nif* se encuentran en una región de 125Kpb flanqueada por dos IS completas lo cual sugiere la posibilidad de que exista cierta capacidad de transposición. Además, esta región separa los operones de replicación y movilización planteando la idea de que la región simbiótica podría ser un elemento móvil. Otra característica de esta cepa es que el plásmido p42b es requerido para la formación de nódulos en *Phaseolus vulgaris*, en parte debido a la presencia de los genes involucrados en la síntesis de lipopolisacárido (LPS)(Brom, S., et al., 1992, Cava, J. R., et al., 1989). Similarmente, en la cepa VF39 de *R. leguminosarum* bv. *viciae* los genes de LPS están localizados en el plásmido pRleVF39c, mientras que los genes *nod* y *nif* están en el plásmido pRleVF39d (Hynes, M. F. y N. F. McGregor, 1990).

La secuencia completa del plásmido simbiótico pNGR234a (536Kpb) de la cepa de amplio rango de huésped *Rhizobium* sp. NGR234 (Freiberg, C., et al., 1997) reveló, que el 18% del plásmido está conformado por secuencias similares a secuencias de inserción (IS), posibles integrones, y otras secuencias que varían notablemente en su contenido de G+C, lo que sugieren la ocurrencia de un proceso evolutivo que dio lugar a dicha estructura mosaico (Hynes, M. F. y T. M. Finan, 1997). Otra peculiaridad llamativa del genoma de esta cepa es que codifica más sistemas diferentes de secreción que cualquier otro rizobio conocido. La mayoría de las proteínas secretorias se encuentran codificadas en su plásmido pNGR234b (2430Kpb). Esta particularidad podría relacionarse con el amplio rango de huéspedes que identifica a esta cepa (Schmeisser, C., et al., 2009).

I.2.2. Plásmidos no simbióticos.

Los plásmidos no simbióticos (no-pSym) o crípticos son aquellos que no son necesarios para el establecimiento de un estado simbiótico completo y presentan en general un tamaño altamente variable (Mercado-Blanco, J. y N. Toro, 1996).

En estos plásmidos se han reportado la presencia de reiteraciones de distintos genes, que incluyen a los *nod* y *nif* (Barran, L. R. y E. S. P. Bromfield, 1988). En *R. meliloti* 1076, el plásmido pSv1 por ejemplo, mostró reiteraciones de los genes *nodB* y *nodC*, *nifE* y *nifB* (Rastogi, V. K., et al., 1991). Otro ejemplo es la repetición del set de genes *fixNOQP* presente en el plásmido simbiótico pRl10 de la cepa de Rlv3841 y del plásmido p42d de *R. etli* CFN42 que presenta una copia adicional en el plásmido 9 y en el plásmido p42f respectivamente (Gonzalez, V., et al., 2010, Young, J. P., et al., 2006). La existencia de reiteraciones en plásmidos crípticos de genes presentes normalmente en plásmidos simbióticos puede ser consecuencia de un evento de captura de porciones de pSyms y posterior transferencia a otras cepas a través de eventos de recombinación (Brom, S., et

al., 1991, Romero, D., et al., 1991). Ha sido postulado que estas regiones pueden estar involucradas en la aparición de re-arreglos genéticos (Hahn, M. y H. Hennecke, 1987, Kaluza, K., et al., 1985) que conducen ya sea a la presencia de secuencias iteradas, a la generación de deleciones, o a la cointegración de plásmidos.

En cuanto a sus características funcionales, los plásmidos crípticos pueden codificar funciones que le otorgan ventajas fenotípicas a las células rizobianas que lo portan. Sin embargo se conoce muy poco acerca del verdadero rol que juega este tipo de plásmidos, salvo en excepciones en las que se ha podido relacionar determinadas características fenotípicas con la presencia de un determinado plásmido. Asignar a un plásmido una o varias funciones importantes para la simbiosis o para el crecimiento en vida libre, no es siempre una tarea sencilla. La caracterización de las funciones aportadas por estos plásmidos requiere normalmente la obtención de cepas curadas de plásmidos y su comparación, en cuanto al fenotipo que muestran, con las cepas salvajes correspondientes (Mercado-Blanco, J. y N. Toro, 1996). Por este tipo de ensayos se pueden revelar características que de otro modo son difíciles de detectar.

Existen varios ejemplos en los que se logró vincular la presencia de un plásmido no simbiótico y una característica simbiótica determinada, por ejemplo:

- En la simbiosis de rizobios con *P. vulgaris* la competencia puede estar modulada por información presente en plásmidos no simbióticos (Martínez-Romero, E. y M. Rosenblueth, 1990).
- Plásmidos no simbióticos grandes autotransmisibles están ligados en muchos casos a la síntesis de bacteriocinas y también influyen probablemente la competencia (Hirsch, P. R., et al., 1980, Johnston, A. W. B., et al., 1978).
- Plásmidos no-pSym de *R. tropici* CFN299 estimulan la nodulación de transconjugantes de *A. tumefaciens* que llevan el plásmido simbiótico. De hecho, los transconjugantes nodulan mejor y fijan más nitrógeno cuando llevan todos los plásmidos de la cepa CFN299 que cuando sólo llevan el plásmido simbiótico (Martínez, E., et al., 1987).
- Brom et al. (Brom, S., et al., 1992) demostraron que en la cepa de *R. etli* CFN42, el plásmido p42e es requerido para la habilidad competitiva exhibida por la cepa salvaje.
- En la cepa de *S. meliloti* GR4 han sido descritos genes de plásmidos crípticos involucrados directamente en la eficiencia de la nodulación (Toro, N. y J. Olivares, 1986). Esos genes están localizados en el plásmido pSmeGR4b, y fueron llamados *nfe* (*nodule formation efficiency*) (Sanjuan, J. y J. Olivares, 1989, Soto, M. J., et al., 1993). Tres genes se han encontrado en la región *nfe* de la cepa *S. meliloti* GR4, *nfeA*, *nfeB* y *nfeD*. Sólo se ha encontrado similitud del producto codificado por *nfeD* con la ornitina ciclodeaminasa

(ODCs) de *A. tumefaciens* (Soto, M. J., et al., 1993). Aunque las funciones de los genes *nfe* se mantienen desconocidas, la similitud con genes catabólicos como el *odc* sugiere que podrían estar involucrados en el catabolismo de compuestos específicos, los que le darían una ventaja selectiva durante estadios tempranos de la simbiosis o en la competencia con otras cepas (Mercado-Blanco, J. y N. Toro, 1996).

- Existen casos en que la eficiencia simbiótica se ve afectada negativamente por la presencia de plásmidos crípticos. Un ejemplo de ese fenómeno es el plásmido pRL3J1 que reduce la efectividad de la bacteria que lo posee (DeJong, T. M., et al., 1981). Similarmente, cepas de *R. loti* que han sido curadas de plásmidos muestran una mayor competitividad y eficiencia que sus correspondientes cepas salvajes (Pankhurst, C., et al., 1986).

Se han descrito genes de plásmidos crípticos que confieren la habilidad de utilizar compuestos orgánicos particulares. Un ejemplo es el plásmido pSme41a de *S. meliloti* y su relación con el metabolismo de calisteginas (Tepfer, D., et al., 1988). Boivin y Baldani estudiaron las alteraciones en la utilización de varios compuestos como fuentes de carbono después de haber curado diferentes cepas de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* de plásmidos crípticos (Baldani, J. I., et al., 1992, Boivin, C., et al., 1990).

La habilidad para utilizar compuestos que se encuentran en la materia orgánica del suelo o en exudados radicales gracias a información codificada en plásmidos sugiere, que éstos podrían tener un rol importante en el ciclo de vida libre de los rizobios y permite especular sobre la manipulación de cepas con capacidad diferencial para colonizar determinados ambientes rizosféricos.

I.3. Transferencia horizontal de genes (HGT).

La transferencia horizontal de genes junto con el proceso de recombinación homóloga son los principales mecanismos que operan en la evolución de los genomas bacterianos (Arber, W., 2000, Davison, J., 1999). Cada vez que un nuevo gen es transferido desde un genoma a otro confiere una ventaja adicional para colonizar y controlar el ambiente en el que viven.

Existe abundante evidencia de transferencia de genes entre diferentes especies o géneros de la familia Rhizobaceae. Mucha de esta información proviene del análisis de las poblaciones bacterianas del suelo y el hallazgo de bacterias diferentes conteniendo plásmidos semejantes o, al revés, diferentes plásmidos presentes en cromosomas similares (Brom, S., et al., 2002, Vlassak, K. M. y J. Vanderleyden, 1997). Esta observación

sugiere la existencia de activos eventos de recombinación y transferencia entre cepas de la misma o diferente especie o género.

Se ha reportado además casos en los que luego de la introducción de cepas rizobianas utilizadas en la formulación de inoculantes, en suelos en los cuales no existían rizobios simbióticos naturales, surgían nuevas cepas de rizobios como producto del intercambio de genes simbióticos entre la bacteria inoculada y las poblaciones autóctonas no simbióticas. A través de mecanismos aún no caracterizados en detalle, se han publicado evidencias que apoyan la transferencia horizontal de genes en suelos de Nueva Zelanda desde cepas inoculadas de *Mesorhizobium loti* hacia bacterias receptoras nativas no simbióticas (Sullivan, J. T., et al., 1996, Sullivan, J. T., et al., 1995). En esas especies bacterianas, los genes simbióticos se localizan en una isla simbiótica grande (aprox. 500Kpb) de localización cromosomal. Por análisis de genotipificación se encontró que las cepas aisladas de los nódulos de *L. corniculatus* en los campos inoculados, eran diferentes de la cepa original introducida (en los campos no existía población nativa de bacterias noduladoras de esa leguminosa). Estas nuevas cepas contenían la isla simbiótica de la cepa original inoculada indicando que esa porción cromosomal se había transferido e integrado al cromosoma de otro "rizobio" (originalmente no simbiótico) y como consecuencia se había transferido la capacidad de nodular *L. corniculatus*. La confirmación de esta hipótesis surgió del aislamiento en suelos vecinos de cepas similares no simbióticas, que se presume corresponden a las recipientes autóctonas. Estas cepas fueron utilizadas para demostrar la transferencia exitosa de la isla simbiótica y la transformación del fenotipo simbiótico (Sullivan, J. T. y C. W. Ronson, 1998).

Recientemente Barcellos y colaboradores (Barcellos, F. G., et al., 2007) han confirmado la existencia de HGT de genes simbióticos entre cepas inoculantes y rizobios naturales en Brazilia Cerrados. En su estudio caracterizó genéticamente regiones conservadas, regiones de nodulación y de fijación de N₂ pertenecientes a aislamientos obtenidos de nódulos de soja que posiblemente se trataran de cepas variantes de las poblaciones naturales y la cepa introducida. Una de ellas fue identificada como una cepa autóctona (*Bradirhizobium elkanii*) que incorporó genes *nodC* pertenecientes a la bacteria utilizada en la inoculación *B. japonicum*. Otra cepa nativa *Sinorhizobium fredii* que había adquirido la isla simbiótica completa de *B. japonicum* también fue identificada.

Si bien se ha demostrado la ocurrencia de eventos de HGT en suelo, aún se conoce muy poco de la dinámica del intercambio de ADN entre individuos pertenecientes a la población rizobiana.

I.3.1. Mecanismos de transferencia genética en bacterias.

La transmisión lateral de material genético entre bacterias es llevada a cabo a través de al menos tres mecanismos conocidos: transformación, transducción y conjugación. La transformación se define como la incorporación, integración y posterior herencia estable de ADN libre por parte de las bacterias. En la transducción la información genética es transferida desde la célula donadora a la receptora a través de bacteriófagos. La conjugación es un proceso que requiere contacto célula-célula y por el cual se transfieren plásmidos desde una célula donadora a una receptora. Ya que muchos plásmidos conjugativos exhiben un rango amplio de transferencia y replicación autónoma, la conjugación se considera como uno de los factores más importantes para el flujo de genes entre bacterias. La transferencia conjugativa de genes ha sido considerada como el mecanismo posiblemente más frecuente para la transferencia horizontal de genes entre bacterias (Amábile-Cuevas, C. F. y M. E. Chicurel, 1993, Fry, J. C. y M. J. Day, 1990).

I.3.1.1. Conjugación.

La mayoría de los reportes de genes bacterianos transferidos en el medio ambiente involucran a la conjugación, la cual provee una vía de adquisición rápida de nueva información genética. Fue reportada desde 1940 y puede producirse de varias maneras: (i) Transferencia de un plásmido conjugativo que posee en su secuencia la información completa para su movilización (plásmidos autotransmisibles o conjugativos) (ii) Transferencia de un plásmido no-autotransmisible, que contiene el origen de transferencia (*oriT*), y que sólo puede ser movilizado por acción de un plásmido conjugativo (plásmido movilizable). El plásmido conjugativo puede o no ser transferido conjuntamente (iii) Transferencia de plásmidos por cointegración, donde dos plásmidos diferentes se fusionan para formar un tercero autotransmisible. Así un plásmido no-autotransmisible no-movilizable puede ser transferido debido a la acción de su cointegración por recombinación con plásmidos autotransmisibles. La fusión de plásmidos está generalmente facilitada por la presencia de transposones o elementos de inserción. La resolución del cointegrado puede ocurrir o no una vez incorporado a la célula receptora. (iv) Transferencia mediada por transposones conjugativos, que también pueden facilitar la movilización plasmídica y la formación de cointegrados (Clewell, D. B., et al., 1995). La transferencia conjugativa ha sido demostrada en varios tipos de ecosistemas. En muchos casos estudiados las bacterias donadoras o receptoras pueden ser desconocidas y sólo reconocidas por los marcadores que han adquirido. Para esos casos la ocurrencia de conjugación es sólo presuntiva.

Se ha encontrado que en medios naturales existen "zonas calientes" que favorecen los eventos de transferencia horizontal de genes. Se ha probado por ejemplo que la fitósfera, incluyendo el filoplano, la filósfera, el rizoplano, y en especial la rizósfera proveen condiciones muy favorables para el intercambio genético entre bacterias mediado por conjugación. Varios estudios muestran claramente que la rizósfera favorece la transferencia de genes por conjugación cuando se la compara con el suelo no rizosférico, y debe ser considerada en efecto como una verdadera "zona caliente" de conjugación en ambientes terrestres (Lilley, A. K., et al., 1994, Troxler, J., et al., 1997, van Elsas, J. D., et al., 1988). En general, el enriquecimiento de una muestra de suelo ya sea por presencia de rizósferas de plantas, por el agregado directo de nutrientes o por esterilización (incrementa los niveles de compuestos orgánicos y nitrógeno) facilita la transferencia horizontal en el mismo suelo. La importancia de la rizósfera en promover la transferencia de genes ha sido reafirmada por el hallazgo en la misma de bacterias portadoras de plásmidos alóctonos conjugativos. Por ejemplo, un plásmido autotransmisible capaz de movilizar a un plásmido a distintos miembros de la comunidad alóctono fue aislado de la rizósfera de trigo (van Elsas, J. D., et al., 1988). Existe otro ejemplo en el que luego de la inoculación de remolacha con una cepa bacteriana sensible a mercurio, se aislaron transconjugantes de la rizósfera y rizoplano que poseían plásmidos alóctonos con resistencia a mercurio (Lilley, A. K. y M. J. Bailey, 1997).

I.3.1.2. Sistemas de transferencia conjugativa. Generalidades.

A nivel molecular, la conjugación bacteriana puede ser considerada como un sistema de transporte especializado por medio del cual la información genética es transferida de una bacteria a otra. Esta capacidad es conferida a la bacteria a través de elementos genéticos extracromosomales móviles: los plásmidos y los transposones conjugativos. Estudios sobre sistemas de transferencia conjugativa de diversos plásmidos, han demostrado que estos sistemas tienen similitudes funcionales y de secuencias a nivel de ADN y de proteínas (Lanka, E. y B. M. Wilkins, 1995, Wilkins, B. M. y E. Lanka, 1993). Esta familia de sistemas de transferencia de ADN también incluyen al regulón de virulencia (*vir*) presente en plásmidos Ti (inductor de tumores) de *Agrobacterium tumefaciens*, que es responsable de la transferencia de ADN a plantas superiores (Winans, S. C., 1992).

Las funciones de transferencia conjugativa de los plásmidos están conceptualmente divididas en aquellas asociadas con el procesamiento del ADN (**DNA transfer and replication**, Dtr), y aquellas asociadas con el transporte del plásmido desde la bacteria donadora a la receptora (**Mating pair formation**, Mpf). Una función adicional es la de

articular a los complejos Dtr y Mpf. La proteína acopladora (*coupling protein*, CP) es la encargada de llevar a cabo esta tarea.

Durante la transferencia conjugativa de ADN en bacterias Gram-negativas proteínas codificadas por el plásmido como helicasas, primasas, relaxasas y otras proteínas accesorias, pertenecientes al sistema Dtr, interaccionan con una pequeña región ubicada en *cis* (respecto al plásmido que va a ser transferido) llamada origen de transferencia (*oriT*), para formar un complejo ADN-proteína denominado relaxosoma (Wilkins, B. M. y E. Lanka, 1993).

La transferencia se inicia cuando la célula donadora produce el pelo conjugativo (sistema Mpf) el cual hace contacto con la célula receptora y atrae ambas membranas hasta producir el contacto directo, momento en el cual se forma el poro de apareamiento. La proteína acopladora envía esta "señal" a la relaxasa la cual, formando parte del relaxosoma, produce un corte sitio-específico hebra-específico. Dicha proteína luego permanece covalentemente unida, a través de un residuo tirosina (Tyr-Y) al extremo 5' de la hebra cortada (Pansegrau, W., et al., 1994). Esta hebra cortada es desplazada en dirección 5'-3' y en su lugar se sintetiza una nueva hebra a partir del extremo 3' terminal generado en el corte. La reacción es isoenergética. Utiliza la energía liberada por la ruptura del ADN y la conserva en el enlace fosfoéster formado como producto de la unión covalente de la proteína a la hebra de ADN. Esta reacción es reversible pudiendo el extremo 3'-OH libre atacar el enlace fosfotirosilo.

Una vez que la hebra completa ha sido desplazada, un segundo corte se efectúa en el *oriT* y los extremos 5' y 3' de la hebra desplazada son ligados. La hebra complementaria es luego sintetizada dentro de la célula receptora. Tanto el corte como la posterior unión son llevados a cabo por la misma enzima (Furste, J. P., et al., 1989).

El mecanismo por el cual la hebra procesada es transferida a la célula receptora es todavía desconocido, pero se cree que el desplazamiento y la transferencia ocurren simultáneamente (Lanka, E. y B. M. Wilkins, 1995).

El sistema Mpf es una estructura compleja, cuyos componentes atraviesan la membrana interna y externa de la bacteria donadora. Esta estructura forma un canal a través del cual el ADN intermediario es transferido. Se lo considera perteneciente a la familia de Sistemas de Secreción Tipo 4 (T4SS) que transportan proteínas monoméricas, toxinas multiméricas y complejos ADN-proteína, desde el interior de una bacteria hacia otra célula bacteriana o eucariota (Cascales, E. y P. J. Christie, 2003, Chen, L., et al., 2002, de Paz, H. D., et al., 2005, Lawley, T. D., et al., 2003). Si bien el tipo más común de estos sistemas es el que interviene en la transferencia conjugativa de plásmidos, también

están comprometidos en mecanismos de virulencia de muchos patógenos animales (Ding, Z., et al., 2003, Gomis-Ruth, F. X., et al., 2004, Grohmann, E., et al., 2003).

Las estructuras involucradas en el reconocimiento, adherencia con la célula recipiente y transporte del ADN-proteína son un grupo de 11 o 12 proteínas conservadas que forman un complejo que expande la membrana bacteriana y expone en su superficie el pili o pelo sexual.

3.1.2.1. Características del origen de transferencia.

El origen de transferencia es el único sitio requerido en *cis* para la transferencia de ADN por conjugación y es definido por su habilidad de convertir un vector no transmisible en un plásmido movilizable. Ha sido demostrado que los *oriT* se encuentran dentro del complejo de transferencia de genes, comprendiendo porciones intergénicas de hasta 500 pb. Alta similitud de secuencias sólo se encuentran entre las regiones *oriT* de plásmidos cercanamente relacionados. Sin embargo, similitudes más significativas se observan en el propio sitio de corte dentro de la región *oriT* (Pansegrau, W., et al., 1994). Este sitio definido como el sitio para la acción de la relaxasa, es una secuencia corta de no más de 10 pares de bases.

Analogías estructurales pueden existir entre *oriTs*, orígenes vegetativos de replicación de plásmidos y orígenes de las hebras (+) de fagos de simple cadena de ADN (ssDNA). Varios de estos ADNs tienen en común una forma rudimentaria del sitio de corte del *oriT* de plásmidos del grupo de incompatibilidad IncP (secuencia consenso de ADN: YAWCYTG, Y: C o T, W: A o T) (Pansegrau, W., et al., 1994, Waters, V. L. y D. G. Guiney, 1993). Todas estas secuencias es posible que involucren el tipo de replicación por círculo rodante (*rolling circle*).

Los orígenes de transferencia tienen varias características en común (Lanka, E. y B. M. Wilkins, 1995).

- a) Se sitúan asimétricamente con respecto a los genes de transferencia de modo que la mayoría de estos genes entran a la célula recipiente al final del proceso conjugativo.
- b) Tienen un contenido de adenina (A) timina (T) más alto que las regiones circundantes, hecho que probablemente facilita la separación de hebras.
- c) Tienen una gran estructura secundaria conferida por repeticiones directas e indirectas. En los plásmidos F y RP4 estas estructuras se sabe que actúan como sitios de reconocimiento específico para proteínas de unión a ADN y son necesarias para el procesamiento eficiente del mismo.

d) Contienen curvaturas intrínsecas (DNA *bending*) que actuarían como potenciales sitios de unión de proteínas para alterar la estructura local del *oriT*, de modo de facilitar el acceso de las proteínas a la región de corte;

e) Incluyen promotores para la expresión de los genes *tra*, los cuales en muchos casos promueven una transcripción divergente desde el *oriT*.

Los primeros indicios acerca de las reacciones involucradas en el procesamiento de *oriTs* a cargo de relaxasas en rizobios fue reportado por Pérez-Mendoza et al. (Perez-Mendoza, D., et al., 2006), quienes realizaron la caracterización bioquímica del dominio N-terminal de la relaxasa TraA del plásmido p42d de *R. etli*. El estudio de su actividad *in vitro* utilizando un oligonucleótido marcado portador de la posible secuencia de corte, permitió delimitar el sitio de unión y corte específico, señalar el nucleótido exacto donde se produce la interrupción de la hebra de ADN luego del corte, como también determinar cierto grado de preferencia de actividad en *cis* por parte de esta enzima.

Anteriormente, Cook y Farrand (1992), habían mostrado en *A. tumefaciens*, una región de 65pb que poseía la mínima secuencia requerida para el transporte conjugativo del plásmido pTi, dicha región de 65pb posee dominios relacionados con otros *oriTs*, la secuencia de corte (*nic*) de 12pb propiamente dicha, como también una porción de secuencia (*tra box*) dependiente de acyl-homoserina-lactona involucrada en la regulación de la movilización a cargo de opinas. Sin embargo tanto el sitio exacto como la identidad de la hebra de corte fueron recientemente determinados por Cho y Winans, 2007 (Cho, H. y S. C. Winans, 2007), mediante el uso de oligonucleótidos marcados radioactivamente a través de un ensayo de *primer extension* utilizando ADN de cultivos bacterianos inducidos por 3-O-C₈-AHL. El resultado experimental arrojó amplificación positiva solo cuando se emplearon oligos que hibridizaban con la hebra de ADN complementaria (Cho, H. y S. C. Winans, 2007).

En *R. leguminosarum* la búsqueda de *oriTs* mediante amplificación por PCR de la región intergénica altamente conservada *traA-traC* arrojó resultados similares a los reportados por Pérez-Mendoza et al., (Perez-Mendoza, D., et al., 2004) pero su enfoque no fue capaz de determinar si las regiones de movilización identificadas eran funcionales (Turner, S. L., et al., 2002).

3.1.2.2. Características de la enzima relaxasa.

La relaxasa o nicasa es el componente esencial del relaxosoma y produce el corte sitio y hebra específico que inicia el transporte de ADN tanto en plásmidos movilizables como conjugativos. Existen muchas similitudes entre las distintas relaxasas codificadas por los

diferentes sistemas conjugativos, lo cual sugiere un mecanismo de relajación compartido (Pansegrau, W. y E. Lanka, 1991). De acuerdo a estos tres motivos que forman parte del centro catalítico fueron descriptos:

a) Motivo I: contiene el sitio catalítico en el cual se localiza un residuo tirosina (Tyr-Y) involucrado en la actividad de corte y mediante el cual permanece ligada covalentemente a la hebra de ADN.

b) Motivo II: está involucrado en la interacción con el extremo libre de la cadena de ADN en donde participa un residuo de serina (Ser).

c) Motivo III: contiene tres residuos histidina (His) y es conocido como el motivo 3H. Estas His participarían ayudando al ataque nucleofílico de la Tyr mediante la activación de la misma y por medio del reclutamiento de iones Mg^{+2} .

Francia et al. (Francia, M. V., et al., 2004), clasificaron, de acuerdo a la secuencia aminoacídica localizada en el extremo N-terminal, las distintas relaxasas pertenecientes a **plásmidos movilizables**. Así surgieron cuatro familias o superfamilias: Mob_Q, ColE1, pMV158 y CloDF13. Cada una representada por la relaxasa mejor caracterizada in vitro y de la que mayor información existe en cuanto a sus propiedades de movilización.

La estructura de las relaxasas de tipo Mob_Q consiste en un dominio N-terminal que posee actividad relaxasa y un dominio primasa localizado en su extremo carboxilo. A pesar de contener los tres motivos comunes a todas las relaxasas, en su Motivo II la Ser no está presente y en cambio presenta un residuo de ácido glutámico. En cuanto al Motivo II, este parece extender el número de aminoácidos invariantes lo cual da lugar a una secuencia consenso del tipo (N/Q)xHxHxxxxR. La relaxasa MobA de esta familia es capaz de producir in vitro el corte de ADN monohebra que contiene su respectivo *oriT* pero requiere de proteínas accesorias (MobB y MobC) para procesar ADN de doble cadena. La presencia de estas proteínas también incrementaría la eficiencia de la transferencia (Scherzinger, E., et al., 1992, Zhang, S. y R. Meyer, 1997). Es importante destacar que la relaxasa conjugativa del plásmido pTi de la cepa de *A. tumefaciens* C58 pertenece a este grupo.

La siguiente superfamilia ColE1, se encuentra sub-dividida en dos familias que difieren en su Motivo III, en la organización de sus regiones de movilización y en las características del *oriT*. Una de ellas se denomina Mob_{HEN} y la otra la Mob_p.

El tercer grupo corresponde a proteínas cuyo común denominador es que el alineamiento de la secuencia aminoacídica de sus relaxasas presenta desviaciones a los motivos comunes. La diferencia más destacable es que la Tyr clásica del Motivo I no está presente.

Por último, en la familia CloDF13, no se han identificado secuencias portadoras de los sellos distintivos de relaxasas. Su región de movilización posee los marcos de lectura *mobB* y *mobC* (van Putten, A. J., et al., 1987). Nuñez y de la Cruz sugieren que la proteína iniciadora de la transferencia sería MobC (Nunez, B. y F. De La Cruz, 2001) .

Recientemente una actualización a esta primera aproximación incorporó relaxasas provenientes de plásmidos conjugativos (Garcillán-Barcia, M. P., et al., 2007).

3.1.2.3. Características de la maquinaria de secreción.

En la naturaleza, el sistema de secreción involucrado en la transferencia de plásmidos mejor estudiado en relación a los rizobios es el sistema VirB/VirD4 presente en el plásmido Ti de *A. tumefaciens*. El mismo es responsable de secretar un fragmento de ADN (T-DNA), asociado a su relaxasa VirD2, similar a como lo hacen los sistema de conjugación, pero hacia las células de la planta en la cual inducen tumorigénesis (Cho, H. y S. C. Winans, 2007).

Cada uno de los distintos componentes de la maquinaria de secreción están codificados en el operón *virB* (*virB1* a *virB12*) y funcionan asociados a VirD4, la proteína acopladora.

Estudios bioquímicos y genéticos sugieren que VirB8, VirB9 y VirB10 forman el “core” del aparato de secreción. VirB10 se localiza en el periplasma, VirB8 anclando el canal a la membrana interna, mientras que VirB9 provee el anclaje a la membrana externa donde también se encuentra VirB3 (Cascales, E. y P. J. Christie, 2004, Shirasu, K., et al., 1994).

La unidad energética está compuesta por VirB4, VirB11 y VirD4. Estas proteínas formarían parte de la estructura citoplasmática del canal de membrana que a través de la hidrólisis o el pegado de NTPs originarían los cambios conformacionales que al propagarse a lo largo del canal permitirían el transporte de los distintos sustratos (Atmakuri, K., et al., 2004, Judd, P. K., et al., 2005) (Cascales, E. y P. J. Christie, 2004).

VirB1 es un glicanasa (Bayer, M., et al., 2001) de localización periplasmática, que permite el ensamblado del complejo proteico que constituye el aparato de secreción, degradando la capa de peptidoglicano. La lipoproteína VirB7 forma homodímeros y conecta el core con el pili extracelular que se constituye mayoritariamente por la proteína VirB2 o pilina y minoritariamente por VirB5 que podría ser una adhesina encargada de unirse a algún receptor en la otra membrana. VirB6 forma parte del lumen del aparato de secreción y podría modular la movilización de los sustratos a través del canal (Krall, L., et al., 2002, Sagulenko, E., et al., 2001, Sagulenko, V., et al., 2001).

La proteína acopladora se encuentra codificada en el plásmido conjugativo (a excepción del plásmido pcloDF13 (Nunez, B. y F. De La Cruz, 2001)) y en la mayoría de los T4SS. Es la responsable del reconocimiento específico de su propio relaxosoma como también del perteneciente al plásmido movilizable (Cabezón, E., et al., 1997, Szpirer, C. Y., et al., 2000). No está involucrada en el procesamiento del ADN y contrariamente al resto de los componentes del relaxosoma muestra cierto grado de promiscuidad (Cabezón, E., et al., 1997). En experimentos con sistemas conjugativos quiméricos compuestos por Dtr y Mpf provenientes de diferentes plásmidos, la proteína acopladora determina si la maquinaria quimérica es funcional o no. Al Intercambiar la proteína acopladora, la especificidad del Mpf para promover el transporte puede cambiar lo que implica que esta proteína constituye la interface entre ambos complejos (Cabezón, E., et al., 1997, Hamilton, C. M., et al., 2000) interaccionando de modo específico con las proteínas del relaxosoma (Moncalián, G., et al., 1999, Schroder, G. y E. Lanka, 2005, Schröder, G. y E. Lanka, 2003).

Dicha proteína posee en su extremo N-terminal un motivo transmembrana α -hélice mediante el cual permanece anclada a la membrana interna y un dominio citoplasmático en su extremo C-terminal (Grahm, A. M., et al., 2000). Aunque no ha sido demostrada su actividad NTPasa, posee los motivos conservados de Walker y es capaz de unir ADN de doble y simple cadena inespecíficamente (Gomis-Ruth, F. X., et al., 2001).

Por todo lo antes descrito es que, actualmente se divide a la funciones de la maquinaria conjugativa en las operadas por el Dtr y las llevadas a cabo por el Mpf/CP o T4SS.

3.1.3. Sistemas de transferencia conjugativa en rizobios.

Elementos genéticos transmisibles por conjugación han sido reportados en virtualmente todos los miembros de la familia Rhizobiaceae. Durante las décadas de 1970 y 1980 hubo un número significativo de trabajos en los que se describieron transmisiones conjugativas de plásmidos desde rizobios donadores a otros miembros de la familia Rhizobiaceae empleadas como receptores. Se han identificado varios plásmidos simbióticos transmisibles por conjugación. Esto incluye el pRL1JI (Johnston, A. W. B., et al., 1978) y el pRL5JI (Brewin, N. J., et al., 1980), ambos de *R. leguminosarum bv. viciae*, y el pSym5 de *R. leguminosarum bv. trifolii* (Hooykaas, P. J. J. S., F. G. M. y R. A. Schilperoort, 1982). El plásmido simbiótico pRP2JI de *R. leguminosarum bv. phaseoli* también fue reportado como autotransmisible (Lamb, J. W., et al., 1982), aunque su re transferencia no ha sido confirmada desde donadores que no contienen otros sistemas conjugativos. El plásmido pRL1JI fue uno de los primeros plásmidos transmisibles identificados en rizobios fundamentalmente debido al hecho que posee una elevada

frecuencia de movilización entre diferentes cepas de rizobios. Actualmente se sabe que su transferencia es dependiente de un minucioso sistema de regulación (Danino, V. E. W., A. Edwards, A. Downie, J. A., 2003).

Generalmente los plásmidos transmisibles coexisten en los rizobios con otros plásmidos, especialmente en aislamientos de suelos. En muchos casos estos plásmidos pueden formar cointegrados, por lo que la transferencia de un dado plásmido puede deberse a autotransferencia (plásmido conjugativo), pero también puede resultar de la cointegración con otro plásmido autotransmisible (conducción). También existen casos en los que la movilización ocurre en *trans*, es decir, otro plásmido conjugativo residente en la bacteria donadora aporta las funciones necesarias para la transferencia de un plásmido movilizable. Para discernir entre estas posibilidades es necesario analizar las características de transferencia del plásmido de interés. La falla en la transferencia debe considerarse con cautela. Por un lado la ausencia de marcadores de selección fuertes puede hacer que las bajas frecuencias de conjugaciones sean difíciles de detectar. Además, la expresión de genes del sistema de transferencia conjugativo puede estar regulada y requerir de inductores no siempre presentes en condiciones de laboratorio (Li, P. L., et al., 1998, Moré, M. I., et al., 1996).

La organización de los sistemas conjugativos en rizobios es muy similar a la descrita para el sistema presente en el plásmido inductor de tumor pTi perteneciente a la bacteria, estrechamente relacionada con los rizobios *A. tumefaciens*, la cual es también miembro de la familia Rhizobaceae (Cascales, E. y P. J. Christie, 2003, Cook, D. M. y S. K. Farrand, 1992). Para esta bacteria se describieron dos clusters de genes de transferencia denominados *tra* y *trb*. El operón *tra* posee la secuencia correspondiente al *oriT* y dos grupos de genes que se transcriben de modo divergente, *traAFB* y *traCDG*. En este caso en particular, TraA contiene un dominio relaxasa N-terminal y un dominio helicasa en su extremo carboxilo. TraC y TraD son proteínas pequeñas que forman parte del relaxosoma y son indispensables para la actividad *in vitro* pero no *in vivo* (Cho, H. y S. C. Winans, 2007). TraG es la conocida proteína acopladora responsable de coordinar al relaxosoma con el componente a nivel de membrana y TraB si bien no es esencial, aumentaría la eficiencia de la transferencia. Por otro lado TraF estaría involucrada en el armado del canal transmembrana durante el apareamiento de las células donadora y receptora.

El operón *trb* contiene 12 genes, el gen *tral* codifica la sintasa autoinducible involucrada en la regulación por *quorum sensing* (QS) y los 11 genes restantes, de *trbB* a *trbL*, los componentes del complejo Mpf. El sistema de secreción *VirB* tipoIV de *A. tumefaciens* comparte dichas características.

La regulación de los sistemas conjugativos en plásmidos relativos a los rizobios, a grandes rasgos, pueden agruparse en dos tipos: mecanismos regulatorios dependientes de la densidad de población bacteriana o QS y los compuestos por genes del tipo *rctA-rctB*.

El mecanismo QS mejor estudiado es del plásmido pTi de *A. tumefaciens* (Cha, C., et al., 1998). El plásmido pTi es capaz de modular su número de copias y su transferencia conjugativa en respuesta a señales liberadas por otras bacterias o por la planta huésped. Estas señales, al aumentar su concentración, inducen la expresión de determinados genes. Este tipo de regulación también se encontró en procesos como la esporulación, la formación de biofilms, la bioluminiscencia, los mecanismos de virulencia, etc (Winans, S. C. y B. L. Bassler, 2002). El gen *trai* (acil-homoserina-lactona sintasa) dirige la síntesis de N-3-oxo-octanoil-L-homoserinalactona (3-O-C₈-AHL) que cuando incrementa la densidad celular se acumula y se une a su receptor TraR el cual actúa como activador transcripcional operando sobre los *tra box* de los genes *traAFB*, *traCDG*, *trai-trb*, *rep* y *traM*. La proteína TraM, a su vez inactiva TraR (Piper, K. R. y S. K. Farrand, 2000). La transcripción de TraR se desreprime en presencia de opinas (octopina o nonpalina) liberadas por el tumor y en presencia de 3-O-C₈-AHL es cuando TraR ejerce su acción (Hamilton, C. M., et al., 2000). Cho y Winans, 2007 (Cho, H. y S. C. Winans, 2007), demostraron también que TraA reprime a su promotor uniéndose al *oriT* el cual se localiza río abajo de dicho promotor.

Un mecanismo similar opera en los rizobios y fue reportado para el plásmido pRetCFN42a, pNGR234a y pRL1JI. En este último existe, además, un sistema QS adicional: *cinR/cinI* de localización cromosomal (Lithgow, J. K., et al., 2000). En el plásmido de *R. etli* p42a también se identificó un gen *cinR* que codifica un regulador transcripcional del tipo LuxR que responde a alguna señal ambiental aun desconocida (Tun-Garrido, C., et al., 2003). Es importante destacar que *traAFBH* en la cepa de *Rhizobium sp.* NGR234 no responde a TraR (He, X., et al., 2003).

Los plásmidos pRL7JI y pRL8JI de RLv3841, pSmed01 y pSmed02 de *S. medicae* WSM419 también poseen genes relacionados con este mecanismo regulatorio de QS pero todavía no hay evidencias experimentales que lo confirmen.

Los plásmidos pTiC58, pRetCFN42a, pNGR234a, pSmed02, pRL1JI y del pSmeSM11b además de compartir el mecanismo regulatorio poseen un operón *trb/virB* en el que sus genes se encuentran en disposición opuesta a los genes de replicación *repABC* y guardan sintenia entre ellos.

El mecanismo regulatorio dependiente de RctA fue descrito para el plásmido pRetCFN42d de *R. etli*. La transferencia del plásmido se ve inhibida por la unión de RctA a una secuencia específica localizada entre las regiones -10 y -35 del promotor del

operon *virB* (Sepúlveda, E., et al., 2008). El producto del gen *rctB* localizado río abajo del gen *traA* sería el responsable de antagonizar el efecto anterior en respuesta a algún estímulo ambiental no descubierto. Homólogos a *rctA* fueron encontrados en el plásmido pSymA de *S. meliloti* (Pérez-Mendoza, D., et al., 2005) y pAtC58 de *A. tumefaciens* aunque en este último la frecuencia de transferencia en el laboratorio es elevada (Chen, L., et al., 2002). Homólogos a *rctA* fueron también encontrados en la cepa de *Mesorhizobium sp.*BNC1 pero su función no ha sido estudiada todavía.

En cuanto a la organización del complejo Mpf, estos plásmidos comparten similitudes con los plásmidos QS dependientes, pero a diferencia de ellos, poseen una proteína TraA mucho más grande y carecen de los genes *traFBH*.

Experimentos de transferencia realizados entre los plásmidos pRleVF39c, pRleVF39d, pRleVF39e y pRleVF39f pertenecientes a la cepa de *R. leguminosarum bv. viciae* VF39 y pRL10JI, pRL11JI, pRL12JI de RLv3841 sugirieron la existencia de un posible tercer mecanismo regulatorio. Mientras que su transferencia independiente no fue posible en condiciones de laboratorios, los mismos se movilizaron en presencia del plásmido pRleVF39c, como también en presencia de pRL1JI, pRetCFN42a y pRetCFN42d (Ding, H. y M. F. Hynes, 2009).

En este aparente tercer grupo de plásmidos ni los genes *traFBH* ni los *traCD* están presentes. Como característica destacable poseen un gen homólogo a *mobC* entre los genes divergentes *traA* y *traG*.

Como mencionamos previamente, Pérez-Mendoza y colaboradores identificaron la región poseedora del *oriT* del plásmido simbiótico p42d de la cepa de *Rhizobium etli* CFN42, cuya movilización había sido descrita hasta entonces como dependiente de la presencia del plásmido autotransmisible p42a a través de un mecanismo cointegrativo (Brom, S., et al., 2004). Además obtuvieron el primer indicio de la automovilización del plásmido simbiótico pRetCFN42d, sugerencia que se apoyó en el descubrimiento de un pequeño marco de lectura *Yp028*, localizado en las cercanías del gen *traA*, cuya sobreexpresión promueve la activación de la transferencia de pCFN42d por medio de algún mecanismo aún no dilucidado pero que posiblemente se encienda en respuesta a señales ambientales (Perez-Mendoza, D., et al., 2004). Posteriormente reportaron al gen *rctA* como el responsable de reprimir la expresión de los genes de transferencia en condiciones de laboratorio (Pérez-Mendoza, D., et al., 2005).

En el caso de *S. meliloti*, no se ha demostrado aún la movilización en condiciones de laboratorio del pSymB aunque Pretorius-Güth et al. (Pretorius-Güth, I. M., et al., 1990) mediante la introducción del *oriT* de RP4 pudieron movilizarlo mediante la utilización de un plásmido que aporta las funciones necesarias para la movilización en *trans* (plásmido *helper*). Varios plásmidos simbióticos han sido descriptos como no autotransmisibles,

pero sí movilizables por otros plásmidos (Hooykaas, P. J. J., et al., 1985, Hooykaas, P. J. J. S., F. G. M. y R. A. Schilperoort, 1982). Sin embargo, al igual que como sucedió con el plásmido simbiótico de *R. etli* (Pérez-Mendoza, D., et al., 2005), una mutación en el gen *rctA* incrementa la frecuencia de transferencia de pSymA, en condiciones de laboratorio, desde valores no detectables a valores de 1×10^{-5} transconjugantes/donadora. Afirmando que la movilización espontánea del plásmido pSymA (1.35Mbp) está sujeta a la regulación negativa de *rctA*.

Por último, el análisis de las características del cromosoma y de los plásmidos en poblaciones naturales de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (Schofield, P. R., et al., 1987), bv. *phaseoli* (Geniaux, E., et al., 1993) y bv. *viciae* (Young, J. P. W. y M. Wexler, 1988) y también en *R. galegae* (Kaijalainen, S. y K. Lindström, 1989) apoyan la idea que existe intercambio de plásmidos en condiciones naturales. El análisis teórico de algunos de estos datos sugiere que entre 10% (*R. galegae*) y 30 % de (*R. leguminosarum* bv. *viciae*) de todos los tipos genéticos han sido o donadoras o receptoras en algún evento de transferencia plasmídica (Valdez y Piñeiro, 1992). Una publicación reciente orientada a investigar la diversidad de bacterias asociadas al género *Medicago* aportó evidencia directa que respalda un rol activo de la transferencia horizontal de genes (HGT) en la determinación de las estructuras genómicas actuales de especies pertenecientes al género *Sinorhizobium* (Bailly, X., et al., 2007).

I.3.3. Plásmidos crípticos transmisibles en *S. meliloti*.

Los plásmidos crípticos mejor caracterizados de *S. meliloti* son los pertenecientes a la cepa *RmeGR4* (Herrera-Cervera, J. A., et al., 1998, Mercado-Blanco, J. y J. Olivares, 1993, Mercado-Blanco, J. y N. Toro, 1996). Hace ya algunos años fue demostrado que el plásmido pRmeGR4a (170Kpb) es autotransmisible y capaz de promover la transferencia conjugativa del plásmido acompañante pRmeGR4b (210Kpb), el cual porta genes necesarios para la formación eficiente de nódulos, involucrados en la determinación de la competitividad durante la nodulación (Sanjuan, J. y J. Olivares, 1989, Soto, M. J., et al., 1993). Herrera-Cervera y colaboradores primero, (1998) y Pérez-Mendoza et al., (2004) después, identificaron regiones de ADN portadoras de orígenes de transferencia (*oriT*) en la cepa GR4 a partir de una biblioteca genómica de ese rizobio. Basándose en la capacidad de secuencias *oriT* para convertir un vector no movilizable en un plásmido transmisible identificaron el *oriT* del plásmido críptico pRmeGR4a. La secuencia identificada como el origen de transferencia (2,5Kpb) presentó una organización típica de *oriT* plasmídico: dos marcos abiertos de lectura divergentes separados por una región rica en adenina (A) y timina (T); y una secuencia de 8pb, con elevada similitud de

secuencia con los *oriTs* reportados previamente, donde se localizaría el sitio de corte (*nic*). Uno de los marcos de lectura codifica una proteína con elevada similitud con una proteína involucrada en la movilización conjugativa de plásmidos tipo ColE1, y el otro con una proteína involucrada en el procesamiento y la estabilidad de los plásmidos. También identificaron, una región de secuencias invertidas (IR) (Herrera-Cervera, J. A., et al., 1998).

Recientemente, fueron secuenciados dos plásmidos pertenecientes a un aislamiento de *S. meliloti* proveniente de Braunschweig and Strassmoos. Dichos plásmidos, pSmeSM11b (181Kpb) y pSmeSM11a (144Kpb) poseen regiones codificantes de sistemas conjugativos similares a otros plásmidos autotransmisibles pero sus características de transmisibilidad no han sido determinadas aún (Stiens, M., et al., 2006, Stiens, M., et al., 2007). También Kuhn y colaboradores abordaron el estudio de la proporción de plásmidos transmisibles similares al plásmido pSmeSM11a en los aislamientos de *S. meliloti* provenientes Braunschweig and Strassmoos (Kuhn, S., et al., 2008).

En nuestro laboratorio se ha prestado especial atención en la caracterización funcional y molecular de los plásmidos crípticos conjugativos presentes en *Sinorhizobium meliloti* simbiote de alfalfa como sistema modelo. En particular, se construyó una colección de aislamientos de *S. meliloti* recuperados de suelos agrícolas locales, los cuales fueron caracterizados en base a su perfil genómico y contenido plasmídico (Pistorio, M., et al., 2008). En dicho trabajo, también se inició la caracterización de las propiedades de movilización y aspectos moleculares del sistema conjugativo binario constituido por el plásmido pSmeLPU88b movilizable en presencia del plásmido pSmeLPU88a portador de las funciones de ayuda para la movilización (*helper*), ambos presentes en la cepa SmeLPU88. Pistorio et al., (2008), estudiaron también la presencia de sistemas conjugativos plasmídicos en cepas de *S. meliloti* provenientes de aislamientos locales. Como producto de esta investigación reportaron que el 14% de los aislamientos locales de *S. meliloti*, poseían elementos accesorios transmisibles y que un 29% de los mismos eran capaces de retransferir al plásmido críptico pLPU88b mostrando la existencia de cierto grado de complementariedad cruzada en las funciones de transferencia de distintas cepas. Por otro lado hallaron que un 14% de los aislamientos mostraba fenómenos de incompatibilidad o de exclusión a nivel de superficie (Pistorio, M., et al., 2008). Estos resultados enfatizan de este modo, el rol central de los plásmidos transmisibles como vehículos de adaptación, especiación y diversificación bacteriana lo que los hace objeto de futuros estudios.

I.4. Replicación y estabilidad de plásmidos de rizobios.

Varios reportes recientes indican que las regiones de replicación de muchos de los plásmidos de rizobios están relacionadas con secuencias de plásmidos Ti y Ri de *Agrobacterium* (Turner, S. L., et al., 1996, Turner, S. L. y J. P. W. Young, 1995). De acuerdo a esta analogía varios plásmidos de distintas especies bacterianas pueden agruparse dentro de una familia de elementos extracromosomales que comparten la región de replicación.

Una idea muy generalizada es pensar que la estabilidad de plásmidos está muchas veces asociada a su condición de portadores de funciones importantes para la fisiología y la adaptabilidad de la célula huésped. Hoy sabemos que los plásmidos de rizobios muestran un alto grado de estabilidad y que la mayoría de estos plásmidos, tanto simbióticos como no simbióticos, son mantenidos en forma estable a lo largo de muchas generaciones sin que se detecte pérdida de los mismos, sugiriendo la existencia de mecanismos de mantenimiento muy precisos.

Originalmente los plásmidos de bacterias fueron clasificados basándose en su grupo de incompatibilidad, característica que está asociada al mecanismo por cual los plásmidos controlan el inicio de la replicación y herencia estable. Los plásmidos pertenecientes a un mismo grupo de incompatibilidad comparten estos mecanismos y como consecuencia no pueden ser coheredados en forma estable. En pocas palabras, dos plásmidos son incapaces de coexistir en la misma célula si sus funciones de replicación y partición interfieren. Esto es causado por dos características del mantenimiento de los plásmidos bacterianos: la selección al azar de las moléculas de plásmido que se van a replicar y la distribución al azar en la partición. Este tipo de clasificación es útil desde un punto de vista práctico ya que en una cepa sólo pueden mantenerse plásmidos compatibles (de distinto grupo de incompatibilidad).

El rango de huésped de los plásmidos de distintos rizobios incluye a *Agrobacterium*. De hecho cepas de *Agrobacterium tumefaciens* libres de plásmidos han sido muy útiles para el estudio y manipulación de plásmidos de rizobios. También existen evidencias que sugieren que los plásmidos de *Agrobacterium* pueden replicarse en rizobios. Un hecho interesante es que tanto el plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens* como el plásmido pSym de *Rhizobium leguminosarum* son capaces de replicar en *Phyllobacterium* (van Veen, R., et al., 1974). Consistente con estas observaciones, se han reportado casos de incompatibilidad entre plásmidos de rizobios y *Agrobacterium* (Hynes, M. F., et al., 1985) (O'Connell, M. P. H., M. F. y A. Puhler, 1987). Muchos de estos plásmidos muestran orígenes de replicación relacionados (Turner, S. L., et al., 1996, Turner, S. L. y J. P. W. Young, 1995).

Actualmente se sabe que el operón de replicación *repABC* se encuentra presente en un gran número de α -proteobacterias. En algunas de dichas bacterias pueden aparecer múltiples replicones *repABC* indicando que esta familia incluye varios grupos de incompatibilidad. Inicialmente este sistema se encontró en plásmidos de alto peso molecular y bajo número de copias como lo son los hallados en las cepas de *Agrobacterium* y *Rhizobium* pero luego fueron descritos también en bacterias menos relacionadas como las pertenecientes a los géneros de *Paracoccus*, *Rhodobacter* y *Ruegeria* (Bartosik, D., et al., 2001, Cevallos, M. A., et al., 2002, Zhong, Z., et al., 2003) En el operón *repABC* los genes encargados de la replicación y partición plasmídica se encuentran juntos (Pappas, K. M. y S. C. Winans, 2003, Ramírez-Romero MA, S. N., Pérez-Oseguera A, Téllez-Sosa J, Cevallos MA., 2000, Ramírez-Romero, M. A., et al., 2001). RepA y RepB comparten similitudes de secuencia con proteínas involucradas en la segregación de plásmidos y cromosomas (Bignell, C. y C. M. Thomas, 2001) mientras que RepC es la proteína de inicio de la replicación (Ramírez-Romero MA, S. N., Pérez-Oseguera A, Téllez-Sosa J, Cevallos MA., 2000). La región intergénica entre los genes *repB* y *repC* se encuentra altamente conservada y contiene genes que codifican ARN en antisentido.

Existen tres regiones de incompatibilidad: la primera pertenece a RepA que además, sola o junto a RepB, participa negativamente en la regulación transcripcional del operón *repABC*. Este factor sería el responsable de determinar incompatibilidad en *trans*.

La segunda, es la región comprendida entre *repB* y *repC*, que mencionamos recientemente, y la última estaría sumida en la porción de secuencia localizada río abajo de *repC* (Cevallos, M. A., et al., 2008, Chai, Y. y S.C. Winans, 2005).

En cuanto al origen de replicación *oriV*, existen varios ensayos que sugieren que se encuentra contenido en la secuencia *repC*, sin embargo no se conoce todavía el sitio de unión de RepC o cuál es el mecanismo por el cual induce la replicación (Bartosik, D., et al., 1998)

El plásmido simbiótico de la cepa de *R. etli* CFN42 pertenece a la familia de replicones *repABC* (Gonzalez, V., et al., 2003), al igual que el plásmido simbiótico pNGR234a de la cepa *Rhizobium* sp.NGR234 (Freiberg, C., et al., 1997) o los pSymA y pSymB de Sme1021 (Barnett, M. J., et al., 2001, Finan, T. M., et al., 2001). Algunos replicones de plásmidos crípticos también pertenecen a esta familia: pSmeSM11a y b provenientes de aislamientos locales (Stiens, M., et al., 2006, Stiens, M., et al., 2007), los plásmidos pMLa y b de *Mesorhizobium loti* MAFF303099 (Kaneko, T., et al., 2000), el plásmido críptico pRL8JI de *R. leguminosarum* bv. *viciae* 3841 (Turner, S. L. y J. P. W. Young, 1995) como también el resto de los plásmidos de *R. etli* CFN42 y de *R. leguminosarum* 3841. Otros tantos aún no se encuentran publicados, como son los plásmidos pSMED01, pSMED02 y

pSMED03 de *S. medicae* WSM419, los plásmidos pOANT01, pOANT02 y pOANT03 de *O. anthropi* ATCC49188 y p1, p2 y p3 de *Nitrobacter hamburgensis* X14 entre otros (Cevallos, M. A., et al., 2008).

La secuencia *repC* no posee homólogos asociados a otra actividad que no sea la de replicación. Su función siempre se corrobora por su capacidad de conferir estabilidad al vector no replicativo que la posee (Cevallos, M. A., et al., 2002, MacLellan, S. R., et al., 2005).

Es así como se han encontrado genes *repC* en otro contexto genético. Fundamentalmente asociados a un pequeño ARN antisentido (ctRNA), similar en secuencia a la región intergénica de incompatibilidad pero sin la presencia de los genes *repA* y *repB* (Izquierdo, J., et al., 2005, Stiens, M., et al., 2006). El ctRNA actuaría también reprimiendo la expresión de *repC* (Izquierdo, J., et al., 2005). Este tipo de replicones constituyó una subfamilia denominada *repC*.

El plásmido pMBA9 caracterizado por Watson y Hynes (Watson, R. J. y R. Heys, 2006) pertenece, al igual que el plásmido autotransmisible pRmeGR4a, a la familia de replicones tipo *repC*. Se ha demostrado que este tipo de replicones se encuentra ampliamente distribuido en aislamientos naturales de *S. meliloti*, *S. fredii* y *R. tropici* (Burgos, P. A., et al., 1996, Mercado-Blanco, J. y J. Olivares, 1994) pero poco se sabe acerca del mecanismo regulatorio que opera en la replicación de este tipo de plásmidos.

Es importante destacar que existe un tercer grupo de genes de replicación donde *repC* se encuentra ligado a *repA*, mientras que *repB* o ctRNA no están presentes. Esta es la situación encontrada en el pRL7JI reportada por Young et al. (Young, J. P., et al., 2006).

4.1. Regulación de la replicación.

El operón *repABC* posee un sistema regulatorio que incluye mecanismos que actúan tanto a nivel transcripcional como postranscripcional. Alguno de ellos han sido estudiados en detalle como el de *A. tumefaciens* y se sabe que se encuentran ligados al operon *tra-trb* y cuya replicación se ve afectada tanto positiva como negativamente por factores del huésped y por QS (Pappas, K. M. y S. C. Winans, 2003).

Por ejemplo, la presencia de 3-oxo-octanoil-acilhomoserina-lactona incrementa el número de copias del plásmido pTi probablemente a través de un incremento en la concentración intracelular de RepC (Li, P. L. y S. K. Farrand, 2000). Ha sido demostrada la presencia de *tra box* en las inmediaciones de los promotores del operón *repABC* (Cevallos, M. A., et al., 2008).

Otro mecanismo existente involucra a un sistema de dos componentes VirA/VirG. El receptor quinasa de membrana VirA puede detectar varias sustancias externas como

acetosiringona, ácido salicílico, compuestos fenólicos, etc y vía la fosforilación de VirG coordina la expresión de los genes *vir* que a la vez modulan positiva y negativamente la actividad del operon *repABC* Cho y Winans, 2005 (Zhu, J., et al., 2000)

En el caso de los rizobios existen evidencias, como en el caso del plásmido simbiótico de *Rhizobium sp.* NGR234, de que ciertos flavonoides inducen el operon *repABC* como también que el número de copias de los plásmidos aumentan en respuesta a señales de QS (McAnulla, C., et al., 2007, Perret, X., et al., 2003). También se encuentran situaciones como la del p42d de *R. etli* que posee un solo promotor del tipo sigma que por sí solo regula la replicación del plásmido eficientemente (Ramírez-Romero, M. A., et al., 2001). Un último mecanismo de regulación fue descrito, el *locus parS*. Chai and Winans, 2004, reportaron que en aquellos plásmidos que lo poseen existe una represión de la replicación mucho mayor que en los plásmido que no (Chai, Y. y S. C. Winans, 2005).

Como mencionamos en la descripción de los sistemas de replicación, en la mayoría de los operones *repABC* existe una zona altamente conservada que se localiza entre los genes *repB* y *repC* y que codifica un pequeño ARN que no se traduce (ctRNA) y que se dispone en dirección opuesta al operón (Chai, Y. y S.C. Winans, 2005, Venkova-Canova, T., et al., 2004). La estructura secundaria de estos ARNs consiste en un simple bucle (*stem loop*) y una secuencia rica en uridinas parecidos a los terminadores de la transcripción. Su capacidad para actuar como terminadores de la transcripción fue determinada por Venkova-Canova (Venkova-Canova, T., et al., 2004) como también su aptitud de actuar como determinantes de incompatibilidad en *trans* y como modulador de los niveles de RepC y del número de copias de los plásmidos que lo poseen.

Objetivos

Consideraciones generales.

Rizobios, prácticas de inoculación y transferencia conjugativa de plásmidos.

En el marco de una agricultura sustentable la Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN) por rizobios en asociación simbiótica con leguminosas es un factor importante desde el punto de vista de la conservación de los suelos y la productividad agropecuaria. Por esta razón, el estudio de las interacciones rizobio-leguminosa ha sido muy activo, aumentando en forma considerable las posibilidades actuales de manipular genéticamente los simbioses para el mejoramiento de la asociación. Sin embargo, la manipulación genética de la bacteria plantea nuevos interrogantes e incertidumbres asociados especialmente al impacto futuro de la liberación de los organismos genéticamente modificados (GEOs, *genetically engineered organisms*) sobre la biodiversidad y estructura de las poblaciones naturales. El uso de cepas inoculantes recombinantes (y también salvajes) requiere conocer y optimizar la capacidad simbiótica de los rizobios, minimizando al mismo tiempo los riesgos derivados de su liberación sostenida en campos de cultivo.

Un aspecto al que se ha prestado especial atención es la evaluación y prevención de posibles transferencias de material genético desde el organismo/cepa/variedad introducida a la comunidad bacteriana local. Eventos de transferencia horizontal de genes (HGT) de alta frecuencia desde las cepas introducidas pueden conducir a la aparición de nuevos genotipos bacterianos cuya dinámica poblacional y propiedades simbióticas a mediano y largo plazo son difíciles de predecir.

El conocimiento preciso en rizobios de la genética, bioquímica y función de las moléculas participantes del proceso de conjugación, como uno de los mecanismos más eficiente de HGT, será un requisito imprescindible por un lado para comprender las bases moleculares de los mecanismos conjugativos, y por otro para poder abordar a futuro el análisis del control de riesgos vinculado a la liberación de cepas durante las prácticas agropecuarias de inoculación. La caracterización (molecular y funcional) de los módulos conjugativos y de replicación de los plásmidos transmisibles por rizobios, constituye la base formal necesaria para cualquier análisis ulterior dirigido a estimar el destino y alcance de la dispersión génica desde estas bacterias por HGT. Para avanzar en el

estudio básico de las cuestiones anteriores, en este trabajo de tesis abordaremos los objetivos que se detallan a continuación:

Objetivo general.

Abordar la caracterización molecular y funcional de un sistema binario de plásmidos crípticos involucrados en la transferencia horizontal de genes por conjugación en la bacteria fijadora de nitrógeno y simbiote de alfalfa, *Sinorhizobium meliloti*.

Objetivos específicos.

En el marco del objetivo precedente abordaremos el estudio de las funciones que hacen a la transferencia conjugativa y a la replicación del plásmido críptico modelo pSmeLPU88b de *S. meliloti* descrito previamente por Pistorio et al., (2003) según el siguiente esquema:

Identificación y caracterización de elementos estructurales y genes involucrados en la movilización del plásmido modelo pSmeLPU88b.

Caracterización del complejo Dtr (DNA transfer and replication).

- Clonado, y caracterización de la región génica del plásmido pSmeLPU88b asociada al módulo Dtr. Búsqueda y caracterización del gen de la relaxasa y de su producto de traducción como una de las proteínas centrales de la transferencia de ADN *via* conjugativa.
- Identificación y caracterización funcional del origen de transferencia (*oriT*).
- Evaluación con herramientas moleculares del grado de ubicuidad de funciones de movilización (Dtr) en *S. meliloti*.

Identificación y caracterización de los módulos de replicación del plásmido pSmeLPU88b.

- Clonado de los módulos de replicación, secuenciamiento, estudios de incompatibilidad.

Evaluación de la transmisibilidad del plásmido pSmeLPU88b en el medio suelo, en condiciones de laboratorio y de campo.

CAPÍTULO II

Materiales y Métodos

II.1. Procedimientos microbiológicos

II.1. Cepas bacterianas y plásmidos.

Las características más relevantes de las cepas bacterianas utilizadas en este trabajo se describen en la Tabla II-1. En la Tabla II-2 se enumeran los plásmidos que fueron empleados.

Tabla II-1: Cepas bacterianas más usadas.

Cepas	Características relevantes	Referencia
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α	<i>recA</i> , Δ <i>lacU169</i> , Φ 80 <i>dlacZ</i> Δ M15	Bethesda Res. Lab.
S17-1	<i>E. coli</i> 294 RP4-2-Tc::Mu-Km::Tn7 integrado en el cromosoma	Simon et al., 1983 (Simon, R., et al., 1983)
BL21(DE3)	<i>E. coli</i> derivada de la cepa K-12 con el profago λ portador del gen de la ARN polimerasa T7 y del gen <i>lacIq</i>	Studier FW, 1986
<i>Sinorhizobium meliloti</i>		
<i>S. meliloti</i> 2011	Cepa salvaje, Nod+, Fix+, Sm ^r	J. Denarié., France
<i>S. meliloti</i> LPU88	Cepa aislada de suelos locales con pH entre 6,5 y 7,5	Colección de nuestro laboratorio, Pistorio 2001
<i>S. meliloti</i> LPU88All	Cepa utilizada en el ensayo a campo. (Sm-Gm-Sp) ^r	Este trabajo
<i>S. meliloti</i> LPU88::Tn5	<i>SmeLPU88b::Tn5</i> (Nm ^r)	Pistorio 2001
<i>S. meliloti</i> LPU88Tn5B13	<i>SmeLPU88a::Tn5B13</i> (Tc ^r)	Pistorio 2001
<i>S. meliloti</i> LPU88Relm	<i>SmeLPU88b::pB6</i> Δ <i>sac</i>	Este trabajo
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>		
<i>A. tumefaciens</i> UBAPF2	Cepa libre de plásmidos Rif ^r	Hynes et al; 1985 (Hynes, M. F., et al., 1985)

Tabla II-2: Plásmidos utilizados.

Plásmidos	Características relevantes	Referencia
pK18mob	<i>mob</i> Km ^r , suicida en rizobios	Schäfer et al, 1994(Schäfer, A., et al., 1994)
pG18mob	<i>mob</i> Gm ^r , suicida en rizobios	Kirchner y Tauch, 2003 (Kirchner, O. y A. Tauch, 2003)
pGemT easy	Vector multicopia, Ap ^r	Promega
pMP1	pSUP102 conteniendo el fragmento <i>EcoR1</i> que contiene al Tn5 del plásmido pSmeLPU88b	Pistorio 2001
pMP2	pSUP102 conteniendo el fragmento <i>EcoR1</i> que contiene al Tn5-B13 del plásmido pSmeLPU88a	Pistorio 2001
pB6	pG18mob2 conteniendo el fragmento <i>BamHI-BamHI</i> de 2Kpb del plásmido pLPU88b	Este trabajo

Plásmidos	Características relevantes	Referencia
pB6Δsac	pG18mob2 conteniendo el fragmento <i>Bam-Sac</i> de 500pb del plásmido pB6	Este trabajo
pBBR1MCS5	Gm ^r amplio rango de hospedantes	Kovach et al., 1995 (Kovach, M. E., et al., 1995)
pINT	Derivado del pBBR1MCS5 conteniendo el fragmento intergénico del complejo Dtr clonado en el sitio <i>SmaI</i> .	Este trabajo
pAsm	Derivado del pBBR1MCS5 conteniendo el producto de amplificación generado por los cebadores AsmR-L clonado en el sitio <i>SmaI</i>	Este trabajo
pC3	Derivado del pBBR1MCS5 conteniendo el producto de amplificación generado por los cebadores ITGC3 e ITGC2b clonado en el sitio <i>SmaI</i>	Este trabajo
pC5	Derivado del pBBR1MCS5 conteniendo el producto de amplificación generado por los cebadores ITGC5 e ITGC2b clonado en el sitio <i>SmaI</i>	Este trabajo
pET30a-c+	Vector de expresión Km ^r	Novagen
pKN	Derivado del pK18mob conteniendo el fragmento de amplificación generado por los cebadores MobZN-MobZC	Este trabajo
pET30Nick	Subclonado en los sitios <i>NdeI</i> y <i>HindIII</i> del pKN.	Este trabajo
pET30ΔNot	Derivado del pET30Nick en el cual se eliminó la secuencia río abajo del sitio de restricción <i>NotI</i>	Este trabajo
pGrepABC	Fragmento <i>SmaI-BamHI</i> del complejo de replicación clonado en el vector pG18mob.	Este trabajo
pAB2001	Vector de clonado Ap ^r -Gm ^r	A. Becker et al., 1995 (Becker, A., et al., 1995)
pKrepC	Derivado del pK18mob conteniendo el producto de amplificación generado por los cebadores rep(A)C y rep(A)N.	Este trabajo

II.1.2. Medios de cultivo, condiciones de crecimiento y conservación de los microorganismos.

II.1.2.1. Medios de cultivo.

Los cultivos de las bacterias de los géneros *Sinorhizobium* y *Agrobacterium* se llevaron a cabo habitualmente en medio completo TY, Beringer, (Beringer, J. E., 1974) cuya composición es la siguiente:

CaCl ₂ .2H ₂ O	0,7 g
Triptona	5 g
Extracto de levadura	3 g
Agua (desionizada)	1000ml

Los cultivos se incubaron a 28°C con agitación a 180rpm. En los casos que fue necesario se estimó el número de microorganismos por mediciones de DO_{600nm} (DO_{600nm}=0,1

corresponde a 1×10^8 ufc/ml) o por el plaqueo de diluciones seriadas de los cultivos a determinar.

Para la preparación de medios sólidos se añadió ágar al 1,5 %.

En todos los casos la esterilización se realizó durante 20 minutos a 120°C en autoclave.

Para el cultivo de las cepas de *Escherichia coli* se utilizó habitualmente el medio de cultivo LB, Bertani G. (Bertani, G., 1951) cuya composición es la siguiente:

Glucosa	1g
NaCl	5g
Triptona	10g
Extracto de levadura	5g
Agua (desionizada)	1000ml

Para preparar medio sólido se utilizó en todos los casos 15 g/l de ágar.

La temperatura de incubación para el crecimiento de las cepas de *E. coli* fue siempre de 37°C y con agitación a 180 rpm para los cultivos líquidos.

El medio se esterilizó igualmente a 120°C durante 20 minutos.

Como solución mineral libre de nitrógeno para los cultivos de alfalfa se utilizó la solución mineral libre de nitrógeno descrita por Jensen (Jensen, H. L., 1942).

CaHPO ₄	1g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2g
NaCl	0,2g
K ₂ HPO ₄	0,2g
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0,1g
H ₂ O (desionizada)	1000ml

El medio fue esterilizado en autoclave 20 minutos a 120°C. Se le agregó luego 1ml/l de la siguiente solución de micronutrientes:(g/l): 3,73 KCl, 1,55 H₃BO₃, 0,85 MnSO₄·H₂O, 0,13 CuSO₄·5H₂O, 0,58 ZnSO₄·7H₂O, 0,018 (NH₄)₆Mo₇O₂₄·H₂O. En el caso de la utilización de Ágar Jensen pico de flauta se agregó ágar en una concentración de 1,5% y se dejó solidificar en posición inclinada.

La solución utilizada en el ensayo de microcosmos para homogenizar las muestras de tierra fue PBS (Sambrook et al., 1989) cuya composición es:

KCl	0.2g
Na ₂ HPO ₄	1.44g
NaCl	8g
K ₂ HPO ₄	0.24g
H ₂ O (desionizada)	1000ml
PH	7.4

II.1.2.2. Antibióticos.

Los antibióticos, cuando se requirieron, fueron adicionados a los medios de cultivo a partir de soluciones concentradas de los mismos preparados en agua desionizada salvo para los casos de tetraciclina, cicloheximida y rifampicina que en los dos primeros se usó etanol y en el último metanol. Las soluciones preparadas en agua se esterilizaron por filtración empleando membranas de nitrocelulosa de 0,2 μm de tamaño de poro. Las concentraciones finales en los medios de cultivo (en $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) para *E. coli* fueron: kanamicina sulfato (Km) 25, gentamicina (Gm) 10, tetraciclina (Tc) 10, ampicilina (Amp) 200; y para los rizobios, neomicina sulfato (Nm) 120, estreptomycin (Sm) 400, espectinomycin (Sp) 200, rifampicina (Rif) 100, gentamicina (Gm) 20 o 50 y tetraciclina (Tc) 5.

Cuando hizo falta inhibir organismos eucariotas se utilizó cicloheximida en una concentración de 100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

II.1.2.3. Medios de conservación.

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

II.1.3. Obtención de mutantes espontáneos resistentes a antibióticos.

En cajas de Petri conteniendo medio TY con el antibiótico de interés se plaquearon alícuotas de 0,1ml/caja de un cultivo en fase logarítmica tardía sin diluir. Las cajas se incubaron a 28°C durante 2 o 3 días, al cabo de los cuales se evaluó la aparición de colonias. Las colonias obtenidas fueron repicadas en cajas con medio fresco suplementado con el mismo antibiótico y se incubaron durante 2 días a 28°C para verificar crecimiento. En todos los casos la cepa original y el derivado resistente se compararon por PCR con la técnica de la "huella digital" utilizando cebadores BOX A 1R para detectar eventuales contaminantes.

II.1.4. Métodos de conjugación.

II.1.4.1. Conjugaciones biparentales.

Las conjugaciones fueron realizadas empleando la técnica de Simon et al, (Simon, R., et al., 1991) con modificaciones menores según se indica a continuación. En un microtubo de polipropileno de 1,5ml se mezclaron 0,7ml de un cultivo de la cepa donadora ($DO_{600\text{nm}} = 0,4 - 0,5$) con 0,7ml de un cultivo de igual densidad óptica de la cepa receptora. La mezcla fue luego centrifugada a 2500 rpm durante 8 minutos y el sedimento resuspendido suavemente en aproximadamente 50 μl de medio líquido TY. La suspensión entonces fue colocada en una caja de Petri con medio TY sólido sin antibióticos e incubada a 28°C durante 12 a 16 horas. La mezcla de bacterias fue finalmente resuspendida en medio TY líquido y sembrada en medio TY sólido suplementado con el (los) antibiótico(s) adecuado(s) para la selección de transconjugantes. En todas las conjugaciones se realizaron controles en los que sólo se agregaron la bacteria donadora o la receptora.

Cuando se requirió determinar la frecuencia de conjugación, se realizaron diluciones seriadas para contar ufc tanto de los transconjugantes como de las células dadoras y/o receptora para los que se utilizaron medios TY sólidos suplementados con los antibióticos necesarios para realizar la selección de la cepa de interés.

II.1.5. Preparación de células electrocompetentes. Electrotransformación de *E.coli*.

Se siguió la técnica de Wai Ling Tung y King Chuen Chow (Tung, W. L. y K. C. Chow, 1995). Se inocularon 500ml de medio LB con 1ml de un cultivo de la cepa de *E. coli* de interés que había sido crecida desde el día anterior. El cultivo fue incubado a 37°C y agitado vigorosamente hasta que la $DO_{600\text{nm}}$ llegó a 0,8 unidades. Las células fueron centrifugadas a 4000 g por 15 min a 4°C y se lavaron 2 veces con 200ml de glicerol 10% a 4°C. Luego, las células se resuspendieron suavemente en 0,5ml de GYT helado (10% glicerol, 0,125% extracto de levadura y 0,25% triptona.) y se fraccionaron en alícuotas de 100 μl .

Las electrotransformaciones fueron llevadas a cabo usando un equipo Gene Pulser (Bio - Rad) y en cubetas de 0,2ml bajo las condiciones recomendadas por el fabricante (25 μF , 200 Ω , 2,5 kV). Luego de la electrotransformación se adicionó inmediatamente a las células 1ml de medio SOC (2% triptona, 0,5% extracto de levadura, 10mM NaCl, 10mM SO_4Mg 10mM MgCl_2), y la mezcla se incubó 1 hora a 37°C para permitir la expresión de los fenotipos de resistencia a antibióticos codificados en los plásmidos que se hayan

incorporados en la transformación. Finalmente las células fueron plaqueadas en medio LB sólido selectivo y se incubaron por una noche a 37°C.

II.2. Técnicas de biología molecular.

II.2.1. Reacción en cadena de polimerasa (PCR).

Los ensayos de PCR fueron realizados empleando los termocicladores de tubos de pared delgada BioRad iCycler o BioRad Mycycler:

La composición de las mezclas de reacción utilizadas fue: 20mM Tris-HCl, pH 8,4; 3mM MgCl₂; 200 μM dNTPS; 1 unidad Taq ADN polimerasa (INVITROGEN S.A.) y 0.5 μM de cada uno de los cebadores (*primers*) para PCR específicas. Los cebadores empleados están listados en la Tabla II-3.

Las condiciones de ciclado utilizadas variaron de acuerdo a los cebadores utilizados y al tamaño del producto de amplificación esperado siempre siguiendo el protocolo estándar compuesto por: una etapa de desnaturalización inicial a 94°C durante 2 minutos; 35 ciclos de: desnaturalización a 94°C, *annealing* a la temperatura adecuada y elongación a 72°C y una etapa final de 2 minutos a 72°C.

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

a) para amplificaciones específicas sobre ADN genómico: Las células provenientes de cultivos líquidos o sólidos fueron lavadas con NaCl 1 M y resuspendidas en 100 μl agua bidestilada estéril. La suspensión fue hervida por cinco minutos y centrifugada a 14000x g por 4 minutos; 5 μl de los sobrenadantes fueron usados como ADN molde.

Alternativamente se realizaron preparaciones de ADN total de acuerdo a la metodología que se describe a continuación en la sección 2.6.

b) para la amplificación de secuencias específicas de ADN contenidas en plásmidos: Se cortaron las zonas de los geles de agarosa de lisis *in situ* que correspondían a la posición de bandas plasmídicas específicas. Los tacos de agarosa se fundieron luego por calentamiento en 500 μl de agua destilada estéril y 10 μl de la mezcla fueron usados como ADN molde. Cuando los plásmidos fueron de tamaño pequeño se realizaron minipreparaciones de los mismos según se indica en la sección 2.5.

Finalizada la reacción de PCR los productos obtenidos fueron visualizados en geles de agarosa (0,8%- 1%) teñidos con bromuro de etidio en una concentración final de 1,0μg/ml y observados con luz UV de 260nm en transiluminador.

El perfil de bandas obtenido fue fotografiado usando una cámara digital bajo iluminación ultravioleta, tal como se detalla en la sección 2.10.

II.2.2. Oligonucleótidos.

Los oligonucleótidos utilizados fueron sintetizados por las empresas INVITROGEN S.A. u OPERON indistintamente y fueron utilizados como cebadores para PCR, para secuenciamiento o para el EMSA, según se detalla en su descripción. En la tabla II-3 se muestra un listado de los mismos junto a su secuencia y utilidad.

Tabla II-3: Oligonucleótidos.

Cebador	Secuencias 5'-3'	Descripción
Nickr Nickf	GACCGACCGGCGGAG TGCCATGCACGATCCG	Utilizados como indicativos de la presencia del gen <i>mobZ</i>
B9-H1L B9-H1R IS-RepAL IS-RepAR tral-ISL tral-ISR	GTCCGGACACGATGAGAGTT GATGGAAGTAACGGCAGAGC AGCGCGTTTTACGCAATAAT CGGGTATCGATGTGAGCTTT AGGAAAGACTTCCGTGACCA CCCTGAAAAACAGGCGTTTA	Utilizados para la identificación del plásmido pLPU88b en el ensayo de campo.
B6f SondaR	CCTGCCGTGTTTCGC AGAGCATGTCGGGACGAG	Empleados en la confección de la sonda
ITGC1 ITGC2b	TCCCCTGAAGCGCATAAC GACTTCTCGATCGCCGCATG	Usados en la amplificación de la región comprendida entre los genes <i>para</i> y <i>mobC</i>
ITGC3	GAAGAGATCGTGCTG	Amplificación de la región contenida en el plásmido pC3
ITGC5	CTGAAACGCTCGCAC	Amplificación de la región contenida en el plásmido pC5
AsmR AsmL	AAGTCCCCGTCCGTAAAAAG AGGATCGCACTGTGCGCAT// GTACTGGCCGTCGTTTTACA	Utilizados para amplificar la secuencia portadora del <i>oriT</i>
M13F M13R	GTA AACGACGGCCAG GTCATAGCTGTTTCCTG	Cebadores universales utilizados para amplificar fragmentos de ADN contenidos en vectores de clonado tipo
BOX A 1R	CTACGGCAAGGCGACGCTGACG	Utilizado en la evaluación de la "huella" genómica mediante PCR, de Brujin et al., 1992
Gmr Gmf	GGATCCCTTAGGTGGCGGTACT GAATTCAAGCTTAGGAGGAAAACTATGTT ACGCAGCAGC	Amplificación del gen <i>aacC1</i> (Resistencia a Gm) sin promotor.

Cebador	Secuencias 5'-3'	Descripción
SimpleL	CTTGGGCAGAGGAAGAGATG	Utilizados para clonar un fragmento interno del gen <i>mobZ</i>
SimpleR	GCACCGACCCGAGCAC	
MobZ-N	GAAATCTTCTTCGGCGCATT	Usados para el clonado del marco de lectura del gen <i>mobZ</i>
MobZ-C	GACCACGGTGACCGGGATCGC	
POT	FAM-GTGATCGAGGGTTCGTCCCTCGATT GCAGGAAAATGGCGTAGCACATTTT CCGTATCCTGCCTCTCAAATTGTAAGGGGAATT	Empleado en el ensayo de retardo electroforético
repC(A)C	GTTCGGCTGACCGACACGCG	Utilizados para clonar el gen <i>repC(2)</i>
repC(A)N	AGGACCTGTGGCGTCGCCAG	
repCAMN	ACGAATCACGGCGCTTTC	Utilizados para mutagenizar al gen <i>repC(2)</i>
repCAMC	CAGGCATGTCGTATTGCGAG	
repCABC MN	GCCAGAAAAGACAGGACAGG	Utilizados para mutagenizar al gen <i>repC(1)</i>
repCABC MC	GTATGTGCCGCTCATTTTGA	

II.2.3. Preparación de ADN plasmídico.

Los plásmidos de *E. coli* fueron preparados ya sea por la técnica de lisis alcalina (miniprep) descrita por Sambrook et al (Sambrook, J., et al., 1989) o usando un protocolo modificado de purificación de plásmidos basado en la unión a sílica (SiO₂)(Rappleye, C). En el cual luego de realizar la lisis alcalina como se describe en el protocolo de "miniprep" y de la precipitación con acetato de potasio 3M, pH=5,4; se recoge el sobrenadante y se le agrega la cantidad apropiada de la suspensión de sílica (2grs de sílica en 15ml de agua centrifugada a 2000xg 2 minutos y resuspendida en un volumen final de agua equivalente a dos veces el volumen de sílica) estimando una capacidad de unión apropiada de 200ng de ADN/ µl de suspensión. Se centrifuga 10 segundos a máxima velocidad y se lava tres veces con 500ul de solución de lavado (50mM NaCl, 10mM Tris pH=7,5, 2.5µM EDTA, 50% etanol). Se centrifuga a máxima velocidad y se seca al aire.

La elución se realiza agregando el volumen deseado de TE o agua, incubando 5 min a 60 °C para luego centrifugar y recuperar el sobrenadante.

II.2.4. Purificación del plásmido pSmeLPU88b. Técnica Juanin et al., 1981.

El aislamiento de plásmidos de *S. meliloti* se realizó a partir de un cultivo de 16hs. en medio TY. Para ello se inocula un matraz de 50ml con 0,2ml de un cultivo ON de la cepa apropiada y se incuba en agitación a 28°C durante 36-48hs. Se recogen las bacterias centrifugando el cultivo a 7000 rpm 5 minutos y posteriormente se congelan durante 3-

4hs. Las células se tratan con Sarcosyl 0,1% en TE (Tris 50mM, EDTA 20mM, pH=8,0), se centrifugan y se lavan con el mismo tampón por lo menos dos veces.

Las células resuspendidas en TE se lisan con SDS a una concentración final de 1% y 5mg/ml de pronasa a 37°C durante 2hs. El lisado se lleva a pH=12,45 adicionando NaOH 3N de a poco y agitando suavemente. Una vez alcanzado el pH se deja en reposo 20-30 min. Para luego neutralizar con Tris 2M, pH=7 hasta pH=8,5. La preparación permanece en hielo 15 min y se añade NaCl 5M hasta una concentración final de 1M. Después de 1h a 0°C se sedimentan los restos de proteínas y ADN cromosómico centrifugando 30 minutos a 8000 rpm. El sobrenadante se precipita añadiendo polietilenglycol (PEG 6000) al 20% hasta una concentración final de 10% dejándolo durante toda la noche a 0°C.

El ADN plasmídico se recoge centrifugando a 5000rpm 10 minutos y el precipitado se resuspende en TE. El contenido del plásmido se analiza por electroforesis en gel de agarosa.

A la solución resultante se le añade 1gr. CsCl por cada 1ml de solución. Se realiza de a poco y, mezclando para que la sal quede bien disuelta. Posteriormente se adiciona BrEt disuelto en TE (10mg/ml) hasta que quede una concentración final de 400µg/ml. Se centrifuga 30 min para eliminar el exceso de PEG y la suspensión se transfiere a tubos apropiados (BECKMAN) para someterlos nuevamente a una centrifugación durante 72horas a 100000xg a 20°C.

La banda inferior corresponde al ADN plasmídico. La misma es recogida usando una aguja que perfora un poco por debajo de la banda. Utilizando luz UV de 360nm puede mejorarse la observación.

La eliminación del BrEt se consigue agregando un volumen igual de isopropanol saturado en agua. Se mezcla y se extrae la fase superior. El proceso se repite 3 o 4 veces hasta que desaparezca todo el color rosado de la solución acuosa. A esta se le agregan dos volúmenes de agua y se precipita el ADN con 6 volúmenes de EtOH a -20°C una noche. Pasado este tiempo se centrifuga a 15000g, 20min; se lava el precipitado 2 veces con EtOH al 70 % y se disuelve en TE conservándose a -20°C.

II.2.5. Extracción de ADN genómico.

A partir de cultivos en fase exponencial tardía se centrifugaron 1,5ml durante 3 minutos en microtubos de polipropileno. Las células se lavaron luego con 100 µl de N-lauril sarcosina 0,1% (P/V) en TE y se centrifugaron para luego lavarlas con NaCl 1M. A continuación el sedimento se resuspendió en 250 µl de TE, se añadieron 250 µl de

lisozima 0,5mg/ml en sacarosa 20% (P/V), se incubó 1 hora a 37°C, y luego se agregaron 50 µl de una solución de pronasa 5mg/ml y de 5% de N-lauril-sarcosina en TE, se mezcló por inversión y se incubó a 37°C durante 1-2 horas. Transcurrido este tiempo, los restos celulares se precipitaron en presencia de 70µl de acetato de sodio 3M con 200µl de fenol equilibrado con Tris pH=8 y 100µl de cloroformo. La mezcla se agitó suavemente y se centrifugó durante 15 minutos a 10000xg. Recogida la fase acuosa se procedió a dos nuevas extracciones, la primera con fenol/cloroformo y la segunda con cloroformo. El ADN se precipitó añadiendo 1 volumen de isopropanol o 3 volúmenes de etanol incubando la mezcla a -20°C, 20 minutos y centrifugando 15 minutos a 14000xg. El precipitado obtenido se lavó con 500µl de etanol al 70%, se secó al aire y finalmente se resuspendió el ADN en 25-50 µl de TE al que se añadió 1 µl de una solución de RNAsa 1mg/ml (P/V).

II.2.6. Determinación de la concentración de ADN.

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

II.2.7. Tratamientos enzimáticos del ADN

Las digestiones con enzimas de restricción se realizaron en las condiciones óptimas para la enzima, siguiendo las indicaciones de temperatura y tampón propuestas por los proveedores comerciales (Fermentas, Invitrogen y Promega) y las recomendaciones descritas en Sambrook et al., 1989. Las reacciones se llevaron a cabo habitualmente con 0,5-5 µg de ADN, el volumen correspondiente del buffer suministrado por el proveedor (diez veces concentrado) y 0,5-1 unidad de la enzima a utilizar en un volumen final de 10-25µl. Las mezclas de reacción fueron incubadas a la temperatura óptima de las enzimas utilizadas por un período de tiempo mayor que 2 horas.

II.2.8. Electroforesis de ADN.

II.2.9.1. Separación e identificación de fragmentos de restricción o de amplificación por PCR mediante 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 (SIGMA tipo I) de

concentración entre 0,8% y 1,5% en TBE (Tris 89mM, EDTA Na₂ 2,5mM, BO₃H₃ 89mM, pH=8,2). Este mismo tampón se utilizó como solución de corrida.

El voltaje de trabajo varió entre 5 y 12 volts/cm según los tamaños a separar. Como solución de siembra se utilizó sacarosa 40% y azul de bromofenol 0,25% en una relación 5 µl solución de ADN en agua o TE / µl solución de siembra.

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

El tamaño de los fragmentos de restricción fue determinado por interpolación gráfica en curvas de calibración en las que fue representado el logaritmo del peso molecular de fragmentos de ADN de tamaño conocido frente a la movilidad de cada uno de esos fragmentos. Como patrones de peso molecular fueron utilizados ADN del fago lambda digerido con la endonucleasa de restricción *HindIII*.

II.2.9.2. Geles de lisis *in situ*.

Los análisis del contenido plasmídico bacteriano fueron realizados por medio del método de lisis *in situ* de Wheatcroft et al., 1990. Las bacterias fueron cultivadas en medio TY líquido. Alícuotas de 1ml de cultivos crecidos hasta una DO_{620nm} de 0,4 fueron centrifugadas y las células lavadas con 1ml de solución 0,3% (P/V) de sarcosilato de sodio. Las células de cada muestra fueron centrifugadas nuevamente, resuspendidas en 15 µl de solución de ficoll 20% (P/V) y mantenidas en agua hielo hasta el momento de sembrar el gel de lisis/separación (0,75% de agarosa con buffer TBE (Tris 0,09M; ácido bórico 0,09M; EDTA 0,002M)). Previo a la siembra de las muestras en cada fosa del gel se introdujeron 25 µl de una solución de SDS 10% (P/V) con xilen cyanol, y la electroforesis se corrió a polaridad invertida hasta que el frente retrocedió un centímetro. Se detuvo la corrida y se procedió a la siembra. Para ello se agregaron 15µl de solución de lisis (sacarosa 8%, ficoll 2%, Tris 50mM, EDTA 25mM, RNAsa 0,4mg/ml, lisozima 1mg/ml) a cada una de las muestras, se mezclaron en forma suave e inmediatamente se sembraron 15µl de la mezcla por calle.

Se corrió a 30 V 30 minutos y luego a 110 V 2 horas, luego se lavó con agua 30 minutos y se tiñó con bromuro de etidio (0,5µg/ml).

II.2.9. Construcción de la biblioteca parcial de los plásmidos pLPU88a y pLPU88b.

Para la construcción de las bibliotecas genómicas se realizó previamente la purificación de los plásmidos pLPU88aTn5B13 y pLPU88bTn5 como se indica en la sección 2.5. Luego se procedió a la digestión de los mismos con las endonucleasas de restricción *Bam*HI, *Hind*III y *Eco*RI.

Se prepararon cantidades suficientes del vector pG18mob para digerirlo luego con la enzima correspondiente a los fragmentos elegidos, a saber *Bam*HI, *Hind*III o *Eco*RI y se inactivó por calor a 65°C. Se procedió entonces a la ligación de los fragmentos en el vector por medio de T4 ADN ligasa (Promega). La selección de los clones se realizó por transformación en *E. coli* DH5 α y la evaluación en medio sólido LB suplementado con Gm y X-Gal (5-Bromo-4-cloro-3-indolyl- β -galactopiranosido en una concentración de 40 μ g/ml) del desarrollo de colonias Gm^r que perdieron la capacidad de degradar X-Gal y poseen coloración blanca a diferencia de las que si lo pueden hacer, debido a que incorporaron plásmidos sin inserto y por ello son de color azul.

II.2.10. Clonado

II.2.10.1. Clonado de la zona intergénica (INT) del plásmido pLPU88b. Localización posible del origen de transferencia (*oriT*).

Para el clonado de la zona intergénica se utilizó como molde el plásmido pLPU88b e hicimos uso de los cebadores denominamos ITGC1 y ITGC2b (Ver tabla de oligonucleótidos) diseñados oportunamente en base a la secuencia consenso producto del apareamiento de secuencias intergénicas presentes en plásmidos de la familia Rhizobiaceae, apilamiento de secuencias realizado en la descripción de la región Dtr.

Este caso se usó, según las especificaciones del fabricante, ADN polimerasa Pfx platinum (INVITROGEN) en lugar de la polimerasa mencionada en la descripción de la técnica experimental de PCR.

El producto de amplificación, de 836pb, fue ligado al vector pBBR1MCS5(Gm^r), portador de la resistencia a gentamicina y de los genes de movilización compatibles con funciones de transferencia del tipo RK2, previamente digerido con la enzima de restricción *Sma*I dando lugar al plásmido pINT. La mezcla de ligación se usó para la transformación de células de *E. coli* DH5 α electrocompetentes. Dicha construcción fue corroborada por secuenciamiento.

Las colonias que contenían el plásmido fueron seleccionadas por la adquisición de la resistencia a Gm. La presencia del inserto se corroboró por PCR (amplificación del

fragmento específico) en aquellos clones candidatos que mostraron ausencia de actividad β -galactosidasa cuando crecían en el medio LB en presencia de X-gal.

Una vez obtenido el plásmido se procedió a la movilización del mismo hacia la bacteria *S.meLPU88* desde la cepa de *E. coli* S17-1 portadora de las funciones de ayuda compatibles con los genes de movilización derivados del plásmido RP4 presentes en el vector de clonado. Esta vez la selección de los transconjugantes se realizó en medio TY sólido suplementado con los antibióticos Sm, (resistencia presente en la célula receptora) y Gm (resistencia localizada en el plásmido introducido).

La presencia del plásmido fue nuevamente verificada por PCR mediante el empleo de los cebadores M13F y M13R que poseen sitios de pegado específico localizados en el vector de clonado. Su amplificación incorpora aproximadamente 229pb al tamaño de 836pb esperado para el fragmento clonado.

II.2.10.2. Clonado de los fragmentos C3, C5 y Asm del plásmido pLPU88b.

Determinación de la secuencia mínima con capacidad de promover la movilización.

Para el clonado del fragmento Asm procedimos de la misma manera que describimos previamente para el clonado de la región intergénica (INT) sólo que utilizamos como molde al plásmido pLPU88b e hicimos uso de los cebadores denominamos AsmR y AsmL (Ver tabla de oligonucleótidos) diseñados oportunamente en base a la secuencia consenso producto del apareamiento de secuencias intergénicas presentes en plásmidos de la familia Rhizobiaceae, apilamiento de secuencias realizado en la descripción de la región Dtr.

El fragmento de 238 bp se amplificó con Pfx y se clonó en el vector pBBR1MCS5 digerido con *Sma*I. Luego de transformar la construcción en *E. coli* DH5 α se confirmó por secuenciamiento la presencia del inserto en aquellos clones candidatos que mostraron ausencia de actividad β -galactosidasa cuando crecían en medio LB en presencia de X-gal. Luego se procedió a la movilización del plásmido hacia la bacteria *SmeLPU88* desde la cepa de *E. coli* S17-1 dentro de la cual se introdujo previamente por electrotransformación.

La selección de los transconjugantes se realizó en medio TY sólido suplementado con los antibióticos Sm, (resistencia presente en la célula receptora) y Gm (resistencia localizada en el plásmido introducido). La presencia del plásmido en S17-1 fue verificada por PCR utilizando los cebadores Gmf y Gmr y en *SmeLPU88Tn* a través de la recuperación del plásmido, su posterior transformación en *E. coli* DH5 α y la confirmación por PCR utilizando los cebadores específicos AsmR y AsmF.

Para el clonado de las regiones C3 y C5 utilizamos como molde el plásmido pLPU88b e hicimos uso de los pares de cebadores denominamos ITGC3-ITGC2b y ITGC5-ITGC2b (Ver tabla de oligonucleótidos) diseñados oportunamente.

Este caso se usó, según las especificaciones del fabricante, ADN Taq polimerasa (ver descripción de la técnica experimental de PCR).

Los productos de amplificación, de 551pb y 406pb respectivamente, fueron ligados al vector pGemT easy (Amp^r). La mezcla de ligación se usó para la transformación de células de *E. coli* DH5 α electrocompetentes.

Las colonias que contenían plásmido pGemT::C3 y pGemT::C5 fueron seleccionadas por la adquisición de la resistencia a Ampicilina. La presencia del inserto se corroboró por PCR (amplificación del fragmento específico) en aquellos clones candidatos que mostraron ausencia de actividad β -galactosidasa cuando se crecieron en medio LB en presencia de X-gal.

Los plásmidos pGemT::C3 y pGemT::C5 fueron digeridos con las enzimas de restricción *SphI* y *PstI*, Figura III.4. Los fragmentos liberados, fueron inactivados por calor a 65°C y se ligaron al vector pBBR1MCS5 (Gm^r) previamente digerido con las mismas endonucleasas dando lugar a los plásmidos pC3 y pC5. Nuevamente la selección de los clones se realizó mediante la transformación de células de *E. coli* DH5 α . En las colonias que resultaron Gm^r y que no mostraron la expresión del gen *lacZ* cuando se crecieron en cajas de medio de cultivo suplementado con X-gal, se verificó la presencia del inserto por PCR utilizando los cebadores específicos. La construcción también fue confirmada por secuenciamiento.

Se procedió entonces a la movilización del plásmido hacia la bacteria *S.meLPU88* desde la cepa de *E. coli* S17-1 dentro de la cual se introdujo previamente por electrotransformación.

La selección de los transconjugantes se realizó en medio TY sólido suplementado con los antibióticos Sm, (resistencia presente en la célula receptora) y Gm (resistencia localizada en el plásmido introducido).

II.2.10.3. Clonado de las regiones de replicación del plásmido pSmeLPU88b.

Para clonar el módulo de replicación correspondiente a la familia repABC utilizamos de plásmido E1 que poseía la secuencia codificante de la proteína RepC (Tabla 1) clonada en el vector pG18mob. El mismo se introdujo por vía conjugativa a la cepa *SmeLPU88b* y se seleccionaron aquellos transconjugantes con resistencia a Sm, Nm y Gm en los que se

había producido, por simple recombinación homóloga, la inserción del vector suicida (interrumpiendo el gen *repC* durante el evento de recombinación). La correcta integración del plásmido fue verificada por PCR.

Se realizó una digestión enzimática con *SmaI* del ADN cromosomal de un transconjugante y posteriormente la ligación de los fragmentos. Esto permitió recuperar el plásmido pGrepABC. Este plásmido fue utilizado durante el secuenciamiento realizado por *plasmid walking*. El mismo posee el fragmento portador de los genes *repA*, *repB* y *repC*.

El clonado de la región que contiene a la proteína RepC de la familia de replicasas *repC* fue obtenido por amplificación del fragmento flanqueado por los cebadores *repC(A)N* y *repC(A)C* utilizando ADN pfx polimerasa y ADN genómico perteneciente a la cepa *SmeLPU88* como molde. Dicho fragmento se ligó al vector pK18mob2 previamente digerido con la endonucleasa *SmaI*. El producto de ligación se electrotransformó en *E. coli* DH5 α . Tanto el plásmido pKrepC como el pGrepABC fueron preparados e introducidos en *E. coli* S17-1 electrocompetentes y movilizados hacia *SmeLPU88* o *Sme2011* por conjugación.

II.2.11. Mutagénesis

II.2.11.1. Interrupción del gen *mobZ* por simple recombinación homóloga.

Para realizar la interrupción, se introdujo por vía conjugativa a la cepa *SmeLPU88*, el plásmido pB6 Δ *sac* (contiene un fragmento interno de 500pb comprendido entre los sitios de restricción *BamHI* y *SacI* del gen *mobZ*).

Se seleccionaron aquellos transconjugantes con resistencia a Sm y Gm en los que había sido reemplazado el segmento del gen *mobZ* durante el evento de recombinación y la consecuente incorporación del vector pG18mob2 portador de la resistencia a Gm.

II.2.12.1.1. Estrategia de *plasmid walking*

Los clones obtenidos, luego de la introducción de un plásmido portador de un fragmento a partir del cual se realizó la integración sitio específica en el lugar a secuenciar, se cultivaron y se realizó la preparación de ADN total, el cual fue digerido posteriormente por una enzima de restricción determinada. Luego de realizada la digestión se procedió a la ligación y a la electroporación en *E. coli* DH5 α electrocompetentes del nuevo clon obtenido, portador de una porción mayor del genoma del plásmido pLPU88b .

II.2.11.2. Interrupción de los genes *repABC* y *repC* por simple recombinación homóloga.

En primer lugar se realizó una simple recombinación homóloga en la secuencia *repC(2)* perteneciente al sistema de replicación *repC*. Un fragmento interno de la secuencia *repC(2)* se amplificó con los cebadores *repCMN* y *repCMC* y fue clonado en el vector *pK18mob*, resultando el plásmido *pKrepCmut*. Luego fue introducido en la cepa *SmeLPU88* por conjugación. Esto permitió la integración del plásmido dando lugar a la interrupción del gen *repC(2)*. Aquellas bacterias en las que se produjo la integración fueron seleccionadas por adquirir resistencia a Nm. La correcta integración fue evaluada por PCR.

La interrupción del gen *repC(1)* perteneciente al sistema *repABC*, se realizó a través de la integración del plásmido *pKrepABCmut* movilizado desde *E. coli* S17-1 hacia *SmeLPU88* por conjugación. El plásmido *pKrepABCmut* fue construido por amplificación de un fragmento interno del gen *repC(1)* a partir del plásmido *LPU88b*, utilizando los cebadores *repABCMN* y *repABCMC* y el clonado posterior de dicho fragmento en el vector *pK18mob*.

II.2.12. Expresión y purificación de proteínas.

II.2.12.1. Sobre-expresión y purificación de MobZ.

La secuencia codificante de *mobZ* se subclonó, desde el plásmido *pKN*, al vector de expresión *pET30a-c+* (Novagen) digerido con *HindIII* y *NdeI*, (*pET30Nick*) dando lugar a un nuevo ORF correspondiente a la proteína MobZ fusionada con una secuencia de seis histidinas (His6) en su extremo C-terminal. La proteína MobZ-H6 generada posee la fusión de una secuencia de seis histidinas al extremo carboxilo terminal de MobZ. La construcción fue verificada por secuenciamiento y transformada en células electrocompetentes de *E. coli* BL21 (DE3). La sobreexpresión se produjo por agregado de 1mM IPTG a un cultivo de las células de DO=0.6 y se el mismo se mantuvo a 37°C durante 3 hs.

Las células fueron posteriormente centrifugadas, lavadas con buffer B (Tris 50mM pH= 8.0, 100mM NaCl, 1mM PMSF) y resuspendidas en el mismo buffer con 10mg/ml de lisozima. Se incubaron a 4°C durante 30 minutos y se lisaron por sonicación. La proteína MobZ-H6 fue purificada desde el lisado celular, primero en condiciones nativas y luego desnaturizantes, a través de una cromatografía de afinidad utilizando para tal fin una resina de níquel, Ni-ácidonitrilotriacético (NI-NTA) Invitrogen S.A.

Purificación nativa: La elución de MobZ-H6 se realizó empleando un gradiente de 10 y 100mM de imidazol en buffer B. Las fracciones obtenidas fueron colectadas y dializadas

contra buffer Tris 20mM, NaCl 200mM y MgSO₄ 2mM, y posteriormente concentradas y almacenadas a -20°C en glicerol 20%.

Purificación desnaturalizante: La inmovilización, lavado y elución en condiciones desnaturalizantes se realizaron en presencia de urea 8M con gradiente de pH entre 4,6 y 8 según las recomendaciones de Invitrogen S.A. La posterior renaturalización se llevó a cabo posterior a la elución con imidazol 300mM, a través de una diálisis en buffer B con gradiente decreciente de urea. El volumen obtenido se fraccionó y almacenó a -20°C en glicerol 20%.

II.2.12.2. Sobre-expresión y purificación del extremo N-terminal de MobZ.

Sobre el clonado pET30Nick, obtenido previamente, se realizó una digestión *NotI* y una posterior ligación conservando el marco de lectura y la fusión de las seis His necesarias para la unión a la columna de purificación.

El clon pETΔNot así generado contiene la secuencia del gen *mobZ* que codifica para los primeros 241 aminoácidos. Dicho clonado fue verificado por secuenciamiento.

Su posterior sobreexpresión y purificación se realizó siguiendo la misma metodología descrita anteriormente para la purificación de la proteína MobZ completa.

II.2.13. Análisis de proteínas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida.

Las electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS y β-mercaptoetanol, se llevaron a cabo según el procedimiento descrito por Laemmli, (Laemmli, 1970). El gel de apilamiento se preparó con 5% de poliacrilamida en Tris-HCl a pH=6,8, mientras que la parte inferior de los geles (de separación) se prepararon con 12,5 a 15 % de poliacrilamida en Tris-HCl a pH=8,8. Las corridas se llevaron a cabo durante 30 a 60 minutos en equipos Miniprotean II (BioRad) a 100-120 volts. Los geles se tiñeron en una solución alcohólica de Azul Coomassie (5% v/v metanol, 42,5% v/v etanol, 10% v/v ácido acético, 0,2% p/v Coomassie Brilliant Blue G250, 0,05% p/v Coomassie Brilliant Blue R250), durante 12 horas aproximadamente. Los mismos fueron desteñidos sumergiendo los geles en una solución de desteñido similar a la solución de teñido sin agregado de colorante, con sucesivos cambios. Finalmente, los geles fueron decolorados en el último paso en una solución 7% de ácido acético, hasta lograr un fondo claro.

II.2.14. Retardo electroforético en gel de poliacrilamida (EMSA)

Las mezclas de reacción contenían 1nM del sustrato portador de la posible secuencia específica y 1µM de proteína purificada o el equivalente de extracto crudo adicionado de 5mM de EDTA en 20µl finales del buffer de reacción compuesto por 10mM Tris-HCl pH=7.6, 100mM NaCl, 0,02mM EDTA.

Las mismas se incubaron durante 20 minutos a 28°C. Luego se mezclaron con el buffer de siembra compuesto por sacarosa 40% y azul de bromofenol y se incorporaron a la fosa de un gel de poliacrilamida 15% en TBE (Tris 0,09M; ácido bórico 0,09M; EDTA 0,002M) no desnaturalizante. La corrida electroforética se realizó durante 60 minutos a 100 V, en TBE pH=8.2.

Una vez finalizada la corrida se procedió a la tinción del gel con SyBr safe (Invitrogen S. A.) según las especificaciones del fabricante o con BrEt 10µg/ml.

II.2.15. Determinación de la habilidad de las regiones de replicación para mantener estable un plásmido suicida en rizobios.

El clonado del sistema de replicación tipo *repABC* y del sistema *repC* en plásmidos suicidas, según se detalló previamente, fue introducido por separado en la cepa salvaje *SmeLPU88* o en *Sme2011* según corresponda. Para ello se transformaron células de *E. coli* S17-1 electrocompetentes y se realizaron dos conjugaciones independientes. Ambas utilizando como célula receptora *SmeLPU88*. Fueron seleccionados aquellos transconjugantes resistentes a Gm y Sm para seleccionar los que hubieran incorporado el plásmido pGrepABC y los resistentes a Sm y Nm para seleccionar los que adquirieron el plásmido pKrepC. Luego, a través de un gel de lisis *in situ* se evaluó la presencia de los distintos plásmidos en la célula LPU88 transconjugante. Esto permitió estudiar como detallamos en el capítulo correspondiente la incompatibilidad de cada una de las regiones de replicación y la habilidad de las mismas para mantener la viabilidad del plásmido suicida.

II.2.16. Secuenciamiento de ADN.

El secuenciamiento de ADN fue realizado por MacroGen-Inc utilizando oligonucleótidos universales como son los cebadores M13R, M13F, T7promoter y T7 terminator que fueron suministrados por dicha compañía.

II.3. Ensayos con plantas.

II.3.1. Plantas, esterilización de semillas en superficie y germinación.

En los distintos experimentos se utilizó *Medicago sativa* (alfalfa), ecotipo Súper Monarca, como planta huésped. Las semillas se esterilizaron en superficie por inmersión en lavandina al 50% durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo, se lavaron 10 veces con agua destilada estéril. A continuación, se extendieron en condiciones asépticas sobre placas de Petri con agar-agua y se dejaron finalmente en oscuridad a 22°C hasta su germinación (24 horas). Opcionalmente se pudo comprobar el grado de esterilidad extendiendo algunas semillas en placas de TY e incubándolas a 28°C.

II.3.2. Condiciones de cultivo.

Todos los ensayos se realizaron en una cámara de cultivo de plantas mantenida en las siguientes condiciones: fotoperíodo de 16/8 horas (luz/oscuridad), 22/18°C de temperatura (día/noche) y 50% de humedad relativa.

II.3.3. Estimación del número de microorganismos alóctonos noduladores de alfalfa presentes en el suelo en estudio. Técnica del número más probable (NMP).

Para la estimación del número de rizobios en muestras de suelo, se utilizó la técnica del número más probable (NMP). Para esta técnica se tomaron muestras de suelo de 100 grs y se las resuspendió en 900ml de solución Fâhraeus. Se las dejó agitando por 4 horas y de ahí se practicaron diluciones seriadas en Fâhraeus. Con cada dilución se inocularon plantas que estaban colocadas en tubos de ensayo que contenían solución de Jensen agarizada en forma de pico de flauta, ver sección 1.2. Se colocó en cada tubo una planta de dos días de edad en forma axénica, y luego se inoculó cada una de ellas con 1ml de la dilución correspondiente. Para cada dilución seriada se prepararon cuatro tubos. Se dejaron los tubos en el invernáculo, y al cabo de 28 días se observaron cuáles eran los tubos que poseían nódulos. A partir del porcentaje de plantas noduladas para cada dilución se calculó el NMP de rizobios noduladores de alfalfa presentes en la muestra de suelo mediante el empleo de tablas, Vincent (Vincent, J. M., 1970).

Medio Mineral de Fåhraeus (g/l)

CaCl ₂ .2H ₂ O	0.114
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.120
Citrato Férrico	0.005
KH ₂ PO ₄	0.1
Na ₂ HPO ₄	0.15
Sol. Micronutrientes	1 ml l

Solución Micronutrientes (1000X) (g/l)

KCl	3.73
H ₃ BO ₃	1.55
SO ₄ Mn.H ₂ O	0.85
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.13
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.58
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	0.018

II.3.4. Determinación de pH en suelos.

Para medir el pH de un determinado suelo, se mezclaron 20 gramos del mismo con 20ml de H₂O destilada. Dicha mezcla se mantuvo en agitación por 1 hora y al cabo de ese lapso de tiempo se midió el pH de la fase acuosa.

II.4. Ensayo a campo.**II.4.1. Siembra e inoculación de la cepa *SmeLPU88AII*.**

La bacteria *SmeLPU88AII* (Sm₄₀₀, Gm₂₀, Nm₁₂₀)^f fue obtenida en el laboratorio producto de mutaciones espontáneas luego de la exposición reiterada de la cepa *SmeLPU88* a dichos antibióticos.

La misma fue introducida al suelo siguiendo las prácticas rutinarias de inoculación para el cultivo de alfalfa. La inoculación de las semillas se realizó empleando inoculante en base turba (semilla pelletizada) a razón de aprox. 5 10⁹ ufc/g turba; aprox. 8 10⁵ ufc/semilla luego de la inoculación. La siembra fue realizada a voleo manual y se realizó un riego de 72,121l/Ha.

El ensayo se implantó en un campo experimental de la empresa BIAGRO S.A. en la localidad de Las Heras, provincia de Buenos Aires (pH del horizonte superficial 6,5 – 7,0; población aproximada de rizobios naturalizados 35 ufc/g suelo).

Se utilizaron dos parcelas de 6mts. por 1mt. c/u. una destinada a la inoculación y la otra utilizada como control (se sembraron semillas sin bacterias, recubiertas con turba estéril).

II.4.2. Recolección y procesamiento de nódulos.

Las plantas fueron desterradas conservando su rizósfera y conservadas a temperatura ambiente durante su procesamiento. Las raíces fueron previamente lavadas y los nódulos fueron separados de la planta y esterilizados en superficie con H₂O₂ al 20% durante 10 minutos. Seguidamente fueron lavados varias veces con H₂O destilada estéril y colocados en fosas multipocillos estériles. Luego los nódulos fueron macerados individualmente en condiciones asépticas con una varilla de madera. Una gota del triturado se extendió en medio de cultivo Ty con y sin Sm (uno de los antibióticos marcadores de la cepa utilizada durante la inoculación).

Las bacterias sensibles a Sm fueron seleccionadas por su desarrollo en medios de cultivo carentes de Sm.

II.4.3. Determinación de la presencia del plásmido pSmLPU88b en bacterias sensibles a Sm aisladas de nódulos provenientes de plantas trampa.

La presencia del plásmido pLPU88b se evaluó mediante un ensayo de PCR en aquellos aislamientos provenientes de los nódulos que resultaron sensibles a Sm. La reacción de PCR se realizó sobre un lisado celular de cada aislamiento y se llevó a cabo según protocolo estándar.

Los cebadores utilizados en este ensayo fueron diseñados para amplificar tres secuencias intergénicas presentes en el plásmido pLPU88b. Dichos pares de cebadores se denominaron B9-H1L/B9-H1R, IS-RepAL/IS-RepAR y traI-ISL/traI-ISR (ver tabla II-3). Los productos de amplificación corresponden a fragmentos cuyo tamaño es de 481pb; 397pb y 204pb respectivamente.

II.5. Ensayo de microcosmos.

El ensayo de microcosmos consistió en 28 tubos plásticos cerrados de 50ml, dentro de los cuales se colocó 30 gramos de tierra sin esterilizar, proveniente del mismo suelo en el cual se realizó el ensayo a campo. La tierra fue previamente homogeneizada con un tamiz número 10 y posteriormente inoculada con un determinado volumen de cultivo de bacterias dadoras y otro volumen correspondiente al cultivo de las células receptoras de modo de alcanzar la concentración final de bacterias por gramo de tierra deseado. Cada tubo se encontraba ensamblado a otro similar que contenía agua destilada estéril. Este último actuaba de reservorio de agua. Un hilo de algodón a modo de mecha comunicaba un tubo con el otro asegurando el aporte hídrico al suelo. Dos semillas de alfalfa (*Medicago sativa*), previamente esterilizadas y luego de 24 horas de germinación, fueron colocadas en cada uno de los tubos. Como control se prepararon, de igual manera, el mismo número de microcosmos con tierra en la cual no fue introducida ninguna bacteria exógena. Los microcosmos fueron incubados en cámara de plantas a 22°C/18°C con un fotoperíodo de 16-8 horas y en presencia de un recipiente con H₂O estéril para mantener la humedad del ambiente.

II.5.1. Procesamiento de las muestras. Recuentos bacterianos en microcosmos

Las poblaciones bacterianas se midieron a intervalos de 3-5 días aproximadamente a través del recuento de microorganismos obtenidos de las diluciones apropiadas de la tierra proveniente de cada uno de los tres microcosmos réplicas. Para ello el contenido completo de cada tubo se introdujo en un recipiente conteniendo 300ml de PBS estéril (dilución 1/10). El mismo se mezcló en un agitador de aire a temperatura ambiente y a una velocidad de 120 rpm aproximadamente 30 minutos. Luego se dejó descansar unos 15 minutos y se procedió al recuento bacteriano.

Se realizaron diluciones seriadas en medio TY: 1/100, 1/1000, 1/10000, 1/100000 y se sembraron 100µl de cada una de las diluciones en placas de Petri conteniendo medio de cultivo TY suplementado con Sm y Nm para la selección de la cepa dadora; TY suplementado con Rif para la selección de la cepa receptora y finalmente TY suplementado con Rif y Nm para la selección de los transconjugantes. En todos los casos también se utilizó cicloheximida para controlar el crecimiento de organismos eucariotas. La muestra control se procesó de igual modo pero solamente se sembraron las diluciones en placas de TY con Rif y Nm para el conteo de los transconjugantes.

Luego de 48 horas de incubación en estufa a 28°C se procedió al recuento de las UFC. Cuando fue necesario diluir menos la muestra al momento del recuento, elegimos

procesar a la misma en 100ml de PBS estéril. Para aumentar la probabilidad de hallar transconjugantes, 10ml de la muestra resuspendida de esta manera fueron centrifugados y nuevamente disueltos en 500-600µl de PBS. Posteriormente se sembró la totalidad de la muestra en 5 o 6 placas de cultivo respectivamente.

II.5.2. Recuentos bacterianos en rizósfera.

Para realizar el conteo de microorganismos en la tierra íntimamente adherida a la raíz, se procedió a retirar una de las plantas del microcosmos, favorecer la pérdida de tierra en exceso de la misma y colocar la planta sin su parte aérea en un tubo falcon de 14ml que contenía 1ml de PBS estéril. Luego de agitarlo enérgicamente para permitir que las bacterias se resuspendan se procedió a la siembra de la muestra en los distintos medios de cultivo selectivos para detectar los distintos microorganismos.

Se utilizaron 500µl para contar por duplicado cada una de las cepas dadora y receptora y para realizar una dilución 1/10 en medio TY líquido con el mismo objetivo. Los 500 µl restantes fueron sembrados en placas de medio TY suplementado con Rif y Nm para permitir la selección de posibles transconjugantes.

CAPÍTULO III

**Búsqueda de las regiones génicas de
movilización presentes en el sistema
conjugativo modelo pSmeLPU88a
/pSmeLPU88b.**

III.1. Introducción.

La presencia de plásmidos movilizables y/o conjugativos portadores de marcadores asociados a la expresión de distintas características fenotípicas es un hecho frecuente en diferentes especies de rizobios. La biología y la bioquímica de dichos plásmidos transmisibles está siendo activamente investigada debido a su rol central en los procesos adaptativos y evolutivos. A pesar de ello, son muy pocos los casos en los que se ha caracterizado la información contenida en los plásmidos crípticos de los rizobios, sus características evolutivas y las implicancias de la deriva de los mismos a la comunidad bacteriana de los suelos como consecuencia de las prácticas rutinarias de inoculación. Eventos de transferencia génica de alta frecuencia a partir de las cepas introducidas pueden conducir a la generación de nuevos genotipos bacterianos cuya dinámica poblacional y propiedades simbióticas a mediano y largo plazo son difíciles de predecir.

En nuestro laboratorio hemos iniciado estudios de caracterización de plásmidos de *S. meliloti* transferibles por conjugación como uno de los vehículos más eficientes para la transferencia horizontal de genes intra e interespecífica (Kinkle, B. K., et al., 1991, Kinkle, B. K. y E. L. Schmidt, 1991). La transferencia de plásmidos por conjugación ha sido demostrada en distintas especies de rizobios. Sin embargo, solo en los últimos años, se ha comenzado con la caracterización a nivel molecular de los sistemas conjugativos presentes en los plásmidos de los rizobios (Mercado-Blanco, J. y N. Toro, 1996). El aislamiento de plásmidos movilizables y la caracterización de las funciones de transferencia permitirán analizar los sistemas de movilización desde el punto de vista genético molecular así como abordar el diseño de sondas específicas para la detección de dichos sistemas en cepas de colección e inoculantes.

Como mencionamos en la introducción de este trabajo, en estudios previos, hemos identificado sistema binario de conjugación, constituido por el plásmido pSmeLPU88b movilizable en presencia del plásmido *helper* pSmeLPU88a en la bacteria fijadora de N₂ *Sinorhizobium meliloti* (Pistorio, M., et al., 2008). La caracterización de este sistema plásmídico a nivel molecular nos permitirá obtener información de base sobre los sistemas conjugativos presentes en rizobios, como un sistema modelo en bacterias del suelo. Dentro de este marco, en este Capítulo, presentaremos resultados referidos al aislamiento de los plásmidos pSmeLPU88a/pSmeLPU88b e identificación de funciones relacionadas con la supervivencia (replicación, partición) y dispersión (conjugación) a partir del secuenciamiento de los mismos.

III.2. Purificación de los plásmidos pSmeLPU88b::Tn5 y pSmeLPU88a::Tn5B13.

Los plásmidos de rizobios se encuentran frecuentemente en bajo número de copias y son más difíciles de aislar que los plásmidos pequeños utilizados como vectores de clonado. Varias técnicas diferentes han sido utilizadas para visualizar y aislar plásmidos de los miembros de la familia *Rhizobiaceae*. Muchas de estas técnicas están basadas en usar condiciones de lisis alcalina para desnaturalizar y eliminar el ADN cromosomal (Casse, F., et al., 1979, Hirsch, P. R., et al., 1980, Jouanin, L., et al., 1981, Kado, C. I. y S. T. Liu, 1981, Ledebøer, A. M., et al., 1976). Todas estas técnicas usadas a escala preparativa resultan en el aislamiento de buenas cantidades plásmido.

Para la purificación de ambos plásmidos se utilizó el método de la desnaturalización alcalina descrito por Jouanin et al. (Jouanin, L., et al., 1981), seguido de una purificación en un gradiente de CsCl-bromuro de etidio (Sambrook, J., et al., 1989), como se describe en Materiales y Métodos sección 2.5. Las condiciones de corrida para una buena separación de las bandas correspondientes a ADN circular (plasmídico) del lineal fueron 72 hs a 100000xg a 20°C. La banda obtenida luego de su descontaminación y precipitación, se analizó en geles de agarosa para determinar el grado de pureza. En el gel se observó una única banda correspondiente al ADN plasmídico (no mostrado).

En la Figura III.1 se muestra el perfil de restricción obtenido para los plásmidos pLPU88a y pLPU88b. El análisis de restricción permitió estimar con mayor precisión el tamaño de los plásmidos. En trabajos previos su tamaño había sido predicho en base a la movilidad que presentaban en geles de lisis *in situ* utilizando como patrones los plásmidos de la cepa *S. meliloti* MVII-I previamente caracterizada por Hynes (Hynes, M. F., et al., 1986). De esta manera el tamaño del plásmido pSmeLPU88b que había sido estimado en 22Kpb cuenta con aproximadamente 40Kpb y el plásmido pLPU88a con 155Kpb en lugar de 139Kpb.

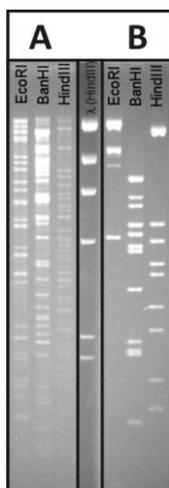


Fig. III.1: Patrón de restricción de los plásmidos purificados.

A: perfil obtenido para el plásmido pLPU88a::Tn5B13 **B:** patrón correspondiente al plásmido pLPU88b::Tn5. Los plásmidos pLPU88a::Tn5B13 y pLPU88b::Tn5 fueron digeridos con las enzimas *EcoRI*, *BamHI* y *HindIII*. Para estimar el tamaño de los mismos se utilizó el patrón de restricción λ (*HindIII*).

III.3. Construcción de una biblioteca parcial del plásmido pSmeLPU88b::Tn5. Secuenciamiento de la misma.

Para identificar los genes relacionados a la movilización y replicación, procedimos a realizar una biblioteca parcial del plásmido pSmeLPU88b::Tn5 en el plásmido pG18mob2, Gm^r (Kirchner, O. y A. Tauch, 2003). La biblioteca se realizó digiriendo el plásmido con una de las siguientes enzimas de restricción: *BamHI*, *EcoRI* y *HindIII*. La biblioteca de los clones resultantes se analizó primero por geles de lisis *in situ* para determinar el tamaño de los insertos de los distintos clones. Un representante de cada uno de los insertos de ADN presente en los plásmidos se secuenció a partir de los cebadores M13F y M13R que se adhieren al vector pG18mob2.

El análisis, de las secuencias obtenidas, en base a la comparación de los productos de traducción (blastx, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) contra la base de datos de proteínas arrojó los resultados que se muestran en la Tabla III-1.

Esta Tabla, muestra que distintos clones generaron resultados asociados con genes afines a las funciones de replicación y transferencia plasmídica buscadas. En particular los clones B6 y E2 presentaron similitud con secuencias relacionadas al complejo Dtr, componente del sistema de conjugación.

El clon B6 de aproximadamente 2,2Kpb arrojó similitud significativa desde sus dos extremos secuenciados con proteínas relaxasas pertenecientes a otros plásmidos de bacterias del suelo. Estas enzimas son la pieza principal en el procesamiento del ADN previo a su transferencia.

En cuanto al clon E2, el mismo presentó una identidad a nivel de ADN del 90 % con el *oriT* del plásmido pRmeGR4a perteneciente a la cepa de *S. meliloti* GR4 (Herrera-Cervera, J. A., et al., 1998). Asimismo, hallamos otra secuencia relacionada con la transferencia conjugativa en el clon BGK, que presentó una similitud del 63 % con el gen *tral* del plásmido p42a de *Rhizobium etli* CFN42.

El gen *tral* codifica una acil-homoserina-lactona sintasa involucrada en la regulación de la transferencia plasmídica conjugativa por *quorum sensing* (QS). Como se muestra en la Tabla III-1 los productos de traducción de las secuencias de los clones E1 y H6 presentaron similitud de secuencia con las proteínas RepC y RepA ambas relacionadas con la replicación de plásmidos en las α -proteobacterias (ver Capítulo I, sección 4).

Tabla III-1: Análisis *in silico* de las secuencias de los extremos de los clones de la biblioteca parcial del plásmido pLPU88b.

Clon	Inserto (pb)	Secuencia obtenida con el cebador M13F	Secuencia obtenida con el cebador M13R
BamH1			
B2	400	Subunidad catalítica sintasa acetoláctico (<i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021) NP_435765.1	Subunidad catalítica sintasa acetoláctico (<i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021) NP_435765.1
B6	2400	Proteína hipotética Smed_6382 (<i>Sinorhizobium medicae</i> WSM419) Relaxasa TraA (<i>Agrobacterium vitis</i> S4, ACM40283.1) Relaxasa (<i>Ochrobactrum anthropi</i> ATCC 49188) ABS17240.1 Proteína hipotética Meso_4166 (<i>Mesorhizobium</i> sp. BNC1, ABG61150.1)	Proteína hipotética Smed_6382 (<i>Sinorhizobium medicae</i> WSM419) Relaxasa TraA (<i>Agrobacterium vitis</i> S4) ACM40283.1
B9	1300	Proteína hipotética mll6062 (<i>Mesorhizobium loti</i> MAFF303099)	Proteína hipotética mll6062 (<i>Mesorhizobium loti</i> MAFF303099)
B12	4000	Glu/Leu/Phe/Val deshidrogenasa (<i>Methylobacterium chloromethanicum</i> CM4) ACK86208.1	Proteína hipotética SMc03251 (<i>S. meliloti</i> 1021)
BGK	3800	Tn5 proteína de resistencia a neomicina	Transposasa TRm17 (<i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021) AAK64908.1 Proteína tipo TraI (<i>Sinorhizobium meliloti</i>) AAX19272.1
EcoRI			
E1	700	RepC (<i>Sinorhizobium medicae</i> WSM419) Smed_6492, ABR65047.1	RepC (<i>S. medicae</i> WSM419) Smed_6492, ABR65047.1
E2	4500	Integrasa/recombinasa (<i>S. meliloti</i> 1021, AAK65874.1) Proteína hipotética SMA2259 (<i>S. meliloti</i> 1021, NP_436463.1)	<i>oriT</i> de pRmeGR4a (blastn)
Hind III			
H1	1400	Proteína hipotética mll6062 (<i>Mesorhizobium loti</i> MAFF303099)	Proteína hipotética mll6062 (<i>Mesorhizobium loti</i> MAFF303099)
H2	>7000	transposasa Tn5	3-cetoacil reductasa (<i>S. meliloti</i> 1021, SMA0959)
H6	2400	TRm17a transposasa (<i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021, SMc02430, SMA0475)	RepA (<i>S. meliloti</i> , plásmid pMBA9a, AAX19273.1)

El análisis se realizó mediante el paquete informático blastx <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>, salvo para la secuencia E2-M13R que se utilizó el módulo blastn de mismo paquete informático.

Para obtener la secuencia completa de las regiones que contienen los genes de interés realizamos secuenciamientos sucesivos desde ambos extremos a lo largo de los distintos clones empleando cebadores diseñados cada 600-700pb (*primer walking*). Una vez secuenciado completamente el inserto, cuando fue necesario ampliar la región a secuenciar, realizamos caminatas plasmídicas (*plasmid walking*).

En la Figura III.2 se esquematiza el procedimiento general de *plasmid walking*. Alternativamente, también utilizamos para el secuenciamiento el plásmido pMP1 (Pistorio, M., et al., 2008) que contiene el fragmento *EcoRI* de 10527pb portador de la inserción Tn5 del plásmido pSmeLPU88b. El clon BGK fue mapeado sobre el plásmido pMP1, por ello utilizamos este último cuando fue necesario realizar pasos de *primer walking*.

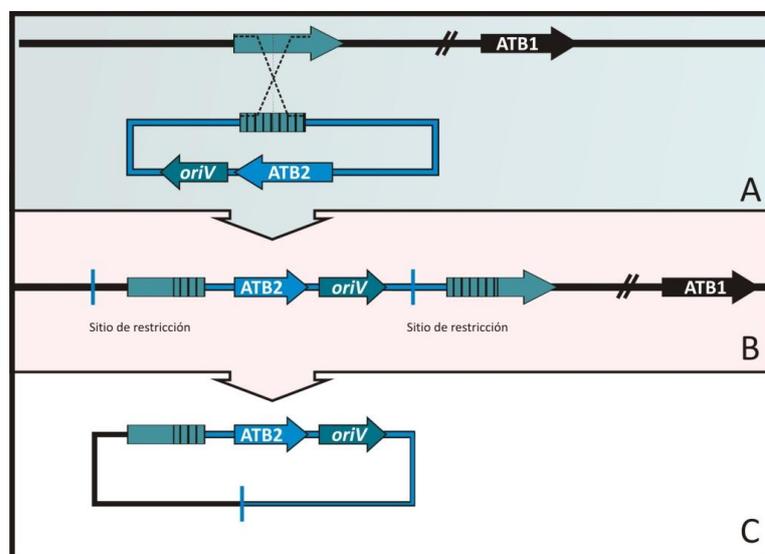


Fig. III.2: Estrategia general de *plasmid walking*: En A el primer paso, que consiste en la recombinación de un fragmento homólogo en la región cuyo secuenciamiento se quiere extender. En B el resultado de la integración sitio específica en la cual se incorpora una resistencia antibiótica que posee el plásmido portador del fragmento a recombinar. En C, la escisión por digestión con endonucleasas de restricción y la posterior recuperación de un fragmento del plásmido de mayor tamaño.

El alineamiento de las secuencias de ADN obtenidas mediante el programa *Contig Express* del paquete informático Vector NTI permitió agruparlas en 3 *contigs* grandes de 2Kpb , 4Kpb y 19Kpb denominados *contigs* 1, 2 y 3 respectivamente y 2 *contigs* pequeños (*contig* 4 y *contig* 5) 900pb y 400pb, Figura III.3. La suma total de los tamaños de los fragmentos de secuencia de ADN obtenida suman un total de 26,3Kpb lo que representan alrededor del 70 % del genoma plasmídico.

III.4. Organización genética del plásmido pSmeLPU88b.

Los *contigs* grandes fueron analizados para determinar el tipo y número de marcos abiertos de lectura (ORFs) potencialmente presentes mediante el uso del programa ORF finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>). En la Figura III.3 se muestra la posible estructura de ORFs de los distintos *contigs*. La comparación de la secuencia de ADN y de sus productos de traducción contra la base de datos de GenBank arrojó similitudes significativas para los distintos *contigs*. En particular el *contig* 1 presenta un único ORF que mostró 64 % de identidad a nivel de su producto de traducción con una posible carboxilasa de *Mesorhizobium loti* MAFF303099 (BAB52616). El *contig* 2 presentó 3 ORF: el ORF1 mostró 68 % de identidad con una Glu/Leu/Phe/Val dehidrogenasa *Methylobacterium chloromethanicum* CM4. El ORF2 mostró un 62 % de identidad con una 8-amino-7-oxononanoato sintasa de *Rhizobium* sp. NGR234 y el ORF3 presentó un 90 % de identidad con el gen SMC03251 de *S. meliloti*.

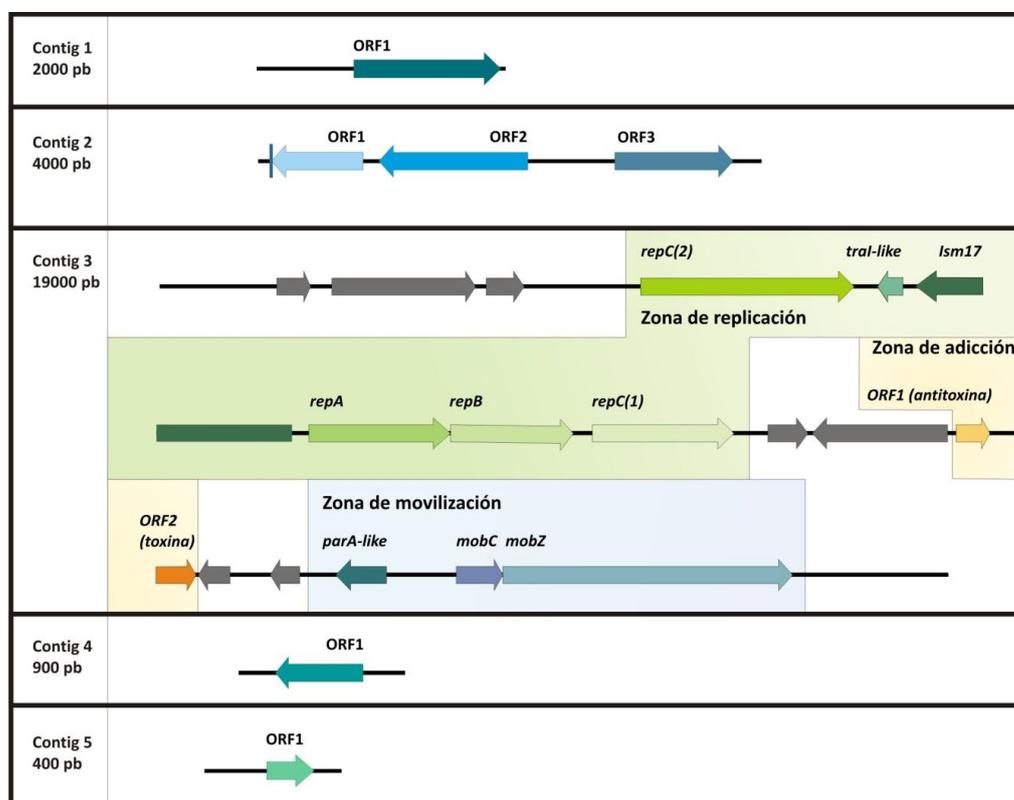


Fig. III.3: *Contigs* construidos luego del secuenciamiento realizado sobre el plásmido pLPU88b. Se esquematizan con flechas los marcos abiertos de lectura encontrados y se delimitan las distintas regiones de interés.

El *contig* que resultó de mayor interés fue el *contig* 3 ya que en él se pudo identificar *in silico*:

- a) La región Dtr involucrada en la movilización del plásmido (**D**na transfer and replication). Cuya descripción detallada realizaremos en la siguiente sección.
- b) Dos módulos de replicación que incluyen dos proteínas de inicio de la replicación diferentes. Una perteneciente al tipo *repABC* de la familia Rhizobaceae (RepC (1)) y la otra perteneciente a la familia de replicones *repC* (RepC (2)). El análisis de la región de replicación será abordada en el capítulo V.
- c) Un Sistema de adicción plasmídica, constituido por una toxina y una antotoxina. Cuya exploración será abordada al final del Capítulo V.

4.1. Estructura génica de la región de movilización (Dtr) del plásmido pSmeLPU88b.

En el Capítulo I mencionamos que las funciones de transferencia conjugativa de los plásmidos están conceptualmente divididas en aquellas asociadas con el procesamiento del ADN (**Dtr**), y aquellas asociadas con el transporte del plásmido desde la bacteria donadora a la receptora (**Mating pair formation, Mpf**, relacionado con el sistema de secreción tipo 4, T4SS).

Durante la transferencia conjugativa de ADN proteínas codificadas por el plásmido interactúan con una pequeña región ubicada en *cis* (respecto al plásmido que va a ser transferido) llamada origen de transferencia (*oriT*), para formar un complejo ADN-proteína llamado relaxosoma (Wilkins, B. M. y E. Lanka, 1993). La transferencia se inicia por la unión de una o más proteínas pequeñas a la región del *oriT*, seguido de un corte sitio-específico hebra-específico efectuado por una proteína de mayor tamaño, la relaxasa. Los plásmidos movilizables contienen sólo un grupo mínimo de genes que les permite ser transferidos en presencia de otros plásmidos conjugativos (*helper*). Generalmente, contienen el *oriT*, la relaxasa y una o más proteínas accesorias para la relajación del plásmido. Como ya hemos mencionado el plásmido pSmeLPU88b pertenece a este grupo ya que solo es transferido cuando otro plásmido le aporta las funciones del Mpf. El secuenciamiento completo del *contig* 3 reveló en este plásmido la presencia del posible Dtr. La localización y orientación de los genes presentes mostraron una remarcable sintenia con los Dtr de otros plásmidos de rizobios, Figura III.4.

En la región Dtr se observa la presencia de 3 marcos abiertos de lectura. Dos de ellos, denominados *mobZ* y *mobC* se transcriben en un sentido y el otro marco de lectura se transcribe en sentido divergente a los anteriores y ha sido denominado *parA*. El gen *mobZ* codifica una hipotética relaxasa con una identidad del 52 % con el gen *traA* del plásmido pAtS4a de *Agrobacterium vitis* S4. La proteína TraA es relaxasa del sistema

conjugativo tipo Ti. El marco de lectura *mobC* codifica una proteína homóloga a la proteína MobC descrita para los miembros de la superfamilia de los plásmidos ColE1.

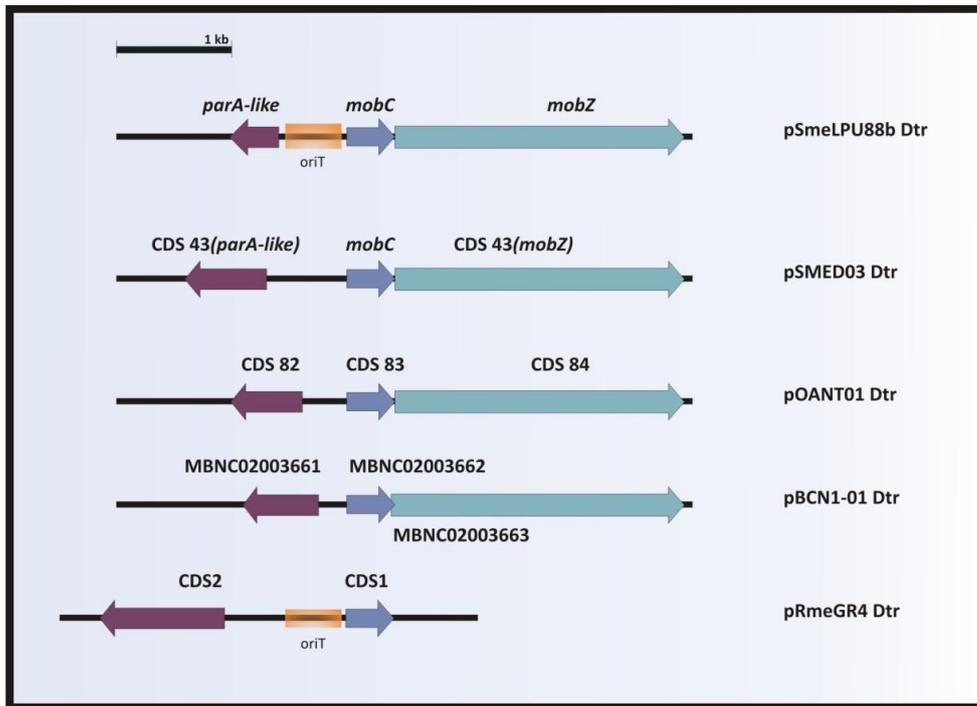


Fig. III.4: Regiones Dtr de plásmidos relacionados. En celeste se muestra el gen de las supuestas relaxasas, en azul la proteína accesoria, en violeta los marcos de lectura divergentes que delimitan la zona intergénica de localización del *oriT*, en naranja. Los distintos Dtr corresponden a: **pSMED3**, *Sinorhizobium medicae* WSM419 **pOANT1**, *Ochrobactrum anthropi* ATCC 49188, **pBCN1-01**, *Mesorhizobium* sp. BNC1 y **pRmeGR4**, *Sinorhizobium meliloti* GR4.

La misma no tiene todavía una función asociada, posiblemente se encuentre vinculada al proceso de movilización aumentando la relajación del *oriT* aunque se ha demostrado que no es esencial para la transferencia (Zhang, S. y R. Meyer, 1997). La proteína codificada por el gen *parA* pertenece a una familia de proteínas bacterianas conservadas involucradas en la segregación. El posible *oriT* del plásmido pSmeLPU88b se encuentra localizado entre los genes *mobC* y *parA*, que es la misma localización que se predijo para plásmidos relacionados, Figura III.4. El *oriT* se define por su capacidad de convertir un vector no transmisible en un plásmido movilizable y es el sitio requerido en *cis* para que la relaxasa inicie la transferencia del ADN. Ha sido demostrado que los orígenes de transferencias se encuentran dentro del complejo de transferencia comprendiendo regiones intergénicas no mayores a 500pb (Wilkins, B. M. y E. Lanka, 1993). Los *oriT*, particularmente ricos en adenina (A) y timina (T), poseen sitios altamente específicos de unión de la relaxasa y de corte, generalmente de entre 10 y 20pb. La modificación de una o dos bases nitrogenadas reduce drásticamente la afinidad, el corte y también la transferencia del plásmido en cuestión (Stern, J. C. y J. F. Schildbach, 2001).

Con el propósito de investigar si existen similitudes de secuencias entre el *oriT* del pSmeLPU88b y los orígenes de los plásmidos, que presentaron sintenia en la región de movilización, realizamos un alineamiento de las secuencia de los mismos, Figura III-5.

	1	10	20	30	40	50	60	70	88																																																																			
pBNC1-01	A	G	C	C	G	G	A	T	C	A	T	T	T	C	C	G	T	A	C	T	C	A	G	A	A	A	A	T	G	--	T	A	T	C	A	T	T	T	C	C	G	T	A	C	T	C	T	G	C	A	A	C	G	A	T	A	A	C	A	T	A	G	--													
pOANT01	--	A	A	T	C	G	A	C	A	A	T	C	G	C	G	A	C	G	T	G	T	T	T	C	G	C	A	A	C	A	C	A	C	A	A	A	A	T	T	G	--	T	A	G	C	A	T	T	T	C	C	G	T	A	T	C	T	G	C	T	A	A	C	C	A	--	A	T	T	A	C	A	A	C	G	C
pRmeGr4	--	G	T	C	A	G	A	T	G	A	T	C	G	A	G	G	C	T	C	C	T	C	G	A	T	T	G	C	A	--	G	G	A	A	A	A	A	A	T	G	--	T	A	G	C	A	T	T	T	C	C	G	T	A	T	C	T	G	C	C	T	C	C	A	C	A	T	T	G	T	A	A	G	--		
pSMED03	--	G	A	C	A	G	A	T	G	A	T	C	G	A	G	G	C	T	C	C	T	C	G	A	T	T	G	C	A	--	G	G	A	A	A	A	A	A	T	G	--	T	A	G	C	A	T	T	T	C	C	G	T	A	T	C	T	G	C	C	T	C	C	A	A	A	T	T	G	T	A	A	G	--		
pSme88b	--	G	T	C	A	G	A	T	G	A	T	C	G	A	G	G	C	T	C	C	T	C	G	A	T	T	G	C	A	--	G	G	A	A	A	A	A	A	T	G	--	T	A	G	C	A	T	T	T	C	C	G	T	A	T	C	T	G	C	C	T	C	C	A	A	A	T	T	G	T	A	A	G	--		
Consenso	G	C	A	G	A	T	G	A	T	C	G	A	G	G	C	T	C	C	T	C	G	A	T	T	G	C	A	--	G	G	A	A	A	A	A	A	T	G	--	T	A	G	C	A	T	T	T	C	C	G	T	A	T	C	T	G	C	C	T	C	C	A	A	A	T	T	G	T	A	A	G	--				

Fig.III.5: Alineamiento de la región que contiene al *oriT* de distintos plásmidos.

El estudio de la región *parA-like-mobC* en las cepas *Mesorhizobium sp.* BCNI, *O. anthropi*, *S. meliloti* GR4, *S. medicae* WSM419 junto con la cepa *S. meliloti* LPU88.

El apilamiento de las secuencias demostró que existe una secuencia de aproximadamente 80pb con un alto grado de conservación, donde sobresalen dos bloques de 5 y 21pb con secuencias idénticas.

II.5. Identificación de funciones conjugativas (Mpf, T4SS) en el plásmido pSmeLPU88a.

Los componentes del sistema Mpf, que comprenden un set mínimo de 10 proteínas conservadas, forman un complejo proteico que atraviesa la membrana y un pilus sexual expuesto en la superficie, que sirven para establecer contactos físicos íntimos entre la bacteria donadora y receptora. Estas proteínas, llamadas tipo VirB, se encuentran conservadas en la mayoría de los Mpf de plásmidos pertenecientes a distintos grupos de incompatibilidad.

Para la búsqueda las funciones del Mpf en el plásmido pSmeLPU88a utilizamos la misma estrategia que ya hemos descrito en este Capítulo para la identificación del Dtr: generar una biblioteca parcial del plásmido pSmeLPU88a, secuenciar los extremos de los clones y analizar las secuencias obtenidas en base a la comparación de los productos de traducción (blastx, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) contra la base de datos de proteínas. Para ello, fragmentos del plásmido obtenidos por digestión con la enzima de restricción *BamHI* fueron clonados en el vector pG18mob2 (Kirchner, O. y A. Tauch, 2003). Los clones obtenidos junto con el plásmido pMP2 (fragmento *EcoRI* conteniendo al Tn5B13) fueron secuenciados y analizados. Sólo el plásmido pMP2 arrojó similitudes significativas, con proteínas relacionadas con los sistemas conjugativos. El secuenciamiento fue extendido aproximadamente 2,6Kpb empleando cebadores diseñados cada 600-700pb (*primer walking*). La secuencia obtenida (2671pb) fue analizada para determinar el tipo y número de marcos abiertos de lectura (ORFs) potencialmente presentes mediante el uso del programa ORF *finder*. En la Figura III.6 se

muestra la posible estructura de ORFs del fragmento que hemos secuenciado. Encontramos tres marcos de lectura completos y un marco de lectura truncado. Los mismos presentaron homología con los componentes *virB1*, *virB2*, *virB3* y *virB4* pertenecientes a T4SS de varios plásmidos de rizobios como también *Agrobacterium*. Los componentes hallados del T4SS presentaron su máxima identidad con la región *virB* del plásmido pSMED03 de *Sinorhizobium medicae* WSM419 (mayor a 92 %).

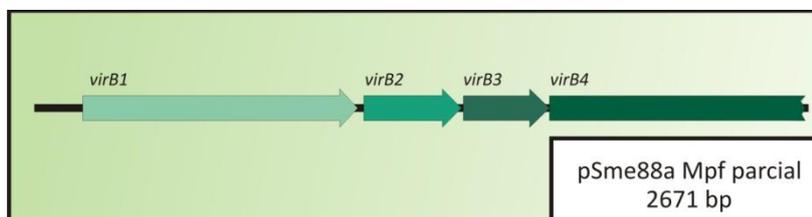


Fig. III.6: Mapa genético de la región de transferencia del plásmido pSmeLPU88a. Se esquematizan con flechas los marcos abiertos de lectura identificados en la misma.

En este Capítulo hemos abordado la búsqueda de genes asociados a la transferencia conjugativa en el sistema plasmídico binario pSmeLPU88a/pSmeLPU88b. En primer término hemos purificado ambos plásmidos mediante la realización de un enriquecimiento en ADN plasmídico y su posterior purificación en gradiente de cloruro de cesio. A partir del clonado parcial de los mismos y su posterior secuenciamiento pudimos identificar elementos de los sistema Dtr y Mpf. Ambas regiones resultaron casi idénticas a las regiones homólogas presentes en el plásmido críptico pSMED03 de *S. medicae* WSM419 con una identidad a nivel de ADN del 90 %. Es interesante destacar que los plásmidos pSmeLPU88a/pSmeLPU88b constituyen un sistema binario con el Dtr en el localizado en el plásmido pSmeLPU88b y el Mpf en el pSmeLPU88a. Los resultados obtenidos refuerzan la hipótesis planteada por Pistorio et al. (2008), que el sistema binario pudo haberse originado a partir de la resolución de un co-integrado ancestral que separó los sistemas Mpf y Dtr en los plásmidos pSmeLPU88a y pSmeLPU88b respectivamente.

Como se mencionó en la introducción, recientemente, Ding y Hynes (2009), clasificaron los Dtr de los rizobios en tres grupos diferentes de acuerdo a la organización genética que presentan, dicha clasificación fue coherente con el árbol filogenético generado a partir de las secuencias aminoacídicas de las relaxasas pertenecientes a cada uno de los complejos de transferencia. La organización genética que hemos encontrado en el Dtr del plásmido pSmeLPU88b resultó ser idéntica a la de los plásmidos pSMED03, al plásmido pBNC1-01 de *Mesorhizobium* sp. BNC1, y al plásmido pOANT01 de *O. anthropi*, y constituiría un nuevo grupo debido a que presenta una composición y organización diferente a las previamente descritas. En la Figura III.7 se muestra la comparación de los cuatro tipos de Dtr hallados en plásmidos de rizobios. La diferencia más llamativa,

hallada en el plásmido pLPU88b, es la ausencia de la proteína acopladora, enzima encargada de coordinar al complejo Dtr y al complejo Mpf.

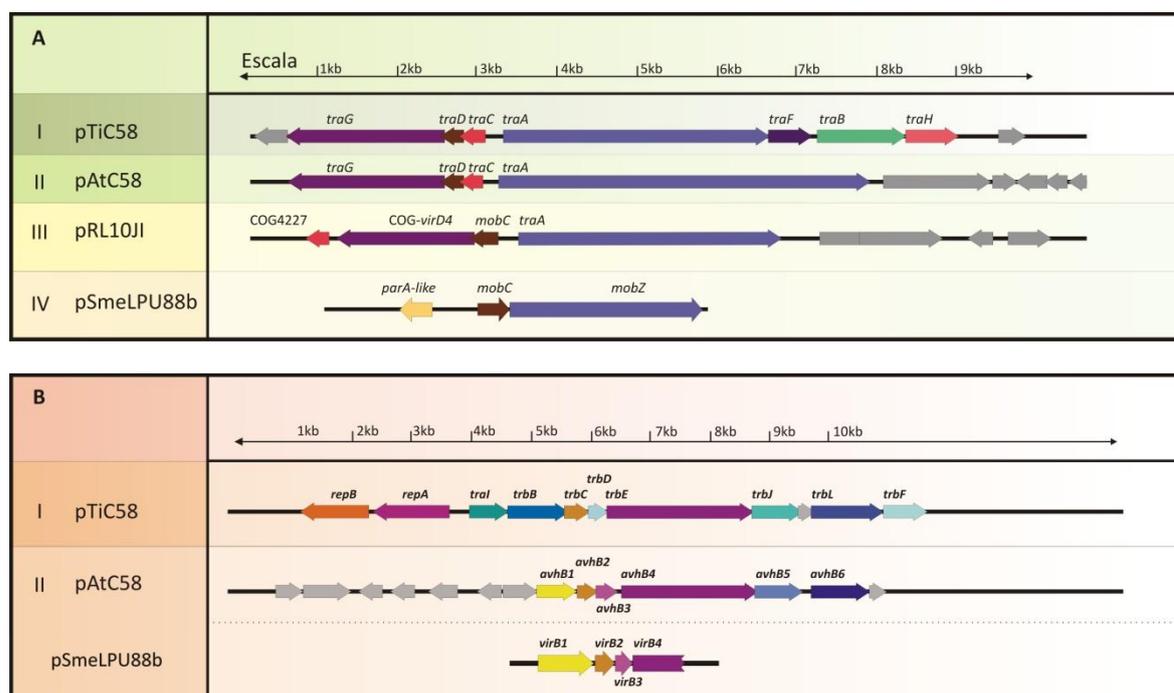


Fig. III.7: Mapa genético de las regiones Dtr y Mpf de los distintos sistemas conjugativos plasmídicos de rizobios. A) Operones *traAFBH* y *traCDG* o sus equivalentes para los cuatro sistemas de movilización descritos. Solo se esquematiza un representante de cada grupo. **B)** Organización génica de las agrupaciones de genes *tral-trb/virB* en sus dos variantes encontradas. Los genes cuyos productos de traducción mostraron similitud de secuencia y función, poseen el mismo color. Aquellos que no poseen homólogos no fueron nombrados.

A partir de los resultados que hemos obtenido será posible el desarrollo de herramientas genético-moleculares que permitan mejorar el control del riesgo asociado a la transferencia de germoplasma desde los rizobios inoculados.

En el Capítulo siguiente analizaremos con más detalle el Dtr del plásmido pSmeLPU88b en particular nos centraremos en caracterizar la enzima relaxasa y en delimitar en forma precisa el *oriT*

CAPÍTULO IV

Caracterización de la región génica asociada al Dtr del plásmido pSmeLPU88b

IV.1. Introducción: Las relaxasas y el proceso conjugativo. El gen *mobZ* presente en el plásmido pSmeLPU88b.

Como mencionamos en la Introducción de este trabajo de tesis, las relaxasas representan uno de los componentes principales del complejo del relaxosoma. Las mismas están involucradas directamente en el procesamiento inicial del ADN que será movilizado por conjugación (corte de una de sus hebras), al que se unen luego covalentemente previo a la transferencia de ambos por el sistema de secreción tipo IV presente en la membrana bacteriana (ver Introducción, sección 3.1.2.2). Brevemente, luego de la hidrólisis de un enlace fosfodiéster de la hebra de ADN que será transferida, el extremo 5' libre de la misma se une covalentemente al resto -OH de una tirosina presente en el sitio activo de la relaxasa; mientras el extremo 3' permanece también unido a la proteína por una interacción fuerte no covalente que mantiene estable la estructura de la doble hebra. Esta reacción catalizada por la relaxasa es reversible, pudiendo por tanto ocurrir un ataque nucleofílico por parte del -OH 3' libre de la hebra cortada sobre el enlace fosfotirosilo para regenerar la doble hebra intacta de ADN. La misma reversibilidad de la reacción, y la posible participación de una segunda tirosina, son capaces de regenerar en la región del *oriT* la estructura covalente de doble cadena (Byrd, D. R. y S. W. Matson, 1997). Como consecuencia del mecanismo catalítico, similar en todas las relaxasas, las mismas comparten semejanzas estructurales. Son proteínas largas que usualmente contienen dos o más dominios proteicos. Mientras el dominio relaxasa propiamente dicho se localiza en el extremo N-terminal de la proteína, en la porción C terminal existe ya sea un dominio helicasa, primasa, o u otro de función no conocida (Garcillan-Barcia, M. P., et al., 2009). A raíz de estas similitudes, a nivel de estructura primaria existen normalmente en las relaxasas tres motivos aminoacídicos conservados (Pansegrau, W. y E. Lanka, 1991). El Motivo I contiene el/los residuos de tirosina (Tyr) encargados de la actividad de corte y ligación. El Motivo II está involucrado en la interacción de la proteína con el extremo 3' del sitio de corte específico (en algunos tipos de este motivo se destaca la presencia de una serina). En el denominado Motivo III (HxHxH) se encuentran presentes tres histidinas que serían las encargadas de reclutar el Mg^{+2} para el ataque nucleofílico que realiza la Tyr, y para activar a la misma secuestrando el H del grupo -OH. Es interesante que proteínas iniciadoras de la replicación del tipo círculo rodante tienen motivos análogos a los Motivos I y III de las relaxasas pero en orden invertido (Francia, M. V., et al., 2004).

Teniendo en cuenta el rol central de las relaxasas en la movilización conjugativa de plásmidos y la similitud del gen *mobZ* (descrito en el capítulo precedente) con genes correspondientes a otras relaxasas, presentaremos a continuación los análisis que hemos realizado de *mobZ* (y su producto de traducción), y de la región de ADN

localizada inmediatamente río arriba como posible origen de transferencia (*oriT*) del plásmido pSmelPU88b.

IV.2. Caracterización del gen *mobZ*. Identificación de motivos estructurales presentes en proteínas de la familia de las relaxasas.

En primer lugar analizamos si la secuencia *mobZ*, y la de su producto de traducción, presentan motivos conocidos presentes en relaxasas. El análisis de la secuencia de ADN muestra un posible gen de 2.487pb, Figura IV.1., correspondiente a un producto de traducción de 91KDa (828 aminoácidos) con un *pl* estimado en 5.82.

AGCGCCGAGGGGAGACGTAGCCC

TTGGAAATCTTCTTCGGCGCATTACCAGCGAATGGGAGCAGCGCGCGCAGCGCTGCTG
 ·L·E·I·F·F·G·A·F·T·S·E·W·E·Q·R·R·A·A·L·L·
 CACGAAATGTCGTCTGGCGGGCGAGGCGCTTGGGCAGAGGAAGAGATGCGAAAGCGCCTG
 ·H·E·M·S·S·G·G·R·G·A·W·A·E·E·E·M·R·K·R·L·
 AAGCAGGTGGCTCAACTTGGCGCCGTCGGTGGCGGGGAGGCTCAAGCGGCACACCCGGT
 ·K·Q·V·A·Q·L·G·A·V·G·G·G·G·S·S·G·T·P·G·
 GGTCGTGGACCCGCATCGAAGGGCGGGGCGGCTCCTCGAGCGGCGACCCGGCCCGCA
 ·G·R·G·P·A·S·K·G·G·A·A·P·R·A·A·T·P·A·A·R·
 CCGATGGAGGCGCGCTAGCGGCCATCGCAAAGGAAGCCAGCCGGCAGTCGTCAAATG
 ·P·M·E·A·R·L·A·A·I·A·K·G·S·Q·P·A·V·V·K·**M**·
 GCGTCT**TAT**GGCGGGTGCCTCGGGTCCGATGCTGAAC**TAT**GTGTGCGGTGGCGGC
A·S·Y·G·G·G·A·R·V·G·A·M·L·N·**Y**·V·S·R·G·G·**M-I**
 GAGCTGAAGGTGAAAATGAAAGCGGCAGGATCCTCGAGGGGCGGGAGGAATTGGCGCGC
 ·E·L·K·V·E·N·E·S·G·R·I·L·E·G·R·E·E·L·A·R·
 ATCCGTGGCGATTGGGACCACCTTTTTCAGAACCAGCGCAGAAAGCCGCGACATTGGGAGT
 ·I·R·G·D·W·D·H·L·F·Q·N·R·A·E·S·R·D·I·G·S·
 TTTTCCGTGCAAAATCGCTGCGTCCGGCTTTGCATCGGACGAGGCATTGCACGAGCAGGTG
 ·F·S·V·E·I·A·A·S·G·F·A·S·D·E·A·L·H·E·Q·V·
 AGGAGCACCTGACGAGCGGCTTTGGGGACCAGGCTATGCTTATGCGATTGCGAAAAAT
 ·R·S·T·L·T·S·G·F·G·D·R·R·Y·A·Y·A·I·A·K·N·
 GACGGCAGCTCCGTGGCCGTTTCAGGGCTTGTCTGTTGCGAAGCGAGCAGGGGGAGCGG
 ·D·G·S·S·V·A·V·Q·G·L·V·V·L·R·S·E·Q·G·E·R·
 CTAACGGGCGACGTCGAAGGCGCGCCGCATCATCCAGGGCCGTTACGACGCCAGCGCGGCC
 ·L·T·G·D·V·K·A·A·G·I·I·Q·G·R·Y·D·A·S·A·A·
 GCGGGCGAGGCTGCGGCGAAGTTCTCCTTTTCAGGGTTACGAAATGGCGTCGAGTTCGGC
 ·A·G·E·A·A·A·K·F·S·F·Q·G·Y·G·N·G·V·E·F·G·
 GCCAGCCGCTTGCAGGACTGGTCGATCGGCATCACGGCTTCGCGACGATCGTGGCCAG
 ·A·S·R·L·R·G·L·V·D·R·H·H·G·V·R·D·D·R·G·Q·
 TCGATAACGAATGAGAAGGTGGCGGGCGACCTGGTGAGAAGGAATGGCGCGGGGAGCTC
 ·S·I·T·N·E·K·V·A·G·D·L·V·Q·K·**E·W·R·G·E·L**·
 CAC**AGT**CGCAAGAGCCGCGACGCAATGCACGTATCATGTCCGGCTCGGGCCGGAACCGAC
H·S·R·K·S·R·D·A·M·H·V·I·M·S·A·R·A·G·T·D·**M-II**
 GTTGCCGCATTCGAAGGTGCGGTGCGCGACTTCTGGCGCATCAGTTTGCTGGGCACCGG
 ·V·A·A·F·E·G·A·V·R·D·F·L·A·H·Q·F·A·G·H·R·
 TATGTCTTTGCCATGCACGATCCGGCTAGCGATCCGAAAGAGGCGGGGGAGGGGGAAAG
 ·Y·V·F·A·M·H·D·P·A·S·D·P·K·E·**A·G·E·G·G·K**·
 CGTCCG**CAT**GTGCATGCC**CAT**GCGATCGTAGCGATGAAATCGGATTCGGGTGATCGCATC
R·P·H·V·H·A·H·A·I·V·A·M·K·S·D·S·G·D·R·I·**M-III**

GAGACTACGCTGCCGTGTTTCGCGAATGGCGATCCGTTATGGCAGAGAAGGCCGGGAG
 ·E·T·T·P·A·V·F·R·E·W·R·S·V·M·A·E·K·A·R·E·
 CACGGCATTGAGATGGAAATGACCGACCGGCGAGTTTGCTGCCCCGCCGCATTCAGG
 ·H·G·I·E·M·E·M·T·D·R·R·E·F·A·A·P·P·A·F·T·
 CGCACCCAGGTCCGGCCGGTGAGCCGCGAAGGCCGCACAGAGCATGTCGGGACGAGCGAA
 ·R·T·Q·V·R·P·V·S·R·E·G·R·T·E·H·V·G·T·S·E·
 CGGGCGCAGGCGAGGTATGACGCCAAGCGCGGGCCGACGCATGGTCGCGAAAAGCGAT
 ·A·A·Q·A·R·Y·D·A·K·R·G·G·R·R·M·V·A·K·S·D·
 CGGAGCCGGCAGTACATCATAAAGGCCGAGGAAACCTGGCAGAGGGTCGCCCTTGCGGGT
 ·R·S·R·Q·Y·I·I·K·A·Q·E·T·W·Q·R·V·A·L·A·G·
 GCGGACCATCAGATCGTGACCTATGCTACGCAGCATCAAAGTGTGTTAGAACGAGCGTT
 ·G·D·H·Q·I·V·T·Y·A·T·Q·H·Q·K·C·L·E·A·S·V·
 TCGACAGCGCAGACGGAAGCGAGCGGAACGTGCATTTCGCGCGGACTTTGGATCGAACTTC
 ·S·T·A·Q·T·E·A·S·G·T·V·I·R·A·D·F·G·S·N·F·
 CGGATCAATTTGGCTACATTGCAGGAGATGGTTTTGGAGGGTCAGGAATTGCGCGAAATG
 ·R·I·N·L·A·T·L·Q·E·M·V·L·E·G·Q·E·L·R·E·M·
 TCACGAGCAGAGTTTGAGGCTTACGAGAAGAAGGTCGAGACAGCCTTGTTCAAGTTGGAG
 ·S·R·A·E·F·E·A·Y·E·K·K·V·E·T·A·L·F·K·L·E·
 CGGTTCGGTCTCGGCAGACGATCGGGCGGACTTTGACGAGGTAGCCGGCCTGGCCCCGAGAT
 ·R·S·V·S·A·D·D·R·A·D·F·D·E·V·A·G·L·A·R·D·
 TTCGTCAACCAGAAGCGTGAGCTGGTGGATCTCTACGAGCAGCGCAAAGAAGCGTTGGCG
 ·F·V·N·Q·K·R·E·L·V·D·L·Y·E·Q·R·K·E·A·L·A·
 GAGCAAGGTGGCGAAGCGCCTCGAAGCGAGCCGCGTGAGCCAACCAACGACGAGTGGGCC
 ·E·Q·G·G·E·A·P·R·S·E·P·R·E·P·T·N·D·E·W·A·
 GCTGCAGTCGCAAGCACGGCGAGGCTGTGTCGAGGTTCGCAACGAGGCGATGGTAGAA
 ·A·A·V·A·K·H·G·E·A·V·V·E·V·G·N·E·A·M·V·E·
 ATCGAGCACTACCGAGAGGGACTTGATCGGATCGAGGCCGGCGAGTTTTCCGCCGATCGC
 ·I·E·H·Y·R·E·G·L·D·R·I·E·A·G·E·F·S·A·D·R·
 AAAGAAAGAATGCAGGCCGGCTTCAGCAGCGGATGGAGCGGGCCGCGCAGTTGGCTGTC
 ·K·E·R·M·Q·A·G·L·Q·Q·A·M·E·R·A·A·Q·L·A·V·
 GATGGAAACAGCTACCTCAGAGACGTTGCTGAGCAGGACCGGATTTGCGACAGGCAATC
 ·D·G·N·S·Y·L·R·D·V·A·E·Q·D·R·D·L·R·Q·A·I·
 GATCGCGAGGAAAAACAAGCCGAAGTTGATCGACAGAATGACGGGCGCGCAGATGTCATC
 ·D·R·E·E·K·Q·A·E·V·D·R·Q·N·D·G·R·A·D·V·I·
 AACCGCAACGACGATCGCCCGATGGAAGAAAAGGACAAGACGCCGCAATTTTGATGCT
 ·N·R·N·D·D·R·P·M·E·E·K·D·K·T·P·A·N·F·D·A·
 GCTGGCGAGCAGCAGCGTGATGGTAGCGAGGGCGAGGCAGAAGGGCGGCCGATCGACAGC
 ·A·G·E·Q·Q·R·D·G·S·E·G·E·A·E·G·R·P·I·D·S·
 AAGGCGCGCAAGATCACAAGTTGGCGCCTACGGTCGATGCTACAAATCACCTGCAAGAT
 ·K·A·R·Q·D·H·K·L·A·P·T·V·D·A·T·N·H·L·Q·D·
 CGTCTAAACAAGGATCGGGAAGCCGCTCAACTCGGCGGAGAAATGCCACGGACTGACCCT
 ·R·L·N·K·D·R·E·A·A·Q·L·G·G·E·M·P·R·T·D·P·
 GCACAACAGCATGTTTCTCGGCTCAAGGAGCTTGC GCGGGAGCAGTTTGAACAGAGGGAA
 ·A·Q·Q·H·V·S·R·L·K·E·L·A·R·E·Q·F·E·Q·R·E·
 CGCGACCACGGTGACCGGATCGCTAA
 ·R·D·H·G·D·R·D·R·*·

Fig. IV.1: Secuencia nucleotídica completa de *mobZ* y de su producto propuesto de traducción. En rojo y azul se indican los codones de inicio y terminación, respectivamente. En la primera línea se indica en verde la región propuesta donde debe encontrarse el sitio de unión a ribosomas. En amarillo se indican los residuos importantes para la catálisis y en gris y subrayado los Motivos I, II y III (ver sección IV.2) conservados en otras relaxasas. La secuencia posee un total de 2487pb correspondiente a un producto de traducción de 828 aminoácidos.

Basados en las secuencias consenso propuestas para los Motivos I, II, III presentes en otras relaxasas (Francia, M. V., et al., 2004), y en la conservación de las propiedades fisicoquímicas de los amino ácidos incluidos en los mismos, hemos buscado motivos similares en la secuencia aminoacídica de MobZ, los resultados que se presentan en la Figura IV.2 siguiente:

	MOTIVO I		MOTIVO II		MOTIVO III	
	121	128	342	360	401	420
Y (96)	LASYGGGAR	(254)	WRKELHSRKGRDVMHLI VSAR	(314)	MTEGGKRP H I H A H A I I T M R S E T	
Z (100)	MASYGGGAR	(258)	WRGELHSRKSRDAMHVI MSAR	(317)	AGEGGKRP HVH A H A I V A M K S D S	
Z0 (102)	MASYGGGAR	(260)	WRGELHSRKSRDVMHVI MSAR	(319)	AGEGGKRP HVH A H A I V A M K S D S	
Z1 (120)	VISYGHGVA	(294)	SWDKTLNSYKPRDTMHMI LSAK	(351)	MAE E G G -- H I H V H A V V A V K G E D	
Z2 (105)	VVSYARGVA	(278)	EWGPSLRQSARDTMHLI ISAK	(335)	DKESAG -- H I H A H A V I T V K N E S	
Consenso	(121) MAS ^Y GGGAR	(301)	EWR ELHS ^R KS ^R RD MHLI MSAR	(361)	GEGGKRP ^H I ^H A ^H A ^I IVAMKSES	

Fig. IV.2: Motivos I, II y III presentes en la proteína MobZ. Z0 corresponde a un fragmento aminoacídico de una posible relaxasa de *Sinorhizobium medicae* WSM419 presente en el plásmido pSmed03. Z1 corresponde a un fragmento aminoacídico de la proteína MII9292 (gen756pb) codificada en el plásmido pMLa de *Mesorhizobium* sp. MAFF303099. Z2 corresponde a la proteína hipotética 635877245 Nham_4527 (gen745pb) de *Nitrobacter hamburgensis* X14. Y corresponde a la proteína hipotética YP_665797 (gen895pb) perteneciente a *Mesorhizobium* sp. BNC1. Z corresponde a la hipotética relaxasa MobZ (gen828pb) del plásmido pSmeLPU88b. Código de color: rojo= conservado; azul=parcialmente conservado, verde=poco conservado; negro=no conservado. En fondo amarillo se indican los aminoácidos conservados más relevantes en cada uno de los motivos.

Dentro del Motivo I se observa la presencia de una tirosina en la posición 103 (Y103) de la proteína, que puede corresponder al residuo propuesto en otras relaxasas como parte del sitio activo de la enzima, Figuras IV.1. y IV.2. En la Figura IV.1 puede verse además la presencia de una segunda tirosina cercana, Y115. En el MOTIVO II puede verse por su parte la presencia de una serina, S302, también conservada en varias relaxasas por estar involucrada en el contacto íntimo con el ADN sustrato según hemos mencionado en la Introducción de este Capítulo. Finalmente, en el Motivo III se observan claramente los tres residuos de histidina, H363, H365 y H367 (separados entre sí por aminoácidos hidrofóbicos) propuestos como necesarios para la activación de la reacción catalizada por la relaxasa. La secuencia de este último motivo muestra además similitud parcial de secuencias con el Motivo III presente en relaxasas de las superfamilias MobP definidas por Francia et al. (2004) en un análisis de las regiones génicas correspondientes a los sistemas Dtr de diferentes plásmidos movilizables.

Con el propósito de investigar la posición filogenética de la proteína MobZ en relación a las relaxasas de otros plásmidos, realizamos un análisis de distancias según se presenta en la Figura IV.3. Para facilitar el reconocimiento y localización de las proteínas de plásmidos conocidos, en la figura hemos marcado la posición ocupada por relaxasas de plásmidos de los grupos MobP y MobQ, relaxasas de plásmidos simbióticos (pSym), relaxasas de plásmidos encontrados en bacterias de la familia Rhizobiaceae, y relaxasas de otros plásmidos ambientales. Claramente, la proteína MobZ no se incluye dentro de

ninguno de los grupos anteriores, formando una rama independiente junto a plásmidos presentes en las cepas *S. medicae* WSM419, *Mesorhizobium* sp. BNC1, *Nitrobacter hamburgensis* X14 y *Mesorhizobium loti* MAFF303099 (todos organismos del orden Rhizobiales). Se observa además que el grupo que incluye a MobZ ocupa una posición filogenética intermedia entre la que corresponde a relaxasas de plásmidos del tipo MobP y las de plásmidos recuperados de cepas ambientales de géneros externos a la familia Rizobiaceae.

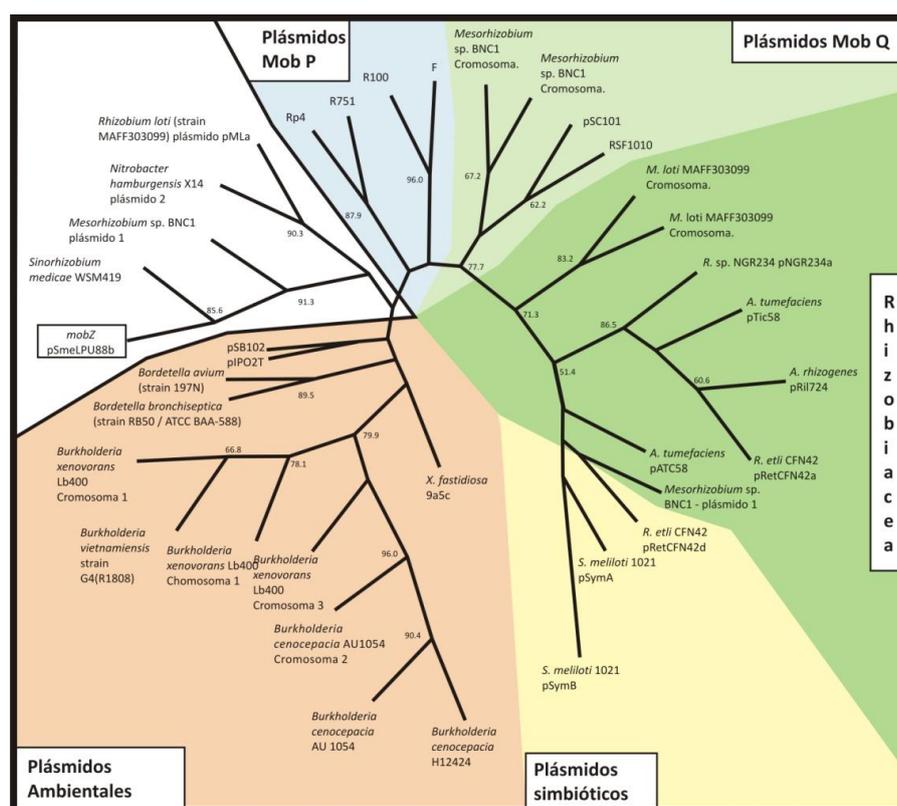


Fig. IV.3: Análisis de distancias para establecer la posición filogenética de MobZ respecto de otras relaxasas plasmídicas. El análisis filogenético de distancias fue realizado utilizando la secuencia completa de MobZ y de relaxasas de los organismos indicados en la figura, y el programa *neighbor joining* del paquete de programas Phyllip (<http://bioweb.pasteur.fr/phylogeny/intro-en.html>). Los porcentajes en cada una de las ramas del árbol corresponden al peso de las mismas calculado a partir de un análisis *bootstrap* de 1000 iteraciones. En diferentes colores se han agrupado las relaxasas similares a MobZ (blanco), aquellas de las familias MobP (celeste) y MobQ (verde claro), las de plásmidos simbióticos (ocre), las de plásmidos de la familia Rhizobiaceae (verde oscuro), y las presentes en otros plásmidos ambientales (rosa).

IV.3. Fenotipo de movilización de un mutante *mobZ* insercional diseñado para generar un producto MobZ con 300 aminoácidos del extremo N terminal.

Como hemos mencionado en la Introducción de este capítulo, la actividad relaxasa se localiza en la porción amino terminal de las mismas. Con el propósito de generar un mutante que carezca de la porción C-terminal de MobZ e investigar si ello afecta o no la movilización del plásmido pSmeLPU88b, interrumpimos el gen *mobZ* por integración del vector no replicativo pB6 Δ Sac, que contiene un fragmento *Bam*HI-*Sac*I de 512 pb interno a *mobZ*, según se muestra esquemáticamente en la Figura IV.4 siguiente:

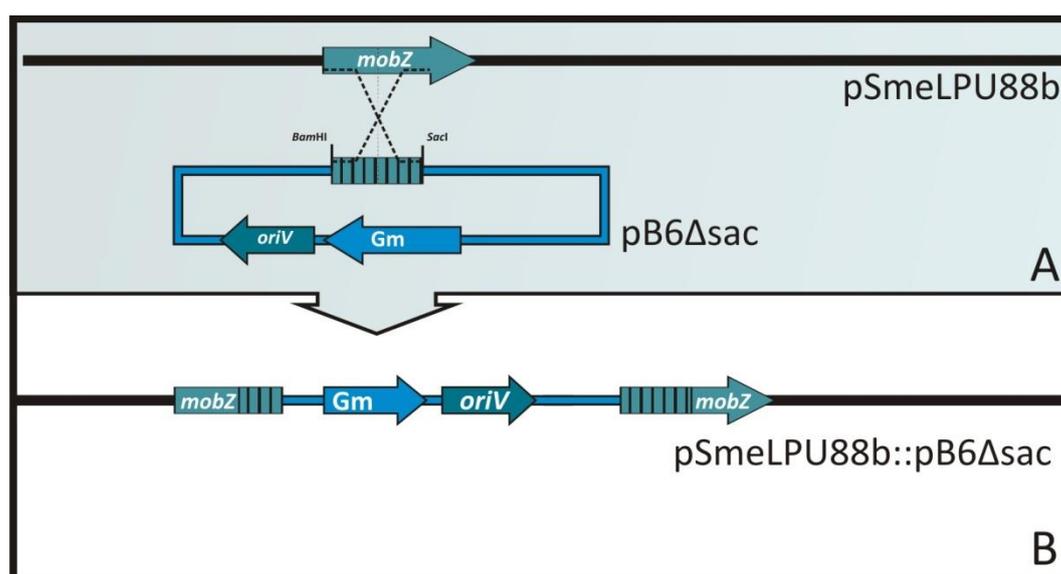


Fig.IV.4: Esquema de la integración del vector pB6 Δ Sac en el gen *mobZ* donde se muestra la estructura del mutante resultante (LPU88ReIm). En un primer paso el plásmido pB6 obtenido a partir de una biblioteca *Bam*HI parcial del plásmido pSmeLPU88b (Materiales y Métodos, tabla II-2; Capítulo III, tabla III-1) fue digerido con la endonucleasa *Sac*I y religado para dar lugar al plásmido pB6 Δ Sac que contiene un fragmento *Bam*HI-*Sac*I de 512pb interno a *mobZ*. Dicho plásmido fue a continuación transferido por conjugación desde *E. coli* S17-1 a la cepa LPU88 (A), y los mutantes resultantes de la integración del vector seleccionados en medio TY con Sm y Gm (B). La correcta integración del vector en el plásmido pSmeLPU88b fue confirmada por PCR.

La interrupción generada por la integración del vector pB6 Δ Sac debe resultar en la remoción de los Motivos II y III del extremo C-terminal de la proteína dando lugar a un producto de traducción cercano a los 300 aminoácidos. En concordancia con lo observado en otras relaxasas, el mutante mostró ser capaz de movilizar el plásmido pSmeLPU88b a la cepa receptora *Agrobacterium tumefaciens* UBA PF2 hecho que confirma la prescindibilidad de los Motivos II y III para la transferencia conjugativa del plásmido.

IV.4. Caracterización bioquímica de la hipotética relaxasa MobZ.

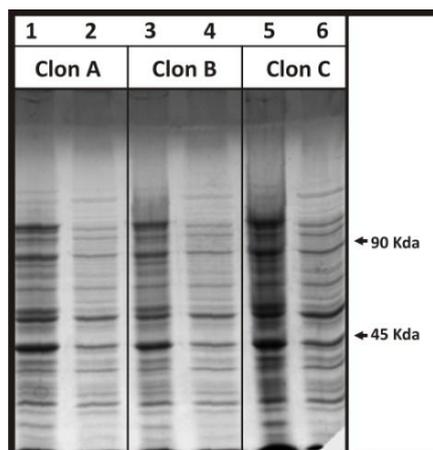
El análisis de secuencias de relaxasas permite inferir grados de relación filogenética entre unas y otras como lo hemos hecho a partir de los resultados presentados en la Figura IV.3. Sin embargo, la posibilidad de contar con un ensayo *in vitro* que permita evaluar la actividad de corte de una relaxasa permite confirmar su actividad bioquímica sobre ADN sustratos, reconocer el sitio específico de corte (*nic*), y caracterizar los requerimientos de secuencia de sus sustratos que podrán ser luego buscados en los *oriTs* de otros plásmidos de *S. meliloti* y otros rizobios. Con el objetivo de avanzar en la caracterización funcional de MobZ decidimos evaluar su capacidad de unión a ADN del origen de transferencia del plásmido pSmeLPU88b (ver sección siguiente IV.6). Mostraremos que la región comprendida entre los genes *parA* y *mobC* es capaz de funcionar como origen de transferencia conjugativo como dedujimos del análisis informático presentado en el Capítulo III precedente, sección 4.1). En relación a ello, otras proteínas purificadas con actividad relaxasa ya han mostrado actividad *in vitro* para unir y cortar ADN simple cadena, en presencia de Mg^{+2} , y sin necesidad de la presencia de proteínas accesorias (Lanka, E. y B. M. Wilkins, 1995). Con el propósito de abordar ensayos de unión de MobZ al *oriT* emprendimos entonces la expresión y purificación de la proteína en *E. coli*.

IV.4.1. Expresión y purificación de la proteína MobZ.

En un primer paso, la secuencia codificante de *mobZ* fue transferida desde el plásmido pKN que contiene la secuencia codificante completa sin codón de terminación (Materiales y Métodos, sección II.2.15.1) al vector de expresión pET30. La secuencia codificante resultante generó una fusión del extremo C-terminal de MobZ a 6 restos consecutivos de histidina (MobZ-His₆). La transformación del plásmido recombinante en la cepa *E. coli* BL21 permitió ensayar la inducción de la expresión de MobZ-His₆ por agregado de IPTG, y *a posteriori* purificar la proteína por cromatografía de afinidad utilizando una resina unida a níquel siguiendo procedimientos estándar. Lamentablemente, los intentos de purificar la relaxasa en condiciones nativas a partir de extractos citoplasmáticos de las células inducidas de *E. coli* BL21 no arrojaron resultados positivos.

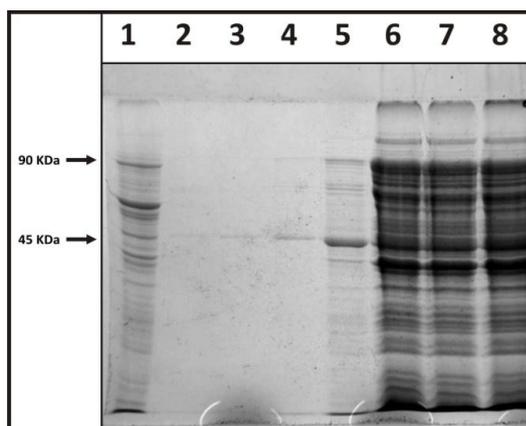
Si bien se logró inducir la expresión de la proteína, según puede verse en 3 clones independientes (A, B, y C) de las calles 1, 3, y 5 del gel SDS-PAGE que se muestra en la Figura IV.5, la unión de la proteína nativa a la columna de níquel fue muy débil eluyendo casi en su totalidad de la proteína expresada en las primeras fracciones, a concentraciones de imidazol entre 20-40mM, y acompañada además de otras proteínas como se aprecia en las calles 6, 7, y 8 del SDS-PAGE de la Figura IV.6.

Fig. IV.5: SDS-PAGE correspondiente a la evaluación de la expresión de la proteína MobZ-Hisx6 en la cepa *E. coli* BL21. La figura corresponde a un gel de poliacrilamida 10% con SDS obtenido luego de la sobreexpresión de los clones A, B y C con IPTG 1mM, durante 3hs. En las diferentes calles se sembraron cantidades equivalentes de células. En todos los casos se observan en los cultivos inducidos (1, 3 y 5) aumentos de intensidad en dos bandas correspondientes a componentes de aprox. 90KDa y 45KDa, respecto de los cultivos no inducidos (2, 4 y 6)



A raíz del resultado obtenido, y teniendo en cuenta que la relaxasa de un plásmido de *R. etli* pudo ser replegada a su forma activa luego de una purificación en condiciones desnaturalizantes, realizamos una purificación en columna pero con la proteína en presencia de urea 8M. Tanto la unión a la columna con níquel como su posterior elución se llevaron a cabo en presencia de urea. A continuación, y para generar condiciones donde la proteína pueda replegarse, se eliminó la urea por diálisis. Con este procedimiento pudo obtenerse una proteína de aproximadamente 92KDa, acompañada de otra proteína de aproximadamente 45KDa, ambas con elevada afinidad por la columna de Ni-NTA, Figura IV.7., calle 6.

Fig. IV.6: SDS-PAGE correspondiente a la evaluación de la purificación nativa de la proteína MobZ-Hisx6 a partir de un extracto citoplasmático de la cepa *E. coli* BL21. La figura corresponde a un gel de poliacrilamida 10% obtenido luego de realizada la purificación en condiciones nativas según se describe en Cap. II sección II.2.15.1. Calle1: Marcador de peso molecular. Las flechas de la izquierda indican la posición estimada para componentes de 97KDa y 45KDa, respectivamente. Calle2: Elución con Imidazol 300mM. Calle3: Elución con Imidazol 100mM. Calle4: Elución con Imidazol 40mM. Calle5: Elución con Imidazol 20mM. Calle6: Lavado de la columna con tampón B. Calle7: Volumen eluido que atraviesa la columna. Calle8: Lisado celular



El producto de menor peso molecular puede corresponder a una proteína diferente a la relaxasa, o bien a un producto de digestión proteolítica de la misma o generado a partir de una traducción iniciada en un sitio interno del mRNA. El análisis por espectrometría de masas UV-MALDI-TOF de digeridos tripticos de las proteínas de 45KDa y 90KDa reveló la presencia de 2 péptidos comunes a ambas y a la proteína MobZ digerida *in silico* con tripsina. Como se muestra en la Figura IV.8. ambos péptidos, de 1164.58KDa y 1377,71KDa, se localizan en el extremo C-terminal de MobZ, hecho que confirma que el

producto de 45KDa corresponde ya sea a un producto de proteólisis de MobZ o a un polipéptido resultante del inicio de la traducción en un codón interno del mismo mRNA de la relaxasa.

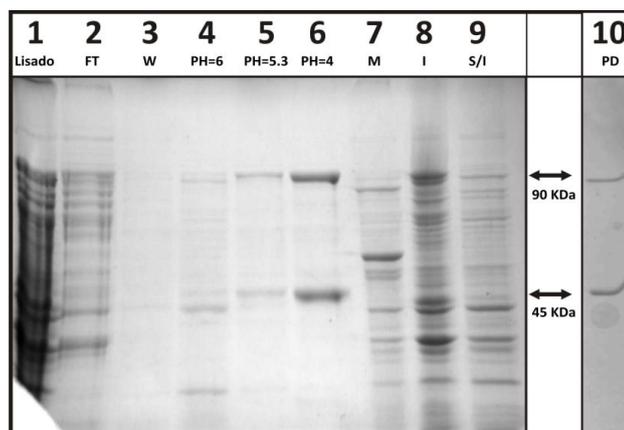


Fig. IV.7: SDS-PAGE correspondiente a la evaluación de la purificación en condiciones desnaturalizantes en presencia de urea 8M de la proteína MobZ-His6 obtenida de la cepa *E. coli* BL21. La figura corresponde a un gel de poliacrilamida 10% obtenido luego de la una purificación en condiciones desnaturalizante según se describe en Materiales y Métodos, sección II.13.1. **Calle1:** Fracción citosólica cruda. **Calle2:** Fracción eluida que no se une a la columna(FT). **Calle3:** Lavado de la columna con tampón B. **Calle4:** Elución con tampón pH=6. **Calle5:** Elución con tampón pH=5.3. **Calle6:** Elución con tampón pH=4. **Calle7:** Marcador de PM. **Calle8:** Lisado de células inducidas. **Calle9:** Lisado de células sin inducir. **Calle10:** Eluido con buffer pH=4 (calle 6) luego de la diálisis.

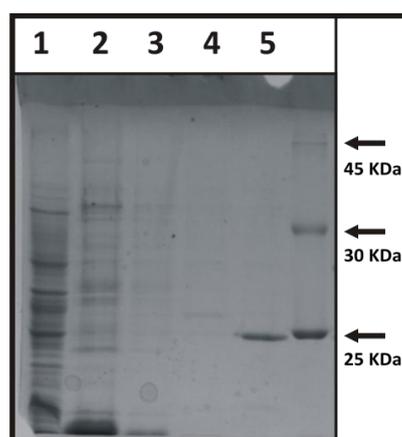
Considerando esta última posibilidad, en mobZ y a la altura de los codones de los aminoácidos 405 y 407 existen dos potenciales codones de inicio ATG, con secuencias inmediatamente río arriba ricas en AG, que de ser funcionales como sitios de inicio en *E. coli* darían lugar a un producto de traducción cercano a 50KDa. Será interesante investigar si la aparición del producto truncado existe también en *S. meliloti*, o sólo corresponde a un artefacto derivado de la expresión de MobZ en una especie heteróloga. La existencia de proteínas adicionales codificadas dentro del propio gen de una relaxasa (solapamiento génico) es un fenómeno que ya se ha reportado (Francia, M. V., et al., 2004).

Fig. IV.8: Secuencia y localización de los 2 péptidos trípticos comunes a los productos de expresión de 45KDa y 90KDa, y a la proteína MobZ detectados por análisis UV-MALDI-TOF. En la secuencia que se muestra en la figura se indican en gris los 2 péptidos que se localizan en la región C-terminal de ambas proteínas. Masa calculada para el péptido ELVDLYEQR, 1164,58KDa; masa calculada para el péptido AAQLAVDGNLYLR, 1377,71KDa.

```
LEIFFGAF TSEWEQRRAALLHEMSSGGRGAWAEEEMRKRLKQVAQL
GAVGGGGSSSGT PGGRG PASKGGAAPRAATPAARFMEARLAAIAKG
SQPAVVKMAS YGGGARV GAMLNYVSRGGELKVENESGRILEGREEL
ARIRGDWDH LFNRAESR DIGSF SVEIAASGFASDEALHEQVRSTL
TSGFGDRRYAYAIAKNDGSSVAVQGLVLRSEQGERLTGDVKAAGI
IQGRYDASAAAGEAAAKFSFQGYGNGVEFGASRLRGLVDRHHGVRD
DRGQSIITNEKVAGDLVQKEWRGELHRSRKRSDAMHVMIMSARAGTDVA
AFEGAVRDFLAHQFAGHRVVFAMHDPASDPKEAGEGGKRPVHHAHA
IVAMKSDSGDRIETTPAVFREWRVSVMAEKAREHGIEMEMTDREFA
APPAFTRTQVRPVSREGRTEHVGTSEAAQARYDAKRGGRRMVAKSD
RSRQYI IKAQETWQRVALAGGDHQIVTYATQHQCLEASVSTAQTE
ASGTVIRADFGSNFRINLATLQEMVLEGGQELREMSRAEPEAYEKKV
ETALFKLERSVVSADDRADFDEVAGLARDVFNQKR ELVDLYEQR KEA
LAEQGGEAPRSEPREPTNDEWAAA VAKHGEAVVEVGNEAMVEIEHY
REGLDRIEAGEF SADRKERMQAGLQQAMER AAQLAVDGNLYLR DVA
EQDRDLRQAIDREKQAEVDRQNDGRADV INRNDRPMEKDKTPA
NFDAAGEQQRDGSEGEAEGRPIDSKARQDHKLAPTVDATNHLQDRL
NKDREAAQLGGEMPRTDPAQQHVSRLKELAREQFEQRERDHGDRDR
KLAAALEHHHHHH
```

Teniendo en cuenta la mezcla de dos proteínas que obtuvimos luego de la purificación, que en otras relaxasas el dominio N-terminal con su Motivo I presentó actividad catalítica (Perez-Mendoza, D., et al., 2006), y finalmente que el mutante insercional de la sección IV.3. fue capaz de movilizar el plásmido pSmeLPU88b, resolvimos abordar la expresión de sólo la porción amino terminal de MobZ para eliminar el polipéptido contaminante de 45KDa y ensayar luego la actividad con el producto truncado. Con una estrategia similar, Pérez-Mendoza et al., 2006 reportaron la purificación del dominio N-terminal de la relaxasa del plásmido pRetCFN42d de *Rhizobium etli* y la medida posterior de su actividad catalítica. En el caso de la relaxasa de este rizobio, la necesidad de construir una proteína truncada no derivó de la aparición de productos espurios sino de la imposibilidad de expresar la proteína completa en *E. coli*.

Fig. IV.9: SDS-PAGE correspondiente a la evaluación de la purificación de la proteína MobZ Δ Not-Hisx6 en la cepa *E. coli* BL21. La figura corresponde a un gel de poliacrilamida 12% con muestras de un clon de *E. coli* BL21 con el que se indujo la expresión de Mob Δ NotZ-Hisx6 con IPTG 1mM durante 3hs, y realizó luego una purificación de la proteína en condiciones desnaturalizantes. **Calle1:** Fracción citosólica cruda. **Calle2:** Fracción eluída que no se une a la columna. **Calle3:** Lavado con tampón pH=7,6. **Calle4:** Elución con tampón pH=6. **Calle5:** Elución con Imidazol 300mM. **Calle6:** Marcador de PM.



Construimos entonces el plásmido pET Δ Not (Materiales y Métodos, sección II.2.15.2) que sólo contiene el fragmento de ADN correspondiente a los primeros 241 aminoácidos de la proteína MobZ fusionados a las 6 histidinas. Como describimos precedentemente, se realizó una purificación en condiciones desnaturalizantes con renaturalización por diálisis. Se obtuvo, de esta manera, una proteína de aproximadamente 22KDa correspondiente al peso molecular calculado. El extracto proteico que contiene la proteína MobZ Δ Not-H₆ fue criopreservado en glicerol y utilizado en los ensayos que se describen en la sección siguiente.

IV.4.2. Ensayos para evaluar el reconocimiento del *oriT* por la proteína MobZ Δ Not.

En la sección siguiente IV.6. mostraremos la identificación inequívoca de una región de ADN que contiene al *oriT* del plásmido pSmeLPU88b. Para investigar la capacidad de la proteína MobZ Δ Not-H₆ de unirse a dicha región de ADN que contiene al origen de transferencia conjugativa, diseñamos un ensayo de retardo electroforético (EMSA) (Materiales y Métodos sección II.2.17). En dicho ensayo analizamos si la movilidad

electroforética de un fragmento de PCR designado INT, que contiene el *oriT*, se modifica luego de la incubación del mismo con la proteína MobZΔNot purificada. El fragmento INT ha sido generado por amplificación de la región intergénica *parA-mobC* con los cebadores ITGC1 y ITGC2b según se describe en Materiales y Métodos, sección II.2.2. En el panel A de la Figura IV.10. se muestran los resultados obtenidos en el ensayo.

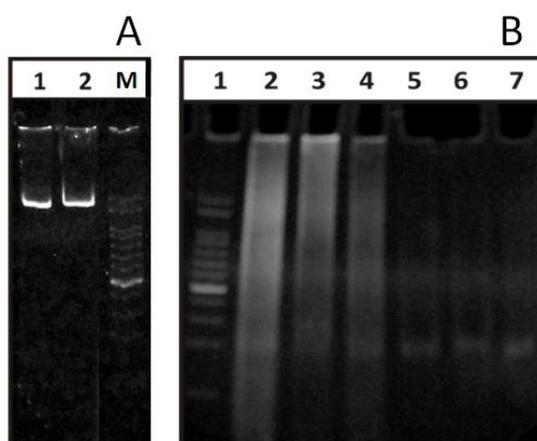


Fig. IV.10: Análisis de la movilidad electroforética en gel de poliacrilamida del producto de PCR INT (región intergénica *mobC-mobZ*) (panel A), y del oligonucleótido POT (85pb interna a INT) en ausencia y en presencia de extractos de MobZΔNot. Panel A. Movilidad electroforética del fragmento INT (1nM) en ausencia (calle 1) y en presencia (calle2) de 1μM de la proteína purificada MobZΔNot. Panel B. Movilidad del oligonucleótido POT en presencia de diferentes extractos proteicos. Calle 1: marcador de peso molecular que escala de a 50pb. Calle 2: oligonucleótido POT incubado con extracto citosólico control (sin la proteína MobZΔNot), calles 3 y 4: oligonucleótido POT incubado con 5 y 2 microlitros, respectivamente, del extracto citosólico crudo que contiene a la proteína MobZΔNot luego de la inducción con IPTG, calle 5: oligonucleótido POT incubado con la proteína MobZΔNot purificada en concentración 0,1 μM, calle 6: oligonucleótido POT incubado con la proteína MobZΔNot purificada en concentración 1 μM, calle 7: oligonucleótido POT (0,5μM).

Según se observa en el gel no detectamos ningún cambio en la movilidad del fragmento INT al agregar el extracto purificado de la proteína MobZΔNot. En la parte B de la Figura se muestra que tampoco se observaron cambios de movilidad cuando en lugar del fragmento INT se utilizó un oligonucleótido (POT, Materiales y Métodos, Tabla II-1) de 85pb incluido en la región INT (cubriendo la región donde estimamos, podría encontrarse el sitio *nic* de acuerdo a los análisis de la secuencia presentados en el Capítulo III precedente, sección III.4.1).

Teniendo en cuenta que el mutante que expresa sólo 300 aminoácidos de la relaxasa es capaz de movilizar el plásmido pSmeLPU88b (este capítulo, sección IV.3.), y que otros autores han obtenido resultados positivos utilizando relaxasas trunacadas con estrategias comparables a la aquí utilizada (Perez-Mendoza, D., et al., 2006); en probable que el resultado negativo de los ensayos anteriores derive de la necesidad de mejorar las condiciones de unión en el EMSA, o de un inadecuado plegamiento de la

relaxasa luego de su purificación en condiciones fuertemente desnaturizantes que hemos utilizado.

IV.5. Búsqueda de secuencias homólogas a *mobZ* presentes en aislamientos de *S. meliloti* proveniente de aislamientos locales.

En el Capítulo III precedente hemos hecho referencia a evidencias previas de nuestro laboratorio que han mostrado una muy frecuente complementariedad funcional entre los genes del complejo Mpf de plásmidos de una dada cepa de *S. meliloti* y el *oriT* del plásmido modelo pSmeLPU88b (Pistorio, M., et al., 2008). La observación anterior ha puesto en evidencia la existencia de un número importante de plásmidos de *S. meliloti* que comparten sus módulos funcionales Mpf y Dtr de transferencia conjugativa. Teniendo en cuenta entonces la caracterización molecular que hemos realizado de la región Dtr de uno de esos plásmidos, pSmeLPU88b, exploramos entonces la incidencia de secuencias homólogas a *mobZ* en cepas de *S. meliloti*. El análisis estuvo orientado a explorar cuán frecuente es la presencia de componentes Dtr en este rizobio y, teniendo en cuenta las características que conocemos de cada una de esas cepas (Pistorio, M., et al., 2008), determinar si los Dtr están acompañados por el componente del Mpf. Para ello diseñamos cebadores para un ensayo de PCR teniendo en cuenta las secuencias de las relaxasas relacionadas de las cepas *S. meliloti* GR4 y *Mesorhizobium* sp. BNC1, ambas pertenecientes a miembros de la familia Rhizobaceae (este capítulo, Figura IV.3.). Los cebadores Nickf y Nickr que hemos diseñado (Materiales y Métodos, sección II.2.2) permiten la amplificación de un fragmento interno de *mobZ* de 208pb. Dado que en nuestro laboratorio hemos caracterizado de modo detallado las propiedades de movilización de un grupo bien caracterizado de cepas de *S. meliloti* portadoras de un número importante de plásmidos crípticos, el ensayo de PCR se llevó a cabo sobre lisados celulares pertenecientes a representantes de cada uno de los distintos perfiles plasmídicos de la colección que hemos descrito previamente (Pistorio, M., et al., 2008). En la Tabla IV.3. se presentan los resultados obtenidos, donde se muestra amplificación positiva en 15 de las 20 cepas ensayadas. El hecho de que el 75% de las cepas analizadas haya revelado la presencia de secuencias del tipo *mobZ* sustenta la idea de un muy activo intercambio de genes mediado por una maquinaria genética de movilización muy ubicua. Situación que hemos comprobado al evaluar la capacidad de las cepas de cada uno de los grupos para movilizar el plásmido modelo pSmeLPU88b (Pistorio, M., et al., 2008).

Tabla IV-1: Evaluación de la presencia de secuencias *mobZ* homólogas en la colección de cepas de *S. meliloti* descrita previamente por Pistorio et al., (2008).

Grupo o perfil plasmídico	Aislamiento representativo	Transmisibilidad de plásmidos crípticos propios (1)	Presencia de funciones de ayuda para la removilización del plásmido pLPU88b (2)	Amplificación de secuencias internas a <i>mobZ</i> por PCR	Amplificación de la región <i>parA-mobC</i> con los cebadores ITGC1 y ITGC2b.
I	<i>SmeLPU25</i>	ND	ND	No	---
II	<i>SmePU1090</i>	ND	Si	Si	No
III	<i>SmeLPU9</i>	ND	ND	Si	No
IV	<i>SmeLPU198</i>	ND	ND	No	---
V	<i>SmeLPU5</i>	ND	ND	Si	Si
VI	<i>SmeLPU87</i>	SI	Si	Si	---
VII	<i>SmeLPU191</i>	ND	No se pudo introducir el plásmido p <i>SmeLPU88b</i>	Si	No
VIII	<i>SmeLPU86</i>	ND	Si	Si	Si
IX	<i>SmeLPU196</i>	ND	Si	Si	---
X	<i>SmeLPU258</i>	ND	ND	No	Si
XI	<i>SmeLPU26</i>	ND	No se pudo introducir el plásmido p <i>SmeLPU88b</i>	Si	Si
XII	<i>SmeLPU88</i>	SI	---	Si	Si
XIII	<i>SmeLPU57</i>	SI	ND	Si	---
XIV	<i>SmeLPU178</i>	ND	ND	Si	Si
XV	<i>SmeLPU118</i>	ND	No se pudo introducir el plásmido p <i>SmeLPU88b</i>	Si	No
XVI	<i>SmeLPU116</i>	ND	ND	No	No
XVII	<i>SmeLPU243</i>	ND	ND	Si	No
XVIII	<i>SmeLPU15</i>	ND	ND	ND	No
XIX	<i>SmeLPU110</i>	ND	ND	Si	No
XX	<i>SmeLPU121</i>	ND	Si	Si	No
XXI	<i>SmeLPU122</i>	ND	Si	ND	Si
XXII	<i>SmeLPU244</i>	ND	ND	No	No

En la tabla se listan cada uno de los aislamientos de *S. meliloti* previamente caracterizados por Pistorio et al., (2008) en base a su perfil plasmídico, las características de transmisibilidad de los plásmidos crípticos de cada una de ellas, y la capacidad de movilizar el plásmido p*SmeLPU88b*. En la anteúltima columna se presentan los resultados del ensayo de PCR diseñado para la búsqueda de secuencias *mobZ*.

(1) ND significa que no se ha detectado transferencia conjugativa de plásmidos propios en la cepa analizada.

(2) ND significa que no se han detectado funciones de ayuda (*helper*) para la movilización del plásmido p*SmeLPU88b*.

En cinco de las cepas que movilizaron el plásmido pSmeLPU88b, y como era esperable, se observó detección positiva de secuencias *mobZ*. Además, en otras 6 cepas observamos presencia de secuencias relacionadas con *mobZ*, aunque las mismas no fueron capaces de transferir por conjugación plásmidos propios. En estos casos es posible que el producto de PCR provenga de la amplificación de secuencias que residen en plásmidos sin Mpf (plásmidos movilizables), o de plásmidos donde la activación de los genes asociados al Mpf requiera de señales y condiciones ambientales específicas que no han sido provistas en los ensayos realizados por Pistorio et al., (2008).

Finalmente, el caso más peculiar está representado por la cepa LPU122 donde habiéndose observado movilización del plásmido modelo pLPU88b, no se amplificaron secuencias internas a *mobZ*. Estamos seguramente en presencia de una cepa sólo portadora del sistema Mpf y sin Dtr, que parece ser la situación menos frecuente.

Además del *screening* precedente de secuencias homólogas a *mobZ*, diseñamos un ensayo de PCR dirigido a explorar el grado de conservación de otros marcos de lectura de la región del Dtr. Para ello, con cebadores anclados en la región 5' de *parA* (cebador ITGC1) y en la zona 5' de *mobC* (cebador ITGC2b) investigamos el grado de conservación del arreglo *parA-oriT-mobC* en las mismas cepas de la Tabla IV.III. La ausencia de amplificación en cepas que dieron positivo el resultado de PCR para la relaxasa, es indicativo ya sea de la ausencia de *parA* o *mobC*, o de la existencia de divergencia de secuencias en la posición de anclado de los cebadores utilizados. Cualquiera sea la causa, el resultado provee un indicio directo de diferencias existentes entre las regiones Dtr de los plásmidos presentes en las distintas cepas.

IV.6. Localización del *oriT* del plásmido pLSmeLPU88b en la región intergénica entre los genes *parA* y *mobC*.

En el capítulo anterior describimos la organización génica de la región Dtr donde propusimos a la región intergénica *parA-mobC* como la que contiene el origen de transferencia conjugativa del plásmido pSmeLPU88b. La localización propuesta para el *oriT* ha sido derivada del alineamiento de secuencias provenientes de otros plásmidos presentes en miembros de la familia Rhizobiaceae. Con el propósito de evaluar entonces si la región comprendida entre los marcos de lectura divergentes *parA* y *mobC* posee el *oriT* del pSmeLPU888b, construimos un plásmido que fuera portador de dicha zona intergénica (INT) y estudiamos su movilización conjugativa cuando en la misma cepa en *trans* se proveen el gen de la relaxasa y los genes necesarios para el desarrollo de un Mpf funcional. En un primer paso amplificamos la región INT por PCR con los cebadores

ITGC1 e ITGC2b (ver Capítulo II, Tabla II-3) y clonada en el sitio *Sma*I del plásmido replicativo pBBR1MCS5 para dar lugar al plásmido recombinante buscado pINT. Dicho plásmido fue transferido desde la cepa de *E. coli* DH5 α a la cepa S17-1, y luego por conjugación a la cepa *S. meliloti* LPU88 portadora de sus plásmidos naturales pSmeLPU88a (que contiene el Mpf) y pSmeLPU88b (donde se encuentra el gen *mobZ* y la copia original de la región INT).

En la Figura IV.11. se muestra un esquema de la configuración y resultado del ensayo en el que evaluamos la transferencia del plásmido pINT desde la cepa LPU88 (pINT) (Sm^r , Rif^r) hacia la cepa receptora *Agrobacterium tumefaciens* UBA PF2 (Rif^r) libre de plásmidos. El resultado del ensayo mostró la aparición de transconjugantes *A. tumefaciens* Rif^r - Gm^r con una frecuencia de 7×10^{-4} transconjugantes/receptora, sin aparición de colonias en el experimento control en el que el plásmido pINT se reemplazó por el plásmido pBBR1MCS5 (Gm^r) sin el fragmento INT clonado. La caracterización posterior de los transconjugantes mostró que los mismos eran efectivamente portadores del plásmido pINT. Una estrategia similar a la descrita a la que aquí hemos empleado para demostrar la funcionalidad de un fragmento de ADN como origen de transferencia conjugativo ha sido utilizada previamente por Tun-Garrido et al. (2003) con la cepa de *R. etli* CFN42 para la caracterización funcional del *oriT* del plásmido pRetCFN42a de ese rizobio.

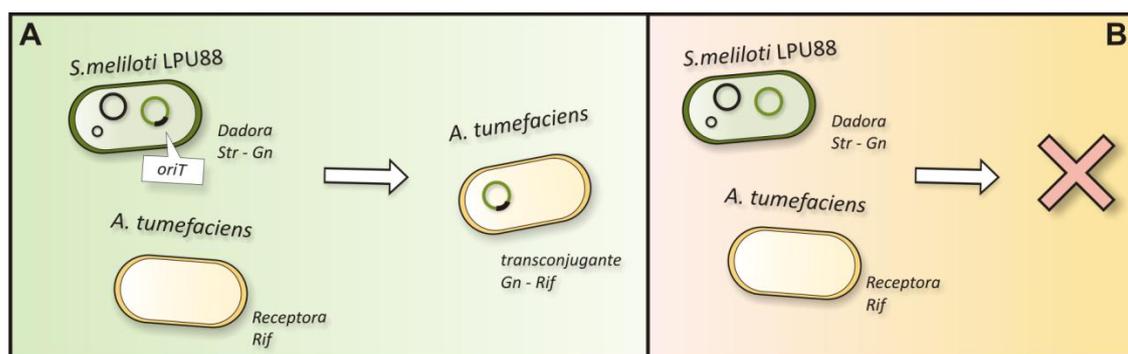


Fig. IV.11: Esquema del ensayo utilizado para evaluar si el fragmento INT es reconocido como origen de transferencia conjugativo en la cepa LPU88. Se muestran la cepa receptora *Agrobacterium tumefaciens* UBA PF2 y la cepa dadora *S. meliloti* LPU88 portadora, además de su sistema binario de conjugación, del plásmido pINT (**panel A**) o del vector de clonado vacío utilizado como control (**panel B**). Los plásmidos y las células no están dibujados a escala.

El hecho que en nuestros ensayos el plásmido pINT haya sido transferido en las condiciones ensayadas muestra que el fragmento clonado es suficiente para ser reconocido como *oriT* por el aparato conjugativo de la cepa LPU88. Además, debe destacarse que el fragmento INT ha mediado la transferencia conjugativa del plásmido que lo porta con una frecuencia comparable a la que se transfiere el plásmido salvaje ($3,8 \times 10^{-4}$) pSmeLPU88b. Tal observación indica que la movilización del *oriT* del plásmido

pSmeLPU88b no requiere que su relaxasa esté localizada en *cis* para la eficiente movilización del plásmido, como sí ocurre y ha sido demostrado para la movilización del *oriT* del plásmido simbiótico pRetCFN42d (Perez-Mendoza, D., et al., 2006).

IV.7. Búsqueda de una secuencia reducida dentro del fragmento INT con capacidad de promover la movilización conjugativa de plásmidos en la cepa LPU88.

Si bien las secuencias de los orígenes de transferencia son diferentes, la presencia de secuencias nucleotídicas repetidas e invertidas adyacentes al sitio de corte (*nic*) parecen ser importantes en la determinación de la especificidad de unión de la relaxasa (Becker, E. C. y R. J. Meyer, 2003) delimitando así la región mínima necesaria para que exista el reconocimiento previo a la transferencia del plásmido.

Habiendo identificado la zona que contiene al *oriT*, y con el objetivo de avanzar en la caracterización de la mínima secuencia necesaria para que este plásmido sea transferido, amplificamos y clonamos distintos fragmentos contenidos dentro en la región INT y evaluamos su capacidad de ser transferidos por vía conjugativa. Los fragmentos amplificados fueron clonados inicialmente en el plásmido pGemT easy y luego transferidos como fragmento *EcoRI* al vector pBBR1MCS para dar lugar a los plásmidos pC3, pC5 y pAsm. Los productos de amplificación de los plásmidos anteriores fueron de 551pb, 406pb y 238pb, respectivamente, según se muestra en la Figura IV.12. Dichos fragmentos de tamaño decreciente fueron diseñados de modo de generar 2 deleciones secuenciales de la región INT desde el extremo 5' distal de *mobC* (clones pC3 y pC5), y deleciones 5' y 3' respecto del fragmento INT en el caso del inserto del plásmido pAsm.

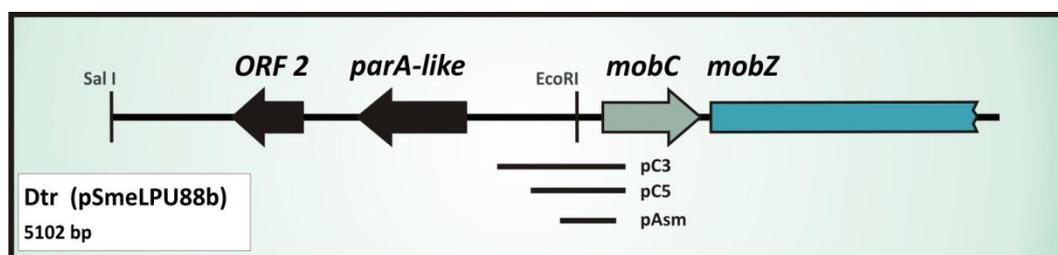


Fig. IV.12: Región intergénica *parA* – *mobC* (INT) y esquema de los fragmentos internos a la misma generados por PCR y clonados en el vector pBBR1MCS5 para evaluar su movilización conjugativa desde la cepa LPU88. pC3, pC5, y pAsm designan a los plásmidos que contienen los fragmentos indicados en la figura con barras negras. Los insertos de los plásmidos pC3, pC5, y pAsm fueron amplificados con los cebadores ITGC3 e ITGC2b, ITGC5 e ITGC2b, y AsmR y AsmL, respectivamente (ver Capítulo II, Tabla II-3); clonados en el plásmido pGemT easy (Ap^r), y luego transferidos como fragmentos *EcoRI* al plásmido pBBR1MCS5 (Gm^r).

Los plásmidos pC3, pC5 y pAsm (Gm^r) fueron transferidos en un primer paso a *E. coli* DH5 α , luego a la cepa *E. coli* S17-1, y finalmente a la cepa *S. meliloti* LPU88 (pSmeLPU88b::Tn5)(Sm^r)(Nm^r). Utilizando dicho rizobio como dador frente a la receptora *A. tumefaciens* UBA PF2 evaluamos la transferencia de cada uno de los plásmidos con las delecciones en la región INT, y en el mismo ensayo de conjugación el modo en que se transfiere el plásmido acompañante pSmeLPU88b::Tn5 marcado con el gen *nptII* presente en el Tn5. En todos los casos verificamos la presencia de los plásmidos pC3, pC5 y pAsm en la cepa dadora LPU88 (pSmeLPU88b::Tn5), antes de su conjugación con la cepa *A. tumefaciens* UBA PF2.

Según puede verse en la Tabla IV-4 los plásmidos pC3 y pC5 pudieron ser transferidos a la cepa UBA PF2.

Tabla IV-2: Cuantificación de la transferencia de los plásmidos pC3, pC5 y pSmeLPU88b::Tn5 desde la cepa LPU88 a la cepa receptora *A. tumefaciens* UBA PF2.

Plásmido	Frecuencia de conjugación (transconjugantes/bacteria dadora)
pC3	$4,38 \times 10^{-4}$
pC5	$2,25 \times 10^{-5}$
pLPU88b (1)	$2,71 \times 10^{-5}$
pLPU88b (2)	$1,49 \times 10^{-4}$

En la tabla se listan los valores de la frecuencia de conjugación hallados para los distintos plásmidos. (1) Es el valor hallado para el plásmido pLPU88b en presencia del plásmido pC3. (2) Es el valor hallado en presencia del plásmido pC5.

El plásmido pAsm no pudo ser movilizado, indicando que alguna de las regiones (o ambas) faltantes en el inserto Asm respecto de pC5 son determinantes para la funcionalidad del origen de transferencia conjugativo. Para el caso de los transconjugantes UBA PF2 (pC3) la presencia del plásmido recibido fue confirmada por PCR. En el caso de los transconjugantes UBA PF2 (pC5) se realizaron preparaciones de plásmido que se transformaron en DH5 α de donde se reextrajeron para su confirmación por secuenciamiento (las preparaciones de plásmido realizadas directamente a partir de *A. tumefaciens* tienen rendimientos muy bajos como para ser secuenciadas).

Como se muestra en la Tabla IV-4, la movilización de los plásmidos pC3 y pC5 fue cuantificada en paralelo a la movilización del plásmido pLPU88b. Puede verse que la frecuencia de movilización del plásmido pC3 es del mismo orden que la observada en los ensayos de la sección precedente para el plásmido pINT (1×10^{-4} transconjugantes/dadora) que contiene completa la región intergénica *parA-mobC*. Los

valores obtenidos muestran que la frecuencia de movilización del plásmido recombinante pC5 es menor que la del plásmido pC3 (este último con una mayor porción clonada de la región INT que pC5). Como ha ocurrido con otros plásmidos (Llosa, M., et al., 1991) (Stern, J. C. y J. F. Schildbach, 2001), deleciones alrededor del sitio *nic* pueden modificar la eficiencia de movilización. Nótese que el plásmido pSmeLPU88b::Tn5 que se encuentra en la misma cepa LPU88 se movilizó con mayor frecuencia en compañía del plásmido pC5 que del plásmido pC3. Es probable que la deleción presente en el plásmido pC5 haya eliminado alguna región de ADN de la región INT que, si bien no anula la transferencia conjugativa del plásmido, modifica su eficiencia de transferencia y capacidad de competir la movilización del plásmido pSmeLPU88b::Tn5. En las condiciones ensayadas parece existir una saturación del sistema de transferencia, en donde la frecuencia de movilización del plásmido pSmeLPU88b::Tn5 depende de la capacidad de movilización del plásmido pC3 o pC5 que se encuentre presente, y en varias multicopias.

Finalmente, la falta de movilización del plásmido pAsm (238 pb) nos ha permitido delimitar pequeñas regiones de los extremos del fragmento pC5, ausentes en pAsm, que deberán ser caracterizadas con el propósito de acotar de modo más preciso la secuencia mínima necesaria para un *oriT* funcional. Para la movilización del plásmido R388 se ha reportado previamente un análisis de deleciones seriadas de un fragmento de 330 pb que permitieron mapear secuencias del *oriT* asociadas a la eficiencia de la transferencia (95 pares de bases de un extremo), y definir además una zona mínima requerida para la transferencia a una muy baja frecuencia (60 pb) portadora del sitio *nick* de corte de la relaxasa (Llosa, M., et al., 1991). Las regiones 5' y 3' delecionadas en el clon pAsm respecto del clon pC5 brindan información valiosa para intentar definir con mayor precisión las secuencias de la región intergénica *parA-mobC* que modulan la funcionalidad del *oriT* del plásmido pSmeLPU88b.

En el presente Capítulo hemos abordado la caracterización de la región genética asociada al sistema Dtr del aparato conjugativo del plásmido pSmeLPU88b (Pistorio, M., et al., 2003). Como hemos descrito en la introducción de este Capítulo y de la Tesis, el principal componente del sistema Dtr es la relaxasa encargada del procesamiento inicial del ADN doble hebra, generando un corte en una de sus hebras, uniéndose covalentemente al extremo 5' generado, conduciendo la transferencia de la hebra cortada a la célula receptora, y participando en la formación de la nueva doble cadena (Gomis-Ruth, F. X. y M. Coll, 2006, Llosa, M., et al., 2002). Según hemos mostrado en el Capítulo III precedente, la realización de una biblioteca parcial del plásmido pSmeLPU88b nos ha permitido identificar una secuencia que por análisis de similitud

representa la posible relaxasa asociada a la transferencia conjugativa del plásmido. El análisis de la secuencia aminoacídica de la misma ha revelado la presencia de motivos que se asemejan a los ya descritos en otras relaxasas, como el Motivo I que en este tipo de enzimas está asociado a la actividad catalítica mediada por un residuo tirosina. Llama la atención sin embargo que dicho motivo se localice a más de 100 aminoácidos luego del sitio posible de inicio si se compara con la ubicación del mismo motivo en otras relaxasas de la familia MobP y MobQ, donde se encuentra entre los primeros 30 aminoácidos. Teniendo en cuenta esta observación, deberá prestarse especial atención a la actual metionina M82 como potencial sitio de inicio, lo que posicionaría la tirosina del Motivo I en la posición 22 de la nueva proteína en concordancia con lo observado en otras relaxasas. Para la proteína MobZ cabe señalar, por otra parte, que aunque los Motivos II y III que hemos propuesto se encuentran más alejados del Motivo I que lo que ocurre en otras relaxasas (200 aminoácidos respecto de cerca de 40 en otras proteínas), los mismos conservan la distancia que usualmente se observa entre ellos (alrededor de medio centenar de aminoácidos). A pesar que los Motivos II y III parecen vincularse en su secuencia a los descritos para los plásmidos ColE1 de la familia MobP, los mismos presentan importantes variaciones de secuencia con conservación sólo de los aminoácidos centrales del núcleo (serina en el Motivo II, tres histidinas vecinas en el Motivo III), hecho que refleja la divergencia de MobZ de otras relaxasas como lo pone de manifiesto el análisis filogenético de la proteína que presentamos en la Figura IV.3. Es interesante destacar que la proteína MobZ se posiciona filigenéticamente entre las relaxasas de plásmidos de la familia MobP (con las que hemos mencionado que comparte Motivos II y III similares), y las relaxasas de los plásmidos ambientales pSB102, pIPO2T, y pXF51 recuperados de la rizósfera de alfalfa (Schneiker, S., et al., 2001), de la rizósfera de trigo (Tauch, A., et al., 2002), y del patógeno de plantas *Xylella fastidiosa* (Marques, M. V., et al., 2001, Simpson, A. J., et al., 2000), respectivamente. Todos los plásmidos anteriores han sido considerados como miembros de una nueva familia de plásmidos de amplio rango de huéspedes (Tauch, A., et al., 2002). Los organismos que portan los plásmidos anteriores comparten con los rizobios el ambiente suelo, y particularmente el rizosférico. Plásmidos similares a pIPO2T han sido encontrados en un monitoreo de muestras rizosféricas de diferentes plantas que incluyen gramíneas y tomate entre otras (Tauch, A., et al., 2002). De todos modos, y más allá de la similitud entre las relaxasas presentes en pSB102 y pIPO2T con MobZ, es claro que esta última forma un clado independiente sólo junto a relaxasas similares en algunos plásmidos de Rhizobiales. En este contexto cabe recordar que los plásmidos de rizobios tienen asociados en muchos casos sistemas conjugativos con relaxasas diferentes a MobZ, como es el caso de plásmidos crípticos y el simbiótico de *R. etli*, y del plásmido

simbiótico A de *S. meliloti* (Perez-Mendoza, D., et al., 2004, Pérez-Mendoza, D., et al., 2005).

Más allá de las consideraciones anteriores respecto de las relaciones filogenéticas de MobZ y de las peculiaridades de su estructura primaria, como ocurre con otras relaxasas hemos mostrado que la porción amino de la proteína (300 aminoácidos) es suficiente para sostener la movilización del plásmido pSmeLPU88b y con la misma frecuencia que en la cepa salvaje. A pesar de esta evidencia, no hemos podido demostrar interacción física *in vitro* entre la porción N-terminal de MobZ y ADN de la región del *oriT*. Nuevas condiciones a ensayar en el EMSA deberán incluir el uso de oligonucleótidos marcados con ³²P para mejorar la detección de eventuales cambios en la movilidad de los mismos, y el ensayo de nuevas condiciones de renaturalización de los productos de traducción parcial o total de MobZ. En los ensayos de unión que hemos presentado en este Capítulo no hemos utilizado de modo regular la proteína completa dado que, como hemos mostrado, la misma ha estado acompañada de un polipéptido de cerca de 45KDa correspondiente a su extremo C-terminal. Dado que el polipéptido de 45KDa acompañante comparte secuencias con el extremo C-terminal de MobZ, no debe descartarse que el mismo pueda también generarse naturalmente en rizobios. En apoyo de esta posibilidad, existen evidencias que muestran otros genes de relaxasas que se solapan extensivamente con genes de otras proteínas (Francia, M. V., et al., 2004).

Finalmente, y en relación a MobZ, hemos realizado un análisis de su distribución en diferentes cepas de *S. meliloti* pertenecientes a diferentes grupos de diversidad plasmídica según han sido definidos previamente por Pistorio et al., 2008 (2008). Varias de las cepas que mostraron capacidad de movilizar el plásmido pSmeLPU88b dieron positivo el ensayo para la detección de relaxasas del tipo *mobZ*. También en una proporción importante se detectaron secuencias homólogas a *mobZ* en rizobios que no movilizaron el plásmido modelo, hecho que refleja seguramente genotipos que sólo poseen plásmidos movilizables portadores de genes asociados al sistema Dtr y sin Mpf. Estos resultados, como ya había sugerido Pistorio et al. (2008), muestran un carácter muy ubicuo del sistema conjugativo asociado a los plásmidos pSmeLPU88a/b. El par de cebadores que hemos diseñado para la detección de secuencias *mobZ* será una herramienta muy útil a la hora de evaluar de modo rápido y sencillo la eventual presencia de replicones conjugativos/movilizables en cepas inoculantes de *S. meliloti*.

Por último y como parte del análisis de la región asociada al Dtr, hemos avanzado en la localización del *oriT* del plásmido pSmeLPU88b. El *oriT* ha sido mapeado dentro de un fragmento de 400 pb dentro de la zona intergénica *parA–mobC*. Más allá de la localización del *oriT*, los resultados mostraron una transferencia eficiente del plásmido que porta el *oriT* independientemente de la localización del gen de la relaxasa respecto

del origen de transferencia (*cis/trans*). Este comportamiento contrasta con el comportamiento del plásmido simbiótico pRetCFN42d de *R. etili* CFN42 en el que, para que exista transferencia conjugativa del mismo, el *oriT* y el gen de la relaxasa deben localizarse en *cis* (Perez-Mendoza, D., et al., 2006). Las diferencias entre uno y otro sistema devienen seguramente de aspectos particulares de uno y otro vinculados al modo en que la relaxasa recientemente traducida es capaz de reconocer al *oriT*. Es interesante destacar que la propia relaxasa cuyo gen es requerido en *cis* respecto del *oriT* ha sido muy eficiente en reacciones *in vitro* (Perez-Mendoza, D., et al., 2006), lo que pone en evidencia limitaciones importantes de los ensayos *in vitro* para el estudio de aspectos mecanísticos sutiles de los eventos que tienen lugar *in vivo* durante las reacciones asociadas al Dtr.

CAPÍTULO V

Análisis estructural y funcional de los módulos de replicación del plásmido pSmeLPU88b

V.1. Introducción.

Los plásmidos son elementos extracromosomales formados a partir de una selección de distintas funciones de supervivencia y propagación. Entre estas funciones se incluyen la replicación y transferencia conjugativa.

Como mencionamos en la introducción de esta Tesis, los genes de replicación mejor estudiados en bacterias de suelo pertenecen al sistema de replicación *repABC* (Nishiguchi, R., et al., 1987, Tabata, S., et al., 1989). Más específicamente en la familia Rhizobaceae, los replicones del tipo *repABC* predominan en los plásmidos en los cuales se ha abordado el estudio de las regiones de replicación (Cevallos, M. A., et al., 2008). El sistema *repABC* consiste en un operon compuesto por los tres genes *repA*, *repB* y *repC*. Por un lado, el gen *repA* codifica proteínas de la familia de ATPasas *parA* y el gen *repB* corresponde a un dominio del tipo nucleasa y estarían involucradas en la regulación de las funciones relacionadas a la segregación y estabilidad de los plásmidos (Tabata, S., et al., 1989). El gen *repC* codifica la proteína RepC, esencial para la replicación y en muchos casos se encuentra asociado a secuencias cercanas que incluyen determinantes de incompatibilidad y/o un origen de replicación (Bartosik, D., et al., 2001, Cevallos, M. A., et al., 2002, Pappas, K. M. y S. C. Winans, 2003, Ramírez-Romero MA, S. N., Pérez-Oseguera A, Téllez-Sosa J, Cevallos MA., 2000).

Otros tres sistemas de replicación han sido descritos en los rizobios. El primero incluye sólo un miembro, el plásmido pRm1132f de 7,2Kpb aislado de la cepa de *S. meliloti* 1132 y pertenece al grupo II de replicación por círculo rodante (Barran, L. R., et al., 2001). La segunda familia de replicones llamada familia *repC* esta evolutivamente relacionada con la familia *repABC* porque comparten a la proteína de inicio de la replicación RepC, pero en contraste con la organización de *repABC*, *repC* no está asociado con genes *repA* y *repB* (Mercado-Blanco, J. y J. Olivares, 1994). Como describimos en el Capítulo I, en esta familia también un ARN antisentido juega un rol central como regulador negativo de la expresión de *repC* y como determinante de la incompatibilidad (Izquierdo, J., et al., 2005). Finalmente, Watson y Heys, 2006 (2006) aislaron un plásmido cuya región de replicación contiene genes similares a los asociados con plásmidos de amplio rango de huésped y que su proteína Rep está relacionada con la del plásmido de *Pseudomonas aeruginosa* pVS1.

En los Capítulos III y IV nos hemos dedicado a la caracterización funcional y molecular de la transferencia conjugativa del sistema binario plasmídico constituido por pSmeLPU88a/pSmeLPU88b. En particular hemos descrito y caracterizado la región Dtr del plásmido pSmeLPU88b. En este Capítulo mostraremos el análisis que hemos

realizado para identificar y caracterizar genes responsables de la replicación en nuestro sistema plasmídico.

V.2. Mapa físico de las regiones de replicación del plásmido pLPU88b.

La estrategia que hemos utilizado para la detección de las funciones de replicación consistió en el análisis *in silico* de las secuencias obtenidas por secuenciación de la biblioteca parcial del plásmido pLPU88b y *plasmid walking* descritas en el Capítulo III.

El análisis *in silico* de las secuencias obtenidas lo realizamos mediante el programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). A través del mismo, pudimos identificar dos módulos de replicación que incluyen dos proteínas de inicio de la replicación diferentes; una perteneciente al tipo *repABC* y la otra perteneciente a la familia de replicones *repC*.

El secuenciamiento completo de la región que contiene ambas proteínas reveló mediante el uso del programa ORF *finder* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>) la presencia de nueve marcos abiertos de lectura contenidos en una zona de 11,3Kpb, Figura V.1, Tabla V-1 y dos ARN antisentido. Tres de los marcos de lectura corresponden a los genes *repA*, *repB* y *repC* correspondientes al sistema de replicación *repABC* ampliamente distribuido en α -proteobacterias (Young, J. P., et al., 2006). Río arriba del sistema *repABC* y previo al marco de lectura *repC* correspondiente al otro módulo de replicación, se encuentra en sentido divergente el marco de lectura correspondiente a una proteína con elevada identidad de secuencia (72 %) con la proteína *Tral* asociada a la regulación del tipo *quorum sensing* para la movilización del plásmido de *R. etli* p42a (Tun-Garrido, C., et al., 2003). En la Tabla V-1 se muestran la comparación de la secuencia de ADN y de sus productos de traducción contra la base de datos de GenBank de los ORF encontrados en la región.

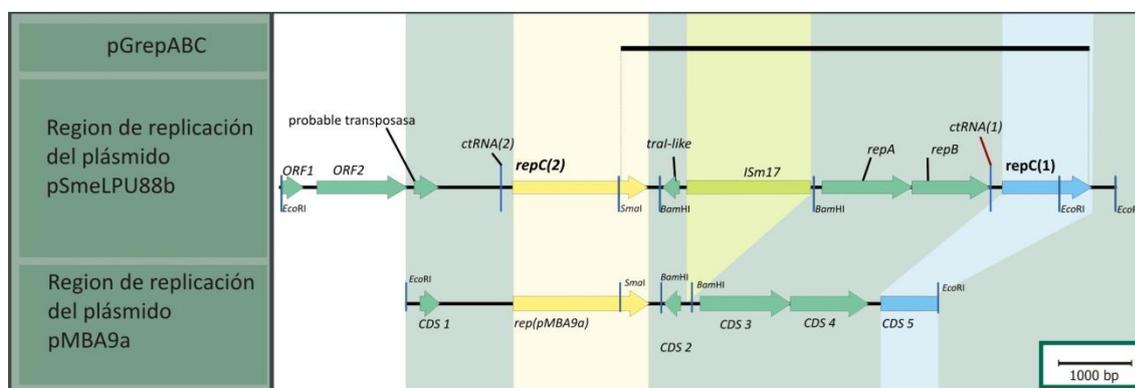


Fig. V.1: Solapamiento entre la región de replicación del plásmido pSmeLPU88b y la región de replicación reportada para el plásmido pMBA9. En la figura se observan con flechas los marcos de lectura descubiertos luego del secuenciamiento de plásmido pLPU88b. Las similitudes encontradas se esquematizan por coincidencias de color, como también las diferencias fundamentales (ISm17) respecto del pMBA9a.

Tabla V-1: Comparación de secuencias de la región *rep* del plásmido pLPU88b contra el GenBank.

ORF	Nombre asignado	Resultados de BLAST – N° acceso GenBank	Identidad (%)
1	---	Proteína de función desconocida (carboxilo terminal) DUF894 DitE, <i>Mesorhizobium opportunistum</i> WSM2075 - EEW33736.1	65
2	---	Probable carboxilasa, <i>Mesorhizobium loti</i> MAFF303099 - BAB52616	70
3	---	Posible transposasa <i>Sinorhizobium meliloti</i> MBA9 - AAX19270.1	100
4	repC	Rep(pMBA9a) <i>Sinorhizobium meliloti</i> MBA9 - AAX19271.1	99
5	tral	Proteína tipo Tral <i>S. meliloti</i> MB9 - AAX19272.1	100
6	TRm17	Probable transposasa para ISRm17, <i>Sinorhizobium meliloti</i> 2011 - CAC47692.1	100
7	repA	Proteína tipo RepA <i>S. meliloti</i> MB9 - AAX19273.1	100
8	repB	Proteína tipo RepB <i>S. meliloti</i> MB9 - AAX19274.1	100
9	repC	Posible proteína de replicación C (repC) <i>Agrobacterium rhizogenes</i> - CAA28532.1	72
		Proteína tipo RepC <i>S. meliloti</i> MB9 - AAX19275.1 ^a	100

Sólo se muestra el gen que presenta el mayor score. La comparación fue realizada usando el programa blastp o blastx.

a) Sólo figuran en el GenBank los primeros 259 aminoácidos.

La secuencia de ADN de ambas regiones de replicación, resultaron casi idénticas a las respectivas regiones homólogas encontradas en el plásmido pMBA9 de *S. meliloti* (identidad 99 %), Figura V-1 (Watson, R. J. y R. Heys, 2006). Dicho plásmido también presenta dos regiones de replicación, al igual que el pLPU88b, una perteneciente al grupo de replicones del tipo *repABC* y la otra al *repC*. Como puede observarse en la Figura V-1 a diferencia de lo reportado para el plásmido pMBA9a, el gen *repC* perteneciente al grupo *repABC* del plásmido pSmLPU88b está completo. Otra diferencia es la presencia de la secuencia de inserción ISRm17 entre los módulos de replicones *repC-repABC*. Este hecho podría implicar que el plásmido pSmLPU88b deriva de un ancestro en común con el plásmido pMBA9 en el cual se produjo la inserción de la secuencia ISRm17 separando ambas unidades de replicación.

Como mencionamos en la introducción se ha descrito la presencia de pequeños ARN antisentido (ctRNA) como elementos regulatorios de la expresión de *repC* así también como determinantes de *trans*-incompatibilidad. A partir de la alineación de las zonas río arriba de las *repC* mediante el programa *align* del paquete Vector NTI, logramos identificar *in silico* dos ARN antisentido, Figura V.2. Mientras el ctRNA perteneciente a

repABC muestra una elevada conservación de secuencia en los elementos transcripcionales pertenecientes a plásmidos de un mismo tipo, el ctRNA de *repC* posee cierta conservación restringida a la secuencia -35.

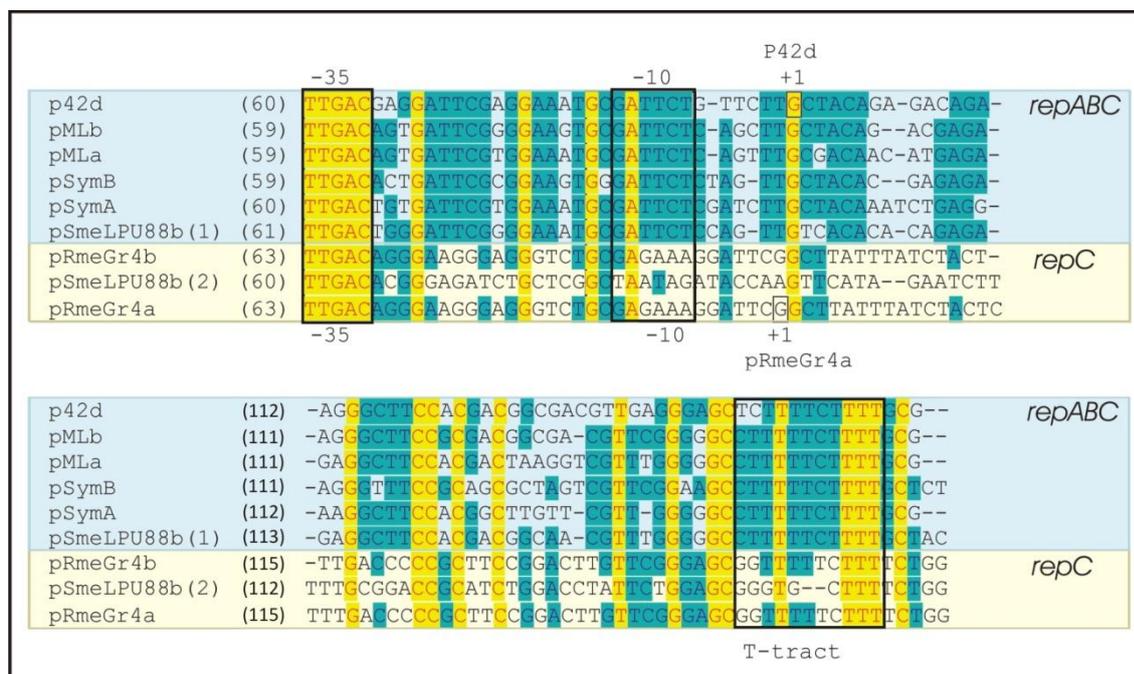


Fig. V.2: Alineamiento de regiones intergénicas *repB-repC* codificantes de posibles ctARNs. Identificación de elementos regulatorios pertenecientes a los promotores de ctRNA.

A la izquierda del alineamiento se encuentra el nombre de los plásmidos y el tamaño de la secuencia incluida en el alineamiento. Del lado derecho se indica la familia de replicones a los cuales pertenecen las secuencias alineadas. En la figura se muestran las cajas -35 y -10 correspondientes al promotor ctRNA como también la región T-tract. Recuadrado en negro se marca el nucleótido comienzo para aquellos plásmidos en los cuales se determinó experimentalmente. El plásmido p42d pertenece a *Rhizobium etli* CFN42; pSymA y pSymB a *S. meliloti*; pRmeGR4a y pRmeGR4b a *S. meliloti* GR4 y pMLa y pMLb a *Mesorhizobium loti*.

V.2.1. Análisis comparativo con otros miembros de las familias *repABC* y *repC*.

Debido a que la replicación es esencial para la supervivencia y dispersión de los plásmidos los orígenes de replicación/proteínas de inicio de la replicación han sido considerados característicos de los mismos y se los ha usado para determinar relaciones filogenéticas. Con el objetivo de estudiar la relación filogenética de los dos módulos de replicación presentes en el plásmido pLPU88b realizamos un estudio a partir de las dos proteínas de inicio de replicación RepC a través del módulo Drawtree del paquete de programas PHYLIP con un remuestreo (bootstrap) de 1000 y en base a la secuencia aminoacídica completa de replicasas conocidas pertenecientes a familias tipo *repABC* y *repC*, Figura V.3. En el gráfico puede observarse que las dos proteínas de inicio de la replicación se agrupan en distintas ramas del árbol filogenético. El árbol filogenético fue realizado utilizando secuencias *repC* pertenecientes a ambas familias.

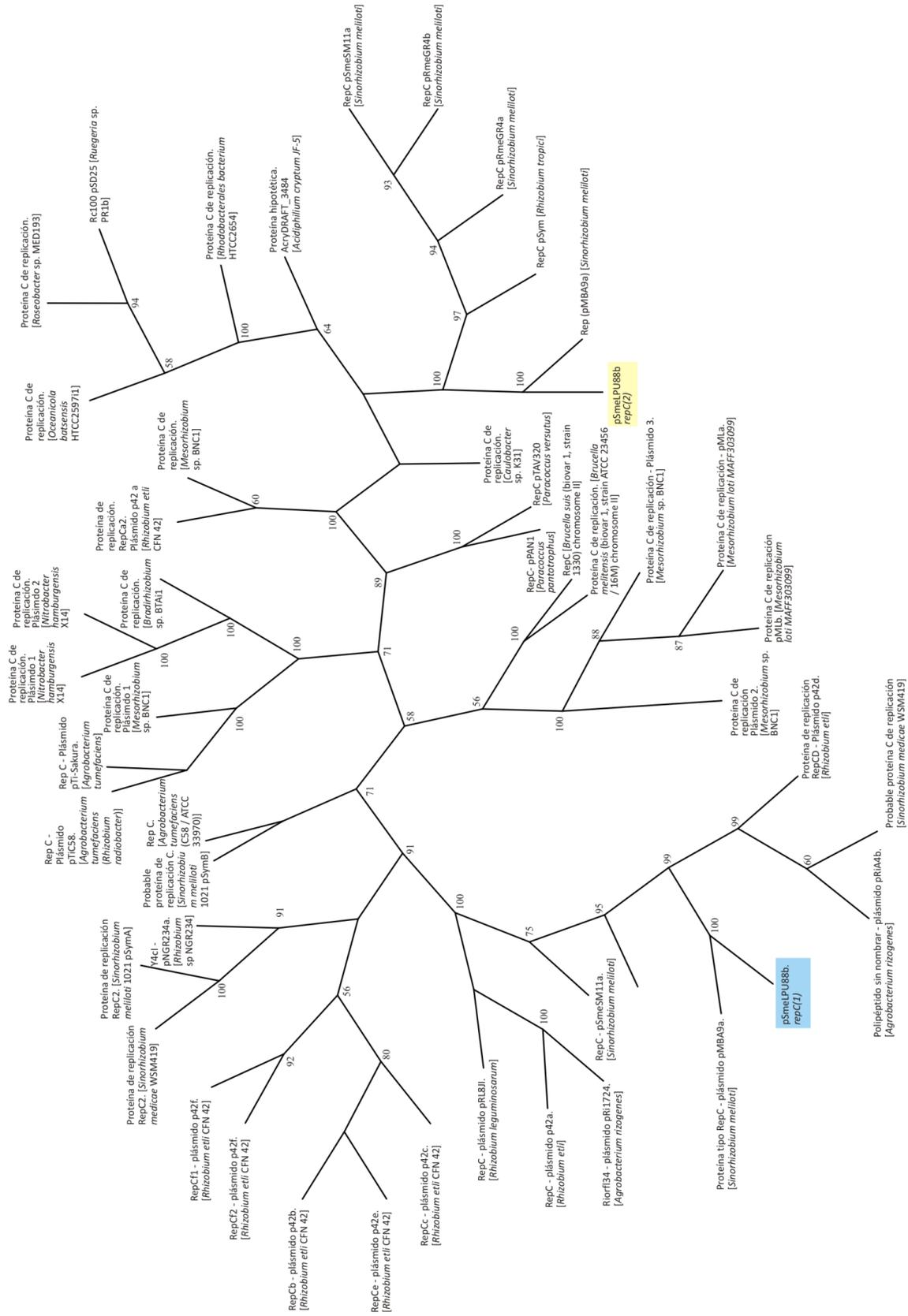


Fig. V.3: Análisis filogenético de las distintas replicasas reportadas. El árbol filogenético fue realizado usando la secuencia completa de las proteínas RepC(1) y RepC(2) y el programa NEIGHBOR JOINING con un valor de bootstrap de 1000.

Los miembros pertenecientes a *repC* se encuentran agrupados y se observa que están más cercanos evolutivamente a miembros de la familia *repABC* provenientes de bacterias distintas a los rizobios. El *repC* perteneciente a la familia *repABC* se encuentra cercanamente relacionado a genes *repC* provenientes de rizobios y bacterias de género *Agrobacterium*.

V.3. Caracterización funcional de los dos módulos de replicación del plásmido pLPU88b.

Es interesante mencionar que algunas cepas contienen varios plásmidos donde cada uno de ellos lleva un operón *repABC*. Los casos más evidentes de esta peculiaridad se observan en *Rhizobium etli* CFN42 y *Rhizobium leguminosarum* 3841, cada uno de los cuales tiene seis plásmidos todos pertenecientes a la familia de *repABC*. Esto sugiere que diferentes plásmidos *repABC* pertenecen a grupos de incompatibilidad diferentes (Gonzalez, V., et al., 2006, Young, J. P., et al., 2006). Además, también se han encontrado replicones que albergan dos operones *repABC* funcionales. Dos replicones en *R. etli* CFN42 y uno en *R. leguminosarum* 3841 contienen dos operones de *repABC*. Este hecho también ha sido observado en otros plásmidos de *S. meliloti* como pMBA9a, pSmeSM11a y nuestro plásmido modelo pLPU88b. Posiblemente la funcionalidad de dos unidades de replicación contribuya a la estabilidad general del plásmido que las porta. Dicha condición, ha sido postulada como benéfica suponiendo que la presencia de más de un módulo de replicación puede contribuir a la estabilidad global del plásmido que los porta.

Con el propósito de determinar la funcionalidad de los replicones *repABC* y *repC* efectuamos dos estrategias, por un lado realizamos una mutagénesis insercional sitio específica sobre cada una de las proteínas de inicio de la replicación y en una segunda aproximación se clonaron cada uno de los módulos de replicación por separado en vectores suicidas, en ambos ensayos se evaluó la capacidad para mantener la replicación en rizobios.

Para la construcción de los mutantes sitio específicos, fragmentos internos de cada una de las proteínas *repC* fueron amplificados por PCR y clonados en el vector pK18mob (ver Materiales y Métodos, sección II.2.14.2), resultando los vectores pKrepCmut y pKrepABCmut. Dichos plásmidos fueron transferidos por conjugación a la cepa SmLPU88 y la correcta inserción en los transconjugantes fue corroborada por PCR. La obtención de mutantes en ambos genes *repC* fue indicativa de su funcionalidad.

Para la segunda aproximación se clonó, en una etapa inicial, un fragmento de 2486p que incluye tanto a la secuencia codificante del gen *repC* como también 496pb río arriba y 194pb río abajo del mismo. El producto de la amplificación obtenido fue luego clonado en el plásmido pK18mob generando el plásmido pK-repC. El vector que contiene al sistema *repABC* fue obtenido por integración del plásmido pG18mob conteniendo el extremo carboxilo del gen *repC* y se realizó una posterior *plasmid walking* para obtener el operón entero. El plásmido resultante fue designado pG-repABC. Ambos plásmidos fueron transferidos a la cepa de *S. meliloti* 2011 por conjugación desde la cepa de *E. coli* S17-1. Para verificar la presencia de los plásmidos pK-repC y pG18-repABC en el rizobio, transconjugantes tomados al azar fueron analizados por el método de lisis *in situ* habiéndose confirmado a través de la presencia de las bandas plasmídicas esperadas la funcionalidad de replicación de ambos replicones, Figura V.4.

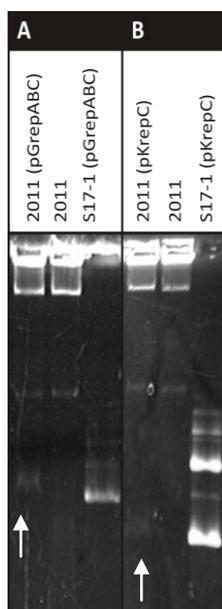


Fig. V.4: Habilidad de los plásmidos pGrepABC y pKrepC para mantener la replicación de un vector suicida en *Sme2011*.

En las figuras A y B se muestran los perfiles plasmídicos de los clones obtenidos de las conjugaciones entre *E. coli* S17-1 (pGrepABC) y la cepa de *S. meliloti* 2011 y entre *E. coli* S17-1 (pKrepABC) y *S. meliloti* 2011 respectivamente.

A. Se muestran los perfiles obtenidos para un transconjugante *S. meliloti* Sm^r Gm^r, de la cepa receptora *S. meliloti* 2011 y de la cepa donadora *E. coli* S17-1 (pGrepABC). En la primera calle, según lo indica la flecha, puede observarse la presencia del plásmido pGrepABC. En la segunda calle esta banda no está presente.

B. Se muestran los perfiles obtenidos para un transconjugante *S. meliloti* Sm^r Nm^r, de la cepa receptora *S. meliloti* 2011 y de la cepa donadora *E. coli* S17-1 (pKrepC). En la primera calle, la flecha indica, a diferencia de la segunda calle, la presencia del plásmido pKrepC.

Los perfiles plasmídicos fueron obtenidos en geles de agarosa por la técnica de lisis *in situ*.

Otro aspecto interesante a estudiar es la incompatibilidad de los vectores pKrepC y pGrepABC con respecto al plásmido pLPU88b. La incompatibilidad entre plásmidos está dada por la incapacidad que presentan dos replicones para coexistir de modo dentro de la misma célula. Generalmente esta situación es el resultado de compartir ciertos elementos involucrados en la replicación o segregación plasmídica, como también en algún componente regulatorio de dichas funciones. Con el objetivo de realizar un estudio de incompatibilidad, los plásmidos pKrepC y pGrepABC fueron transferidos por conjugación a la cepa LPU88. Debe tenerse en cuenta que la presión de selección con Nm (pKrepC) y Gm (pGrepABC) fuerza la selección en favor de la permanencia de los plásmidos que han sido incorporados en detrimento del plásmido residente pLPU88b. El

análisis por geles de lisis *in situ* mostró llamativamente que ambos replicones eran capaces de excluir por incompatibilidad al plásmido pLPU88b, Figura V.5.

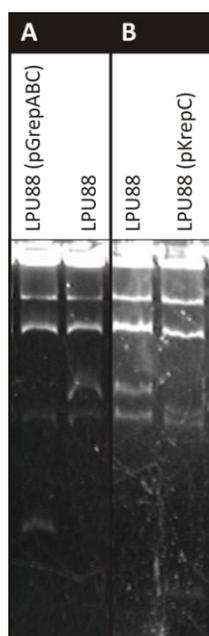


Fig. V.5: Habilidad de los plásmidos pGrepABC y pKrepC para desplazar al pLPU88b.

A. Se muestran los perfiles de plásmidos de un transconjugante obtenido luego de la conjugación entre S17-1 (pGrepABC) y *S. meliloti* LPU88 y de la cepa receptora *S. meliloti* LPU88.

La primera calle corresponde al transconjugante *SmeLPU88* (Sm^r , Gm^r) en el cual aparece el plásmido pGrepABC. Puede observarse también que el plásmido pLPU88b no está presente.

La segunda calle corresponde a la cepa *SmeLPU88* control. En ella puede verse una banda superior correspondiente a los plásmidos pSymA y pSymB. Las bandas menores corresponden a sus plásmidos crípticos pLPU88a y pLPU88b.

B. Se muestran los perfiles de plásmidos de la cepa receptora *S. meliloti* LPU88 y de un transconjugante luego de la conjugación entre S17-1 (pKrepC) y *S. meliloti* LPU88.

En la primera calle se observa el perfil de *SmeLPU88*. En la segunda calle el perfil correspondiente a un transconjugante *SmeLPU88* (Sm^r , Nm^r). En ella puede verse la banda del plásmido pKrepC y la pérdida del plásmido pLPU88b.

En ambos casos los perfiles plasmídicos fueron obtenidos en geles de agarosa por la técnica de lisis *in situ*.

El resultado obtenido plantea la existencia de cierta interacción entre ambos sistemas de replicación. Para corroborar esta hipótesis transferimos a la cepa de *S. meliloti* 2011 (pKrepC) el plásmido pGrepABC, Figura V.6, y a la cepa *S. meliloti* (pGrepABC) el plásmido pKrepC vía conjugación desde la cepa de *Escherichia coli* S17-1.

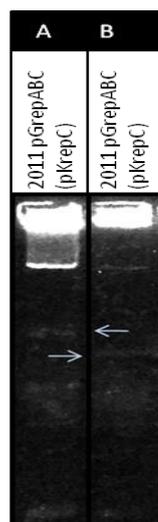


Fig. V.6: Comportamiento de ambos sistemas de replicación en el entorno de la cepa *Sme2011*.

En las calles A y B se observa el perfil plasmídico obtenido luego de introducir el pGrepABC en la cepa *Sme2011* (pKrepC) en dos ensayos independientes.

En ambas calles se puede ver la aparición de bandas adicionales de tamaño variado correspondiente a la formación de diferentes cointegrados.

Como se aprecia en la figura V.6 nunca hemos observado en los tranconjugantes analizados la presencia de ambos plásmidos replicando independientemente. Se observan bandas plasmídicas correspondientes a uno de ellos y la presencia de bandas de menor movilidad electroforética atribuible a la formación de cointegrados.

V.4. Identificación de Sistemas de adicción plasmídica.

El mantenimiento de los plásmidos en muchas bacterias es atribuido a la presencia a un *loci* toxina-antitoxina codificado en ellos. Estos *loci* consisten en dos genes, uno codifica para una toxina estable y el segundo para una antitoxina inestable. Si el plásmido se pierde de la célula en división, se degrada la antitoxina inestable y la bacteria muere por acción de la toxina estable. Este fenómeno es conocido como “muerte post-segregacional” o “adicción plasmídica” y se ha descrito en muchos tipos de plásmidos pertenecientes tanto a bacterias Gram negativas y Gram positivas.

A partir del análisis de las secuencias de ADN del plásmido pSmeLPU88b obtenidas, hemos podido identificar 2Kpb río abajo del sistema *repABC* dos ORF que presentan homologías con sistemas de toxina-antitoxina, Figura V.7. El producto de traducción del ORF 1 posee un 90% de identidad con la proteína Smed_5802 de *Sinorhizobium medicae*, que codifica para una proteína que previene la muerte del huésped.

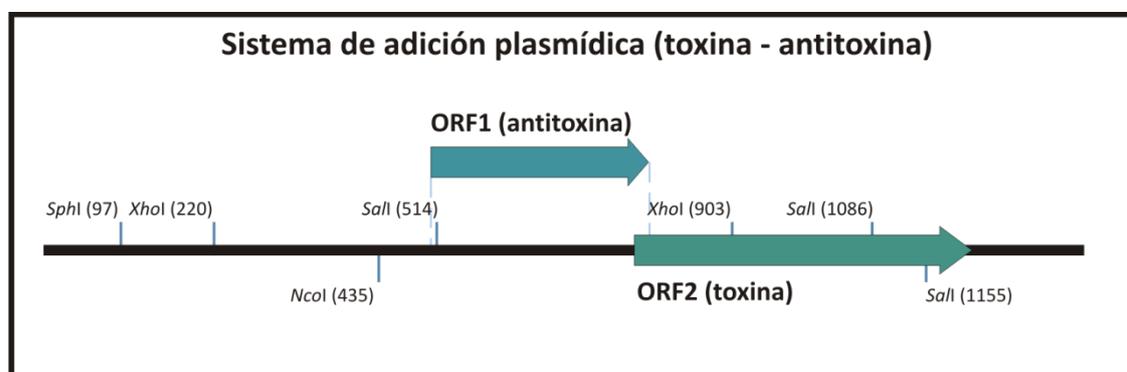


Fig. V.7: Estructura genética propuesta para el sistema de adicción plasmídica del plásmido pSmeLPU88b. La orientación de los ORF1 y ORF2 se esquematiza con flechas. El ORF1 codifica una proteína que previene la muerte del huésped. El ORF2 codifica una proteína que inhibe el crecimiento de las células huésped.

El producto de traducción del ORF2 presenta un dominio putativo conservado perteneciente a la superfamilia PemK, que inhibe el crecimiento de las células huésped y presenta una identidad del 75% con la proteína BOV_A0496 de *Brucella ovis* ATCC 25840. Todavía no hemos abordado el estudio de la funcionalidad del sistema.

En este Capítulo, a partir de los datos recogidos de la secuencia del plásmido pSmeLPU88b, hemos identificado *in silico* dos módulos de replicación del plásmido, uno pertenece a la familia de replicones *repABC*, y el otro se relacionó con la familia de replicones *repC*. La familia *repABC* es probablemente la más ampliamente distribuida y más comúnmente encontrada en plásmidos de bacterias de los géneros *Rhizobium*,

Mesorhizobium, y *Sinorhizobium* (Freiberg, C., et al., 1997, Ramírez-Romero, M. A., et al., 1997, Turner, S. L., et al., 1996). No sólo se encuentra en plásmidos sino también en los cromosomas de bacterias patógenas de plantas y animales (DelVecchio, V. G., et al., 2002, Kaneko, T., et al., 2000, Li, P. L. y S. K. Farrand, 2000, Nishiguchi, R., et al., 1987, Paulsen, I. T., et al., 2003, Suzuki, K., et al., 1998, Tabata, S., et al., 1989). La familia *repC* está evolutivamente relacionada con la familia *repABC* debido a que comparten a RepC la proteína iniciadora de la replicación, pero carecen de los genes *repAB* (Mercado-Blanco, J. y J. Olivares, 1994). El primer miembro de este grupo fue aislado del plásmido críptico autoransmisible pRmeGR4a perteneciente a la cepa *S. meliloti* GR4 y después se encontró que esta familia está ampliamente distribuida en poblaciones naturales de *S. meliloti*, *Sinorizobium fredii* y *Rhizobium tropici* (Burgos, P. A., et al., 1996, Mercado-Blanco, J. y J. Olivares, 1993, van Dillewijn, P., et al., 2001). Recientemente Watson et al., 2005, reportaron en el plásmido pMBA9 proveniente de un aislamiento de *S. meliloti* de Canadá, el hallazgo de una región de replicación que mostró identidad parcial con la proteína codificada por el plásmido pRmeGR4a mencionada anteriormente, además de la presencia de un segmento de ADN truncado homólogo al replicón *repABC* (Watson, R. J. y R. Heys, 2006). Como hemos mostrado, ambas regiones presentes en el pMB9a presentaron una identidad del 99% con los elementos homólogos del plásmido pRmeLPU88b. Dicha identidad se ve interrumpida por la inserción en el plásmido pSmeLPU88b de la ISm17 entre los replicones contiguos *repC-repABC*.

Parece ser una característica común la presencia de más de un tipo de sistema de replicación perteneciente a distintas familias en los plásmidos de *S. meliloti* como ha sido observado en pMBA9a, pSmeSM11a y ahora en el pSmeLPU88b.

Para el plásmido pSmeLPU88b a partir del clonado de cada sistema de replicación en plásmidos suicidas hemos demostrado que cualesquiera de ellos pudieron mantener la replicación en *S. meliloti* y que, a través de mecanismos no caracterizados aún, ambos replicones excluyeron por incompatibilidad al plásmido pSmeLPU88b. No conocemos todavía cuál de los sistemas de replicación es el que opera y determina el número de copias del plásmido pSmeLPU88b en los rizobios.

El análisis del árbol filogenético construido con secuencias de proteínas RepC perteneciente a miembros de las familias *repABC* y *repC*, muestra que los miembros de la familia *repC* se encuentran todos en el mismo racimo compartido con miembros de la familia *repABC*. Esta observación ha generado la hipótesis que la familia *repABC* pudo haberse originado a partir de la fusión del *cassette* de partición *repAB* con el módulo de replicación *ctRNA-repC* y que esta fusión ocurrió más de una vez de manera independiente (Izquierdo, J., et al., 2005).

La replicación es una función básica y característica de cada plásmido. De hecho, existen plásmidos generalmente denominados crípticos que no revelan otra función detectable más que la de replicación. A la largo de la vida de los plásmidos el reclutamiento de distintas funciones como la partición (*repAB*), la herencia estable (toxina-antitoxina) y la transferencia (*tra-trb*) le garantizan la habilidad de sobrevivir y multiplicarse en distintas bacterias.

CAPÍTULO VI

Estudios de movilización del plásmido pSmeLPU88b en suelo, en condiciones de campo, y en el laboratorio en sistemas contenidos.

VI.1. Introducción.

El empleo de inoculantes formulados con cepas de rizobios se ha convertido en una actividad frecuente con el propósito de mejorar la fertilidad nitrogenada de los suelos y la sustentabilidad de las prácticas agrícolas modernas. A través de la inoculación se introducen a los suelos de cultivo rizobios que han sido previamente seleccionados en base a sus capacidades destacadas de competición por la formación de nódulos y fijación de nitrógeno atmosférico. En ese marco, sin embargo, poco se ha investigado respecto del impacto de la inoculación en lo que hace a la dispersión de genes desde la cepa introducida a la comunidad de rizobios (y de otras bacterias) presentes en el suelo. Teniendo en cuenta que muchos rizobios son portadores de plásmidos (Mercado-Blanco, J. y N. Toro, 1996) y/o de islas simbióticas transmisibles (Ramsay, J. P., et al., 2009, Ramsay, J. P., et al., 2006, Sullivan, J. T., et al., 1995, Sullivan, J. T., et al., 2002), la diseminación de genes desde el rizobio inoculante debe ser considerarse como un fenómeno potencialmente asociado a la fertilización mediada por rizobios. En relación a esta cuestión, son varios los estudios que reportan eventos de transferencia horizontal de genes desde rizobios inoculados en semillas hacia rizobios alóctonos del suelo (Barcellos, F. G., et al., 2007, Li, Q., et al., 2009, Ramsay, J. P., et al., 2009, Ramsay, J. P., et al., 2006, Sullivan, J. T., et al., 1995, Sullivan, J. T., et al., 2002). Conocer la frecuencia con que tienen lugar dichos eventos, en las condiciones rutinarias de las prácticas de inoculación, será importante para estimar el impacto de las cepas introducidas en la dinámica del germoplasma de los rizobios (y de otras bacterias) presentes en el suelo inoculado. En este contexto debe considerarse que la transferencia horizontal de genes es en bacterias uno de los procesos biológicos centrales de generación de diversidad genética, adquisición de nuevas capacidades (Thomason, B. y T. D. Read, 2006) y adaptación a los desafíos de ambiente (Marri, P. R., et al., 2006, Marri, P. R., et al., 2007). En este contexto, la evaluación de la frecuencia de movilización de los plásmidos de rizobios en condiciones de suelo constituye un paso obligado hacia el desarrollo de modelos de predicción de frecuencias de dispersión génica a otros rizobios y bacterias del suelo, y hacia la estimación final del impacto de dichos eventos sobre la diversidad del moviloma (y germoplasma en general) presente en el ambiente receptor del inoculante.

En este Capítulo exploraremos en distintos ensayos la posibilidad de detectar (y cuando sea posible estimar la frecuencia de) eventos de transferencia plasmídica desde una cepa de *S. meliloti* introducida al suelo hacia rizobios homólogos alóctonos y hacia otras bacterias que introduciremos al sistema como potenciales receptoras.

En un primer término exploraremos, en un ensayo a campo, si la inoculación de alfalfa con rizobios portadores de un plásmido movilizable da lugar a la posibilidad de recuperar de los nódulos de las plantas inoculadas (y de plantas trampa introducidas a lo largo de un año) transconjugantes alóctonos que hayan incorporado el plásmido introducido (sección 2 siguiente). Luego, en ensayos de microcosmos realizados con muestras del mismo suelo en el que se realizó el ensayo a campo, evaluaremos la transferencia del plásmido movilizable hacia bacterias potencialmente receptoras (introducidas y marcadas) de la masa del suelo o del entorno rizosférico de plantas de alfalfa (sección 3 siguiente).

De las aproximaciones experimentales implementadas en este capítulo.

Desde el año 1992 en la República Argentina quedan expresamente prohibidas la experimentación y/o liberación al medio de microorganismos genéticamente modificados (MGM) que no cuenten con el debido permiso otorgado por la autoridad competente a tal efecto (para información detallada de los procedimientos y reglamentaciones vigentes, consúltese la página http://www.sagpya.mecon.gov.ar/new/0-0/programas_/conabia/reglamentaciones.php de la Comisión Nacional de Biotecnología Agropecuaria). Teniendo en cuenta la legislación vigente y que el interés del laboratorio enfoca hoy la exploración inicial de eventos de transferencia horizontal de plásmidos desde rizobios a bacterias del suelo; para explorar estas cuestiones en una primera fase de análisis, hemos decidido implementar: a) ensayos a campo que no requieran la liberación de MGM, y b) ensayos con sistemas contenidos (como los microcosmos) cuando se implemente el empleo de MGM.

VI.2. Inoculación de alfalfa con *S. meliloti* en condiciones de campo. Búsqueda de eventos de transferencia plasmídica a rizobios alóctonos que nodulen plantas trampa. Objetivo y diseño del ensayo.

Teniendo en cuenta que en condiciones de campo la detección en el suelo de rizobios alóctonos que hayan adquirido información plasmídica desde una cepa introducida es una tarea difícil si no se recurre a la liberación de rizobios marcados genéticamente por técnicas recombinantes; en los ensayos a campo en esta fase inicial de análisis hemos sólo investigado la presencia de rizobios transconjugantes alóctonos sólo en los nódulos de plantas de alfalfa utilizadas como “trampa” a tal efecto. Debe tenerse en cuenta que el empleo de la planta huésped (“trampa” en nuestro diseño experimental) permite recuperar a partir de nódulos radicales, y de modo muy específico, sólo rizobios

noduladores de alfalfa evitando el resto de la microbiota que los acompaña en el medio suelo circundante. Los rizobios recuperados de dichos nódulos serán luego susceptibles de ser analizados para investigar si han recibido, o no, un plásmido movilizable introducido al campo a través de semillas inoculadas con un rizobio dador.

El ensayo consistió entonces en la liberación inicial de la cepa LPU88AII portadora del plásmido modelo pLPU88b (Materiales y Métodos sección II.4.1) que fue inoculada sobre semillas de alfalfa siguiendo las prácticas regulares utilizadas a campo. Luego de la siembra de las semillas inoculadas, y una vez que emergieron las plantas, se investigó la presencia del plásmido modelo en los rizobios alóctonos que nodularon dichas plantas (diferentes del rizobio inoculado) y en los que nodularon plantas “trampa” adicionales sembradas a largo del primer año y medio luego de la siembra inicial. En el ensayo se utilizaron dos parcelas de 6mts x 1m, una de ellas inoculada con la cepa LPU88AII y la otra utilizada como parcela control sin inocular. En la Figura VI.1. se muestra un esquema con el diseño y la cronología del ensayo en el que se indican los tiempos de inoculación y siembra inicial, de siembra de plantas trampa, y de muestreo de nódulos.

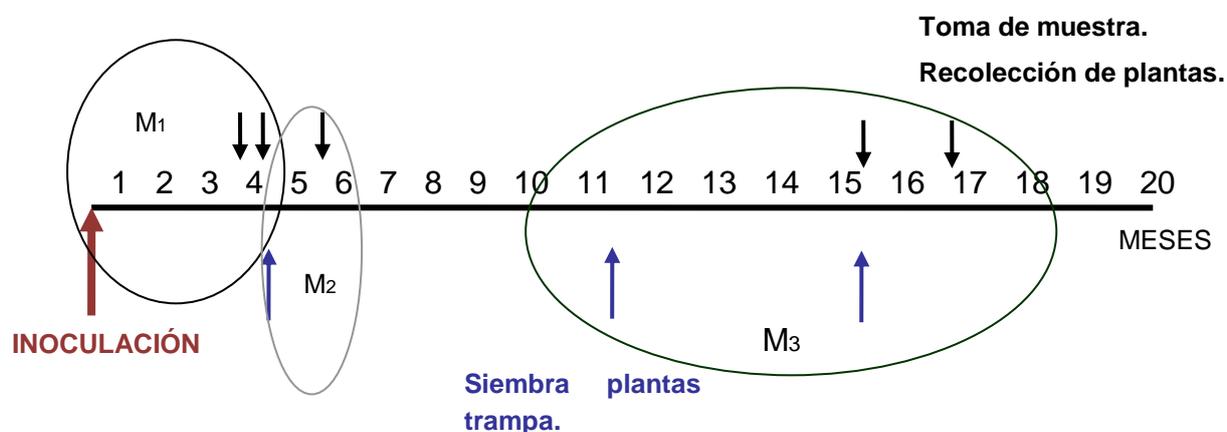


Fig. VI.1: Esquema del ensayo a campo diseñado para la búsqueda, en nódulos de alfalfa, de transconjugantes alóctonos que hayan recibido el plásmido pSmLPU88b desde la cepa inoculada *S. meliloti* LPU88AII. En el gráfico se presenta el diseño y la cronología del ensayo realizado en condiciones de campo en el que se indican los tiempos de inoculación, de siembra de plantas trampa (flechas negras, parte superior), y de muestreo de nódulos (flechas azules, parte inferior). La siembra de semillas inoculadas con la cepa dadora LPU88AII se realizó solo al inicio del ensayo (flecha marrón, parte inferior). La línea de tiempo muestra la duración del ensayo en meses. La primera siembra e inoculación se inició en el mes de junio del 2006. Las recolecciones de plantas para la posterior recuperación de nódulos fueron realizadas en los meses de octubre (M1) y diciembre del mismo año (M2), y en octubre y diciembre del año 2007 (M3). El número aproximado de rizobios noduladores de alfalfa presentes en el suelo al inicio del ensayo fue de aproximadamente 35 rizobios/g suelo según se estimó mediante técnica del número más probable (NMP) (ver Materiales y Métodos, sección II.3.3).

La búsqueda de rizobios transconjugantes alóctonos que puedan haber recibido el plásmido pSmLPU88b desde la cepa inoculada fue realizada según se indicó a partir de

rizobios aislados de nódulos de las plantas de alfalfa, y utilizando un ensayo de PCR multiplex específico para la amplificación de tres marcadores independientes propios del plásmido pSmeLPU88b (cabe señalar que en los controles del campo en el que realizamos el ensayo no obtuvimos amplificación positiva cuando se procesaron nódulos generados por los rizobios alóctonos).

Cada aislamiento analizado correspondió a rizobios recuperados de un nódulo individual previa esterilización superficial del mismo (Materiales y Métodos, sección II.3.1). Dado que en general los nódulos de alfalfa derivan de un evento de infección desarrollado por un único rizobio, la situación más frecuente es que los rizobios de cada nódulo tengan un origen clonal.

Todos los rizobios recuperados de los nódulos fueron en una primera selección analizadas en su fenotipo de resistencia a Sm de forma de descartar aquellos que su patrón de resistencias coincidiera con el de la cepa inoculada *S. meliloti* LPU88AII. Los rizobios sensibles a Sm se asumió que provenían del suelo (alóctonos) y eran susceptibles de ser analizados para establecer si habían adquirido el plásmido pSmeLPU88b introducido al sistema a través de la cepa inoculante. En una segunda etapa de análisis, los aislamientos obtenidos según se describió precedentemente fueron sometidos individualmente al ensayo de PCR diseñado para detectar la presencia del plásmido pLPU88b a través de la amplificación de secuencias de 481, 397 y 204 (Materiales y Métodos sección 4.3 y Tabla II-3, cebadores B9-H1L y B9-H1R; IS-RepAL y IS-RepAR; traI-ISL y traI-ISR).

Durante el primer muestreo (M1 en Figura VI.1.) se analizaron 1248 nódulos y se obtuvieron 442 aislamientos sensibles a Sm (correspondientes nódulos de plantas cuyas semillas fueron las inoculadas e introducidas en el suelo al comienzo del ensayo). Los nódulos anteriores fueron recuperados de la parcela inoculada y correspondieron a rizobios noduladores de alfalfa presentes en el suelo del ensayo. En el segundo muestreo (M2 en Figura VI.1.) se procesaron 1152 nódulos y se obtuvieron 812 aislamientos sensibles a Sm (correspondientes a nódulos de plantas trampa introducidas 4 meses post-inoculación). Luego de los dos primeros muestreos, uno correspondiente a nódulos de las plantas inicialmente inoculadas (M1), y otro a nódulos recogidos de plantas trampa introducidas a los 4 meses postinoculación (M2); no fue detectado ningún evento de movilización del plásmido pSmeLPU88b a los rizobios alóctonos que nodularon las plantas analizadas. En el tercer y último muestreo (M3) realizado 6 meses post-inoculación se estudiaron aproximadamente 400 nódulos de los cuales se recuperaron 220 aislamientos de rizobios sensibles a Sm y, como en los muestreos anteriores, con PCR negativa para marcadores del plásmido pLPU88b.

Un factor que con el curso del tiempo puede haber afectado negativamente la formación de transconjugantes es el decaimiento en el tiempo del número de bacterias dadoras (Sm^r) inicialmente introducidas a través del inoculante. El número de bacterias Sm^r recuperadas de los nódulos a lo largo del ensayo se muestra en la Figura VI.2. Como puede observarse, la mayor concentración de rizobios dadores (curva azul) está presente al inicio del ensayo (más de 65% de los nódulos con aislamientos Sm^r). Si en esas condiciones (abundancia del rizobio introducido LPU88All en las cercanías de la raíz) ninguno de los más de 400 aislamientos analizados en el muestreo M1 recibió el plásmido pSmeLPU88b, es razonable que también hayan dado negativas las búsquedas de transconjugantes en los muestreos posteriores M2, M3, y M4 en los que baja sensiblemente la presencia aislamientos Sm^r recuperados de los nódulos. En estos muestreos los porcentajes de rizobios Sm^r recuperados de los nódulos de la parcela inoculada (curva azul) se acercan a los obtenidos para los rizobios recuperados de la parcela control (curva gris).

El ensayo que hemos realizado ha incorporado a través de la inoculación aproximadamente $1,4 \times 10^3$ rizobios/cm² de superficie (calculado en base a 35 kg semilla/hectárea, 5×10^5 semillas/kg, y 8×10^4 rizobios/semilla), con una concentración de rizobios receptores cercana al medio centenar de rizobios de acuerdo a las estimaciones realizadas por la técnica del NMP (leyenda a la Figura VI.2.).

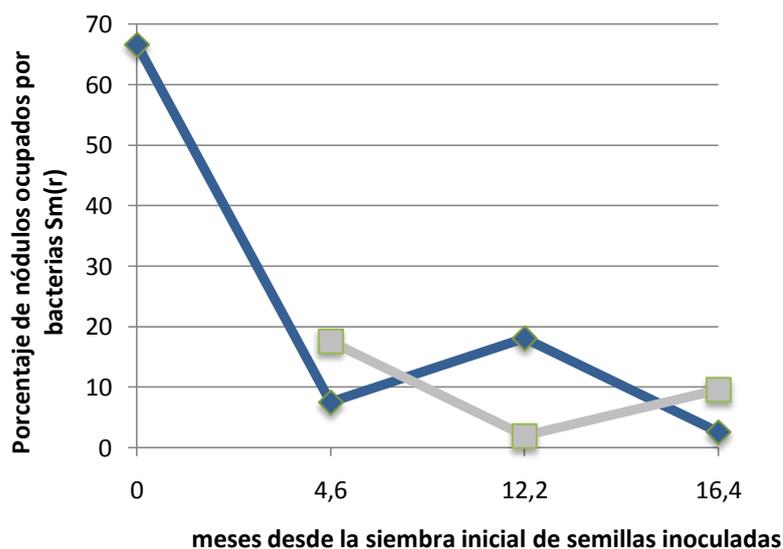


Fig. VI.2: Proporción de los nódulos de alfalfa portadores de rizobios resistentes a estreptomycin colectados en los muestreos M1, M2 y M3. Los datos en azul y en gris corresponden a las resistencias de los rizobios recuperados de los nódulos de la parcela inoculada y de la control, respectivamente.

En esas condiciones de ensayo, la inoculación de la cepa *S. meliloti* LPU88All portadora del plásmido movilizable pSmeLPU88b (de relativamente alta frecuencia de movilización

en relación a otros plásmidos de rizobios) no redundó en la recuperación de rizobios transconjugantes de nódulos de las plantas inicialmente introducidas, ni de los nódulos recuperados de las plantas trampa incorporadas en tres ciclos sucesivos de siembra separados 4, 12, y 16 meses del momento de la siembra.

Puede afirmarse por tanto que cualquiera haya sido la movilidad del plásmido desde la cepa introducida a la población de rizobios autóctonos, los transconjugantes formados no ocupan más del 1‰ de los nódulos que se recuperan en sucesivos ciclos de siembra a lo largo del primer año y medio posterior a la liberación de la cepa inoculada (como hemos dicho al inicio de esta sección, el ensayo no ha enfocado la detección de rizobios transconjugantes libres en el suelo, y se ha acotado solamente a evaluar la aparición de transconjugantes en los nódulos de plantas de alfalfa).

VI.3. Ensayo de microcosmos con muestras de suelo para la búsqueda de eventos de transferencia del plásmido pSmeLPU88b desde una cepa de *S. meliloti* a bacterias receptoras introducidas al suelo. Objetivos y diseño del ensayo.

Los ensayos a campo, como el que hemos descrito en la sección precedente, permiten explorar el comportamiento de los microorganismos en las condiciones naturales que operan en el ecosistema bajo análisis. Sin embargo, más allá del carácter irremplazable de los ensayos a campo; la obtención de resultados estadísticamente confiables y con valor predictivo es una tarea difícil teniendo en cuenta la complejidad del sistema, la dificultad para acotar variables, y la fluctuación de las condiciones operantes. Al mismo tiempo, el uso de prácticas bioseguras que incluyen evitar la liberación de microorganismos recombinantes (ver Introducción en este mismo capítulo), restringe muy fuertemente el tipo de aproximaciones analíticas que pueden aplicarse (ej. seguimiento de los genotipos introducidos, del plásmido modelo en nuestro caso, y de las cepas autóctonas que hayan adquirido el plásmido movilizable). Por todas estas razones, una alternativa a los ensayos a campo en condiciones de cielo abierto es la implementación de experimentos en condiciones de microcosmos en cámaras de cultivo de plantas con muestras de suelo. Dichos ensayos permiten el uso de suelo natural, controlar de modo adecuado las variables fisicoquímicas del ensayo (ciclo de luz, temperatura, humedad del suelo), y utilizar cepas recombinantes en tanto que se trata de un sistema contenido.

En el ensayo a campo que hemos presentado en la sección anterior no hemos podido detectar, en nódulos de plantas trampa de alfalfa, rizobios autóctonos que hayan

adquirido el plásmido movilizable portado por la cepa inoculante LPU88AII. Tal observación, como hemos indicado, no descarta ciertamente la existencia de eventos de transferencia desde el rizobio inoculado hacia rizobios que no hayan nodulado las plantas trampa analizadas, o hacia bacterias de otras especies que puedan replicar el plásmido pSmeLPU88b. Para analizar esta última posibilidad, hemos diseñado un ensayo de microcosmos en el que además de la cepa inoculante dadora *S. meliloti* LPU88 (pSmeLPU88b::Tn5) (Nm^r) (Pistorio, M., et al., 2003), se introdujo como eventual receptora la cepa *Agrobacterium tumefaciens* UBA PF2 (Rif^r) (libre del plásmidos, incluido su plásmido Ti) (Hynes, M. F., et al., 1985). La cepa receptora, además de ser capaz de sostener la replicación del plásmido pSmeLPU88b::Tn5, debe en principio tener tres características importantes: a) no poseer otros plásmidos que puedan excluir la entrada del plásmido pSmeLPU88b::Tn5, o competir con él por la replicación; b) no poseer funciones de ayuda (*helper*) que promuevan la re-movilización del plásmido entrante de modo que las frecuencias de transferencia que puedan medirse sólo correspondan a eventos promovidos por la cepa introducida y eventualmente por otras bacterias del suelo que retransfieran el plásmido luego de recibirlo y c) que no posea sistemas de restricción/metilación que degraden el plásmido entrante. La cepa *A. tumefaciens* UBA PF2 cumple con esas condiciones. La búsqueda de transconjugantes *A. tumefaciens* UBA PF2 (pSmeLPU88b::Tn5) se realizó en la masa del suelo y en la rizósfera, ambiente propicio este último para el desarrollo bacteriano y la transferencia de genes por vía conjugativa (Molbak, L., et al., 2007, van Elsas, J. D., et al., 1989, Van Elsas, J. D., et al., 1990).

VI.3.1. Evaluación de la transferencia del plásmido pSmeLPU88b::Tn5 en la masa de suelo.

La búsqueda de transconjugantes *A. tumefaciens* (pSmeLPU88b::Tn5) que puedan formarse en la masa del suelo durante el ensayo de microcosmos fue realizada por plaqueo en medios con Nm y Rif a lo largo de 35 días posteriores a la inoculación. Como control, y antes del ensayo de microcosmos, se determinó la frecuencia de transferencia del plásmido entre las dos cepas en la superficie de un medio sólido y en condiciones de laboratorio. En dichas condiciones la conjugación entre las dos cepas ocurrió a una frecuencia de: $8,75 \times 10^{-5}$ trasconjugantes/célula dadora y $3,8 \times 10^{-4}$ trasconjugantes/célula receptora cuando en el ensayo de conjugación se utilizaron $4,0 \times 10^9$ ufc/ml y $8,6 \times 10^8$ ufc/ml de la bacteria dadora y receptora, respectivamente.

Los ensayos de microcosmos fueron realizados según se describe en Materiales y Métodos sección II.5. En un primer ensayo la tierra fue inoculada con aproximadamente

$9,25 \times 10^6$ ufc/gr de tierra de los rizobios dadores y $1,06 \times 10^7$ ufc/gr del *A. tumefaciens* receptor. El número de de cada una de las bacterias introducido al suelo del microcosmos fue estimado en base a la densidad óptica de los cultivos y luego determinada por recuento en placa. Luego de la inoculación, el suelo fue dispuesto en tubos plásticos según se muestra en la Figura VI.3. en los que luego se sembraron 2 plantas de alfalfa de modo de recrear entorno rizosférico alrededor de cada una de las raíces.

Los recuentos de bacterias dadoras, receptoras y transconjugantes se realizaron cada 3-5 días, y en todos los casos por triplicado. Para el recuento de bacterias se procesó la totalidad del suelo de cada uno de los tubos de microcosmos (30 g). El mismo fue resuspendido en 300ml de solución salina tamponada (PBS, ver Materiales y Métodos, sección II.1.2.1.) estéril y diluido a *posteriori* para su recuento en placas con Nm, Rif, o Nm+Rif según correspondió al recuento de la cepa dadora, receptora, o transconjugantes; respectivamente. En la Figura VI.4. se muestran los recuentos de cada una de las cepas durante el primer mes post-inoculación.

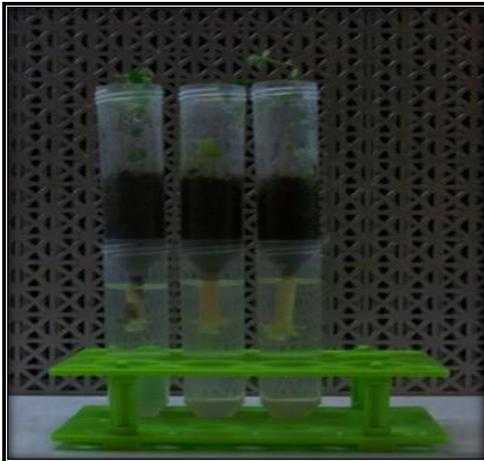
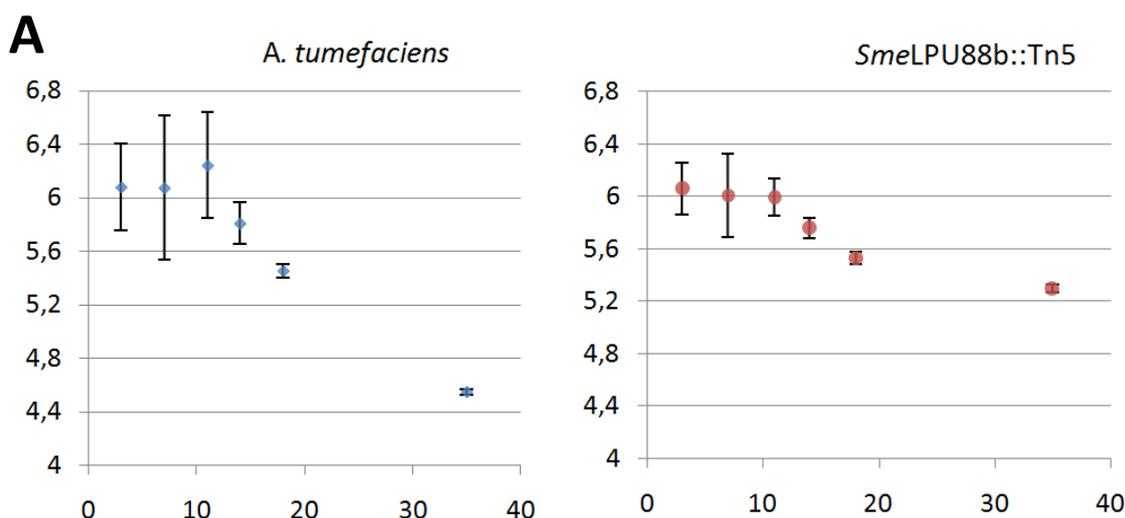


Fig. VI.3: Fotografía del sistema de microcosmos utilizado. Treinta gramos de suelo inoculado con la cepa dadora y receptora según se indica en el texto fueron depositados en un tubo de polipropileno de 50 ml. El suelo de dicho tubo fue mantenido con riego a capacidad de campo mediante el empleo de una mecha de hilo de algodón de aprox. 0,5 cm colocada en el fondo del tubo con suelo, y conectada al depósito de agua de un segundo tubo inferior. Cada uno de los tubos de microcosmos fue sembrado con dos plantas de alfalfa de 2 días para recrear en los mismos el ambiente rizosférico de la planta huésped de la cepa dadora.

Finalmente, los datos de la Figura VI.4. muestran que, como ya hemos observado en otros ensayos en microcosmos realizados en nuestro laboratorio con muestras de suelo (Del Papa, M. F., et al., 2003), los recuentos de las cepas introducidas disminuyen en el tiempo posiblemente debido a la competencia por el medio ejercida por organismos depredadores presentes incluyendo protozoos (Lowendorf, H. S., et al., 1981). En el ensayo resultó claro, sin embargo, que el título de la cepa dadora *S. meliloti* al final del ensayo fue mayor casi en un orden de magnitud (factor 10) respecto de título de la cepa receptora. Si bien el efecto puede deberse a una capacidad diferente de una y otra cepa para persistir en el suelo utilizado en el ensayo, no debe descartarse que la diferencia pueda también pueda derivar de una mejor colonización de la rizósfera de alfalfa por sus rizobios homólogos, respecto de otras bacterias como el *Agrobacterium* que hemos introducido.



B **Unidades formadoras de colonias/gr de suelo de las cepas dadora y receptora en los tubos de microcosmos (ufc/gr de suelo)**

Día	<i>Sme</i> LPU88 (pLPU88b::Tn5)	<i>A. tumefaciens</i> UBA PF2	Transconjugantes
3	$1,15 \times 10^6 \pm 3,41 \times 10^5$	$1,20 \times 10^6 \pm 5,60 \times 10^5$	ND
7	$1,01 \times 10^6 \pm 5,51 \times 10^5$	$1,19 \times 10^6 \pm 9,36 \times 10^5$	ND
11	$9,87 \times 10^5 \pm 2,46 \times 10^5$	$1,75 \times 10^6 \pm 6,82 \times 10^5$	ND
14	$5,77 \times 10^5 \pm 1,36 \times 10^5$	$6,43 \times 10^5 \pm 2,68 \times 10^5$	ND
18	$3,38 \times 10^5 \pm 8,52 \times 10^4$	$2,83 \times 10^5 \pm 8,62 \times 10^4$	ND
35	$2,00 \times 10^5 \pm 5,57 \times 10^4$	$3,51 \times 10^4 \pm 3,56 \times 10^4$	ND

Fig. VI.4: Evolución en los microcosmos del recuento de la cepa dadora *S. meliloti* LPU88 (pSmeLPU88b::Tn5), de la receptora *A. tumefaciens* UBA PF2 (gráfica en panel A), y de los transconjugantes (tabla en panel B) a lo largo de 35 días post inoculación. El suelo de los microcosmos fue inoculado con $9,25 \times 10^5$ ufc/gr de los rizobios dadores y $1,06 \times 10^7$ ufc/gr del *A. tumefaciens* receptor. Los recuentos de microorganismos fueron realizados por siembra en placas con medio Ty suplementado con Neomicina para el recuento de la cepa dadora, con Rifampicina para el recuento de la cepa receptora, y con ambos antibióticos para la búsqueda de transconjugantes. Los resultados se expresan como valores promedio \pm desvío estándar de tres réplicas independientes. ND: no detectable. Las placas control en las que no se inocularon la cepa dadora ni la receptora, como era esperable no se observaron colonias con la resistencia correspondiente a los transconjugantes. En todas las cajas se adicionó cicloheximida 100 μ g/ml para disminuir el desarrollo de hongos naturalmente presentes en el suelo.

En ninguno de los muestreos realizados se detectaron transconjugantes. Teniendo en cuenta el procedimiento utilizado (resuspensión de 30 g de suelo del microcosmos en 300ml de solución salina y plaqueo de 100 μ l en placas con medio selectivo), el número mínimo de transconjugantes detectables es 100/g de suelo (cuando aparece una única colonia en el plaqueo directo).

Por tanto, teniendo en cuenta el recuento de la cepa dadora ($1,15 \times 10^6$ /g al inicio – 2×10^5 /g al final del ensayo; Figura VI.4.), y que no hemos detectado transconjugantes, puede inferirse que la frecuencia de transferencia en las condiciones del ensayo realizado ha sido menor que $8,7 \times 10^{-5}$ transconjugantes/célula dadora si se considera el recuento inicial (y menor que 5×10^{-4} transconjugantes/célula dadora si se considera el plaqueo final). Tales resultados muestran que, si han ocurrido eventos de transferencia en el medio suelo, los mismos han tenido lugar en el mejor de los casos a frecuencias comparables a la observada en medios sólidos de laboratorio (según hemos mencionado del orden de $8,7 \times 10^{-5}$ trasconjugantes/célula dadora). Si bien no se han reportado en la literatura estudios cuantitativos de movilización de plásmidos crípticos de rizobios en suelo no estéril, para el plásmido simbiótico pJB5JI de *R. leguminosarum* bv viciae Kinkle y Schmidt (1991) han encontrado frecuencias de transferencia en suelo no estéril del orden de 10^{-5} transconjugantes/célula dadora.

VI.3.2. Evaluación de la transferencia del plásmido pSmLPU88b::Tn5 en el ambiente y suelo rizosférico.

Existe abundante información en la literatura en la que se reporta al ambiente rizosférico como un sitio muy propicio para el crecimiento de microorganismos, para su interacción a través de diferentes señales (de acción intra e interespecíficas) , y para el intercambio horizontal de genes por vía conjugativa (Molbak, L., et al., 2007, van Elsas, J. D., et al., 1989, Van Elsas, J. D., et al., 1990) con frecuencias que oscilan entre 10^{-3} y 10^{-1} trasconjugantes/célula dadora, tanto para plásmidos endógenos como para aquellos introducidos artificialmente (Sorensen, S. J., et al., 2005). Sobre la base de esta información y de los resultados obtenidos luego del análisis del suelo de los microcosmos a lo largo de un mes (sección 3.1. precedente), decidimos explorar la eventual presencia de transconjugantes de *A. tumefaciens* UBA PF2 en la rizósfera de plantas introducidas en tubos de microcosmos similares a los establecidos en el ensayo anterior pero en los que incorporamos $3,60 \times 10^6 \pm 2,27 \times 10^6$ ufc/gr de suelo de *A. tumefaciens* UBA PF2 y $4,68 \times 10^7 \pm 1,86 \times 10^7$ ufc/gr de suelo de *S. meliloti* LPU88 (pLPU88b::Tn5)(diez veces más bacterias dadoras que en el ensayo anterior).

Tabla VI-1: Recuento de rizobios donadores, de *A. tumefaciens* receptores, y de transconjugantes en la rizósfera de plantas de alfalfa descalzadas de los suelos de microcosmos inoculados.

Día	recuento de bacterias rizosféricas (ufc) / raíz		
	<i>SmeLPU88b::Tn5</i>	<i>A. tumefaciens</i>	Transconjugantes
15	$2,95 \times 10^6$	$1,45 \times 10^6$	2 (dos)
36	$1,43 \times 10^6 \pm 1,22 \times 10^6$	$8,88 \times 10^4 \pm 5,42 \times 10^4$	ND

Las cepas receptora y dadora fueron inoculadas en el suelo a una concentración $3,60 \times 10^6$ ufc/gr de suelo de *A. tumefaciens* UBA PF2 y $4,68 \times 10^7$ ufc/gr de suelo de *S. meliloti* LPU88 (pLPU88b::Tn5), respectivamente. El recuento de microorganismos se realizó por siembra en placas con medio TY suplementado con neomicina para el recuento de la cepa dadora, con rifampicina para el recuento de la cepa receptora, y con ambos antibióticos para la búsqueda de transconjugantes. Los resultados se expresan como valores promedio \pm desvío estándar de tres réplicas independientes. ND: no detectable. Las placas control en las que no se inocularon la cepa dadora ni la receptora, como era esperable no se observaron colonias con la resistencia correspondiente a los transconjugantes. En todas las caja se adicionó cicloheximida 100 μ g/ml para disminuir el desarrollo de hongos naturalmente presentes en el suelo.

La búsqueda de transconjugantes asociados en la rizósfera se realizó a los 15 y 36 días post-inoculación junto al análisis de plantas extraídas de tubos control sin inocular. Para obtener la muestra rizosférica la planta a analizar fue descalzada manualmente de la masa de suelo, y las raíces sumergidas junto con el suelo asociado a ellas en 1ml de PBS que fue luego plaqueado en medio TY con Nm+Rif para la búsqueda de transconjugantes. En la Tabla VI.1. se muestran los resultados obtenidos. Luego de plaquear la mitad de la suspensión de suelo rizosférico de una de las plantas (0,5ml), detectamos una única colonia de *A. tumefaciens* Nm^r - Rif^r (lo que resulta en un valor normalizado de 2 transconjugantes/raíz de alfalfa según consta en la primera línea de la Tabla VI.1.). Para evaluar si en efecto la colonia obtenida correspondía a una cepa portadora del plásmido pLPU88b::Tn5 realizamos: a) una corrida electroforética en gel de lisis *in situ* (tipo Eckhardt) para evaluar la presencia del plásmido pSmeLPU88b::Tn5 (Figura VI.5.B.), y b) un ensayo de PCR *multiplex* para la detección de 3 marcadores diferentes presentes en el plásmido (Figura VI.5.A.).

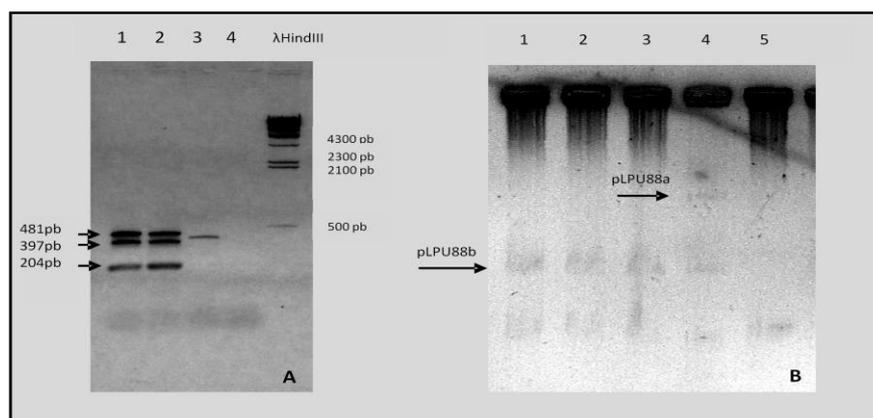


Fig. VI.5: Caracterización del clon resistente a Nm y Rif aislado de la rizósfera de una planta de alfalfa 15 días luego de la inoculación de los microcosmos con la cepa dadora *S. meliloti* LPU88 (pSmeLPU88b::Tn5) (Nm^r) y la receptora *A. tumefaciens* UBA PF2 (Rif^r). Panel A. Electroforesis en gel de agarosa 0,8% para la separación de los productos de amplificación de una reacción de PCR multiplex diseñada para la amplificación de 3 marcadores presentes en el plásmido pSmeLPU88b::Tn5 (481 pb, 397 pb y 204 pb) (Materiales y Métodos, sección II.4.3). Calle 1: control positivo con ADN molde de la cepa LPU88; calle 2: amplificación con ADN molde del clon resistente a Nm y Rif aislado de la rizósfera de una planta de alfalfa; calle 3: amplificación con ADN molde de la cepa receptora *A. tumefaciens* UBA PF2; calle 4: control negativo din ADN molde. La última calle corresponde al marcador de peso molecular, fago λ digerido con la endonucleasa de restricción *Hind*III. **Panel B.** Gel de lisis *in situ* (ver Materiales y Métodos sección II.2.9) del clon resistente a Nm y Rif aislado de la rizósfera de una planta de alfalfa. Las tres primeras calles corresponden a muestras repetidas del clon resistente a Nm y Rif ; la calle 4 es el control positivo en el que se observan las plásmidos pSmeLPU88a y pSmeLPU88b::Tn5 presentes en la bacteria dadora. La calle 5 corresponde a la cepa libre de plásmidos de *A. tumefaciens* UBA PF2 utilizada como receptora.

Tanto el gel de lisis *in situ* como el ensayo de PCR confirmaron en el clon Nm^r Rif^r la presencia del plásmido pSmeLPU88b::Tn5. La frecuencia de conjugación hallada resultó entonces de $6,8 \times 10^{-7}$ transconjugantes/célula dadora, y de $1,38 \times 10^{-6}$ transconjugantes/célula receptora. Dichas frecuencias de conjugación son entre 1 y 3 órdenes de magnitud inferiores a las obtenidas en condiciones de laboratorio en superficies de medios sólidos y con altas concentraciones bacterianas.

El hecho que las frecuencias de conjugación rizosféricas hayan sido sólo del orden de 10^{-7} transconjugantes/célula dadora con una carga bacteriana cercana a las 10^6 células dadoras y receptoras/raíz sugiere fuertemente que las frecuencias conjugativas en el suelo no rizosférico deben ser seguramente menores ($<10^{-7}$ /célula dadora). Observación esta última que es consistente con los resultados de la sección precedente en la que, utilizando una aproximación experimental que sólo permitía detectar frecuencias

conjugativas mayores que 10^{-5} /célula dadora, no observamos tranconjugantes en la masa del suelo libre.

Cabe destacar finalmente que entre el día 15 y el 36 del ensayo el título de los *S. meliloti* dadores en la rizósfera decayó menos que el correspondiente a los *A. tumefaciens* (Tabla VIII.1.). Dicha la observación sugiere nuevamente la posibilidad de que exista un efecto rizosférico positivo preferencial sobre *S. meliloti* (crecimiento y persistencia) respecto del que pueda existir sobre otras bacterias no simbióticas de alfalfa como el *A. tumefaciens* que hemos agregado.

En los capítulos precedentes hemos presentado la caracterización molecular de los módulos de replicación y de movilización conjugativa del plásmido pSmeLPU88b presente en la cepa de *S. meliloti* LPU88 (Pistorio, M., et al., 2003) recuperada de un suelo local y que hemos adoptado como modelo de estudio basados en las características funcionales que hemos observado en el moviloma de *S. meliloti* (Pistorio, M., et al., 2008). En este capítulo, hemos abordado la caracterización de la transferencia conjugativa del mismo plásmido pSmeLPU88b, en medio suelo, y hacia rizobios alóctonos y otras bacterias presentes. Evaluamos en un primer ensayo si la liberación a campo de la cepa *S. meliloti* LPU88 capaz de movilizar el plásmido pSmeLPU88b, redundaba en la recuperación de rizobios alóctonos portadores del plásmido cuando se introducen plantas trampa de alfalfa a lo largo del primer año y medio post-inoculación. En dicho ensayo, en el que los rizobios inoculantes fueron introducidos empleando prácticas rutinarias de inoculación (aprox. 8×10^4 rizobios/semilla, y aprox. 1.750 semillas/m²), no hemos detectado rizobios alóctonos transconjugantes en los más de 1.400 nódulos analizados durante 18 meses. La inoculación a campo de un rizobio portador de un plásmido críptico de alta frecuencia de movilización mostró que los transconjugantes alóctonos que puedan originarse están representados en menos del 1 % de los nódulos formados en las plantas de alfalfa. La liberación de un rizobio libre de marcadores recombinantes no nos ha permitido explorar en la masa del suelo a campo la presencia de transconjugantes alóctonos.

En una segunda serie de ensayos en sistemas contenidos exploramos la frecuencia de movilización del plásmido pSmeLPU88b en condiciones de suelo hacia bacterias que puedan replicarlo. Empleamos para ellos dos ensayos de microcosmos en presencia de plantas de alfalfa en los que analizamos la transferencia del plásmido a una cepa de *A. tumefaciens* (libre de plásmidos) empleada como receptora indicadora. En dichos ensayos (usando inóculos altos de dadora y receptora $>10^6$ ufc/g) no hemos detectado transconjugantes en la masa de suelo libre, pero sí en la rizósfera de alfalfa donde la frecuencia de transferencia pudo ser estimada en cerca de 10^{-7} eventos/célula dadora (ó

receptora) (frecuencias estas inferiores a las observadas en la superficie de medios sólidos en condiciones de laboratorio). Teniendo en cuenta la frecuencia anterior, y que el número de rizobios en suelos naturales de cultivo oscila generalmente entre $10-10^5$ (excepcionalmente este último valor)/g de suelo (mucho menores a los utilizados en nuestros ensayos de microcosmos), puede inferirse que la transferencia conjugativa entre rizobios de plásmidos como el estudiado en condiciones naturales es un evento sólo significativo en el contexto de la evolución genética de la población a mediano y largo plazo. Estos resultados contrastan con los reportados por Kinkle y Schmidt (1991) que reportan frecuencias de movilización del orden de 10^{-5} eventos/célula para el plásmido simbiótico de una cepa de *R. leguminosarum* bv viciae en suelo no estéril. El estudio anterior (un pSym) y los aquí reportados (un plásmido críptico) son hasta donde hemos podido explorar los únicos disponible para plásmidos de rizobios en suelo no estéril, y permiten dimensionar el orden de magnitud de la transferencia conjugativa en esta especie de bacterias en su medio natural.

Finalmente, la justa evaluación del impacto de la introducción de rizobios inoculantes portadores de plásmidos movilizables/transmisibles sobre la población de rizobios alóctonos requerirá claramente de la consideración de variables adicionales. Dado que los rizobios llevan a cabo una parte central de su ciclo de vida asociados a leguminosas, el resultado de la inoculación de cepas portadoras de plásmidos movilizables/conjugativos será por un lado dependiente de la capacidad de esos genotipos de persistir en vida libre en el suelo, y por otro de la capacidad de los mismos de asociarse en simbiosis con alfalfa respecto de la población alóctona de rizobios existentes.

Conclusiones Generales

Caracterización molecular de la región Dtr y de los módulos de replicación del plásmido pSmeLPU88b.

En el presente trabajo de tesis hemos avanzado en la caracterización molecular y funcional del sistema conjugativo binario constituido por los plásmidos pSmeLPU88a/b descrito inicialmente por Pistorio et al., (2003). La construcción inicial de una biblioteca parcial del plásmido pSmeLPU88b::Tn5 permitió, mediante secuenciamiento *shotgun* completar cerca del 70% de la secuencia del plásmido e identificar genes del complejo Dtr y de movilización (Mpf) por un lado; y elementos asociados a la replicación por otro.

En relación a la región Dtr, el análisis *in silico* de la misma permitió identificar marcos de lectura con similitud de secuencia a genes *par* y *mob* de otros plásmidos, y el marco de lectura de una posible relaxasa al que designamos *mobZ*. El análisis de la secuencia aminoacídica del producto MobZ ha revelado la presencia de motivos de secuencia (Motivos I, II, y III) que se asemejan a los ya descritos en otras relaxasas (Francia, M. V., et al., 2004). Aunque los Motivos II y III parecen vincularse en su secuencia a los descritos para los plásmidos ColE1 de la familia MobP, los mismos presentan importantes variaciones de secuencia con conservación sólo de los aminoácidos centrales del núcleo (serina en el Motivo II, tres histidinas vecinas en el Motivo III), hecho que refleja la divergencia de MobZ de otras relaxasas como lo pone de manifiesto el análisis filogenético de la proteína que presentamos en el Capítulo IV. La proteína MobZ se posiciona filogenéticamente entre las relaxasas de plásmidos de la familia MobP (con las que hemos mencionado que comparte Motivos II y III similares), y las relaxasas de los plásmidos ambientales pSB102, pIPO2T, y pXF51 recuperados de la rizósfera de alfalfa (Schneiker, S., et al., 2001), de la rizósfera de trigo (Tauch, A., et al., 2002), y del patógeno de plantas *Xylella fastidiosa* (Marques, M. V., et al., 2001, Simpson, A. J., et al., 2000), respectivamente. De todos modos, y más allá de la similitud entre las relaxasas presentes en pSB102 y pIPO2T con MobZ, es claro que esta última forma un clado independiente sólo junto a relaxasas similares en algunos plásmidos de Rizobiales.

Aparte de las consideraciones anteriores respecto de las relaciones filogenéticas de MobZ y de las peculiaridades de su estructura primaria, como ocurre con otras relaxasas hemos mostrado que la porción amino de la proteína (300 aminoácidos) es suficiente para sostener la movilización del plásmido pSmeLPU88b y con la misma frecuencia que en la cepa salvaje. A pesar de esta evidencia, no hemos podido demostrar interacción física *in vitro* entre la porción N-terminal de MobZ y ADN de la región del *oriT*. Deberán explorarse nuevas condiciones para el ensayo EMSA y evaluar, también, condiciones alternativas de renaturalización de los productos de traducción parcial o total de MobZ.

En relación todavía a MobZ, hemos realizado un análisis de su distribución en diferentes cepas de *S. meliloti* pertenecientes a diferentes grupos de diversidad

plasmídica según han sido definidos previamente por Pistorio et al. (2008). Los resultados mostraron un carácter muy ubicuo del sistema conjugativo asociado a los plásmidos pSmeLPU88a/b, y muestran a la PCR que hemos diseñado como una herramienta muy útil a la hora de evaluar de modo rápido y sencillo la eventual presencia de replicones conjugativos/movilizables en cepas de colección e inoculantes de *S. meliloti*.

Finalmente, y como parte del análisis de la región asociada al Dtr, hemos avanzado en la localización del *oriT* del plásmido pSmeLPU88b. El *oriT* ha sido mapeado dentro de un fragmento de 400 pb dentro de la zona intergénica *para like-mobC*. Más allá de la localización del *oriT*, los resultados mostraron una transferencia eficiente del plásmido que porta el *oriT* independientemente de la localización del gen de la relaxasa respecto del origen de transferencia (*cis/trans*). Este comportamiento contrasta con el comportamiento del plásmido simbiótico pRetCFN42d de *R. etili* CFN42 en el que, para que exista eficiente transferencia conjugativa del mismo, el *oriT* y el gen de la relaxasa deben localizarse en *cis* (Perez-Mendoza, D., et al., 2006).

Respecto a las funciones de replicación hemos encontrados dos módulos, uno del tipo *repABC*, y el otro relacionado con la familia de replicones *repC*. Ambas regiones resultaron casi idénticas a los elementos homólogos del plásmido pMBA9a. Parece ser una característica común, como ha sido observado en pMBA9a, pSmeSM11a y ahora en el pSmeLPU88b, la presencia de más de un tipo de sistema de replicación perteneciente a distintas familias en los plásmidos de *S. meliloti*. El estudio funcional que hemos hecho con cada uno de los módulos de replicación mostró que cada uno de ellos es capaz de sostener la replicación en *S. meliloti* de plásmidos suicidas y que a través de mecanismos no caracterizados aún, ambos replicones excluyeron por incompatibilidad al plásmido pSmeLPU88b. Estudios adicionales son necesarios para comprender la naturaleza y el funcionamiento de dos sistemas de replicación coexistiendo en un mismo plásmido.

La movilización conjugativa del plásmido pSmeLPU88b en microcosmos con suelo no estéril y en condiciones de campo.

En el Capítulo VI de esta Tesis hemos abordado la caracterización de la transferencia conjugativa del plásmido pSmeLPU88b, en medio suelo hacia rizobios alóctonos y hacia otras bacterias presentes. Evaluamos en un primer ensayo si la liberación a campo de la cepa *S. meliloti* LPU88 capaz de movilizar el plásmido pSmeLPU88b, redundaba en la recuperación de rizobios alóctonos portadores del plásmido cuando se introducen plantas trampas de alfalfa a lo largo del primer año y medio post-inoculación. En dicho ensayo, en el que los rizobios inoculantes fueron introducidos empleando prácticas rutinarias de inoculación (aprox. 8×10^4 rizobios/semilla, y aprox. 1750 semillas/m²), no hemos detectado rizobios alóctonos transconjugantes en los más de 1400 nódulos analizados durante 18 meses. La inoculación a campo de un rizobios portador de un plásmido críptico de alta frecuencia de movilización mostró que los

transconjugantes alóctonos que puedan originarse están representados en menos del 1 % de los nódulos formados en las plantas de alfalfa. La liberación de un rizobio libre de marcadores recombinantes no nos ha permitido explorar en la masa del suelo a campo la presencia de transconjugantes alóctonos.

En una segunda serie de ensayos en sistemas contenidos exploramos la frecuencia de movilización del plásmido pSmeLPU88b en condiciones de suelo hacia bacterias que puedan replicarlo. Empleamos para ellos dos ensayos de microcosmos en presencia de plantas de alfalfa en los que analizamos la transferencia del plásmido a una cepa de *A. tumefaciens* (libre de plásmidos) empleada como receptora indicadora. En dichos ensayos (usando inóculos altos de dadora y receptora $>10^6$ ufc/g) no hemos detectado transconjugantes en la masa de suelo libre, pero sí en la rizósfera de alfalfa donde la frecuencia de transferencia pudo ser estimada en cerca de 10^{-7} eventos/célula dadora (ó receptora) (frecuencias estas inferiores a las observadas en la superficie de medios sólidos en condiciones de laboratorio). Teniendo en cuenta la frecuencia anterior, y que el número de rizobios en suelos naturales de cultivo oscila generalmente entre $10-10^5$ (excepcionalmente este último valor)/g de suelo (mucho menores a los utilizados en nuestros ensayos de microcosmos), puede inferirse que la transferencia conjugativa entre rizobios de plásmidos como el estudiado en condiciones naturales es un evento sólo significativo en el contexto de la evolución genética de la población a mediano y largo plazo. Estos resultados contrastan con los reportados por Kinkle y Schmidt (1991) que reportan frecuencias de movilización del orden de 10^{-5} eventos/célula para el plásmido simbiótico de una cepa de *R. leguminosarum* bv viciae en suelo no estéril. El estudio anterior (un pSym) y los aquí reportados (un plásmido críptico) son hasta donde hemos podido explorar los únicos disponible para plásmidos de rizobios en suelo no estéril, y permiten dimensionar el orden de magnitud de la transferencia conjugativa en esta especie de bacterias en su medio natural.

Finalmente, la justa evaluación del impacto de la introducción de rizobios inoculantes portadores de plásmidos movilizables/transmisibles sobre la población de rizobios alóctonos requerirá claramente de la consideración de variables adicionales. Dado que los rizobios llevan a cabo una parte central de su ciclo de vida asociados a leguminosas, el resultado de la inoculación de cepas portadoras de plásmidos movilizables/conjugativos será por un lado dependiente de la capacidad de esos genotipos de persistir en vida libre en el suelo, y por otro de la capacidad de los mismos de asociarse en simbiosis con alfalfa respecto de la población alóctona de rizobios existentes.

Consideraciones finales. Perspectivas.

Los rizobios son bacterias gran negativas del suelo caracterizados por su capacidad de asociarse en simbiosis con plantas leguminosas y dar lugar a nódulos en los que fijan nitrógeno atmosférico a cambio de la provisión de carbono originado en la fotosíntesis.

Tanto en sistemas naturales como en sistemas agrícolas de cultivo intensivo los rizobios son importantes actores para la preservación de la fertilidad nitrogenada del suelo. Estas características han sido sin duda determinantes de la atención que se ha prestado desde hace décadas a la biología y bioquímica de estas bacterias.

Dos características particularmente interesantes de los rizobios son su amplia diversidad (que hace en muchos casos difícil la sistemática de los mismos) y, en la mayoría de las especies, la presencia de abundante ADN extracromosomal bajo la forma de megaplásmidos portadores de genes simbióticos (pSym) y de plásmidos de menor tamaño de función en la mayoría de los casos desconocida (plásmidos crípticos). Esta característica junto a la capacidad de plásmidos simbióticos y crípticos de ser transferidos por vía conjugativa posiciona a los rizobios como organismos con genomas muy dinámicos. En este contexto, históricamente se ha puesto mayor énfasis en la caracterización de los plásmidos simbióticos, su carga génica, el modo en que los mismos se movilizan, y cómo la adquisición de genes específicos da lugar al tránsito de comportamientos saprofiticos/patogénicos a una íntima vida simbiótica con plantas.

En este trabajo de Tesis hemos enfocado la caracterización molecular de un plásmido críptico movilizable presente en *S. meliloti*, una de las especies de rizobios con mayor contenido de ADN en plásmidos crípticos. El trabajo se ha centrado en particular en la caracterización de una parte del sistema de movilización (genes del Dtr), de sus módulos de replicación, y de las características de movilidad del plásmido en el medio suelo. La información molecular obtenida es particularmente valiosa teniendo en cuenta que los resultados previos del laboratorio y el análisis aquí realizado muestran ambos que el sistema conjugativo de los plásmidos pSmeLPU88a/b es de distribución muy ubicua en *S. meliloti* (y presente en la cepa secuenciada de *S. medicae*). El avance en la caracterización del moviloma críptico deberá incluir ahora estrategias destinadas por un lado, a completar la caracterización del sistema conjugativo (proteína acopladora, Mpf), y por otro a establecer el pool génico presente en los plásmidos y su relación con el pool cromosomal y de los replicones simbióticos. Para avanzar en esta última dirección, en nuestro laboratorio ya hemos comenzado la preparación (aislamiento) de todos los plásmidos presentes en cepas representantes de cada uno de los 22 grupos de diversidad descritos por Pistorio et al., (2008) hacia su pirosecuenciamiento masivo. El secuenciamiento completo del moviloma plasmídico no sólo permitirá conocer en detalle la estructura de los sistemas conjugativos en toda la colección de plásmidos, sino también el conjunto de genes asociados a los replicones crípticos, la redundancia de los mismos, y su relación con la información cromosomal. La información precedente esperamos permita, elaborar un modelo de intercambio de información entre plásmidos y con el cromosoma que permita comprender los mecanismos que subyacen a la evolución genómica de los rizobios.

Referencias Bibliográfica

- Amabile-Cuevas, C. F., y M. E. Chicurel.** 1993. Horizontal gene transfer. *Am. Sci.* **81**:332-342.
- Arber, W.** 2000. Genetic variation: molecular mechanisms and impact on microbial evolution. *FEMS Microbiol Rev* **24**:1-7.
- Atmakuri, K., E. Cascales, y P. J. Christie.** 2004. Energetic components VirD4, VirB11 and VirB4 mediate early DNA transfer reactions required for bacterial type IV secretion. *Mol Microbiol* **54**:199-211.
- Bailly, X., I. Olivieri, B. Brunel, J. C. Cleyet-Marel, y G. Béna.** 2007. Horizontal gene transfer and homologous recombination drive the evolution of the nitrogen-fixing symbionts of *Medicago* species. *J Bacteriol.* **189**:5223-36.
- Baldani, J. I., R. W. Weaver, M. F. Hynes, y B. D. Eardly.** 1992. Utilization of carbon substrates, electrophoretic enzyme patterns, and symbiotic performance of plasmid-cured clover rhizobia. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:2308-2314.
- Banfalvi, Z., V. Sakanyan, C. Koncz, A. Kiss, I. Dusha, y A. Kondorosi.** 1981. Location of nitrogen fixation genes on a high molecular weight plasmid of *R. meliloti*. *Mol. Gen. Genet.* **184**:318-325.
- Barcellos, F. G., P. Menna, J. S. da Silva Batista, y M. Hungria.** 2007. Evidence of horizontal transfer of symbiotic genes from a *Bradyrhizobium japonicum* inoculant strain to indigenous diazotrophs *Sinorhizobium (Ensifer) fredii* and *Bradyrhizobium elkanii* in a Brazilian Savannah soil. *Appl Environ Microbiol* **73**:2635-43.
- Bardin, S., S. Dan, M. Osteras, y T. M. Finan.** 1996. A phosphate transport system is required for symbiotic nitrogen fixation by *Rhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **178**:4540-7.
- Barnett, M. J., R. F. Fisher, T. Jones, C. Komp, A. P. Abola, F. Barloy-Hubler, L. Bowser, D. Capela, F. Galibert, J. Gouzy, M. Gurjal, A. Hong, L. Huizar, R. W. Hyman, D. Kahn, M. L. Kahn, S. Kalman, D. H. Keating, C. Palm, M. C. Peck, R. Surzycki, D. H. Wells, K. C. Yeh, R. W. Davis, N. A. Federspiel, y S. R. Long.** 2001. Nucleotide sequence and predicted functions of the entire *Sinorhizobium meliloti* pSymA megaplasmid. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:9883-8.
- Barnett, M. J., y S. R. Long.** 1997. Identification and characterization of a gene on *Rhizobium meliloti* pSyma, syrB, that negatively affects syrM expression. *Mol Plant Microbe Interact* **10**:550-9.
- Barran, L. R., y E. S. P. Bromfield.** 1988. Symbiotic gene probes hybridize to cryptic plasmids of indigenous *Rhizobium meliloti*. *Can. J. Microbiol.* **34**:703-707.
- Barran, L. R., N. Ritchot, y E. S. Bromfield.** 2001. *Sinorhizobium meliloti* plasmid pRm1132f replicates by a rolling-circle mechanism. *J Bacteriol* **183**:2704-8.
- Bartosik, D., J. Baj, y M. Wlodarczyk.** 1998. Molecular and functional analysis of pTAV320, a repABC-type replicon of the *Paracoccus versutus* composite plasmid pTAV1. *Microbiology.* **144**:3149-57.
- Bartosik, D., M. Witkowska, J. Baj, y M. Wlodarczyk.** 2001. Characterization and sequence analysis of the replicator region of the novel plasmid pALC1 from *Paracoccus alcaliphilus*. *Plasmid* **45**:222-6.
- Batut, J., B. Terzaghi, M. Ghérardi, M. Huguet, E. Terzaghi, A. M. Garnerone, P. Boistard, y T. Huguet.** 1985. Localization of a symbiotic fix region on *Rhizobium meliloti* pSym megaplasmid more than 200 kilobases from the nod-nif region. *Mol. Gen.* **199**:232-239.
- Bayer, M., R. Iberer, K. Bischof, E. Rassi, E. Stabentheiner, G. Zellnig, y G. Koraimann.** 2001. Functional and mutational analysis of p19, a DNA transfer protein with muramidase activity. *J Bacteriol* **183**:3176-83.
- Becker, A., M. Schmidt, W. Jager, y A. Puhler.** 1995. New gentamicin-resistance and *lacZ* promoter-probe cassettes suitable for insertion mutagenesis and generation of transcriptional fusions. *Gene* **162**:37-9.

- Becker, E. C., y R. J. Meyer.** 2003. Relaxed specificity of the R1162 nickase: a model for evolution of a system for conjugative mobilization of plasmids. *J Bacteriol* **185**:3538-46.
- Beringer, J. E.** 1974. R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *J Gen Microbiol* **84**:188-98.
- Bertani, G.** 1951. Studies on lysogenesis I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **62**:293-300.
- Bignell, C., y C. M. Thomas.** 2001. The bacterial ParA-ParB partitioning proteins. *J Biotechnol.* **13**:1-34.
- Boivin, C., S. Camut, C. A. Malpica, G. Truchet, y C. Rosenberg.** 1990. *Rhizobium meliloti* genes encoding catabolism of trigonelline are induced under symbiotic conditions. *Plant Cell* **2**:1157-1170. **2**:1157-1170.
- Brewin, N. J., J. E. Beringer, y A. W. B. Johnston.** 1980. Plasmid-mediated Transfer of Host-range Specificity Between Two Strains of *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.* **120**:413-420.
- Brom, S., A. García de los Santos, M. L. Girard, y G. P. Davila, R. Romero, D. .** 1991. High frequency rearrangements in *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli plasmids. *J. Bacteriol.* **173**:1344-1346.
- Brom, S., A. Garcia de los Santos, T. Stepkowsky, M. Flores, y G. R. Dávila, D. Palacios, R. .** 1992. Different plasmids of *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli are required for optimal symbiotic performance. *J. Bacteriol.* **174**:5183-5189.
- Brom, S., L. Girard, A. Garcia-de los Santos, J. M. Sanjuan-Pinilla, J. Olivares, y J. Sanjuan.** 2002. Conservation of plasmid-encoded traits among bean-nodulating *Rhizobium* species. *Appl Environ Microbiol* **68**:2555-61.
- Brom, S., L. Girard, C. Tun-Garrido, A. Garcia-de los Santos, P. Bustos, V. Gonzalez, y D. Romero.** 2004. Transfer of the symbiotic plasmid of *Rhizobium etli* CFN42 requires cointegration with p42a, which may be mediated by site-specific recombination. *J Bacteriol* **186**:7538-48.
- Burgos, P. A., E. Velazquez, y N. Toro.** 1996. Identification and distribution of plasmid-type A replicator region in rhizobia. *Mol Plant Microbe Interact* **9**:843-9.
- Burkhardt, B., D. Schillik, y A. Pühler.** 1987. Physical characterization of *Rhizobium meliloti* megaplasmids. *Plasmid* **17**:13-25.
- Byrd, D. R., y S. W. Matson.** 1997. Nicking by transesterification: the reaction catalysed by a relaxase. *Mol Microbiol* **25**:1011-22.
- Cabezón, E., J. I. Sastre, y F. de la Cruz.** 1997. Genetic evidence of a coupling role for the TraG protein family in bacterial conjugation. *Mol Gen Genet.* **254**:400-6.
- Cascales, E., y P. J. Christie.** 2004. Definition of a bacterial type IV secretion pathway for a DNA substrate. *Science* **304**:1170-1173.
- Cascales, E., y P. J. Christie.** 2003. The versatile bacterial type IV secretion systems. *Nat Rev Microbiol.* **1**:137-49.
- Casse, F., C. Boucher, J. S. Julliot, M. Michel, y J. Denarie.** 1979. Identification and characterization of large plasmids in *Rhizobium meliloti* using agarose gel electrophoresis. *J. Gen. Microbiol.* **113**:229-242.
- Cava, J. R., P. M. Elias, D. A. Turowski, y K. D. Noel.** 1989. *Rhizobium leguminosarum* CFN42 genetic region encoding lipopolysaccharide structures essential for complete nodule development on bean plants. *J. Bacteriol.* **171**:8-15.
- Cevallos, M. A., R. Cervantes-Rivera, y R. M. Gutierrez-Rios.** 2008. The *repABC* plasmid family. *Plasmid* **60**:19-37.

- Cevallos, M. A., H. Porta, J. Izquierdo, C. Tun-Garrido, A. Garcia-de-los-Santos, G. Davila, y S. Brom.** 2002. *Rhizobium etli* CFN42 contains at least three plasmids of the *repABC* family: a structural and evolutionary analysis. *Plasmid* **48**:104-16.
- Clewell, D. B., S. E. Flannagan, y D. D. Jaworski.** 1995. Unconstrained bacterial promiscuity: The Tn916-Tn1545 family of conjugative transposons. *Trends Microbiol.* **3**:229-236.
- Cook, D. M., y S. K. Farrand.** 1992. The oriT Region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti Plasmid pTiC58 Shares DNA Sequence Identity with the Transfer Origins of RSF1010 and RK2/RP4 and with T-Region Borders. *Journal of Bacteriology* **174**:6238-6246.
- Cha, C., P. Gao, Y. C. Chen, P. D. Shaw, y S. K. Farrand.** 1998. Production of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by gram-negative plant-associated bacteria. *Mol Plant Microbe Interact.* **11**:1119-29.
- Chai, Y., y S. C. Winans.** 2005. Amino-terminal protein fusions to the TraR quorum-sensing transcription factor enhance protein stability and autoinducer-independent activity. *J Bacteriol* **187**:1219-26.
- Chai, Y., y S. C. Winans.** 2005. A small antisense RNA downregulates expression of an essential replicase protein of an *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid. *Mol Microbiol.* **56**:1574-85.
- Charles, T. C., y T. M. Finan.** 1991. Analysis of a 1600-kilobase *Rhizobium meliloti* megaplasmid using defined deletions generated in vivo. *Genetics* **127**:5-20.
- Charles, T. C., y T. M. Finan.** 1990. Genetic map of *Rhizobium meliloti* megaplasmid pRmeSU47b. *J. Bacteriol.* **172**:2469-2476.
- Chen, L., Y. Chen, D. W. Wood, y E. W. Nester.** 2002. A new type IV secretion system promotes conjugal transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol.* 2002 Sep;184(17):4838-45. **184**:4838-45.
- Cho, H., y S. C. Winans.** 2007. TraA, TraC and TraD autorepress two divergent quorum-regulated promoters near the transfer origin of the Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol Microbiol* **63**:1769-82.
- Danino, V. E. W., A. Edwards, A. Downie, J. A.** 2003. Recipient-induced transfer of the symbiotic plasmid pRL1J1 in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* is regulated by a quorum-sensing relay. *Mol Microbiol* **50**:511-25.
- David, M., M. L. Daveran, J. Batut, A. Dedieu, O. Domergue, J. Ghai, C. Hertig, P. Boistard, y D. Kahn.** 1988. Cascade regulation of *nif* gene SmA818 expression in *Rhizobium meliloti*. *Cell* **54**:671-683.
- Davison, J.** 1999. Genetic exchange between bacteria in the environment. *Plasmid* **42**:73-91.
- de Paz, H. D., F. J. Sangari, S. Bolland, J. M. Garcia-Lobo, C. Dehio, F. de la Cruz, y M. Llosa.** 2005. Functional interactions between type IV secretion systems involved in DNA transfer and virulence. *Microbiology* **151**:3505-16.
- DeJong, T. M., N. J. Brewin, y D. A. Phillips.** 1981. Effects of plasmid content in *Rhizobium leguminosarum* on pea nodule activity and plant growth. *J. Gen. Microbiol.* **124**:1-7.
- Del Papa, M. F., M. Pistorio, L. J. Balague, W. O. Draghi, C. Wegener, A. Peticari, K. Niehaus, y A. Lagares.** 2003. A microcosms study on the influence of pH and the host-plant on the soil persistence of different alfalfa-nodulating rhizobia. *Biology and Fertility of Soils* **39**:112-116.
- DelVecchio, V. G., V. Kapatral, R. J. Redkar, G. Patra, C. Mujer, T. Los, N. Ivanova, I. Anderson, A. Bhattacharyya, A. Lykidis, G. Reznik, L. Jablonski, N. Larsen, M. D'Souza, A. Bernal, M. Mazur, E. Goltsman, E. Selkov, P. H. Elzer, S. Hagius, D. O'Callaghan, J. J. Letesson, R. Haselkorn, N. Kyrpides, y**

- R. Overbeek.** 2002. The genome sequence of the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*. Proc Natl Acad Sci U S A **99**:443-8.
- Ding, H., y M. F. Hynes.** 2009. Plasmid transfer systems in the rhizobia. Can J Microbiol. Review. **55**:917-27.
- Ding, Z., K. Atmakuri, y P. J. Christie.** 2003. The outs and ins of bacterial type IV secretion substrates. Trends Microbiol. **11**:527-535.
- Eckhardt, T.** 1978. A rapid method for the identification of plasmid deoxyribonucleic acid in bacteria. Plasmid **1**:584-588.
- Fang, Y., y A. M. Hirsch.** 1998. Studying early nodulin gene ENOD40 expression and induction by nodulation factor and cytokinin in transgenic alfalfa. Plant Physiol **116**:53-68.
- Finan, T. M., I. Oresnik, y A. Bottacin.** 1988. Mutants of *Rhizobium meliloti* defective in succinate metabolism. J. Bacteriol. **170**.
- Finan, T. M., S. Weidner, K. Wong, J. Buhrmester, P. Chain, F. J. Vorholter, I. Hernandez-Lucas, A. Becker, A. Cowie, J. Gouzy, B. Golding, y A. Puhler.** 2001. The complete sequence of the 1,683-kb pSymB megaplasmid from the N₂-fixing endosymbiont *Sinorhizobium meliloti*. Proc Natl Acad Sci U S A **98**:9889-94.
- Francia, M. V., A. Varsaki, M. P. Garcillan-Barcia, A. Latorre, C. Drinas, y F. de la Cruz.** 2004. A classification scheme for mobilization regions of bacterial plasmids. FEMS Microbiol Rev **28**:79-100.
- Fred, E. B., I. L. Baldwin, y E. McCoy.** 1937. Concerning fossil remains of leguminous plants. Science **85**.
- Freiberg, C., R. Fellay, A. Bairoch, W. J. Broughton, A. Rosenthal, y X. Perret.** 1997. Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes. Nature **387**:394-401.
- Fry, J. C., y M. J. Day.** 1990. Bacterial genetics in natural environments. Chapman and Hall. London.
- Furste, J. P., W. Pansegrau, G. Ziegelin, M. Kroger, y E. Lanka.** 1989. Conjugative transfer of promiscuous IncP plasmids: interaction of plasmid-encoded products with the transfer origin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **86**:1771-1775.
- Galas, D. J., y M. Chandler.** 1989. Bacterial insertion sequence. Mobile DNA. Berg, D., Howe, M., (eds) American Society for Microbiology, Washington DC.:109-162.
- Galibert, F., T. M. Finan, S. R. Long, A. Puhler, P. Abola, F. Ampe, F. Barloy-Hubler, M. J. Barnett, A. Becker, P. Boistard, G. Bothe, M. Boutry, L. Bowser, J. Buhrmester, E. Cadieu, D. Capela, P. Chain, A. Cowie, R. W. Davis, S. Dreano, N. A. Federspiel, R. F. Fisher, S. Gloux, T. Godrie, A. Goffeau, B. Golding, J. Gouzy, M. Gurjal, I. Hernandez-Lucas, A. Hong, L. Huizar, R. W. Hyman, T. Jones, D. Kahn, M. L. Kahn, S. Kalman, D. H. Keating, E. Kiss, C. Komp, V. Lelaure, D. Masuy, C. Palm, M. C. Peck, T. M. Pohl, D. Portetelle, B. Purnelle, U. Ramsperger, R. Surzycki, P. Thebault, M. Vandenbol, F. J. Vorholter, S. Weidner, D. H. Wells, K. Wong, K. C. Yeh, y J. Batut.** 2001. The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. Science **293**:668-72.
- Garcillan-Barcia, M. P., M. V. Francia, y F. de la Cruz.** 2009. The diversity of conjugative relaxases and its application in plasmid classification. FEMS Microbiol Rev **33**:657-87.
- Geniaux, E., G. Laguerre, y N. Amarger.** 1993. Comparison of geographically distant populations of *Rhizobium* isolated from root nodules of *Phaseolus vulgaris*. Mol. Ecol. **2**:1-8.
- Glazebrook, J., y G. C. Walker.** 1989. A novel exopolysaccharide can function in place of the calcofluor-binding exopolysaccharide in nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*. Cell **56**:661-672.

- Gomis-Ruth, F. X., y M. Coll.** 2006. Cut and move: protein machinery for DNA processing in bacterial conjugation. *Curr Opin Struct Biol* **16**:744-52.
- Gomis-Ruth, F. X., G. Moncalian, R. Perez-Luque, A. Gonzalez, E. Cabezon, F. de la Cruz, y M. Coll.** 2001. The bacterial conjugation protein TrwB resembles ring helicases and F1-ATPase. *Nature* **409**:637-41.
- Gomis-Ruth, F. X., M. Sola, F. de la Cruz, y M. Coll.** 2004. Coupling factors in macromolecular type-IV secretion machineries. *Curr Pharm Des* **10**:1551-65.
- Gonzalez, V., J. L. Acosta, R. L. Santamaría, P. Bustos, J. L. Fernandez, I. L. Hernández González, R. Díaz, M. Flores, R. Palacios, J. Mora, y G. Davila.** 2010. Conserved symbiotic plasmid DNA sequences in the multireplicon pangenomic structure of *Rhizobium etli* Appl. Environ. Microbiol. **76**:1604-1614.
- Gonzalez, V., P. Bustos, M. A. Ramirez-Romero, A. Medrano-Soto, H. Salgado, I. Hernandez-Gonzalez, J. C. Hernandez-Celis, V. Quintero, G. Moreno-Hagelsieb, L. Girard, O. Rodriguez, M. Flores, M. A. Cevallos, J. Collado-Vides, D. Romero, y G. Davila.** 2003. The mosaic structure of the symbiotic plasmid of *Rhizobium etli* CFN42 and its relation to other symbiotic genome compartments. *Genome Biol* **4**:R36.
- Gonzalez, V., R. I. Santamaria, P. Bustos, I. Hernandez-Gonzalez, A. Medrano-Soto, G. Moreno-Hagelsieb, S. C. Janga, M. A. Ramirez, V. Jimenez-Jacinto, J. Collado-Vides, y G. Davila.** 2006. The partitioned *Rhizobium etli* genome: genetic and metabolic redundancy in seven interacting replicons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:3834-9.
- Goodner, B., G. Hinkle, S. Gattung, N. Miller, M. Blanchard, B. Qurollo, B. S. Goldman, Y. Cao, M. Askenazi, C. Halling, L. Mullin, K. Houmiel, J. Gordon, M. Vaudin, O. Iartchouk, A. Epp, F. Liu, C. Wollam, M. Allinger, D. Doughty, C. Scott, C. Lappas, B. Markelz, C. Flanagan, C. Crowell, J. Gurson, C. Lomo, C. Sear, G. Strub, C. Cielo, y S. Slater.** 2001. Genome sequence of the plant pathogen and biotechnology agent *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science* **294**:2323-8.
- Grahn, A. M., J. Haase, D. H. Bamford, y E. Lanka.** 2000. Components of the RP4 conjugative transfer apparatus form an envelope structure bridging inner and outer membranes of donor cells: implications for related macromolecule transport systems. *J Bacteriol.* **182**:1564-74.
- Grohmann, E., G. Muth, y M. Espinosa.** 2003. Conjugative plasmid transfer in gram-positive bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**:277-301, table of contents.
- Hahn, M., y H. Hennecke.** 1987. Mapping of a *Bradyrhizobium japonicum* DNA region carrying genes for symbiosis and an asymmetric accumulation of reiterated sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**:2247-2252.
- Hamilton, C. M., H. Lee, P. L. Li, D. M. Cook, K. R. Piper, S. B. von Bodman, E. Lanka, W. Ream, y S. K. Farrand.** 2000. TraG from RP4 and TraG and VirD4 from Ti plasmids confer relaxosome specificity to the conjugal transfer system of pTiC58. *J Bacteriol.* **182**:1541-8.
- He, X., W. Chang, D. L. Pierce, L. O. Seib, J. Wagner, y C. Fuqua.** 2003. Quorum sensing in *Rhizobium* sp. strain NGR234 regulates conjugal transfer (tra) gene expression and influences growth rate. *J Bacteriol* **185**:809-22.
- Herrera-Cervera, J. A., J. M. Sanjuan-Pinilla, J. Olivares, y J. Sanjuan.** 1998. Cloning and identification of conjugative transfer origins in the *Rhizobium meliloti* genome. *J Bacteriol* **180**:4583-90.
- Hirsch, P. R., M. van Montagu, A. W. B. Johnston, N. J. Brewin, y J. Schell.** 1980. Physical identification of bacteriocinogenic, nodulation, and other plasmids in strains of *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.* **120**:403-412.

- Hooykaas, P. J. J., M. den Dulk-Ras, A. J. G. Regensburg-Twink, A. A. van Brussel, y R. A. Schilperoort.** 1985. Expression of a *Rhizobium phaseoli* sym plasmid in *R. trifolii* and *Agrobacterium tumefaciens*: incompatibility with a *R. trifolii* sym plasmid. . Plasmid **14**:47-52.
- Hooykaas, P. J. J. S., F. G. M., y R. A. Schilperoort.** 1982. Identification of the Sym plasmid of *Rhizobium leguminosarum* strain 1001 and its transfer to an expression in other rhizobia and *Agrobacterium tumefaciens*. Plasmid **8**:73-82.
- Huguet, T. R., C., F. Casse-Delbart, P. de Lajudie, L. Jouanin, J. Batut, D. P. Boistard, J. S. Julliot, y J. Dénarié.** 1983. Studies on *Rhizobium meliloti* plasmids and on their role in the control of nodule formation and nitrogen fixation: The pSym megaplasmid and the other large plasmids. Molecular Genetics of the Bacteria-Plant Interaction.:35-45
- Hynes, M. F., K. Brucksch, y U. Priefer.** 1988. Melanin production encoded by a cryptic plasmid in a *Rhizobium leguminosarum* strain. . Arch. Microbiol. **150**:326-332.
- Hynes, M. F., y T. M. Finan.** 1997. General Genetic Knowledge. The Rhizobiaceae. Spanik, H. P., Kondorosi, A., y Hooykaas, P. J. J., Kluwers Academics Publishers.:25-43.
- Hynes, M. F., y N. F. McGregor.** 1990. Two plasmids other than the nodulation plasmid are necessary for formation of nitrogen-fixing nodules by *Rhizobium leguminosarum*. . Mol. Microbiol. **4**:567-571.
- Hynes, M. F., R. Simon, P. Miiller, K. Niehaus, M. Labes, y A. Pühler.** 1986. The two megaplasmid of *Rhizobium meliloti* are involved in the effective nodulation of alfalfa. Mol. Gen. Genet. **202**:356-362.
- Hynes, M. F., R. Simon, y A. Puhler.** 1985. The development of plasmid-free strains of *Agrobacterium tumefaciens* by using incompatibility with a *Rhizobium meliloti* plasmid to eliminate pAtC58. Plasmid **13**:99-105.
- Izquierdo, J., T. Venkova-Canova, M. A. Ramirez-Romero, J. Tellez-Sosa, I. Hernandez-Lucas, J. Sanjuan, y M. A. Cevallos.** 2005. An antisense RNA plays a central role in the replication control of a repC plasmid. Plasmid **54**:259-77.
- Jensen, H. L.** 1942. Nitrogen fixation in leguminous plants. I. General characters of root nodule bacteria isolated from species of *Medicago* and *Trifolium* in Australia. Proc. Linn. Soc. N. S. W. **66**:98-108.
- Johnston, A. W. B., J. L. Beynon, A. V. Buchanan-Wollaston, S. M. Setchell, P. R. Hirsch, y J. E. Beringer.** 1978. High frequency transfer of nodulating ability between strains and species of *Rhizobium*. . Nature **276**:634-636 **276**:634-636.
- Jouanin, L., P. De Lajudie, S. Bazetoux, y T. Huguet.** 1981. DNA sequence homology in *Rhizobium meliloti* plasmids. Mol Gen Genet. **182**:189-95.
- Judd, P. K., R. B. Kumar, y A. Das.** 2005. Spatial location and requirements for the assembly of the *Agrobacterium tumefaciens* type IV secretion s. . Proc. Natl. Acad. Sci. USA **102**:11498-11503.
- Kado, C. I., y S. T. Liu.** 1981. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. . J Bacteriol **145**:1365-73.
- Kajjalainen, S., y K. Lindström.** 1989. Restriction fragment length polymorphism analysis of *Rhizobium galegae* strains. . J. Bacteriol. **171**:5561-3269.
- Kaluza, K., H. M., y H. Hennecke.** 1985. Repeated sequences similar to insertion elements clustered around the *nif* region of the *Rhizobium japonicum* genome. J. Bacteriol. **162**:535-542.
- Kaneko, T., Y. Nakamura, S. Sato, E. Asamizu, T. Kato, S. Sasamoto, A. Watanabe, K. Idesawa, A. Ishikawa, K. Kawashima, T. Kimura, Y. Kishida, C. Kiyokawa, M. Kohara, M. Matsumoto, A. Matsuno,**

- Y. Mochizuki, S. Nakayama, N. Nakazaki, S. Shimpo, M. Sugimoto, C. Takeuchi, M. Yamada, y S. Tabata. 2000. Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. DNA Res 7:331-8.
- Kaneko, T., Y. Nakamura, S. Sato, K. Minamisawa, T. Uchiumi, S. Sasamoto, A. Watanabe, K. Idesawa, M. Iriguchi, K. Kawashima, M. Kohara, M. Matsumoto, S. Shimpo, H. Tsuruoka, T. Wada, M. Yamada, y S. Tabata. 2002. Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. DNA Res 9:189-97.
- Kinkle, B. K., M. J. Sadowski, E. L. Schmidt, y W. C. Koskinen. 1991. Plasmids JP4 and r68.45 can be transferred between populations of Bradyrhizobia in non-sterile soil. Appl. Environ. Microbiol. 59:1762-1766.
- Kinkle, B. K., y E. L. Schmidt. 1991. Transfer of the Pea Symbiotic Plasmid pJB5JI in Nonsterile Soil. Appl Environ Microbiol 57:3264-3269.
- Kirchner, O., y A. Tauch. 2003. Tools for genetic engineering in the amino acid-producing bacterium *Corynebacterium glutamicum*. Journal of Biotechnology 104:287.
- Kleckner, N. 1981. Transposable and illegitimate recombination in procaryotes. Molecular and cellular mechanisms of mutagenesis. Lemontt, J. F., Generoso, W. M., (eds) Plenum, New York.:245-258.
- Klein, S., A. M. Hirsch, C. A. Smith, y E. R. Signer. 1988. Interaction of nod and exo *Rhizobium meliloti* in alfalfa nodulation. Mol Plant Microbe Interact. 2:94-100.
- Kovach, M. E., P. H. Elzer, D. S. Hill, G. T. Robertson, M. A. Farris, R. M. Roop, 2nd, y K. M. Peterson. 1995. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. Gene 166:175-6.
- Krall, L., U. Wiedemann, G. Unsin, S. Weiss, N. Domke, y C. Baron. 2002. Detergent extraction identifies different VirB protein subassemblies of the type IV secretion machinery in the membranes of *Agrobacterium tumefaciens*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:11405-11410.
- Kuhn, S., M. Stiens, A. Pühler, y A. Schlüter. 2008. Prevalence of pSmeSM11a-like plasmids in indigenous *Sinorhizobium meliloti* strains isolated in the course of a field release experiment with genetically modified *S. meliloti* strains. FEMS Microbiol Ecol. 63:118-31.
- Laemmli. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680-685.
- Lamb, J. W., G. Hombrecher, y A. W. B. Johnston. 1982. Plasmid determined nodulation and nitrogen fixation abilities in *Rhizobium phaseoli*. Mol. Gen. Genet. 186:449-452.
- Lanka, E., y B. M. Wilkins. 1995. DNA processing reactions in bacterial conjugation. Annu Rev Biochem 64:141-69.
- Lawley, T. D., W. A. Klimke, M. J. Gubbins, y L. S. Frost. 2003. F factor conjugation is a true type IV secretion system. FEMS Microbiol Lett 224:1-15.
- Ledeboer, A. M., A. J. Krol, J. J. Dons, F. Spier, R. A. Schilperoort, I. Zaenen, N. van Larebeke, y J. Schell. 1976. On the isolation of TI-plasmid from *Agrobacterium tumefaciens*. Nucleic Acids Res 3:449-63.
- Lee, K. B., P. De Backer, T. Aono, C. T. Liu, S. Suzuki, T. Suzuki, T. Kaneko, M. Yamada, S. Tabata, D. M. Kupfer, F. Z. Najjar, G. B. Wiley, B. Roe, T. T. Binnewies, D. W. Ussery, W. D'Haese, J. D. Herder, D. Gevers, D. Vereecke, M. Holsters, y H. Oyaizu. 2008. The genome of the versatile nitrogen fixer *Azorhizobium caulinodans* ORS571. BMC Genomics 9:271. 9.

- Li, P. L., D. M. Everhart, y S. K. Farrand. 1998. Genetic and sequence analysis of the *trb* locus on pTiC58, a mating-pair formation system related to members of the type IV secretion family. *J. Bacteriol.* **180**:6164-6172.
- Li, P. L., y S. K. Farrand. 2000. The replicator of the nopaline-type Ti plasmid pTiC58 is a member of the *repABC* family and is influenced by the TraR-dependent quorum-sensing regulatory system. *J. Bacteriol.* **182**:179-88.
- Li, Q., X. Zhang, L. Zou, Q. Chen, D. P. Fewer, y K. Lindstrom. 2009. Horizontal gene transfer and recombination shape mesorhizobial populations in the gene center of the host plants *Astragalus luteolus* and *Astragalus ernestii* in Sichuan, China. *FEMS Microbiol Ecol* **70**:71-9.
- Lilley, A. K., y M. J. Bailey. 1997. The acquisition of indigenous plasmids by a genetically marked *Pseudomonas* population colonizing the sugar beet phytosphere is related to local environmental conditions. *Adv. Appl. Microbiol.* **63**:1577-1583.
- Lilley, A. K., J. C. Fry, M. J. Day, y M. J. Bailey. 1994. In situ transfer of an exogenously isolated plasmid between *Pseudomonas* spp in the sugar beet rhizosphere. *Microbiology* **140**:27-33.
- Lithgow, J. K., A. Wilkinson, A. Hardman, B. Rodelas, F. Wisniewski-Dye, P. Williams, y J. A. Downie. 2000. The regulatory locus *cinRI* in *Rhizobium leguminosarum* controls a network of quorum-sensing loci. *Mol Microbiol* **37**:81-97.
- Lowendorf, H. S., A. M. Baya, y M. Alexander. 1981. Survival of *Rhizobium* in Acid Soils. *Appl Environ Microbiol* **42**:951-957.
- Llosa, M., S. Bolland, y F. de la Cruz. 1991. Structural and functional analysis of the origin of conjugal transfer of the broad-host-range IncW plasmid R388 and comparison with the related IncN plasmid R46. *Mol Gen Genet* **226**:473-83.
- Llosa, M., F. X. Gomis-Ruth, M. Coll, y F. de la Cruz Fd. 2002. Bacterial conjugation: a two-step mechanism for DNA transport. *Mol Microbiol* **45**:1-8.
- MacLellan, S. R., L. A. Smallbone, C. D. Sibley, y T. M. Finan. 2005. The expression of a novel antisense gene mediates incompatibility within the large *repABC* family of alpha-proteobacterial plasmids. *Mol Microbiol* **55**:611-23.
- Marques, M. V., A. M. da Silva, y S. L. Gomes. 2001. Genetic organization of plasmid pXF51 from the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Plasmid* **45**:184-99.
- Marri, P. R., W. Hao, y G. B. Golding. 2006. Gene gain and gene loss in *Streptococcus*: is it driven by habitat? *Mol Biol Evol* **23**:2379-91.
- Marri, P. R., W. Hao, y G. B. Golding. 2007. The role of laterally transferred genes in adaptive evolution. *BMC Evol Biol* **7 Suppl 1**:S8.
- Martínez-Romero, E., y M. Rosenblueth. 1990. Increased bean (*Phaseolus vulgaris* L.) nodulation competitiveness of genetically modified *Rhizobium* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:2384-2388.
- Martínez, E., R. Palacios, y F. Sánchez. 1987. Nitrogen fixing nodules induced by *Agrobacterium tumefaciens* harbouring *Rhizobium phaseoli* plasmids. *J. Bacteriol.* **169**:2828-2834.
- McAnulla, C., A. Edwards, M. Sanchez-Contreras, R. G. Sawers, y J. A. Downie. 2007. Quorum-sensing-regulated transcriptional initiation of plasmid transfer and replication genes in *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*. *Microbiology.* **153**:2074-82.

- Mercado-Blanco, J., y J. Olivares.** 1994. The large nonsymbiotic plasmid pRmeGR4a of *Rhizobium meliloti* GR4 encodes a protein involved in replication that has homology with the RepC protein of *Agrobacterium* plasmids. *Plasmid* **32**:75-9.
- Mercado-Blanco, J., y J. Olivares.** 1993. Stability and transmissibility of the cryptic plasmids of *Rhizobium meliloti* GR4: Their possible use in the construction of cloning vectors for rhizobia. *Arch. Microbiol.* **160**:477-485.
- Mercado-Blanco, J., y N. Toro.** 1996. Plasmids in Rhizobia: the role of nonsymbiotic plasmids. *Molecular Plant Microbe Interaction* **9**:535-545. .
- Molbak, L., S. Molin, y N. Kroer.** 2007. Root growth and exudate production define the frequency of horizontal plasmid transfer in the rhizosphere. *FEMS Microbiol Ecol* **59**:167-76.
- Moncalián, G., E. Cabezón, I. Alkorta, M. Valle, F. Moro, J. M. Valpuesta, F. M. Goñi, y F. de la Cruz.** 1999. Characterization of ATP and DNA binding activities of TrwB, the protein essential in plasmid R388 conjugation. *J. Biol. Chem.* **274**:36117-36124.
- Moré, M. I., L. D. Finger, J. L. Stryker, C. Fuqua, A. Eberhard, y S. C. Winans.** 1996. Enzymatic synthesis of a quorum-sensing autoinducer through use of defined substrates. *Science* **272**:1655-1658.
- Murphy, E.** 1989. Transposable elements in Gram positive bacteria. *Mobile DNA*. Berg, D., Howe, M., (eds) American Society for Microbiology, Washington D.C.:269-288.
- Nishiguchi, R., M. Takanami, y A. Oka.** 1987. Characterization and sequence determination of the hairy root inducing plasmid pRiA4b. *Mol. Gen. Genet.* **206**:1-8.
- Nunez, B., y F. De La Cruz.** 2001. Two atypical mobilization proteins are involved in plasmid CloDF13 relaxation. *Mol Microbiol* **39**:1088-99.
- Nuti, M. P., A. A. Lepidi, R. K. S. Prakash, R. A., y F. C. Cannon.** 1979. Evidence for nitrogen fixation genes on indigenous *Rhizobium* plasmids. . *Nature* **282**:533-535. **282**:533-535.
- O'Connell, M. P. H., M. F., y A. Puhler.** 1987. Incompatibility between a *Rhizobium* Sym plasmid and a Ri plasmid of *Agrobacterium*. . *Plasmid*. **18**:156-63.
- Ogawa, J., y S. R. Long.** 1995. The *Rhizobium meliloti* groELc locus is required for regulation of early nod genes by the transcription activator NodD. *Genes Dev* **9**:714-29.
- Pankhurst, C., P. Macdonald, y J. Reeves.** 1986. Enhanced nitrogen fixation and competitiveness for nodulation of *Lotus pedunculatus* by a plasmid-cured derivative of *Rhizobium loti*. *J. Gen. Microbiol.* **132**:2321-2328.
- Pansegrau, W., y E. Lanka.** 1991. Common sequence motifs in DNA relaxases and nick regions from a variety of DNA transfer systems. *Nucleic Acids Res* **19**:3455.
- Pansegrau, W., W. Schroder, y E. Lanka.** 1994. Concerted action of three distinct domains in the DNA cleaving-joining reaction catalyzed by relaxase (TraI) of conjugative plasmid RP4. *J Biol Chem* **269**:2782-9.
- Pappas, K. M., y S. C. Winans.** 2003. A LuxR-type regulator from *Agrobacterium tumefaciens* elevates Ti plasmid copy number by activating transcription of plasmid replication genes. *Mol Microbiol* **48**:1059-73.
- Paulsen, I. T., L. Banerjee, G. S. Myers, K. E. Nelson, R. Seshadri, T. D. Read, D. E. Fouts, J. A. Eisen, S. R. Gill, J. F. Heidelberg, H. Tettelin, R. J. Dodson, L. Umayam, L. Brinkac, M. Beanan, S. Daugherty, R. T. DeBoy, S. Durkin, J. Kolonay, R. Madupu, W. Nelson, J. Vamathevan, B. Tran, J. Upton, T. Hansen, J.**

- Shetty, H. Khouri, T. Utterback, D. Radune, K. A. Ketchum, B. A. Dougherty, y C. M. Fraser. 2003. Role of mobile DNA in the evolution of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Science* **299**:2071-4.
- Perez-Mendoza, D., A. Dominguez-Ferreras, S. Munoz, M. J. Soto, J. Olivares, S. Brom, L. Girard, J. A. Herrera-Cervera, y J. Sanjuan. 2004. Identification of functional *mob* regions in *Rhizobium etli*: evidence for self-transmissibility of the symbiotic plasmid pRetCFN42d. *J Bacteriol* **186**:5753-61.
- Perez-Mendoza, D., M. Lucas, S. Munoz, J. A. Herrera-Cervera, J. Olivares, F. de la Cruz, y J. Sanjuan. 2006. The relaxase of the *Rhizobium etli* symbiotic plasmid shows *nic* site cis-acting preference. *J Bacteriol* **188**:7488-99.
- Pérez-Mendoza, D., E. Sepúlveda, V. Pando, S. Muñoz, J. Nogales, J. Olivares, M. J. Soto, J. A. Herrera-Cervera, D. Romero, S. Brom, y S. J. 2005. Identification of the *rctA* gene, which is required for repression of conjugative transfer of rhizobial symbiotic megaplasmids. *J Bacteriol*. **187**:7341-50.
- Perret, X., H. Kobayashi, y J. Collado-Vides. 2003. Regulation of expression of symbiotic genes in *Rhizobium* sp. NGR234. *Indian J Exp Biol* **41**:1101-13.
- Piper, K. R., y S. K. Farrand. 2000. Quorum sensing but not autoinduction of Ti plasmid conjugal transfer requires control by the opine regulon and the antiactivator TraM. *J Bacteriol*. 2000 Feb;182(4):1080-8. **182**:1080-8.
- Pistorio, M., M. F. Del Papa, L. J. Balague, y A. Lagares. 2003. Identification of a transmissible plasmid from an Argentine *Sinorhizobium meliloti* strain which can be mobilised by conjugative helper functions of the European strain *S. meliloti* GR4. *FEMS Microbiol Lett* **225**:15-21.
- Pistorio, M., M. A. Giusti, M. F. Del Papa, W. O. Draghi, M. J. Lozano, G. T. Tejerizo, y A. Lagares. 2008. Conjugal properties of the *Sinorhizobium meliloti* plasmid mobilome. *FEMS Microbiol Ecol* **65**:372-82.
- Pretorius-Güth, I. M., A. Puhler, y R. Simon. 1990. Conjugal transfer of megaplasmid 2 between *Rhizobium meliloti* strains in alfalfa nodules. . *Appl. Environ. Microbiol*. **56**:2354-2359.
- Ramírez-Romero, M. A., P. Bustos, M. L. Girard, O. Rodríguez, M. A. Cevallos, y G. Dávila. 1997. Sequence, localization and characteristics of the replicator region of the symbiotic plasmid of *Rhizobium etli*. . *Microbiology* **143**:2825-2831.
- Ramírez-Romero MA, S. N., Pérez-Oseguera A, Téllez-Sosa J, Cevallos MA. 2000. Structural elements required for replication and incompatibility of the *Rhizobium etli* symbiotic plasmid. *J Bacteriol*. **182**:3117-24.
- Ramírez-Romero, M. A., J. Téllez-Sosa, H. Barrios, A. Pérez-Oseguera, V. Rosas, y M. A. Cevallos. 2001. RepA negatively autoregulates the transcription of the repABC operon of the *Rhizobium etli* symbiotic plasmid basic replicon. *Mol Microbiol*. **42**:195-204.
- Ramsay, J. P., J. T. Sullivan, N. Jambari, C. A. Ortori, S. Heeb, P. Williams, D. A. Barrett, I. L. Lamont, y C. W. Ronson. 2009. A LuxRI-family regulatory system controls excision and transfer of the *Mesorhizobium loti* strain R7A symbiosis island by activating expression of two conserved hypothetical genes. *Mol Microbiol* **73**:1141-55.
- Ramsay, J. P., J. T. Sullivan, G. S. Stuart, I. L. Lamont, y C. W. Ronson. 2006. Excision and transfer of the *Mesorhizobium loti* R7A symbiosis island requires an integrase IntS, a novel recombination directionality factor RdfS, and a putative relaxase RlxS. *Mol Microbiol* **62**:723-34.
- Rastogi, V. K., E. S. P. Bromfield, S. T. Whitwill, y L. R. Barran. 1991. A cryptic plasmid of indigenous *Rhizobium meliloti* possesses reiterated *nodC* and *nifE* genes and undergoes DNA rearrangement. . *Can. J. Microbiol*. **38**:563-568.

- Renalier, M.-H., J. Batut, J. Ghai, B. Terzaghi, M. Gherardi, M. David, A. M. Garnerone, J. Vasse, G. Truchet, T. Huguet, y P. Boistard. 1987. A new symbiotic cluster on the pSym megaplasmid of *Rhizobium meliloti* 2011 carries a functional *fix* gene repeat and a nod locus. . J. Bacteriol. 169:2231-2238. **169**:2231-2238.
- Romero, D., S. Brom, J. Martinez Salazar, M. L. Girard, R. Palacios, y G. Davila. 1991. Amplification and deletion of a *nod-nif* region in the symbiotic plasmid of *Rhizobium phaseoli*. . J. Bacteriol. **173**:2435-2441.
- Rosenberg, C., P. Boistard, J. Dénarié, y F. Casse-Delbart. 1981. Genes controlling early and late functions in symbiosis are located on a megaplasmid in *R. meliloti*. Mol. Gen. Genet. 184:326-333 **184**:326-333.
- Sagulenko, E., V. Sagulenko, J. Chen, y P. J. Christie. 2001. Role of Agrobacterium VirB11 ATPase in T-pilus assembly and substrate selection. J Bacteriol **183**:5813-25.
- Sagulenko, V., E. Sagulenko, S. Jakubowski, E. Spudich, y P. J. Christie. 2001. VirB7 lipoprotein is exocellular and associates with the *Agrobacterium tumefaciens* T pilus. . J. Bacteriol. **183**:3642-3651.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, y T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. . Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanjuan, J., y J. Olivares. 1989. Implication of *nifA* in regulation of genes located on a *Rhizobium meliloti* cryptic plasmid that affect nodulation efficiency. J Bacteriol. **171**:4154-61.
- Schäfer, A., A. Tauch, W. Jäger, J. Kalinowski, G. Thierbach, y A. Pühler. 1994. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmid pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. Gene **145**:69-73.
- Scherzinger, E., V. Kruft, y S. Otto. 1992. Purification of the large mobilization protein of plasmid RSF1010 and characterization of its site-specific DNA-cleaving/DNA-joining activity. Eur J Biochem. 1993 Nov 1;217(3):929-38. **217**:929-38.
- Schmeisser, C., H. Liesegang, D. Krysciak, N. Bakkou, A. Le Quere, A. Wollherr, I. Heinemeyer, B. Morgenstern, A. Pommerening-Roser, M. Flores, R. Palacios, S. Brenner, G. Gottschalk, R. A. Schmitz, W. J. Broughton, X. Perret, A. W. Strittmatter, y W. R. Strei. 2009. *Rhizobium* sp. Strain NGR234 Possesses a Remarkable Number of Secretion Systems. Appl. Environ. Microbiol. **75**: 4035–4045
- Schneiker, S., M. Keller, M. Droge, E. Lanka, A. Puhler, y W. Selbitschka. 2001. The genetic organization and evolution of the broad host range mercury resistance plasmid pSB102 isolated from a microbial population residing in the rhizosphere of alfalfa. Nucleic Acids Res **29**:5169-81.
- Schneiker, S., B. Kosier, A. Puhler, y W. Selbitschka. 1999. The *Sinorhizobium meliloti* insertion sequence (IS) element ISRm14 is related to a previously unrecognized IS element located adjacent to the *Escherichia coli* locus of enterocyte effacement (LEE) pathogenicity island. Curr Microbiol **39**:274-81.
- Schofield, P. R., A. H. Gibson, W. F. Dudman, y J. M. Watson. 1987. Evidence for genetic exchange and recombination of *Rhizobium* plasmids in a soil population. Appl. Environ. Microbiol. **53**:2942-2947.
- Schröder, G., y E. Lanka. 2005. The mating pair formation system of conjugative plasmids-A versatile secretion machinery for transfer of proteins and DNA. Plasmid **54**:1-25.
- Schröder, G., y E. Lanka. 2003. TraG-like proteins of type IV secretion systems: functional dissection of the multiple activities of TraG (RP4) and TrwB (R388). J. Bacteriol. **185**:4371-81.
- Schwinghamer, M. W., y R. J. Shepherd. 1980. Formaldehyde-containing slab gels for analysis of denatured, tritium-labeled RNA. Anal Biochem. 1980 Apr;103(2):426-34 **103**:426-34.

- Segovia, L., D. Pinero, R. Palacios, y E. Martínez-Romero. 1991. Genetic structure of a soil population of nonsymbiotic *Rhizobium leguminosarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:426–433.
- Sepúlveda, E., D. Pérez-Mendoza, M. A. Ramírez-Romero, M. J. Soto, I. M. López-Lara, O. Geiger, J. Sanjuán, S. Brom, y D. Romero. 2008. Transcriptional interference and repression modulate the conjugative ability of the symbiotic plasmid of *Rhizobium etli*. *J. Bacteriol.* **190**:4189-97.
- Shirasu, K., Z. Koukolikova-Nicola, B. Hohn, y C. I. Kado. 1994. An inner-membrane-associated virulence protein essential for T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to plants exhibits ATPase activity and similarities to conjugative transfer genes. *Mol. Microbiol.* **11**:581-588.
- Simon, R., B. Hötte, B. Klauke, y B. Kosier. 1991. Isolation and characterization of insertion sequence elements from gram-negative bacteria by using new broad-host-range, positive selection vectors. *J. Bacteriol.* **173**:1502-1508.
- Simon, R., U. Priefer, y A. Pühler. 1983. A Broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Biotechnology* **1**:784-791.
- Simpson, A. J., F. C. Reinach, P. Arruda, F. A. Abreu, M. Acencio, R. Alvarenga, L. M. Alves, J. E. Araya, G. S. Baia, C. S. Baptista, M. H. Barros, E. D. Bonaccorsi, S. Bordin, J. M. Bove, M. R. Briones, M. R. Bueno, A. A. Camargo, L. E. Camargo, D. M. Carraro, H. Carrer, N. B. Colauto, C. Colombo, F. F. Costa, M. C. Costa, C. M. Costa-Neto, L. L. Coutinho, M. Cristofani, E. Dias-Neto, C. Docena, H. El-Dorry, A. P. Facincani, A. J. Ferreira, V. C. Ferreira, J. A. Ferro, J. S. Fraga, S. C. Franca, M. C. Franco, M. Frohme, L. R. Furlan, M. Garnier, G. H. Goldman, M. H. Goldman, S. L. Gomes, A. Gruber, P. L. Ho, J. D. Hoheisel, M. L. Junqueira, E. L. Kemper, J. P. Kitajima, J. E. Krieger, E. E. Kuramae, F. Laigret, M. R. Lambais, L. C. Leite, E. G. Lemos, M. V. Lemos, S. A. Lopes, C. R. Lopes, J. A. Machado, M. A. Machado, A. M. Madeira, H. M. Madeira, C. L. Marino, M. V. Marques, E. A. Martins, E. M. Martins, A. Y. Matsukuma, C. F. Menck, E. C. Miracca, C. Y. Miyaki, C. B. Monteriro-Vitorello, D. H. Moon, M. A. Nagai, A. L. Nascimento, L. E. Netto, A. Nhani, Jr., F. G. Nobrega, L. R. Nunes, M. A. Oliveira, M. C. de Oliveira, R. C. de Oliveira, D. A. Palmieri, A. Paris, B. R. Peixoto, G. A. Pereira, H. A. Pereira, Jr., J. B. Pesquero, R. B. Quaggio, P. G. Roberto, V. Rodrigues, M. R. A. J. de, V. E. de Rosa, Jr., R. G. de Sa, R. V. Santelli, H. E. Sawasaki, A. C. da Silva, A. M. da Silva, F. R. da Silva, W. A. da Silva, Jr., J. F. da Silveira, et al. 2000. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. The *Xylella fastidiosa* consortium of the organization for nucleotide sequencing and analysis. *Nature* **406**:151-9.
- Sorensen, S. J., M. Bailey, L. H. Hansen, N. Kroer, y S. Wuertz. 2005. Studying plasmid horizontal transfer in situ: a critical review. *Nat Rev Microbiol* **3**:700-10.
- Soto, M. J., A. Zorzano, J. Mercado Blanco, V. Lepek, J. Olivares, y N. Toro. 1993. Nucleotide sequence and characterization of *Rhizobium meliloti* nodulation competitiveness genes nfe. *J. Mol. Biol.* **229**:570-576.
- Stern, J. C., y J. F. Schildbach. 2001. DNA recognition by F factor Tral36: highly sequence-specific binding of single-stranded DNA. *Biochemistry* **40**:11586-95.
- Stiens, M., S. Schneiker, M. Keller, S. Kuhn, A. Pühler, y A. Schlüter. 2006. Sequence analysis of the 144-kilobase accessory plasmid pSmeSM11a, isolated from a dominant *Sinorhizobium meliloti* strain identified during a long-term field release experiment. *Appl Environ Microbiol.* 2006 May;72(5):3662-72. **75**:3662-72.
- Stiens, M., S. Schneiker, A. Puhler, y A. Schluter. 2007. Sequence analysis of the 181-kb accessory plasmid pSmeSM11b, isolated from a dominant *Sinorhizobium meliloti* strain identified during a long-term field release experiment. *FEMS Microbiol Lett* **271**:297-309.

- Sullivan, J. T., B. D. Eardly, P. van Berkum, y C. W. Ronson.** 1996. Four unnamed species of nonsymbiotic rhizobia isolated from the rhizosphere of *Lotus corniculatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:2818-2825.
- Sullivan, J. T., H. N. Patrick, W. L. Lowther, D. B. Scott, y C. W. Ronson.** 1995. Nodulating strains of *Rhizobium loti* arise through chromosomal symbiotic gene transfer in the environment. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:8985-9.
- Sullivan, J. T., y C. W. Ronson.** 1998. Evolution of rhizobia by acquisition of a 500-kb symbiosis island that integrates into a *phe*-tRNA gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:5145-5149.
- Sullivan, J. T., J. R. Trzebiatowski, R. W. Cruickshank, J. Gouzy, S. D. Brown, R. M. Elliot, D. J. Fleetwood, N. G. McCallum, U. Rossbach, G. S. Stuart, J. E. Weaver, R. J. Webby, F. J. De Bruijn, y C. W. Ronson.** 2002. Comparative sequence analysis of the symbiosis island of *Mesorhizobium loti* strain R7A. *J Bacteriol* **184**:3086-95.
- Suzuki, K., N. Ohta, Y. Hattori, M. Uraji, A. Kato, y K. Yoshida.** 1998. Novel structural difference between nopaline- and octopine-type *trbJ* genes: construction of genetic and physical map and sequencing of *trb/tral* and *rep* gene clusters of a new Ti plasmid pTi-SAKURA. *J. Biophys. Acta* **1397**:1-7.
- Szipirer, C. Y., M. Faelen, y M. Couturier.** 2000. Interaction between the RP4 coupling protein TraG and the pBHR1 mobilization protein Mob. *Mol Microbiol* **37**:1283-92.
- Tabata, S., P. J. J. Hooykaas, y O. A.** 1989. Sequence determination and characterization of the replicator region in the tumor-inducing plasmid pTiB6S3. *J. Bacteriol.* **171**:1665-1672.
- Tauch, A., S. Schneiker, W. Selbitschka, A. Puhler, L. S. van Overbeek, K. Smalla, C. M. Thomas, M. J. Bailey, L. J. Forney, A. Weightman, P. Ceglowski, T. Pembroke, E. Tietze, G. Schroder, E. Lanka, y J. D. van Elsas.** 2002. The complete nucleotide sequence and environmental distribution of the cryptic, conjugative, broad-host-range plasmid pIPO2 isolated from bacteria of the wheat rhizosphere. *Microbiology* **148**:1637-53.
- Tepfer, D., A. Goldman, N. Pamboukdjian, M. Maille, A. Lepingle, D. Chevalier, J. Dénarié, y C. Rosenberg.** 1988. A plasmid of *Rhizobium meliloti* 41 encodes catabolism of two compounds from root exudate of *Calystegium sepium*. *J. Bacteriol.* **170**:1153-1161.
- Thomason, B., y T. D. Read.** 2006. Shuffling bacterial metabolomes. *Genome Biol* **7**:204.
- Toro, N., y J. Olivares.** 1986. Characterization of a large plasmid of *Rhizobium meliloti* involved in enhancing nodulation. *Mol. Gen. Genet.* **202**:331-335.
- Troxler, J., P. Azelvandre, M. Zala, G. Défago, y D. Haas.** 1997. Conjugal transfer of chromosomal genes between fluorescent Pseudomonads in the wheat rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:213-219.
- Tun-Garrido, C., P. Bustos, V. Gonzalez, y S. Brom.** 2003. Conjugal transfer of p42a from *Rhizobium etli* CFN42, which is required for mobilization of the symbiotic plasmid, is regulated by quorum sensing. *J Bacteriol* **185**:1681-92.
- Tung, W. L., y K. C. Chow.** 1995. A modified medium for efficient electrotransformation of *E. coli*. *Trends in Genetics* **11**:128-129.
- Turner, S. L., K. A. L. Knight, y J. P. W. Young.** 2002. Identification and analysis of rhizobial plasmid origins of transfer. *FEMS Microbiology Ecology* **42** (2002) 227-234 **42**:227-234.
- Turner, S. L., L. Rigottier-Gois, R. S. Power, N. Amarger, y J. P. Young.** 1996. Diversity of *repC* plasmid-replication sequences in *Rhizobium leguminosarum*. *Microbiology* **142** (Pt 7):1705-13.

- Turner, S. L., y J. P. W. Young.** 1995. The replicator region of the *Rhizobium leguminosarum*. cryptic plasmid pRL8JI. FEMS Microbiol. **133**:53-58.
- van Dillewijn, P., M. J. Soto, P. J. Villadas, y N. Toro.** 2001. Construction and environmental release of a *Sinorhizobium meliloti* strain genetically modified to be more competitive for alfalfa nodulation. Appl Environ Microbiol. **67**:3860-5.
- van Elsas, J. D., M. Nikkel, y L. S. van Oberbeek.** 1989. Detection of plasmid RP4 transfer in soil and rhizosphere, and the occurrence of homology to RP4 in soil bacteria. Curr Microbiol **19**:375-381.
- van Elsas, J. D., J. T. Trevors, y M. E. Starodub.** 1988. Bacterial conjugation between Pseudomonads in the rhizosphere of wheat. . FEMS Microbiol. Ecol. **53**:229-306.
- van Elsas, J. D., J. T. Trevors, M. E. Starodub, y L. S. Van Oberbeek.** 1990. Transfer of plasmid RP4 between Pseudomonads ater introduction into soil: influence of spatial and temporal aspects of inoculation. FEMS Microbiol Ecol **73**:1-12.
- van Putten, A. J., G. J. Jochems, R. de Lang, y H. J. Nijkamp.** 1987. Structure and nucleotide sequence of the region encoding the mobilization proteins of plasmid CloDF13. Gene. 1987;51(2-3):171-8. **51**:171-8.
- van Veen, R., H. den Dulk-Ras, T. Bisseling, R. Schilnperoor, y P. Hooykaas.** 1974. Crown gall tumor and root nodule formation by the bacterium *Phyllobacterium myrsinacearum* after the introduction of an *Agrobacterium* Ti plasmid or a *Rhizobium* plasmid. . Mol. Plant. Microb. Inter. **1**:231-234.
- Venkova-Canova, T., N. E. Soberón, M. A. Ramírez-Romero, y M. A. Cevallos.** 2004. Two discrete elements are required for the replication of a *repABC* plasmid: an antisense RNA and a stem-loop structure. Mol Microbiol. **54**:1431-44.
- Vincent, J. M.** 1970. A Manual for the practical study of the root-nodule bacteria. Blackwell Scientific Publications Oxford and Edinburgh. **Handbook N 5**.
- Vlassak, K. M., y J. Vanderleyden.** 1997. Factors influencing nodule occupancy by inoculant rhizobia. Crit. Rev. Plant Sci. **16**:163–229.
- Waters, V. L., y D. G. Guiney.** 1993. Processes at the nick region link conjugation, T-DNA transfer and rolling circle replication. Mol Microbiol. **9**:1123-30.
- Watson, R. J., Y. K. Chan, R. Wheatcroft, A. F. Yang, y S. Han.** 1988. *Rhizobium meliloti* genes required for C4 -dicarboxylate transport and sym-biotic nitrogen fixation are located on a megaplasmid. J. Bacteriol. **170**:927-934.
- Watson, R. J., y R. Heys.** 2006. Replication regions of *Sinorhizobium meliloti* plasmids. Plasmid **55**:87-98.
- Wheatcroft, R., D. G. McRae, y R. W. Miller.** 1990. Changes in the *Rhizobium meliloti* Genome and the Ability to Detect Supercoiled Plasmids During Bacteroid Development. MPMI **1**:9-17.
- Wheatcroft, R., y R. J. Watson.** 1988. Distribution of insertion sequence ISRml in *Rhizobium meliloti* and other Gram negative bacteria. J. Gen. Microbiol. **134**.
- Wilkins, B. M., y E. Lanka.** 1993. DNA processing and replication during plasmid transfer between Gram-negative bacteria. In Bacterial conjugation. D. B. Clewell (ed.). Plenum Press, New York, N.Y.:105-136.
- Winans, S. C.** 1992. Two-way chemical signalling in *Agrobacterium*-plant interactions. Microbiol. Rev. **56**:12-31.
- Winans, S. C., y B. L. Bassler.** 2002. Mob psychology. J Bacteriol **184**:873-883.
- Yarosh, O. K., T. C. Charles, y T. M. Finan.** 1989. Analysis of C4 dicarboxylate transport genes in *Rhizobium meliloti*. . Mol. Microbiol. **3**:813-823.

-
- Young, J. P., L. C. Crossman, A. W. Johnston, N. R. Thomson, Z. F. Ghazoui, K. H. Hull, M. Wexler, A. R. Curson, J. D. Todd, P. S. Poole, T. H. Mauchline, A. K. East, M. A. Quail, C. Churcher, C. Arrowsmith, I. Cherevach, T. Chillingworth, K. Clarke, A. Cronin, P. Davis, A. Fraser, Z. Hance, H. Hauser, K. Jagels, S. Moule, K. Mungall, H. Norbertczak, E. Rabinowitsch, M. Sanders, M. Simmonds, S. Whitehead, y J. Parkhill.** 2006. The genome of *Rhizobium leguminosarum* has recognizable core and accessory components. *Genome Biol* **7**:R34.
- Young, J. P. W., y M. Wexler.** 1988. Sym plasmid and chromosomal genotypes are correlated in field populations of *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.* **134**:2731-2739
- Zhang, S., y R. Meyer.** 1997. The relaxosome protein MobC promotes conjugal plasmid mobilization by extending DNA strand separation to the nick site at the origin of transfer. *Mol Microbiol.* **25**:509-16.
- Zhong, Z., R. Caspi, D. Helinski, V. Knauf, S. Sykes, C. O'Byrne, T. Shea, J. Wilkinson, C. DeLoughery, y A. Toukdarian.** 2003. Nucleotide sequence based characterizations of two cryptic plasmids from the marine bacterium *Ruegeria* isolate PR1b. *Plasmid.* **49**:233-52.
- Zhu, J., P. Oger, B. Schrammeijer, P. Hooykaas, S. Farrand, y S. Winans.** 2000. The bases of crown gall tumorigenesis. *J Bacteriol.* **182**:3885-95.